ОТЗЫВ

официального оппонента Богачева Александра Валерьевича на диссертацию Обухова Юрия Николаевича «Исследование фотохимических свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков семейства WSCP-II», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Диссертационная работа Обухова Ю.Н. посвящена изучению необычных белков некоторых растений – водорастворимых хлорофилл-связывающих белков второго типа (WSCP-II). Эти белки встречаются у различных представителей крестоцветных и отличаются своей уникальной для водорастворимых белков способностью прочно связывать димеры хлорофилла. Физиологическая роль WSCP-II на настоящий момент неизвестна. Также необходимо упомянуть определенный биотехнологический потенциал этих белков, связанный с возможностью их применения при фотодинамической терапии и в других приложениях. В связи с этим актуальность темы исследования Обухова Ю.Н. не вызывает сомнений.

Для определения физиологической роли и биотехнологического потенциала WSCP-II необходимо определение фотохимических свойств этих белков, что и являлось основной целью диссертационной работы. Цель и задачи сформулированы хоть и довольно узко, но вполне корректно. Теоретическая и практическая значимость работы подтверждается публикацией 5 научных статей и представлением результатов на 11 профильных научных конференциях.

Диссертация Обухова Ю.Н. построена по традиционному плану и содержит разделы Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы. Диссертация изложена на 126 страницах, содержит 36 рисунков и 1 таблицу. Список литературы содержит 161 источник. Текст работы написан хорошим языком и легко читается. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Обзор литературы описывает разнообразные водорастворимые хлорофилл-связывающие белки, их физико-химические свойства и структурные особенности. Также большое внимание уделено пигментному составу этих белков, их фотохимической активности и их возможным

физиологическим функциям в клетках фотосинтезирующих организмов. Использованные автором методы подробно описаны.

В разделе Результаты описаны основные проведенные эксперименты. Автором произведена гетерологическая наработка двух разных белков WSCP-II-типа в апо-форме в клетках *E. coli* и их последующая очистка. Далее Обуховым Ю.Н. была разработана оригинальная методика встраивания хлорофилла в исследованные белки и выделения их холо-форм в электрофоретически чистом виде. Фотохимическая активность полученных белков в фемпто-пикосекундном диапазоне исследовалась с помощью фемптосекундной спектроскопии. Полученные данные позволили автору заключить, что при возбуждении полосы Соре связанных с белком хлорофиллов, часть энергии возбуждения теряется в ходе фотохимической реакции с каким-то близко расположенным аминокислотным остатком (остатками), возможно с одним из остатков триптофана. Далее фотохимическая активность полученных белков определялась и в минутном временном диапазоне по способности WSCP-II свето-зависимым образом (i) окислять NADH или аскорбат и (ii) восстанавливать цитохром *c*. Убедительно показано, что эти активности WSCP-II наблюдаются только в присутствии кислорода и протекают опосредованно, через генерацию синглетного кислорода и супероксидрадикала, соответственно. Также проведено исследование устойчивости холобелков WSCP-II к изменению значения температуры, pH, а также к участию в фотохимических реакциях. Показана уникальная стабильность холо-форм этих белков, в том числе продемонстрирована их относительно высокая устойчивость по отношению к облучению светом в присутствии кислорода.

Раздел Обсуждение посвящен анализу полученных данных. В том числе, пожалуй, самый важный полученный результат автор почему-то поместил именно в раздел Обсуждение. В ходе проведенного эксперимента проведено сравнение светозависимой генерации синглетного кислорода хлорофиллом как в свободном виде (в составе мицелл), так и при его связывании с WSCP-II. Показано, что связывание с белком не препятствует способности хлорофилла к генерации $^1O_2$. В то же время, связывание хлорофилла с WSCP-II препятствует фотодеструкции этого пигмента, что в сумме приводит к усиленной генерации синглетного кислорода в случае холо-формы WSCP-II по сравнению со свободным хлорофиллом. Эти данные убедительно опровергают высказывавшуюся ранее гипотезу о протекторной роли WSCP-II в клетках растений по отношению к фотодинамическому действию свободного хлорофилла, появляющегося в ходе разрушения хлоропластов. На основе полученных данных Обухов Ю.Н. выдвигает смелую альтернативную гипотезу о свето-зависимом фотодинамическом действии WSCP-II на патогенов растений и фитофагов, что может являться

основной функцией этого белка в клетке. Эта гипотеза хорошо согласуется с клеточной компартментализацией WSCP-II, однако еще требует дополнительных доказательств.

Сделанные автором выводы, в основном, соответствуют полученным в ходе выполнения работы данным.

Несмотря на общее весьма положительное впечатление от работы есть несколько вопросов, на которых следует остановиться:

1. На мой взгляд, вывод 2 не может быть полностью сделан исходя из полученных данных. В тексте работы отсутствуют убедительные доказательства об участии остатков именно триптофана в наблюдаемой фотохимической реакции. На мой взгляд, формулировка вывода должна быть немного смягчена.

2. Было бы важным определить спектр возбуждения флуоресценции хлорофилла для WSCP-II и сравнить его со спектром поглощения этого белка, а также со спектром возбуждения свободного хлорофилла. Это позволило бы доказать сделанные с помощью фемптосекундной спектроскопии выводы независимым методом, а также выявить участие обоих переходов (в полосе Соре и в Q_y) в фотохимической реакции.

3. Было бы важно провести эксперимент, представленный на рис. 36 диссертации, не только для генерации WSCP-II синглетного кислорода, но и для генерации супероксидрадикала. Это значительно украсило бы проделанную работу и расширило бы возможности по обсуждению функциональной роли изучаемого белка.

Важно отметить, что высказанные замечания носят дискуссионный характер и не умаляют значимости полученных результатов и общую высокую оценку работы.

Диссертация Обухова Юрия Николаевича «Исследование фотохимических свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков семейства WSCP-II» является законченной научно квалификационной работой и соответствует паспорту научной специальности 1.5.4. Биохимия. По актуальности, объему выполненного исследования, методическому уровню, новизне полученных результатов, их фундаментальной и практической значимости представленная работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям а её автор, Обухов Юрий Николаевич, заслуживает

присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заведующий отделом молекулярной энергетики микроорганизмов Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского Государственного университета имени М.В. Ломоносова, доктор биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия (ранее 03.01.04),

Богачев Александр Валерьевич

21.10.2026

Контактные данные:

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

email: bogachev@belozersky.msu.ru

тел: +7 495 9300086

Подпись Богачева А.В. заверяю:

и.о. директора Научно-исследовательского института

физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

Московского Государственного университета имени М.В. Ломоносова,

член-корреспондент РАН

П.В. Сергиев

21.10.2026