

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Смитиенко Ольги Александровны «Фотохромные реакции ретинальсодержащих белков – зрительного родопсина и бактериородопсина – в фемто- и пикосекундном диапазоне времен», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

Актуальность темы. Исследования принципов работы белковых молекул являются чрезвычайно важной задачей современной науки, имеющей глубочайшее фундаментальное значение и вместе с тем открывающей широкие прикладные перспективы во многих отраслях человеческой деятельности. Многие направления этой научной области достаточно хорошо развиты, а многие вопросы, связанные с работой белков, уже достаточно хорошо изучены. В этом смысле диссертационная работа Смитиенко Ольги Александровны представляет особый интерес в нескольких аспектах.

Во-первых, это выбор **объектов исследования** – бактериородопсин и зрительный родопсин. Оба эти белка являются репрезентативными примерами белковых суперсемейств, каждое из которых имеет огромную важность для современной науки. Бактериородопсин представляет суперсемейство микробных родопсинов, особый интерес в последние годы к которым обусловлен активным развитием оптогенетики как средства для управления клетками и перспективного метода терапии широкого спектра недугов от восстановления слуха до лечения нейродегенеративных заболеваний. Зрительный родопсин относится к суперсемейству рецепторов, сопряжённых с G-белком. Это суперсемейство является основным классом рецепторов человека (и эукариот в целом) и одновременно наиболее востребованным классом лекарственных мишеней, отвечающим за терапевтическое действие 40% всех современных лекарств. Исследования и результаты, получаемые для бактериородопсина и зрительного родопсина, зачастую имеют большой шанс быть транслированными на других представителей этих важнейших суперсемейств.

Во-вторых, интерес к работе Смитиенко О.А. вызван исследованием именно динамических свойств белковых молекул. В то время как современному исследователю доступен широкий спектр возможностей исследования структуры белковых молекул, изучение их динамических параметров развито в меньшей степени. Последнее особенно верно, когда дело касается неинвазивных методов, не требующих внесения дополнительных меток в молекулы, как в случае исследований, проведенных в работе диссертанта.

В итоге можно сказать, что работа Смитиенко О.А. посвящена, несомненно, важным объектам, а проводимые ею исследования бесспорно обладают значительной **научной новизной**. Полученные в результате работы сведения о механизмах прямой фотореакции и фотохромизме изучаемых белков, а также их сравнительный анализ являются важными достижениями в области и представляют значительный интерес за ее пределами.

Структура диссертации и автореферата. Диссертационная работа Смитиенко О.А. написана по традиционному плану и включает введение, обзор литературы (Глава 1), описание используемых материалов и методов (Глава 2), изложение результатов (Глава 3) и их обсуждение (Глава 4), заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список терминов и список литературы, который включает 268 источников, в том числе 254 зарубежных. Материал изложен на 142 страницах, включает 46 рисунков и 5 таблиц. Автореферат соответствует основным положениям и выводам диссертации, написан понятным языком и хорошо иллюстрирован.

Автором диссертации была проделана большая работа по получению и анализу экспериментальных данных. Подробно исследованы прямые фотореакции бактериородопсина и зрительного родопсина и проведено их сравнение как белков, много лет служащих в качестве модельных при исследовании родопсинов 1 и 2 типа, соответственно. Определены времена образования возбужденного состояния и первичных продуктов, время фотоизомеризации составило ~60 и 480 фс для зрительного родопсина и бактериородопсина, соответственно. Также определены времена, характеризующие процессы колебательной релаксации (70–130 фс), которые наблюдаются при образовании некоторых состояний и отражают когерентный характер первичных реакций, наиболее выраженный у зрительного родопсина. Предложены кинетические схемы, которые совпадают для двух исследованных белков. При исследовании обратных фотореакций были продемонстрированы фотопереходы, индуцированные в фемто- и раннем пикосекундном временном диапазоне из первых продуктов прямой фотореакции, Фото и Бато в случае зрительного родопсина и **J** и **K** в случае бактериородопсина, в исходное состояние белка. В случае бактериородопсина эти фотопереходы были продемонстрированы впервые. Квантовый выход фотопереходов из продуктов Фото, Бато и **K** составил 0,14, 0,15 и 0,81, соответственно. В случае зрительного родопсина впервые была исследована динамика обратной фотореакции, индуцированной из продукта Фото. Было показано, что время этой фотореакции сравнимо со временем прямой фотореакции, что подтверждается квантово-

химическими расчетами, известными из литературных данных. Механизм прямой и обратных фотореакций обсуждается в работе в терминах движения волнового пакета вдоль поверхности потенциальной энергии возбужденного (S_1) электронного состояния и его перехода на поверхность основного (S_0) электронного состояния через область конического квазипересечения. Важным выводом работы является то, что низкий квантовый выход обратной фотореакции зрительного родопсина ($\sim 0,15$) по сравнению с бактериородопсином ($0,81$) может свидетельствовать о большей надежности механизма работы родопсинов 2 типа по сравнению с родопсинами 1 типа, что оправдано с точки зрения выполняемых ими функций.

В качестве **вопросов и замечаний** хотелось бы отметить следующие моменты:

- 1) Во введении и литературном обзоре рассматривается вопрос о связи родопсинов 1 и 2 типа, причем отмечено, что этот вопрос остается открытым. Однако незаслуженно обойдена вниманием недавняя работа [Shalaeva et al., 2015]¹, которая, по мнению оппонента, дает достаточно обоснованный ответ на данный вопрос.
- 2) Рассматривая в главе 4.3. наличие нескольких путей распада возбужденного состояния бактериородопсина, отмечено, что вероятной причиной данного факта является наличие гетерогенности белковой молекулы бактериородопсина в виде измененных конформаций и протонированного состояния аминокислотных остатков, окружающих ретиналь. Хотелось бы уточнить, какие именно аминокислотные остатки, по мнению автора, могут быть вовлечены и существуют ли независимые подтверждения такой гетерогенности в опубликованных данных?
- 3) В работе приведено детальное описание первичных фотопревращений бактериородопсина при переходе из основного в *I*-, *J*- и *K*-состояния. Было бы очень интересно проанализировать, каким образом соотносятся эти данные с результатами недавних исследований время-разрешенной кристаллографии бактериородопсина на рентгеновских лазерах на свободных электронах, где наблюдали структурные перестройки в белке при образовании данных переходных состояний [Nango et al., 2016; Kovacs et al., 2019]^{2,3}.

¹ Shalaeva, D. et al. Eukaryotic G protein-coupled receptors as descendants of prokaryotic sodium-translocating rhodopsins. *Biol. Direct* **10**, 25–28 (2015).

² Kovacs, N. et al. Three-dimensional view of ultrafast dynamics in photoexcited bacteriorhodopsin. *Nat. Commun.* **10**, 3177 (2019).

³ Nango, E. et al. A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. *Science* **354**, 1552–1557 (2016).

Указанные вопросы и замечания носят рекомендательный характер, не ставят под сомнение обоснованность научных положений и выводов и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Научные положения и выводы диссертационной работы Смитиенко О.А. базируются на обширном экспериментальном материале и не противоречат литературным данным в области биофизики ретинальсодержащих белков. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных физико-химических методов. **Достоверность** результатов, благодаря статистической оценке погрешности измерений при проведении экспериментов, а также использовании общепринятых методик обработки данных, не вызывает сомнений.

Материалы диссертации прошли апробацию на 6 российских и международных конференциях, опубликованы 5 статей в журналах, входящих в перечень ВАК (в том числе в высокорейтинговых иностранных журналах), и 1 глава в книге, индексируемой в базе Scopus. Автореферат и публикации полностью отражают основное содержание диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Смитиенко О.А. соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, она обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, и свидетельствует о важном вкладе результатов диссертации в науку.

Диссертационная работа Смитиенко О.А. «Фотохромные реакции ретинальсодержащих белков – зрительного родопсина и бактериородопсина – в фемто- и пикосекундном диапазоне времен» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для молекулярной биофизики и биологии. Рецензируемая диссертационная работа по актуальности поставленных задач, новизне полученных результатов, их теоретической и практической значимости удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. в редакции Постановления Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., с изменениями, утвержденными Постановлениями Правительства РФ, № 1168 от 01.10.2018 г. и № 426 от 20.03.2021 г.), и паспорту заявленной специальности 1.5.2. Биофизика, а ее автор Смитиенко Ольга Александровна заслуживает

присвоения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Официальный оппонент:

кандидат физико-
математических наук по
специальности 1.5.3.
Молекулярная биология



Борщевский Валентин Иванович

24.02.2022

подпись

дата

Место работы:

Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (МФТИ)

Должность: заместитель директора Центра исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний

Почтовый адрес: 141701, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9

E-mail: borshchevskiy.vi@phystech.edu

Тел. +7 (964) 632 8650

Подпись и сведения к.ф.-м.н. В.И. Борщевского заверяю:

ученый секретарь МФТИ,
кандидат физико-
математических наук



Е.Г. Евсеев