

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Цораева Георгия Витальевича
на тему: «Роль белка восстановления флуоресценции (FRP) в регуляции
фотоцикла оранжевого каротиноидного белка (ОСР) и фотозащитных
механизмов цианобактерий »
по специальности 1.5.2. – «Биофизика»**

Диссертация Цораева Георгия Витальевича посвящена исследованию конформационных изменений оранжевого каротиноидного белка (ОСР) при фотоактивации, особое внимание автор уделяет изучению механизма взаимодействия белка восстановления флуоресценции (FRP) с переходными состояниями ОСР.

Актуальность темы исследования

Оранжевый каротиноидный белок (ОСР) играет важную роль в защите светособирающих комплексов цианобактерий от фотоповреждений. Под действием света высокой интенсивности этот белок подвергается конформационным изменениям, переходит в активную форму, в которой он связывается с фикобилисомами и предотвращает передачу энергии к фотосинтетическим реакционным центрам. Хотя ОСР способен самостоятельно в темноте возвращаться в неактивное состояние и отсоединяться от фикобилисом, у многих цианобактерий есть специальный белок восстановления флуоресценции (FRP), который ускоряет этот процесс. Несмотря на то, что за последние годы была разрешена пространственная структура ОСР и FRP и их комплекса, механизм взаимодействия этих белков, а также структура промежуточных состояний ОСР в фотоцикле оставались неизученными. Диссертация Цораева Г.В. в основном посвящена решению этих, несомненно, актуальных для науки вопросов.

Научная новизна полученных результатов

В своей работе Цораев Г.В. использовал комплексный подход с использованием ряда сложных современных оптических методов и мутантных форм ОСР с заменами ключевых аминокислот, что позволило

ему, во-первых, обнаружить новые переходные состояния фотоцикла ОСР и установить их функциональные роли, и, во-вторых, показать взаимодействие FRP не только с активной красной формой ОСР, но и с промежуточным компактным фотоактивированным состоянием, предотвращая сам дальнейший переход в активной состоянии и связывание ОСР с фикобилисомой. Таким образом, научная новизна исследования Цораева Г.В. не подлежит никаким сомнениям.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов

Достоверность полученных данных подтверждается использованием современных биофизических экспериментальных методик, большим количеством повторов измерений, применением необходимых методов их математического анализа и сопоставлением результатов, полученных различными методами. Научные положения и выводы диссертации основаны на тщательном анализе полученных результатов с учётом последних достижений в изучаемой области.

Достоверность результатов, обоснованность выводов и признание их научным сообществом также подтверждается пятью публикациями в авторитетных рецензируемых международных изданиях.

Оценка содержания диссертационной работы

Диссертация Цораева Г.В. имеет классическую структуру и состоит из введения, трех основных разделов («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение»), заключения, выводов, списка литературы, состоящего из 108 источников, все из которых англоязычные. Материалы диссертации изложены на 132 страницах машинописного текста и проиллюстрированы 26 рисунками. По результатам, полученным в диссертации, опубликовано 5 научных работ в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова и индексируемых в базе данных Web of Science, в трех статьях Георгий Витальевич является первым автором.

Во **введении** раскрывается актуальность выбранной темы работы, а также дается оценка степени изученности темы исследования. Цель работы и ее задачи сформулированы логично, подчеркнуты научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Представлены основные положения, которые будут вынесены на защиту, а также информация об апробации проведенного исследования, описан личный вклад соискателя.

В **обзоре литературы** дано краткое, но достаточно детальное описание структурной организации светособирающих комплексов цианобактерий, структуры и функциональных особенностей белков OCP и FRP, также рассматриваются известные особенности взаимодействия этих белков и имеющиеся структурные модели, описывающие это взаимодействие.

Глава «**Материалы и методы**» написана достаточно подробно и соответствует предъявляемым к диссертациям критериям воспроизводимости. В этом разделе даны сведения об объектах исследования, экспериментальных условиях и примененных в исследовании методах. Используемые диссертантом методы многообразны и включают молекулярно-биологические и биохимические методы получения, очистки и характеристики исследуемых форм белков, методы флуоресцентного мечения белков, а также большой комплекс биофизических методов оптической спектроскопии с высоким временным разрешением.

Основные **результаты**, полученные автором и изложенные в соответствующем разделе, заключаются в следующем: были выявлены структурные изменения OCP, индуцированные воздействием света и связанные с разрывом водородных связей и разделением белковых доменов, в том числе описана роль и динамика разрыва водородной связи между триптофаном-288 и молекулой кето-каротиноида; был установлен ряд новых интермедиатов фотоцикла OCP, в том числе физиологически неактивное красное состояние, характеризующееся переходом кетокаротиноида в N-домен OCP и компактное оранжевое состояние, характеризующееся двумя водородными связями с триптофаном-288 и тирозином-201. Особенно

интересным представляется установление того факта, что белок FRP способен взаимодействовать не только с конечным активным продуктом фотоцикла ОСП (красной формой), но и с одним из промежуточных состояний фотоцикла, предотвращая таким образом появление активной красной формы и связывание с фикобилисомой. Полученные результаты четко и логично изложены, хорошо проиллюстрированы, обоснованы. Обсуждение результатов представлено аргументированно, проведено сравнение с данными отечественных и зарубежных исследований, как классических, так и современных.

В **заключении** автор четко и лаконично излагает итоги своей работы: основные результаты и заключения, сделанные на основании их анализа. Итогом работы является предложенная новая схема фотоцикла ОСП в присутствии белка FRP, в которой показана регуляторная роль FRP, предотвращающего взаимодействие активной формы ОСП с фикобилисомами. **Выводы** из работы обоснованы, **автореферат** полностью отражает содержание диссертации.

Вопросы, комментарии и замечания по работе:

1. Литературный обзор показывает глубокое знакомство автора с темой, но он довольно лаконичен и не дает полного представления об исследуемой проблеме для непосвященного в тему читателя. Например, не хватает сведений о том, насколько система ОСП-FRP консервативна и универсальна у цианобактерий и насколько возможно экстраполировать данные, полученные по структуре и функциям белков ОСП и FRP одного вида цианобактерий на другие виды?
2. Об ОСП каких именно цианобактерий идет речь в разных местах текста? Из методов не понятно, так как в материалах указан *Synechocystis*, в описании методологии (стр. 11) указан тоже только он. При этом в разделе «Методы» идет речь про выращивание *Arthrospira maxima*. Какой штамм *Arthrospira maxima* был использован в работе?

3. Какой штамм *E. coli* использовали для экспрессии описанных в работе рекомбинантных форм ОСР?
4. Какой каротиноид находился в рекомбинантных формах ОСР? Из описания, данного в методическом разделе, получается, что должен быть β -каротин, тогда как у цианобактерий – эхиненон. Не повлияет ли такая замена на структуру ОСР?
5. В тексте часто упоминаются сокращения, которым не дана расшифровка, или вводятся альтернативные сокращения, что иногда затрудняет понимание текста. Не всегда описание рисунка и сам рисунок соответствуют друг другу (например, в описании рис.11(С) упоминается зеленая линия, но ее нет на самом рисунке).
6. Какова же все-таки роль ОСР в защите фотосинтетического аппарата? Ведь, во-первых, квантовый выход образования активной формы очень низкий, и при наличии FRP активная форма может вообще не образовываться, а, во-вторых, переход в активную форму у ОСР происходит при 488 нм, тогда как фикобилисомы почти не поглощают свет в этой области.
7. Отсюда же вопрос, какова физиологическая роль FRP? Если активная форма ОСР выполняет защитные функции, то зачем предотвращать образование этой активной формы, которое и так не особо эффективно?
8. Как знание о пространственных структурах ОСР, FRP и их комплекса, и понимание механизма их взаимодействия могут помочь при использовании цианобактерий в качестве биотехнологических систем с высокой скоростью продукции биомассы, особенно в биореакторах (см. с. 6 диссертации)?

Все высказанные в отзыве комментарии и заданные вопросы носят дискуссионный характер и ни в коей мере не умаляют ценность представленной к защите диссертации. Диссертация Цораева Г.В. отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации

соответствует специальности 1.5.2. «Биофизика» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Цораев Георгий Витальевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. «Биофизика».

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
заведующая лабораторией экофизиологии микроводорослей
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии растений имени К.А.Тимирязева Российской академии наук»

Синетова Мария Андреевна

30 мая 2025 г.

Контактные данные:

тел.: 8(499) 6785400 (доб.346), e-mail: .ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

1.5.21– Физиология и биохимия растений

Адрес места работы:

127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35,
ФГБУН «Институт физиологии растений имени К.А.Тимирязева РАН»,
лаборатория экофизиологии микроводорослей
Тел.: 8(499) 6785420; e-mail: ifr@ippras.ru

