

**МИНОБРНАУКИ РОССИИ**  
Федеральное государственное учреждение науки  
**«Федеральный исследовательский центр  
«Пушкинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук»  
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)**

142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д.3.  
Тел./факс: (4967)73-26-36, e-mail: info@pncbi.ru, http://www.pbcras.ru  
ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983, ИНН/КПП  
5039002841/503901001

18.11.2024 № 191-01-2115/808

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН

  
д.ф.м.н. Г. Я. Грабарник



«18» ноября 2024 г.

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

на диссертацию Слонимского Юрия Борисовича «Механизм функционирования белка восстановления флуоресценции (FRP) в регуляции фотозащиты у цианобактерий», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия

*Актуальность темы.* Интенсивность солнечного света, используемого фотосинтезирующими организмами, в течение дня может изменяться в сотни и тысячи раз. Это требует формирования у фотосинтетиков адаптационных механизмов к таким вариациям, в частности, к избыточной освещенности. Защита от эффектов интенсивного света необходима всем фотосинтезирующим организмам вследствие неизбежного повреждения компонентов клетки. Особенно чувствительны к высокой интенсивности солнечного света светособирающие комплексы и фотосистемы. Нарушение их функционирования может приводить к образованию активных форм кислорода. Особое

место в многоуровневой системе фотозащиты занимает механизм тепловой диссипации энергии света. Высшие растения обладают т. н. ксантофилловым циклом, обеспечивающим рассеяние поглощенной энергии света в виде тепла в зависимости от интенсивности света в течение дня. Однако для цианобактерий, вносящих значительный вклад в биогеохимические циклы углерода, кислорода и азота, такой механизм не применим. В случае цианобактерий был открыт собственный уникальный механизм тепловой диссипации энергии света, связанный с функционированием фотоактивного Оранжевого Каротиноидного Белка (ОСР). Синий свет приводит к активации ОСР и взаимодействию со светособирающими комплексами, что, свою очередь, предотвращает передачу энергии на реакционные центры фотосистем. Долгое время с момента открытия ОСР было неясно, как осуществляется обращение его действия, экспериментально детектируемое как тушение флуоресценции фикобилисом. Впоследствии был открыт регулятор активности ОСР – белок восстановления флуоресценции (FRP). Механизм действия FRP оставался неясен, а предложенные механизмы взаимодействия FRP с ОСР были крайне противоречивы. Тем не менее, был достигнут консенсус, что ОСР и FRP представляют собой управляемую светом систему взаимодействующих белков, которая потенциально может быть использована как инструмент в оптогенетике.

Можно сделать вывод, что изучение механизма взаимодействия белков ОСР и FRP, является актуальным и необходимым не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения.

*Научная новизна и научно-практическая значимость работы.* В рамках работы впервые путем сочетания дополняющих друг друга методов структурной и молекулярной биологии был определен участок взаимодействия белков ОСР и FRP. Был разработан метод получения комплекса ОСР и FRP с фиксированной стехиометрией, необходимый для исследования его структуры. Описаны функциональные свойства и структура для неизученных ранее гомологов белка FRP и ОСР, что позволило произвести их сравнительный анализ и независимо подтвердить, какие участки ОСР и FRP вовлечены в образование их комплекса.

Результаты работы Слонимского Ю.Б. представляют несомненную практическую значимость, так как понимание механизма взаимодействия белков ОСР и FRP открывают возможности для управления уровнем фотозащиты у цианобактерий, что может найти свое применение в биотехнологии. Кроме того, выявленный механизм и структура комплекса ОСР-FRP подтверждает возможность применения ОСР и FRP в оптогенетике.

*Структура диссертации.* Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из Введения, 3 глав («Обзор литературы», «Материалы и методы исследования» и «Результаты и их обсуждение»), Заключения, Выводов, Приложения и списка цитированной литературы. Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из пяти подразделов, соответствующих различным полученным результатам. Диссертационная работа изложена на 104 страницах и содержит 38 рисунков, одну таблицу и 106 источников литературы.

В работе поставлены 4 задачи, по которым сформулированы 4 положения, выносимые на защиту. Эти положения полностью отражают поставленные задачи. По результатам диссертации сделано заключение и сформулированы 5 выводов, которые соответствуют поставленным целям и задачам. Научные положения, сформулированные автором диссертационного исследования, обоснованны и достоверны. Выводы, которые автор дает на основании совокупности данных, представленных в работе, полностью обоснованы.

*Оценка содержания диссертационной работы, ее завершенности.*

Во **Введении** автор описывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи, обосновывает научную новизну и научно-практическую значимость работы.

Глава **«Обзор литературы»** начинается с описания светособирающих комплексов различных групп фотосинтетических организмов. Подробно разобрана проблема необходимости механизмов рассеивания в виде тепла избыточной поглощенной энергии света. Далее обзор фокусируется на механизмах фотозащиты высших растений в сравнении с механизмами фотозащиты цианобактерий. Рассмотрен механизм действия Оранжевого Каротиноидного Белка (ОСР) как сенсора и эффектора тепловой диссипации поглощенной энергии света светособирающими комплексами цианобактерий – фикобилисомами. Описано открытие и обобщены сведения о белке-регуляторе ОСР – белке восстановления флуоресценции (FRP). Автор обосновывает, почему предложенные в литературе механизмы взаимодействия белков ОСР и FRP противоречивы и не дают в полной мере понимания механизма действия белка FRP.

В главе **«Материалы и методы исследования»** автор приводит описание и характеристику методов, использованных в работе. Довольно большой объем этой части диссертации определяется весьма широким спектром примененных методов. Работа проведена с использованием молекулярно-биологических, биохимических методов, а также методов структурной биологии. Большая часть работы проведена на рекомбинантных белках, полученных в системе экспрессии *E.coli* и очищенных

комбинацией металл-аффинной, эксклюзионной, ионообменной и гидрофобной хроматографий. После получения белков с аминокислотными заменами проводили оценку вторичной структуры белков методом кругового дихроизма в дальнем ультрафиолете. Третичную структуру отдельных белков и их комплексов изучали с помощью методов малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и рентгеноструктурного анализа. Описание каротиноидного состава в каротиноид-связывающих белках проводили с помощью тонкослойной хроматографии. Параметры взаимодействия белков OCP и FRP были определены методом гель-фильтрации. Способность к фотоактивации OCP и изменение скорости перехода OCP в отсутствие или в присутствии белка FRP из фотоактивированного («красного») состояние в неактивное («оранжевое») состояние проводили с помощью абсорбционной спектрофотометрии.

В главе «**Результаты исследования и их обсуждение**» описаны и проанализированы полученные результаты исследования. Результаты изложены в виде 5 частей, соответствующих основным направлениям исследований. Первая часть главы посвящена выяснению универсальности действия гомологов белка FRP с низким уровнем идентичности на фотоцикл и взаимодействие с OCP или его отдельными доменами. Автор показал, что структура и функциональные свойства гомологов FRP из *Anabaena variabilis* и *Arthrospira maxima* соответствует ранее изученному FRP из *Synechocystis sp.*

Во второй части главы приведены весьма интересные, на наш взгляд, результаты. Слонимский Ю. Б. выявил роль одного из структурных элементов OCP – N-концевого сегмента (NTE) в регуляции взаимодействия с белком FRP. Фиксация NTE на поверхности C-домена OCP (CTD-OCP) методом дисульфидной ловушки предотвращала взаимодействие OCP с FRP. В свою очередь, удаление NTE у OCP, приводило к значительному усилению взаимодействия OCP и FRP в отсутствие света. Таким образом, был локализован участок связывания OCP и FRP на поверхности CTD-OCP и разработан метод получения комплекса OCP-FRP для структурных исследований.

В третьей части главы автор обращается к проблеме получения комплекса OCP-FRP с определенной стехиометрией и исследованию его структуры. На стадии получения комплекса OCP-FRP было выявлено, что при взаимодействии с OCP димерный белок FRP может претерпевать мономеризацию. Такая гетерогенность комплексов OCP-FRP представляла собой серьезное препятствие для получения структуры данного комплекса. Для фиксации мономерного и димерного состояний FRP были получены белки с аминокислотными заменами в области контакта субъединиц FRP. Стабильная димерная форма FRP, полученная методом дисульфидной ловушки, структурно и функционально соответствовала ранее описанному белку FRP дикого типа. Комплекс OCP-FRP в

стехиометрии 1:2 был использован для изучения его структуры методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения. Уточнение и верификация модели были проведены с помощью биохимических методов. Слонимский Ю. Б. использовал метод дисульфидной ловушки для поиска близко расположенных аминокислотных остатков в белках OCP и FRP. Было показано, что полученная топология комплекса методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения согласуется с полученной сшивкой остатков на поверхности субдомена «головы» FRP с остатком на поверхности CTD-OCP. Построенная модель комплекса OCP-FRP также проясняла возможный механизм действия белка FRP. FRP при взаимодействии с OCP поддерживает такую ориентацию его доменов, которая и ускоряет переход OCP в неактивную («оранжевую») форму.

В четвертой части главы рассмотрена проблема регуляции фотозащиты цианобактерий, в которых есть OCP, но отсутствует белок FRP. По современным представлениям, группа белков OCP представлена 3-мя линиями белков (OCP1, OCP2 и OCPX), которые могут попарно присутствовать у цианобактерий. В тех случаях, когда у цианобактерии отсутствует OCP1, для которого была получена структура и охарактеризовано взаимодействие с FRP, также отсутствует и FRP.

Автор предложил исследовать самую удаленную от OCP1 и наименее изученную филогенетическую группу OCPX. Для характеристики OCPX был выбран белок из цианобактерии *Gloeobacter kilaueensis*. Полученный белок также был фотоактивным и был способен вызывать тушение флуоресценции фикобилисом, однако скорость его перехода в «оранжевую» форму была существенно выше, чем у OCP1 при низких температурах. Кроме того, добавление белка FRP не приводило к ускорению переход OCPX в «оранжевую» форму. Все это свидетельствовало о существенных отличиях в структуре OCPX по сравнению с OCP1. В результате проделанной работы была получена первая структура OCPX методом рентгеноструктурного анализа. При сравнительном анализе OCPX и OCP1 были обнаружены элементы структуры OCPX, обеспечивающие наблюдаемые свойства OCPX.

В заключительной части главы «Результаты исследования и их обсуждение» автор переходит к рассмотрению вопроса о происхождении белка FRP, который вероятно был приобретен цианобактериями уже после разделения *Gloeobacteria* от остальных цианобактерий. Выбранные гомологи белка FRP из протеобактерий (FRPH) во многом сохраняли черты цианобактериальных FRP, однако не были способны регулировать фотоцикл OCP. Таким образом, современные протеобактерии, по-видимому, не сохранили черты FRP предков, способного к взаимодействию с OCP. Данные результаты находятся в



полном согласии с исследованием представителей FRPH, проведенным независимо Steube и соавторами в 2023 году.

В разделе «**Заключение**» сделано обобщение результатов работы, предложен механизм взаимодействия белка FRP с белком OCP. Выводы, сформулированные в диссертации, полностью соответствуют поставленным задачам, логично вытекают из результатов работы и являются в полной мере обоснованными. Представленные в диссертационной работе результаты экспериментов свидетельствуют, что поставленные задачи были успешно решены. Тема диссертации, ее положения и выводы полностью соответствуют специальности 1.5.4. Биохимия.

В разделе «**Приложение**» приведен список нуклеотидных последовательностей праймеров, использованных в процессе сайт-направленного мутагенеза.

*Соответствие автореферата основным положениям диссертации.* Автореферат диссертации оформлен по стандартной форме, соответствует установленным требованиям. Автореферат полностью отражает содержание диссертации и дает представление о степени участия автора в исследованиях.

*Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов не вызывает сомнений*

Представлен большой объем экспериментальных данных, результаты получены различными методами, соответствуют поставленным задачам.

*Апробация результатов и личный вклад соискателя.* Основные положения и результаты диссертационной работы доложены на трех конференциях международного уровня в виде стендовых докладов (43th FEBS Congress 2018 (Prague), 44th FEBS Congress 2019 (Krakow) и 45th FEBS Virtual Congress 2021). Всего по теме диссертации было опубликовано 7 статей в ведущих отечественных и международных научных журналах.

*Рекомендации по использованию научных выводов диссертационной работы.* Результаты исследования имеют существенное значение для биохимии и физиологии микроорганизмов, могут быть использованы в биотехнологии и при разработке синтетических оптических триггерных систем. Полученные в диссертации результаты могут быть использованы в ряде научных учреждений: Институте физиологии растений РАН, Институте фундаментальных проблем биологии РАН, Институте проблем химической физики РАН, Научно-исследовательском институте физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского при МГУ.

*Замечания и вопросы по работе.* Диссертационная работа Ю.Б. Слонимского не полностью свободна от недостатков:

### Замечания:

1. В работе для сравнения параметров перехода OCP1 и OCPX фотоактивированного «красного» состояния в исходное «оранжевое» состояние автор для оценки скорости образования и убыли «красной» формы OCP использует скорость изменения поглощения при длинах волн 550-590 нм, однако в явном виде в разделе «Материалы и методы исследования» не было объяснено, с чем связан выбор именно такого диапазона длин волн.
2. При выделении и очистке фикобилисом из *Gloeobacter violaceus* их интактность оценена только сравнением их спектра флуоресценции и соответствием положения в градиенте плотности сахарозы при ультрацентрифугировании, описанными в литературе. В качестве рекомендации на будущее, прямым способом доказать интактность фикобилисом было бы использование метода электронной микроскопии.

Эти замечания не носят принципиального характера и не подвергают сомнению корректность сделанных в диссертации выводов.

### Вопросы:

1. При исследовании взаимодействия гомологов FRP из цианобактерий с отдельными доменами OCP1 не удается зафиксировать комплексы FRP с N-концевым доменом OCP (NTD). Исходя из представленной модели комплекса OCP-FRP, полученной методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения, у FRP есть протяженный участок взаимодействия с NTD. Не является ли это серьезным противоречием с построенной моделью комплекса OCP-FRP?
2. При исследовании возможного взаимодействия белка FRP на фотоцикл OCPX, были использованы как OCPX дикого типа, так и OCPX, лишенный N-концевого сегмента. На графике в координатах Аррениуса можно заметить, что удаление N-концевого сегмента у OCPX само по себе снижает скорость перехода OCP в оранжевую форму. Как можно объяснить подобное явление?
3. Для картирования аминокислотных остатков в OCPX, препятствующих взаимодействию с FRP (рис. 29), использована модель OCPX, полученная с помощью нейросети AlphaFold2. Будут ли показанные аминокислотные остатки объяснять нечувствительность OCPX к действию FRP уже на полученной методом рентгеноструктурного анализа модели OCPX?

**Заключение.** Диссертация Слонимского Юрия Борисовича «Механизм функционирования белка восстановления флуоресценции (FRP) в регуляции фотозащиты у цианобактерий» представляет собой целостное и завершённое научное исследование, выполненное на высоком методическом уровне. Работа отвечает всем требованиям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, с изменениями Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335; 02.08.2016 № 748; 29.05.2017 № 650), а ее автор Слонимский Юрий Борисович заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Отзыв на диссертацию рассмотрен, обсужден и утвержден на расширенном семинаре Лаборатории молекулярной организации фотосинтетического аппарата ИФПБ РАН - обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН, протокол №3 от 7 ноября 2024 г.

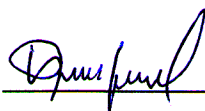
Отзыв на диссертационную работу Слонимского Ю.Б. подготовил

доктор физико-математических наук

ведущий научный сотрудник

и.о. зав. Лабораторией молекулярной спектроскопии ИФПБ РАН - обособленного

подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН



Проскуряков Иван Игоревич

«18» ноября 2024 г.

Подпись Проскурякова Ивана Игоревича заверяю

Начальник отдела кадров ИФПБ РАН



Фиошкина Татьяна Анатольевна



Федеральное государственное учреждение науки "Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук" (ИФПБ РАН) - обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН

Почтовый адрес: 142290, г. Пущино Московской обл., Институтская ул., д.2.

Эл. почта: ifpb@issp.serpukhov.su; pros@issp.serpukhov.su; сайт: <http://www.ibbp.psn.ru>;

тел./факс: (4967)73-36-01, тел.: (4967) 73-28-80.