

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук Кусочека Павла Александровича на тему: «Моделирование механизмов первичных фотохимических реакций и фотоиндуцированной динамики ретиналь-содержащих белков» по специальности 1.4.4 – «Физическая химия»

Диссертационная работа Кусочека П.А. посвящена теоретическому исследованию механизма фотоизомеризации хромофорных групп фотоактивных белков родопсинов при помощи современных неэмпирических методов квантовой химии и молекулярной динамики.

Светочувствительные ретиналь-содержащие белки родопсины представлены во всех царствах живых организмов. Они делятся на микробиальные родопсины (I типа) и родопсины животных (II типа). Большинство представителей родопсинов I типа функционируют как ионные насосы, выполняя фотоэнергетическую функцию (простейший фотосинтез); некоторые из них, функционируя как катионные или анионные каналы или связываясь с белком-переносчиком в ответ на световой сигнал, выполняют фотосенсорную функцию.

В основе функционирования родопсинов лежит фотохимическая реакция изомеризации хромофорной группы (полностью-*транс* ретиналя в микробиальных родопсинах и 11-*цис* ретиналя в родопсинах животных), которая инициирует конформационные изменения белковой части молекулы, сопровождающиеся образованием промежуточных продуктов (интермедиатов) с различными временами жизни и спектральными свойствами. Фотореакция характеризуется уникальными параметрами, которые определяются как внутренними свойствами хромофора, так и влиянием белкового окружения. Как результат, резко возрастает скорость, квантовый выход и селективность фотореакции по сравнению с аналогичной

фотореакцией в растворе. Первичный акт фотоизомеризации хромофора протекает когерентно в фемтосекундном временном диапазоне, а процесс запасания энергии кванта света завершается в раннем пикосекундном временном диапазоне.

Несмотря на большой прогресс в изучении фотореакции родопсинов, достигнутый как экспериментально, так и теоретически, роль и взаимодействие сверхбыстрых молекулярных процессов, лежащих в основе фотоизомеризации хромофора, а также влияние белкового окружения на динамику реакции являются предметом дискуссий. Поэтому дальнейшее изучение механизма такого быстрого, эффективного и когерентного процесса преобразования энергии, осуществляемого в родопсинах, является важной задачей.

Таким образом, для объяснения механизмов функционирования родопсинов, а также для успешного рационального дизайна новых родопсинов с заданными свойствами важно понимать механизм первичной фотохимической реакции. Отдельным вопросом является различие в скоростях фотоизомеризации хромофора микробных и животных родопсинов. Ранее считалось, что эта разница обусловлена различным конформационным состоянием хромофора в этих родопсинах. Но недавнее открытие микробного родопсина KR2, в котором ретиналь изомеризуется со скоростью, сопоставимой с таковой в животных родопсинах, более не позволяет сводить различия в скорости фотохимической реакции в двух группах родопсинов только к структуре хромофорной группы. Кроме того, до сих пор не установлена природа медленных нерреакционноспособных компонент в динамике распада возбужденного состояния родопсинов.

В своей диссертационной работе Кусочек П.А. обращается к рассмотрению вопроса о том, какие механизмы лежат в основе обеспечения высокой эффективности первичной реакции фотоизомеризации в микробных родопсинах и родопсинах животных. В рамках изучения

данной темы соискатель сосредоточился на исследовании ранней динамики фотоизомеризации хромофорных групп в разных белках. Важно отметить, что в работе были использованы активно развивающиеся высокоточные неэмпирические методы квантовой химии, которые позволяют получить качественно новые результаты даже для уже хорошо изученных родопсинов. В представленных исследованиях были учтены новые экспериментальные данные о недавно открытом родопсине KR2, который стал первым микробальным родопсином, сравнимым по скорости фотохимической реакции с родопсинами животных. Также в диссертации рассматривается вопрос о нереакционноспособных состояниях родопсинов, в частности, малоизученного родопсина KR2, что является важным предметом в теме изучения многих родопсинов. Таким образом, вопросы, изучаемые в диссертационной работе, являются **актуальными** и находятся в соответствии с современными вызовами, возникающими при исследовании родопсинов.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, расчетной части, обсуждения результатов, выводов, списка сокращений, списка литературы и приложений. Объем диссертации составляет 150 страниц машинописного текста, работа содержит 50 рисунков, 10 таблиц и 2 приложения. В список литературы входит 194 ссылки.

Введение содержит раздел об актуальности вопросов, изучаемых в диссертационной работе. Также во введении имеется информация о новизне и степени разработанности темы исследования, обозначены объект и предмет исследования, цель и задачи работы.

Литературный обзор (глава 1) содержит описание современных экспериментальных и теоретических данных о фотохимии исследуемых родопсинов, фотофизических свойств хромофорных групп в различном окружении, а также описание основ методов квантовой химии, используемых в диссертационной работе. Рассмотрены ключевые стадии фотохимии данных белков. Также соискатель останавливается на обзоре

кристаллических структур микробных и животных родопсинов, на подробном анализе устройства их активных центров. Описанные кристаллические структуры использованы в диссертационной работе в качестве стартовых структур для проведения молекулярно-динамического моделирования.

Вторая часть литературного обзора содержит информацию о влиянии среды, в которую помещены хромофорные группы родопсинов, на их спектральные и фотофизические характеристики. Так, например, автор подробно останавливается на вопросе о том, каким образом первичный противоион, стабилизирующий положительно заряженный хромофор в активном центре и его положение относительно хромофорной группы, изменяет спектр поглощения протонированного основания Шиффа ретиналя.

Еще одним важным блоком в данной части литературного обзора является рассмотрение фотоиндуцированной динамики хромофора в различных окружениях. Рассмотрены эксперименты по мутагенезу аминокислотных остатков в активном центре родопсинов, в которых изучался вопрос, каким образом замена того или иного аминокислотного остатка влияет на скорость и квантовый выход фотоизомеризации. Также детально рассмотрен вопрос о нереакционноспособных состояниях разных родопсинов, в частности, недавно открытого микробного родопсина KR2.

В третьей части главы 1 помещен обзор методов теоретической и квантовой химии, применяемых в диссертационной работе для проведения расчетов. Приведены основы метода потенциалов эффективных фрагментов, который нужен для учета влияния белкового окружения на свойства хромофорной группы. Также описана теория, лежащая в основе неэмпирических высокоточных методов квантовой химии, при помощи которых были рассчитаны фотофизические свойства протонированного основания Шиффа ретиналя во всех рассматриваемых окружениях.

Глава 2 диссертационной работы посвящена описанию методики проведения расчетов при помощи методов молекулярной динамики и квантовой химии. В первых двух разделах данной главы соискатель приводит параметры расчетов фотофизических и фотохимических свойств изомеров протонированного основания Шиффа ретиналя и их модифицированных форм в газовой фазе при помощи неэмпирических методов квантовой химии. Также в данной главе описаны детали молекулярно-динамического моделирования родопсинов, детали создания полных атомистических моделей белков в водном окружении, описаны мутации, сделанные для нейтрализации общего заряда системы. Приведены подробности расчетов при оптимизации геометрических параметров белковых систем в основном электронном состоянии при помощи комбинированного метода квантовой и молекулярной механики. В заключительной части данной главы описана методика расчета фотофизических свойств хромофорной группы в белковом окружении при помощи высокоточных неэмпирических методов квантовой химии.

Глава 3 посвящена обсуждению полученных результатов. В первой и второй части данной главы приведены сечения потенциальной энергии, полученные при вращении различных изомеров хромофора и его модифицированных форм вокруг определенных двойных связей, и рассчитанные константы скорости фотоизомеризации. На основании этих данных соискатель делает важный вывод о влиянии изомерной формы хромофорной группы и ее структурных модификаций на скорость и эффективность фотоизомеризации. Также в этой главе рассматриваются результаты, полученные в ходе моделирования фотофизических свойств хромофорных групп родопсинов. Приведено подробное описание того, какие изменения происходят в структуре активных центров родопсинов при оптимизации геометрии по сравнению с исходными кристаллическими структурами. На основе полученных структур были рассчитаны электронно-колебательные спектры хромофорных групп в рассматриваемых родопсинах.

Из анализа данных спектров были сделаны выводы о том, как белковое окружение родопсинов I и II типов влияет на активность определенных колебательных мод протонированного основания Шиффа ретиналя при фотовозбуждении. Рассмотрев закономерность, существующую между структурой активного центра родопсинов и возбуждением определенных колебательных мод, соискатель изучил вопрос о связи гетерогенности основного состояния родопсина KR2 с возникновением нереакционноспособных состояний в динамике распада его первого синглетного электронно-возбужденного состояния.

Научная новизна и ценность полученных результатов отражена в выводах диссертационной работы.

1. Установлено, что изолированный 11-*цис* изомер хромофорной группы родопсинов обладает скоростью фотоизомеризации, сравнимой со скоростью этой реакции в белковом окружении родопсинов животных. При этом фотохимические свойства полностью *транс* протонированного основания Шиффа ретиналя в газовой фазе значительным образом отличаются от таковых свойств хромофора в микробильных родопсинах, белковое окружение которых изменяет специфичность реакции фотоизомеризации и снижает время жизни в электронно-возбужденном состоянии на порядок.
2. Найдены способы управления фотоиндуцированной динамикой протонированного основания Шиффа ретиналя в газовой фазе. Показано, что характеристическое время фотоизомеризации хромофорной группы можно снизить путем введения химических модификаций в структуру хромофора, изменяющих конформацию сопряженной полиеновой цепи в основном и электронно-возбужденном состояниях.
3. С использованием высокоточных неэмпирических методов квантовой химии показано, что родопсины I и II типов способны уже на ранних временах оказывать значительное влияние на фотоиндуцированную динамику хромофорной группы, приводя к возбуждению именно тех колебательных мод, которые способствуют реакции фотоизомеризации по

определенной двойной связи. Наиболее сильная связь между структурой активного центра белка и фотодинамикой наблюдается в родопсинах I и II типов, в которых присутствует сильная водородная связь между протонированным основанием Шиффа ретиналя и его противоионом, что приводит к изменению конформации сопряженной полиеновой цепи ретиналя, как и в химически модифицированных аналогах хромофора в газовой фазе.

4. Показано, что микробиальный родопсин KR2 характеризуется наличием нескольких структур активного центра в основном электронном состоянии. Обнаруженная структурная гетерогенность белка KR2 позволяет объяснить наличие реакционноспособных и нереакционноспособных состояний этого белка.

Достоверность и обоснованность полученных в диссертационной работе результатов не вызывают сомнений и обусловлены тем, что при расчете фотофизических свойств хромофоров были использованы современные высокоточные неэмпирические методы квантовой химии, которые способны на высоком уровне теории описывать возбужденные состояния сопряженных систем. Влияние белкового окружения на фотофизические свойства хромофорной группы было грамотно учтено при помощи метода потенциалов эффективных фрагментов. Хорошее совпадение полученных результатов с экспериментальными данными также подтверждает их достоверность.

Полученные в диссертационной работе результаты имеют высокую **теоретическую и практическую значимость**. Проведенное исследование охватывает изучение фотохимических и фотофизических свойств хромофорной группы в широком диапазоне варьирования структурных характеристик и параметров окружающей среды, что, безусловно, вносит значимый вклад в фундаментальное понимание механизма реакции фотоизомеризации. Также полученные результаты будут полезны при дизайне хромофоров и родопсинов с определенными требуемыми

фотофизическими свойствами. Полученные результаты представляют интерес для специалистов, занимающихся исследованиями в области фотобиологии, фотофизики и фотохимии.

Полученные в диссертационной работе результаты в полном объеме представлены в 9 публикациях: из них 4 статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.4 – «Физическая химия», и 5 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Автореферат адекватно отражает основное содержание диссертации. Сформулированные в работе выводы соответствуют положениям, выносимым на защиту, являются достоверными и не вызывают сомнений.

По диссертационной работе имеются следующие замечания и вопросы:

1) В литературном обзоре некоторые термины используются не совсем корректно для описания фотохимии родопсинов разных типов: в отличие от микробиальных родопсинов, для которых корректно использовать термин «фотоцикл», для животных родопсинов, а именно для позвоночных животных, корректно говорить о фотолизе. Кроме того, при описании процессов, запускаемых поглощением кванта света родопсином животных в результате фототрансдукции, правильно говорить о формировании фоторецепторного потенциала (гиперполяризация фоторецепторной мембраны), а не нервного импульса.

2) На данный момент для недавно открытого микробиального родопсина KR2 имеются две альтернативные кристаллические структуры мономерной и пентамерной форм белка. В работе были использованы обе структуры. Какая из двух данных структур является наиболее релевантной?

3) Выводы не содержат численных значений обсуждаемых процессов. Выводы были бы более понятными, если бы содержали данные, например, основных характеристических времен фотохимических реакций в первом выводе, или частотные характеристики колебательных мод, которые

способствуют реакции фотоизомеризации по определенной двойной связи, в третьем выводе.

Высказанные вопросы и замечания не снижают общей положительной оценки диссертационного исследования Кусочка П.А. Необходимо особо отметить высокий уровень публикаций соискателя по теме диссертационной работы. Полученные результаты надежны и достоверны, а заключения и выводы на их основе хорошо обоснованы. Следует заключить, что диссертационная работа Кусочка П.А. представляет собой законченное исследование, которое вносит ценный вклад в понимание молекулярных механизмов фотохимии ретиналь-содержащих белков.

Диссертационная работа Кусочка П.А. по своей актуальности, оригинальности и новизне, теоретической и практической значимости отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.4 – «Физическая химия» (по физико-математическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Работа оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Кусочек Павел Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.4.4 – «Физическая химия».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры молекулярной физиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Фельдман Татьяна Борисовна

Handwritten signature

«26» сентября 2022 г.

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-33-02, e-mail: *Handwritten email address*

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.02 - Биофизика

Адрес места работы:

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, стр.12, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, кафедра молекулярной физиологии

тел.: +7 (495) 939-33-02, e-mail: *Handwritten email address*

Подпись сотрудника МГУ имени М.В. Ломоносова
Фельдман Т.Б. удостоверяю:

Ученый секретарь биологического факультета

Е.В. Петрова



26 сентября 2022 г.