

УТВЕРЖДАЮ:

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук
д.х.н., профессор Курочкин И.Н.

«02»

декабря

2021 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Диссертация «Фотохромные реакции ретинальсодержащих белков – зрительного родопсина и бактериородопсина – в фемто- и пикосекундном диапазоне времен» выполнена в лаборатории физико-химических основ рецепции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН).

В период подготовки диссертации и до настоящего времени соискатель Смитиенко Ольга Александровна работает в лаборатории физико-химических основ рецепции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук в должности научного сотрудника.

В 2002 году Смитиенко О.А. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет по специальности «биофизика». С 1 ноября 2003 года по 1 ноября 2006 года обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по специальности 03.01.02 – биофизика (1.5.2. Биофизика).

Удостоверение № 149 о сдаче кандидатских экзаменов выдано 19.05.2021г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор, академик Российской академии наук Островский Михаил Аркадьевич, главный научный сотрудник и

(по совместительству) заведующий лабораторией физико-химических основ рецепции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук. Тема диссертационной работы и научный руководитель утверждены на заседании Ученого совета ИБХФ РАН 3 июня 2021 года, протокол № 60.

Рецензент: доктор химических наук, профессор Кузьмин Владимир Александрович, заведующий лабораторией процессов фотосенсибилизации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

В ходе обсуждения были заданы следующие вопросы:

1. д.б.н., в.н.с. Муранов К.О.: «На дифференциальных спектрах, иллюстрирующих обратную фотореакцию зрительного родопсина, присутствуют небольшие изменения. Как они соотносятся с погрешностью измерения?»
2. к.ф.-м.н., ст.н.с. Сажина Н.Н.: «Ведутся ли где-то подобные исследования?»
3. д.б.н., зав. лаб. Каламкаров Г.Р.: «Каким образом продемонстрировано, что определенная конформация хромофора совместно с белковым окружением позволяет зрительному родопсину эффективно функционировать?»
4. д.х.н., зам. директора Трофимов А.В.: «Какой характер молекулярных движений, происходящих в процессе фотореакции в ограниченном объеме хромофорного центра?»

Актуальность работы

Родопсины или светочувствительные трансмембранные белки, содержащие хромофорную группу ретиналь, широко представлены во всех доменах живых организмов. Родопсины 1 типа характерны для бактерий, архей и низших эукариот и выполняют в основном фотоэнергетическую функцию. Родопсины 2 типа характерны для высших животных, входят в состав класса G-белок-связывающих рецепторов и выполняют в основном фотоинформационную (зрительную) функцию. В работе были исследованы бактериородопсин археи *Halobacterium salinarum*, функционирующий как протонный насос, и зрительный родопсин быка *Bos taurus*, функционирующий как G-белок-связывающий рецептор.

Оба названных родопсина являются наиболее типичными представителями родопсинов 1 и 2 типа, соответственно. В основе функционирования родопсинов лежит их первичная фотохимическая реакция – сверхбыстрая когерентная изомеризация хромофорной группы, протекающая в фемто- и раннем пикосекундном временном диапазоне. Несмотря на большой прогресс в изучении фотореакции родопсинов, достигнутый как в экспериментальных, так и в теоретических исследованиях, роль и взаимодействие сверхбыстрых молекулярных процессов, происходящих вместе с изомеризацией хромофора, а также влияние белкового окружения на динамику фотохимической реакции, являются предметом дискуссий. Поэтому

дальнейшее и более глубокое изучение механизма такого быстрого, эффективного и когерентного процесса преобразования энергии, осуществляемого в родопсинах, является важной и актуальной задачей современной биофизики.

Существенный эволюционный и физиологический интерес представляет сравнение особенностей первичных фотохимических реакций родопсинов 1 и 2 типа.

Поскольку родопсины обладают фотохромными свойствами, исследование обратных фотореакций из первичных промежуточных состояний в исходное состояние может дать новые знания о сверхбыстрой фотоизомеризации хромофора ретиналя в разном для него белковом окружении. В настоящий момент фотохромизм родопсинов, в том числе зрительного родопсина и бактериородопсина, в фемто- и раннем пикосекундном диапазоне времен подробно не исследован.

Таким образом, исследование фотохромной реакции бактериородопсина и зрительного родопсина в фемто- и пикосекундном диапазоне времен, а также сравнение динамики фотохромной реакции этих двух белков как представителей родопсинов 1 и 2 типа, является важной и актуальной задачей биофизики светочувствительных белков.

Научная новизна работы

1. Изучена прямая и обратная фотореакции зрительного родопсина и бактериородопсина в фемто- и пикосекундном диапазоне времен.
2. Предложены кинетические схемы прямой фотореакции исследованных белков и определено время наблюдаемых процессов. Время протекания прямой фотореакции зрительного родопсина и бактериородопсина составляет ~60 и 480 фс, соответственно.
3. Впервые исследована динамика обратной фотореакции зрительного родопсина, индуцированной на времени 200 фс из первого продукта прямой фотореакции, время протекания которой сравнимо с прямой реакцией.
4. Впервые показана возможность инициирования обратной фотореакции бактериородопсина на временах 1–5 пс из первичных продуктов прямой фотореакции.
5. Рассчитан квантовый выход обратной фотореакции зрительного родопсина и бактериородопсина, который составляет 0,15 и 0,81, соответственно.
6. Проведен сравнительный анализ фотохромной реакции бактериородопсина и зрительного родопсина как представителей родопсинов 1 и 2 типа, соответственно. Показано, что, в отличие от бактериородопсина, в зрительном родопсине квантовый выход обратной реакции значительно ниже, чем прямой реакции, что повышает надёжность работы зрительного родопсина как фоторецептора.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования фотохромной реакции бактериородопсина и зрительного родопсина представляют, как теоретический, так и практический интерес с точки зрения определения механизма такого быстрого и эффективного процесса преобразования энергии

света в химическую энергию конформационных перестроек белка, осуществляемого в наиболее типичных представителях родопсинов 1 и 2 типа для выполнения фотоэнергетической и фотоинформационной (зрительной) функций, соответственно. Понимание механизма фотохромной когерентной реакции ретинальсодержащих белков важно для такого активно развивающегося направления, как оптогенетика, в рамках которого в настоящее время используются родопсины, как 1, так и 2 типа. Фотохромизм ретинальсодержащих белков, продемонстрированный в настоящей работе на самых ранних стадиях их функционирования, может быть применен в оптоэлектронике в различных технических приложениях, требующих создание оптических устройств с обработкой данных высокого быстродействия.

Результаты работы вошли в учебно-методическое пособие «Фотобиология и фотохимия первичных процессов зрения» для студентов биофизиков Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Личное участие соискателя в получении результатов

Все изложенные в диссертации результаты получены соискателем самостоятельно или при его непосредственном участии. Соискателем проведен поиск и анализ литературных данных, выполнены биохимические и стационарные биофизические эксперименты, проведена обработка и анализ время-разрешенных данных, сформулированы положения, выносимые на защиту. Время-разрешенные биофизические эксперименты проводились совместно с сотрудниками ЦКП ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН Гостевым Ф.Е. и Шелаевым И.В. Постановка задач, интерпретация полученных результатов и формулировка выводов исследования осуществлялись совместно с научным руководителем и другими соавторами публикаций. Материалы диссертации в полном объеме представлены соискателем в ряде статей в рецензируемых журналах, а также доложены на ряде российских и международных конференций.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивалась использованием общепринятых физико-химических методов исследования. При проведении данной работы были использованы современные методы выделения, очистки и исследования светочувствительных белков, их структуры и функциональной активности: выделение зрительного родопсина из глаз быка методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, стационарная спектрофотометрия, методы «возбуждение-зондирование» и «возбуждение-возбуждение-зондирование» фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии. Достоверность результатов обеспечивалась инструментальной и статистической оценкой погрешности измерений, а также согласованием полученных результатов с литературными данными.

Ценность научных работ соискателя, соответствие содержания диссертации специальности, полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Кандидатская диссертация «Фотохромные реакции ретинальсодержащих белков – зрительного родопсина и бактериородопсина – в фемто- и пикосекундном диапазоне времен» соответствует требованиям, установленным пп. 9-11 и п. 14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней" (Утверждено Постановлением Правительства России от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства России от 21.04.2016 г. № 335 в редакции Постановления Правительства России от 20.03.2021 г. № 426).

Работа соответствует специальности 1.5.2. Биофизика, биологические науки. Материалы и основные результаты диссертации достаточно полно изложены в опубликованных работах Смитиенко О.А., из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, одна глава в книге, индексируемой в базе Scopus, и тезисы 6 докладов на российских и международных конференциях.

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

- 1) **Smitienko, O. A.** Comparative femtosecond spectroscopy of primary photoreactions of *Exiguobacterium sibiricum* rhodopsin and *Halobacterium salinarum* bacteriorhodopsin / O. A. Smitienko, T. B. Feldman, L. E. Petrovskaya, O. V. Nekrasova, M. A. Yakovleva, I. V. Shelaev, F. E. Gostev, D. A. Cherepanov, I. B. Kolchugina, D. A. Dolgikh, V. A. Nadtochenko, M. P. Kirpichnikov, M. A. Ostrovsky // **J. Phys. Chem. B.** – 2021. – V. 125. – P. 995–1008.
- 2) Медведева, А. С. Сравнительное исследование фотохимии микробиальных родопсинов (I типа) и родопсинов животных (II типа) / А. С. Медведева, **О. А. Смитиенко**, Т. Б. Фельдман, М. А. Островский // **Ж. эвол. биохим. и физиол.** – 2020. – Т. 56. – № 7. – С. 519–523.
- 3) **Смитиенко, О. А.** Фемто и пикосекундная динамика первичных реакций рекомбинантного бактериородопсина в сравнении с природным белком в тримерном и мономерном состояниях / О. А. Смитиенко, О. В. Некрасова, А. В. Кудрявцев, М. А. Яковлева, И. В. Шелаев, Ф. Е. Гостев, Д. А. Долгих, И. Б. Кольчугина, В. А. Надточенко, М. П. Кирпичников, Т. Б. Фельдман, М. А. Островский // **Биохимия.** – 2017. – Т. 82. – № 4. – С. 664–676.
- 4) Feldman, T. B. Femtosecond spectroscopic study of photochromic reactions of bacteriorhodopsin and visual rhodopsin / T. B. Feldman, **O. A. Smitienko**, I. V. Shelaev, F. E. Gostev, O. V. Nekrasova, D. A. Dolgikh, V. A. Nadtochenko, M. P. Kirpichnikov, M. A. Ostrovsky // **J. Photochem. Photobiol. B.** – 2016. – V. 164. – P. 296–305.
- 5) **Smitienko, O.** Femtosecond laser spectroscopy of the rhodopsin photochromic reaction: a concept for ultrafast optical molecular switch creation (ultrafast reversible photoreaction of

rhodopsin) / O. Smitienko, V. Nadtochenko, T. Feldman, M. Balatskaya, I. Shelaev, F. Gostev, O. Sarkisov, M. Ostrovsky // **Molecules**. – 2014. – V. 19. – P. 18351–18366.

Глава в книге:

- 1) **Smitienko, O.** Coherent control of ultrafast reversible photoreaction of rhodopsin / O. Smitienko, V. Nadtochenko, T. Feldman, M. Balatskaya, I. Shelaev, F. Gostev, O. Sarkisov, M. Ostrovsky // **In Book of Proceedings of the MSSMBS-2014 and DSCMBS-2014 International Workshops**; Molecular Simulation Studies in Material and Biological Research. // Nova Science Publishers, Inc. (N.Y.). – 2015. – P. 29–36.

Публикации в трудах конференций и съездов:

- 1) **Смитиенко, О. А.** Первичные реакции родопсина *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) / О. А. Смитиенко, Т. Б. Фельдман, Л. Е. Петровская, О. В. Некрасова, М. А. Яковлева, И. В. Шелаев, Ф. Е. Гостев, Д. А. Черепанов, Д. А. Долгих, И. Б. Кольчугина, В. А. Надточенко, М. П. Кирпичников, М. А. Островский // Сборник трудов VI Съезда Биофизиков России, Сочи. – 2019. – С. 138.
- 2) Надточенко, В. А. Фемтосекундная спектроскопия сверхбыстрых первичных реакций в биологических системах: фотосистема 1 и ретиналь содержащие белки / В. А. Надточенко, Д. А. Черепанов, И. В. Шелаев, Ф. Е. Гостев, А. А. Айбуш, А. Ю. Семенов, М. Д. Мамедов, **О. А. Смитиенко**, Т. Б. Фельдман, М. А. Островский, В. А. Шувалов // Сборник трудов VI Съезда биофизиков России, Сочи. – 2019. – С. 22.
- 3) **Смитиенко, О.А.** Фотохромные сверхбыстрые реакции бактериального и зрительного родопсинов / О. А. Смитиенко, И. В. Шелаев, Ф. Е. Гостев, Т. Б. Фельдман, О. В. Некрасова, Д. А. Долгих, В. А. Надточенко, М. П. Кирпичников, М. А. Островский // Сборник трудов 19-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века". Пущино. – 2015. – С. 113–114.
- 4) Feldman, T. B. Visual pigment rhodopsin as a concept for ultrafast optical molecular switch creation / T. B. Feldman, **O. A. Smitienko**, V. A. Nadtochenko, M. N. Mozgovaya, I. V. Shelaev, F. E. Gostev, O. M. Sarkisov, M. A. Ostrovsky // Proceedings of the 1st International Symposium DSCMBS-2014 ("Dushanbe Symposium on Computational Materials and Biological Sciences"), Republic of Tajikistan, Dushanbe. – 2014. – P. 38–39.
- 5) **Смитиенко, О. А.** Фотохромизм зрительного пигмента родопсина в фемтосекундной шкале времени / О. А. Смитиенко, М. Н. Мозговая, И. В. Шелаев, Ф. Е. Гостев, Т. Б. Фельдман, В. А. Надточенко, М. А. Островский // Сборник трудов XIII Ежегодной международной молодежной конференции «Биохимическая физика» ИБХФ РАН-ВУЗы. – 2013. – С. 196–201.
- 6) Островский, М. А. Фемтосекундная динамика фотоизомеризации родопсина / М. А. Островский, В. А. Надточенко, **О. А. Смитиенко**, И. В. Шелаев, Ф. Е. Гостев, Т. Б. Фельдман, К. В. Шайтан, М. П. Кирпичников // Сборник трудов VII Московского

международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Международный симпозиум «Научно-техническое сотрудничество: РФФИ-EMBL в области молекулярной биологии». – 2013. – Ч. 2. – С. 374–375.

Оценка выполненной работы

Диссертация Смитиенко О.А. «Фотохромные реакции ретинальсодержащих белков – зрительного родопсина и бактериородопсина – в фемто- и пикосекундном диапазоне времен» является законченной научно-квалификационной работой, посвященной изучению механизмов прямой и обратной фотореакций ретинальсодержащих белков, зрительного родопсина и бактериородопсина, протекающих в фемто- и раннем пикосекундном диапазоне времен. В работе на основании полученных автором результатов исследований разработаны положения, имеющие актуальное научное и практическое значение для биофизики светочувствительных белков. Диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Заключение принято на заседании расширенного семинара по биофизике ИБХФ РАН 30 июня 2021 г. Присутствовало на заседании 20 человек, из них 10 докторов наук по специальности 1.5.2. Биофизика. Результаты голосования: «за» – 20 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 1 от 30 июня 2021 г.

Председатель семинара:

доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник лаборатории
физико-химических основ регуляции
биологических систем



Пальмина Надежда Павловна

Секретарь семинара:

ведущий научный сотрудник,
доктор биологических наук



Дудник Людмила Борисовна