МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пущинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

142290, Московская обл., г.о. Серпухов, г. Пущино, проспект Науки, д.3.
Тел./факс: (4967)73-26-36, e-mail: info@pncbi.ru, https://www.pbcras.ru
ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983, ИНН/КПП 5039002841/503901001

_____ № _____

На № _____ от _____

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук
Диссертационный совет 24.1.233.01

Отзыв на диссертацию
Обухова Юрия Николаевича «Исследование фотохимических свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков семейства WSCP-II», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Обухова Ю.Н. посвящена исследованию фотохимических свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков семейства WSCP-II. Белки данного семейства представляют особый интерес, поскольку, в отличие от большинства других хлорофилл-связывающих белков, локализуются в эндоплазматическом ретикулуме и не принимают непосредственного участия в фотосинтезе. Физиологические функции WSCP-II белков в растениях до настоящего времени остаются недостаточно изученными. Вместе с тем высказывается предположение о возможности перемещения данных белков из эндоплазматического ретикулума в хлоропласт, а также об их потенциальном участии в регуляции стрессовых ответов и функционировании сигнальных систем растений. Кроме того, особенности организации молекул хлорофилла в составе WSCP-II позволяют предположить, что в этих белковых комплексах могут протекать фотохимические реакции, сопровождающиеся генерацией активных форм кислорода (АФК). Однако возможность протекания таких реакций, а также

лежащие в их основе молекулярные механизмы требуют всестороннего изучения. В связи с этим исследование фотохимической активности белков WSCP-II представляет значительный интерес как для понимания их возможных физиологических функций, так и для разработки подходов к использованию данных белков в биотехнологии и фотодинамической терапии. Учитывая этот факт, актуальность выбранной темы диссертационной работы не вызывает сомнений.

Цель исследования достаточно ясно сформулирована и заключается в анализе способности димеров хлорофилла в составе холобелков WSCP-II проявлять фотохимическую активность. Для достижения цели диссертационной работы были получены рекомбинантные апобелки BoWSCP (водорастворимый хлорофилл-связывающий белок из *Brassica oleracea*) и LvWSCP (водорастворимый хлорофилл-связывающий белок из *Lepidium virginicum*), которые затем инкубировали с изолированными тилакоидами для формирования холобелков с хлорофиллом.

Работа имеет теоретическую и практическую значимость и характеризуется научной новизной. Важным представляется комплексный подход к изучению фотохимических свойств данных белков, включающий исследование первичных процессов, анализ фотоиндуцированных окислительно-восстановительных реакций с участием экзогенных доноров и акцепторов электронов, а также оценку их устойчивости к воздействию факторов среды. Результаты работы создают предпосылки для дальнейших исследований физиологических функций WSCP-II в стрессовых ответах растений и открывают перспективы практического использования данных комплексов. Научные положения, выносимые на защиту, являются обоснованными. Выводы достоверны.

Структура и содержание диссертации

Диссертация Обухова Ю.Н. структурно построена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, материалы и методы,

результаты, обсуждение, заключение, выводы, список литературы и благодарности. Работа содержит 126 страниц машинописного текста, 36 рисунков и 1 таблицу. Список цитируемой литературы включает 161 источник.

Во введении обосновывается актуальность исследования, сформулированы цель и задачи работы, определены теоретическая и практическая значимость, научная новизна и положения, выносимые на защиту. Литературный обзор содержит необходимую для понимания современного состояния проблемы информацию. Рассмотрены особенности водорастворимых хлорофилл-связывающих белков семейства WSCP, их структурные и филогенетические различия, а также современные представления о возможных физиологических функциях данных белков в растениях. Отдельное внимание уделено особенностям организации молекул хлорофилла в составе белков WSCP-II и фотохимическим процессам, которые могут протекать с их участием. Представленные сведения позволяют оценить степень разработанности проблемы и обосновывают необходимость проведения настоящего исследования.

Методический арсенал представленной работы обширен и соответствует поставленным задачам. Для получения апобелков WSCP-II использовали гетерологичную экспрессию в клетках *Escherichia coli* с последующей сборкой хлорофилл-белковых комплексов. Чистоту и нативность полученных препаратов контролировали с помощью денатурирующего и нативного электрофореза в полиакриламидном геле, а также с использованием абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма. Для изучения быстрых процессов, протекающих после возбуждения хлорофилла светом, применяли широкополосную фемтосекундную лазерную спектроскопию «возбуждение-зондирование». Кроме того, использовали спектрофотометрические и флуориметрические методы для исследования фотоиндуцированных

окислительно-восстановительных реакций и устойчивости холобелков к различным факторам среды.

Первый раздел результатов диссертационной работы посвящен получению и характеристике белковых препаратов WSCP-II. Автором получены препараты апобелков и осуществлена их сборка в хлорофилл-белковые комплексы. Электрофоретический анализ показал ожидаемую молекулярную массу апобелков около 20 кДа и отсутствие примесей посторонних белков. Спектральные характеристики полученных холобелков BoWSCP и LvWSCP соответствовали опубликованным в литературе данным. Полученные результаты имеют принципиальное значение для последующего исследования фотохимических свойств комплексов, поскольку подтверждают качество экспериментального материала и позволяют проводить дальнейший анализ с использованием охарактеризованных белковых препаратов.

Важным результатом работы является исследование сверхбыстрых фотохимических процессов в холобелках WSCP-II. С использованием фемтосекундной лазерной спектроскопии автором получены свидетельства оттока энергии возбуждения в холобелках BoWSCP на протекание сверхбыстрой фотохимической реакции между связанным хлорофиллом и остатками триптофана в его аминокислотном окружении. Данный результат представляет интерес для понимания первичных процессов, происходящих в хлорофилл-белковых комплексах после поглощения энергии света, и расширяет существующие представления о возможных путях преобразования этой энергии в белках семейства WSCP-II. Следует отметить, что исследование процессов в фемто- и пикосекундном диапазонах времени позволяет выявлять особенности фотохимической активности, которые невозможно установить при использовании только традиционных спектроскопических методов.

Существенная часть экспериментальных результатов посвящена изучению фотоиндуцированных окислительно-восстановительных реакций с участием холобелков WSCP-II. В работе впервые экспериментально

продемонстрирована способность данных комплексов к окислению экзогенных доноров электрона, таких как NADH и аскорбат натрия. Исследование механизмов этих реакций показало, что фотоиндуцированное окисление указанных соединений происходит с участием синглетного кислорода, генерируемого при фотохимическом возбуждении хлорофилла. Другим важным результатом является выявление способности холобелков WSCP-II к фотоиндуцированному восстановлению экзогенного цитохрома *c*. Показано, что данный процесс опосредован образованием супероксидного анион-радикала. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о способности BoWSCP и LvWSCP холобелков участвовать в фотоиндуцированных окислительно-восстановительных реакциях, приводящих к генерации АФК.

Отдельного внимания заслуживает исследование устойчивости WSCP-II к действию факторов окружающей среды. Автором показано, что белковая структура и связанный хлорофилл сохраняют устойчивость при освещении светом высокой интенсивности, изменении температуры и pH среды в широком диапазоне. Кроме того, продемонстрирована устойчивость холобелков к условиям сенсибилизации ими фотохимических реакций. Данные результаты дополняют характеристику изучаемых комплексов и имеют значение для оценки перспектив их дальнейшего использования в качестве компонентов фотохимических и биотехнологических систем.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается контролем качества и нативности белковых препаратов, использованием комплекса спектроскопических и электрофоретических методов, проведением фотохимических экспериментов не менее чем в трех независимых повторностях и применением стандартных методов математической статистики. Результаты диссертационной работы опубликованы в пяти статьях в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, а также

представлены в материалах одиннадцати профильных научных конференций. Представленные сведения свидетельствуют о достаточной апробации результатов исследования.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

У оппонента отсутствуют замечания к основным разделам диссертационной работы. Однако при прочтении диссертационной работы возникли вопросы, требующие комментариев со стороны соискателя:

1. Известно, что хлорофилл подвержен феофитинизации как в растворах, так и под действием факторов среды, в том числе в связанном состоянии. Автором не представлены свидетельства о контроле феофитинизации хлорофилла в процессе сборки холобелков, а также во время проведения экспериментальной работы с холобелками, в частности, при термической обработке, при изменении pH среды, при освещении светом высокой интенсивности и т.д.
2. В работе в качестве объектов исследования использовали как BoWSCP, так и LvWSCP холобелки. Однако в положениях, выносимых на защиту, приводятся данные только о BoWSCP холобелках.
3. Представленные данные не позволяют однозначно подтвердить протекание сверхбыстрой фотохимической реакции между хлорофиллом и остатком триптофана в BoWSCP холобелках; предполагаемый механизм следует обозначить как гипотезу, основанную на полученных данных, а не как доказанный факт.
4. Автором показана способность холобелков генерировать АФК, такие как синглетный кислород и супероксидный анион-радикал. Образование синглетного кислорода не требует участия донора электронов, поскольку данный процесс осуществляется посредством переноса энергии от хлорофилла в триплетном состоянии к молекулярному кислороду. В то же время генерация супероксидного анион-радикала предполагает одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода. В связи с

этим возникает вопрос: какой компонент холобелков выступает в качестве донора электрона в данном процессе?

5. Для подтверждения супероксид-зависимого восстановления цитохрома *c* необходимо сравнивать результаты в отсутствие и присутствии только супероксиддисмутазы. Проводились ли такие эксперименты, поскольку использование супероксиддисмутазы совместно с каталазой не позволяет однозначно установить роль супероксидного анион-радикала в восстановлении цитохрома *c*?
6. В разделе «Обсуждение результатов» хотелось бы видеть более широкое рассмотрение возможной физиологической роли холобелков WSCP-II в высших растениях и их потенциального значения для функционирования фотосинтетического аппарата, в том числе с учетом выявленных закономерностей их фотохимической активности и возможных механизмов участия в фотоиндуцированных процессах.

Заключение

Вместе с тем приведенные замечания не оказывают существенного влияния на общую положительную оценку диссертационной работы. Диссертация Обухова Юрия Николаевича «Исследование фотохимических свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков семейства WSCP-II» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой получены новые экспериментальные данные о фотохимической активности холобелков WSCP-II, механизмах фотоиндуцированных окислительно-восстановительных реакций и устойчивости данных комплексов к воздействию факторов среды. По актуальности, объему выполненного исследования, методическому уровню, новизне полученных результатов, их теоретической и практической значимости представленная работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в действующей редакции),

предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Обухов Юрий Николаевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией фотосинтетического электронного транспорта Института фундаментальных проблем биологии РАН – обособленного подразделения ФГБУН ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», доктор биологических наук Мария Мансуровна Борисова

Адрес: 142290, г. Пущино, ул. Институтская д. 2
Тел.: +7(4967)73-27-15
E-mail: mubarakshinamm@gmail.com

Я, Борисова Мария Мансуровна, настоящим даю согласие на размещение моих персональных данных на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН и в Федеральной информационной системе государственной научной аттестации, включение их в диссертационное дело соискателя и их дальнейшую обработку.

27 октября 2026 года Мария Мансуровна Борисова

Подпись Борисовой Марии Мансуровны заверяю

Ученый секретарь
ФИЦ ПНЦБИ РАН Галина Николаевна Назарова