

**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 (биологические науки)**

Диссертационная работа Г.В.Цораева, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, посвящена изучению электронно-конформационных переходов при взаимодействии оранжевого каротиноидного белка (Orange Carotenoid Protein, ОСР) с белком восстановления флуоресценции (Fluorescence Recovery Protein, FRP). Исследование взаимодействия ОСР и FRP интересно потому, что имеет прямое отношение к механизму уникальной защитной системы, характерной для цианобактерий, которая связана с оранжевым каротиноидным белком ОСР. Белок ОСР может переключаться между двумя состояниями - оранжевым (неактивным) и красным (активированным светом). Активированный ОСР взаимодействует с фикобилисомой, подавляя передачу энергии к PSI и способствуя её диссипации в виде тепла. Данный механизм значительно повышает устойчивость цианобактерий к высоким уровням освещённости.

Актуальность темы исследования. Фотосинтез является глобальным источником энергии для жизнедеятельности биосферы Земли. В ходе фотосинтеза энергия солнечного света преобразуется в энергию высокоэнергетических химических соединений. Процессы фотосинтеза могут протекать в условиях, когда освещение существенно изменяется. При этом фотосинтезирующие организмы должны защищаться от избытка поглощенных квантов света, способных породить активные формы кислорода (ROS) повреждающие фотосинтетический аппарат. Растения и водоросли гибко адаптируются к условиям среды, защищая себя от потенциально вредных последствий чрезмерного освещения и сохраняя

высокий уровень эффективности фотосинтетических реакций. Одной из защитных стратегий является уникальная защитная система, характерная для цианобактерий, которая связана с оранжевым каротиноидным белком (ОСР). Детальное исследование регуляторного функционирования ОСР актуально в связи с важностью цианобактерий для биотехнологий и экологии.

Научная новизна полученных результатов. В работе Г.В.Цораева определена совокупность изменения абсорбционных и флуоресцентных свойств ОСР при фотоактивации. Накопление красной формы ОСР^R наблюдали по оптическому поглощению каротиноида эхиненона и по триптофановой флуоресценции белка. Было установлено изменение гидрофобных свойств ОСР по флуоресценции гидрофобного красителя «Нильский голубой» при фотоактивации. При изучении влияния Trp-288 и Trp-201 на взаимодействие белка с каротиноидом эхиненоном и на стабилизацию оранжевой формы ОСР^O показано, что Trp-288 белка не является необходимым для фотопереключения ОСР аминокислотным остатком. Более вероятно, что взаимодействие с Trp-288 является дополнением к связи каротиноида с тирозином-201 белка и необходимо для стабилизации промежуточного соединения ОСР^{OI} во время обратной конверсии. Также было установлено, что триптофановые остатки ОСР не являются необходимыми для фотоактивности ОСР, хотя эти остатки могут быть важны для регуляции фотозащиты.

В рамках диссертационной работы было показано, что фотоцикл ОСР характеризуется согласованным характером электронно-конформационных взаимодействий на всех этапах, включая конформационное изменение каротиноида, его белкового окружения и взаимодействия структурных субъединиц.

Были обнаружены новые переходные состояния фотоцикла ОСР, установлены и охарактеризованы их функциональные роли. Описано взаимодействие ОСР с FRP, предотвращающее реализацию последующих конформационных изменений ОСР, таких, как разделение структурных

доменов и образование физиологически активного состояния ОСР, способного взаимодействовать с антенными комплексами.

Полученные данные уточняют существующую модель фотоиндуцированных переходов ОСР и взаимодействия его промежуточных состояний с белком FRP. Результаты экспериментов *in vitro* указывают, что наличие FRP в клетке может полностью предотвращать накопление активной формы ОСР даже в условиях повышенной интенсивности освещения.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов. Достоверность полученных результатов основывается на использовании современного спектрального оборудования, лазерных и светодиодных источников света непрерывного, а также пикофемтосекундного временного диапазонов, применении современных биофизических методик исследований, многократном повторении экспериментов для повышения точности измерений. Применение адекватных математических инструментов анализа данных и сопоставление сведений, полученных различными методами, также служат повышению достоверности результатов. Выводы и научные положения, представленные в исследовании, основываются на тщательном анализе последних результатов полученных в других лабораториях. Помимо прочего, научная ценность работы и признание выводов научным сообществом дополнительно подтверждаются публикациями автора в авторитетных международных изданиях, прошедших экспертную оценку специалистов.

Оценка содержания диссертационной работы. Диссертационная работа Г.В.Цораева состоит из Введения, Главы 1. «Обзор литературы», Главы 2. «Материалы и методы», Главы 3. «Результаты исследования», Заключение, Выводов, Списка сокращений и Списка литературы.

Во Введении показана актуальность темы диссертационной работы и описана степень разработанности проблемы. Указывается, что целью работы является изучение конформационных изменений оранжевого каротиноидного белка (ОСР) при фотоактивации, а также механизма взаимодействия белка

восстановления флуоресценции FRP с OCP и переходных состояний фотоцикла OCP. Цель работы и задачи хорошо сформулированы, подчеркнуты научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Приведены основные положения, которые будут вынесены на защиту, а также информация об апробации проведённого исследования, описан личный вклад соискателя.

В «Обзоре литературы» описывается структура комплексов светособирающих антенн цианобактерий; структура, функция и фотоактивность OCP; функции и структурная организация белка восстановления флуоресценции (FRP); расположение и экспрессия генов FRP, структурные модели и взаимодействие белков OCP и FRP.

В Главе «Материалы и методы» в первой части описываются культивирование цианобактерий; экспрессия и очистка белков; конструкции кДНК и клонирование; флуоресцентное мечение OCP. Во второй части, посвященной методам, приведены условия освещения OCP, измерения спектров оптического поглощения и флуоресценции, пикосекундные измерения флуоресценции и анизотропии с временным разрешением, а также методы время-коррелированного счета одиночных фотонов (TCSPC) для переходных процессов флуоресценции триптофана. Кроме того, кратко рассмотрены динамическое рассеяние света и аналитическая эксклюзионная хроматография.

В Главе «Результаты исследования» три подглавы с большим числом параграфов: Изменение свойств OCP вследствие фотоактивации; Конформационные изменения структуры OCP при фотоактивации; Взаимодействие OCP и FRP на разных этапах фотоцикла.

Автор в Заключение ясно и сжато подводит итог проделанной работе, представляя главные выводы и обобщения, полученные в процессе исследования. Основным результатом стало предложение новой модели фотоцикла OCP в присутствии белка FRP, демонстрирующей регулирующее воздействие последнего, препятствующего контакту активной формы OCP с

фикобилисомами. Сделанные выводы аргументированы, а автореферат точно передает содержание диссертации.

Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, иллюстрирована 26 рисунками. Список литературы включает 108 источников.

При ознакомлении с диссертационной работой Г.В.Цораева у меня появилось несколько вопросов:

1. В диссертации обсуждается роль водородных связей между каротиноидом эхиненоном и остатками тирозина и триптофана ОСР для образования оранжевой формы ОСР^R. Показано что для формирования этого состояния достаточно связи с одним остатком тирозином-201. Зачем тогда в природных вариантах ОСР встречаются оба остатка тирозин-201 и триптофан-288?
2. В экспериментах в режиме "накачка-зондирование" обычно варьируют время зондирования, однако при изучении динамики разрыва водородной связи по триптофановой флуоресценции наоборот линия задержки была в канале накачки. С чем связана такая необычная схема установки?
3. Показано что ОСР не способен переходить в красную активную форму в присутствии FRP, что известно о возможности активации нефотохимического тушения флуоресценции фикобилисом в аналогичных условиях (in vitro)?

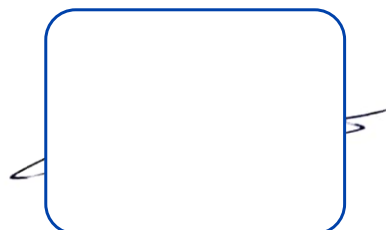
Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.2. «Биофизика» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационная работа 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».

доктор физико-математических наук,
заведующий отделом фотосинтеза и флуоресцентных методов исследований
НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского
ФГБУ ВО учреждения «Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова»

РАЗЖИВИН Андрей Павлович



09.06.2025

Контактные данные:

тел.:  -mail: razjivin@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

1.5.2. – «Биофизика»

119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40

Адрес места работы:

119234 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени
М. В. Ломоносова», НИИ физико-химической биологии имени
А. Н. Белозерского

Тел.: 7(495)9395359; e-mail: razjivin@belozersky.msu.ru

Подпись сотрудника ФГБОУ ВО «Московский государственный
Университет имени М.В. Ломоносова» удостоверяю:

Изначально
отдела кадров

