

## ОТЗЫВ

официального оппонента Зориной Анны Алексеевны

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

Работа Слонимского Ю.Б. посвящена исследованию механизма функционирования регулятора нефотохимического тушения флуоресценции, белка восстановления флуоресценции (FRP) у цианобактерий. Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла — это процесс, при котором избыточная поглощенная световая энергия рассеивается в тепло. Он происходит в фотосинтетических мембранах растений, водорослей и цианобактерий. Стоит отметить, что система фотозащиты цианобактерий уникальна и не встречается ни у высших растений, ни у эукариотических водорослей. Сенсором и эффектором данного механизма является фотоактивный оранжевый каротиноидный белок (OCP). Под воздействием синего и зеленого света он претерпевает структурные и спектральные изменения и взаимодействует со светособирающими комплексами цианобактерий – фикобилисомами. Благодаря этому, происходит снижение эффективности передачи энергии с фикобилисом на реакционные центры фотосистем. Для ускорения перехода OCP из «красной» фотоактивированной в «оранжевую» неактивную форму необходимо присутствие белка-партнера - FRP. Несмотря на обширные исследования последних лет, оставалось неясным как именно FRP вовлечен в регуляцию активности OCP, а предлагаемые модели комплекса этих белков были противоречивы. Автором проведено исследование взаимодействия FRP и OCP у цианобактерий разных групп и выяснение деталей молекулярного взаимодействия. Последнее проливает свет на аспекты адаптации цианобактерий к условиям меняющейся освещенности и эволюцию этих механизмов. Принимая во внимание, что цианобактерии имеют огромный биотехнологический потенциал, то полученные автором данные могут являться основой для рационального дизайна новых систем фотозащиты и создания биопродуцентов с оптимизированными характеристиками. В этой связи диссертационная работа Слонимского Ю. Б., посвященная анализу белок-белковых взаимодействий компонентов системы фотозащиты цианобактерий, особенно актуальна.

## Структура диссертации

Диссертационная работа Слонимского Ю. Б. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и обсуждения, заключения, выводов, приложения, в котором приведены последовательности использованных в работе праймеров, и списка цитированной литературы, включающего 106 наименований. Иллюстративный материал представлен 38 рисунками и одной таблицей.

Обзор литературы содержит 6 разделов. В первом разделе обзора литературы подробно описаны механизмы фотозащиты у организмов разных групп, а также обнаружение нефотохимического тушения у цианобактерий, обусловленного активностью оранжевого каротиноидного белка (ОСР).

Во втором разделе обзора автор приводит данные о структуре и общих принципах функционирования ОСР, в частности, механизм взаимодействия с фикобилисомами, на примере цианобактерии *Synechocystis*. В последующих разделах обзора литературы подробно описан второй компонент системы фотозащиты – белок FRP. Обобщены и отмечены на структуре FRP известные аминокислотные замены, приводящие к изменению его активности. Заключительный раздел обзора литературы посвящен многообразию белков ОСР, разделенных, по современным представлениям, на три группы ОСР1, ОСР2 и ОСР3. Анализируя литературу, автор замечает существующее многообразие ОСР у цианобактерий и необязательное присутствие его белка-регулятора FRP в их геномах и ставит вопрос об универсальности канонической модели регуляции механизма фотозащиты. Таким образом, обзор литературы логически подводит к выбранной автором стратегии диссертационной работы – исследование механизмов регуляции ОСР белком FRP для отдельных паралогических линий ОСР.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» автором подробно описаны методы, использованные в ходе работы: клонирование генов, сайт-направленный мутагенез, трансформация бактериальных клеток, экспрессия белков в гетерологических системах, в том числе – в уникальном штамме *E. coli*, несущем плазмиду с путем синтеза каротиноидов, методы жидкостной хроматографии и методы исследования структуры и свойств белков и белковых комплексов. Отдельного внимания заслуживают разнообразные методы детекции белок-белкового взаимодействия. Используя комплементарные методы, автор с высокой достоверностью экспериментально подтверждает детали молекулярного взаимодействия ОСР с белком FRP.



Глава 3 посвящена описанию и обсуждению полученных результатов исследования. Эта глава включает 5 разделов. Автор, исследуя разнообразие и структурно-функциональные характеристики гомологов белка FRP, обращает свое внимание на их низкий уровень идентичности среди цианобактерий и ставит вопрос об универсальности действия белка FRP на фотоцикл белка OCP. В результате проведенного исследования автору удалось показать, что гомологи белка FRP сохраняют свою структуру и функциональные свойства, что дало экспериментальную основу для их сравнительного анализа. Второй и третий раздел посвящены поиску основного сайта взаимодействия OCP и FRP и получению их стабильного комплекса для структурных исследований, а также выяснению роли мономеризации FRP в процессе его функционирования. Путем удаления N-концевого сегмента OCP была получена форма OCP (OCP $\Delta^{2-20}$ ), компетентная для взаимодействия с FRP в отсутствие света. Использование метода S-S кроссшивков позволило автору получить стабильную димерную форму FRP. Данная форма, стабилизированная двумя дисульфидными мостиками, была активна и сохраняла структуру белка FRP дикого типа. Благодаря полученным формам OCP и FRP автору удалось получить стехиометрический комплекс OCP-FRP, который в дальнейшем был охарактеризован методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения. Анализ полученной структуры позволил построить модель функционирования белка FRP. В четвертом разделе автор обращается к многообразию белков OCP в контексте особенностей их функционирования и восприимчивости к действию белка FRP. Благодаря описанию OCP из примитивной цианобактерии *Gloeobacter* (GIOCPx), получению его структуры и функциональной характеристике автору удалось объяснить, как OCP может корректно осуществлять свою функцию даже в отсутствие FRP. В заключительном разделе рассматривается проблема присутствия гомологов белка FRP даже у нефотосинтетических микроорганизмов, в частности различных групп протеобактерий, у которых отсутствует OCP. Автор демонстрирует, что два представителя гомологов FRP из протеобактерий сохраняют общие черты строения известного цианобактериального FRP, однако не способны осуществлять ускорение перехода OCP в «оранжевую» форму.

В Заключении автор обобщает полученные данные и намечает направления для будущих исследований по данной проблеме. Выводы соответствуют поставленным задачам и согласуются с приведенными экспериментальными данными.

В тексте автореферата отражены основные результаты и выводы диссертационной работы. Содержание автореферата полностью соответствует основным разделам диссертации. Он оформлен по стандартной форме и соответствует установленным

требованиям. В автореферате показан вклад автора в проведенное исследование, степень новизны, теоретическая и практическая значимость результатов исследования

#### **Апробация результатов**

Результаты диссертации изложены в 7 статьях в международных научных журналах и тезисах докладов в 3 конференциях международного уровня: 43th FEBS Congress 2018 (Prague), 44th FEBS Congress 2019 (Krakow) и 45th FEBS Virtual Congress 2021.

#### **Замечания и вопросы по работе**

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 FRP<sub>сс</sub> для получения стабильной димерной формы FRP в подписи к рисунку 20 в явном виде не указано, какие именно параметры являются самыми оптимальными для получения финального препарата. 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 автор может объяснить полученные результаты?



2. Коррелируют ли полученные параметры взаимодействия ОСР и FRP (константа диссоциации и стехиометрия комплекса) с физиологическим ответом цианобактерий на воздействие синим светом?
3. В обзоре литературы автор рассматривает модель взаимодействия ОСР из *Synechocystis* sp. с фикобилисомой из того же организма, где отмечены участки ядра фикобилисомы, участвующие в образовании контакта с ОСР. 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 СОСР-FRP не наблюдалось. Как можно интерпретировать полученные результаты? Может ли автор предположить вероятный механизм взаимодействия с полноразмерным двухдоменным белком ОСР?

**Заключение.** Диссертация Слонимского Юрия Борисовича «Механизм функционирования белка восстановления флуоресценции (FRP) в регуляции фотозащиты у цианобактерий» является целостным законченным научным исследованием. Работа выполнена и оформлена в соответствии с современными требованиями. Автореферат полностью отражает содержание диссертации и соответствует положениям, выносимым на защиту. 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.

По актуальности, 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,

Старший научный сотрудник лаборатории клеточной регуляции

ФГБУН Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН,

кандидат биологических наук

Зорина Анна Алексеевна

127276, Москва, Ботаническая, 35

Телефон: +7(903) 220-62-73

Адрес электронной почты: tarlonc@yandex.ru

Подпись Зорина А.А. удостоверяю



Магашин  
Отдел кадров *А. А. Борисович*

"15" ноября 2024 г.