

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ  
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ 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 5 декабря 2024 г. № 20

о присуждении Слонимскому Юрию Борисовичу, гражданство Российская Федерация,  
ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «Механизм функционирования белка восстановления флуоресценции (FRP) в регуляции фотозащиты у цианобактерий» по специальности 1.5.4. Биохимии принята к защите 8 августа 2024 г. (протокол № 13) 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**

Слонимский Юрий Борисович в 2019 году окончил 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» по программе «Общая биохимия». С 2019 по 2023 гг. обучался в очной аспирантуре на кафедре биохимии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (свидетельство об окончании аспирантуры АС 000201).

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

**Научный руководитель:**

**Случанко Николай Николаевич**, доктор биологических наук, специальность 03.01.04. Биохимия, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией белок-белковых взаимодействий Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН).

**Официальные оппоненты:**

**Митькевич Владимир Александрович**, доктор биологических наук, специальность 1.5.3 Молекулярная биология, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии, заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

**Зорина Анна Алексеевна**, кандидат биологических наук, специальность 03.01.05 Физиология и биохимия растений, старший научный сотрудник лаборатории клеточной регуляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Выбор официальных обусловлен:

тем, что доктор биологических наук, член-корреспондент РАН Митькевич Владимир Александрович является одним из ведущих отечественных специалистов в области исследования молекулярной нейропатологии и межмолекулярных взаимодействий, вовлеченных в этот процесс.

тем, что кандидат биологических наук, Зорина Анна Алексеевна является одним из ведущих отечественных специалистов в области исследования внутриклеточной сигнализации цианобактерий в условиях абиотического стресса.

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

Оба официальных оппонентов дали положительные отзывы на диссертацию Слонимского Ю.Б.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ) в своем положительном отзыве, подписанном Проскуряковым И.И., доктором физико-математических наук, ведущим научным сотрудником, и.о. зав. лабораторией молекулярной спектроскопии ИФПБ РАН, и утвержденном директором ФИЦ ПНЦБИ доктором физико-математических наук П. Я. Грабарником, указала, что диссертационная работа Слонимского Ю.Б. 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 Слонимский Ю.Б. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что ФИЦ ПНЦБИ является признанным отечественным научным центром и в своем составе имеет несколько подразделений, занимающихся исследованием механизмов адаптации высших растений к различным условиям освещенности, молекулярной спектроскопией фотосинтезирующих микроорганизмов и высших растений, изучением биосенсоров. Таким образом, сотрудники ФИЦ ПНЦБИ и, в частности, лаборатория молекулярной спектроскопии ИФПБ РАН являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Слонимского Ю.Б.

### Публикации

Основные результаты диссертационной работы Слонимского Ю. Б. изложены в 7 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. 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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.

Результаты работы также были представлены на 3 международных конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций) в частности в виде стендовых докладов на международных конгрессах 43-й FEBS в Праге (Чехия) в 2018 году, 44-й FEBS в Кракове (Польша) в 2019 году, 45-й FEBS онлайн в 2021 году.

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, член-корреспондента РАН, зам. директора, главного научного сотрудника Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН **Митькевича Владимира Александровича** (положительный). Отзыв содержит следующие 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 титрационная калориметрия, 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 kilaeensis*, 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 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?

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника ФГБУН Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН **Зориной Анны Алексеевны** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания и вопросы:

#### Замечания:

1. Сам текст не лишен небольших недочетов. Встречаются жаргонизмы, такие как «фитирование».
2. Автор непосредственно погружает в научную проблему, опуская некоторые, очевидные ему моменты. Это демонстрирует глубокое владение материалом, но затрудняет его восприятие читателем.
3. Хотелось бы отметить некоторые упущения в оформлении. Так, при описании подбора условий окисления FRPcc для получения стабильной димерной формы FRP в подписи к рисунку 20 в явном виде не указано, какое именно из условий является самым оптимальным для получения финального препарата окисленного FRPcc. Тем не менее, по тексту работы можно понять, что автор выбирает окисление в присутствии глутатиона.
4. При исследовании особенностей функционирования OCPX из *Gloeobacter* был выбран гомолог из *Gloeobacter kilaueensis*, однако для проверки его взаимодействия с фикобилисомами были получены фикобилисомы из *Gloeobacter violaceus*. При дальнейшей работе было бы корректнее либо получить фикобилисомы из *Gloeobacter kilaueensis*, либо получить OCPX из *Gloeobacter violaceus*.

#### Вопросы:

1. Для оценки кажущейся константы диссоциации комплекса OCP-FRP из *Synechocystis* sp. в работе применяется метод гель-фильтрации и модель взаимодействия 1:1 (один мономер OCP к одному мономеру FRP), хорошо описывающую экспериментальные данные. Впоследствии автор показывает, что димерная форма FRP также функциональна и способна взаимодействовать с OCP. Как разрешить наблюдаемое противоречие?
2. Коррелируют ли полученные параметры взаимодействия OCP и FRP (константа диссоциации и стехиометрия комплекса) с физиологическим ответом цианобактерий на воздействие синим светом?
3. В обзоре литературы автор рассматривает модель взаимодействия OCP из *Synechocystis* sp. с фикобилисомой из того же организма, где отмечены участки ядра фикобилисомы, участвующие в образовании контакта с OCP. Фикобилисомы *Gloeobacter violaceus* обладают принципиально иной архитектурой, что ставит под вопрос о применимости данной модели для представителей *Gloeobacteria*. Какую модель взаимодействия может предложить автор, и насколько он консервативен в эволюции цианобактерий?
4. Автором показана универсальность механизма действия белка FRP для гомологов из *Anabaena variabilis* (AnaFRP) и *Arthrospira maxima* (AmaxFRP). Оба белка ускоряют R-O конверсию неродственного SynOCP, хотя и с меньшей скоростью. Тем не менее, в случае AmaxFRP образования комплексов COCP-FRP не наблюдалось. Как можно интерпретировать полученные результаты? Может ли автор предположить вероятный механизм взаимодействия с полноразмерным двухдоменным белком OCP?

Отзыв ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук» (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

Замечания:

1. В работе для сравнения параметров перехода OCP1 и OCPX фотоактивированного «красного» состояния в неактивное «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.

Вопросы:

1. При исследовании взаимодействия гомологов FRP из цианобактерий с отдельными доменами OCP1, не удается зафиксировать комплексов 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?

**На автореферат поступили положительные отзывы от:**

**Гусева Николая Борисовича**, доктора биологических наук, профессора кафедры Биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, члена-корреспондента РАН.

Отзыв Гусева Николая Борисовича замечаний не содержит.

**Стадничука Игоря Николаевича**, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории экспрессии генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

**Отзыв содержит следующие замечания:**

1. Отметим, что основная часть работы связана с OCP1 и OCP3. В автореферате лишь вскользь упоминается OCP2, занимающий промежуточное положение по своим свойствам между упомянутыми двумя. Этому белку для полноты картины следовало бы уделить ряд строк.

2. Отметим не всегда удачную стилистику изложения материала. Например, вместо «опубликовано 3 тезиса конференций» желательно писать: опубликованы тезисы 3-х конференций.

3. Вместо упоминания трех неравных групп OCP-белков, OCP1, OCP2 и OCPX, точнее было бы говорить о трех неравных по встречаемости у цианобактерий группах: OCP1, OCP2 и OCP3 (он же OCPX).

Сделанные замечания не умаляют значения работы, проведенной диссертантом, и достигнутых в ее итоге важных результатов.

**Коппель Ларисы Алексеевны**, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника кафедры биохимии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Отзыв содержит следующие замечания:

1. К недостаткам реферата относится отсутствие ссылок в разделе «Актуальность работы» и небольшое количество опечаток.

2. Не нашли отражение в реферате предложенные переименование и новая классификация группы OCPX, о которых сказано в разделе «Научная новизна полученных результатов».

**Клычникова Олега Игоревича**, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Отзыв Клычникова Олега Игоревича замечаний не содержит.

**Кропачевой Екатерины Вадимовны**, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории антимикробных агентов ФГБУН Института биологии гена Российской академии наук.

Отзыв содержит следующее замечание:

Несколько несогласованностей в тексте (например, стр. 4 «следующий задачи», стр. «106 источника») несколько не умаляют ценности текста.

### **С вопросами выступали:**

1. академик РАН, проф., д.х.н. В. О. Попов
2. проф., д.х.н. Дзантиев Б.Б.
3. проф., д.б.н. Шишкин С.С.
4. проф., д.б.н. Звягильская Р.А.
5. д.х.н. Безсуднова Е.Ю.
6. к.б.н. Неверов К.В.
7. Обухов Ю.Н.
8. Колесник М. В.

### **В дискуссии приняли участие:**

1. академик РАН, проф., д.х.н. В. О. Попов
2. член-корр. РАН, проф., д.б.н. Гусев Н.Б.
3. проф. д.б.н. Левицкий Д.И.

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

1. Основной участок взаимодействия белков OCP и FRP расположен на C-домене OCP в области прилегания к нему N-концевого сегмента OCP.
2. N-концевой сегмент OCP позволяет регулировать взаимодействие с белком FRP. Стабильный комплекс OCP/FRP может быть получен при удалении N-концевого сегмента OCP даже в нефотоактивированной форме OCP.
3. Построена модель пространственной структуры комплекса мономерного OCP с димером FRP, согласно которой димер FRP своим головным субдоменом взаимодействует с C-доменом OCP, а стержневой субдомен FRP за счет электростатического соответствия с поверхностью доменов OCP облегчает их воссоединение, ускоряя переход OCP в темновую форму.
4. Эволюционно наиболее примитивный вариант OCP демонстрирует высокую скорость спонтанной релаксации, особенно при низких температурах, и невосприимчив к регуляции под действием FRP в силу наличия дополнительных стабилизирующих элементов структуры на поверхности C-домена и нарушения комплементарности зарядов в зоне контакта OCP-FRP.
5. Широкая представленность гомологов FRP у протеобактерий и их отсутствие у наиболее древних цианобактерий позволяют предположить, что фотозащитная функция FRP была приобретена цианобактериями в ходе эволюции в результате горизонтального переноса генов.



### **Научная новизна работы:**

- Установлено, что N-концевой сегмент (NTE) OCP вовлечен в регуляцию взаимодействия с белком FRP;
- Выявлено, что гомологи белка FRP из различных цианобактерий сохраняют свою структуру и функциональную активность;
- Предложена модель пространственной структуры комплекса OCP-FRP на основе данных малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (МУРР), подтвержденная биохимическими методами;
- Получена первая пространственная структура OCPX и проведен ее сравнительный анализ со структурой OCP1;
- Описано многообразие гомологов FRP у бактерий за пределами группы цианобактерий.

### **Практическая значимость работы:**

- Результаты работы по исследованию механизма адаптации цианобактерий к высокому уровню освещенности актуальны в области биотехнологии для увеличения эффективности продукции биомассы и контроля роста токсикогенных цианобактерий, вызывающих цветение водоемов;
- Полученная модель комплекса OCP-FRP позволяет на ее основе создавать новые оптически контролируемые системы.

### **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.

### **Заключение**

Диссертация Слонимского Ю.Б. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого набора современных методов, постановкой логически обоснованных задач, взаимосвязанностью сделанных выводов и полученных результатов. Выводы и положения диссертации, выносимые на защиту, опубликованы в ведущих рецензируемых журналах (7 статей). Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и представляет интерес не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения.

На заседании 5 декабря 2024 года диссертационный совет принял решение присудить Слонимскому Юрию Борисовичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 9 докторов биологических наук, 8 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета 24.1.233.01.

«За» присуждение ученой степени - 18,

«Против» - нет,

Недействительных бюллетеней - нет.

Заместитель председателя

диссертационного совета

ФИЦ биотехнологии РАН

доктор химических наук, профессор

Б.Б. Дзантиев

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ биотехнологии РАН

Кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

«5» декабря 2024 г.

