

*На правах рукописи*



**СМИТИЕНКО Ольга Александровна**

**ФОТОХРОМНЫЕ РЕАКЦИИ РЕТИНАЛЬСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ –  
ЗРИТЕЛЬНОГО РОДОПСИНА И БАКТЕРИОРОДОПСИНА – В ФЕМТО- И  
ПИКОСЕКУНДНОМ ДИАПАЗОНЕ ВРЕМЕН**

**1.5.2. Биофизика**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук**

**Москва - 2021**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, г. Москва.

**Научный руководитель:** **Островский Михаил Аркадьевич,**  
доктор биологических наук, профессор, академик РАН

**Официальные оппоненты:** **Красновский Александр Александрович,**  
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории физической биохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха

**Борщевский Валентин Иванович,**  
кандидат физико-математических наук, заместитель директора Центра исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (МФТИ)

**Ведущая организация:** Федеральное государственное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук», Центр Фотохимии

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г. в \_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного Совета 24.1.038.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский пр-т, д. 38 и на сайте [https://biochemphysics.ru/assets/upload/docs2021/Dissertaciya\\_%D0%9E.Smitienko.pdf](https://biochemphysics.ru/assets/upload/docs2021/Dissertaciya_%D0%9E.Smitienko.pdf)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года

Ученый секретарь Диссертационного Совета  
24.1.038.01, кандидат химических наук



Мазалецкая Л.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Родопсины или ретинальсодержащие белки (РСБ) – это светочувствительные трансмембранные белки, представленные во всех доменах живых организмов. Наличие хромофорной группы ретиналя определяет способность родопсинов поглощать свет в широком спектральном диапазоне (~ 400 – 600 нм) и использовать его энергию для выполнения различных функций. Выделяют две большие группы родопсинов – 1 типа (микробиальные родопсины), характерные для бактерий, архей и низших эукариот, и 2 типа (родопсины животных), характерные для высших животных. Родопсины 1 типа выполняют в основном фотоэнергетические (ионные насосы) и фотоинформационные (сенсорные родопсины и ионные каналы) функции. При этом фотоэнергетическую функцию можно рассматривать как простейший фотосинтез. Родопсины 2 типа представляют собой специализированные G-белок-связывающие рецепторы животных, которые обеспечивают в основном фотоинформационные функции, основная из которых – зрительная. Типичными и наиболее изученными представителями родопсинов 1 и 2 типа являются протонный насос археи *Halobacterium salinarum* бактериородопсин (БР) и зрительный родопсин быка *Bos taurus* (Р), соответственно, которые часто выступают как модельные системы для изучения РСБ и G-белок-связывающих рецепторов.

В основе функционирования РСБ лежит фотохимическая реакция изомеризации хромофорной группы (полностью-*транс* ретиналя в родопсинах 1 типа и 11-*цис* ретиналя в родопсинах 2 типа), 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 и в вакууме. Первичный акт фотоизомеризации хромофора протекает когерентно в фемтосекундном (фс) временном диапазоне, а процесс запасаения энергии кванта света завершается в раннем пикосекундном (пс) временном диапазоне.

Несмотря на большой прогресс в изучении фотореакции РСБ, 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 РСБ, является важной задачей.

Представляет также большой эволюционный и физиологический интерес сравнение родопсинов 1 и 2 типов. Несомненно, что родопсины 1 типа появились в биосфере Земли существенно раньше – около 3 млрд. лет назад, в то время как родопсины 2 типа – около 1 млрд. лет назад. Остается открытым вопрос о происхождении родопсинов 2 типа – являются ли они результатом конвергентной или дивергентной эволюции родопсинов 1

типа. В любом случае сравнение родопсинов 1 и 2 типов, особенно структуры их хромофорного центра и изомерной формы хромофорной группы – ретиналя, и в этой связи особенностей их первичных фотохимических реакций, является важной физико-химической и биологической задачей для понимания их физиологических функций.

Известно, что РСБ обладают фотохромными свойствами. При этом обратные фотопереходы инициируются из продуктов прямой фотореакции, образованных в микро- и миллисекундном диапазоне времен. Изучение фотохромных реакций с разных этапов фотопреобразования является одним из экспериментальных подходов к изучению механизма фотохимической реакции и последующих процессов темнов́ой релаксации РСБ. Исследование обратных фотореакций из первичных промежуточных состояний в исходное состояние может дать новые знания о сверхбыстрой фотоизомеризации хромофора ретиналя в разном белковом окружении. В настоящий момент фотохромизм РСБ, в том числе зрительного родопсина и бактериородопсина, в фемто- и раннем пикосекундном диапазоне времен исследован крайне недостаточно.

Таким образом, исследование фотохромной реакции зрительного родопсина и бактериородопсина в фемто- и пикосекундном диапазоне времен является актуальной задачей биофизики РСБ. В то же время, сравнение динамики фотохромной реакции этих двух белков как представителей родопсинов 1 и 2 типа важно, как уже было сказано, для понимания фотобиологического механизма преобразования энергии света для выполнения различных – фотоинформационных и фотоэнергетических – функций.

**Цель исследования.** Целью диссертационной работы было исследование механизма фотохромной когерентной реакции изомеризации хромофора в зрительном родопсине и бактериородопсине методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии.

**Задачи исследования:**

- 1) исследовать динамику прямой фотореакции зрительного родопсина и бактериородопсина в фемто- и пикосекундном диапазоне времен;
- 2) исследовать обратную фотореакцию зрительного родопсина и бактериородопсина, инициированную из первых двух продуктов прямой фотореакции;
- 3) провести сравнение фотохромных реакций бактериородопсина и зрительного родопсина как представителей родопсинов 1 и 2 типа, соответственно.

**Научная новизна работы.** Проведено исследование прямой и обратной фотореакций зрительного родопсина и бактериородопсина. Для прямой фотореакции предложены кинетические схемы и определены времена наблюдаемых процессов. Впервые исследована и описана динамика обратной фотореакции зрительного родопсина, индуцированной на времени 200 фс из первого продукта прямой фотореакции. Впервые показана возможность индуцирования обратной фотореакции бактериородопсина на временах 1–5 пс из первичных продуктов прямой фотореакции этого белка. Рассчитан квантовый выход обратной фотореакции зрительного родопсина и бактериородопсина, а также подтверждена зависимость эффективности обратного фотоперехода от когерентного характера прямой фотореакции.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты исследования фотохромной реакции бактериородопсина и зрительного родопсина представляют

существенный 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 функций, соответственно.

Результаты работы вошли в учебно-методическое пособие «Фотобиология и фотохимия первичных процессов зрения», предназначенное для студентов биофизиков и физиологов.

**Методология и методы исследования.** Для исследования прямых и обратных фотореакций РСБ, зрительного родопсина и бактериородопсина, протекающих в фемто- и пикосекундном диапазоне времен, в работе были использованы методы стационарной спектrophотометрии и фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии при комнатной температуре с временным разрешением 20–30 фс и зондированием в диапазоне 400–900 нм на временах -0,2–10 и 100 пс.

**Положения, выносимые на защиту:**

- 1) Механизм прямой фотореакции зрительного родопсина и бактериородопсина.
- 2) Фотообратимость реакции изомеризации зрительного родопсина и бактериородопсина в фемто- и пикосекундном диапазоне времен.
- 3) Сравнение фотохромной реакции бактериородопсина и зрительного родопсина как представителей родопсинов 1 и 2 типа, соответственно.

**Личный вклад автора.** Все изложенные в диссертации результаты получены соискателем самостоятельно или при его непосредственном участии. Личный вклад соискателя состоял в участии в биохимических и биофизических экспериментах, а также в обработке и анализе полученных данных, формулировании положений и выводов, подготовке статей и участии в конференциях. Постановка задач, интерпретация полученных результатов и формулировка выводов исследования осуществлялись совместно с научным руководителем и другими соавторами публикаций. Материалы диссертации в полном объеме доложены автором в устных докладах на ряде российских и международных конференций.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивалась использованием общепринятых физико-химических методов исследования. При проведении данной работы были использованы современные методы исследования белков: выделение зрительного родопсина из глаза быка методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, стационарная спектrophотометрия, 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.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были доложены на: VII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Международном симпозиуме «Научно-техническое сотрудничество: РФФИ-EMBL в области молекулярной биологии» (2013); XIII Ежегодной международной молодежной

конференции «Биохимическая физика» ИБХФ РАН-ВУЗы, Москва (2013); 1st International Symposium DSCMBS-2014 («Dushanbe Symposium on Computational Materials and Biological Sciences»), Republic of Tajikistan; 19-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века», Пушино (2015); VI Съезде биофизиков России, Сочи (2019).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы 12 печатных работ, из них 6 статей (5 публикаций в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, и 1 публикация в книге, индексируемой в базе Scopus), 6 тезисов в сборниках трудов научных конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 142 страницах, содержит 5 таблиц и 46 иллюстраций. Библиографический указатель включает 268 источников по 2021 год включительно, из них 14 отечественных и 254 – зарубежных авторов. Работа состоит из следующих разделов: оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, благодарности, список сокращений и условных обозначений, список терминов и список литературы.

**Сокращения, принятые в работе.** РСБ – ретинальсодержащие белки; Р – зрительный родопсин быка *Bos taurus*; БР – бактериородопсин галоархеи *Halobacterium salinarum*; фс – фемтосекунды; пс – пикосекунды; ф/и – фотоиндуцированный;  $\Delta A_{ESA}$  – поглощение из электронно-возбужденного  $S_1$  состояния;  $\Delta A_{GSA}$  – поглощение из основного  $S_0$  электронного состояния;  $\Delta A_{SE}$  – вынужденное испускание из электронно-возбужденного  $S_1$  состояния;  $\Delta A_{GSB}$  – выцветание основного  $S_0$  электронного состояния, обусловленное обеднением его заселенности при возбуждении; Фото<sub>570</sub> – фотородопсин; Бато<sub>535</sub> – батородопсин;  $J_{625}$  и  $K_{590}$  – первый и второй продукты фотоцикла БР;  $P_{498}$  – основное  $S_0$  электронное состояние Р;  $P_{510}^*$  – электронно-возбужденное  $S_1$  состояние Р;  $P_{498}'$  – колебательно-возбужденное состояние  $P_{498}$ ; ППЭ – поверхность потенциальной энергии; ФК – Франк-Кондоновский; СІ – коническое пересечение; волновой пакет – когерентный квантовый волновой пакет; БР<sub>568</sub> – основное  $S_0$  электронное состояние БР;  $I_{460}$  – электронно-возбужденное  $S_1$  состояние БР; НООР – внеплоскостные колебания атомов водорода; ШО – Шиффово основание.

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Во введении** охарактеризована тема работы, обоснована ее актуальность, определены цели и задачи исследований, положения, выносимые на защиту, научная новизна работы и ее научно-прикладное значение.

**ГЛАВА 1. Обзор литературы.** Дана характеристика структуры и функции, а также физико-химических свойств Р и БР. Описан процесс фотолиза Р и фотоцикл БР. Особое внимание уделено первичным реакциям исследуемых белков, их экспериментальному и теоретическому исследованию. Приведен обзор по исследованию фотохромных свойств Р и БР.

**ГЛАВА 2. Материалы и методы.** В данном разделе приведено описание методов получения образцов, содержащих Р и БР, а также описаны методы исследования физико-химических свойств исследуемых белков.

**2.1 Исследуемыми объектами** являлись **детергентный экстракт Р и суспензия пурпурных мембран, содержащих БР.** Р был выделен из наружных сегментов палочек глаз быка *Bos taurus* в составе детергентных мицелл с концентрацией 3–7 мг/мл и коэффициентом чистоты ( $A_{280}/A_{500}$ ) – 1,6–1,9. **Суспензии пурпурных мембран** были получены на основе штамма ET1001 галоархеи *Halobacterium salinarum* и любезно предоставлены ЦНИТИ "Техномаш" (121108, РФ, Москва, ул. Ивана Франко, д. 4). Концентрация БР составила 1–2 мг/мл, а коэффициент чистоты – 1,8. Образец был обработан ультразвуком и свето-адаптирован.

**2.2 Стационарная абсорбционная спектроскопия.** Стационарные спектры поглощения исследуемых белков регистрировали на спектрофотометре «Shimadzu UV–1601PC» (Япония) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 0,1 и 1 см.

**2.3 Метод фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии.** Время-разрешенные спектры фотоиндуцированного (ф/и) поглощения исследуемых белков были зарегистрированы с помощью фемтосекундной установки, созданной в лаборатории био- и нанопотоники ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН для выполнения экспериментов методами «возбуждение-зондирование» и «возбуждение-возбуждение-зондирование» фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии с временным разрешением 20–30 фс.

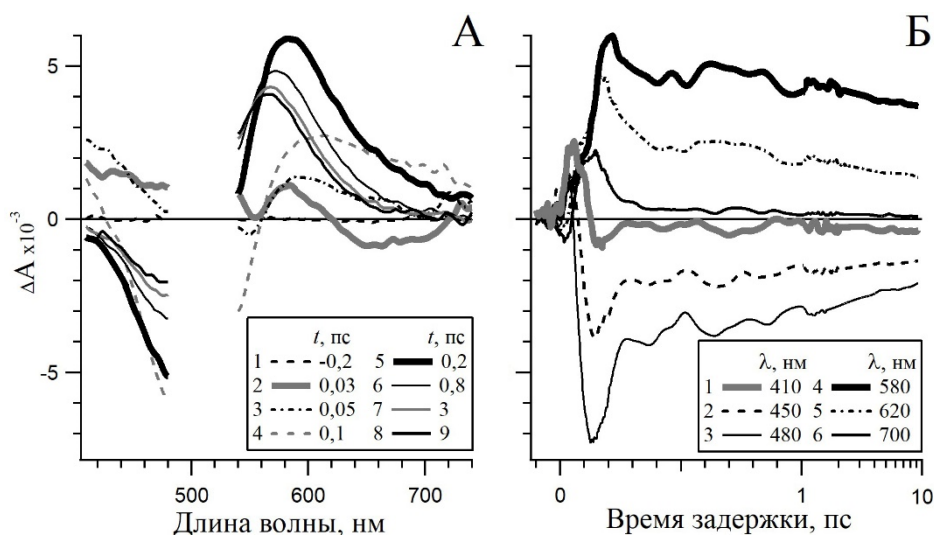
Изучение **прямой фотореакции Р и БР** проводили методом «возбуждение-зондирование». Для возбуждения использовался импульс Гауссовой формы с энергией 70–220 нДж и длиной волны 500 (Р) и 560 нм (БР). В качестве зондирующего импульса использовали суперконтинуум с энергией 10 нДж, спектральным диапазоном 400–900 нм, поляризацией относительно возбуждающего под «магическим углом» ( $54,7^\circ$ ) и временной задержкой до 10 пс. Были зарегистрированы сигналы дифференциального ф/и поглощения Р и БР  $\Delta A(\lambda; t)$ . В общем виде сигнал можно выразить как:  $\Delta A(\lambda; t) = \Delta A_{ESA}(\lambda; t) + \Delta A_{SE}(\lambda; t) + \Delta A_{GSA}(\lambda; t) + \Delta A_{GSB}(\lambda; t)$ , где  $\Delta A_{ESA} > 0$ ,  $\Delta A_{GSA} > 0$ ,  $\Delta A_{SE} < 0$  и  $\Delta A_{GSB} < 0$ .

Изучение **фотохромизма Р и БР** проводили методом «возбуждение-возбуждение-зондирование». Для изучения Р/БР использовался первый возбуждающий импульс I с длиной волны 500/560 нм и энергией 70/100 нДж, и второй возбуждающий импульс II с длиной волны 620/680 нм, энергией 700/560 нДж и временной задержкой  $t_{II} = 0,2–3,775$  (1–5) пс. Зондирование осуществлялось импульсом суперконтинуума. В зависимости от задержки  $t_{II}$ , инициировалась обратная фотореакция либо из первого продукта прямой фотореакции фотородопсина (Фото<sub>570</sub>)/интермедиата  $J_{625}$ , либо из второго продукта батородопсина (Бато<sub>535</sub>)/интермедиата  $K_{590}$ . Энергия возбуждающих импульсов находилась в линейном диапазоне зависимости интенсивности сигнала. В результате были зарегистрированы сигналы ф/и поглощения Р и БР при действии импульса I ( $\Delta A^I(\lambda; t)$ ) и импульсов I и II ( $\Delta A^{I+II}(\lambda; t_{II}; t)$ ).

## ГЛАВА 3. Результаты

### 3.1 Динамика прямой фотореакции родопсина

**Дифференциальные спектры и кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения родопсина.** На Рисунке 1 представлены дифференциальные спектры  $\Delta A(\lambda)$  и кинетические кривые  $\Delta A(t)$  ф/и поглощения Р, которые отражают выцветание основного состояния  $P_{498}$  ( $\Delta A_{GSB}$ ), а также образование возбужденного состояния  $P^*_{510}$  ( $\Delta A_{ESA}$  и  $\Delta A_{SE}$ ) и первых продуктов фотолиза – Фото<sub>570</sub>, Бато<sub>535</sub> и колебательно-возбужденного исходного состояния  $P_{498}'$  ( $\Delta A_{GSA}$ ).



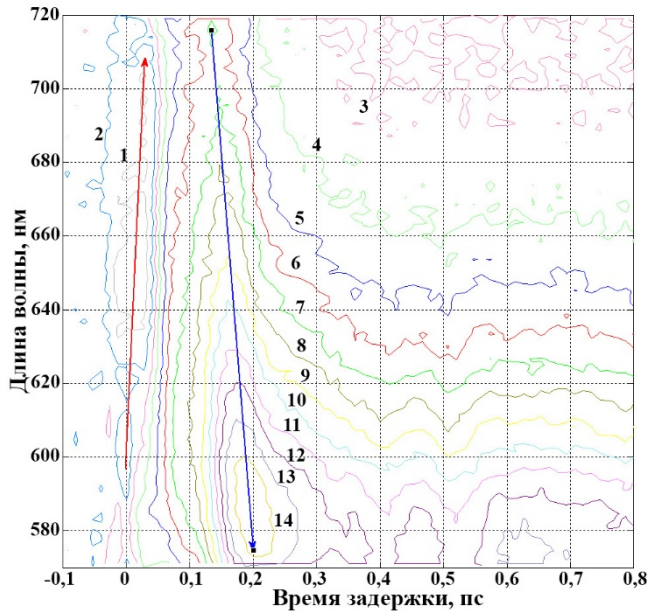
**Рисунок 1** – Дифференциальные спектры (А) и кинетические кривые (Б) ф/и поглощения родопсина, зарегистрированные на характерных временах задержки и длинах волн зондирования. Кинетические кривые представлены в линейном (-0,1–1 пс) и логарифмическом (1–10 пс) масштабах времени

Из  $P^*_{510}$  наблюдаются сигналы  $\Delta A_{ESA}$  (Рисунок 1А, 410–480 нм, (2) и (3); Рисунок 1Б, 0–100 фс, (1–3)) и  $\Delta A_{SE}$  (Рисунок 1А, 630–720 нм, (2); Рисунок 1Б, -30–50 фс, (6)). На более поздних временах появляются сигналы  $\Delta A_{GSA}$  первого продукта *цис-транс* фотоизомеризации – Фото<sub>570</sub> (Рисунок 1А, 560–720 нм, (4); Рисунок 1Б, 100–200 фс, (4–6)) и следующего продукта Бато<sub>535</sub> (Рисунок 1А, 540–680 нм, (6–8); Рисунок 1Б, 1–10 пс, (4) и (5)). Сигнал  $\Delta A_{GSB}$  (Рисунок 1А, 410–560 нм, (4); Рисунок 1Б, ~150 фс, (2) и (3)) значительно уменьшается за счет возвращения одной трети возбужденных молекул обратно в исходное состояние родопсина  $P_{498}'$  (Рисунок 1А, 410–480 нм, (5–8); Рисунок 1Б, 0,15–10 пс, (1–3)).

В кинетических кривых на временах до 2 пс в области поглощения продуктов Фото<sub>570</sub> (Рисунок 1Б, (4–6)) и  $P_{498}'$  (Рисунок 1Б, (1–3)) наблюдаются осцилляции сигнала, которые отражают когерентный характер фотореакции. При действии фемтосекундного импульса на  $S_1$  поверхности потенциальной энергии (ППЭ) образуется волновой пакет, который быстро и безбарьерно движется по  $S_1$  ППЭ вдоль координаты реакции, переходит на  $S_0$  ППЭ через коническое пересечение (CI)  $S_1/S_0$  ППЭ и частично сохраняет свои когерентные свойства в продуктах фотореакции, что отражает их колебательно-возбужденный характер. Движение волнового пакета в процессе реакции наблюдалось непосредственно – вдоль  $S_1$  ППЭ  $P_{498}$  по смещению сигнала  $\Delta A_{SE}(P^*_{510})$  в длинноволновую область на временах 0–50 фс (Рисунок 2, красная стрелка) и далее вдоль  $S_0$  ППЭ продукта Фото<sub>570</sub> по смещению сигнала  $\Delta A_{GSA}$ (Фото<sub>570</sub>) в коротковолновую область на временах



50–200 фс (Рисунок 2, синяя стрелка). Смена сигнала  $\Delta A_{SE}$  на сигнал  $\Delta A_{GSA}$  характеризует момент достижения ансамблем молекул СІ.



**Рисунок 2** – Двумерная диаграмма сигналов ф/и поглощения родопсина  $\Delta A(\lambda; t)$  в зависимости от длины волны зондирования в диапазоне 570–720 нм и времени задержки в диапазоне -0,1–0,8 пс. Контурь 1–14 соответствуют возрастанию интенсивности сигнала от значений  $\Delta A(\lambda; t) < 0$  (контурь 1–2) до  $\Delta A(\lambda; t) > 0$  (контурь 4–14). На Рисунке обозначена эволюция сигнала  $\Delta A_{SE}$  родопсина (красная стрелка) и сигнала  $\Delta A_{GSA}$  продукта Фото570 (синяя стрелка)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об образовании ко времени задержки 30 фс возбужденного состояния  $P_{510}^*$ , которое за 50–100 фс переходит в продукты Фото570 и  $P_{498}'$ . Эти переходы осуществляются через СІ  $S_1/S_0$  ППЭ. Динамика сигналов  $\Delta A_{ESA}$ ,  $\Delta A_{SE}$  и  $\Delta A_{GSA}$  отражает быстрый и направленный  $S_1 \rightarrow S_0$  переход волнового пакета в процессе реакции фотоизомеризации ретиналя в Р, подтверждая ее когерентный характер. Полученные данные хорошо согласуются с данными работ [1, 2].

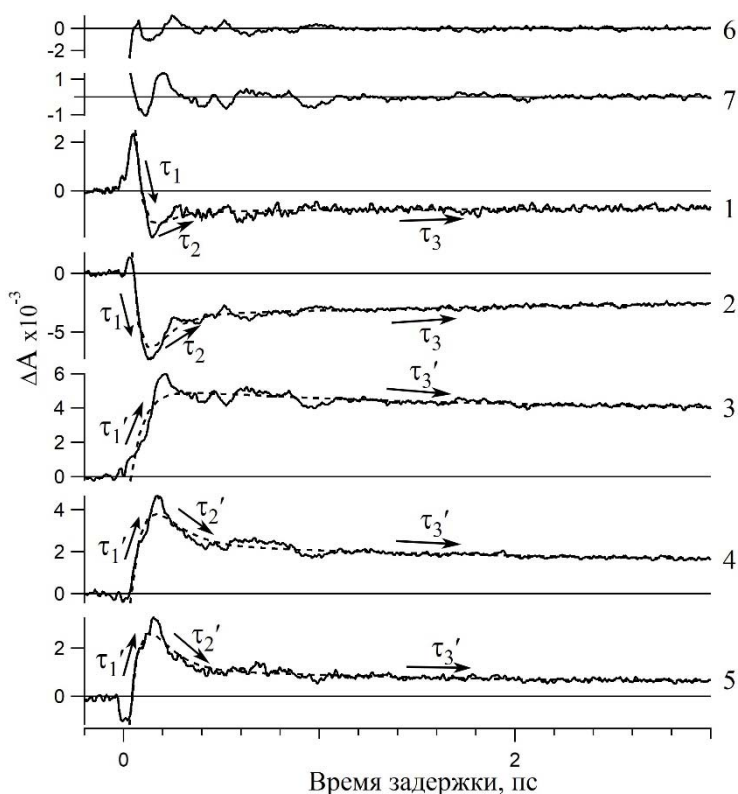
**Анализ кинетических кривых фотоиндуцированного поглощения родопсина.** Для анализа сигналов  $\Delta A(t)$ , характеризующих динамику первичных реакций Р (Рисунок 1Б; Рисунок 3, (1–5)), были построены модельные экспоненциальные кривые (Рисунок 3, (8)), параметры которых приведены в Таблице 1. Усредненные времена затухания  $\tau_1$ – $\tau_3$  и  $\tau_1'$ – $\tau_3'$  были получены в спектральных диапазонах 430–490 и 560–650 нм, соответственно.

**Таблица 1** – Усредненные параметры модельных экспоненциальных кривых, построенных для экспериментальных кинетических кривых ф/и поглощения родопсина во временном диапазоне 0,03–10 пс в спектральных диапазонах зондирования 430–490 и 560–650 нм

$\Delta A$	$\lambda$ , нм	$\tau_1$ , фс	$a_2$	$\tau_2$ , фс	$a_3$	$\tau_3$ , пс
GSB + GSA( $P_{498}$ )	430–490	$59 \pm 12$	-0,96	$84 \pm 20$	-0,04	$2,35 \pm 0,17$
$\Delta A$	$\lambda$ , нм	$\tau_1'$ , фс	$a_2'$	$\tau_2'$ , фс	$a_3'$	$\tau_3'$ , пс
GSA(Фото570 и Бато535)	560–650	$74 \pm 9$	0,94	$114 \pm 20$	0,06	$2,22 \pm 0,1$

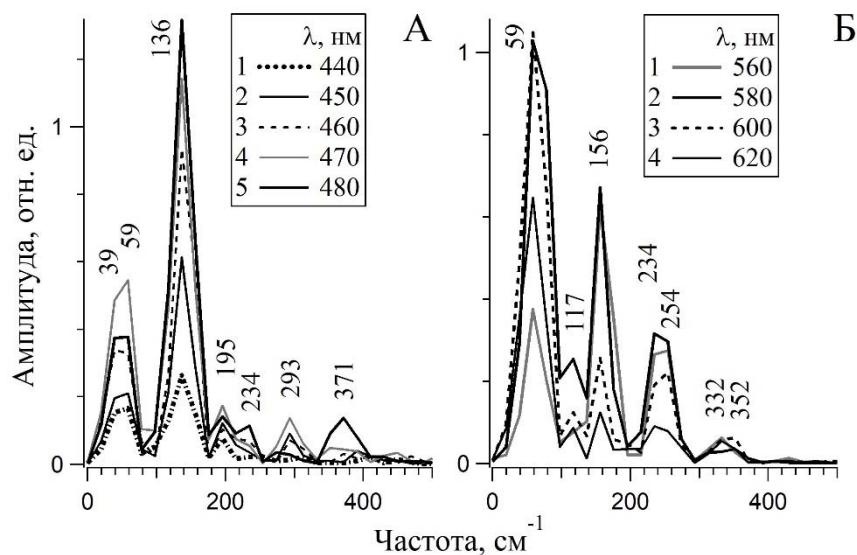
Время достижения волновым пакетом СІ и образования продуктов Фото570 и  $P_{498}'$  составило  $\sim 60$  фс ( $\tau_1$ ), время движения волновых пакетов по  $S_1$  ППЭ Фото570 и  $P_{498}'$ , отражающее колебательную релаксацию, происходящую при образовании этих продуктов, было оценено в  $\sim 70$  фс ( $\tau_1'$ ) и  $\sim 80$  фс ( $\tau_2$ ), соответственно. Характерное время перехода Фото570  $\rightarrow$  Бато535 составило  $\sim 2,2$  пс ( $\tau_3$ ).

Основываясь на данных работы [3], можно предположить, что при возбуждении  $R_{498}$ , кроме реакционного возбужденного состояния, образуется дополнительное нереакционное состояние, которое ведет только к образованию исходного состояния белка. Время этого процесса было оценено в  $\sim 2,4$  пс ( $\tau_3$ ), а вклад нереакционного состояния в общую динамику распада – в 0,04 (Таблица 1).



**Рисунок 3** – Кинетические кривые ф/и поглощения родопсина, зарегистрированные на длинах волн зондирования 430 (1), 480 (2), 580 (3), 620 (4) и 650 нм (5), и соответствующие им модельные экспоненциальные кривые (пунктирные кривые), построенные в диапазоне времен задержки 0,03–10 пс. На Рисунке также представлены осцилляционные составляющие кривых 2 (6) и 3 (7)

При построении модельных кривых не учитывалась осцилляционная динамика волнового пакета, связанная с когерентным характером реакции фотоизомеризации ретиналя в Р. Фурье-анализ осцилляционной составляющей кривых  $\Delta A(t)$  (Рисунок 3, (6) и (7)) позволил определить частоты и амплитуды различных компонент волновых пакетов продуктов  $R_{498}'$  (Рисунок 4А) и  $\text{Фото}_{570}$  (Рисунок 4Б).

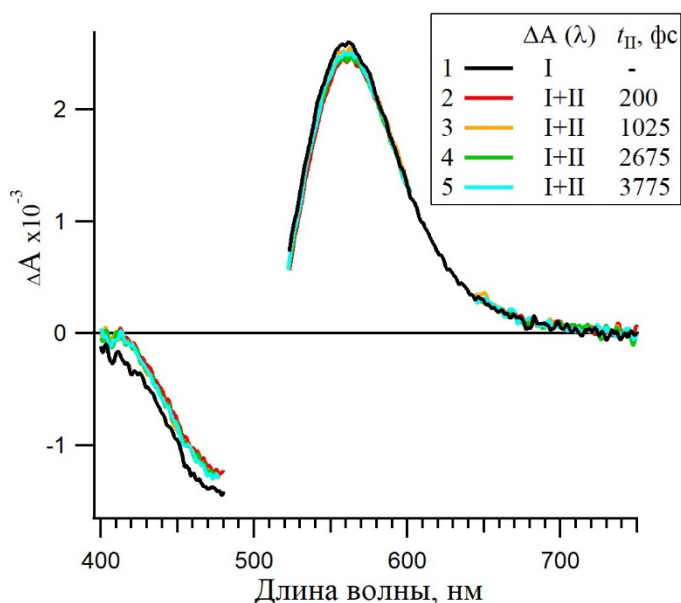


**Рисунок 4** – Спектры мощности Фурье-компонент, полученные при анализе осцилляций сигналов  $\Delta A(t)$  родопсина в интервале времен задержки 0,09–1 пс в диапазоне частот 0–500  $\text{см}^{-1}$  на длинах волн зондирования 440–480 нм (А) и 560–620 нм (Б). Частоты пиков подписаны на Рисунке в [ $\text{см}^{-1}$ ]

В полосе поглощения  $P_{498}'$  был получен следующий набор частот осцилляций: 39, 59, 136, 195, 234, 293 и  $371 \text{ см}^{-1}$ , среди которых доминируют частоты  $136 \text{ см}^{-1}$  и в меньшей степени 39 и  $59 \text{ см}^{-1}$ . В полосе поглощения  $\text{Фото}_{570}$  были получены частоты: 59, 117, 156, 234, 254, 332 и  $352 \text{ см}^{-1}$ , с доминирующими частотами  $59 \text{ см}^{-1}$  и в меньшей степени  $156 \text{ см}^{-1}$ .

### 3.2 Фотохромизм родопсина

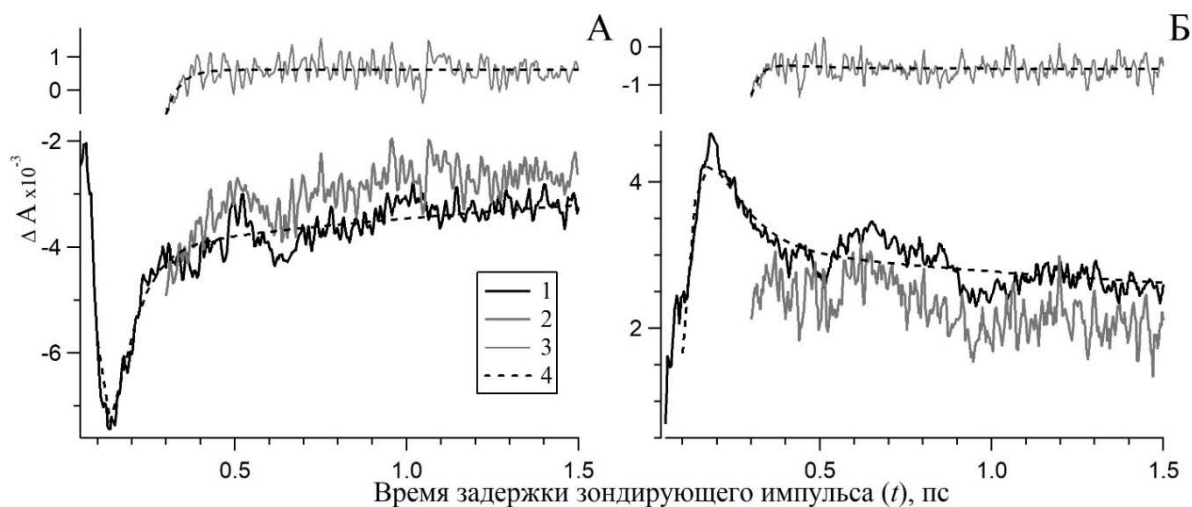
**Обратная фотореакция родопсина, инициированная из первых двух продуктов прямой фотореакции.** На Рисунке 5 представлены сигналы  $\Delta A(\lambda)$ , полученные при действии одного и двух возбуждающих импульсов при времени задержки импульса II  $t_{II} = 200, 1025, 2675$  и  $3775$  фс и зондирующего импульса  $t = 100$  пс. При данной задержке  $t$  дифференциальный спектр состоит только из сигналов  $\Delta A_{GSB}(P_{498})$  и  $\Delta A_{GSA}(\text{Бато}_{535})$ . После действия на образец импульса II уменьшается темновое образование продукта  $\text{Бато}_{535}$  и увеличивается поглощение исходного состояния  $P_{498}$  (Рисунок 5, (2–5)). Это свидетельствует об обратных фотопереходах  $\text{Фото}_{570} \rightarrow P_{498}$  (при  $t_{II} = 200$  и  $1025$  фс) или  $\text{Бато}_{535} \rightarrow P_{498}$  (при  $t_{II} = 2675$  и  $3775$  фс), которые сопровождаются *транс*  $\rightarrow$  *11-цис* изомеризацией ретиналя. При этом форма дифференциальных спектров не меняется, что свидетельствует об отсутствии в обратной фотореакции побочных продуктов.



**Рисунок 5** – Дифференциальные спектры ф/и поглощения родопсина  $\Delta A(\lambda)$ , полученные при действии одного возбуждающего импульса I (1) и двух возбуждающих импульсов I и II (2–5) при задержке импульса II  $t_{II} = 200$ – $3775$  фс и зондирующего импульса  $t = 100$  пс. В спектральных областях 480–520 нм и 600–645 нм данные не представлены из-за артефактного сигнала, связанного с рассеянием возбуждающих импульсов

Также была изучена динамика обратного фотоперехода  $\text{Фото}_{570} \rightarrow P_{498}$  при  $t_{II} = 200$  фс (Рисунок 6). Сравнение кинетических кривых  $\Delta A^I(t)$  и разностных кривых  $\Delta A'(t) = \Delta A^{I+II}(t) - \Delta A^I(t)$  показало, что продукты обратной фотореакции,  $P_{498}$  и  $\text{Фото}_{570}$ , окончательно образуются уже к 200 фс после действия импульса II ( $t = 400$  фс), как и в случае прямой фотореакции, продукты которой окончательно образуются к 200–300 фс после действия импульса I (Рисунок 1Б, (3) и (4); Рисунок 6). Кривые  $\Delta A^I(t)$  и  $\Delta A'(t)$  были аппроксимированы экспоненциальными модельными кривыми. Сравнение полученных времен  $\tau_1$ – $\tau_3$  приведено в Таблице 2. Время жизни возбужденного состояния  $\text{Фото}_{570}$  определить не удалось, но было показано, что времена колебательной релаксации в продуктах обратной фотореакции,  $P_{498}$  ( $\tau_2 = 37 \pm 7$  фс) и  $\text{Фото}_{570}$  ( $\tau_1 = 29 \pm 18$  фс),

сравнимы с временами колебательной релаксации продуктов прямой фотореакции,  $\text{Фото}_{570}$  ( $\tau_1 = 42 \pm 5$  фс) и  $\text{Р}_{498}$  ( $\tau_2 = 63 \pm 6$  фс). Полученные данные свидетельствуют о том, что обратная фотореакция  $\text{Фото}_{570} \rightarrow \text{Р}_{498}$  протекает крайне быстро без образования промежуточных продуктов, а ее скорость сравнима со скоростью прямой фотореакции.



**Рисунок 6** – Нормированные кинетические кривые ф/и поглощения родопсина  $\Delta A^I(t)$  (1) и  $\Delta A^{I+II}(t)$  (2) и разностные кривые  $\Delta A'(t) = \Delta A^{I+II}(t) - \Delta A^I(t)$  (3), представленные на длинах волн зондирования 490 (А) и 610 нм (Б). Временная задержка импульса II составила  $t_{II} = 200$  фс. Для кривых  $\Delta A^I(t)$  и  $\Delta A'(t)$  приведены модельные экспоненциальные кривые (4)

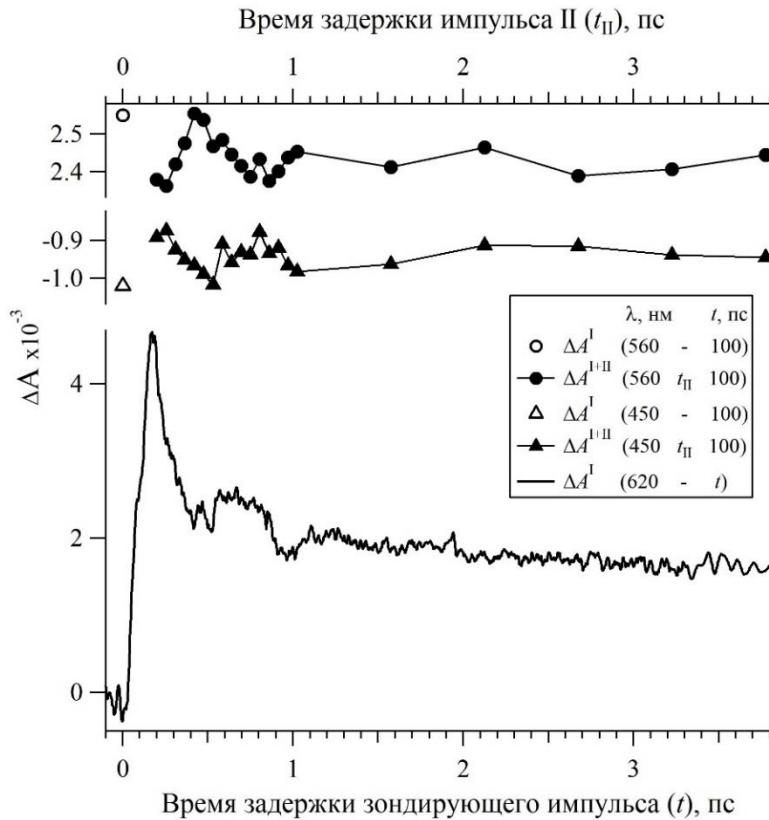
	$\lambda$ , нм	$\tau_1$ , фс	$\tau_2$ , фс	$\tau_3$ , пс
$\Delta A^I(t)$	490	$26 \pm 4$	$63 \pm 6$	$2,2 \pm 0,03$
$\Delta A'(t)$	490	-	$37 \pm 7$	-
$\Delta A^I(t)$	610	$42 \pm 5$	$92 \pm 12$	$2,3 \pm 0,04$
$\Delta A'(t)$	610	$29 \pm 18$	$130 \pm 100$	-

**Таблица 2** – Сравнение параметров модельных экспоненциальных кривых, построенных для экспериментальных кинетических кривых ф/и поглощения родопсина  $\Delta A^I(t)$  и разностных кривых  $\Delta A'(t) = \Delta A^{I+II}(t) - \Delta A^I(t)$  на длинах волн зондирования 490 и 610 нм

При варьировании времени задержки импульса II ( $t_{II}$ ) в соответствии с фазой осцилляций, присутствующих в сигналах поглощения продукта  $\text{Фото}_{570}$ , наблюдается разная эффективность обратной фотореакции, которая оценивалась по падению сигнала  $\Delta A^{I+II}(\lambda = 560$  нм;  $t_{II}$ ;  $t = 100$  пс) и возрастанию сигнала  $\Delta A^{I+II}(\lambda = 450$  нм;  $t_{II}$ ;  $t = 100$  пс) относительно сигнала  $\Delta A^I$  (Рисунок 7, сверху). Если задержка импульса II соответствует максимуму осцилляций продукта  $\text{Фото}_{570}$  с основной частотой  $59 \text{ см}^{-1}$ , то обратная фотореакция протекает более эффективно и меньшее количество продукта  $\text{Бато}_{535}$  образуется ко времени  $t = 100$  пс. Фотохромное переключение регистрируется в меньшей степени, когда импульс II приходит в момент противофазы движения волнового пакета, и совсем не регистрируется в минимуме осцилляций при времени задержки  $t_{II} = 420$ – $475$  фс.

Фотохромное переключение наблюдается как на временах жизни  $\text{Фото}_{570}$  (0,2–2 пс), так и на стадии образования  $\text{Бато}_{535}$  (2–3,775 пс). По мере затухания осцилляций во время-разрешенных сигналах поглощения  $\text{Фото}_{570}$   $\Delta A^I(\lambda = 620$  нм;  $t > 1,5$  пс), происходит выход сигнала  $\Delta A^{I+II}(t_{II})$  на плато.





**Рисунок 7** – Внизу – Кинетическая кривая ф/и поглощения родопсина  $\Delta A^I$ , зарегистрированная на длине волны 620 нм (нижняя ось абсцисс). Вверху – Значения ф/и поглощения родопсина  $\Delta A^{I+II}$ , зарегистрированные на длинах волн 450 и 560 нм на времени задержки зондирования  $t = 100$  пс и представленные в зависимости от времени задержки импульса II  $t_{II} = 0,2-3,775$  пс (верхняя ось абсцисс). На времени задержки  $t_{II} = 0$  фс представлены контрольные значения ф/и поглощения родопсина  $\Delta A^I$ , зарегистрированные на длинах волн 450 и 560 нм на времени задержки  $t = 100$  пс

**Расчет квантового выхода обратной фотореакции родопсина.** Квантовый выход обратной фотореакции Р рассчитывали для двух случаев, когда задержка импульса II составляла  $t_{II} = 0,2$  пс и протекала реакция  $\text{Фото}_{570} \rightarrow \text{Р}_{498}$  с квантовым выходом  $\varphi_2$ , и когда  $t_{II} = 3,775$  пс и протекала реакция  $\text{Бато}_{535} \rightarrow \text{Р}_{498}$  с квантовым выходом  $\varphi_3$ . Квантовый выход определяли, как долю возбужденных под действием импульса II молекул  $\text{Фото}_{570}$  ( $\text{Бато}_{535}$ ), возвратившихся в  $\text{Р}_{498}$ .

Квантовый выход  $\varphi_2$  рассчитывали по соотношению  $\varphi_2 = N_2/N_1^*$ , где  $N_2$  – количество возбужденных импульсом II молекул  $\text{Фото}_{570}$ , перешедших в  $\text{Р}_{498}$  в результате обратной фотореакции, а  $N_1^*$  – количество возбужденных импульсом II молекул  $\text{Фото}_{570}$  в объеме образца  $V$ , который подвергался действию импульсов I и II и зондирующего импульса.  $V = l S_{\text{probe}}$ , где  $l$  – оптический путь, а  $S_{\text{probe}}$  – площадь кюветы с образцом, через которую прошел зондирующий импульс.

Значения  $N_2$  и  $N_1^*$  рассчитывали из экспериментальных данных прямого  $\text{Р}_{498} \rightarrow \text{Фото}_{570}$  и обратного  $\text{Фото}_{570} \rightarrow \text{Р}_{498}$  фотопереходов. Падение интенсивности импульса II после прохождения через образец можно представить, как  $\Delta I = I_0 2,303 \epsilon_{\text{Фото}_{620}} C l$ , где  $\epsilon_{\text{Фото}_{620}}$  – коэффициент экстинкции  $\text{Фото}_{570}$  на длине волны импульса II ( $1,25 \cdot 10^7 \text{ см}^2 \text{ моль}^{-1}$  [4]), а  $C$  – концентрация молекул  $\text{Фото}_{570}$  к моменту прихода импульса II. Величина  $\Delta I$  может быть выражена через величину  $N_1^*$ :  $\Delta I = \Delta E / (S_{\text{probe}} t) = N_1^* E_{\text{ph}} / (S_{\text{probe}} t)$ , где  $\Delta E$  – изменение энергии импульса II при прохождении через образец в объеме  $V$ ,  $t$  – длительность импульса II,  $E_{\text{ph}}$  – энергия фотона с длиной волны  $\lambda = 620$  нм ( $3,21 \cdot 10^{-19}$  Дж). Величина  $I_0$  может быть представлена аналогично:  $I_0 = N E_{\text{ph}} / (S_{\text{probe}} t)$ , где  $N$  – число фотонов в импульсе II, прошедших через площадь  $S_{\text{probe}}$ . Величину  $N$  можно выразить как  $N = E_{\text{pump2}} S_{\text{probe}} / (E_{\text{ph}} S_{\text{pump2}})$ , где  $E_{\text{pump2}}$  –

энергия импульса  $\Pi$  ( $7 \cdot 10^{-7}$  Дж), а  $S_{\text{pump2}}$  – площадь кюветы с образцом, через которую прошел импульс  $\Pi$  ( $2,54 \cdot 10^{-4}$  см<sup>2</sup>).

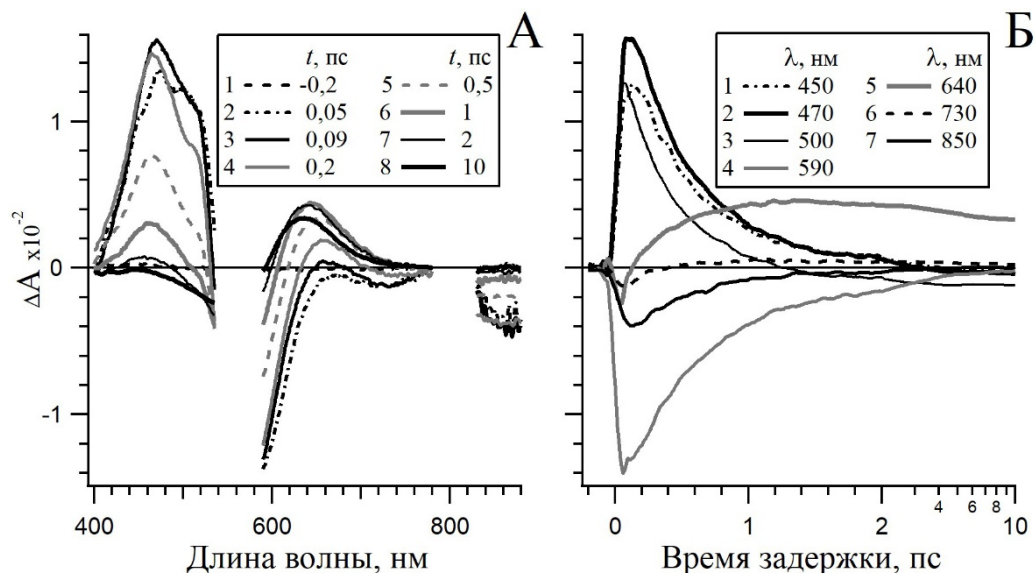
Используя приведенные выше выражения, величину  $N_1^*$  можно представить как:  $N_1^* = N(2,303 \varepsilon_{\text{ФОТО620}} C l) = 2,303 \varepsilon_{\text{ФОТО620}} E_{\text{pump2}} N_1 / (E_{\text{ph}} S_{\text{pump2}} N_A) = 0,41 N_1$ , где  $N_1$  – число молекул ФОТО<sub>570</sub> и, соответственно, БАТО<sub>535</sub>, образованных в результате прямой фотореакции в объеме  $V$ , а  $N_A$  – число Авогадро ( $6,02 \cdot 10^{23}$  моль<sup>-1</sup>).

Величину  $N_1$  можно выразить как  $N_1 = \Delta A^{I_{560}}(\lambda = 560 \text{ нм}; t = 100 \text{ пс})/k_0$ , где  $\Delta A^{I_{560}} = 2,59 \cdot 10^{-3}$  еоп.,  $k_0 = (\varepsilon_{\text{БАТО560}} - \varepsilon_{\text{Р560}}) l / (N_A V)$ ,  $\varepsilon_{\text{БАТО560}}$  и  $\varepsilon_{\text{Р560}}$  – коэффициенты экстинкции БАТО<sub>535</sub> и Р<sub>498</sub>, соответственно, на длине волны 560 нм. Величину  $N_2$  можно выразить аналогично:  $N_2 = |\Delta A'_{560}(\lambda = 560 \text{ нм}; t_{\text{II}} = 200 \text{ фс}; t = 100 \text{ пс})|/k_0$ , где  $|\Delta A'_{560}| = |\Delta A^{I+II}_{560} - \Delta A^{I_{560}}| = 1,5 \cdot 10^{-4}$  еоп.

Таким образом, квантовый выход обратной фотореакции ФОТО<sub>570</sub> → Р<sub>498</sub> может быть представлен как:  $\varphi_2 = |\Delta A'_{560}(t_{\text{II}} = 200 \text{ фс})| / (0,41 \Delta A^{I_{560}}) = 0,14$ . Для фотореакции БАТО<sub>535</sub> → Р<sub>498</sub> квантовый выход  $\varphi_3$  был вычислен аналогично, он составил  $\varphi_3 = 0,15$ .

### 3.3 Динамика прямой фотореакции бактериородопсина

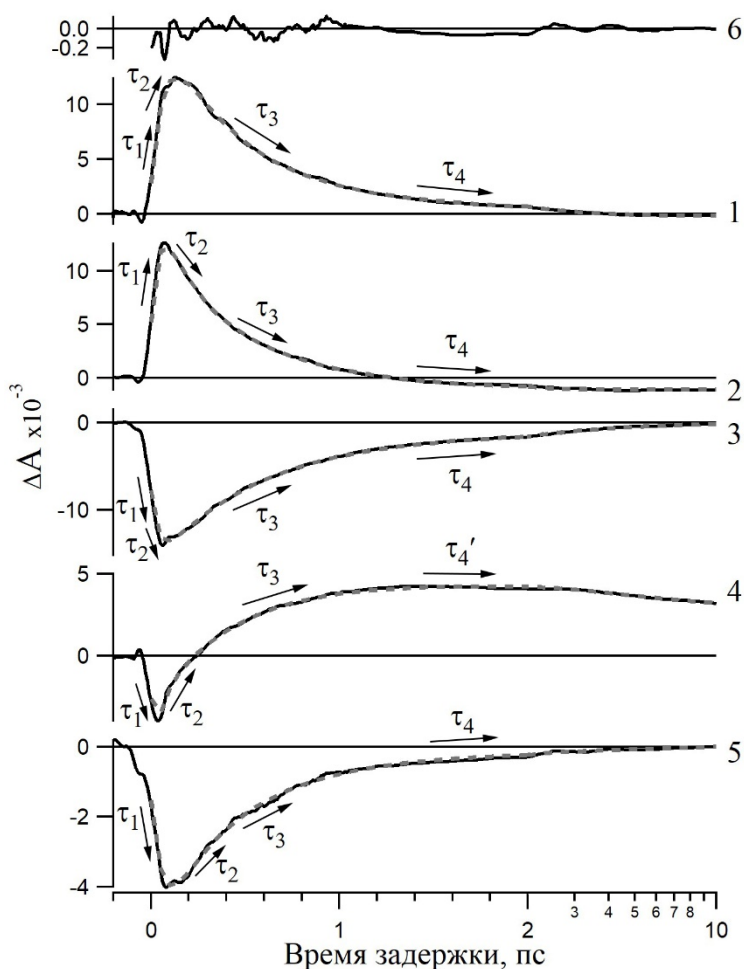
На Рисунке 8 представлены дифференциальные спектры  $\Delta A(\lambda)$  и кинетические кривые  $\Delta A(t)$  ф/и поглощения БР, которые отражают выцветание основного состояния БР<sub>568</sub> ( $\Delta A_{\text{GSB}}$ ), образование возбужденного состояния, называемого интермедиатом  $I_{460}$  ( $\Delta A_{\text{ESA}}$  и  $\Delta A_{\text{SE}}$ ), и первых фотопродуктов в основном состоянии – интермедиатов  $J_{625}$ ,  $K_{590}$  и исходного состояния БР<sub>568</sub> ( $\Delta A_{\text{GSA}}$ ).



**Рисунок 8** – А – Дифференциальные спектры (А) и кинетические кривые (Б) ф/и поглощения бактериородопсина, зарегистрированные на характерных временах задержки и длинах волн зондирования. Кинетические кривые представлены в линейном (-0,2–2 пс) и логарифмическом (2–10 пс) масштабах времени

Сигналы  $\Delta A_{\text{ESA}}$  и  $\Delta A_{\text{SE}}$  возникают к 100 фс после возбуждения в областях 450–490 нм и 700–900 нм, соответственно (Рисунок 8А, (2–4)). Исчезновение этих сигналов сопряжено с образованием ко времени задержки 1 пс в области 650 нм полосы поглощения интермедиата  $J_{625}$  с изомеризованным ретиналем (Рисунок 8А, (5) и (6));

Рисунок 8Б, (5)). Дальнейший сдвиг этой полосы  $\Delta A_{GSA}$  в коротковолновую область отражает образование следующего интермедиата  $K_{590}$  (Рисунок 8А, (7) и (8)). Сигнал  $\Delta A_{GSB}$ , наблюдаемый в области 530–640 нм, значительно уменьшается при  $t > 100 - 150$  фс из-за перехода части возбужденных молекул в исходное состояние  $BR_{568}$  (Рисунок 8Б, (4)). Характерные времена наблюдаемых процессов были оценены путем построения модельных экспоненциальных кривых (Рисунок 9, пунктирные кривые; Таблица 3).



**Рисунок 9** – Кинетические кривые ф/и поглощения бактериородопсина, представленные на длинах волн зондирования 450 (1), 500 (2), 590 (3), 630 (4) и 880 нм (5) в линейном (-0,2–2 пс) и логарифмическом (2–10 пс) масштабах времени, и соответствующие им модельные экспоненциальные кривые (пунктирные кривые), построенные в диапазоне времен задержки 0–10 пс. На Рисунке также представлена осцилляционная составляющая кривой 5 (6)

3). Характерное время  $\tau_4' = 1,8$  пс отражает  $J_{625} \rightarrow K_{590}$  переход, наблюдаемый в области поглощения  $\Delta A_{GSA}$  этих продуктов (Рисунок 9, (4)).

В кинетических кривых ф/и поглощения БР  $\Delta A_{SE}(t)$  (Рисунок 9, (5)) также присутствует осцилляционная составляющая (Рисунок 9, (6)), но с амплитудой на порядок

Образование интермедиата  $I_{460}$  из ФК состояния происходит с характерным временем  $\tau_1 = 40$  фс. Характерное время  $\tau_2 = 130$  фс отражает коротковолновый сдвиг сигнала  $\Delta A_{ESA}$  и длинноволновый сдвиг сигнала  $\Delta A_{SE}$  на временах задержки 50–200 фс.

Процесс с характерным временем  $\tau_3 = 480$  фс является основным путем распада возбужденного состояния  $I_{460}$ , происходящего с образованием интермедиата  $J_{625}$  и исходного состояния  $BR_{568}$ . Следовательно, эту составляющую можно отнести к реакционному пути распада возбужденного состояния через  $S_1/S_0$  CI.

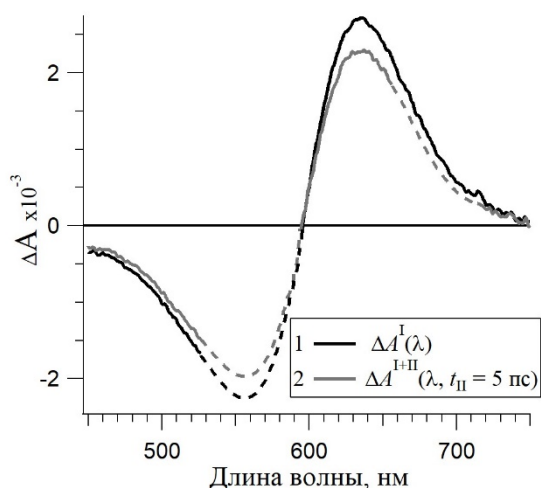
Процесс с характерным временем  $\tau_4 = 2,4$  пс, который можно наблюдать в полосах  $\Delta A_{ESA}$ ,  $\Delta A_{SE}$  и  $\Delta A_{GSB}$ , связан с дополнительным нереакционным путем распада возбужденного состояния, поскольку в этом временном диапазоне формируется только исходное состояние  $BR_{568}$  (Рисунок 9, (1–3) и (5)). Соотношение реакционного и нереакционного путей составило 0,96/0,04 (Таблица

меньшей, чем в случае Р (Рисунок 3, (6) и (7)). Фурье-анализ показал в кинетических кривых  $\Delta A_{SE}(t)$  наличие слабо выраженных осцилляций с частотами  $\sim 100$  и  $175 \text{ см}^{-1}$ .

**Таблица 3** – Параметры модельных экспоненциальных кривых, построенных для экспериментальных кинетических кривых ф/и поглощения бактериородопсина во временном диапазоне 0–10 пс в характерных спектральных диапазонах зондирования

$\Delta A$	$\lambda$ , нм	$\tau_1$ , фс	$\tau_2$ , фс	$\tau_3$ , фс	$a_3$	$\tau_4$ , пс	$a_4$	$\tau_4'$ , пс
ESA	440–460	$50 \pm 20$	$90 \pm 20$	$410 \pm 160$	0,94	$2,8 \pm 0,8$	0,06	-
ESA	490–510	$40 \pm 10$	$140 \pm 50$	$480 \pm 190$	0,99	$2,8 \pm 0,7$	0,01	-
GSA + + GSA(BP <sub>568</sub> )	585–600	$40 \pm 10$	$100 \pm 40$	$500 \pm 230$	0,96	$2,1 \pm 0,6$	0,04	-
ESA + + GSA(J <sub>625</sub> и K <sub>590</sub> )	620–640	$40 \pm 10$	$110 \pm 20$	$480 \pm 170$	-	-	-	$1,8 \pm 0,6$
SE	870–890	$20 \pm 10$	$230 \pm 120$	$550 \pm 320$	0,96	$1,7 \pm 0,8$	0,04	-
среднее значение		<b><math>40 \pm 10</math></b>	<b><math>130 \pm 50</math></b>	<b><math>480 \pm 210</math></b>	<b>0,96</b>	<b><math>2,4 \pm 0,7</math></b>	<b>0,04</b>	<b><math>1,8 \pm 0,6</math></b>

### 3.4 Фотохромизм бактериородопсина



**Рисунок 10** – Дифференциальные спектры ф/и поглощения бактериородопсина, полученные при действии одного возбуждающего импульса I (1) и двух возбуждающих импульсов I и II (2) при задержке импульса II  $t_{II} = 5$  пс и зондирующего импульса  $t = 100$  пс. В спектральных областях прохождения возбуждающих импульсов 530–590 и 660–710 нм экспериментальные кривые были построены модельными кривыми (пунктирные кривые)

#### *Обратная фотореакция бактериородопсина, инициированная из первых двух продуктов прямой фотореакции.*

Фотохромные свойства БР были исследованы в раннем пикосекундном диапазоне при задержке импульса II  $t_{II} = 1, 3$  и  $5$  пс. При  $t_{II} = 1$  пс импульс II возбуждает интермедиат  $J_{625}$ , а при  $t_{II} = 3$  и  $5$  пс – интермедиат  $K_{590}$ . Как видно из Рисунка 10, действие импульса II при  $t_{II} = 5$  пс приводит к уменьшению сигналов  $\Delta A_{GSA}(BP_{568})$  и  $\Delta A_{GSA}(K_{590})$  на времени зондирования  $t = 100$  пс. Аналогичные данные были получены для  $t_{II} = 1$  и  $3$  пс. Это свидетельствует о том, что импульс II в части молекул БР прерывает фотоцикл и инициирует обратную фотореакцию со стадии интермедиатов  $J_{625}$  и  $K_{590}$  в исходное состояние  $BP_{568}$  без образования побочных продуктов, о чем можно судить по сохранению формы дифференциальных спектров. В отличие от Р, эффективность обратной фотореакции БР практически не зависит от величины  $t_{II}$ .

#### *Расчет квантового выхода обратной фотореакции бактериородопсина.*

Квантовый выход обратной фотореакции БР рассчитывали для случая, когда задержка



импульса  $\Pi$   $t_{\Pi} = 5$  пс и протекала фотореакция  $K_{590} \rightarrow BR_{568}$  с квантовым выходом  $\phi_4$ . Расчет был выполнен аналогично, представленному в Пункте 3.2 для Р. Квантовый выход определяли, как долю возбужденных импульсом  $\Pi$  молекул  $K_{590}$ , возвратившихся в  $BR_{568}$ . Было получено значение  $\phi_4 = 0,81$ .

## **ГЛАВА 4. Обсуждение результатов**

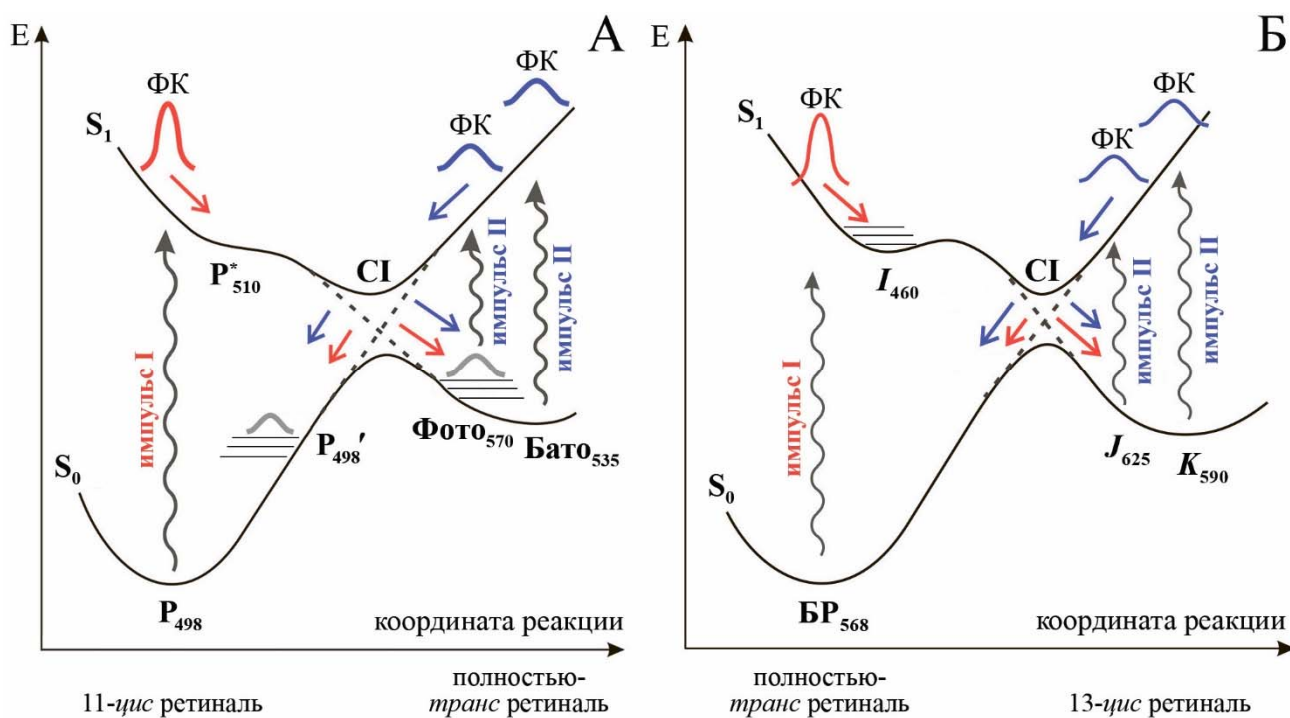
### **4.1 Динамика первичных фотопревращений родопсина**

На основании спектрально-кинетических данных (П. 3.1), характеризующих первичные реакции Р, и модели 2-х состояний можно предположить следующую последовательность индуцированных светом событий (Рисунок 11А, красный цвет). После поглощения кванта света на  $S_1$  ППЭ  $R_{498}$  образуется ФК состояние, которое к 30 фс переходит в возбужденное состояние  $R_{510}^*$  как результат движения волнового пакета вдоль  $C=C$  колебательных мод ретиналя. Из этого состояния наблюдаются сигналы  $\Delta A_{ESA}$  и  $\Delta A_{SE}$ . Далее волновой пакет двигается вдоль реакционных колебательных мод, что видно по динамике сигнала  $\Delta A_{SE}$  (Рисунок 2, красная стрелка). К реакционным модам относятся торсионные моды ретиналя и внеплоскостные колебания атомов водорода (НООР). Волновой пакет с характерным временем  $\sim 60$  фс достигает области CI  $S_1/S_0$  ППЭ, разделяется на два подпакета, один из которых двигается по  $S_0$  ППЭ Фото $_{570}$  в процессе колебательной релаксации этого продукта, происходящей с характерным временем  $\sim 70$  фс, что видно по динамике сигнала  $\Delta A_{GSA}$  (Рисунок 2, синяя стрелка).

Время фотоизомеризации ретиналя в Р ( $\sim 60$  фс) было оценено по анализу сигналов  $\Delta A(t)$ . Это значение хорошо согласуется с литературными данными (50–100 фс) [2, 5]. Такая высокая скорость фотореакции Р возможна благодаря асинхронному движению  $C_9=C_{10}$  и  $C_{11}=C_{12}$  связей на  $44^\circ$  и  $-128^\circ$ , соответственно [2], по механизму «велосипедных педалей» с сохранением занимаемого объема [6], что крайне важно в ограниченном объеме хромофорного центра. Предварительное скручивание  $C_{11}=C_{12}$  связи на  $-13^\circ$  [2] также способствует высокой скорости и селективности фотореакции.

Второй волновой подпакет через область CI переходит на  $S_0$  ППЭ исходного состояния  $R_{498}'$  и движется далее с характерным временем  $\sim 80$  фс, что отражает колебательную релаксацию ретиналя в этом продукте. При образовании продукта Бато $_{535}$  за время 2,2 пс завершаются процессы колебательной релаксации и дефазировки различных колебательных мод ретиналя, вероятно связанные с перераспределением энергии между ретиналем и его белковым окружением.

Движение волнового пакета также можно проследить по осцилляциям во время-разрешенных сигналах  $\Delta A_{GSA}(\text{Фото}_{570})$  и  $\Delta A_{GSA}(R_{498}')$  (Рисунок 1 и 3). Частоты осцилляций, полученные в настоящей работе (Рисунок 4), согласуются с данными работ [5, 7] и соответствуют в основном делокализованным торсионным колебаниям ретиналя. В то время как реакция фотоизомеризации требует торсионного движения, сильно локализованного в области  $C_{11}=C_{12}$  связи ( $570 \text{ см}^{-1}$ ) [5], более масштабные и низкочастотные торсионные движения активируются уже после перехода на  $S_0$  ППЭ.



**Рисунок 11** – Строение  $S_0$  и  $S_1$  поверхностей потенциальной энергии родопсина (А) и бактериородопсина (Б), иллюстрирующее их фотохромные реакции в фемто- и пикосекундном временном диапазоне. Красным цветом обозначены параметры прямой фотореакции, синим – обратной фотореакции

Полученные результаты подтверждают нестационарный когерентный характер фотореакции ретиналя в Р. В других РСБ, как и в протонированном ШО ретиналя в растворе, эта реакция также имеет когерентный характер [8].

#### 4.2 Фотохромизм родопсина

Строение  $S_0$  и  $S_1$  ППЭ Р в рамках модели 2-х состояний, а также отсутствие побочных и промежуточных продуктов в процессе обратной фотореакции, позволяет предположить следующую схему ее протекания (Рисунок 11А, синий цвет), которая имеет много общего со схемой прямой фотореакции. Импульс II, пришедший в образец через  $t_{II} = 0,2-2$  пс, инициирует  $S_1 \leftarrow S_0$  переход из колебательно-возбужденного состояния  $Фото_{570}$ , эволюционирующего во времени, на правую ветвь той же  $S_1$  ППЭ, которая участвовала в прямой фотореакции. Импульс II создает на  $S_1$  ППЭ волновой пакет, который движется в область того же  $CI$   $S_1/S_0$  ППЭ [9], где также разделяется на два подпакета, которые переходят на  $S_0$  ППЭ продукта обратной фотоизомеризации,  $P_{498}$ , и исходного состояния,  $Фото_{570}$ . Если задержка импульса II  $t_{II} = 2-3,775$  пс, то обратная фотореакция инициируется из продукта  $Бато_{535}$ . Можно предположить, что обратная фотореакция Р также протекает в когерентном режиме.

В работе было показано, что скорость фотоперехода  $Фото_{570} \rightarrow P_{498}$  при  $t_{II} = 200$  фс сравнима со скоростью прямой фотореакции (Рисунок 6; Таблица 2), что согласуется с теоретическими данными работы [10]. Известно, что *транс*  $\rightarrow$  *цис* фотопереход в ретинале протекает медленнее, чем *цис*  $\rightarrow$  *транс* фотопереход (П. 4.3 и 4.5). Столь высокая скорость обратной фотореакции свидетельствует о том, что конформация

ретиная не успевает сильно измениться при образовании продукта Фото<sub>570</sub>. Согласно теоретическим расчетам [2] С<sub>11</sub>=С<sub>12</sub> связь в этом продукте скручена на 39° в сторону *цис* изомера, что должно сильно облегчить обратную фотореакцию именно по 11-*транс* связи.

Квантовый выход обратных фотореакций Фото<sub>570</sub> → Р<sub>498</sub> и Бато<sub>535</sub> → Р<sub>498</sub> довольно низкий и составляет 0,15. В работе также было показано, что эффективность фотореакции Фото<sub>570</sub> → Р<sub>498</sub> напрямую зависит от динамики волнового пакета в продукте Фото<sub>570</sub> (Рисунок 7). В данном случае эффективность связана с количеством молекул Фото<sub>570</sub>, принявшим участие в обратной фотореакции.

### 4.3 Динамика первичных фотопревращений бактериородопсина

Для описания первичных реакций БР часто применяют модель 3-х состояний, которая предполагает влияние S<sub>2</sub> ППЭ на S<sub>1</sub> ППЭ, что приводит к созданию небольшого барьера (Рисунок 11Б), замедляющего фотореакцию и влияющего на ее когерентный характер. На основании модели 3-х состояний и спектрально-кинетических данных, характеризующих первичные реакции БР (П. 3.3), можно предположить последовательность индуцированных светом событий (Рисунок 11Б, красный цвет), которая имеет много общего с Р. Остановимся на особенностях первичных реакций БР. Первые два процесса, наблюдаемые после поглощения кванта света, отражают динамический сдвиг Стокса, который возникает из-за баллистического движения волнового пакета в возбужденном состоянии в сторону барьера на S<sub>1</sub> ППЭ. Эти процессы связаны с образованием возбужденного состояния, интермедиата I<sub>460</sub>, за время 40 фс и последующей колебательной релаксацией, занимающей ~130 фс. Распад возбужденного состояния по реакционному пути занимает 480 фс, а по нерекционному – 2,4 пс. Процессы колебательной релаксации на стадии J<sub>625</sub> → K<sub>590</sub> перехода завершаются за 1,8 пс.

В процессе прямой фотореакции БР, как и в случае Р, изомеризация ретиная протекает по типу асинхронного движения «велосипедных педалей» с сохранением занимаемого объема в хромофорном центре. При этом изначальное скручивание ретиная по С<sub>13</sub>=С<sub>14</sub> связи на 20° по направлению к 13-*цис* конфигурации [11] сильно облегчает изомеризацию и делает ее такой селективной.

Наличие нескольких путей распада возбужденного состояния, некоторые из которых могут быть нерекционными, в целом характерно для родопсинов 1 типа [12]. Это связывают с разделением путей реакции в ФК состоянии или с исходной гетерогенностью белка. Последнее предположение было подтверждено для натриевого насоса бактерии *Krokinobacter eikastus* [12] и для протонного насоса протеородопсина [13].

### 4.4 Фотохромизм бактериородопсина

В работе была впервые продемонстрирована обратная фотореакция БР, инициированная из первых продуктов прямой фотореакции J<sub>625</sub> и K<sub>590</sub> в диапазоне времени 1–5 пс при комнатной температуре. Строение S<sub>0</sub> и S<sub>1</sub> ППЭ БР (модель 3-х состояний), а также отсутствие побочных продуктов в процессе обратной фотореакции,

позволяет предположить следующую схему ее протекания (Рисунок 11Б, синий цвет), во многом повторяющую схему обратной фотореакции Р. Импульс II, пришедший в образец через  $t_{II} = 1$  пс, инициирует  $S_1 \leftarrow S_0$  переход из интермедиата  $J_{625}$  на правую ветвь той же  $S_1$  ППЭ, которая участвовала в прямой фотореакции. Образованный импульсом II волновой пакет движется вдоль этой ветви вероятно к той же области CI, которая участвует в прямой фотореакции, после чего происходит переход на  $S_0$  ППЭ с образованием как БР<sub>568</sub>, являющегося продуктом этой фотореакции, так и исходного состояния, интермедиата  $J_{625}$ . Поскольку время образования интермедиата  $K_{590}$  составляет 1,8 пс, то импульс II, следующий с задержкой  $t_{II} = 3$  и 5 пс, будет инициировать фотореакцию  $K_{590} \rightarrow$  БР<sub>568</sub>, механизм которой можно описать аналогично.

При образовании интермедиатов  $J_{625}$  и  $K_{590}$  двугранный угол  $C_{13}=C_{14}$  связи поворачивается на  $140^\circ$  (от  $-160^\circ$  до  $-20^\circ$ ) [11]. Таким образом, при инициировании обратной фотореакции ретиналь, как и в случае прямой фотореакции, скручен на  $20^\circ$  по направлению к полностью-*транс* изомеру, что должно облегчить обратную фотореакцию. Вероятно, фотореакция  $J_{625}(K_{590}) \rightarrow$  БР<sub>568</sub> будет протекать быстрее, чем фотореакция БР<sub>568</sub>  $\rightarrow J_{625}$ , поскольку она инициируется из *цис* изомера ретиналя. В работе [14] было показано, что время жизни возбужденного состояния интермедиата  $K_{590}$  составляет  $\sim 100$  фс. Можно предположить, что обратная фотореакция  $J_{625}(K_{590}) \rightarrow$  БР<sub>568</sub> протекает безбарьерно и по своей динамике напоминает прямую фотореакцию Р и БР, содержащего 13-*цис* ретиналь в темно-адаптированном состоянии [15].

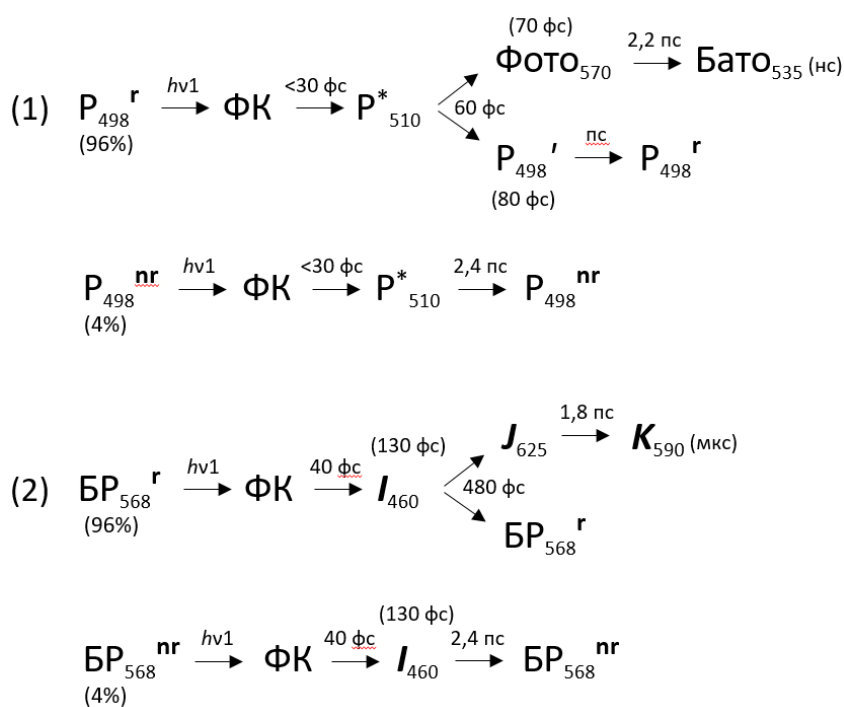
В работе было показано, что эффективность обратной фотореакции  $J_{625} \rightarrow$  БР<sub>568</sub> практически не зависит от времени задержки второго возбуждающего импульса, что связано с отсутствием ярко выраженных когерентных эффектов в интермедиате  $J_{625}$ , образованном в процессе прямой фотореакции, в отличие продукта Фото<sub>570</sub> в случае Р.

Квантовый выход обратной фотореакции  $K_{590} \rightarrow$  БР<sub>568</sub> ( $\phi_4$ ) был рассчитан как часть возбужденных импульсом II молекул ( $t_{II} = 5$  пс), вернувшихся в исходное состояние БР<sub>568</sub>. Он составил  $\phi_4 = 0,81$ , что в целом близко к значениям, полученным ранее методом низкотемпературной спектrophотометрии и время-разрешенной спектроскопии (0,93–0,96) [16].

#### 4.5 Сравнение фотохромных реакций родопсинов 1 и 2 типа на примере бактериородопсина и родопсина

**Сравнение прямых фотореакций бактериородопсина и родопсина.** На основе данных, полученных в настоящей работе (П. 3.1 и 3.3), с учетом литературных данных, можно предложить следующие модельные кинетические схемы (Рисунок 12), описывающие первичные реакции Р и БР. Эти схемы имеют много общего и отражают предположение, что гетерогенность возбужденных состояний исследуемых белков связана с гетерогенностью их начальных состояний. В Р и БР в процессе реакции образуются аналогичные по своим свойствам интермедиаты:  $P^*_{510}$ , Фото<sub>570</sub>, Бато<sub>535</sub> и  $I_{460}$ ,  $J_{625}$ ,  $K_{590}$ , соответственно. Элементарный акт изомеризации ретиналя протекает в возбужденном состоянии путем перехода через CI  $S_1/S_0$  ППЭ, и время этого перехода находится в фемтосекундном диапазоне. Первые продукты с изомеризованным

ретиналем (Фото<sub>570</sub> и J<sub>625</sub>) образуются в основном (S<sub>0</sub>) состоянии и являются колебательно-возбужденными предшественниками следующих продуктов (Бато<sub>535</sub> и K<sub>590</sub>, соответственно), образующихся в масштабе нескольких пикосекунд. На этом этапе завершается изомеризация ретиналя, а в напряженной структуре продуктов Бато<sub>535</sub> и K<sub>590</sub> запасается часть энергии кванта света. Квантовый выход прямых фотореакций Р и БР практически совпадает (~0,65) [16, 17]. Реакция фотоизомеризации ретиналя в Р и БР, как и в других РСБ и в растворе, протекает когерентно, что является внутренним свойством хромофора. Особенностью когерентных реакций является возможность управления ими путем создания различной топологии ППЭ, участвующих в реакции, что активно используется биологическими молекулами РСБ.



**Рисунок 12** – Кинетические схемы прямых фотореакций родопсина (1) и бактериородопсина (2), отражающие гетерогенность исходных состояний этих белков, среди которых можно выделить реакционные (r) и нереакционные (nr) состояния. В скобках приведены времена колебательной релаксации, наблюдаемой при образовании продуктов Фото<sub>570</sub>, P<sub>498</sub>' и интермедиата I<sub>460</sub>

импульсным. В случае БР, как и других родопсинов 1 типа, прямая фотореакция описывается моделью 3-х состояний (S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> и S<sub>2</sub>), постулирующей наличие небольшого барьера на пути распада S<sub>1</sub> возбужденного состояния из-за взаимодействия с S<sub>2</sub> ППЭ, что сильно влияет на динамику реакции. В результате волновому пакету для S<sub>1</sub> → S<sub>0</sub> перехода требуется больше времени (480 фс), чем в случае Р (~60 фс), а различные компоненты волнового пакета сильно теряют свои когерентные свойства. Такой тип динамики называется диффузным.

Конформация ретиналя влияет на динамику фотореакции посредством системы сопряженных π-связей [18], длина которой значительно отличается в полностью-транс-

Основные отличия динамики прямых фотореакций Р и БР связаны со строением S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> и S<sub>2</sub> ППЭ реакционных форм этих белков (Рисунок 11), которое определяется как конформацией ретиналя, так и влиянием специфического белкового окружения на ретиналь. В случае Р, как и других родопсинов 2 типа, прямая фотореакция описывается моделью 2-х состояний (S<sub>0</sub> и S<sub>1</sub>). S<sub>1</sub> → S<sub>0</sub> переход волнового пакета в процессе фотореакции происходит быстро, направленно и безбарьерно с сохранением значительной доли когерентности. Такой тип динамики называется баллистическим или

6-*s-транс* ретинале (родопсины 1 типа) и 11-*цис*-6-*s-цис* ретинале (родопсины 2 типа). Чем больше сопряжение  $\pi$ -связей в основном состоянии ретиналя, тем больше барьер на  $S_1$  ППЭ и тем труднее проходит фотоизомеризация. Нарушение системы  $\pi$ -связей в 11-*цис* и 6-*s-цис* положении приводит к созданию безбарьерной  $S_1$  ППЭ ретиналя и значительному ускорению фотореакции.

На динамику фотореакции РСБ также может влиять различная структура хромофорного центра в основном посредством скручивания ретиналя и изменения положения протонировавшего протона Шиффова основания (ШО). Взаимодействие ретиналя с белком в целом увеличивает скорость и квантовый выход фотореакции по сравнению с наблюдаемыми в газовой фазе и в растворе, а селективность увеличивает до 100%. Можно предположить, что наиболее тонкая регуляция этих параметров осуществляется в родопсинах 2 типа, в которых фотореакция имеет более выраженный когерентный характер. Хромофор-белковые взаимодействия также могут быть причиной возникновения гетерогенности начального состояния белка, поскольку в газовой фазе она не наблюдается [19].

На основе проведенного сравнения можно заключить, что различия в динамике фотохимических реакций родопсинов 1 и 2 типов в основном связаны с различиями исходных изомерных форм их хромофоров, электронные свойства которых оптимизированы посредством взаимодействия с белковым окружением, которое может быть гетерогенным.

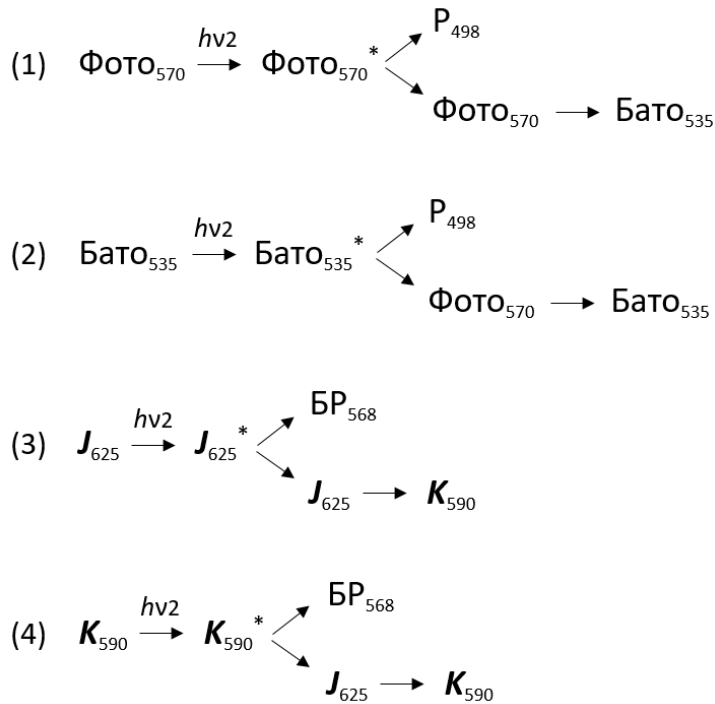
Уменьшение системы сопряженных  $\pi$ -связей в 11-*цис* ретинале по сравнению с *транс* изомером также приводит к сдвигу максимума поглощения белка в синюю область и к увеличению барьера тепловой 11-*цис*  $\rightarrow$  *транс* изомеризации ретиналя. Первый эффект активно используется родопсинами 2 типа как один из факторов для спектральной настройки, а второй эффект имеет большое значение для уменьшения «темнового шума» фоторецепторной клетки, чему также сильно способствует ограниченный объем хромофорного центра. В случае БР и некоторых других родопсинов 1 типа, хромофорный центр достаточно просторный и не препятствует тепловой *транс*  $\rightarrow$  13-*цис* изомеризации, происходящей в процессе темновой адаптации.

Все перечисленные выше особенности 11-*цис* ретиналя могут быть использованы родопсинами 2 типа для создания высокой светочувствительности, что крайне важно для функционирования этих белков, выполняющих фотоинформационную функцию. Возможно именно поэтому 11-*цис* ретиналь был выбран в ходе эволюции в качестве хромофорной группы для родопсинов высших животных.

В рамках теории конвергентной эволюции родопсинов 1 и 2 типа можно предположить, что белковые структуры этих двух групп развивались независимо путем оптимизации электронных свойств хромофорной группы, конформация которой различается, что привело к созданию разных аминокислотных последовательностей. При этом сходство структуры и механизма работы такой сложной биологической структуры может явиться результатом давления отбора при биофизических ограничениях, связанных с общностью выполняемой функции, поскольку в конвергентных структурах общие структурные сходства жизненно важны для функционирования.

В рамках теории дивергентной эволюции предполагается наличие общего предка для родопсинов 1 и 2 типа. Им мог бы быть родопсин 1 типа, который стал использовать 11-цис ретиналь в качестве хромофорной группы, возможно пройдя через стадию потери фоторецепторной функции. При этом оптимизация электронных свойств хромофора, которая влияет на эффективность фотоизомеризации и барьер тепловой изомеризации, также рассматривается как ключевой фактор эволюции родопсинов 2 типа и появления поразительного расхождения аминокислотных последовательностей, наблюдаемого при сравнении с родопсинами 1 типа [18].

**Сравнение обратных фотореакций бактериородопсина и родопсина.** В работе были подробно исследованы обратные фотопереходы из первых продуктов прямой фотореакции Р (Фото<sub>570</sub> и Бато<sub>535</sub>) и БР ( $J_{625}$  и  $K_{590}$ ) в фемто- и раннем пикосекундном масштабе времени (П. 3.2 и 3.4, соответственно), кинетические схемы которых представлены на Рисунке 13. Было высказано предположение, что эти фотопереходы осуществляются с участием тех же  $S_1$  ППЭ и CI, которые участвовали в прямой фотореакции, как представлено на Рисунке 11.



**Рисунок 13** – Кинетические схемы обратных фотореакций родопсина (1 и 2) и бактериородопсина (3 и 4), инициированных из продуктов прямой фотореакции: Фото<sub>570</sub> (1), Бато<sub>535</sub> (2),  $J_{625}$  (3) и  $K_{590}$  (4). Знаком \* отмечены возбужденные ( $S_1$ ) состояния

сравнению с БР является преимуществом, способствующим более надёжному осуществлению прямой реакции, запускающей процесс фототрансдукции.

Поглощение света родопсинами 1 типа в основном служит фотоэнергетической функции, как в случае БР, и обратные фотореакции вполне вероятно не могут существенно повлиять на ее эффективность. Однако в случае родопсинов 2 типа, которые

Несмотря на то, что квантовые выходы прямой фотореакции Р и БР практически совпадают ( $\sim 0,65$ ), квантовые выходы обратных фотореакций из первых фотопродуктов сильно отличаются ( $\sim 0,15$  и  $0,81$ , соответственно). Видимо определяющим фактором является влияние белкового окружения на динамику обратных фотопереходов полностью-транс  $\rightarrow$  11-цис ретиналь в Р и 13-цис  $\rightarrow$  полностью-транс ретиналь в БР, поскольку в растворе метанола эти фотореакции идут с квантовыми выходами, близкими по значению ( $0,14$  и  $0,11$ , соответственно [20]). Можно отметить, что с функциональной точки зрения столь маленький квантовый выход обратной фотореакции Р по

являются G-белок-связывающими рецепторами, 11-*цис* ретиналь действует как эффективный лиганд-антагонист, поддерживающий низкий тепловой «темной шум» фоторецепторной клетки. Поглощение света этими рецепторами инициирует процесс фототрансдукции, и изомеризованный полностью-*транс* ретиналь действует как мощный агонист. В этом случае вероятность возникновения обратной фотореакции может значительно снизить эффективность процесса фототрансдукции. Таким образом, меньшая эффективность обратной фотореакции Р, повышающая надежность прямой фотореакции, может рассматриваться как один из аргументов в пользу отбора в ходе эволюции 11-*цис* изомера в качестве хромофорной группы всех родопсинов 2 типа.

Можно предположить, что фотобиологический механизм преобразования света в информационный процесс в эволюционно более «молодых» зрительных родопсинах (родопсины 2 типа) должен быть надежнее, нежели механизм преобразования света в фотоэнергетический процесс в эволюционно более «древних» микробных родопсинах (родопсины 1 типа), что и отражается в низком значении квантового выхода обратной реакции, протекание которой можно рассматривать как потерю информации. Это свидетельствует о более совершенном строении хромофорного центра Р и выборе в процессе эволюции такого хромофора (11-*цис* ретиналь), взаимодействие с которым позволяет эффективно осуществлять процесс фототрансдукции.

## ВЫВОДЫ

1. В процессе прямой реакции фотоизомеризации 11-*цис* ретиналя в зрительном родопсине волновой пакет достигает области конического пересечения за время ~60 фс. Это позволяет заключить, что к этому времени система переходит из возбужденного в основное состояние первого фотопродукта – Фото<sub>570</sub>.
2. Когерентный характер прямой реакции фотоизомеризации полностью-*транс* ретиналя в бактериородопсине слабо выражен, время протекания реакции составляет 480 фс.
3. Время протекания обратной фотореакции зрительного родопсина из продукта Фото<sub>570</sub> сравнимо со временем протекания прямой фотореакции. Подтверждена гипотеза о влиянии когерентного характера прямой фотореакции зрительного родопсина на эффективность обратной фотореакции из продукта Фото<sub>570</sub>. Квантовый выход обратной фотореакции из продуктов Фото<sub>570</sub> и Бато<sub>535</sub> составляет 0,15.
4. Показана возможность инициирования обратного фотоперехода из продуктов прямой фотореакции бактериородопсина,  $J_{625}$  и  $K_{590}$ , в раннем пикосекундном диапазоне времени. Квантовый выход обратной фотореакции из продукта  $K_{590}$  составляет 0,81.
5. Сравнительный анализ прямых и обратных фотореакций зрительного родопсина и бактериородопсина показал, что зрительному родопсину, в отличие от бактериородопсина, присущи ярко выраженный когерентный характер и высокая скорость прямой фотореакции, а также низкий квантовый выход обратной фотореакции, что повышает надежность и эффективность осуществления основной физиологической функции этого белка – инициации процесса фототрансдукции.



### Список цитируемой литературы

1. Schoenlein, R.W. The first step in vision: Femtosecond isomerization of rhodopsin / R.W. Schoenlein, L.A. Peteanu, R.A. Mathies, et al. // *Science*. – 1991. – V. 254. – P. 412–415.
2. Polli, D. Conical intersection dynamics of the primary photoisomerization event in vision / D. Polli, P. Altoè, O. Weingart, et al. // *Nature*. – 2010. – V. 467. – P. 440–443.
3. Kandori, H. Excited-state dynamics of rhodopsin probed by femtosecond fluorescence spectroscopy / H. Kandori, Y. Futurani, S. Nishimura, et al. // *Chem. Phys. Letters*. – 2001. – V. 334. – P. 271–276.
4. Kandori, H. Absolute absorption spectra of batho- and photorhodopsins at room temperature. Picosecond laser photolysis of rhodopsin in polyacrylamide / H. Kandori, Y. Shichida, T. Yoshizawa // *Biophys. J.* – 1989. – V. 56. – P. 453–457.
5. Johnson, P.J.M. Local vibrational coherences drive the primary photochemistry of vision / P.J.M. Johnson, A. Halpin, T. Morizumi, et al. // *Nat. Chem.* – 2015. – V. 7. – P. 980–986.
6. Warshel, A. Bicycle-pedal model for the first step in the vision process / A. Warshel // *Nature*. – 1976. – V. 260. – N. 5553. – P. 679–683.
7. Lin, S.W. Vibrational assignment of torsional normal modes of rhodopsin: Probing excited-state isomerization dynamics along the reactive C11=C12 torsion coordinate / S.W. Lin, M. Groesbeek, I. van der Hoef, et al. // *J. Phys. Chem. B*. – 1998. – V. 102. – P. 2787–2806.
8. Hou, B. Comparing photoinduced vibrational coherences in bacteriorhodopsin and in native and locked retinal protonated Schiff bases / B. Hou, N. Friedman, M. Ottolenghi, et al. // *Chem. Phys. Lett.* – 2003. – V. 381. – P. 549–555.
9. Strambi, A. Relationship between the excited state relaxation paths of rhodopsin and isorhodopsin / A. Strambi, P.B. Coto, L.M. Frutos, et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – V. 130. – P. 3382–3388.
10. Schapiro, I. The ultrafast photoisomerizations of rhodopsin and bathorhodopsin are modulated by bond length alternation and HOOP driven electronic effects / I. Schapiro, M. N. Ryazantsev, L. M. Frutos, et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – V. 133. – P. 3354–3364.
11. Altoe, P. Aborted double bicycle-pedal isomerization with hydrogen bond breaking is the primary event of bacteriorhodopsin proton pumping / P. Altoe, A. Cembran, M. Olivucci, et al. // *PNAS USA*. – 2010. – V. 107. – N. 47. – P. 20172–20177.
12. Tahara, S. Origin of the reactive and nonreactive excited states in the primary reaction of rhodopsins: pH dependence of femtosecond absorption of light-driven sodium ion pump rhodopsin KR2 / S. Tahara, S. Takeuchi, R. Abe-Yoshizumi, et al. // *J. Phys. Chem. B*. – 2018. – V. 122. – P. 4784–4792.
13. Chang, C.-F. Acid-base equilibrium of the chromophore counterion results in distinct photoisomerization reactivity in the primary event of proteorhodopsin / C.-F. Chang, H. Kuramochi, M. Singh, et al. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2019. – V. 21. – P. 25728–25734.
14. Gai, F. Chemical dynamics in proteins: The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin / F. Gai, K.C. Hasson, J.C. McDonald, et al. // *Science*. – 1998. – V. 279. – P. 1886–1891.
15. Wand, A. Ultrafast photochemistry of light-adapted and dark-adapted bacteriorhodopsin: Effects of the initial retinal configuration / A. Wand, N. Friedman, M. Sheves, et al. // *J. Phys. Chem. B*. – 2012. – V. 116. – P. 10444–10452.
16. Govindjee, R. Quantum efficiency of the photochemical cycle of bacteriorhodopsin / R. Govindjee, S.P. Balashov, T.G. Ebrey // *Biophys. J.* – 1990. – V. 58. – P. 597–608.
17. Kim, J.E. Wavelength dependent cis-trans isomerization in vision / J.E. Kim, M.J. Tauber, R.A. Mathies // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40. – N. 46. – P. 13774–13778.
18. Luk, H.L. Molecular bases for the selection of the chromophore of animal rhodopsins / H.L. Luk, F. Melaccio, S. Rinaldi, et al. // *PNAS USA*. – 2015. – V. 112. – P. 15297–15302.
19. Kiefer, H.V. Intrinsic photoisomerization dynamics of protonated Schiff-base retinal / H.V. Kiefer, E. Gruber, J. Langeland, et al. // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10. – P. 1210.
20. Koyama, Y. Effect of protonation on the isomerization properties of n-butylamine Schiff base of isomeric retinal as revealed by direct HPLC analyses: Selection of isomerization pathways by retinal proteins / Y. Koyama, K. Kubo, M. Komori, et al. // *Photochem. Photobiol.* – 1991. – V. 54. – N. 3. – P. 433–443.

**Публикации по теме диссертации**

**Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:**

- 1) **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.
- 2) 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.
- 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) Медведева А.С. Сравнительное исследование фотохимии микробных 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.
- 5) **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.

**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 Пушинской школы-конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века". Пушино. – 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.