

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»

Актуальность выбранной темы диссертационного исследования

Ряд важнейших процессов, протекающих в биологических системах, происходят на временах порядка сотен и даже десятков фемтосекунд. Долгое время динамика таких процессов не могла быть детально изучена из-за отсутствия экспериментальных методов, обладающих необходимым временным разрешением. Но в последние годы благодаря созданию лазеров, способных генерировать фемтосекундные световые импульсы, интенсивное развитие получили методы исследования с использованием разных видов спектроскопии, которые способны детектировать явления, происходящие на фемтосекундном временном диапазоне. Одной из наиболее изученных реакций является протекающая в светочувствительных белках родопсинах фотоизомеризация их хромофорной группы, протонированного основания Шиффа ретиналя. Фотоиндуцированная динамика возбужденного состояния ретиналя является одним из важных предметов современных исследований родопсинов с использованием время-разрешенной фемтосекундной спектроскопии. Для интерпретации экспериментальных данных, в частности, для установления структуры интермедиатов, а также для моделирования их электронно-колебательных спектров широко используются методы квантовой химии, являющиеся неотъемлемой частью при современном глубоком изучении фотохимических процессов. Диссертация Кусочека П.А. как раз и посвящена моделированию фотодинамики первичных фотохимических реакций ретиналь-содержащих белков с использованием высокоточных неэмпирических методов квантовой химии.

Родопсины принято разделять на две группы: микробные родопсины (тип I) и родопсины животных (тип II). В каждой из групп реакция фотоизомеризации протекает за сотни фемтосекунд с высоким квантовым выходом. Но, несмотря на принадлежность к общему белковому семейству и высокую эффективность фотоизомеризации, родопсины I и II типов имеют несколько важных отличий, одним из которых является изомерная форма хромофора: в родопсинах I типа находится полностью *транс*-изомер, а в родопсинах II типа – *11-цис* изомер. С этим фактом долгое время связывали второе отличие, заключающееся в том, что скорость фотоизомеризации в микробных родопсинах в несколько раз ниже таковой в родопсинах животных. Но недавно данная гипотеза об однозначной связи скорости фотоизомеризации с изомерной формой хромофора была поставлена под сомнение в связи с открытием микробного родопсина KR2, скорость фотоизомеризации которого не уступает зрительным родопсинам животных. В свете этих новых открытий в своей работе соискатель сосредоточил свое внимание на вопросе о влиянии белкового окружения родопсинов I и II типов на эффективность их первичной фотохимической реакции. Для ответа на этот вопрос в работе рассматривались родопсины из разных групп, а также родопсины с разным структурным типом активного центра. Также на примере родопсина KR2 была изучена природа его нереакционноспособных состояний, часто наблюдающихся и в других родопсинах. В диссертационной работе исследования фотофизических свойств хромофора в белковом окружении дополняются изучением свойств и механизма фотоизомеризации различных изомеров хромофорной группы и ее модифицированных аналогов в газовой фазе. Исходя из вышесказанного, безусловно, поднимаемые и исследуемые в диссертации вопросы являются **актуальными** и релевантными текущим мировым научным исследованиям в данной области.

В работе был получен ряд **новых и оригинальных** результатов:

1. Установлено, что изолированные полностью *транс* и *цис* изомеры протонированного основания Шиффа ретиналя в газовой фазе обладают существенно разными фотохимическими свойствами. Так, 11-*цис* изомер хромофора характеризуется временем жизни возбужденного состояния, которое близко к времени фотоизомеризации в белках зрительной рецепции. При этом в микробальных родопсинах для обеспечения нужной селективности и скорости первичной фотохимической реакции происходит существенное изменение фотохимических свойств полностью *транс* хромофора, который в газовой фазе изомеризуется на порядок медленнее и по другой связи.

2. Предложены оригинальные модификации структуры хромофорной группы, которые позволяют увеличить скорость реакции фотоизомеризации. Установлено, что введение модификации, затрагивающей полиеновую цепь ретиналя, способно приводить к существенному уменьшению времени жизни возбужденного состояния за счет значительного снижения барьера внутримолекулярного вращения в первом возбужденном состоянии из-за стерического влияния на конформацию молекулы.

3. Установлено, что белковое окружение оказывает значительное влияние на фотофизические свойства хромофоров. В родопсинах наблюдается скручивание ретиналя по определенной двойной связи, что вызывает возбуждение валентных и деформационных колебательных мод, способствующих реакции фотоизомеризации. Самая высокая интенсивность электронно-колебательных переходов, соответствующих этим модам, наблюдается именно у тех родопсинов I и II типов, которые обладают наибольшей скоростью фотоизомеризации и характеризуются похожими структурами активного центра: в них присутствует сильная водородная связь между основанием Шиффа ретиналя и противоионом.

4. Обнаружено, что в основном электронном состоянии активный центр родопсина KR2 обладает повышенной конформационной подвижностью. Структурная гетерогенность позволяет объяснить возникновение

нереакционноспособных состояний данного белка, характеризующихся значительно большим временем жизни возбужденного состояния.

Объем диссертационной работы

Диссертационная работа включает в себя следующие части: введение, обзор литературы, расчетную часть, обсуждение результатов, выводы, список используемых сокращений, список литературы и приложение. Диссертация написана на 150 страницах машинописного текста и содержит 10 таблиц, 50 рисунков и 2 приложения. Список литературы содержит 194 наименования.

Во введении приведено обоснование актуальности темы диссертационной работы, описана научная новизна, оригинальность, практическая и теоретическая значимости полученных результатов. Также в данном разделе приведены объект и предмет исследования, цель и задачи, поставленные в диссертации.

Глава 1 посвящена литературному обзору и содержит несколько частей. В первой части литературного обзора подробно рассмотрены фотоциклы изучаемых в диссертационной работе родопсинов. Описаны экспериментальные и теоретические работы, в которых были установлены характеристические времена разных стадий фотоцикла и изменения в структуре хромофора, происходящие при переходе от одного интермедиата фотоцикла к другому. Также подробно рассмотрены кристаллические структуры активных центров родопсинов, которые были использованы для создания полных атомистических моделей белков и последующих расчетов в диссертационном исследовании.

Вторая часть литературного обзора посвящена детальному рассмотрению того, как фотофизические и фотохимические свойства основания Шиффа ретиналя зависят от среды, в которую помещен хромофор, и от структурных параметров хромофорной группы. В начале данной части приведено теоретическое рассмотрение пути реакции фотоизомеризации вдоль координаты реакции на поверхности возбужденного состояния, а также рассмотрена электронная структура ретиналя в основном и

возбужденных состояниях. Дано описание того, как стерические и электростатические факторы могут влиять на спектральные свойства хромофорной группы, в частности, описаны причины такого явления, как опсиновый сдвиг.

Особое внимание уделено работам, изучающим динамику реакции фотоизомеризации в разных окружениях. Подробно описаны инновационные эксперименты по фемтосекундной спектроскопии действия в газовой фазе, позволяющие установить характеристики реакции фотоизомеризации в газовой фазе, рассмотрены характеристики данной реакции в растворах. Проанализированы работы, в которых изучено, какие колебательные моды, способствующие реакции фотоизомеризации, возбуждаются во время фотодинамики в белках.

Еще один раздел данной части литературного обзора содержит гипотезы, выдвигающиеся в литературе о природе нереакционноспособных состояний разных родопсинов. Отдельное внимание уделено нереакционноспособному состоянию родопсина KR2, которое изучается в данной диссертационной работе.

Третья часть литературного обзора посвящена подробному описанию методов теоретической и квантовой химии, которые применялись для расчетов в диссертационной работе. Разобраны основы многоконфигурационной теории возмущений, при помощи которой были рассчитаны фотофизические свойства хромофоров, а также основы метода потенциалов эффективных фрагментов, позволяющего учитывать влияние среды на свойства хромофорной группы.

Во **второй главе** диссертационной работы подробно описаны параметры проведенных расчетов. Начинает главу описание того, как при помощи высокоточных неэмпирических методов квантовой химии были рассчитаны характеристики реакции фотоизомеризации хромофорных групп и их модифицированных форм в газовой фазе.

Далее рассматриваются детали проведения расчетов в белковом окружении. Приведена процедура создания полных атомистических моделей белков, разобраны параметры молекулярно-динамического моделирования и молекулярной метадинамики, которая была использована для оценки конформационной подвижности белковых структур. Описана оптимизация геометрии молекулы комбинированным методом КМ/ММ.

В конце главы рассматривается проведение расчетов с использованием высокоточных неэмпирических методов квантовой химии для исследования фотоиндуцированной динамики хромофорных групп в родопсинах.

Глава 3 содержит обсуждение полученных результатов.

В первом разделе данной главы приведено обсуждение фотохимических свойств изомеров протонированного основания Шиффа ретиналя. Построены профили поверхности потенциальной энергии первого возбужденного состояния вдоль координаты вращения по определенным двойным связям, оценены значения барьеров вращения вокруг данных связей и вычислены времена жизни возбужденных состояний. Сделан вывод о влиянии изомерной формы хромофора на эффективность и селективность изомеризации. Также в данной части проведен расчет энергий S_1 - S_n вертикальных переходов, и на основании сил осцилляторов сделан вывод о наиболее вероятных переходах.

Во втором разделе изучаются фотофизические свойства модифицированных форм хромофорной группы, для которых были выполнены расчеты, аналогичные представленным в первой части данной главы. Были сделаны выводы о том, за счет каких факторов разные модификации способны увеличивать эффективность фотоизомеризации.

Получив в первых двух разделах данные, позволяющие создать референсную систему сравнения, соискатель обратился к рассмотрению фотофизических свойств хромофоров в белковом окружении. При помощи комбинированного метода КМ/ММ были проведены оптимизация геометрии структур родопсинов и колебательный анализ. С помощью высокоточных

неэмпирических методов квантовой химии были рассчитаны электронно-колебательные спектры хромофоров. На основании анализа данных спектров был сделан вывод о том, как белковое окружение родопсинов I и II типов способствует реакции фотоизомеризации посредством возбуждения определенных колебательных мод на ранних временах фотоиндуцированной динамики.

Также соискателем был рассмотрен важный вопрос о природе нереакционноспособных состояний родопсина KR2. При помощи методов молекулярного моделирования была обнаружена гетерогенность основного состояния данного родопсина. Установлена связь между существованием нескольких конформеров активного центра и возникновением нереакционноспособных состояний.

Достоверность и обоснованность результатов

Результаты диссертационного исследования, безусловно, являются **достоверными и обоснованными**, так как для моделирования фотоиндуцированной динамики родопсинов были использованы современные высокоточные неэмпирические методы квантовой химии, сопряженные в ряде случаев с методом потенциалов эффективных фрагментов для достоверного учета влияния белкового окружения.

Выводы о конформационной подвижности родопсина KR2 подтверждаются результатами двух независимых друг от друга методов молекулярной динамики и метадинамики.

Достоверность результатов также дополнительно подтверждалась при помощи сравнения с экспериментальными данными. Рассчитанные времена жизни возбужденных состояний изомеров и модифицированных форм хромофоров в газовой фазе отлично согласуются с экспериментальными данным по фемтосекундной спектроскопии действия с временным разрешением. Форма и ширина рассчитанных электронно-колебательных спектров хромофоров хорошо совпадает с экспериментальными спектрами.

Теоретическая и практическая значимость результатов

Диссертационное исследование и полученные в ходе него результаты представляют высокую **теоретическую** и **практическую** значимость и ценность. Проведенная работа вносит значимый вклад в понимание механизма фотоиндуцированной реакции изомеризации хромофорных групп родопсинов как в изолированном состоянии, так и в белковом окружении. Выводы, сделанные в результате проведенного исследования, являются полезными для практических исследований по созданию хромофорных групп с модифицированными фотофизическими и фотохимическими свойствами.

Публикации

Основное содержание диссертационного исследования и полученные результаты в полной мере изложены 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.

Представленные в диссертационной работе научные положения, результаты и выводы правильно переданы и в полной мере изложены в автореферате и опубликованных статьях.

По проведенному диссертационному исследованию есть ряд **замечаний**:

1. Анализ данных по фотоизомеризации производных ретиналей в газовой фазе основывается на теории активированного комплекса, в которой, помимо высоты энергетического барьера, должен проводиться также расчет колебательных статистических сумм равновесного и переходного состояний, что характеризует изменение энтропии системы при образовании активированного комплекса. Однако, такой расчет не был произведен, и поэтому оценки скоростей фотоизомеризации производных ретиналей могут быть некорректными.

2. Одним из важных выводов работы является заключение о том, что белковое окружение способствует изменению конформации хромофора и

возбуждению определенных колебательных мод при S_0 - S_1 переходе. В этой связи хотелось бы увидеть расчеты, каким образом белковое окружение изменяет поверхности потенциальной энергии вдоль координаты вращения ретиналя, поскольку форма таких поверхностей детально анализируется для изомеризации ретиналя в вакууме. Однако, такой анализ для моделей ретиналь-содержащих белков не был проведен.

3. В литературе, посвященной электронным состояниям ретиналя в бактериородопсине, активно обсуждается роль в механизме фотоизомеризации электронного состояния S_2 , энергия которого близка к состоянию S_1 (см., например, Yang et al., 2022, Quantum-classical simulations of rhodopsin reveal excited-state population splitting and its effects on quantum efficiency. *Nature Chemistry*, 14, 441-449). В диссертационной работе утверждается, что состояние S_2 находится значительно выше по энергии и с состоянием S_1 в ходе изомеризации не пересекается. В связи с этим хотелось бы увидеть оценку точности расчетов, проведенных диссертантом методом XMCQDPT2, по сравнению с другими методами, например, TD-DFT.

Высказанные замечания не умаляют значимости и высокого уровня диссертационного исследования.

Соответствие автореферата и диссертации требованиям, установленным МГУ имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода

Диссертационная работа по своей новизне, оригинальности и актуальности, достоверности и обоснованности результатов, 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.

Таким образом, соискатель, Кусочек Павел Александрович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.4.4 – «Физическая химия».

Официальный оппонент:

доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нанофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской Академии Наук

Черепанов Дмитрий Александрович


«23» сентября 2022 г.

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-73-47, e-mail: fs@chph.ras.ru

**Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:**

03.01.02 - Биофизика

Адрес места работы:

119991, г.Москва, ул. Косыгина, 4

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской Академии Наук, лаборатория нанофотоники

тел.: +7 (495) 939-73-47, e-mail: fs@chph.ras.ru

Подпись сотрудника ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семёнова РАН

Черепанова Д.А. удостоверяю



*ученого секретаря
в. н. с. Д. А. Черепанова*

«23» сентября 2022 г.