

ОТЗЫВ

официального оппонента Митькевича Владимира Александровича на диссертационную работу Слонимского Юрия Борисовича на тему «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

В диссертационной работе Слонимским Ю.Б. проводилось исследование механизма функционирования одного из ключевых регуляторов нефотохимического тушения флуоресценции, белка восстановления флуоресценции (FRP) из цианобактерий. Под воздействием света в цианобактериях благодаря действию фотоактивного оранжевого каротиноидного белка (OCP) с высокой интенсивностью происходит снижение эффективности светосбора на уровне светособирающих комплексов – фикобилисом. Для обращения данного эффекта и восстановления передачи энергии с фикобилисом на реакционные центры фотосистем задействуется регуляторный белок FRP, который, согласно исследованиям *in vitro*, приводит к ускорению перехода OCP в неактивную форму. Кроме того, особое внимание привлекает высокое разнообразие белков OCP и FRP среди различных цианобактерий. OCP разделяют на 3 паралогические линии (OCP1, OCP2 и OCPx), представители которой нередко попарно сосуществуют в цианобактериях. В свою очередь, белки FRP отличаются низким уровнем идентичности по сравнению с OCP в одной и той же цианобактерии, что ставило вопрос об универсальности действия белков FRP на фотоцикл OCP. Понимание молекулярного механизма действия белка FRP даст возможность тонко регулировать ответ цианобактерий на увеличение интенсивности света, что позволит эффективнее использовать цианобактерии в биотехнологии и биоремедиации. В связи с этим, диссертационная работа, посвященная изучению функциональных свойств, структуры и механизма взаимодействия белков OCP и FRP, является актуальной как для фундаментальной науки, так и в практическом отношении.

Цель исследования и задачи сформулированы корректно и отражают комплексное структурно-функциональное исследование взаимодействия белков OCP и FRP. Стоит отметить, что в рамках поставленных задач, автор стремится не только описать механизм взаимодействия OCP-FRP для модельного организма *Synechocystis* sp., но и ответить на вопрос об универсальности данного механизма в регуляции фотозащиты у цианобактерий.

Научная новизна

Проведенная исследовательская работа соответствует современному состоянию науки в данной области и обладает не вызывающей сомнения новизной. В ней впервые путем комбинации биохимических методов и методов структурной биологии найден основной участок взаимодействия белков OCP и FRP. Представленная модель позволяет объяснить, как FRP ускоряет переход OCP в неактивное состояние. Подобраны методы стабилизации OCP и FRP в различных олигомерных и конформационных состояниях, отражающих сложный, многоступенчатый характер данного взаимодействия. Кроме того, автор проводит сравнительный анализ между гомологами белка FRP и OCP, что позволяет ответить на вопрос, насколько представленный механизм регуляции применим для различных цианобактерий. Отдельного внимания заслуживает получение первой структуры представителя паралогической линии OCP (OCPX) из примитивной цианобактерии *Gloeobacter violaceus*.

Научно-практическая значимость работы

В практическом плане данные, полученные в работе Слонимского Ю.Б., открывают не только возможности для тонкой регуляции фотозащиты у цианобактерий в зависимости от условий освещения, но и создают платформу для применения OCP и FRP в оптогенетике на основе полученной структуры их комплекса.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов обусловлена применением широкого арсенала методов от биоинформатического анализа последовательностей белков до методов структурной биологии. Существенно повышает достоверность, представленной автором модели комплекса OCP-FRP, верификация топологии их комплекса методом дисульфидной ловушки, а также обобщении имеющихся в литературе данных об аминокислотных заменах в OCP и FRP, нарушающих их функции. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 3 международных конференциях. Список статей, опубликованных по теме диссертации, включает 7 работ в международных научных журналах. Все это свидетельствует о хорошем качестве работы и независимой высокой оценке специалистами ее результатов.

Структура диссертации

Диссертационная работа представлена на 104 страницах. Структура изложения диссертации традиционная, состоящая из введения, 3 глав («Обзор литературы», «Материалы и методы исследования» и «Результаты и их обсуждение»), заключения, выводов, приложения и списка цитированной литературы. Список литературы включает 106 наименований. Иллюстративный материал представлен 38 рисунками и одной таблицей.

В главе 1 «Обзор литературы» автор подробно проанализировал имеющиеся на сегодняшний день данные, касающиеся взаимодействия белков OCP и FRP. Обзор литературы начат с описания разнообразия светособирающих комплексов фотосинтетических организмов и необходимости механизмов рассеивания в виде тепла поглощенной энергии света. В обзоре литературы рассмотрены существующие гипотезы о механизме функционирования белков OCP и FRP. Обосновано показано, почему ни одна из существующих моделей комплекса OCP-FRP, не может претендовать на полное непротиворечивое объяснение имеющихся экспериментальных данных. Обзор литературы дает достаточно полное представление об изучаемой проблеме.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» автором дана характеристика методов исследования и используемых материалов. Подробно описан каждый используемый в работе метод. Для вычисления констант диссоциации комплексов приведены формулы, используемые для расчетов с описанием используемых параметров. Надо отметить значительное разнообразие использованных в работе методов, охватывающие как характеристику структуры отдельных белков и их комплексов, так и методов детекции их взаимодействия. Применение их комбинации позволяет надежно и однозначно интерпретировать получаемые результаты и построить детальную картину механизма взаимодействия белков OCP и FRP.

Глава 3 посвящена описанию и обсуждению полученных результатов исследования. Автор прежде, чем приступить к исследованию механизма взаимодействия белков OCP и FRP, поставил перед собой задачу о выяснении универсальности действия гомологов белка FRP с низким уровнем идентичности. Это потребовало филогенетического анализа известных последовательностей гомологов FRP и выявления репрезентативных представителей FRP для дальнейшей работы. До момента данного исследования помимо FRP из *Synechocystis* sp. был описан лишь один представитель FRP из *Tolypothrix* sp. Исследования автором структуры и функциональных свойств FRP из *Anabaena variabilis* и *Arthrospira maxima* дополняют ряд охарактеризованных гомологов FRP и показывают универсальность действия белков FRP на регуляцию белка OCP среди цианобактерий,

несмотря на сравнительно низкую долю консервативных аминокислотных остатков среди гомологов белка FRP.

На втором этапе исследования Слонимский Ю. Б. выявил ключевую роль одного из структурных элементов OCP – N-концевого сегмента, примыкающего к поверхности C-концевого домена OCP (CTD-OCP), что было продемонстрировано двумя независимыми подходами. Первый подход заключался в фиксации NTE на поверхности CTD-OCP методом дисульфидной ловушки. Было показано, что ковалентная сшивка NTE с CTD-OCP предотвращает взаимодействие OCP с FRP. Другой подход заключался в полном удалении структурного элемента NTE у OCP, что приводило значительному усилению взаимодействия OCP и FRP даже в отсутствие света. Получение такого комплекса не только открыло возможность количественного измерения констант взаимодействия OCP и FRP, но и позволило получить стабильный комплекс OCP-FRP для дальнейших структурных исследований. Одним из препятствий на пути получения структуры комплекса OCP-FRP стала возможная мономеризация белка FRP при взаимодействии с OCP. В растворе и в кристаллических структурах FRP представляет собой стабильный димер, тогда как при характеристике комплекса OCP-FRP автор наблюдал его мономеризацию. Для фиксации одного из олигомерных состояний FRP была проведена работа по получению стабильных мономерной и димерной форм FRP. Только стабильная димерная форма FRP в полной мере структурно-функционально соответствовала белку FRP дикого типа и в дальнейшем именно она была использована для получения структуры комплекса OCP-FRP методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения. Одним из недостатков данного метода является то, что она дает структуру низкого разрешения и сама по себе может быть представлена различными ансамблями компонентов комплекса, даже при условии, если известны структуры белков, входящих в его состав. Решение данной проблемы потребовало привлечение биохимических методов, позволяющих уточнить топологию комплекса. Автором вновь был использован метод дисульфидной ловушки, но уже для поиска аминокислотных остатков в белках OCP и FRP, находящихся в непосредственной близости друг от друга. Было успешно показано, что один из остатков на поверхности субдомена «головы» FRP (K102) контактирует с остатком на поверхности CTD-OCP (F299). Кроме того, был привлечен анализ распределения зон с положительным и отрицательным электростатическим потенциалом на белках OCP и FRP, а также анализ консервативности остатков на поверхности OCP и FRP. Все это позволило успешно построить первую непротиворечивую модель комплекса OCP-FRP, которая также проясняет возможный механизм действия белка FRP. FRP при взаимодействии с OCP обеспечивает правильную ориентацию его доменов и, таким образом ускоряет переход OCP в неактивную форму.

На заключительном этапе работы автор обратился к решению проблемы механизма фотозащиты цианобактерий, в которых присутствует ген *osp*, однако отсутствует ген *frp*. Как было отмечено ранее, ОСР представлена 3 паралогическими линиями ОСР1, ОСР2 и ОСРх. Все приведенные ранее результаты по исследованию механизма взаимодействия ОСР и FRP были получены для группы ОСР1. Слонимским Ю.Б. было предложено исследовать самую удаленную от ОСР1 филогенетическую группу ОСРх. Эволюционно от большинства цианобактерий наиболее отдалена примитивная цианобактерия *Gloeobacter kilaueensis*, которая обладает единственной копией гена *osp3*, но не содержит ген *frp*. Полученный белок ОСР3 напоминал по свойствам белок ОСР1, однако скорость его перехода в неактивную форму была существенно выше, чем у ОСР1 даже при низких температурах (например, при +5°C). Кроме того, добавление белка FRP не ускорило переход ОСР3 в свою неактивную форму. Это свидетельствовало о существенных отличиях в структуре ОСР3, которая была успешно получена методом рентгеноструктурного анализа. Были продемонстрированы элементы структуры ОСР, обеспечивающие ускорение перехода в неактивную форму, а также на основании сравнительного анализа с ОСР1 было показано, как отличия аминокислотных остатков на поверхности N-концевого домена ОСР приводят к полной невосприимчивости к действию белка FRP. Таким образом, ОСР3 способны функционировать без регуляции белком FRP благодаря собственным элементам структуры ОСР, ускоряющих переход в неактивную форму.

В Заключении автором обобщены полученные данные и выделены основные, наиболее значимые результаты работы, а также намечены направления для будущих исследований по данной проблеме. Выводы соответствуют поставленным задачам, согласуются с приведенными экспериментальными данными и значительно дополняют ранее полученные другими исследователями данные.

Диссертация хорошо иллюстрирована, в ней приведены рисунки, схемы механизма взаимодействия белков и их структуры. В работе встречаются опечатки и неточные формулировки, которые, однако, не препятствуют восприятию текста. Текст автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы, в нем показан вклад авторы в проведенное исследование, а также степень новизны, теоретическая и практическая значимость результатов исследований.

Замечания и вопросы по работе

К диссертации имеются некоторые замечания и вопросы.

Замечания:

1. Для оценки константы диссоциации комплекса белков OCP-FRP была использована аналитическая гель-фильтрация, которая позволяет получить лишь кажущуюся константу диссоциации вследствие разведения образца и разделения компонентов смеси во время хроматографии. Существуют методы, которые позволяют напрямую вычислить константу диссоциации комплексов, в частности таким методом является изотермическая калориметрия титрования, которая не была использована в ходе работы.

2. В заключительной части работы, посвященной исследованию гомологов белка FRP из нефотосинтетических протеобактерий, автором не было подробно объяснено, как был осуществлен выбор гомологов из *Thauera phenylacetica* (ThauFRPH) и *Mesorhizobium ciceri* (MesoFRPH) для дальнейшей характеристики.

Вопросы:

1. В рамках исследования взаимодействия OCP и FRP была получена структура OCP из паралогической линии OCPx цианобактерии *Gloeobacter kilaueensis*, в которой отсутствует FRP. Однако, сам автор в тексте упоминает также еще одну отдельную ветвь OCP – OCP2. В литературе было показано, что FRP не ускоряет переход OCP2 в неактивное состояние. Могут ли полученные автором результаты по анализу структуры OCPx быть перенесены на OCP2 и объяснить, почему OCP2 не способен к эффективному взаимодействию с FRP?

2. Для дополнительной верификации модели комплекса OCP-FRP автор использовал предсказание структуры комплекса, полученное с помощью нейросети AlphaFold2. Модель хорошо соответствовала структуре комплекса, полученной экспериментально. Не может ли быть так, что данный результат является артефактом вследствие обучения нейросети в том числе на депонированной модели комплекса OCP-FRP?

3. При получении стабильных мономерной и димерной формы FRP автором с одной стороны показано, что мономерная форма FRP (L49E) обладает сниженной долей альфа-спиралей (с 60% до 40%), а с другой стороны, что даже несмотря на это белок частично сохраняет свою активность. Как можно объяснить подобное явление и как это соотносится с высказанной автором гипотезой о том, что мономеризация FRP приводит к увеличению его эффективности?

Заключение. Диссертация Слонимского Юрия Борисовича «Механизм функционирования белка восстановления флуоресценции (FRP) в регуляции фотозащиты у цианобактерий» является законченным научным исследованием. Работа выполнена и оформлена в соответствии с современными требованиями, диссертация и автореферат хорошо иллюстрированы. Достоверность полученных результатов подтверждает как большой набор методов исследования, так и объем выполненной работы. Результаты диссертации доложены на международных конференциях и полностью отражены в 10 печатных работах, из них 7 статей в журналах, соответствующих Перечню ВАК, 3 тезиса докладов и материалов конференций. Автореферат полностью отражает содержание диссертации и соответствует положениям, выносимым на защиту.

По объему выполненного исследования, новизне полученных результатов, их теоретической и практической значимости диссертационная работа Слонимского Юрия Борисовича «Механизм функционирования белка восстановления флуоресценции (FRP) в регуляции фотозащиты у цианобактерий» полностью соответствует требованиям пунктов «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Слонимский Юрий Борисович заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Официальный оппонент,

Доктор биологических наук (1.5.3. Молекулярная биология),
член-корреспондент РАН,
главный научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
Митькевич Владимир Александрович
Адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32
Телефон: +79104696137
e-mail: mitkevich@imb.ru

Подпись Митькевича Владимира Александровича удостоверяю
Ученый секретарь ИМБ РАН, к.ф.-м.н.
Коновалова Елизавета Владимировна

Коновалова Е.В.

«15» ноября 2024г.

