



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

29.05.2024

№ 85-07-07/575

На №

от

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного учреждения
«Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН»
д. б. н. Федоров А. Н.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» на диссертационную работу Слонимского Юрия Борисовича: «Механизм функционирования белка восстановления флуоресценции (FRP) в регуляции фотозащиты у цианобактерий» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, выполненную в лаборатории «белок-белковых взаимодействий» Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН. Тема диссертационной работы «Механизм функционирования белка восстановления флуоресценции (FRP) в регуляции фотозащиты у цианобактерии» утверждена на заседании кафедры биохимии Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова (Протокол №10 от 07.10.2019).

В 2019 году Слонимский Ю. Б. окончил кафедру биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» с присуждением степени магистра по направлению 06.04.01. «Биология» по программе Общая биохимия. С 2019 по 2023 гг. обучался в очной аспирантуре на кафедре биохимии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. В 2023 году Слонимскому Ю. Б. присвоена квалификация Исследователь. Исследователь (Диплом об окончании аспирантуры АА 000201).

С 2017 года работает в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН. В 2017 г. работал в лаборатории структурной биохимии белка ФИЦ Биотехнологии РАН (зав. лабораторией д.б.н. проф. Левицкий Д.И.). В период 2017-2019 гг. и работал в должности старшего лаборанта, а с 2019 года и по настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории «белок-белковых взаимодействий» (зав. лабораторией д.б.н. Случанко Н. Н.).

Научный руководитель – доктор биологических наук Случанко Николай Николаевич, заведующий лабораторией «белок-белковых взаимодействий».

По результатам рассмотрения диссертации «Механизм функционирования белка восстановления флуоресценции (FRP) в регуляции фотозащиты у цианобактерий» принято следующее заключение:

Актуальность работы

Способность к фотосинтезу в живых организмах сопряжена с необходимостью не только эффективно поглощать энергию света, для чего в процессе эволюции возникли различные светособирающие комплексы, но и бороться с последствиями повышенного уровня освещенности, поскольку избыток энергии света губителен для клеток и может приводить к повреждению фотосинтетического аппарата. Цианобактерии, одна из крупнейших групп фотосинтетических микроорганизмов, хорошо адаптированы даже к экстремальным режимам освещения при помощи различных уникальных механизмов. Один из них - механизм фотозащиты, включающий диссипацию поглощенной энергии света через действие фотоактивного белка OCP (от англ. Orange Carotenoid Protein). При фотоактивации OCP происходит изменение спектра поглощения и цвета (красная форма OCP) вследствие смещения каротиноида в N-концевой домен и разделения доменов OCP. Именно в конформации с разделенными доменами OCP осуществляет свою функцию - взаимодействует с фикобилисомами, обеспечивая тепловую диссипацию поглощенной ими энергии, что можно детектировать как тушение их флуоресценции. Несмотря на то, что фотоактивация OCP обратима *in vitro*, адекватный физиологический ответ *in vivo* требует наличия у OCP белка-партнера, обращающего его действие - т. н. белка восстановления флуоресценции (от англ. Fluorescence Recovery Protein, FRP). При делеции гена белка FRP и после облучения синим светом клеток цианобактерий флуоресценция фикобилисом восстанавливается лишь частично, что, по-видимому, обусловлено слишком медленной самопроизвольной диссоциацией OCP от его комплекса с фикобилисомой. FRP способен взаимодействовать с OCP и инактивировать его за счет ускорения его перехода в базовую оранжевую форму. Олигомерное состояние FRP в растворе и его роль в функционировании белка остается предметом дискуссии. Остается неясным также механизм действия FRP по ускорению перехода OCP в оранжевую форму, и за счет каких структурных детерминант FRP различает оранжевую и красную формы OCP. По данным, полученным ранее с участием нашей лаборатории, взаимодействие белков OCP и FRP происходит по нескольким участкам связывания и сопровождается мономеризацией FRP. Совершенно неожиданным является крайне широкое разнообразие как OCP (в цианобактериях можно встретить до двух полноразмерных генов OCP), так и FRP генов. Современная филогенетика разделяет OCP на три неравные группы: OCP1, OCP2 и OCPX. Регуляция функционирования OCP показана только для мажорной группы OCP1, а для OCP2 и крайне гетерогенной группы OCPX данный вопрос остается почти неизученным. Ключевые работы по исследованию взаимодействия OCP и FRP были проведены лишь для пары белков OCP1 и FRP из *Synechocystis* sp., оставляя нерешенным вопрос, насколько универсален механизм взаимодействия OCP-FRP среди разных клад цианобактерий. Выяснение механизма действия FRP поможет пролить свет на способность цианобактерий адаптироваться к условиям меняющейся освещенности. Эти знания, в свою очередь, могут быть учтены в биотехнологическом использовании цианобактерий как источника биомассы и субстрата для получения биотоплива, а также могут быть полезны для разработки оптически контролируемых триггерных систем.

Целью работы стало изучение молекулярного механизма взаимодействия белков OCP и FRP.

Научная новизна и ценность результатов, полученных лично автором в ходе научного исследования

Показана универсальность регуляторного действия FRP гомологов на фотоцикл OCP. Впервые установлена роль N-концевого сегмента (NTE) OCP в регуляции взаимодействия с FRP. Локализован участок взаимодействия OCP и FRP на поверхности C-домена OCP, занимаемой элементом NTE в темновой форме OCP. Предложена модель пространственной структуры комплекса OCP-FRP низкого разрешения на основе данных малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (МУРР) и разносторонних биохимических и биоинформатических данных. Полученная структурная модель верифицирована методом дисульфидной ловушки и сравнительным анализом с наиболее древним OCP (OCPX из *Gloeobacter*), для которого впервые удалось получить

пространственную структуру. Предложены переименование и классификация группы OCPX в OCP3 с разбиением на подгруппы OCP3a, OCP3b, OCP3c, и т.д., а также обнаружено многообразие гомологов FRP у бактерий за пределами группы цианобактерий.

Научно-практическое значение

Описан детальный механизм взаимодействия белков, позволяющих цианобактериям адаптироваться к меняющимся условиям освещения, и показано, как белок FRP влияет на функционирование OCP. Определена константа диссоциации и стехиометрия их комплекса, а также разработан подход для характеристики разнообразных мутантных форм OCP и FRP. В литературе известно, что при суперэкспрессии FRP тушение флуоресценции фикобилисом не наступает даже при облучении цианобактерий интенсивным синим светом. Изменяя соотношение концентраций OCP/FRP, можно добиться необходимого уровня фотозащиты при минимальной потере энергии в виде тепла, что может быть применимо в области биоинженерии и биотехнологии цианобактерий для увеличения эффективности продукции биомассы. Кроме того, систему взаимодействующих белков OCP-FRP можно использовать как платформу для создания новых оптически контролируемых систем, где каскадом молекулярных событий можно управлять при помощи света.

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Большинство экспериментов, вошедших в диссертацию, было выполнено либо непосредственно автором работы, либо с его участием. Научная работа соискателя была отмечена стипендией им. Академика С. Е. Северина первой степени (2017), стипендией МГУ им. М. В. Ломоносова для молодых научных сотрудников (2018), а также дипломом первой степени 1-го студенческого биохимического форума (2018).

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите

Представленная Слонимский Ю. Б. диссертационная работа, посвященная исследованию молекулярного механизма взаимодействия белков OCP и FRP, соответствует специальности 1.5.4 Биохимия, по которой она рекомендуется к защите.

Апробация работы

По теме диссертации были опубликованы 7 статей в международных рецензируемых журналах. Результаты работы в виде стендовых докладов представлены на конференциях 43th FEBS Congress 2018 (Prague), 44th FEBS Congress 2019 (Krakow), 45th FEBS Virtual Congress 2021.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени

По теме диссертации было опубликовано 7 статей в международных рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК, и 3 тезисов международных конференций

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи в международных рецензируемых журналах

1. Sluchanko N.N., **Slonimskiy Y.B.**, Moldenhauer M., Friedrich T., Maksimov E.G. Deletion of the short N-terminal extension in OCP reveals the main site for FRP binding // FEBS Lett. — 2017a. — Vol. 591. № 12. P. 1667–1676. **IF 3.5 (WoS)**
2. Sluchanko N.N., **Slonimskiy Y.B.**, Maksimov E.G. Features of Protein – Protein Interactions in the Cyanobacterial Photoprotection Mechanism // Biochem. Mosc. — 2017b. — Vol. 82. № 13. P. 1592–1614. **IF 2.5 (WoS)**
3. Sluchanko N.N., **Slonimskiy Y.B.**, Shirshin E.A., Friedrich T., Maksimov E.G., Moldenhauer M. OCP–FRP protein complex topologies suggest a mechanism for controlling high light tolerance in cyanobacteria // Nat. Commun. — 2018. — Vol. 9. P. 3869. **IF 16.6 (WoS)**

4. **Slonimskiy Y.B.**, Maksimov E.G., Lukashev E.P., Moldenhauer M., Jeffries C.M., Svergun D.I., Friedrich T., Sluchanko N.N. Functional interaction of low-homology FRPs from different cyanobacteria with Synechocystis OCP // BBA - Bioenerg. — 2018. — Vol. 1859. № 5. P. 382–393. **IF 4.3 (WoS)**
5. **Slonimskiy Y.B.**, Maksimov E.G., Lukashev E.P., Moldenhauer M., Friedrich T., Sluchanko N.N. Engineering the photoactive orange carotenoid protein with redox-controllable structural dynamics and photoprotective function // BBA - Bioenerg. — 2020. P. 148174. **IF 4.3 (WoS)**
6. **Slonimskiy Y.B.**, Maksimov E.G., Sluchanko N.N. Fluorescence recovery protein: a powerful yet underexplored regulator of photoprotection in cyanobacteria// Photochem Photobiol Sci. — 2020 — Vol. 19. № 6. P. 763-775. **IF 3.4 (WoS)**
7. **Slonimskiy Y.B.**, Zupnik A.O., Varfolomeeva L.A., Boyko K.M., Maksimov E.G., Sluchanko N.N. A primordial Orange Carotenoid Protein: Structure, photoswitching activity and evolutionary aspects // Int. J. Biol. Macromol. — 2022. — Vol. 222. P. 167–180. **IF 8.2 (WoS)**

Тезисы докладов

1. **Y. Slonimskiy**, E. Maksimov, N. Sluchanko (2018) Low homology FRPs from different cyanobacteria functionally interact with Synechocystis OCP, FEBS Open Bio, том 8, с. 390
2. **Y. Slonimskiy**, V. Botnarevskii, E. Maksimov, T. Friedrich, N. Sluchanko (2019) Engineered disulfide in the orange carotenoid protein enables control of its structural dynamics associated with photoprotection function and carotenoid transfer, FEBS Open Bio, том 9, с. 306-307
3. **Y. Slonimskiy**, E. Maksimov, E. Lukashev, M. Moldenhauer, T. Friedrich, N. Sluchanko (2021) Engineered disulfide in the orange carotenoid protein enables control of its structural dynamics associated with photoprotection function and carotenoid transfer, FEBS Open Bio, том 11, с. 185-186

Рекомендуемые оппоненты:

Митькевич Владимир Александрович, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, заместитель директора, главный научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии

Зорина Анна Алексеевна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, старший научный сотрудник лаборатории клеточной регуляции

Рекомендуемая ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук»

Диссертационная работы Слонимского Юрия Борисовича «Механизм функционирования белка восстановления флуоресценции (FRP) в регуляции фотозащиты у цианобактерий» 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 лаборатории белок-белковых взаимодействий, лаборатории структурной биохимии белка, лаборатории инженерной энзимологии, лаборатории молекулярной инженерии, группы геномного редактирования промышленных микроорганизмов, лаборатории биоэнергетики, лаборатории экологической и эволюционной биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы

Присутствовало на семинаре – 26 человек. Результаты открытого голосования: «за» – 26, «против» – нет, «воздержались» – нет. Протокол № 4 от 15 мая 2024 года.

Председатель совместного семинара
заведующий лабораторией структурной биохимии белка,
доктор биологических наук, профессор

Д.И. Левицкий

Секретарь:
научный сотрудник лаборатории белок-белковых взаимодействий,
кандидат биологических наук

К.В. Перфилова

29.05.2024 г.

