

*На правах рукописи*

**Смитиенко Ольга Александровна**

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

1.5.2. Биофизика

Диссертация

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

научный руководитель –  
доктор биологических наук,  
профессор, академик РАН  
Островский Михаил Аркадьевич

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	9
1.1. Родопсины 1 и 2 типа .....	9
1.2. Зрительный родопсин .....	12
1.2.1. Структура и функции родопсина .....	13
1.2.2. Спектральные свойства родопсина. Спектральная настройка зрительных пигментов .....	16
1.2.3. Процесс фотолиза родопсина .....	18
1.2.4. Первичные реакции родопсина .....	23
1.2.5. Моделирование реакции фотоизомеризации ретиналя в родопсине .....	24
1.3. Бактериородопсин .....	32
1.3.1. Структура молекулы бактериородопсина .....	32
1.3.2. Фотоцикл бактериородопсина .....	33
1.4. Фотохромизм родопсинов 1 и 2 типа .....	37
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	41
2.1. Получение образцов родопсина и бактериородопсина .....	41
2.2. Метод стационарной абсорбционной спектроскопии .....	43
2.3. Метод фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии .....	43
2.3.1. Метод «возбуждение-зондирование» .....	45
2.3.2. Метод «возбуждение-возбуждение-зондирование» .....	50
2.3.3. Условия проведения экспериментов .....	52
2.3.4. Обработка экспериментальных данных .....	52
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ</b> .....	55
3.1. Динамика прямой фотореакции родопсина .....	55
3.1.1. Дифференциальные спектры и кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения родопсина .....	55
3.1.2. Анализ кинетических кривых фотоиндуцированного поглощения родопсина.....	61
3.2. Фотохромизм родопсина .....	66
3.2.1. Обратная фотореакция родопсина, инициированная из первых двух продуктов прямой фотореакции .....	67
3.2.2. Расчет квантового выхода обратной фотореакции родопсина .....	74
3.3. Динамика прямой фотореакции бактериородопсина .....	77

3.4. Фотохромизм бактериородопсина .....	82
3.4.1. Обратная фотореакция бактериородопсина, инициированная из первых двух продуктов прямой фотореакции .....	82
3.4.2. Расчет квантового выхода обратной фотореакции бактериородопсина .....	84
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ</b> .....	85
4.1. Динамика первичных фотопревращений родопсина .....	85
4.1.1. Дифференциальные спектры и кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения родопсина .....	85
4.1.2. Анализ кинетических кривых фотоиндуцированного поглощения родопсина.....	87
4.2. Фотохромизм родопсина .....	91
4.3. Динамика первичных фотопревращений бактериородопсина .....	97
4.4. Фотохромизм бактериородопсина .....	100
4.5. Сравнение фотохромных реакций родопсинов 1 и 2 типа на примере бактериородопсина и родопсина .....	102
4.5.1. Сравнение прямых фотореакций бактериородопсина и родопсина .....	102
4.5.2. Сравнение обратных фотореакций бактериородопсина и родопсина .....	112
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	115
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	119
<b>БЛАГОДАРНОСТИ</b> .....	120
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ</b> .....	121
<b>СПИСОК ТЕРМИНОВ</b> .....	123
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	124

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Родопсины или ретинальсодержащие белки (РСБ) – это светочувствительные трансмембранные белки, представленные во всех доменах живых организмов [1]. 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 (микробальные родопсины), характерные для бактерий, архей и низших эукариот, и 2 типа (родопсины животных), характерные для высших животных [2, 3]. 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 [4, 5]. 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 запасания 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 [4]. 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 [6, 7]. При этом обратные фотопереходы инициируются из продуктов прямой фотореакции, образованных в микро- и миллисекундном диапазоне времен [8–11]. Изучение фотохромных реакций с разных этапов фотопреобразования является одним из экспериментальных подходов к изучению механизма фотохимической реакции и последующих процессов темновой релаксации РСБ [12–17]. 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 спектрофотометрии 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 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.

#### **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 Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века», Пущино (2015); VI Съезде биофизиков России, Сочи (2019).

### **Финансовая поддержка работы**

Работа поддержана Программами фундаментальных исследований Президиума РАН "Теоретическое и экспериментальное изучение природы химической связи и механизмов важнейших химических реакций и процессов" (Программа 1 ОХНМ РАН) и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов» (Программа № 24), а также грантами РФФИ: 12-04-00844-а и 15-04-05816-а.

### **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.



## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Родопсины 1 и 2 типа

Родопсины или РСБ – это светочувствительные мембранные белки, представленные во всех доменах живых организмов – бактериях, археях и эукариотах [1]. По степени гомологии аминокислотной последовательности, а также по структуре и выполняемым функциям, родопсины разделяются на две большие группы – родопсины 1 типа (или микробные родопсины), характерные для бактерий, архей и низших эукариот, и родопсины 2 типа (или родопсины животных), характерные для высших животных [2, 3]. Наличие хромофорной группы ретиналя позволяет родопсинам поглощать свет не только в ультрафиолетовом, но и видимом диапазоне спектра, энергия которого затем используется для выполнения различных функций.

Родопсины 2 типа в большинстве случаев представляют собой специализированные G-белок-связывающие рецепторы животных, которые обеспечивают в основном фотоинформационные функции, основная из которых – зрительная, как, например, у Р. К незрительным родопсинам можно отнести меланопсин, нейропсин, энцефалопсин, перопсин, фотоизомеразу и другие, функции которых связаны с циркадными ритмами, восприятием рассвета/заката, определением горизонта, сужением зрачка, изменением цвета тела, сезонным размножением и катализом фотоизомеризации ретиналя [3–5].

Известные в настоящее время родопсины 1 типа гораздо более разнообразны по выполняемым функциям. Кроме фотоинформационной функции, которую выполняют сенсорные родопсины, а также катионные ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  и другие) и анионные ( $\text{Cl}^-$ ) каналы, в микробных родопсинах немного представлена фотоэнзиматическая функция и широко представлена фотоэнергетическая функция (простейший фотосинтез), которую осуществляют ионные насосы ( $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ ) [18, 19]. К протонным насосам относятся бактериородопсины, протеородопсины, ксантородопсины, ксенородопсины и другие. К натриевым насосам относится родопсин бактерии *Krokinobacter eikastus* (KR2) [20] и его гомологи. К хлорным насосам относится группа галородопсинов.

БР является первым открытым [21] и наиболее изученным в настоящее время микробным родопсином (Пункт 1.3.), в то время как Р, открытый более 140 лет назад [22], – наиболее изученный родопсин 2 типа (Пункт 1.2.). Эти два белка в течение многих лет являются модельными системами для изучения всего класса РСБ, а также, в случае Р, G-белок-связывающих рецепторов.

Родопсины 1 и 2 типа, за исключением ферментативных микробных родопсинов, имеют одинаковую архитектуру апобелка опсина, представленную семью трансмембранными

(ТМ)  $\alpha$ -спиралями, с N- и C-концами, обращенными наружу и внутрь клетки, соответственно [2]. Но у родопсинов 2 типа, в отличие от родопсинов 1 типа, некоторые ТМ спирали имеют перегиб, цитоплазматические петли более длинные, есть дополнительная восьмая примембранная  $\alpha$ -спираль, а также присутствуют некоторые другие отличия. Ретиналь, альдегид витамина А, ковалентно связанный с аминокислотным остатком (а.о.) лизина в седьмой  $\alpha$ -спирали посредством связи Шиффова основания (ШО), является хромофорной группой, общей для всех родопсинов. Также, для всех родопсинов характерно наличие а.о. триптофана и тирозина (W265 и Y268 в случае Р), фиксирующих положение ретиналя в хромофорном центре. ШО ретиналя в большинстве случаев протонировано (ПШО), и изменения в состоянии протонирования являются неотъемлемой частью сигнальной или транспортной активности родопсинов. Протон ШО координируется отрицательно заряженным противоионом, который у микробных родопсинов часто имеет сложное строение и включает несколько а.о. и одну/несколько молекул воды. Взаимодействие с противоионом во многом определяет спектральную настройку родопсинов и механизм функционирования.

В основе функционирования родопсинов лежит фотохимическая реакция изомеризации ретиналя, которая протекает в фемтосекундном диапазоне времени и запускает более медленные темновы́е процессы, происходящие в масштабе микро- и миллисекунд и связанные с изменением конформации всего белка. Эти процессы протекают постадийно путем образования определенных промежуточных продуктов или интермедиатов, которые у родопсинов 1 и 2 типа имеют много общего. В случае микробных родопсинов полностью-*транс* ретиналь фотоизомеризуется в 13-*цис* форму, а в случае родопсинов 2 типа 11-*цис* ретиналь фотоизомеризуется в полностью-*транс* форму [3]. Для некоторых родопсинов архей, например, БР и сенсорного родопсина цианобактерии *Anabaena sp.* (ASR) характерны темноадаптированные (ТА) и светоадаптированные (СА) состояния, при образовании которых полностью-*транс* ретиналь может осуществлять темновы́й или фотопереход в стабильную 13-*цис* форму и обратно, что служит для регуляции процесса функционирования белка [23–26]. В случае Р объем внутрибелковой полости для встраивания ретиналя (хромофорного центра) настолько ограничен, что не позволяет осуществлять тепловую изомеризацию. Это крайне важно для функционирования Р как фоторецептора, поскольку практически исключает «темновы́й шум».

Запасание энергии кванта света в РСБ происходит в результате образования напряженной структуры изомеризованного ретиналя, испытывающего стерические затруднения в хромофорном центре, которые, в случае родопсинов 1 типа, сопровождаются изменением структуры водородных связей в области ПШО ретиналя. Эти фотоиндуцированные (ф/и) изменения происходят при образовании первичных продуктов, спектры поглощения которых

смещены в красную область по сравнению с исходным состоянием белка. В большинстве родопсинов 1 типа эти продукты называются *J* и *K*, а в большинстве родопсинов 2 типа – фотородопсин и батородопсин. Дальнейшая релаксация хромофора и его ближайшего аминокислотного окружения запускает глобальные структурные изменения белка, необходимые для его функционирования. Для многих родопсинов 1 и 2 типа такие изменения сопровождаются депротонированием ПШО ретиналя на стадии образования интермедиата *M* или метародопсина *П*, соответственно. Эти интермедиаты являются ключевыми для функционирования большинства РСБ.

Хотя реакция фотоизомеризации является общей для родопсинов 1 и 2 типа, конечная стадия фотоактивируемых процессов различается. В родопсинах 1 типа 13-*цис* ретиналь на одной из последних стадий претерпевает тепловую изомеризацию обратно в полностью-*транс* форму, замыкая фотоактивируемые процессы в фотоцикл. В родопсинах беспозвоночных полностью-*транс* ретиналь возвращается в исходную 11-*цис* форму путем поглощения второго кванта света, что делает работу этих белков цикличной, как и в случае родопсинов 1 типа. В родопсинах позвоночных изомеризованный полностью-*транс* ретиналь высвобождается из зрительного пигмента, что называется «фотообесцвечиванием» или фотолизом родопсина. Для дальнейшей работы белка требуется его регенерация с ретиналем в 11-*цис* форме.

Наиболее консервативный домен у каждого из двух типов родопсинов – это хромофорный центр, который у микробиальных и животных родопсинов несколько отличается. При этом даже незначительные изменения в структуре хромофорного центра, в аминокислотном окружении ретиналя и в изомерной форме самого ретиналя самым существенным образом меняют спектральные, фотохимические и ряд других функционально важных свойств молекулы. Родопсины как светочувствительные молекулы представляют собой идеальную модель для исследования и понимания механизма фотохимической реакции изомеризации вообще.

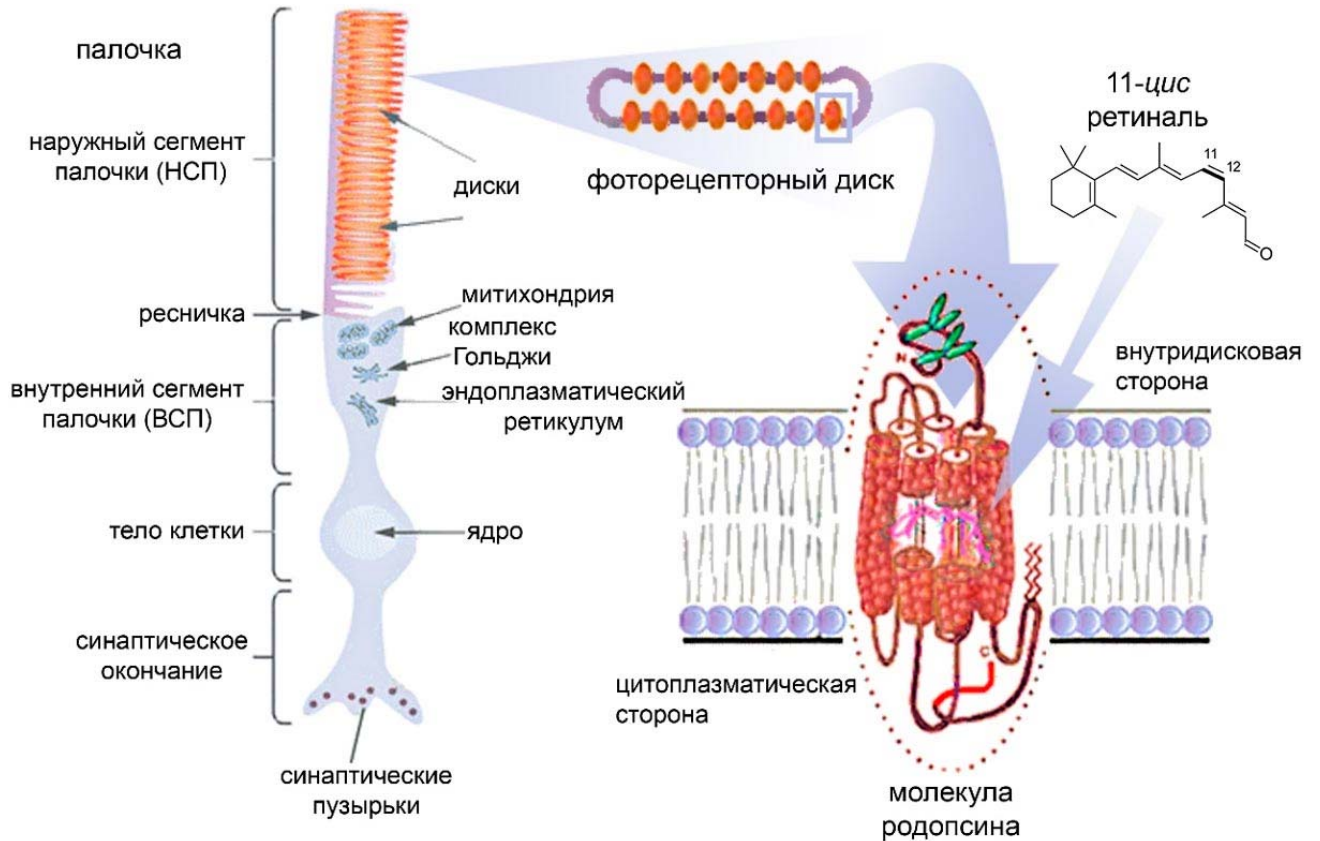
Интересно отметить тот факт, что несмотря на ряд общих черт в строении и механизме функционирования родопсинов 1 и 2 типа, между этими двумя группами, в частности между БР и Р, нет гомологии аминокислотной последовательности [2, 3]. Это позволяет предположить независимое происхождение родопсинов 1 и 2 типа и последующую конвергентную (независимую) эволюцию, определяемую их физиологическими функциями и специфическими взаимодействиями белок-ретиналь. Удивительно, что в ходе такой конвергентной эволюции структура хромофорного центра, топография и фотоактивируемые изменения белков оказались похожими [5]. Некоторые исследователи, как экспериментально [27, 28], так и теоретически [29, 30], пытаются доказать наличие общего предка для родопсинов 1 и 2 типа и их дальнейшую дивергентную эволюцию. В качестве общего предка предполагается некий родопсин 1 типа,

способный функционировать на основе 11-*цис* ретиналя, как один из родопсинов археи *Haloquadratum walsbyi* [31], или временно потерявший фоторецепторную функцию, как большая группа родопсинов грибов, не имеющих а.о. лизина для присоединения ретиналя и, соответственно, не встраивающих ретиналь [32]. Учитывая спорное происхождение родопсинов 1 и 2 типа, сравнение динамики фотоизомеризации ретиналевого хромофора в родопсинах животного и микробного происхождения, в том числе сравнение их прямой и обратной фотореакций, с точки зрения молекулярной эволюции РСБ представляет существенный интерес.

Открытие канального родопсина в одноклеточных и колониальных зеленых водорослях в 2001 году [33] дало начало новому направлению в биологии – оптогенетике [34], которое бурно развивается и в настоящее время рассматривается как контроль различных биологических процессов с помощью света. Микробные родопсины, такие как протонные, хлорные и натриевые помпы, натриевые и хлорные каналы, а также мутанты и химеры этих белков, активно рассматриваются для использования в оптогенетике [19], поскольку в ответ на световой сигнал они могут деполяризовать или гиперполяризовать мембрану нервных клеток-мишеней, то есть, активировать или подавить распространение нервного импульса, соответственно, что используется, например, в терапевтических целях или с целью изучения работы мозга. Родопсины с энзиматической функцией могут быть использованы для фотозависимого изменения концентрации циклических нуклеотидов. Родопсины 2 типа также рассматриваются для применения в оптогенетике [35]. Химические сигналы, такие как гормоны и нейротрансмиттеры, обычно активируют каскады, опосредованные G-белком, и модулируют различные аспекты клеточной физиологии. Следовательно, применение различных родопсинов животных в оптогенетике может дать возможность контролировать различные клеточные функции с помощью света. Таким образом, исследование РСБ имеет большое значение не только для понимания их работы, но и для использования в оптогенетике.

## 1.2. Зрительный родопсин

Процесс зрительной рецепции у позвоночных животных происходит в фоторецепторных клетках сетчатки глаза – палочках и колбочках. Колбочки работают при средних и высоких интенсивностях света и ответственны за цветовое зрение. Палочки, обеспечивающие сумеречное зрение, напротив, работают при низкой освещенности и способны детектировать даже одиночный квант света [36]. Палочки и колбочки различаются морфологическими особенностями и содержащимися в них зрительными пигментами. Р располагается в мембранах фоторецепторных дисков наружного сегмента палочки (НСП) (Рисунок 1.1). Именно здесь происходит поглощение света и начинается процесс фототрансдукции.



**Рисунок 1.1** – Схематичное изображение палочки, фоторецепторного диска наружного сегмента палочки и молекулы родопсина, в центре которой находится 11-цис ретиналь

Роль Р в процессе зрительной фототрансдукции заключается в эффективном поглощении кванта света и в запуске системы ферментативного каскада в фоторецепторной клетке.

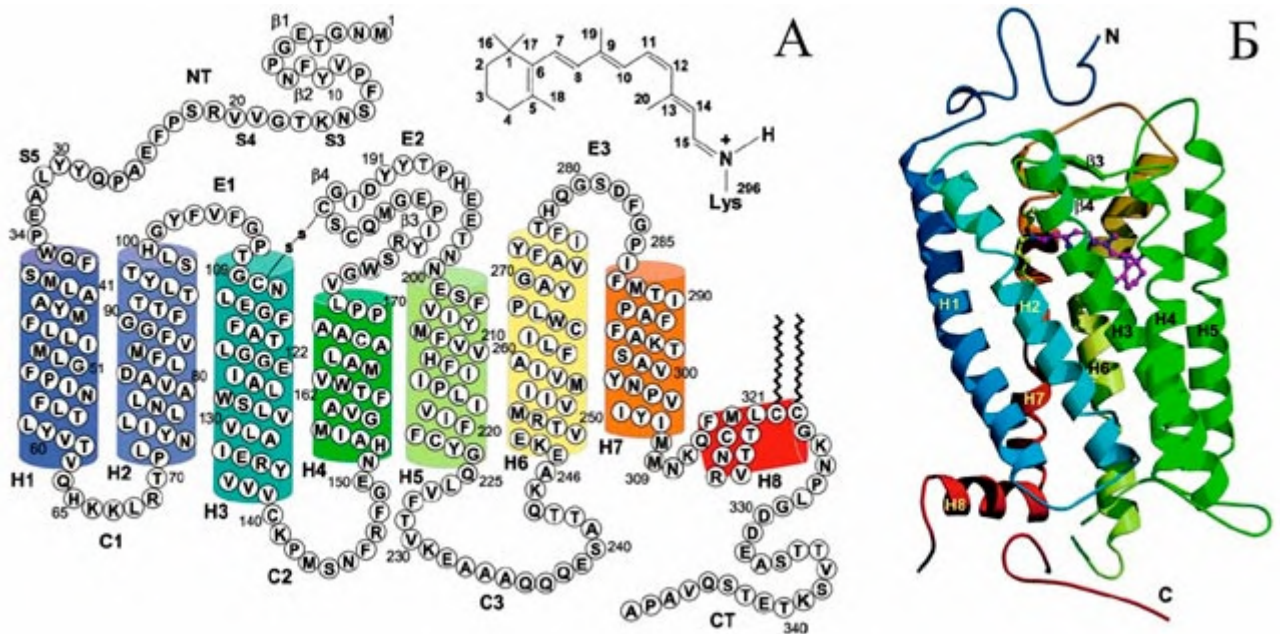
### 1.2.1. Структура и функции родопсина

Р представляет собой мембранный белок, хромогликопротеид, состоящий из белковой части опсина, хромофорной группы 11-цис ретиналя, двух олигосахаридных цепочек и двух остатков пальмитиновой кислоты. Молекулярная масса Р составляет 40 кДа, полипептидная цепь белка состоит из 348 а.о. Строение молекулы Р и его расположение в фоторецепторной мембране показано на Рисунках 1.1 и 1.2.

Этот зрительный пигмент стал первым мембранным белком животного происхождения, полная аминокислотная последовательность которого была расшифрована в начале 80-х годов группой Овчинникова [37], а трехмерная структура была определена впервые в 2000 году с разрешением 2,8 Å [38] и позднее в 2004 году с разрешением 2,2 Å [39].

Р, как типичный представитель семейства рецепторов, сопряженных с G-белками, которые осуществляют жизненно важные сигнальные функции, состоит из семи ТМ α-спиралей (Н1-Н7)

(Рисунок 1.2). У него также есть восьмая примембранная  $\alpha$ -спираль (H8). Хромофорная группа ковалентно связана с  $\epsilon$ -аминогруппой K296 через ПШО в седьмой  $\alpha$ -спирали [40, 41].



**Рисунок 1.2** – А – двумерная структура опсина [37] и структура хромофора родопсина – 11-*цис* ретиналя, соединенного с K296 посредством связи протонированного Шиффова основания. Б – трехмерная структура родопсина [38].  $\alpha$ -спирали обозначены H1–H8, цитоплазматические петли – C1–C3, а внутридисковые петли – E1–E3

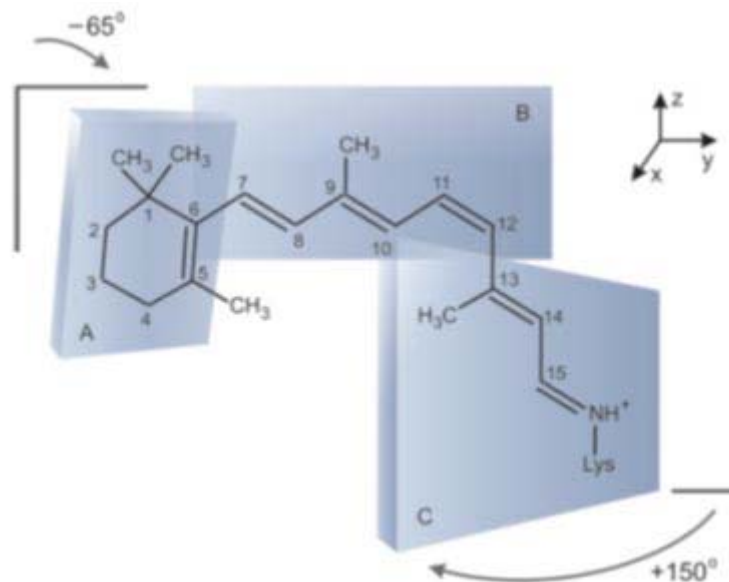
Внутридисковый домен молекулы Р состоит из N-концевого участка полипептидной цепи и трех петель (E1–E3), соединяющих трансмембранные спирали. N-концевой участок гликозилирован по а.о. D2 и D15. Олигосахаридные цепочки участвуют в биосинтезе и транспорте опсина в базальные диски НСП, препятствуют флип-флоп переходу молекулы Р в жидкой дисковой мембране, а также участвуют в фагоцитозе старых дисков клетками пигментного эпителия [42].

В состав цитоплазматического домена входят три петли (C1–C3), соединяющие трансмембранные  $\alpha$ -спирали,  $\alpha$ -спираль H8, а также С-конец опсина. К двум а.о. цистеина спирали H8 присоединены остатки пальмитиновой кислоты, которые погружены в мембрану (Рисунки 1.1 и 1.2А). Цитоплазматический домен Р участвует во взаимодействии с G-белком (трансдуцином) – на свету в ходе фотолиза Р на стадии образования метародопсина I и метародопсина II (Пункт 1.2.3.) открывается активный центр связывания с трансдуцином [43].

Хромофором Р является ретиналь<sub>1</sub> – альдегид витамина А<sub>1</sub> (Рисунки 1.1 и 1.2). Он состоит из метилированной полиеновой цепи, оканчивающейся альдегидной группой с одной стороны и  $\beta$ -иононовым кольцом с другой. В состав зрительных пигментов всех животных (родопсинов 2 типа) входит только одна из его изомерных форм, а именно 11-*цис* ретиналь с  $\beta$ -иононовым

кольцом в *6-s-цис* положении [38, 44]. Некоторые а.о. трансмембранных спиралей и петель между спиральями создают специальную полость или хромофорный центр для *11-цис* ретиналя и регулируют его спектральные свойства, а также участвуют во внутримолекулярных взаимодействиях, которые контролируют третичную структуру белка и динамику его ф/и изменений [36].

Взаимодействие опсина с молекулой хромофора осуществляется с помощью химических связей трех типов. Ковалентная связь ПШО образуется при взаимодействии карбонильной группы ретиналя с остатком K296. Ионная связь образуется между протоном ШО и противоионом E113, в этом взаимодействии также участвуют молекулы воды (W2a и W2b) и а.о. E181 и S186 посредством системы водородных связей, а также некоторые другие а.о. [38, 44, 45]. Гидрофобная связь образуется между  $\beta$ -иононовым кольцом и гидрофобным участком опсина (ароматическим кластером), важную роль в этом взаимодействии играют а.о. W265 и Y268 [46]. Как показал рентгеноструктурный анализ [39], важная часть хромофорного центра образована двумя  $\beta$ -слоями ( $\beta_3$  и  $\beta_4$ ), входящими в состав внутридисковой петли E2, соединяющей  $\alpha$ -спирали H4 и H5. От  $\beta_3$ -слоя отходит а.о. E181, который ориентирован в сторону центральной части полиеновой цепи ретиналя и играет важную роль в функционировании белка. Благодаря взаимодействию с а.о. опсина в хромофорном центре *11-цис* ретиналь, в отличие от ретиналя в растворе, имеет не планарную, а сильно скрученную и напряженную конформацию (Рисунок 1.3), что способствует его быстрой и эффективной фотоизомеризации.



**Рисунок 1.3** – Трехмерная структура *11-цис-6-s-цис* ретиналя в хромофорном центре родопсина, рассчитанная на основе исследований, проведенных методом ЯМР при  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  [47]

В Р наблюдается сильное электростатическое взаимодействие между 11-*цис* ретиналем и а.о. хромофорного центра [48, 49]. Кроме того, предполагается, что важную роль в поддержании скрученной напряженной конформации 11-*цис* ретиналя в темновом неактивном состоянии зрительного пигмента играет ароматический кластер [50, 51]. Это сильное взаимодействие может быть причиной отсутствия темнов́ой изомеризации ретиналя, которая наблюдается, например, в БР в процессе темнов́ой адаптации [52].

Фотоизомеризация ретиналя – основная физиологическая функция 11-*цис* ретиналя как хромофорной группы. Это сверхбыстрая и высокоэффективная реакция, протекающая за время менее 100 фс [53–55] с квантовым выходом 0,65 [56], приводит к инициации процесса фототрансдукции. Еще одной важной функцией ретиналя является его участие в спектральной настройке зрительных пигментов (Пункт 1.2.2.).

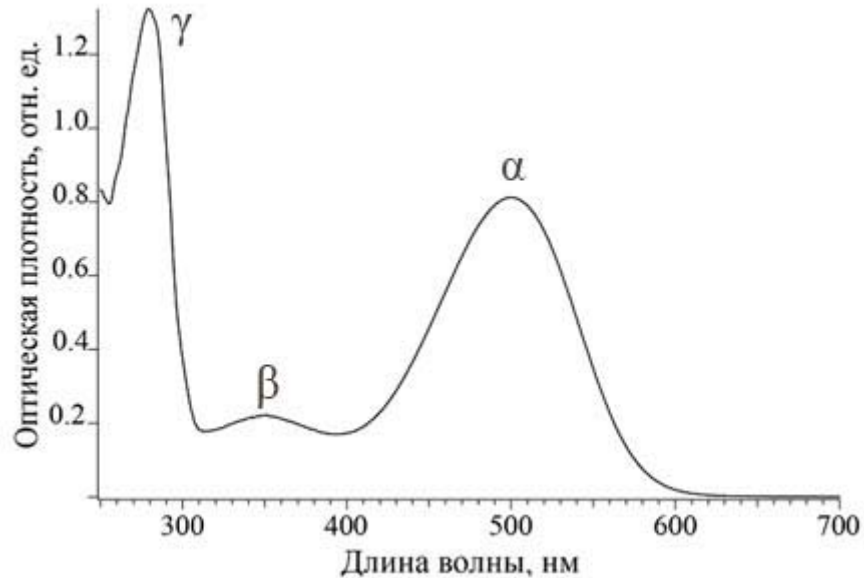
### ***1.2.2. Спектральные свойства родопсина. Спектральная настройка зрительных пигментов***

Спектр поглощения Р в ультрафиолетовой и видимой областях содержит три полосы:  $\alpha$  ( $\lambda_{\max} = 498$  нм),  $\beta$  ( $\lambda_{\max} = 350$  нм) и  $\gamma$  ( $\lambda_{\max} = 280$  нм) (Рисунок 1.4). Полосы  $\alpha$ - и  $\beta$ - определяются поглощением ретиналя, а  $\gamma$ -полоса обусловлена в основном поглощением ароматических а.о. белка – триптофана, тирозина и фенилаланина. Фоточувствительность Р крайне высока, поскольку молярный коэффициент экстинкции в максимуме  $\alpha$ -полосы поглощения составляет  $40600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Именно  $\alpha$ -полоса Р определяет кривую видности палочкового сумеречного зрения. По соотношению поглощения ароматических а.о. белка ( $\gamma$ -полосы) и ретиналя ( $\alpha$ -полосы) судят о степени очистки Р в суспензии фоторецепторных мембран ( $A_{280}/A_{500} = 2,0\text{--}2,3$ ) и детергентном экстракте ( $A_{280}/A_{500} = 1,6\text{--}1,7$ ) [57–59].

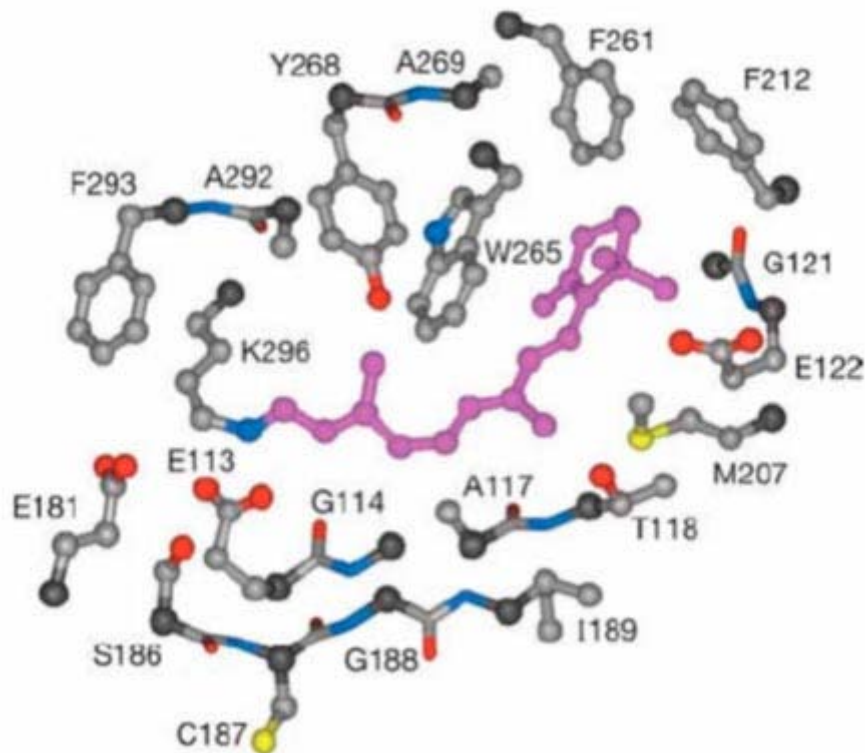
Максимум поглощения Р зависит от расстояния между  $S_0$  и  $S_1$  поверхностями потенциальной энергии (ППЭ) для  $\pi$ - $\pi$  перехода, индуцируемого при поглощении кванта света молекулой ретиналя. Энергия перехода определяется  $\pi$ -конъюгированной полиеновой цепью ретиналя и влиянием на нее ближайшего белкового окружения, а также протонированием ШО. Спектр поглощения 11-*цис* ретиналя в Р ( $\lambda_{\max} = 498$  нм) сдвинут в более длинноволновую область по сравнению со спектром поглощения свободного 11-*цис* ретиналя, ШО и ПШО 11-*цис* ретиналя в растворе (например, в метаноле  $\lambda_{\max} = 380, 360$  и  $440$  нм, соответственно) [60, 61] и в более коротковолновую область по сравнению с ПШО ретиналя в газовой фазе ( $\lambda_{\max} \approx 610$  нм) [62, 63]. Этот сдвиг определяется: (1) образованием ковалентной связи ПШО ретиналя с белком; (2) скрученной конформацией хромофора, которую он принимает в ограниченном объеме хромофорного центра, в том числе 6-*s-цис* положением  $\beta$ -иононового кольца; (3) влиянием



противоиона E113, связанного через систему водородных связей с некоторыми другими а.о. и молекулами воды; (4) влиянием некоторых окружающих ретиналь заряженных и полярных а.о. [41, 64] (Рисунок 1.5).



**Рисунок 1.4** – Стационарный спектр поглощения родопсина в составе детергентного экстракта



**Рисунок 1.5** – Хромофорный центр родопсина, представленный аминокислотными остатками, находящимися на расстоянии 5 Å от 11-*цис* ретиналя [65]

В общем виде можно сказать, что диапазон поглощения зрительных пигментов определяется: (1) природой хромофорной группы; (2) ковалентными и нековалентными (стерическими, ионными и поляризационными) взаимодействиями хромофорной группы с белковой частью молекулы – опсином. Опсины фоторецепторов различных видов беспозвоночных и позвоночных животных отличаются аминокислотной последовательностью, за исключением консервативных участков, которые в основном находятся в хромофорном центре молекулы. Кроме 11-*цис* ретиналя<sub>1</sub>, определяющего принадлежность фоторецепторных белков к классу родопсинов, в качестве хромофорной группы встречается также 11-*цис* дегидроретиналь<sub>2</sub>. Белки, содержащие ретиналь<sub>2</sub>, входят в класс порфиропсинов, спектры поглощения которых часто расположены в более длинноволновой области спектра.

Небольшие изменения в строении хромофорного центра зрительных пигментов могут привести к существенному изменению электронной структуры ретиналя [66] и, соответственно, к широкому разбросу положения максимумов спектров поглощения от ультрафиолетовой ( $\lambda_{\text{макс}} = 360$  нм) до красной ( $\lambda_{\text{макс}} = 620$  нм) области [67]. Так, например, родопсин палочек сетчатки человека имеет максимум спектра поглощения  $\lambda_{\text{макс}} = 498$  нм, а в трех типах колбочек (сине-, зелено- и красночувствительных) содержится три типа зрительных пигментов с максимумами спектра поглощения в синей ( $\lambda_{\text{макс}} = 420$  нм), зеленой ( $\lambda_{\text{макс}} = 531$  нм) и красной ( $\lambda_{\text{макс}} = 558$  нм) областях видимого спектра, соответственно. Благодаря спектральной настройке зрительных пигментов живые организмы имеют возможность приспосабливаться к различным световым условиям обитания.

### 1.2.3. Процесс фотолиза родопсина

При освещении Р обесцвечивается, теряет свой пурпурный цвет и становится желтоватым. Именно это наблюдение на изолированной сетчатке лягушки и привело Франца Болля (1876 г.) к открытию светочувствительного вещества сетчатки, названного потом родопсином.

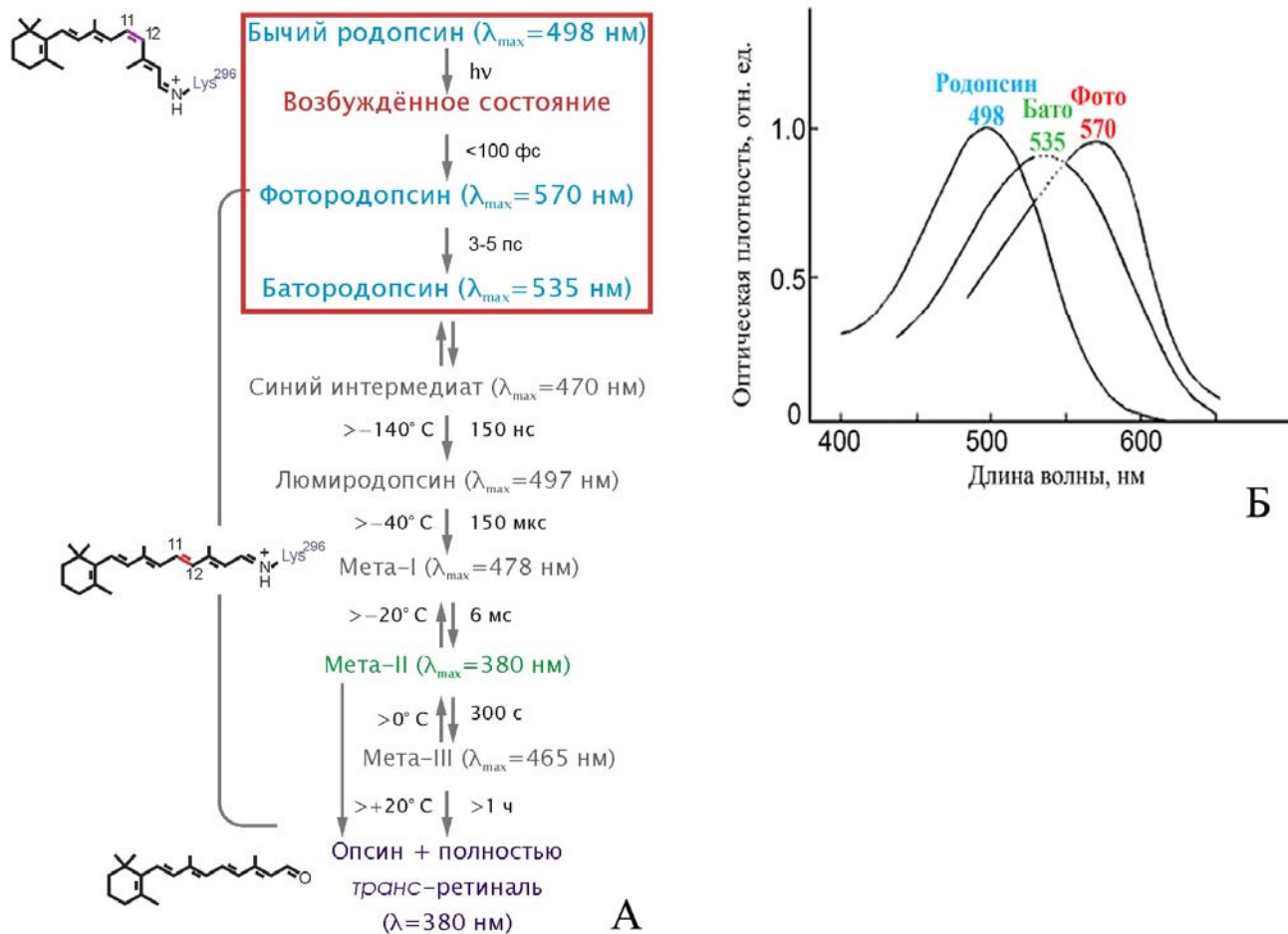
Фотопревращение, или фотообесцвечивание, Р включает собственно фотохимическую реакцию и последующие темновые процессы. В отличие от фотоцикла БР и фотопревращений зрительного родопсина беспозвоночных, зрительный пигмент позвоночных претерпевает при действии света необратимые превращения, или фотолиз. После *цис* → *транс* фотоизомеризации ретиналя происходит гидролиз связи ШО ретиналя с опсином, и ретиналь в полностью-*транс* форме высвобождается из молекулы Р и фоторецепторной клетки. Промежуточные состояния этого процесса были идентифицированы при помощи спектроскопии видимой области, поскольку положение  $\alpha$ -полосы поглощения хромофорной группы Р чувствительно к конформационным изменениям белка, которые происходят в процессе фотолиза (Рисунок 1.6).

Для обнаружения первичных продуктов фотолиза сначала был использован метод низкотемпературной спектрофотометрии [40, 68], который позволяет снижать скорость тепловых реакций. Затем развитие лазерных методов позволило непосредственно исследовать динамику таких процессов при комнатной температуре. Благодаря спектроскопии высокого временного разрешения удалось обнаружить новый короткоживущий продукт в фемто- и раннем пикосекундном диапазоне времен [69], названный фотородопсином (Фото<sub>570</sub>).

На Рисунке 1.6А представлена последовательность образования промежуточных продуктов фотолиза Р с характерными временами образования и максимумами  $\alpha$ -полосы поглощения, которым соответствуют определенные состояния белка и хромофора. На Рисунке 1.6А также приведены максимальные температуры, при которых наблюдались эти интермедиаты при помощи метода низкотемпературной спектрофотометрии.

Поглощение кванта света видимого диапазона переводит молекулу Р в возбужденное состояние  $S_1$ . Дальнейший переход в основное состояние  $S_0$  может происходить за счет фотохимической реакции, процесса внутримолекулярной безызлучательной конверсии (тепловой дезактивации  $S_1$ ) и флуоресценции. В молекуле Р при релаксации возбужденного состояния наиболее вероятным процессом является фотохимическая реакция изомеризации 11-*цис* ретиналя с образованием полностью-*транс* ретиналя. Аналоги Р, содержащие хромофор в заблокированном 11-*цис* положении, не образуют соответствующих фотопродуктов, что доказывает первичность *цис*  $\rightarrow$  *транс* изомеризации в процессе зрения [70]. Данные об изменении дипольного момента перехода в процессе образования первых фотопродуктов Р [71] и результаты низкотемпературной Рамановской спектроскопии также доказывают это предположение [72].

Фотоизомеризация в Р осуществляется с высоким квантовым выходом 0,65 [56], в то время как квантовый выход фотоизомеризации свободного ПШО 11-*цис* ретиналя в растворе в среднем составляет 0,1–0,23 [60, 73]. *Цис*  $\rightarrow$  *транс* переход в Р совершается за фантастически короткое время 50–100 фс [55, 74–76], а первый продукт, Фото<sub>570</sub>, полностью образуется к 200 фс после поглощения кванта света [53, 69]. В то же время фотоизомеризация свободного ПШО 11-*цис* ретиналя в вакууме протекает за время 400 фс [77], а в растворе – за 100–600 фс [78, 79], что в целом медленнее, чем в белке. Таким образом, белковое окружение хромофора сильно влияет на динамику фотохимической реакции, делая ее более быстрой и эффективной. Это влияние осуществляется посредством стерических, электростатических, водородных и гидрофобных взаимодействий ретиналя с ближайшим белковым окружением в хромофорном центре. Таким образом осуществляется белковый контроль (белковый катализ) процесса фотоизомеризации.



**Рисунок 1.6** – А – Схема фотолитического цикла родопсина. Первичные стадии фотолитического цикла заключены в рамку. Б – Спектры поглощения родопсина, фотородопсина и батородопсина. Рисунок модифицирован из работы [80]

По данным рентгеноструктурного анализа объем хромофорного центра Р составляет всего  $660 \text{ \AA}^3$ , а поверхность взаимодействия 11-*цис* ретиналя с белковым окружением –  $\sim 230 \text{ \AA}^2$  [81]. Таким образом, тесное белковое окружение 11-*цис* ретиналя не только не препятствует, а наоборот, активно способствует ускорению и повышению эффективности процесса ф/и изменения геометрии хромофорной группы. Еще предстоит выяснить механизм такого хромофор-белкового взаимодействия.

Первый продукт с изомеризованным ретинолом, Фото<sub>570</sub>, был обнаружен только при помощи метода пикосекундной лазерной спектроскопии [69], стабилизировать этот продукт при низкой температуре не удалось. Его максимум поглощения сдвинут в длинноволновую область по сравнению с темновым состоянием Р (Р<sub>498</sub>) (Рисунок 1.6Б) [80], поскольку Фото<sub>570</sub> содержит полностью-*транс* ретинол со скрученной напряженной структурой, но с более длинной системой сопряженных  $\pi$ -связей, чем 11-*цис* изомер.

Следующий продукт батородопсин (Бато<sub>535</sub>), образующийся из Фото<sub>570</sub>, был впервые обнаружен при низкотемпературных исследованиях Р (-186 °С) как фотопродукт со спектром поглощения, смещенным в красную область ( $\lambda_{\max} = 543$  нм) [82]. При комнатной температуре максимум спектра поглощения этого продукта составляет 535 нм (Рисунок 1.6Б). Характерное время образования Бато<sub>535</sub> составляет 3 пс [53, 83]. В ограниченном объеме хромофорного центра продукта Бато<sub>535</sub> находится полиеновая цепь полностью-*транс* ретиналя в скрученной конформации, но в менее напряженной, чем в продукте Фото<sub>570</sub>. При этом вблизи ПШО ретиналя происходят небольшие смещения некоторых а.о. и молекул воды. Все эти изменения конформации молекулы Р, происходящие на стадиях образования продуктов Фото<sub>570</sub> и Бато<sub>535</sub>, приводят к запасанию около 60% энергии поглощенного кванта света (~35 ккал/моль), что было показано калориметрическими исследованиями [84]. Таким образом, роль сверхбыстрой реакции фотоизомеризации состоит в том, чтобы перевести поглощенную энергию кванта света в свободную химическую энергию, запасаемую в молекуле Р в виде сильно скрученной конформации хромофорной группы. Эта запасенная энергия в дальнейшем расходуется на гораздо более медленные структурные перестройки в белковой части молекулы, что позволяет на стадии образования одного из последующих промежуточных продуктов метародопсина II активировать G-белок трансдуцин.

Реакции Р, протекающие в молекуле в первые фемто- и пикосекунды после поглощения кванта света (Рисунок 1.6А, красная рамка), называются первичными (Пункт 1.2.4.) и являются наиболее интересными с фотохимической точки зрения, поскольку именно на этих стадиях происходит преобразование энергии кванта света в химическую энергию конформационных перестроек белка.

Бато<sub>535</sub> при комнатной температуре в течение нескольких наносекунд обратимо переходит в следующий продукт, так называемый синий интермедиат (BSI<sub>470</sub> – blue-shifted intermediate), максимум поглощения которого сильно сдвинут в коротковолновую область ( $\lambda_{\max} = 470$  нм) [85].

Следующий продукт люмиродопсин образуется из BSI<sub>470</sub> за 150 нс с максимумом 497 нм. На этой стадии хромофор релаксирует в более планарную структуру, что приводит к изменениям во взаимодействии с ближайшими а.о. В течение нескольких микросекунд люмиродопсин переходит в метародопсин I ( $\lambda_{\max} = 478$  нм), в котором изменения конформации хромофора завершаются, но меняется взаимодействие а.о. белка с С<sub>9</sub>-метильной группой ретиналя. Эти и другие изменения существенны для последующего взаимодействия Р с белками зрительного каскада. Метародопсин I переходит в долгоживущий продукт метародопсин II, который является ключевой стадией фотопревращения для физиологического акта фототрансдукции. Этот переход сопровождается увеличением конформационной подвижности всего белка, в результате чего

образуется специфический активный сайт, позволяющий взаимодействовать с G-белком трансдуцином. Метародопсин II содержит депротонированное ШО, что выражается в значительном спектральном сдвиге максимума поглощения этого продукта до 380 нм. Метародопсин II в минутном диапазоне времени переходит в метародопсин III ( $\lambda_{\max} = 465$  нм), который представляет собой протонированную неактивную форму фотоактивированного Р. Вероятно, метародопсин III является депо для запасаения метародопсина II, с которым он находится в равновесии. Затем происходит реакция гидролиза ШО и ретиналь отделяется от опсина. Таким образом, процесс фотолиза Р завешается гидролизом альдиминной связи ШО и образованием свободного полностью-*транс* ретиналя и опсина. Высвободившийся из опсина полностью-*транс* ретиналь активно транспортируется из фоторецепторной клетки и претерпевает дальнейшие биохимические изменения для превращения в 11-*цис* форму. Затем опсин при взаимодействии с 11-*цис* ретиналем регенерирует в исходное состояние.

Фотохимическая реакция в зрении – изомеризация ретиналя, приводит к изменению конформации его ближайшего белкового окружения в хромофорном центре, что в конечном итоге приводит к значительным перестройкам всей молекулы Р. При этом в цитоплазматическом домене Р на стадии образования метародопсина II становятся доступны активные центры связывания с трансдуцином. Конформационно измененный Р при взаимодействии с трансдуцином катализирует обмен гуанозиндифосфата на гуанозинтрифосфат в  $\alpha$ -субъединице G-белка. Один поглощенный молекулой Р квант света может приводить к активации нескольких сотен молекул трансдуцина. Активированный трансдуцин, в свою очередь, активирует фермент фосфодиэстеразу, который гидролизует несколько тысяч молекул низкомолекулярного внутриклеточного вторичного посредника – циклического гуанозинмонофосфата. Это приводит к падению его концентрации у плазматической мембраны, что вызывает падение натриевой проницаемости и гиперполяризацию мембраны фоторецепторной клетки. При этом уменьшается скорость выброса медиатора в синаптическую щель между палочкой и нейронами (биполярными и горизонтальными клетками). Далее сигнал перерабатывается в сетчатке и передается по зрительному нерву в центральную нервную систему.

Крайне высокий коэффициент экстинкции Р и квантовый выход реакции фотоизомеризации, большое количество молекул Р в одной клетке палочке, а также каскад внутриклеточного усиления и передачи фоторецепторного сигнала, позволяют палочке детектировать даже один поглощенный квант света при соответствующей темнов́ой адаптации [86].

Ключевым событием в восстановлении исходного состояния зрительной клетки является активация фермента гуанилатциклазы, который синтезирует циклический гуанозинмонофосфат.

Инактивация фотоактивированного Р достигается фосфорилированием и присоединением белка арестина.

Таким образом, сложная система трансдукции светового сигнала в нервный импульс позволяет фоторецепторной клетке эффективно воспринимать свет и усиливать сигнал в процессе внутриклеточной передачи в  $10^5$ – $10^6$  раз [36].

#### 1.2.4. Первичные реакции родопсина

После доказательства того, что первичной реакцией Р является *цис* → *транс* изомеризация, особенности фотоизомеризации ретиналя стали предметом многочисленных экспериментальных и теоретических исследований. Непосредственное наблюдение этого процесса в Р оказалось возможным только с применением спектральных методов с фемтосекундным временным разрешением. В 1991 году впервые были опубликованы данные, полученные методом «возбуждение-зондирование» фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии с временным разрешением 30 фс [53]. Было показано, что образование первого фотопродукта в основном состоянии, содержащего полностью-*транс* ретиналь, Фото<sub>570</sub>, завершается к 200 фс после возбуждения. Образованию Фото<sub>570</sub> предшествует возникновение полосы поглощения из возбужденного состояния S<sub>1</sub> с максимумом ~510 нм (P\*<sub>510</sub>) [53, 87]. Фото<sub>570</sub> в результате процесса колебательной релаксации хромофорной группы и ее ближайшего аминокислотного окружения переходит в следующий продукт Бато<sub>535</sub> в пикосекундном масштабе времени [53, 88, 89]. Часть молекул при переходе из возбужденного состояния возвращается в исходное состояние Р<sub>498</sub> с неизомеризованным ретиналем, что определяет квантовый выход реакции 0,65.

Поскольку реакция фотоизомеризации протекает в возбужденном состоянии, большое число экспериментальных работ было посвящено исследованию процессов, протекающих в ретинале сразу после поглощения кванта света. Для этой цели хорошо подходят методы флуоресцентной спектроскопии. Спектры флуоресценции Р и модифицированного родопсина (изородопсина), содержащего 9-*цис* ретиналь в качестве хромофора, были зарегистрированы при возбуждении белков светом с различными длинами волн [90]. Квантовый выход флуоресценции составил  $(0,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$  для Р и  $(1,8 \pm 0,7) \cdot 10^{-5}$  для изородопсина, что соответствует времени жизни возбужденного состояния – 50 и 100 фс, соответственно. Было показано, что спектры флуоресценции претерпевают длинноволновый сдвиг при изменении длины волны возбуждения 473 → 568 нм. Это позволило предположить, что испускание света, как в Р, так и в изородопсине, происходит из нерелаксированных, нестационарных колебательных состояний возбужденных молекул.

Методом абсорбционной спектроскопии была показана зависимость квантового выхода фотореакции Р от длины волны возбуждения в диапазоне 500–570 нм [56], при этом значение квантового выхода падало на 5% при уменьшении энергии кванта возбуждения на  $2500 \text{ см}^{-1}$ .

Также информацию о динамике фотореакции Р дал анализ время-разрешенных сигналов поглощения первых продуктов – колебательно-возбужденных Фото<sub>570</sub> и Р<sub>498</sub> (Р<sub>498'</sub>), образующихся при  $S_1 \rightarrow S_0$  переходе в фемтосекундном диапазоне времени. Оказалось, что в этих сигналах в течение 1–2 пс наблюдались осцилляции с основным периодом 550 фс (частота  $60 \text{ см}^{-1}$ ) [91, 92]. Фазы и амплитуды этих осцилляций позволили интерпретировать их как результат нестационарного колебательного движения в основном электронном состоянии продуктов. Было показано, что дальнейшие переходы Фото<sub>570</sub> → Бато<sub>535</sub> и Р<sub>498'</sub> → Р<sub>498</sub> протекают на  $S_0$  ППЭ в течение нескольких пикосекунд и связаны с завершением процессов колебательной релаксации.

Такие особенности фотореакции Р, как крайне высокая скорость и квантовый выход, зависимость величины квантового выхода и положения полосы флуоресценции от длины волны возбуждения, а также осцилляции в сигналах поглощения первичных фотопродуктов, позволили предположить нестационарный характер этой реакции. В реакциях такого типа, вопреки классическим представлениям о протекании фотохимической реакции, образование продукта происходит как результат согласованного движения ядер молекулы и завершается быстрее процессов колебательной релаксации и дефазировки различных колебательных состояний в возбужденном состоянии. Такие реакции называются когерентными.

Интересной особенностью первичных реакций Р является сложная динамика распада его возбужденного состояния. Методом время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии [93], было показано, что этот процесс описывается двумя характерными временами в фемто- (125–330 фс, 60–90%) и пикосекундном (1,0–2,5 пс, 10–40%) временных диапазонах, что свидетельствует о гетерогенности возбужденного состояния. Такая гетерогенность широко известна для микробиальных родопсинов [24, 94–98], и ее часто связывают с гетерогенностью исходного состояния белка [98–101]. Некоторые из этих возбужденных состояний, особенно те, которые характеризуются большим временем жизни, могут не вести к изомеризации ретиналя, поэтому они называются нереакционными. Авторы работы [93] приписали пикосекундное время распада возбужденного состояния Р такому нереакционному состоянию.

### ***1.2.5. Моделирование реакции фотоизомеризации ретиналя в родопсине***

***Общие представления о методах моделирования.*** Реакция фотоизомеризации ретиналя в Р уже около четырех десятилетий является объектом теоретических исследований. В работе [102]



было проведено моделирование динамики этой реакции. Возбужденное состояние ретиналя было описано полуэмпирически в модельном белковом окружении. Было успешно предсказано, что фотореакция завершается к 200 фс, продукт содержит полностью-*транс* ретиналь в скрученной конформации и дополнительно осуществляется поворот  $C_{15}=N$  связи. Автор работы [102] предложил механизм, в рамках которого изомеризация  $C_{11}=C_{12}$  связи происходит по типу поворота «велосипедных педалей», то есть, происходит одновременный поворот в противоположные стороны вокруг двух соседних двойных связей  $C_9=C_{10}$  и  $C_{11}=C_{12}$ , что позволяет реакции пройти очень быстро в ограниченном пространстве хромофорного центра. Этот подход был использован в целой серии работ разных авторов [103–105]. После того, как была определена структура Р методом рентгеноструктурного анализа [38], объектом моделирования методом молекулярной динамики (MD) стал весь белок [50, 106]. Из химических исследований небольших молекул известно, что процесс фотоизомеризации кроме поворота вокруг двойной связи включает целый комплекс движений атомов водорода, приводящих к пирамидализации атомов углерода, участвующих в реакции [107]. Таким образом, появилась потребность использовать метод MD, дополненный квантовохимическими неэмпирическими методами [108–111].

Как было сказано выше, фотоизомеризация ретиналя в Р катализируется белковым окружением, поэтому при моделировании это важно учитывать. С этой целью был разработан гибридный метод квантовой механики/молекулярной механики (QM/MM) [39, 112–115]. Этот подход был удачно соединен с методом MD, что позволило теоретически рассчитать такие спектроскопические характеристики реакции, как время-разрешенные сигналы поглощения продуктов и динамические спектральные осцилляции этих сигналов [55, 116], наблюдаемые экспериментально [55, 91]. Также были определены движения молекулы ретиналя, отвечающие за эти осцилляции.

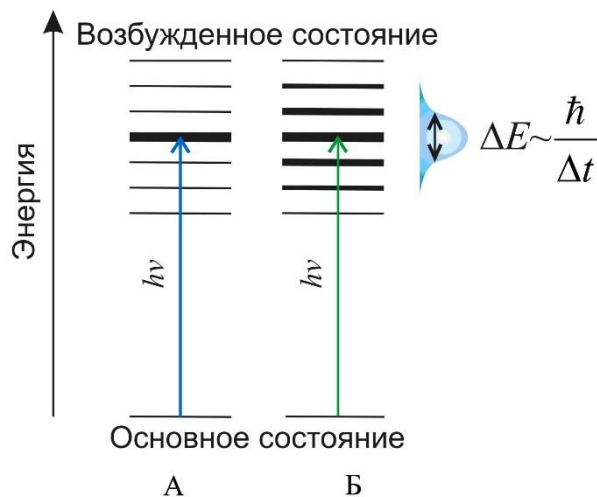
Теоретические работы показали, что реакция фотоизомеризации ретиналя в Р может протекать так быстро благодаря тому, что тепловые флуктуации, связанные с белковым окружением, практически не влияют на динамику реакции. При этом крайне ограниченный объем хромофорного центра вынуждает ретиналь осуществлять *цис* → *транс* изомеризацию, сильно не меняя положение атомов и занимаемый объем, тем самым направляя ее по пути эффективного образования полностью-*транс* ретиналя. Основная роль белкового окружения по результатам теоретических исследований заключается в создании исходной непланарной и напряженной 11-*цис* формы ретиналя, которая уже готова к быстрой фотоизомеризации.

**Квантовохимическая модель фотореакции родопсина.** Основным понятием, которое используют при квантовохимическом описании фотореакции Р, является когерентный колебательный волновой пакет (волновой пакет). Остановимся на этом более подробно.

Возбуждение молекул лазерными фемтосекундными импульсами имеет свои особенности по сравнению с возбуждением непрерывным лазерным излучением. Непрерывное лазерное излучение, обладая определенной энергией, инициирует переход на один колебательный уровень возбужденного состояния молекулы (Рисунок 1.7А). Фемтосекундный лазерный импульс при крайне малой длительности характеризуется энергией в некотором диапазоне значений. Длительность импульса  $\Delta t$  и его энергия  $\Delta E$  связаны соотношением неопределенности:

$$\Delta E \Delta t \geq \hbar, \quad (1.1)$$

где  $\hbar$  – постоянная Планка. Чем короче импульс, тем больший диапазон энергий возбужденного состояния он может охватить. Также важно, что время действия фемтосекундного импульса мало по отношению к периоду колебаний атомов в молекуле, поэтому в момент возбуждения атомы остаются почти неподвижными, сохраняя свои положения в пространстве. После действия фемтосекундного импульса система может с разной вероятностью находиться в любом из состояний, попадающих в энергетический интервал  $\Delta E$  (Рисунок 1.7Б). Таким образом, фемтосекундный импульс позволяет когерентно возбуждать сразу несколько колебательных состояний изучаемой системы. Суперпозиция колебательных возбужденных состояний (в данном случае в электронно-возбужденном состоянии) называется волновым пакетом.



**Рисунок 1.7** – Переходы между энергетическими уровнями основного и возбужденного состояний под действием непрерывного (А) и импульсного фемтосекундного лазерного излучения (Б), в результате которых образуется стационарное состояние (А) и нестационарное состояние (волновой пакет) (Б). Выделенными линиями обозначены заселенные колебательные состояния. Рисунок модифицирован из [117]

Волновая функция волнового пакета меняется во времени и пространстве, и в соответствии с принципом суперпозиции имеет вид:

$$\Psi(r; t) = \sum c_i \psi_i(r) \exp(-i E_i t / \hbar), \quad (1.2)$$

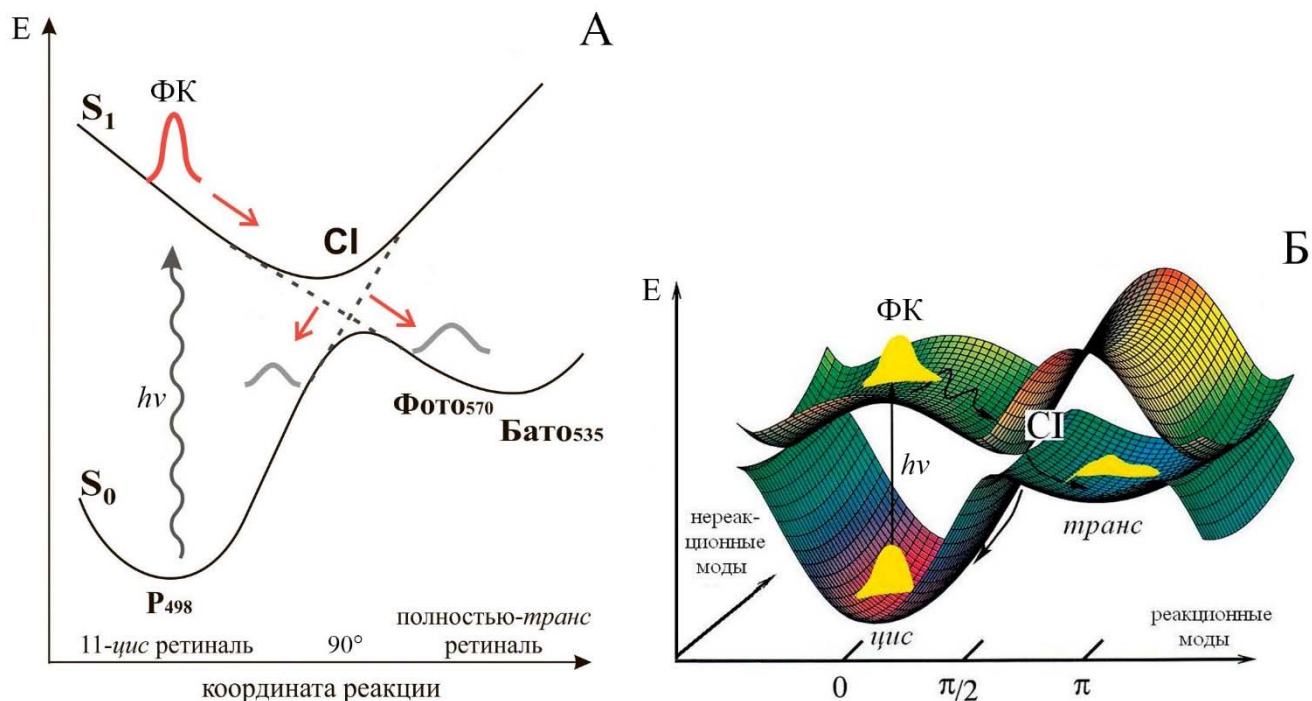
где  $c_i$  – амплитуда, отражающая вклад стационарного колебательного состояния  $\psi_i$  с энергией  $E_i$  в волновой пакет [118]. Волновые функции  $\psi_i$  и уровни энергии  $E_i$  задаются только строением молекулы, а весовые коэффициенты  $c_i$  зависят от параметров светового импульса и определяют фазы колебательных состояний.

В когерентных реакциях, к которым также относится фотореакция Р, волновой пакет или когерентность возбужденных колебаний сохраняется в процессе реакции и существует некоторое время после образования продуктов. Реакция происходит как результат согласованного движения ядер молекулы, и ее динамика проявляется в эволюции волнового пакета.

Можно рассмотреть реакцию фотоизомеризации ретиналя в Р на основе концепции ППЭ. Под ППЭ молекулярной системы для некоторого электронного состояния понимают энергию этого состояния, записанную как функцию координат атомов [119]. Каждая точка на ППЭ – это энергия молекулярной системы в данном электронном состоянии при отсутствии движения ядер. Для описания процессов, происходящих в Р, в рамках модели двух состояний используют две ППЭ, основного ( $S_0$ ) и возбужденного ( $S_1$ ) состояний.

Характер фотохимической реакции Р позволил предположить, что она протекает как результат безбарьерного движения волнового пакета по неадиабатической ППЭ  $S_1$  возбужденного состояния реагента и дальнейшего перехода в основное состояние продукта через пересечение  $S_1/S_0$  ППЭ. Одной из первых моделей для ее описания была предложена классическая одномерная двухуровневая модель Ландау-Зинера (Рисунок 1.8А) [120, 121], в которой фотореакция осуществляется в результате баллистического движения волнового пакета по  $S_1$  ППЭ вдоль торсионных колебательных мод, а квантовый выход фотореакции зависит от скорости движения волнового пакета. Чем быстрее протекает реакция, тем больше должен составлять ее квантовый выход. Эта модель смогла объяснить ряд экспериментальных данных, например, видимую корреляцию между значениями квантовых выходов фотореакций Р (0,65), 11-цис-13-деметилродопсина (0,47) и изородопсина (0,2) и временами максимального образования первого фотопродукта (200, 400 и 600 фс, соответственно) [53, 122, 123], а также зависимость квантового выхода фотореакции Р от длины волны возбуждения [56, 124].

Но ряд экспериментальных [74, 125–127] и теоретических [55, 74, 109, 114, 127–130] исследований, в отличие от модели Ландау-Зинера, выявили сложную динамику возбужденного состояния, предполагающую многомерную координату реакции, включающую разные колебательные моды.



**Рисунок 1.8** – Одномерная (А) и двумерная (Б) схема поверхностей потенциальной энергии, принимающих участие в фотореакции родопсина. Ход реакции показан красными (А) и черными (Б) стрелками. Рисунок Б модифицирован из работы [132]

Благодаря Рамановской спектроскопии и теоретическим расчетам было выявлено 28 нормальных колебательных мод 11-*цис* ретиналя в Р и был определен характер почти всех колебаний, которым они соответствуют [131]. К низкочастотным модам можно отнести делокализованные ( $93, 131, 246, 260, 320, 410$  и  $446 \text{ см}^{-1}$ ) и локализованные ( $568 \text{ см}^{-1}$ ) торсионные колебания полиеновой цепи ретиналя (ТК), а к высокочастотным – внеплоскостные колебания атомов водорода (НООР мода,  $970 \text{ см}^{-1}$ ), колебания С-С связей в так называемой области «отпечатков пальцев» ( $1100\text{--}1300 \text{ см}^{-1}$ ), сильно зависящие от структуры молекулы, и колебания С=С связей ( $1548 \text{ см}^{-1}$ ).

Рассмотрим в общем динамику волнового пакета в процессе протекания фотореакции Р в рамках многомерной двухуровневой модели. Фемтосекундный импульс когерентно возбуждает некоторый набор колебательных мод молекулы ретиналя, создавая волновой пакет на  $S_1$  ППЭ во Франк-Кондоновском (ФК) состоянии, который начинает двигаться вдоль  $S_1$  ППЭ в сторону образования фотопродукта (Рисунок 1.8А). Волновой пакет эволюционирует настолько быстро, что перераспределение энергии между различными колебательными модами не успевает произойти раньше образования фотопродукта. Высокая скорость реакции объясняется тем, что развитие волнового пакета происходит вдоль  $S_1$  ППЭ, которая имеет ненулевой наклон вдоль координаты реакции. Кроме того,  $S_1$  ППЭ имеет еще одну особенность, а именно, отсутствие барьера, в отличие от микробиальных родопсинов. Что касается  $S_0$  ППЭ, то она, напротив, имеет

необычайно большой барьер, который разделяет *цис* и *транс* формы ретиналя в Р, препятствуя спонтанной тепловой изомеризации и возникновению «темнового шума» фоторецепторной клетки. Перед образованием фотопродукта волновой пакет проходит через область перекрывания  $S_1$  и  $S_0$  ППЭ. В рамках многомерной модели, в которой структура ППЭ молекулы Р зависит от большого количества колебательных мод, эта область называется областью конического квазипересечения (CI)  $S_1/S_0$  ППЭ, для которой вероятность перехода из  $S_1$  в  $S_0$  состояние максимальна [108, 132–137] (Рисунок 1.8Б). Считается, что многие особенности реакции фотоизомеризации ретиналя в Р, так или иначе, связаны с наличием CI. Понятие CI широко используется для теоретического описания фотохимии органических соединений, а именно, для описания безызлучательных переходов из возбужденного состояния, когда происходит эффективное и сверхбыстрое преобразование энергии квантов света в химическую энергию.

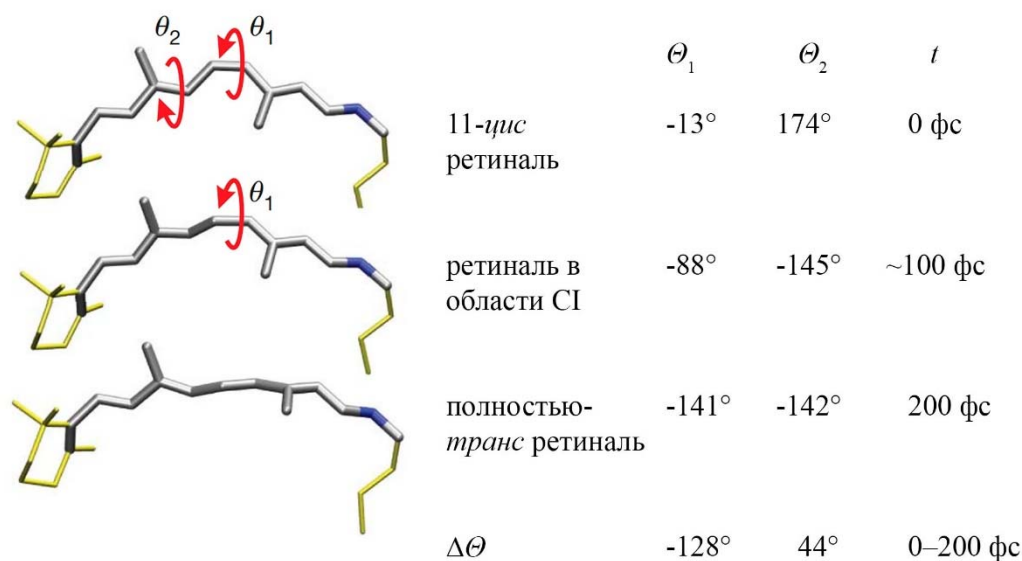
В волновой пакет, образованный при возбуждении молекулы Р, входят как реакционные, так и нереакционные колебательные моды, не принимающие участия в реакции фотоизомеризации. При этом самым первым процессом, происходящим после возбуждения за время 10–20 фс, является движение волнового пакета вдоль нереакционных колебательных мод (Рисунок 1.8Б), в основном колебаний C-C и C=C связей полиеновой цепи ретиналя, в результате которого происходит увеличение длины двойных C=C связей и уменьшение длины одинарных C-C связей [114, 138]. Эта инверсия связана с особенностью возбужденного состояния  $S_1$  в Р, имеющего характер переноса заряда ( $B_u$ ), в то время как основное состояние  $S_0$  имеет ковалентный характер ( $A_g$ ) [139]. Далее начинается движение волнового пакета вдоль реакционных колебательных мод, к которым относят НООР и ТК. В работе [125] методом Рамановской спектроскопии с фемтосекундным временным разрешением (200 фс) была показана высокая активность и большой частотный сдвиг НООР колебаний к 200 фс после возбуждения. Был сделан вывод о том, что НООР колебания играют определяющую роль в процессе реакции, а движение волнового пакета вдоль торсионной координаты большей частью происходит после перехода на  $S_0$  ППЭ. При моделировании фотореакции Р методами QM/MM была выявлена ограниченная роль НООР колебаний, которые участвуют в реакции наравне с торсионными колебаниями полиеновой цепи ретиналя и наиболее активны уже после перехода на  $S_0$  ППЭ [114–116].

Движение волнового пакета по левой ветви  $S_1$  ППЭ (Рисунок 1.8) вдоль реакционных колебательных мод приводит к достижению области CI примерно к 50–100 фс после возбуждения, что было показано как теоретически [55, 114, 116, 139, 140], так и экспериментально [55, 141]. В этой области волновой пакет предположительно распадается на два подпакета [142], один из которых неадиабатически переходит на  $S_0$  ППЭ первого продукта

Фото<sub>570</sub> и еще некоторое время продолжает свое движение вдоль этой ППЭ (Рисунок 1.8). Другой подпакет переходит на  $S_0$  ППЭ исходного состояния  $P_{498}$ , образуя другой «продукт» реакции – колебательно-возбужденную молекулу  $P_{498}'$ . Этот подпакет также некоторое время движется вдоль  $S_0$  ППЭ состояния  $P_{498}'$  до полной колебательной релаксации и разфазировки реакционных колебательных мод. Таким образом, продукты Фото<sub>570</sub> и  $P_{498}'$  образуются колебательно-возбужденными. Квантовый выход фотореакции  $P$  в многомерной модели, в отличие от модели Ландау-Зинера, определяется не скоростью движения волнового пакета вдоль  $S_1$  ППЭ, а согласованностью фаз и амплитуд НООР колебаний атомов водорода  $C_{11}$ -H и  $C_{12}$ -H и торсионных колебаний  $C_{11}=C_{12}$  связи при вхождении в область CI [130, 140].

Таким образом, для описания фотореакции  $P$  используется модель двух состояний и трех мод, где два состояния – это  $S_0$  и  $S_1$  электронные уровни, участвующие в реакции, а три моды соответствуют нереакционным колебаниям C-C и C=C связей и реакционным НООР и торсионным колебаниям полиеновой цепи ретиналя. Реакционные и нереакционные колебательные моды составляют волновой пакет и могут наблюдаться как осцилляции время-разрешенных сигналов из возбужденного состояния и продуктов реакции. Частоты этих осцилляций могут дать важную информацию о структуре волнового пакета и выявить реакционные колебательные моды, непосредственно связанные с механизмом реакции.

Согласно теоретическим работам [55, 116], в процессе реакции происходят следующие изменения в структуре молекулы ретиналя (Рисунок 1.9). Во время движения вдоль реакционных колебательных мод двугранный угол  $C_{11}=C_{12}$  связи (Рисунок 1.9,  $\theta_1$ ) уменьшается от  $-13^\circ$  ( $t = 0$  фс) до  $-88^\circ$  в области CI ( $t \approx 100$  фс) и далее до  $-141^\circ$  при полном образовании Фото<sub>570</sub> ( $t = 200$  фс) [55]. Благодаря влиянию белкового окружения на хромофор  $C_{11}=C_{12}$  связь уже подготовлена к изомеризации тем, что в темновом состоянии скручена на  $-13^\circ$ , что также определяет поворот этой связи по часовой стрелке в процессе фотореакции [139]. Соседние  $C_9=C_{10}$  и  $C_{13}=C_{14}$  связи также претерпевают небольшое торсионное движение в обратном направлении против часовой стрелки, чтобы скомпенсировать изомеризацию  $C_{11}=C_{12}$  связи в ограниченном объеме хромофорного центра. Двугранный угол  $C_9=C_{10}$  связи (Рисунок 1.9,  $\theta_2$ ) в процессе достижения CI меняется от  $174^\circ$  ( $t = 0$  фс) до  $-145^\circ$  ( $t \sim 100$  фс) [55]. При этом в процессе реакции сильно возрастают НООР колебания атомов  $C_8$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{11}$ ,  $C_{12}$ , приводя к их сильной пирамидализации, что непосредственно сопряжено с поворотом  $C_9=C_{10}$  и  $C_{11}=C_{12}$  связей, участвующих в реакции. После прохождения CI до момента полного образования Фото<sub>570</sub> двугранный угол  $C_9=C_{10}$  связи практически не меняется и к  $t = 200$  фс составляет  $-142^\circ$  [55] (Рисунок 1.9). Такой механизм фотоизомеризации ретиналя в  $P$  называется асинхронным движением по типу «велосипедных педалей» [102].



**Рисунок 1.9** – Слева – Изменение структуры ретиналя в хромоформном центре родопсина в процессе фотореакции, полученное методами QM/MM моделирования. Справа – Значения двугранных углов  $\theta_1$  и  $\theta_2$  C<sub>11</sub>=C<sub>12</sub> и C<sub>9</sub>=C<sub>10</sub> связей ретиналя, соответственно, в исходном состоянии родопсина, в момент достижения области CI и в продукте Фото<sub>570</sub>, а также расчетное время достижения этих состояний. Рисунок модифицирован из работы [55]

В дополнении к увеличению угла  $\theta_2$  происходит значительное изменение угла C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> одинарной связи, соединяющей полиеновую цепь ретиналя и  $\beta$ -иононовое кольцо, от  $-52^\circ$  ( $t = 0$  фс) до  $-30^\circ$  ( $t = 30$  фс) и далее до  $-10^\circ$  ( $t = 250$  фс) [114, 116]. Также значительное торсионное движение наблюдается в процессе реакции у C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> связи от  $-180^\circ$  до  $-210^\circ$ . Торсионные движения C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> и C<sub>9</sub>=C<sub>10</sub> связей скорее всего связаны со стерическим взаимодействием C<sub>9</sub>-метильной группы и аминокислотным остатком Y268 [116].

В результате после завершения реакции фотоизомеризации продукт Фото<sub>570</sub> содержит хромофор с колебательно-возбужденной скрученной структурой, далекой от планарности. Колебательная релаксация ретиналя, занимающая несколько пикосекунд, приводит к образованию следующего продукта Бато<sub>535</sub>. Поскольку продукт Фото<sub>570</sub> не был обнаружен методами низкотемпературной спектроскопии и с помощью QM/MM моделирования, есть основания предполагать, что он представляет собой колебательно-возбужденный продукт Бато<sub>535</sub> и не может рассматриваться как отдельный продукт фотолиза Р.

На этапе образования Бато<sub>535</sub> завершается процесс запасания энергии кванта света в химическую энергию в виде скрученной структуры полностью-*транс* ретиналя, которая поддерживается благодаря взаимодействию ПШО с противоионом E113, а также C<sub>9</sub>- и C<sub>13</sub>-метильных групп с окружением (A117 и T118 из петли E2, а также G188 и I189 из спирали H3) [143, 144]. Релаксация такой напряженной структуры по строго выделенным белком степеням свободы видимо позволяет запустить все последующие конформационные изменения белка.

Опосредованную белком напряженную структуру сопряженных С=C связей ретиналя в Бато<sub>535</sub> можно рассматривать как общий механизм для сохранения энергии кванта света, которая используется для последующих конформационных изменений в фотоактивируемых белках.

### 1.3. Бактериородопсин

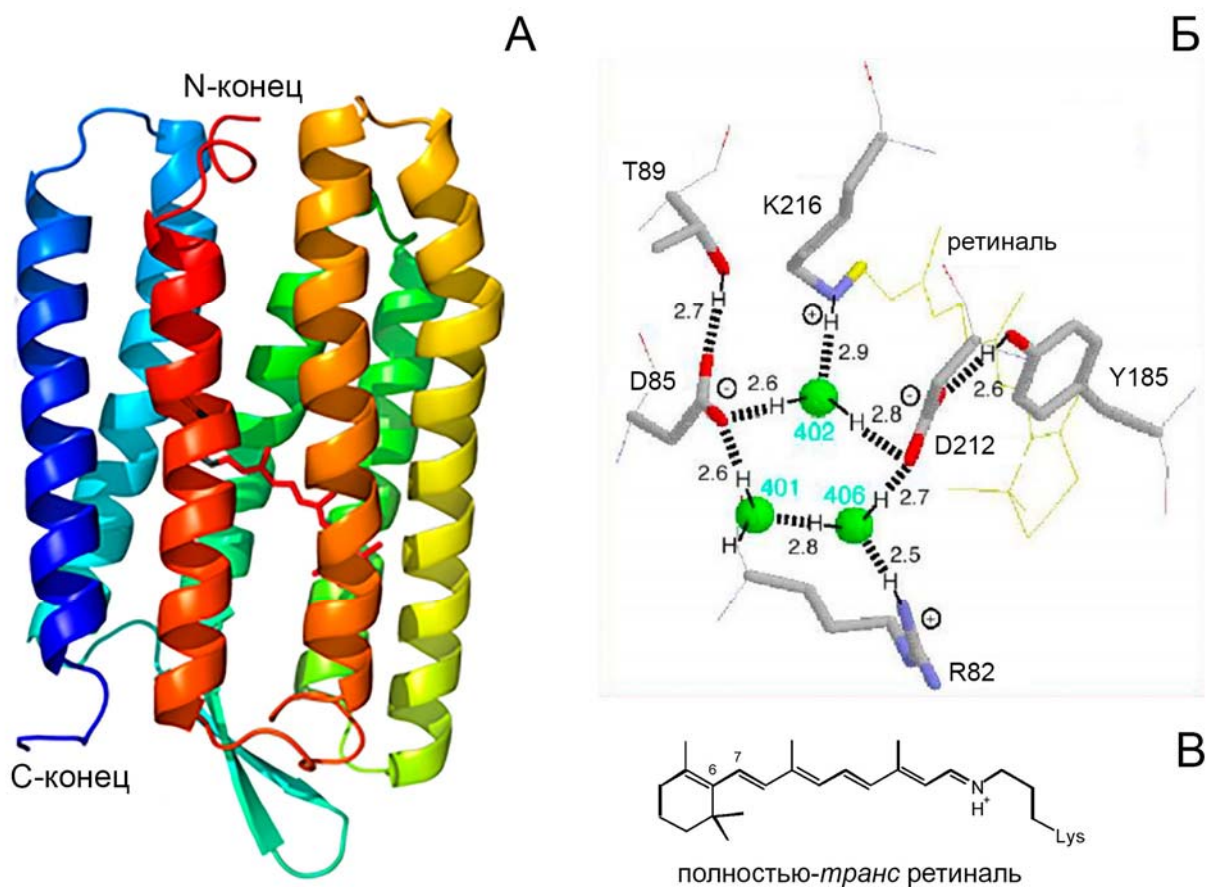
#### 1.3.1. Структура молекулы бактериородопсина

БР – трансмембранный белок галофильной археи *Halobacterium salinarum*, который относится к микробиальным родопсинам и осуществляет фотоэнергетическую функцию – активный транспорт протонов через клеточную мембрану. Этот белок является первым открытым [21] и к настоящему моменту наиболее изученным из всех родопсинов 1 типа. Он представляет собой уникальный объект для изучения молекулярных механизмов преобразования световой энергии в биологических системах и часто служит модельной системой для изучения не только родопсинов 1 типа, но и родопсинов 2 типа. В мембранах *H. salinarum* БР образует участки, называемые пурпурными мембранами, в которых тримеры белка уложены в правильную гексагональную структуру [145]. Действуя как светозависимый протонный насос, БР генерирует трансмембранный электрохимический потенциал, необходимый для синтеза АТФ [145–147]. БР представляет собой хромопротеин массой 26,5 кДа, состоящий из апобелка бактериоопсина и хромофорной группы – полностью-*транс-6-*s-транс** ретиналя, соединенного ковалентно с а.о. лизина К216 с помощью связи ПШО (Рисунок 1.10). Бактериоопсин состоит из 248 а.о., плотно уложенных в семь ТМ  $\alpha$ -спиралей, некоторые а.о. которых образуют хромофорный центр для встраивания ретиналя. Максимум  $\alpha$ -полосы поглощения БР находится в желтой области спектра ( $\lambda_{\max} = 568$  нм), а коэффициент экстинкции крайне высок и составляет  $\varepsilon = 63000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

БР, уложенный в гексагональную структуру, крайне устойчив к воздействию различных факторов окружающей среды, включая высокую соленость, температуру и действие протеаз. Он может сохранять фотохимические свойства в течение длительного времени. Благодаря этим особенностям БР представляет собой крайне удобный объект для исследования, а также широко используется в различных технических приложениях.

Большое содержание БР в природных пурпурных мембранах, где он является единственным белковым компонентом, позволило относительно быстро определить его структуру – сначала с помощью электронной криомикроскопии, а затем методом рентгеноструктурного анализа с высоким пространственным разрешением (Рисунок 1.10А) [148, 149].





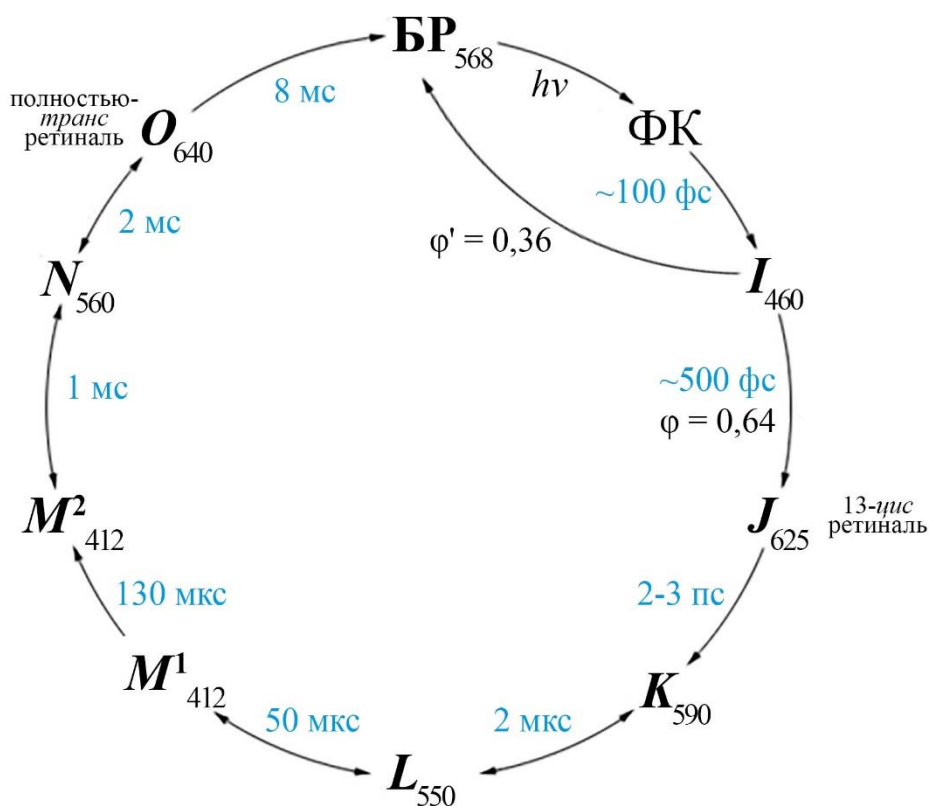
**Рисунок 1.10** – А – Трехмерная структура бактериородопсина, состоящая из семи  $\alpha$ -спиралей, С- и N-концов, и хромофора рeтиналя, ковалентно связанного с седьмой  $\alpha$ -спиралью. Б – Комплексный протонный кластер, представляющий собой пентагональный кластер (D85, D212 и три молекулы воды), координирующий протон Шиффова основания рeтиналя. Рисунок модифицирован из [18]. В – Структура полностью-транс-6-*s*-транс рeтиналя, соединенного с K216 в хромоформном центре бактериородопсина

БР, в отличие от Р, может переходить в ТА состояние, в котором в 50–60% молекул происходит тепловая полностью-транс  $\rightarrow$  13-*цис* изомеризация рeтиналя [150–156]. На свету происходит образование СА формы БР с содержанием полностью-транс рeтиналя 90–100%.

### 1.3.2. Фотоцикл бактериородопсина

Поглощение кванта света приводит к изомеризации хромофора в 13-*цис* форму и сопровождается рядом превращений молекулы БР, замкнутых в фотоцикл (Рисунок 1.11) [157–162]. Результатом фотоцикла является транспорт протона от внутренней стороны мембраны клетки к внешней среде. На разных стадиях фотоцикла во временном диапазоне от фемто- до миллисекунд образуются интермедиаты  $I_{460}$ ,  $J_{625}$ ,  $K_{590}$ ,  $L_{550}$ ,  $M^1_{412}$ ,  $M^2_{412}$ ,  $N_{584}$  и  $O_{640}$ , которые отличаются от исходного состояния БР (БР<sub>568</sub>) своими физико-химическими свойствами и могут быть различимы спектрально и/или кинетически [157, 163, 164]. Изменения спектральных

свойств интермедиатов в видимой части спектра определяются конформацией хромофора и его ближайшего белкового окружения.



**Рисунок 1.11** – Фотоцикл бактериородопсина при pH 7,0 и температуре 20 °C [165]

Возникновение различных интермедиатов фотоцикла БР тесно связано с конформационными перестройками ретиналя и белка в целом. Стадии до образования интермедиата **K**<sub>590</sub> в основном связаны с конформационными изменениями ретиналя, индуцированными поглощением кванта света. Последующие стадии связаны с конформационными изменениями белка, в результате которых происходит перенос протона с цитоплазматической на внешнюю сторону мембраны клетки. Большую роль в этом процессе играет ШО ретиналя, которое изначально протонировано и ориентировано в сторону внешней среды. Оно стабилизировано так называемым пентагональным кластером, который состоит из а.о. D85 и D212 и трех молекул воды (Рисунок 1.10Б). Данный кластер оттягивает на себя протон ШО, после возбуждения ретиналя на стадии образования интермедиатов **M**<sup>1</sup><sub>412</sub> и **M**<sup>2</sup><sub>412</sub> ШО депротонируется и протон уходит через акцептор D85 на а.о. R82. Это приводит к переориентации ШО с внешней стороны мембраны на внутреннюю для активного взаимодействия с донором протона D96 на более поздних стадиях фотоцикла. Таким образом запускается эстафетный механизм переноса протона, в ходе которого различные а.о. протонируются и депротонируются, образуя цепь переноса протона.

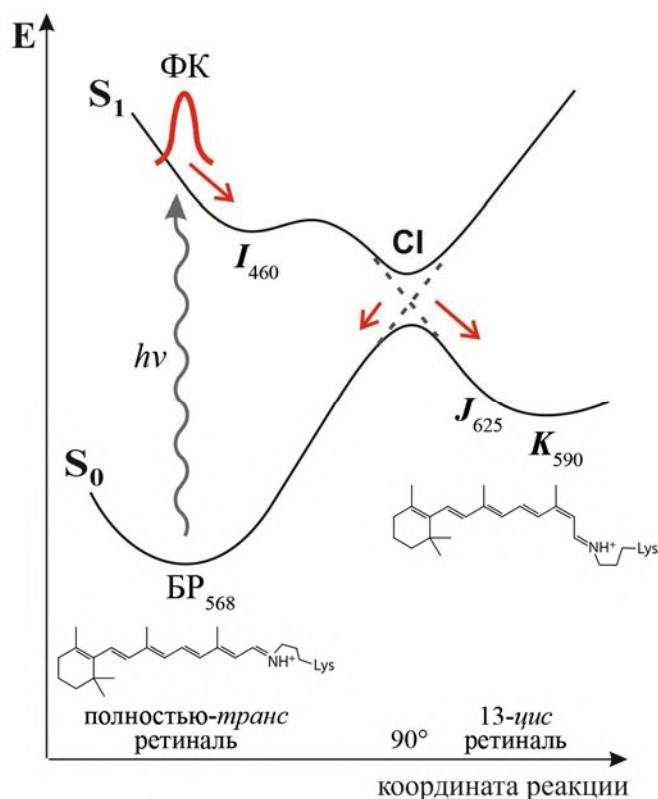
В последние десятилетия методами фемтосекундной абсорбционной и флуоресцентной лазерной спектроскопии, а также методами Рамановской спектроскопии, изучалась сверхбыстрая динамика фотореакции БР, которая имеет много общего с фотореакцией Р и других РСБ [24, 54, 94–96, 166–175]. Под действием кванта света БР переходит во ФК состояние, релаксирующее за время 100–150 фс по высокочастотным (C-C и C=C) колебательным модам в интермедиат  $I_{460}$ , представляющий собой возбужденное состояние (Рисунок 1.12) [24, 166]. Этот интермедиат в течение 450–500 фс [96, 167, 168, 176] переходит через CI  $S_1/S_0$  ППЭ в основное состояние с образованием интермедиата  $J_{625}$  с квантовым выходом 0,64 [14]. При этом ретиналь изомеризуется из полностью-*транс* в 13-*цис* форму [170, 172, 176]. Координата реакции изомеризации ретиналя в БР, также, как и у Р, тесно связана с НООР и торсионными колебательными модами [171, 177, 178]. Около одной трети возбужденных молекул после прохождения CI возвращается в исходное состояние БР<sub>568</sub>. Интермедиат  $J_{625}$  с характерным временем 2–3 пс переходит в следующий интермедиат  $K_{590}$  с более релаксированным 13-*цис* ретиналем [88, 95].

Образование интермедиата  $K_{590}$  с микросекундным временем жизни завершает процесс запасания около 30% энергии поглощенного кванта света [7] в виде химической энергии конформационных перестроек белка, которая будет использоваться в дальнейшем для переноса протона. В отличие от Р, в БР эти перестройки включают не только создание напряженной структуры 13-*цис* ретиналя за счет стерических взаимодействий с белковым окружением, но и изменения в системе водородных связей пентагонального кластера, которые приводят к ослаблению водородной связи между ПШО и противоионом [179–182].

В отличие от Р, фотореакция которого описывается моделью 2-х состояний (Рисунок 1.8), для БР была предложена модель 3-х состояний [94, 170, 183, 184], постулирующая участие  $S_2$  ППЭ в формировании пути фотореакции. Это приводит к образованию небольшого барьера на  $S_1$  ППЭ вдоль координаты реакции [133, 185–187], который молекула преодолевает в процессе распада возбужденного состояния (Рисунок 1.12).

Моделирование реакции фотоизомеризации ретиналя в БР методами QM/MM, проведенное на основе рентгеновской структуры 1C3W [149], показало, что ретиналь в исходном состоянии молекулы до поглощения кванта света скручен на 20° по C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> связи (торсионный угол  $\theta_3 = -160^\circ$ ), а также незначительно скручен по другим связям полиеновой цепи [181]. Это предварительное скручивание, возникающее из-за взаимодействия хромофорной группы с белковым окружением, определяет селективность изомеризации ретиналя именно по C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> связи. Можно отметить, что ПШО полностью-*транс* ретиналя в вакууме планарно [188] и при возбуждении может изомеризоваться по разным двойным связям. При возбуждении ретиналя в

БР, также, как и в Р, растворе и вакууме, происходит инверсия двойных С=С и одинарных С-С связей ретиналя, и начальное движение волнового пакета из ФК состояния определяется С-С и С=С колебательными модами [189]. В результате этого движения волновой пакет попадает в область неглубокого минимума на  $S_1$  ППЭ, соответствующего интермедиату  $I_{460}$  (Рисунок 1.12). Этот интермедиат также называется флуоресцентным состоянием, поскольку из него наблюдаются сигналы поглощения и испускания света. Сигналы  $S_n \leftarrow S_1$  поглощения наблюдаются в области 470 нм [54, 95, 166], а сигналы  $S_3 \leftarrow S_1$  поглощения предполагаются в области 750 нм [94]. Сигналы флуоресценции ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) наблюдаются в области ~740 нм [96, 190], а сигналы вынужденного испускания ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) – в области 850 нм [167, 168, 191]. После образования интермедиата  $I_{460}$  активируются НООР и торсионные колебательные моды, которые направляют реакцию. В результате волновой пакет преодолевает барьер на  $S_1$  ППЭ через так называемое переходное состояние с торсионным углом  $\theta_3 = -140^\circ$  и приближается к довольно протяженной области CI  $S_1/S_0$  ППЭ, в которой угол  $\theta_3$  меняется от  $-120^\circ$  до  $-90^\circ$  [181]. Выход из этой области сопряжен с  $S_1 \rightarrow S_0$  переходом, либо с дальнейшим поворотом  $C_{13}=C_{14}$  связи до  $-20^\circ$  (13-цис ретиналь), либо с возвращением ретиналя в исходное состояние БР<sub>568</sub> (полностью-транс ретиналь).



**Рисунок 1.12** – Схема поверхностей потенциальной энергии, принимающих участие в фотореакции бактериородопсина

Общий механизм фотоизомеризации ретиналя в БР, также, как и в Р, представляет собой асинхронное движение по типу «велосипедных педалей» с сохранением занимаемого объема. При этом связь  $C_{13}=C_{14}$  поворачивается против часовой стрелки на  $140^\circ$ , а связи  $C_{15}=N$  и  $C_{11}=C_{12}$  поворачиваются по часовой стрелке на  $-36^\circ$  и  $-21^\circ$ , соответственно [181]. Это облегчает изомеризацию в ограниченном объеме хромофорного центра, которая завершается при образовании интермедиата  $J_{625}$ . Как и в случае Р, в БР методами низкотемпературной спектроскопии и QM/MM моделирования не было найдено доказательств того, что интермедиат  $J_{625}$  представляет собой отдельный интермедиат фотоцикла, он может являться колебательно-возбужденным состоянием интермедиата  $K_{590}$ .

Реакция фотоизомеризации ретиналя в БР, также как в Р, является когерентной. Такой вывод был сделан на основе таких параметров реакции как: (1) высокая скорость (450–500 фс), (2) высокий квантовый выход (0,64), (3) наблюдения на временах до 1 пс осцилляций сигналов вынужденного испускания из возбужденного состояния с частотой  $170\text{ см}^{-1}$  [192] и  $950\text{--}1000\text{ см}^{-1}$  [178], отражающих динамику волнового пакета, (4) возможности когерентного управления квантовым выходом реакции с изменением его на  $\pm 20\%$  [193]. В отличие от Р, осцилляции сигналов первичных продуктов фотореакции – интермедиата  $J_{625}$  и исходного состояния  $BR_{568}$ , не наблюдаются. Вероятно, это связано с тем, что наличие небольшого барьера на  $S_1$  ППЭ замедляет фотореакцию и приводит к значительной потере волновым пакетом его когерентных свойств.

Для БР также характерен дополнительный канал распада возбужденного состояния в пикосекундном масштабе времени, который не связан с изомеризацией ретиналя [94, 96, 97, 173–175, 194, 195]. Микробиальные родопсины, также как ПШО ретиналя в растворе [196], часто характеризуются дополнительными путями распада возбужденного состояния, некоторые из которых нереакционны, то есть, не приводят к изомеризации ретиналя. Это связывают с разветвлением пути реакции во ФК состоянии [196–201] или с исходной гетерогенностью белка и/или ретиналя [94, 97, 98, 101, 169, 198]. Различные модели, объясняющие этот многокомпонентный процесс, представлены в обзорах [99, 100].

#### 1.4. Фотохромизм родопсинов 1 и 2 типа

Известно, что РСБ обладают фотохромными свойствами [6, 7, 14–17, 104, 202, 203]. Фотохромизм – это обратимый фотопереход химического или биохимического вещества между двумя формами, имеющими разные спектры поглощения. Для РСБ характерно образование промежуточных продуктов с максимумами поглощения, отличающимися от исходной формы белка (Рисунки 1.6 и 1.11), из которых возможен фотопереход в исходное состояние. При этом в

большинстве случаев при обратной фотореакции никаких промежуточных продуктов не образуется [6, 204].

Способность РСБ к фотохромизму используется в природе в ряде белков для выполнения определенных физиологических функций. К таким РСБ можно отнести некоторые родопсины 1 типа, выполняющие сенсорные функции. Например, сенсорный родопсин I *H. salinarum* использует для передачи сигнала отрицательного фототаксиса фотохромный переход из исходного состояния при возбуждении красным/зеленым светом в долгоживущий интермедиат со временем жизни 650 мс и обратно при возбуждении ультрафиолетовым светом [8]. Интересно отметить, что поглощение только одного кванта света сенсорным родопсином I запускает передачу сигнала положительного фототаксиса. Для сенсорного родопсина ASR, как было сказано ранее (Пункт 1.1.), характерно наличие двух стабильных форм белка, содержащих полностью-*транс* и 13-*цис* ретиналь, между которыми осуществляются фотопереходы, что позволяет этому белку функционировать как фотохромный сенсор. Оранжевый свет инициирует активацию фотосинтетического аппарата бактерии, в то время как синий – инактивацию [10]. Канальный родопсин одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* может находиться в двух формах, содержащих полностью-*транс* и 13-*цис* ретиналь, соответственно, каждая из которых может при поглощении кванта света перейти в состояние, проводящее катионы, но с разной селективностью и проводимостью [11]. Между исходными формами возможны фотохромные переходы, которые служат для регуляции работы белка при разных условиях освещенности.

Среди родопсинов 2 типа также встречаются белки, использующие фотохромные переходы для выполнения своих функций. Это, например, бистабильные родопсины 2 типа – зрительные родопсины беспозвоночных и близкородственные им меланопсины позвоночных, осуществляющие незрительные фоторецепторные функции [9]. В бистабильных родопсинах поглощение первого кванта света приводит к фотоизомеризации ретиналя и образованию стабильного продукта (кислой формы метародопсина), который при поглощении второго кванта света в более длинноволновом диапазоне переходит в исходное состояние путем обратной фотоизомеризации (фоторегенерации). Для родопсина осьминога такие фотохромные переходы были продемонстрированы при комнатной температуре в минутном [12] и секундном [13] диапазоне времен.

Для зрительных родопсинов позвоночных, в отличие от беспозвоночных, не характерна фоторегенерация. Регенерация исходной формы Р представляет собой сложный каскад темновых биохимических реакций. Тем не менее, фоторегенерация может быть осуществлена *in vitro*. Поглощение второго кванта света продуктом фотолиза Р может привести к обратной

*транс* → *цис* изомеризации ретиналя и образованию стабильного при комнатной температуре состояния, содержащего 11-*цис* ретиналь, с незначительной примесью изородопсина, содержащего 9-*цис* ретиналь [6]. Процесс фоторегенерации может наблюдаться со всех стадий фотолиза. В работе [17] была описана попытка осуществить обратимое сверхбыстрое фотопереключение из продукта Р, Бато<sub>535</sub>, под действием фемтосекундных (300 фс) лазерных импульсов, но с разрешением по зондированию 50 пс.

БР в процессе работы не требуется фоторегенерация, поскольку ретиналь на одной из последних стадий фотоцикла (при N<sub>560</sub> → O<sub>640</sub> переходе) претерпевает тепловую изомеризацию в исходную полностью-*транс* форму. Но можно осуществить фотохромные переходы с разных стадий фотоцикла [7, 14–16, 203]. Например, для БР была продемонстрирована обратная фотореакция из продукта K<sub>590</sub> в пико- [16] и наносекундном [15] диапазоне времен.

Изучение фотохромных реакций с разных этапов фотопреобразования является одним из экспериментальных подходов к изучению механизма фотохимической реакции и последующих процессов темновой 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 случае Р такое исследование особенно важно на временах до ~2 пс, когда в системе присутствует когерентность различных колебательных состояний в продукте Фото<sub>570</sub>, поскольку это вероятно позволит задействовать различные когерентные эффекты фотореакции. В настоящий момент фотохромизм РСБ, в том числе Р и БР, в фемто- и раннем пикосекундном диапазоне времен подробно не исследован.

Интерес к изучению фотообратимых реакций РСБ в последнее время возрос в связи с тем, что они могут рассматриваться в качестве прообраза для создания оптических устройств для записи, передачи и хранения информации, поскольку эти белки являются почти идеальными фотопереключателями из-за своего высокого квантового выхода, большой разницы в максимумах поглощения реагента и продукта, а также благодаря самой способности к фотопереключению. Например, в настоящее время относительно долгоживущие интермедиаты фотоцикла БР, M<sub>412</sub> и искусственно созданный Q<sub>380</sub>, активно используются в качестве практических приложений для функционирования оптической объемной памяти в миллисекундном временном диапазоне при комнатной температуре [205]. Интермедиат Q<sub>380</sub> не характерен для природного фотоцикла БР, а образуется путем дополнительного возбуждения интермедиата O<sub>640</sub>. Используемый в данных изобретениях способ фотопереключения БР приводит к долгоживущим промежуточным продуктам, пригодным для длительного хранения информации. Но с точки зрения возможности достижения максимального быстродействия при

создании современных оптических устройств наиболее привлекательным является использование ранних стадий ф/и превращений БР и других РСБ.

Можно заключить, что благодаря своим фотохромным свойствам РСБ хорошо подходят для использования в различных технических приложениях. Это зрительные пигменты родопсины беспозвоночных и позвоночных животных, сенсорные родопсины и светозависимые ионные насосы микроорганизмов. Возможно использование рекомбинантных белков, различных мутантных и модифицированных форм белков, причем модификации могут касаться как полипептидной части молекулы, так и хромофора. Сходство строения молекул различных РСБ и механизмов фотопревращений, связанных с изомеризацией ретиналя, дают основание считать, что предлагаемым способом может быть осуществлено сверхбыстрое фотопереключение любого РСБ, независимо от его происхождения. Перспективным является использование и других материалов, содержащих ретиналь в качестве хромофора. Например, в работе [206] показана возможность фотоизомеризации ретиналя в модифицированных детергентом слоях бентонитовой глины.



## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Получение образцов родопсина и бактериородопсина

НСП сетчатки глаз быка (*Bos taurus*), диски фоторецепторных мембран и детергентные экстракты Р были получены методами, разработанными в лаборатории физико-химических основ рецепции ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН на основе методов Смита и Окады [58, 59]. Реактивы были приобретены в Sigma (St. Louis, USA), Fluka (Switzerland), и Anatrace (Maumee, USA).

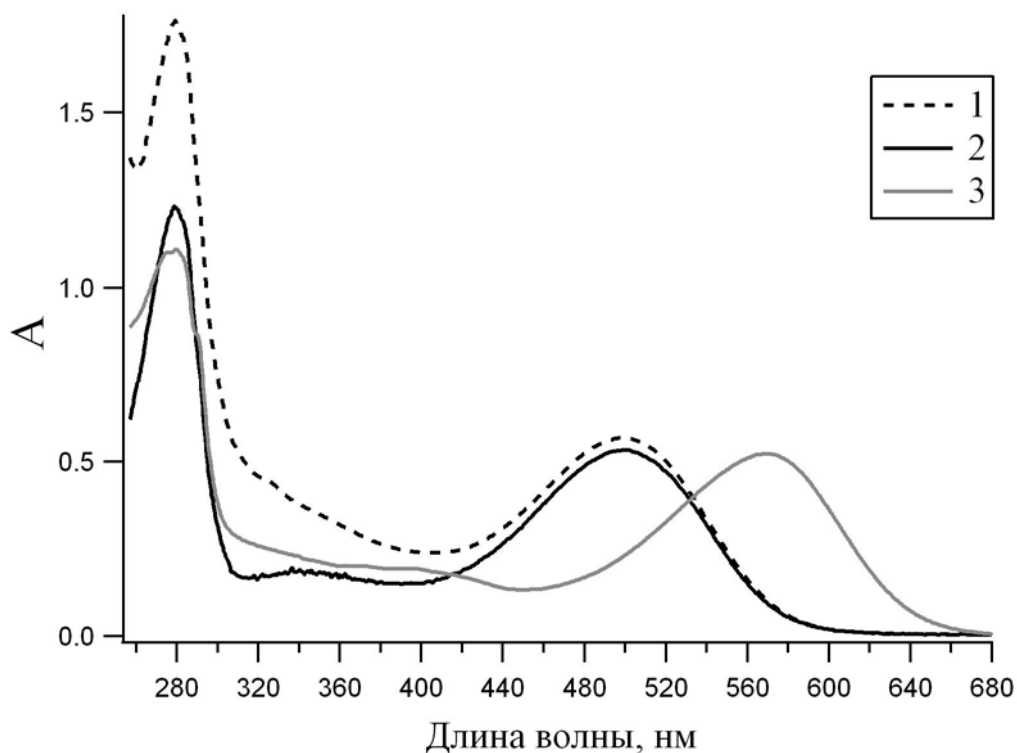
**Выделение наружных сегментов палочек сетчатки из глаз быка.** К сетчаткам, выделенным из бычьих глаз не позднее 3-х часов после забоя, добавляли 50%-й раствор сахарозы, приготовленный на буфере «А» (10 мМ MOPS, pH 7,5, 30 мМ NaCl, 60 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфлюорид, 1 мМ дитиотреитол (DTT), 0,01% NaN<sub>3</sub>), из расчета 1 мл на сетчатку. Суспензию интенсивно встряхивали в течение трех минут и центрифугировали на центрифуге Beckman Coulter Avanti J30I (ротор JS 7,5, 2000 g, 40 мин, 4 °C). После этого супернатант разбавляли в 2,5 раза буфером «А» и центрифугировали аналогично, но в течение 60 мин. Полученный осадок ресуспендировали с 25 мл 40%-го раствора сахарозы, приготовленного на буфере «А», сверху наслаивали 10 мл буфера «А» и центрифугировали на центрифуге Beckman Coulter Avanti J30I (ротор JS 24,38, 24700 g, 60 мин, 4 °C). Фракцию НСП отбирали на границе буфер-сахароза, разбавляли буфером «Б» (5 мМ TRIS/HCl, pH 8,0, 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 0,01% NaN<sub>3</sub>) до удельной плотности 1,05 г/см<sup>3</sup> и регистрировали спектр поглощения полученной суспензии на спектрофотометре Shimadzu (UV-1700, Япония) (Рисунок 2.1, кривая 1).

С учетом светорассеяния, чистота по белку составила  $A_{280}/A_{500} \approx 2,0-2,7$ , а эффективность выделения Р –  $\sim 0,6$  мг на 1 сетчатку. НСП осаждали путем центрифугирования на центрифуге Beckman Coulter Allegra 64R (ротор F 0650, 41400 g, 30 мин, 4 °C). Осадок НСП замораживали при -80 °C.

**Приготовление дисков фоторецепторных мембран.** Осадок НСП размораживали, заливали 50 мл 0,01%-м раствора NaN<sub>3</sub>, тщательно ресуспендировали и оставляли инкубироваться на 30 мин при регулярном перемешивании и 20 °C. Затем суспензию центрифугировали на центрифуге Beckman Allegra 64R (ротор F 0650, 41400 g, 30 мин, 4 °C). Супернатант сливали, а осадок использовали для приготовления детергентных экстрактов Р. Процедура приготовления дисков была проведена два раза.

**Приготовление детергентных экстрактов родопсина.** Диски фоторецепторных мембран ресуспендировали с 1,6%-м раствором н-нонил- $\beta$ -D-гептилтиоглюкозида (НТГ), приготовленным на буфере «В» (0,1 М Na-ацетат, pH 6,0, 0,1 М Zn-ацетат, 0,01% NaN<sub>3</sub>), из

расчета 0,8 мл раствора на 1 мг Р, и инкубировали 3 ч при 20 °С и 12 ч при 4 °С. НТГ является нейтральным детергентом, который сохраняет липидное окружение Р, а также позволяет осуществлять селективную экстракцию и получать высокоочищенные экстракты этого белка [59]. Длительная инкубация была необходима для экстракции Р из дисков в мицеллы НТГ в присутствии высокой концентрации двухвалентных катионов  $Zn^{+2}$ . Суспензию центрифугировали на центрифуге Beckman Allegra 64R (ротор F 0650, 41400 g, 30 мин, 4 °С). Супернатант, содержащий мицеллы НТГ с Р, фильтровали через фильтры Millipore (Millex GS 0,22 мкм) для уменьшения светорассеяния. Спектр поглощения экстракта Р приведен на Рисунке 2.1 (кривая 2). Далее образец концентрировали с использованием центрифужных фильтров Millipore (Amicon Ultracell 30k) при центрифугировании на центрифуге Avanti J30I (ротор JS 7,5, 2000 g, 25 мин, 4 °С).



**Рисунок 2.1** – Спектры поглощения суспензии НСП (1), НТГ-экстракта родопсина (2) и суспензии пурпурных мембран, содержащих бактериородопсин (3)

В результате были получены НТГ-экстракты Р с концентрацией  $C = 3-7$  мг/мл, чистотой  $A_{280}/A_{500} = 1,6-1,9$  и поглощением  $A_{500} = 3-7$  единиц оптической плотности (еоп.). Эффективность экстракции составила 70%. Полученные НТГ-экстракты Р в Na-ацетатном буфере при pH 6,0 были использованы во время-разрешенных экспериментах. Для нейтрализации полностью-транс ретиналя, высвобождающегося из белка в процессе фотолиза,

непосредственно перед экспериментами к образцам Р был добавлен стоковый раствор гидроксилamina ( $2 \text{ M NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ,  $2 \text{ M NaHCO}_3$ ) до конечной концентрации в образце  $0,1 \text{ M}$ .

**Приготовление суспензии пурпурных мембран, содержащих бактериородопсин.** Галоархеи (*H. salinarum*) были выращены на основе штамма ET1001 в ОАО ЦНИТИ "Техномаш" (121108, РФ, Москва, ул. Ивана Франко, д. 4). Пурпурные мембраны были предоставлены Офисом ОАО ЦНИТИ "Техномаш". Образец представлял собой суспензию пурпурных мембран в Na-фосфатном буфере ( $25 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7,0$ ). Концентрация БР составила  $C = 1,6 \text{ мг/мл}$ , коэффициент чистоты –  $A_{280}/A_{568} = 1,8$  и поглощение –  $A_{568} = 3,7$  еоп. Спектр поглощения суспензии пурпурных мембран приведен на Рисунке 2.1 (кривая 3). Перед время-разрешенными экспериментами образец был обработан ультразвуком мощностью  $90 \text{ W}$  в течение  $2\text{--}3$  мин, также проводилась световая адаптация БР при облучении светом галогеновой лампы (КГМ24-250,  $24 \text{ В}$ ,  $250 \text{ Вт}$ ) с использованием фильтров ЖЗС-19 и ЗС-8, выделяющих спектральный диапазон  $500\text{--}600 \text{ нм}$ . Степень световой адаптации проверялась спектрально по сдвигу максимума поглощения от  $560 \text{ нм}$  (ТА форма БР<sub>568</sub>) к  $568 \text{ нм}$  (СА форма БР<sub>568</sub>).

## 2.2. Метод стационарной абсорбционной спектроскопии

Стационарные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Shimadzu UV–1601PC» (Япония) в видимой и ультрафиолетовой областях в кварцевых кюветах Hellma с длиной оптического пути  $0,1$  и  $1 \text{ см}$ .

## 2.3. Метод фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии

Данные, представленные в работе, были получены на экспериментальных установках, созданных в лаборатории био- и нанофотоники ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН. Экспериментальные установки являются лазерными системами, предназначенными для выполнения экспериментов методами «возбуждение-зондирование» и «возбуждение-возбуждение-зондирование» фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии.

Метод фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии широко используется для экспериментального изучения динамики ф/и реакций в различных белках. Это связано с тем, что многие фотореакции протекают в возбужденном состоянии через ряд промежуточных продуктов, время жизни которых находится в фемто- и пикосекундном временных диапазонах.

В рамках метода «возбуждение-зондирование» используются три фемтосекундных импульса: один возбуждающий и два зондирующих (Пункт 2.3.1.). Первый импульс (возбуждающий) переводит изучаемую систему в возбужденное состояние. Через некоторое время  $t$  второй импульс со значительно меньшей энергией («пробный» импульс, зондирующий

1) регистрирует изменения, произошедшие в молекулярной системе за это время. Третий импульс («опорный» импульс, зондирующий 2), идентичный второму импульсу, также проходит через образец через время  $t$ , но в области, не подверженной действию возбуждающего импульса. Время задержки  $t$  задается длиной оптического пути возбуждающего импульса и варьируется в ходе эксперимента. В результате регистрируются дифференциальные спектры ф/и поглощения образца:

$$\Delta A(\lambda; t) = A(\lambda; t) - A_0(\lambda), \quad (2.1)$$

где  $A(\lambda; t)$  – поглощение образца, индуцированное возбуждающим импульсом,  $A_0(\lambda)$  - поглощение образца, не подверженного действию возбуждающего импульса,  $\lambda$  - длина волны зондирующего импульса,  $t$  – временная задержка между возбуждающим и зондирующими импульсами.

Таким образом, экспериментальные данные, зарегистрированные при действии фемтосекундного импульса, представляют собой зависимость дифференциального ф/и поглощения образца от времени задержки  $t$  и длины волны зондирования  $\lambda$ . Этот метод был использован для изучения прямой фотореакции исследуемых белков.

Метод «возбуждение-возбуждение-зондирование» (Пункт 2.3.2.) был использован для изучения обратной фотореакции исследуемых белков. В рамках этого метода к описанной выше последовательности фемтосекундных импульсов добавляется еще один возбуждающий импульс (импульс II), который следует за первым возбуждающим импульсом (импульс I) с временной задержкой  $t_{II}$ . При этом регистрируются дифференциальные спектры ф/и поглощения образца после действия двух возбуждающих импульсов в зависимости от времени задержки импульса II ( $t_{II}$ ) и зондирующего импульса ( $t$ ):

$$\Delta A(\lambda; t_{II}; t) = A(\lambda; t_{II}; t) - A_0(\lambda). \quad (2.2)$$

Экспериментальные установки, использованные в работе, позволили зарегистрировать с временным разрешением 20–30 фс в широком спектральном диапазоне зондирования 400–900 нм:

1. сигналы ф/и поглощения Р при возбуждении импульсом I (500 нм);
2. сигналы ф/и поглощения Р при возбуждении импульсами I (500 нм) и II (620 нм);
3. сигналы ф/и поглощения БР при возбуждении импульсом I (560 нм);
4. сигналы ф/и поглощения БР при возбуждении импульсами I (560 нм) и II (680 нм).

Экспериментальные установки состояли из следующих частей:

- 1) задающий генератор фемтосекундных импульсов, нелинейно-оптические преобразователи, предназначенные для приготовления возбуждающих и зондирующих импульсов;

2) оптико-механические элементы линии задержки и оптической схемы ввода-вывода импульсного излучения в образец;

3) монохроматор с многоканальным спектральным детектором (CCD камера).

Работа установок контролировалась по заданной программе компьютером, через работу которого обеспечивались сбор, хранение и первичная обработка спектральных данных.

### 2.3.1. Метод «возбуждение-зондирование»

**Генерация фемтосекундных импульсов.** Фемтосекундные импульсы генерировались в твердотельном титан-сапфировом лазере Spectra Physics «Tsunami» (длительность  $\Delta\tau = 80$  фс, энергия  $E = 0,8$  нДж, длина волны  $\lambda = 802$  нм и частота  $f = 80$  МГц) с накачкой непрерывным излучением твердотельного лазера с диодной накачкой Spectra Physics «MilleniaVs» ( $\lambda = 530$  нм, мощность  $P = 4,65$  Вт). Далее импульсы усиливались в регенеративном усилителе Spectra Physics «Spitfire» с накачкой излучением лазера Spectra Physics «Evolution X» ( $P = 8$  Вт,  $\lambda = 527$  нм,  $f = 1$  КГц,  $\Delta\tau = 150$  нс). При этом импульсы попадали в регулятор дисперсии групповой скорости (ДГС, стрэтчер), где их длительность существенно увеличивалась до 700–800 пс в зависимости от начальной длительности. Из стрэтчера излучение направлялось непосредственно в лазерный регенеративный усилитель. После усиления, импульсы попадали в компрессор, где они сжимались до  $\sim 85$  фс. Таким образом, были приготовлены фемтосекундные импульсы с параметрами:  $P = 0,05$  Вт,  $\Delta\tau \approx 85$  фс,  $E = 1200$  мкДж,  $\lambda = 802$  нм и  $f = 50$  Гц. Схема приготовления этих исходных фемтосекундных импульсов представлена на Рисунке 2.2.

**Разделение импульсов на возбуждающий и зондирующий.** Чтобы обеспечить синхронизацию импульсов возбуждения и зондирования, эти импульсы генерировали, используя один базовый задающий импульс. Задающий импульс делили на два пучка с помощью полупрозрачного зеркала (Рисунок 2.3). Один пучок был предназначен для приготовления возбуждающих импульсов, а другой – зондирующих.

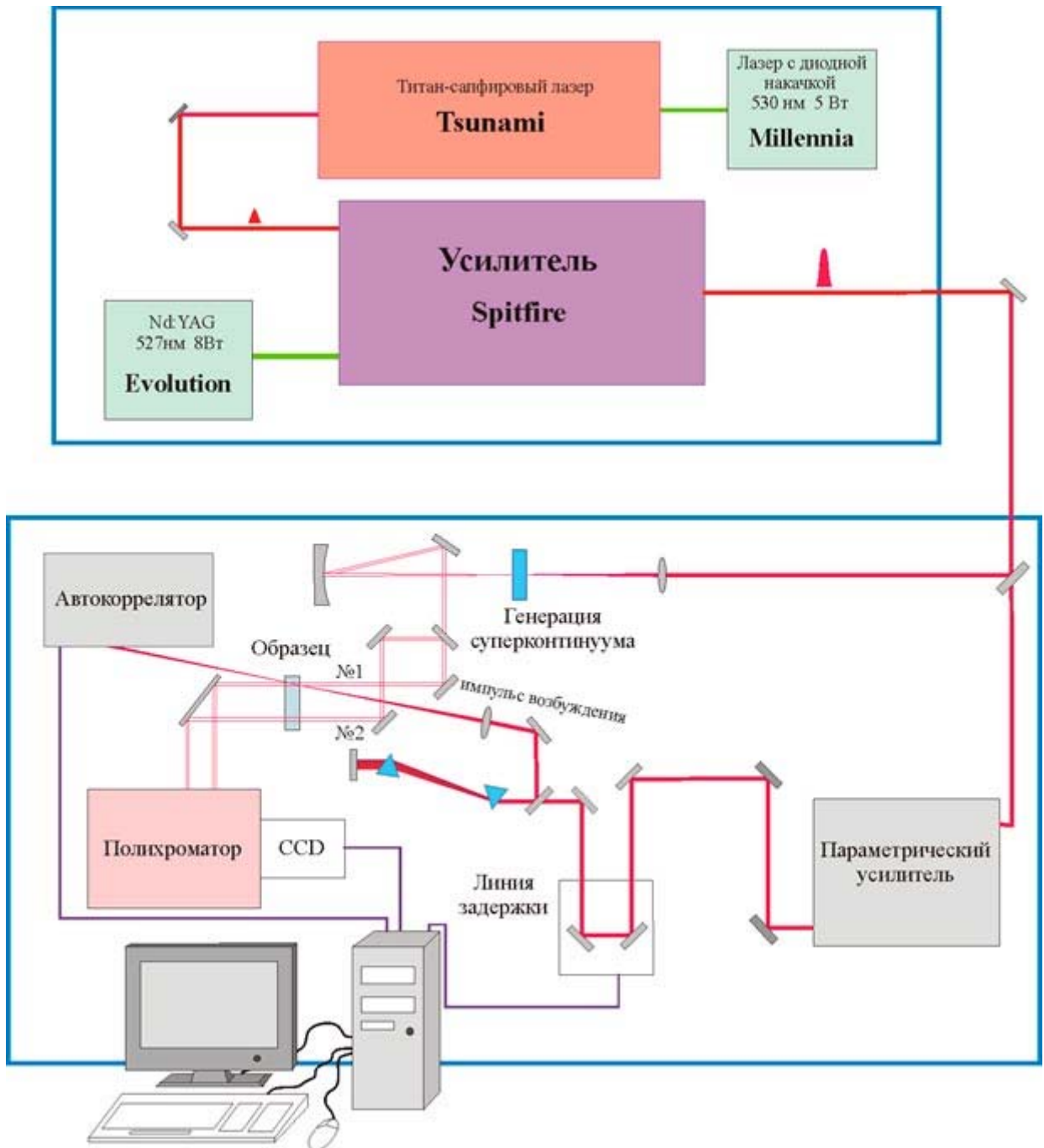
В зависимости от условий эксперимента пучок, предназначенный для приготовления возбуждающих импульсов, усиливали и преобразовывали частоту с использованием нелинейно-оптических кристаллов. С этой целью использовался неколлинеарный параметрический усилитель света Clark MXR «NOPA», который преобразовывал несущую длину волны  $\lambda = 802$  нм в длину волны  $\lambda = 500$  нм в экспериментах с Р и в длину волны  $\lambda = 560$  нм в экспериментах с БР, что соответствовало  $\alpha$ -полосе поглощения исследуемых белков. Энергия таких фемтосекундных импульсов составила  $E = 70$ – $120$  нДж, длительность –  $\Delta\tau = 20$ – $30$  фс, спектральная ширина на полувысоте –  $\Delta\lambda_{1/2} = 15$  нм и диаметр –  $d = 300$  мкм.



**Рисунок 2.2** – Схема приготовления исходных фемтосекундных импульсов

Используемые в работе низкие значения энергии возбуждающих импульсов ( $E \approx 5$  Дж/м<sup>2</sup>, менее 0,2 фотона на молекулу) соответствовали физиологическим условиям освещенности, что позволяло исследовать фотопревращения исследуемых белков после однофотонного поглощения [207, 208].

**Приготовление зондирующих импульсов белого суперконтинуума.** Импульс в канале зондирования ослабляли до энергии  $\sim 0,5\text{--}2$  мкДж и фокусировали в кювету с чистой водой, где генерировался импульс суперконтинуума со спектральным диапазоном 400–900 нм и полной энергией менее 10 нДж (Рисунок 2.3). Толщина кюветы (3 мм) подбиралась таким образом, чтобы обеспечить наиболее устойчивое преобразование усиленного импульса в излучение суперконтинуума. Чтобы исключить повреждение за счет оптического пробоя, а также влияние дисперсионных и нелинейных характеристик материала, окна кюветы были изготовлены из тонкого (100 мкм) плавленого кварца КУ-1. Для контроля поляризации суперконтинуума, перед кюветой с водой лазерный импульс основной длины волны пропускаться через поляризационный аттенуатор, состоящий из волновой пластины  $\lambda/2$  и поляризатора. Оптическая ось поляризатора поворачивалась относительно оси поляризации возбуждающего пучка на угол  $54,7^\circ$  («магический угол»). Посредством вращения волновой пластины осуществлялась тонкая регулировка энергии основной длины волны, необходимой для стабильной генерации импульса суперконтинуума.

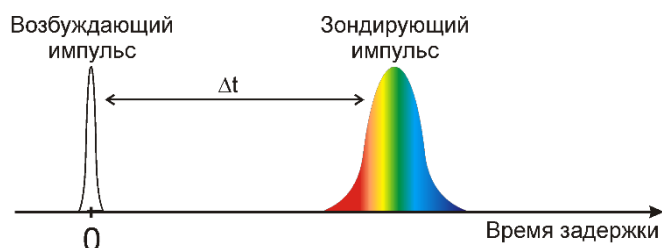


**Рисунок 2.3** – Схема экспериментальной установки для изучения прямой фотореакции родопсина и бактериородопсина методом «возбуждение-зондирование» фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии

Полученный таким образом импульс суперконтинуума делился на два канала. Лучи фокусировались в кювете с исследуемым веществом с пространственным разномом в кювете друг относительно друга 3–4 мм. Один луч являлся «пробным» (импульс 1) и пересекался в кювете с возбуждающим импульсом, а второй луч являлся «опорным» (импульс 2), он не пересекался в кювете с возбуждающим импульсом и был необходим для получения дифференциальных спектров и учета аппаратной функции системы регистрации (выражение (2.1), Рисунок 2.3).

Импульс суперконтинуума позволяет получать набор широких спектров, разрешенных во времени, но обладает одной особенностью, которую надо учитывать при обработке данных [209], – он имеет фазовую модуляцию. Поэтому разные спектральные компоненты суперконтинуума приходят в образец в разное время. Такой импульс называется чирпированным. В процессе обработки экспериментальных данных эта особенность импульса суперконтинуума учитывалась (Пункт 2.3.4.).

**Линия задержки.** Импульсы пучка возбуждения задерживали относительно зондирующего импульса с помощью линии оптико-механической задержки, состоящей из точного полого ретрорефлектора, установленного на подвижной платформе. Подвижная платформа управлялась шаговым мотором, что позволяло задерживать возбуждающий импульс относительно зондирующего в диапазоне 0–600 пс с минимальным шагом 3,3 фс (Рисунок 2.3). В экспериментах с Р задержка между возбуждающим и зондирующим импульсами составила 0–5 пс (с шагом 3,3 фс) и 5–10 пс (с шагом 10 фс), в экспериментах с БР – 0–3 пс (с шагом 3,3 фс) и 3–10 пс (с шагом 10 фс). При этом были зарегистрированы спектры ф/и поглощения исследуемых белков с накоплением сигнала по 50 спектрам. Последовательность импульсов показана на Рисунке 2.4.



**Рисунок 2.4** – Временная последовательность прихода импульсов возбуждения и зондирования (импульса суперконтинуума) в образец при схеме эксперимента «возбуждение-зондирование». Рисунок модифицирован из работы [210]

**Фемтосекундное возбуждение образцов и регистрация сигналов.** Экспериментальный образец размещался внутри самодельной прокачиваемой кюветы. Длина оптического пути внутри кюветы могла регулироваться в диапазоне 0–2 мм. В наших экспериментах она составляла 0,2–0,5 мм. Диаметры возбуждающего и зондирующего лучей составляли 300 и 150 мкм соответственно. Чтобы исключить повреждение за счет оптического пробоя, а также влияние дисперсионных и нелинейно оптических характеристик материала, окна кюветы были изготовлены из тонкого (100 мкм) плавленого кварца КУ-1. Для прокачки кюветы, в зависимости от экспериментального образца, мог использоваться либо самодельный центробежный микронасос, либо эксцентриковый шестеренчатый микронасос Micropump mzg-7223. В первом случае, объем прокачиваемого раствора составлял 5–7 мл, во втором – 0,9–3 мл. Исследуемые



образцы прокачивались через кювету со скоростью 6–10 мл/мин. Прокачка обеспечивала условия, при которых повторное возбуждение образца было исключено.

После прохождения кюветы оба луча зондирования – «пробный» и «опорный» попадали в полихроматор «Acton SP-300», работающий на основе дифракционной решетки и CCD-камеры («Roper Scientific SPEC-10»). Спектры «пробного» и «опорного» канала регистрировались с помощью многоканальных светоприёмников, оцифровывались с помощью АЦП и поступали в компьютер для первичной обработки.

Управление экспериментом осуществлялось ЭВМ при помощи разработанной в лаборатории био- и нанофотоники ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН программы в унифицированной среде управления приборами LabView. Обработка экспериментальных результатов проводилась с помощью программы Span (*Shareware: Belousov, Verzakov*), которая является приложением к программному пакету Matlab, а также с помощью программ Igor Pro и Origin.

Для получения спектров дифференциального ф/и поглощения в ходе эксперимента луч возбуждения при каждом времени задержки дополнительно перекрывался механическим затвором.

Анализируемые спектры дифференциального ф/и поглощения вычислялись с использованием выражения (2.3) [211]:

$$\Delta A = \lg(I_1/I_2)^* - \lg(I_1/I_2)^\circ, \quad (2.3)$$

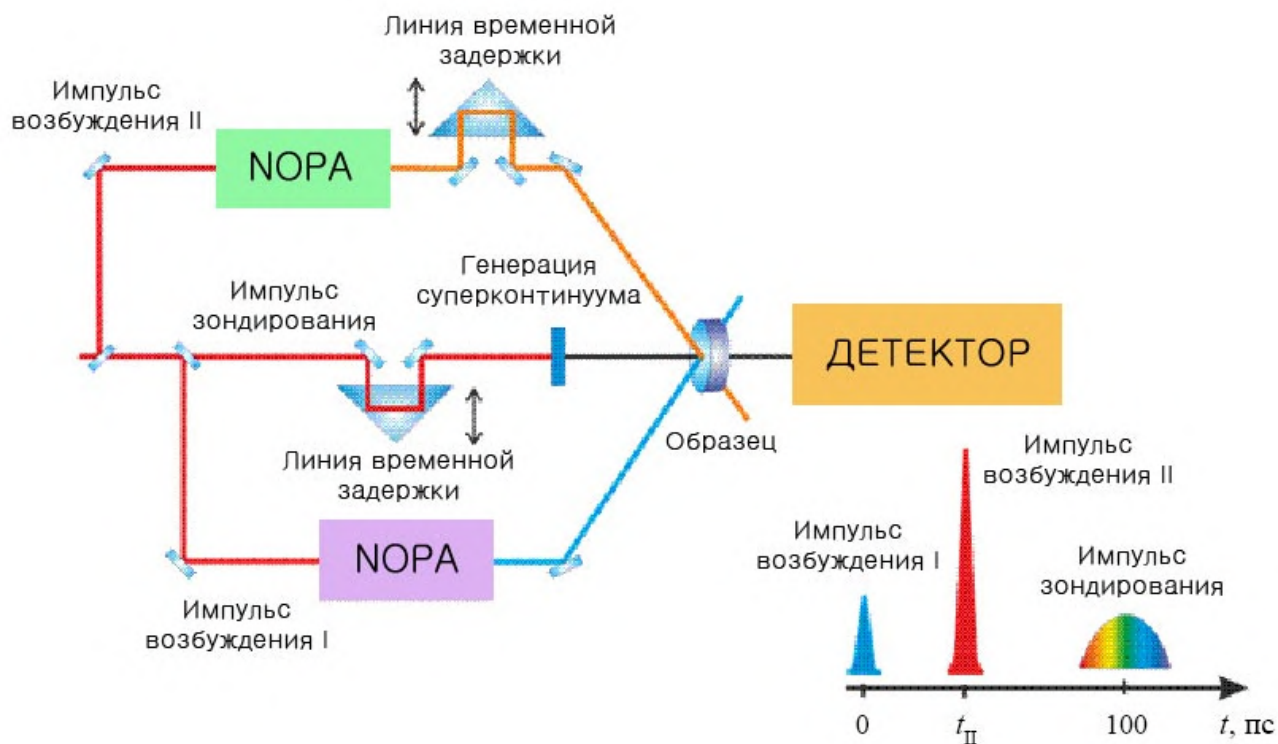
где  $I_1$  и  $I_2$  – интенсивности зондирующих импульсов 1 и 2, соответственно, измеряемые при открытом (\*) и закрытом (°) затворе накачки. Таким образом проводилось измерение ф/и поглощения с учетом разницы двух каналов зондирующих импульсов. Измерения при «закрытом» канале обеспечивали учет темнового заряда в фотодетекторе. Для каждого значения времени задержки между возбуждением и зондированием проводилось накопление из 50 спектров, а в некоторых случаях накопление увеличивалось до 5000–10000 спектров при регистрации дифференциальных спектров ф/и поглощения образцов на времени задержки 100 пс. Эти дифференциальные спектры регистрировались в начале, в конце и в некоторые моменты в середине эксперимента, что давало возможность отследить и учесть степень деградации образца в процессе эксперимента. В работе использовались данные экспериментов, в которых образец деградировал не более чем на 10%. При этом проводилась соответствующая коррекция данных.

Описанная выше методика обеспечивала среднюю по спектру чувствительность  $5 \cdot 10^{-4}$  еоп. При последующей обработке производилась коррекция спектров с учетом временной задержки спектральных компонент суперконтинуума. За ноль времени задержки принимался момент

максимального перекрытия импульсов возбуждения и зондирования на данной длине волны. Для учета вклада в измеряемый сигнал раствора, в котором находился исследуемый белок, проводились эксперименты с прокачкой контрольного раствора. В некоторых случаях в качестве дополнительного контроля были зарегистрированы сигналы  $\Delta A(\lambda; t)$  экстракта Р до и после его полного обесцвечивания.

### 2.3.2. Метод «возбуждение-возбуждение-зондирование»

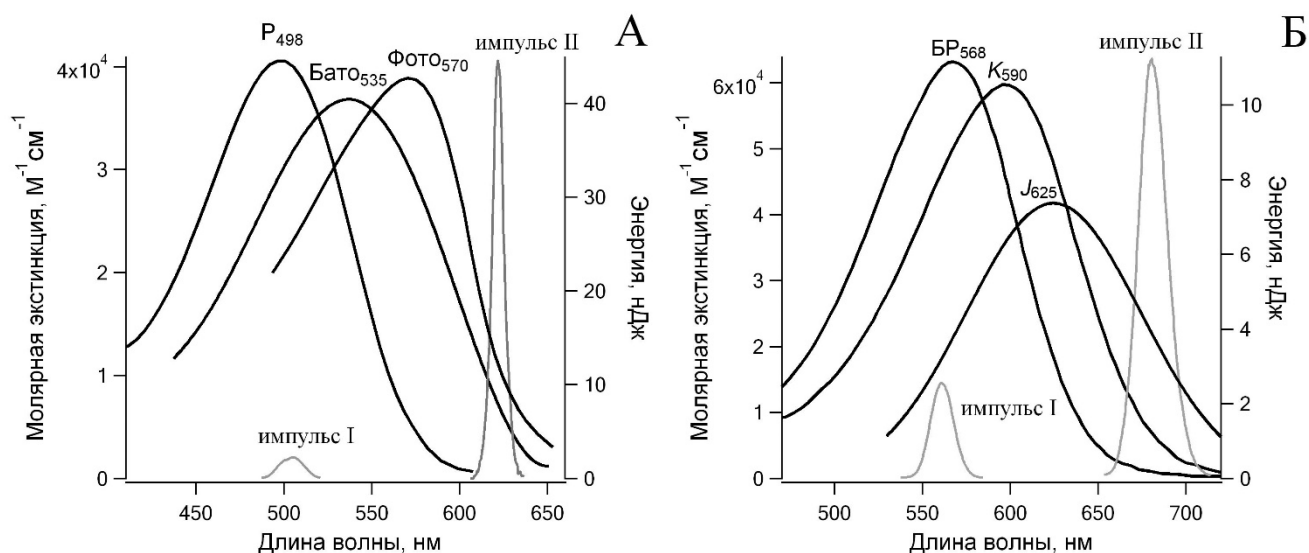
Для исследования обратной фотореакции Р и БР была разработана фемтосекундная лазерная система с двумя возбуждающими импульсами I и II и зондирующим импульсом суперконтинуума (импульс III) (Рисунок 2.5) [212]. Приготовление импульсов I и III были описаны ранее (Пункт 2.3.1.).



**Рисунок 2.5** – Часть схемы экспериментальной установки для изучения обратных фотореакций родопсина и бактериородопсина методом «возбуждение-возбуждение-зондирование» фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии, демонстрирующая приготовление конечных импульсов возбуждения и зондирования, прохождение этих импульсов через образец и регистрацию сигналов. Одна из использованных в работе временных последовательностей прихода импульсов в образец приведена справа внизу

Импульс II генерировался неколлинеарным параметрическим усилителем (Topas-white-SHS). Его параметры составили:  $\lambda = 620$  и  $680$  нм,  $E = 700$  и  $560$  нДж,  $\Delta t = 25$  и  $20$  фс,  $\Delta\lambda_{1/2} = 8$  и  $20$  нм и  $d = 180$  мкм в случае Р и БР, соответственно. Спектральные характеристики и энергия

импульса II были подобраны таким образом, чтобы возбуждать преимущественно продукты прямой фотореакции исследуемых белков – Фото<sub>570</sub> или Бато<sub>535</sub> ( $\lambda = 620$  нм) и интермедиаты  $J_{625}$  или  $K_{590}$  ( $\lambda = 680$  нм) в зависимости от времени задержки импульса II (Рисунок 2.6). Как видно из Рисунка 2.6, спектры импульса II и исходного состояния исследуемых белков,  $P_{498}$  и  $BP_{568}$ , практически не перекрываются. Тем не менее, в качестве контроля были зарегистрированы сигналы ф/и поглощения Р и БР только при действии импульса II  $\Delta A(\lambda; t_{II})$ .



**Рисунок 2.6** – Спектры поглощения исходного состояния родопсина,  $P_{498}$ , и первых продуктов его фотолитиза, Фото<sub>570</sub> и Бато<sub>535</sub> [80] (А, левая ось), а также исходного состояния бактериородопсина,  $BP_{568}$ , и первых продуктов его фотоцикла,  $J_{625}$  [213] и  $K_{590}$  [214] (Б, левая ось), а также спектры соответствующих возбуждающих импульсов I и II (А, Б, правая ось)

Импульсы I и II были поляризованы параллельно друг другу и расположены под «магическим углом» к импульсу III. В работе были использованы низкие плотности энергии импульсов I и II ( $< 5$  Дж/м<sup>2</sup>), что позволило осуществить однофотонное поглощение.

В случае Р временная задержка импульса II ( $t_{II}$ ) была выбрана в соответствии с основной фазой когерентного колебательного пакета Фото<sub>570</sub> ( $f = 60$  см<sup>-1</sup> и  $\tau = 550$  фс), индуцированного импульсом I, и составила  $t_{II} = 200$ – $1025$  фс (с шагом 55 фс) и  $t_{II} = 1025$ – $3775$  фс (с шагом 550 фс). В случае БР временная задержка составила  $t_{II} = 1, 3$  и  $5$  пс.

Импульс III подавался через временную задержку  $t = 100$  пс, при этом дифференциальные сигналы регистрировались с накоплением 5000–10000 спектров. При этой временной задержке регистрируется дифференциальный спектр поглощения, состоящий только из положительной полосы поглощения второго продукта прямой фотореакции Р и БР – Бато<sub>535</sub> и  $K_{590}$ , а также из отрицательной полосы выцветания  $P_{498}$  и  $BP_{568}$ , соответственно. По изменениям этого спектра после действия одного и двух возбуждающих импульсов было сделано заключение о протекании фотообратимых процессов в исследуемых белках. В случае Р для того, чтобы отследить

динамику обратного фотоперехода в реальном времени при  $t_{\text{п}} = 200$  фс, была использована также временная задержка зондирования  $t = 0-5$  пс (с шагом 3,3 фс) и  $t = 5-10$  пс (с шагом 10 фс) с накоплением сигнала по 50 спектрам.

### 2.3.3. Условия проведения экспериментов

Все эксперименты проводились при температуре 21 °С и, в случае Р, при тусклом красном свете ( $\lambda > 600$  нм). Для того, чтобы молекулы БР во время возбуждения фемтосекундным импульсом находились в СА форме, осуществляли постоянную подсветку циркулирующего в проточной системе образца непрерывным лазером с длиной волны  $\lambda = 532$  нм, мощностью  $P = 0,02$  мВт/см<sup>2</sup> и диаметром в области, отличной от области прохождения возбуждающего и зондирующих импульсов,  $d = 0,8$  см. Светоадаптацию образца проверяли спектрально. Условия проведения время-разрешенных экспериментов представлены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Условия проведения время-разрешенных экспериментов

образцы	возбуждающие импульсы								зондирующий импульс				С, мг/ мл
	импульс I				импульс II				импульс III				
	$\lambda$ , нм	$\Delta\tau$ , фс	$E$ , нДж	$D$ , мкм	$\lambda$ , нм	$\Delta\tau$ , фс	$E$ , нДж	$D$ , мкм	$\lambda$ , нм	$\Delta\tau$ , фс	$E$ , нДж	$D$ , мкм	
Р	500	30	70	300	–	–	–	–	400– 900	800	10	150	3–5
	500	25	70		620	30	700	180					4–5
БР	560	30	120		–	–	–	–					1,6
	560	20	100		680	45	560	180					1,6

### 2.3.4. Обработка экспериментальных данных

Как было сказано ранее (Пункт 2.3.), экспериментальные данные представляют собой матрицу значений дифференциального поглощения образцов  $\Delta A(\lambda; t)$  от длины волны зондирования и от времени задержки между возбуждающим и зондирующим импульсами. Для первичной обработки результатов, полученных методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии, была использована программа Span, написанная в программно-языковой среде Matlab (*Hardware: Belousov, Vezakov*, с доработкой сотрудниками лаборатории био- и нанофотоники ФИЦ ХФ РАН).

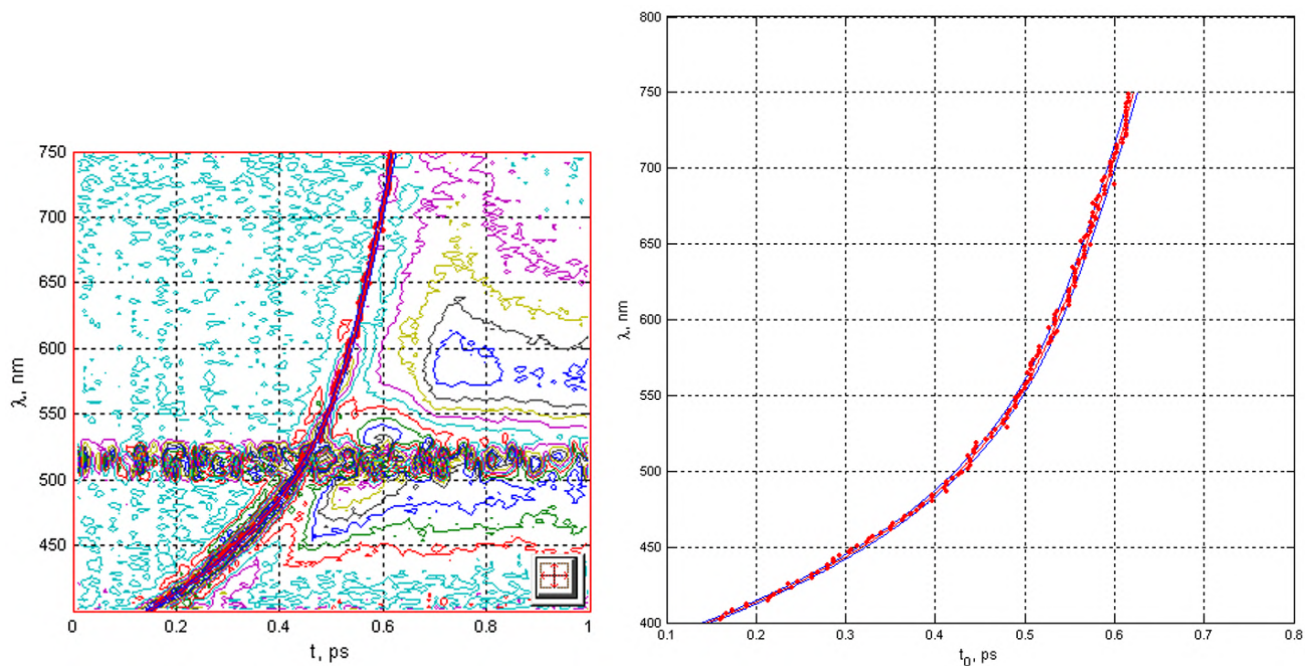
В полученные данные  $\Delta A(\lambda; t)$  вносит вклад светорассеяние возбуждающего импульса, а также исходного фемтосекундного импульса ( $\lambda = 802$  нм), которое наблюдается в диапазонах  $\pm 20$  нм от их несущей длины волны и не позволяет получить в этих диапазонах достоверных

данных. Для коррекции этого сигнала было проведено усреднение первых спектров, полученных до действия возбуждающего импульса (первые 100–200 фс) и не содержащих ф/и изменений поглощения образца. Усредненный спектр был вычтен из всех последующих спектров, что позволило уменьшить «слепые» спектральные диапазоны.

Далее для время-разрешенных данных проводилась фильтрация шумов с коэффициентом ширины сглаживания 3 и 10 для данных, зарегистрированных с шагом 3,3 и 10 фс, соответственно.

Зондирующий импульс суперконтинуума chirпирован, то есть, разные спектральные компоненты импульса приходят в образец в разный момент времени в течение  $\sim 800$  фс. Поэтому необходимо определять «нулевую задержку» между возбуждающим и зондирующим импульсами для каждой спектральной компоненты суперконтинуума. Это можно сделать на основе анализа сигнала когерентного лазерного артефакта в непоглощающем контрольном растворе. Теория когерентного лазерного артефакта и его использования для определения нулевой задержки между спектральной компонентой суперконтинуума и импульса возбуждения была развита в работах [209, 215]. Процедура определения нулевой задержки состоит в построении кривой (кривой нулей), отражающей зависимость времени прихода каждой спектральной компоненты зондирующего импульса от длины волны этой компоненты (Рисунок 2.7, красные точки), аппроксимации этой кривой полиномом 4-й или 5-й степени (Рисунок 2.7, красная кривая) и использованием полученного полинома для соответствующей коррекции данных.

Для удаления сигнала когерентного лазерного артефакта, присутствующего в кинетических кривых на временах  $\pm 90$  фс и используемого ранее при построении кривой нулей, из время-разрешенных экспериментальных данных был вычтен сигнал от контрольного раствора, не содержащего исследуемый белок. Далее с помощью программы Span были построены дифференциальные спектры и кинетические кривые ф/и поглощения исследуемых белков.



**Рисунок 2.7** – Слева – двумерная диаграмма зависимости интенсивности сигнала фотоиндуцированного поглощения родопсина от времени задержки и от длины волны зондирования  $\Delta A(\lambda; t)$ . Справа – экспериментальные значения времен прихода различных спектральных компонент возбуждающего импульса (красные точки), представленные отдельно и соответствующие нулевому времени задержки для каждой длины волны. На обоих графиках изображена кривая нулей, аппроксимированная полиномом 4-ой степени (красная кривая) с доверительным интервалом (синие кривые)

В общем виде дифференциальный сигнал ф/и поглощения исследуемых белков можно выразить следующим образом:

$$\Delta A(\lambda; t) = \Delta A_{\text{ESA}}(\lambda; t) + \Delta A_{\text{GSA}}(\lambda; t) + \Delta A_{\text{GSB}}(\lambda; t) + \Delta A_{\text{SE}}(\lambda; t), \quad (2.4)$$

где  $\Delta A_{\text{ESA}} > 0$  – поглощение из электронно-возбужденного  $S_1$  состояния (ESA – excited state absorption),

$\Delta A_{\text{GSA}} > 0$  – поглощение из основного  $S_0$  состояния продуктов реакции (GSA – ground state absorption),

$\Delta A_{\text{GSB}} < 0$  – выцветание образца, обусловленное обеднением заселенности его основного  $S_0$  состояния при возбуждении (GSB – ground state bleaching),

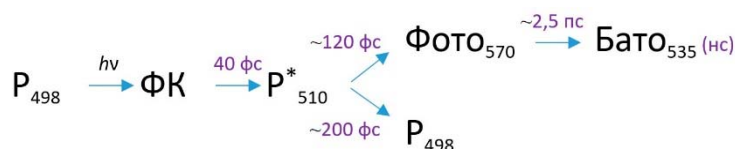
$\Delta A_{\text{SE}} < 0$  – вынужденное испускание из электронно-возбужденного  $S_1$  состояния (SE – stimulated emission).

Из-за перекрывания различных компонент спектрально и во времени анализ дифференциального ф/и сигнала является сложной задачей.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Динамика прямой фотореакции родопсина

Ранее в работах [53, 92, 216] методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии было продемонстрировано образование в процессе первичных реакций Р возбужденного состояния  $R^*_{510}$  ко времени задержки 30 фс, первого продукта Фото<sub>570</sub> с изомеризованным ретиналем ко времени задержки 200 фс и второго продукта Бато<sub>535</sub> ко времени задержки 2–3 пс. Для описания первичных реакций Р в работе [216] была предложена кинетическая схема, представленная на Рисунке 3.1, и определены времена наблюдаемых процессов. Также были зарегистрированы осцилляции время-разрешенных сигналов поглощения продуктов реакции в диапазоне частот  $60\text{--}135\text{ см}^{-1}$  [53] и  $60\text{--}470\text{ см}^{-1}$  [92, 216], отражающие движение волновых пакетов вдоль активных колебательных мод ретиналя, которые были приписаны делокализованным торсионным колебаниям.



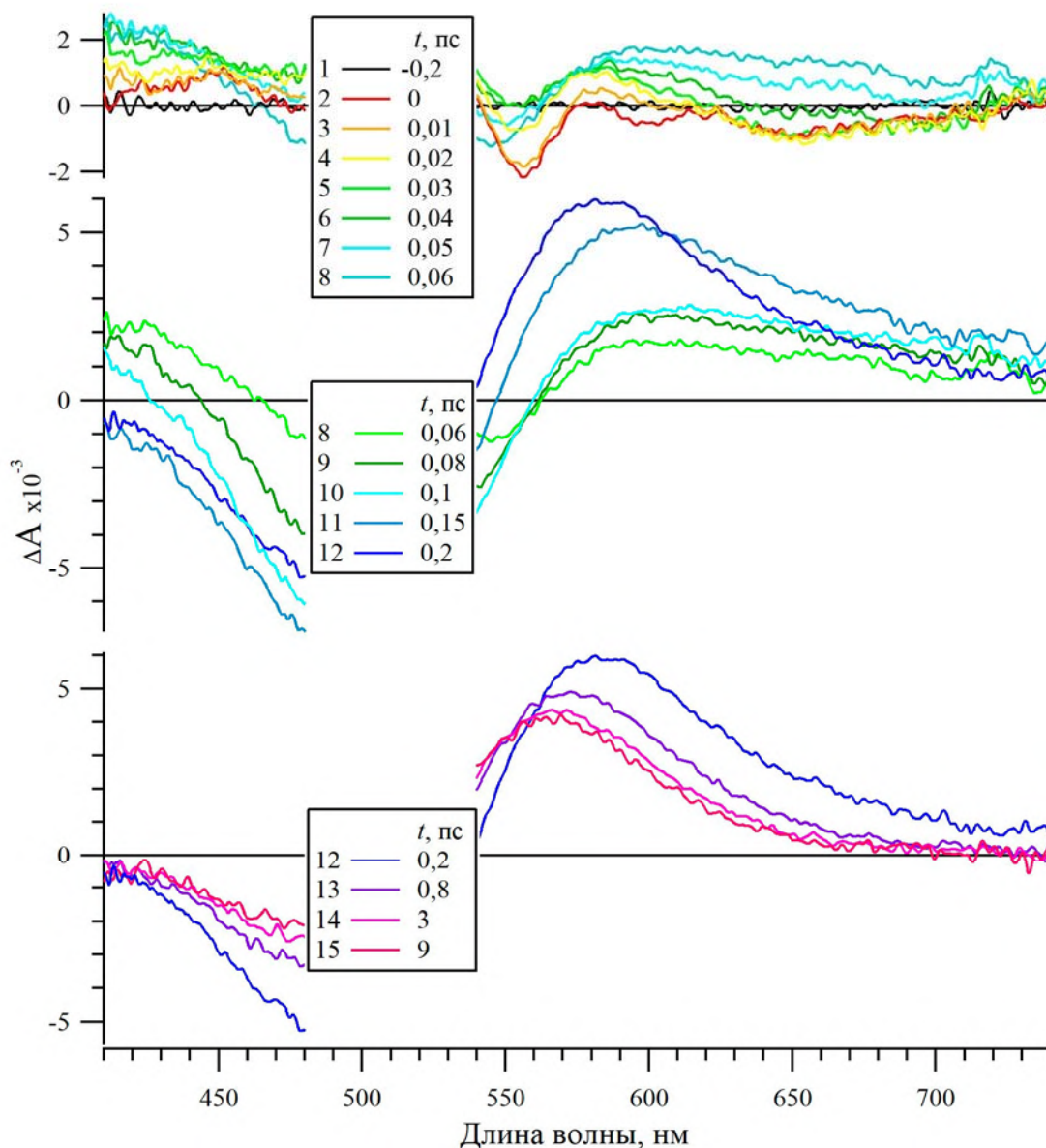
**Рисунок 3.1** – Кинетическая схема прямой фотореакции родопсина [216].

В настоящей работе тем же методом были зарегистрированы сигналы ф/и поглощения Р с лучшим соотношением сигнал/шум [217–220], чем в работах [53, 92, 216], благодаря модернизации экспериментальной установки, в частности, благодаря замене детектора на высокочувствительную CCD-камеру «Roper Scientific SPEC-10», что позволило стабилизировать работу установки. Это позволило: (1) пересмотреть схему реакции (Пункт 4.5.1.); (2) уточнить времена наблюдаемых процессов (Пункт 3.1.2.); (3) уточнить частотные характеристики волновых пакетов (Пункт 3.1.2.); (4) непосредственно наблюдать движение волнового пакета в процессе реакции (Пункт 3.1.1.); (5) на основе анализа время-разрешенных сигналов ф/и поглощения Р охарактеризовать время достижения волновым пакетом СІ (Пункт 3.1.2.).

#### 3.1.1. Дифференциальные спектры и кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения родопсина

На Рисунке 3.2 представлены дифференциальные спектры ф/и поглощения Р, полученные при разных временах задержки зондирующего импульса в диапазоне  $-0,2\text{--}9$  пс. Как видно из Рисунка 3.2 (кривая 1), при отрицательном времени задержки  $-200$  фс не наблюдается сигналов поглощения или испускания. Ко временам задержки  $0\text{--}30$  фс в области  $410\text{--}550$  нм появляется

положительная полоса  $S_n \leftarrow S_1$  поглощения из возбужденного состояния  $P^*_{510}$  ( $\Delta A_{ESA1}$ ) (Рисунок 3.2, кривые 2–5), которое отличается от ФК состояния, поскольку образуется с некоторой задержкой после возбуждения. Ко временам задержки 40–50 фс сигнал  $\Delta A_{ESA1}$  достигает максимума (Рисунок 3.2, кривые 6–7) и за последующие 50–100 фс исчезает (Рисунок 3.2, кривые 10–11).



**Рисунок 3.2** – Дифференциальные спектры фотоиндуцированного поглощения родопсина, зарегистрированные в спектральном диапазоне 410–740 нм на временах задержки -0,2–9 пс. В спектральном диапазоне 480–540 нм данные не представлены из-за артефактного сигнала, связанного с рассеянием возбуждающего импульса

Одновременно с появлением сигнала  $\Delta A_{ESA1}$  в длинноволновой области 520–720 нм наблюдается отрицательная структурированная полоса вынужденного испускания ( $\Delta A_{SE}$ ), которая соответствует  $S_1 \rightarrow S_0$  переходу из того же состояния  $P^*_{510}$  (Рисунок 3.2, кривая 2). На



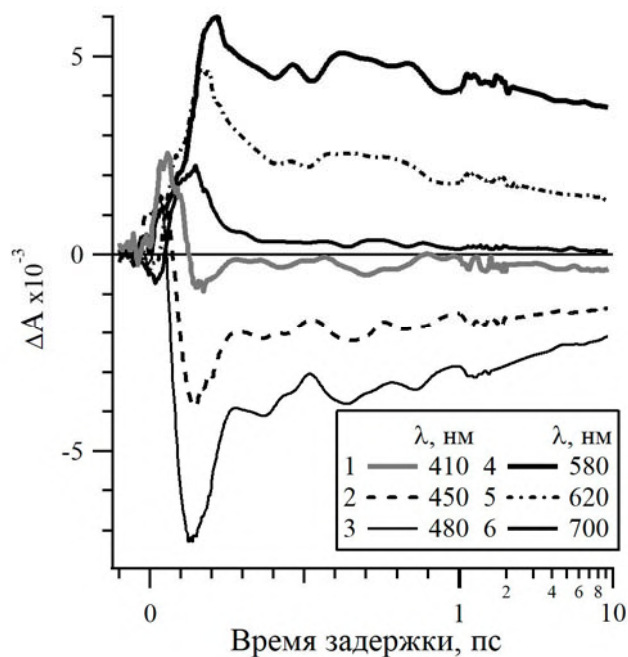
временах задержки 0–20 фс сигнал  $\Delta A_{SE}$  проявляется в областях 560, 610 и 640–720 нм (Рисунок 3.2, кривые 2–4), но к 30 фс остается только одна широкая полоса в диапазоне 640–720 нм. Вероятно, такая сложная форма сигнала  $\Delta A_{SE}$  на ранних временах связана с наличием длинноволновой структурированной полосы  $S_3 \leftarrow S_1$  поглощения из возбужденного состояния ( $\Delta A_{ESA2}$ ), которая конкурирует с сигналом  $\Delta A_{SE}$ .

Сигнал  $\Delta A_{SE}$  исчезает ко времени задержки  $\sim 50$  фс, и ему на смену приходит широкая положительная полоса поглощения первого продукта Фото<sub>570</sub> ( $\Delta A_{GSA}$ ) (Рисунок 3.2, кривая 8). Ко времени задержки 200 фс эта полоса сдвигается в коротковолновую область до  $\sim 580$  нм и достигает максимальной интенсивности в дифференциальном спектре (Рисунок 3.2, кривая 12), а через 3 пс смещается далее до  $\sim 570$  нм и становится менее интенсивной (Рисунок 3.2, кривая 14), что отражает переход Фото<sub>570</sub> в следующий продукт Бато<sub>535</sub>, который обладает меньшим коэффициентом экстинкции по сравнению с Р<sub>498</sub> и Фото<sub>570</sub> (Рисунок 2.6А). На временах 3–9 пс полоса поглощения Бато<sub>535</sub> практически не меняется (Рисунок 3.2, кривые 14–15).

В области 410–560 нм наблюдается отрицательный сигнал  $\Delta A_{GSB}$ , связанный с выцветанием исходного состояния Р<sub>498</sub> (Рисунок 3.2, кривые 8–15). Этот сигнал достигает максимума только к 130–150 фс из-за перекрытия с сигналом  $\Delta A_{ESA1}$  на более ранних временах. В течение последующих 0,15–3 пс сигнал  $\Delta A_{GSB}$  уменьшается за счет возвращения одной трети возбужденных молекул обратно в исходное состояние Р<sub>498</sub>, а также за счет процессов образования продуктов Фото<sub>570</sub> и Бато<sub>535</sub>, поглощающих в этой спектральной области (Рисунок 3.2, кривые 12–15).

Все описанные выше процессы можно наблюдать на кинетических кривых ф/и поглощения Р, представленных на Рисунках 3.3, 3.5–3.7. На Рисунке 3.3 представлены дополнительно сглаженные для наглядности кинетические кривые  $\Delta A(t)$  на временах задержки до 10 пс на наиболее характерных длинах волн зондирования. В спектральном диапазоне 410–480 нм через 50 фс после возбуждения появляется положительный сигнал  $\Delta A_{ESA1}$ , который примерно к 100 фс переходит в отрицательный сигнал  $\Delta A_{GSB}$  (Рисунок 3.3, кривые 1–3). Сигнал  $\Delta A_{GSB}$  достигает максимума к 130 фс и далее уменьшается в два этапа – в фемто- и пикосекундном временных диапазонах, за счет образования Р<sub>498</sub>, а также продуктов Фото<sub>570</sub> и Бато<sub>535</sub>, как было сказано ранее. В длинноволновой области 610–700 нм на временах 0–40 фс наблюдается отрицательный сигнал  $\Delta A_{SE}$ , который ко временам задержки 50–60 фс переходит в положительный сигнал  $\Delta A_{GSA}$  (Рисунок 3.3, кривые 5 и 6), связанный с образованием продукта Фото<sub>570</sub>. Этот сигнал  $\Delta A_{GSA}$  достигает максимума к 150–200 фс после возбуждения и далее немного уменьшается, что отражает образование следующего продукта Бато<sub>535</sub> (Рисунок 3.3, кривые 4–6). Анализ

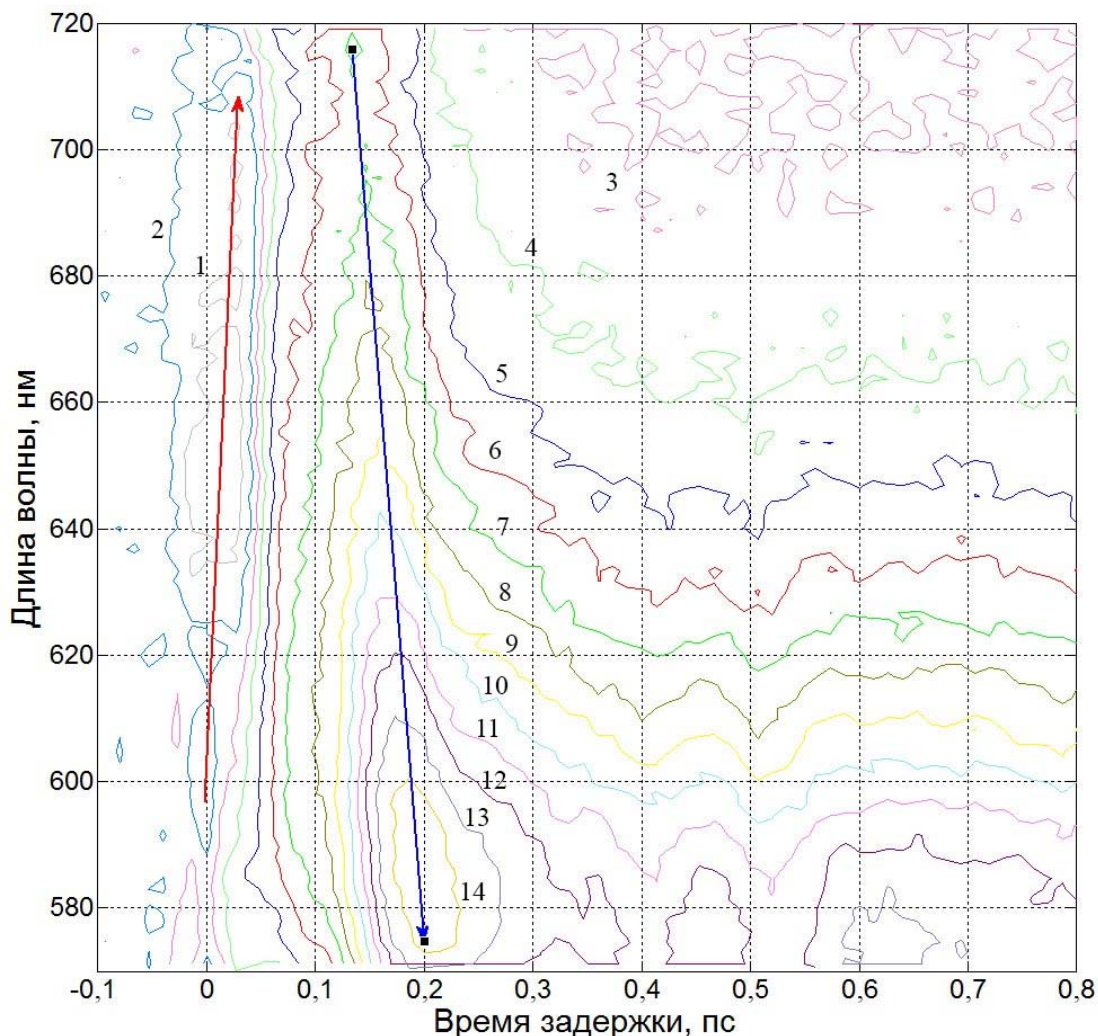
кинетических кривых с целью определения времен наблюдаемых процессов приведен в Пункте 3.1.2.



**Рисунок 3.3** – Сглаженные кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения родопсина, зарегистрированные на характерных длинах волн зондирования и представленные в линейном (-0,1–1 пс) и логарифмическом (1–10 пс) масштабах времени

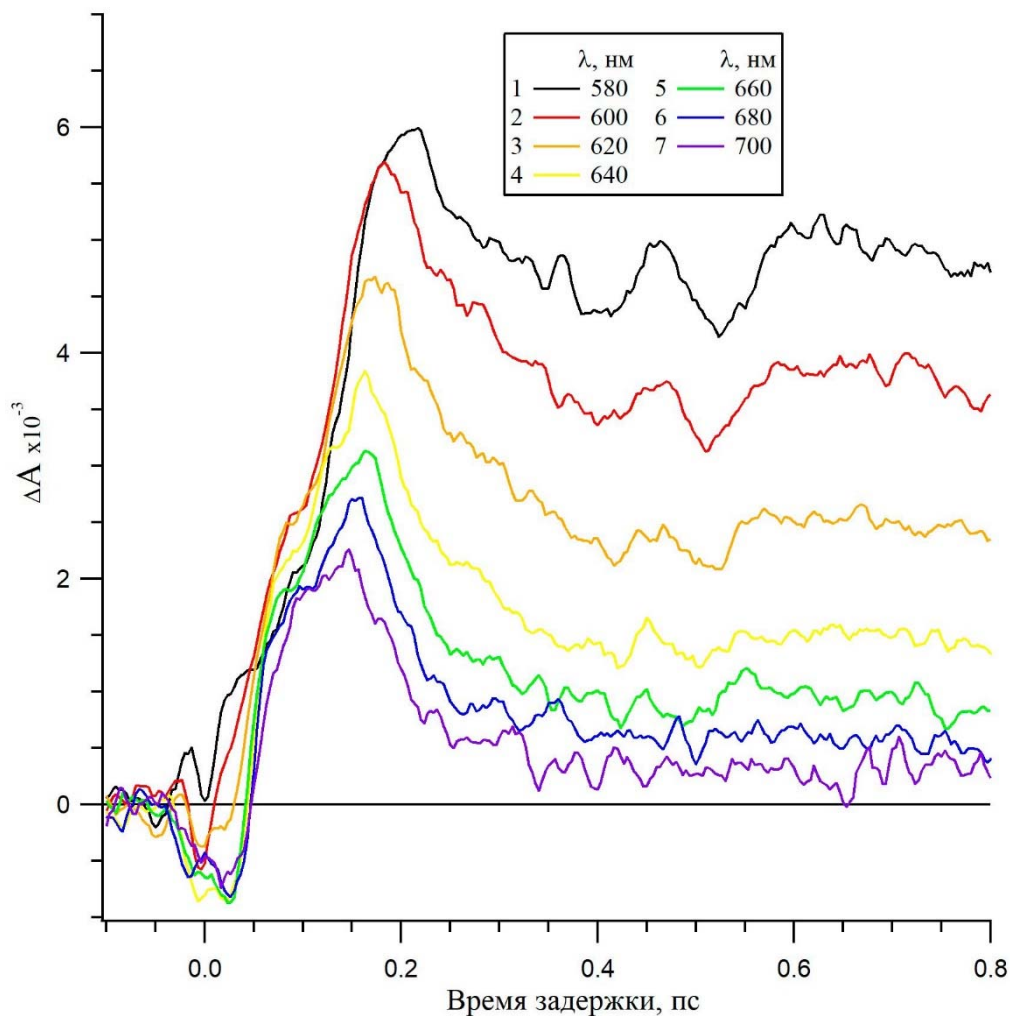
На Рисунке 3.4 представлена двумерная диаграмма сигналов ф/и поглощения  $P$  в зависимости от длины волны зондирования в диапазоне 570–720 нм и времени задержки до 0,8 пс. Как видно из Рисунка 3.4, полоса  $\Delta A_{SE}$  состояния  $P^*_{510}$  во временном диапазоне 0–40 фс сдвигается в длинноволновую область от 600 до 720 нм (Рисунок 3.4, красная стрелка). Далее за последующие 100–200 фс наблюдается возникновение и эволюция в коротковолновую область положительной полосы  $\Delta A_{GSA}$  продукта  $\Phi_{570}$  (Рисунок 3.4, синяя стрелка).

Более подробно наблюдаемые процессы можно рассмотреть на Рисунках 3.5 и 3.6, на которых приведены кинетические кривые ф/и поглощения  $P$  на временах задержки до 0,8 пс в диапазонах 580–700 нм (с шагом 20 нм) и 430–480 нм (с шагом 10 нм), соответственно. На Рисунке 3.5 в кинетических кривых на временах до 50 фс в диапазоне 620–700 нм наблюдается небольшой отрицательный сигнал  $\Delta A_{SE}$  (Рисунок 3.5, кривые 3–7), в то время как в диапазоне 580–600 нм наблюдается небольшой положительный сигнал, который вероятно связан с полосой  $\Delta A_{ESA2}$  (Рисунок 3.5, кривые 1–2). На временах после 50 фс наблюдается только положительный сигнал  $\Delta A_{GSA}$  продукта  $\Phi_{570}$ .



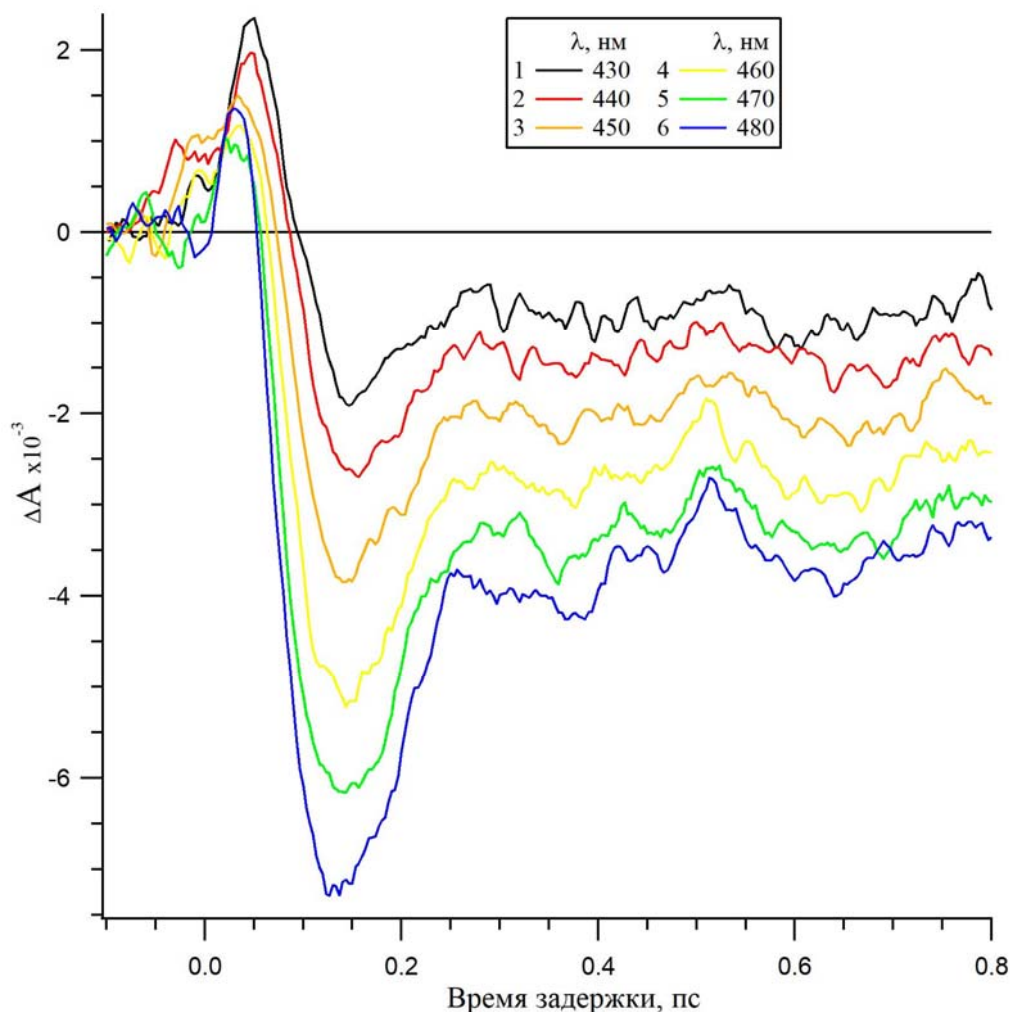
**Рисунок 3.4** – Двумерная диаграмма сигналов фотоиндуцированного поглощения родопсина  $\Delta A(\lambda; t)$  в зависимости от длины волны зондирования в диапазоне 570–720 нм и времени задержки в диапазоне -0,1–0,8 пс. Контуры 1–14 соответствуют возрастанию интенсивности сигнала от значений  $\Delta A(\lambda; t) < 0$  (контуры 1–2) до  $\Delta A(\lambda; t) > 0$  (контуры 4–14). На Рисунке обозначена эволюция сигнала  $\Delta A_{SE}$  родопсина (красная стрелка) и сигнала  $\Delta A_{GSA}$  продукта Фото570 (синяя стрелка)

В кинетических кривых, приведенных на Рисунке 3.5, присутствует осцилляционная составляющая, которая наиболее выражена на длинах волн зондирования 580–620 нм, то есть, в области интенсивного поглощения продукта Фото570. Эти осцилляции наблюдаются во всей полосе поглощения этого продукта с одинаковой фазой. На Рисунке 3.6 в кинетических кривых ф/и поглощения  $P$  в диапазоне зондирования 430–480 нм также наблюдается осцилляционная составляющая, наиболее выраженная в области поглощения  $P_{498}'$  (Рисунок 3.6, кривые 3–6) и присутствующая в этих сигналах также с одинаковой фазой.



**Рисунок 3.5** – Кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения родопсина, представленные в спектральном диапазоне 580–700 нм на временах зондирования до 0,8 пс

Наличие осцилляционной составляющей в рассмотренных выше кинетических кривых отражает тот факт, что при  $S_1 \rightarrow S_0$  переходе, осуществляемом через  $CI$ , образуются колебательно-возбужденные продукты реакции –  $Фото_{570}$  и  $P_{498}'$ , в которых наблюдается движение волновых пакетов, исходно образованных возбуждающим импульсом на  $S_1$  ППЭ. Осцилляции сигналов поглощения  $Фото_{570}$  и  $P_{498}'$  постепенно исчезают к 2 пс (Рисунок 3.3). Анализ осцилляционной составляющей кинетических кривых приведен в Пункте 3.1.2.



**Рисунок 3.6** – Кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения родопсина, представленные в спектральном диапазоне 430–480 нм на временах зондирования до 0,8 пс

### 3.1.2. Анализ кинетических кривых фотоиндуцированного поглощения родопсина

Для анализа время-разрешенных сигналов ф/и поглощения Р, характеризующих динамику его первичных реакций (Рисунки 3.3, 3.5–3.7) были построены модельные экспоненциальные кривые вида (3.1):

$$\Delta A(t) = const + \sum_{i=1}^n a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right), \quad (3.1)$$

где  $a_i$  – вклад в сигнал  $i$ -ой экспоненты ( $i = 1, 2, 3$ ), описывающей образование или исчезновение  $i$ -ого участника реакции,

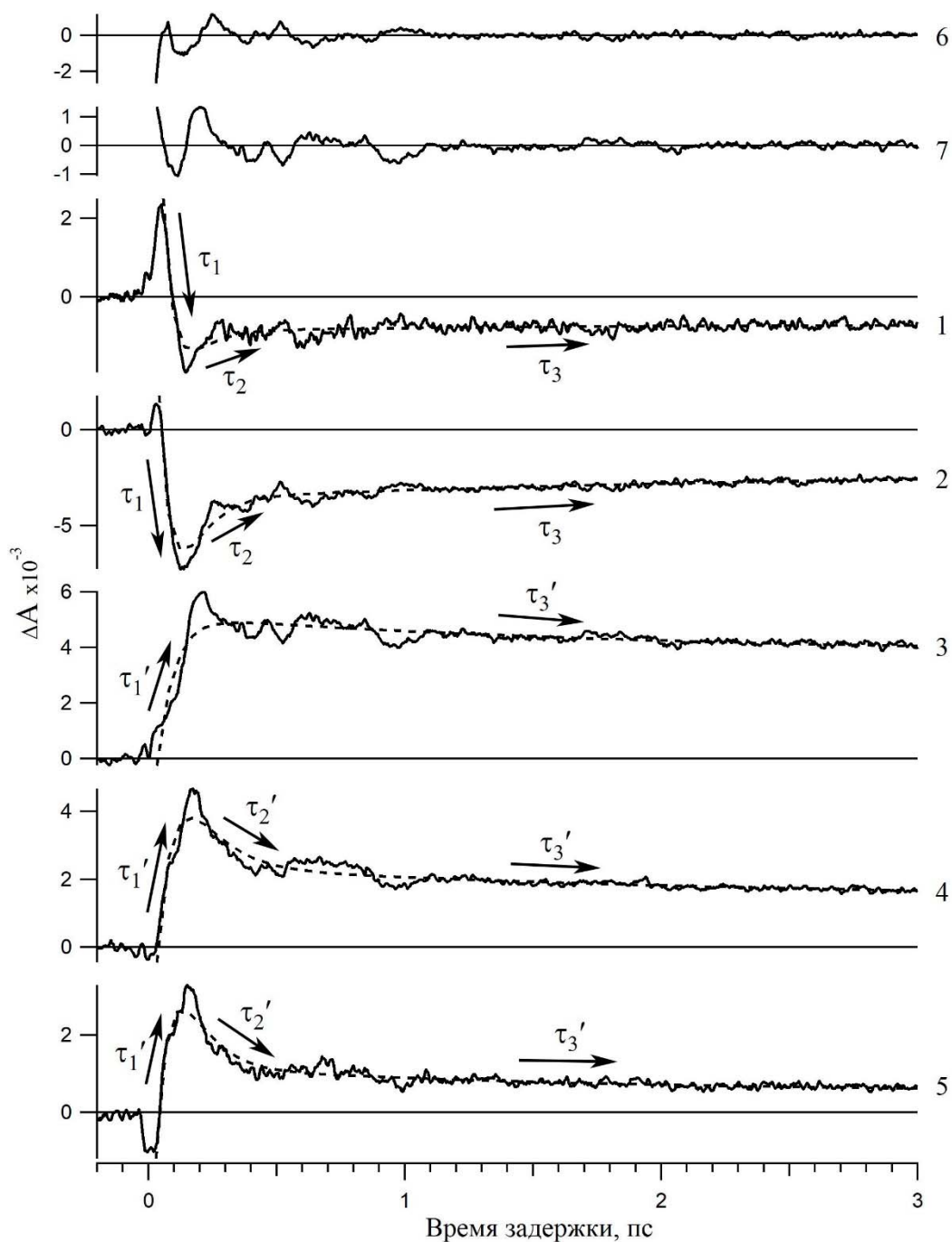
$\tau_i$  – характерное время затухания  $i$ -ой экспоненты.

Параметры модельных кривых приведены в Таблице 3.1. Избранные кинетические кривые ф/и поглощения Р представлены на Рисунке 3.7 в спектральных областях сигналов  $\Delta A_{ESA1} + \Delta A_{GSB} + \Delta A_{GSA}(P_{498})$  (кривые 1 и 2) и  $\Delta A_{ESA2} + \Delta A_{SE} + \Delta A_{GSA}(\text{Фото570 и Бато535})$  (кривые

3–5). Построение модельных кривых вида (3.1) (Рисунок 3.7, пунктирные кривые) позволило получить времена затухания экспонент  $\tau_1$ – $\tau_3$  (Таблица 3.1, 430–490 нм) и  $\tau_1'$ – $\tau_3'$  (Таблица 3.1, 560–650 нм), которые были приписаны определенным процессам, протекающим во время первичных реакций Р.

**Таблица 3.1** – Параметры модельных экспоненциальных кривых, построенных для экспериментальных кинетических кривых фотоиндуцированного поглощения родопсина во временном диапазоне 0,03–10 пс на характерных длинах волн зондирования

$\Delta A$	$\lambda$ , нм	$\tau_1$ , фс	$a_2$	$\tau_2$ , фс	$a_3$	$\tau_3$ , пс
$\Delta A_{ESA1} + \Delta A_{GSB} + \Delta A_{GSA}(P_{498})$	430	$51 \pm 22$	-0,98	$68 \pm 37$	-0,02	$1,22 \pm 0,28$
	440	$53 \pm 15$	-0,97	$72 \pm 23$	-0,03	$2,06 \pm 0,06$
	450	$63 \pm 15$	-0,97	$85 \pm 23$	-0,03	$2,04 \pm 0,21$
	460	$60 \pm 12$	-0,97	$81 \pm 18$	-0,03	$3,12 \pm 0,23$
	470	$62 \pm 8$	-0,94	$101 \pm 15$	-0,06	$2,44 \pm 0,13$
	480	$58 \pm 8$	-0,96	$80 \pm 12$	-0,04	$2,52 \pm 0,1$
	490	$62 \pm 6$	-0,94	$102 \pm 12$	-0,06	$3,06 \pm 0,17$
среднее значение		<b><math>59 \pm 12</math></b>	<b>-0,96</b>	<b><math>84 \pm 20</math></b>	<b>-0,04</b>	<b><math>2,35 \pm 0,17</math></b>
$\Delta A$	$\lambda$ , нм	$\tau_1'$ , фс	$a_2'$	$\tau_2'$ , фс	$a_3'$	$\tau_3'$ , пс
$\Delta A_{ESA2} + \Delta A_{SE} + \Delta A_{GSA}(\text{Фото}_{570} \text{ и Бато}_{535})$	560	$73 \pm 1$	–	–	1,00	$2,84 \pm 0,3$
	570	$63 \pm 1$	–	–	1,00	$2,23 \pm 0,09$
	580	$65 \pm 2$	–	–	1,00	$1,9 \pm 0,06$
	590	$86 \pm 11$	0,83	$154 \pm 31$	0,17	$2,43 \pm 0,11$
	600	$80 \pm 11$	0,88	$133 \pm 23$	0,12	$2,45 \pm 0,1$
	610	$78 \pm 13$	0,92	$114 \pm 22$	0,08	$2,18 \pm 0,08$
	620	$76 \pm 13$	0,94	$106 \pm 19$	0,06	$2,13 \pm 0,08$
	630	$77 \pm 12$	0,96	$106 \pm 17$	0,04	$2,18 \pm 0,1$
	640	$72 \pm 9$	0,97	$99 \pm 13$	0,03	$2,28 \pm 0,08$
	650	$68 \pm 14$	0,97	$85 \pm 18$	0,03	$1,59 \pm 0,05$
среднее значение		<b><math>74 \pm 9</math></b>	<b>0,94</b>	<b><math>114 \pm 20</math></b>	<b>0,06</b>	<b><math>2,22 \pm 0,1</math></b>



**Рисунок 3.7** – Кинетические кривые фотоиндуцированного 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)

Первое характерное время  $\tau_1 = 59 \pm 12$  фс отражает процесс исчезновения реакционного возбужденного состояния  $P^*_{510}$  путем перехода через CI на  $S_0$  ППЭ продуктов Фото<sub>570</sub> и  $P_{498}'$ . Динамику образования возбужденного состояния  $P^*_{510}$  разрешить не удалось, поскольку модельные кривые были построены, начиная со времени задержки  $\sim 30$  фс из-за влияния

артефактного сигнала на более ранних временах. Второе характерное время  $\tau_2 = 84 \pm 23$  фс отражает движение волнового пакета по  $S_0$  ППЭ продукта  $R_{498}'$ , которое происходит после быстрого  $R_{510}^* \rightarrow R_{498}'$  перехода в части молекул. Третье характерное время  $\tau_3 = 2,35 \pm 0,17$  пс вероятно связано с двумя близкими по скорости процессами: (1) дополнительным образованием исходного состояния  $R_{498}$ , протекающим в результате медленного перехода из так называемого нереакционного возбужденного состояния, обнаруженного по время-разрешенным сигналам флуоресценции  $R$  [93]; (2) образованием продукта  $BaTo_{535}$ , который также поглощает в этом спектральном диапазоне (430–490 нм). Если поглощением продукта  $BaTo_{535}$  пренебречь, то можно оценить соотношение заселенности реакционного и нереакционного состояний по соотношению  $a_2/a_3 = 0,96/0,04$  (Таблица 3.1).

Характерное время  $\tau_1' = 74 \pm 9$  фс отражает процесс движения волнового пакета по  $S_0$  ППЭ продукта  $PhoTo_{570}$  вдоль координаты реакции *цис*  $\rightarrow$  *транс* изомеризации ретиналя, о котором было сказано ранее. На дифференциальных спектрах этот процесс проявляется как коротковолновый сдвиг полосы поглощения  $PhoTo_{570}$  от 700 к 580 нм, сопровождающийся возрастанием коэффициента экстинкции (Рисунок 3.2, кривые 8–12). Следующие два характерных времени  $\tau_2'$  и  $\tau_3'$  отражают быструю и медленную фазу падения сигнала  $\Delta A_{GSA}$  в спектральном диапазоне 590–650 нм. Быстрая фаза  $\tau_2' = 114 \pm 20$  фс наблюдается только на длинноволновом плече полосы поглощения  $PhoTo_{570}$ . Она, также, как и процесс с характерным временем  $\tau_1'$ , связана с коротковолновым сдвигом этой полосы в процессе образования  $PhoTo_{570}$ . Медленная фаза  $\tau_3' = 2,22 \pm 0,1$  пс отражает переход  $PhoTo_{570} \rightarrow BaTo_{535}$ , который связан с процессами колебательной релаксации, происходящими в напряженной структуре полностью-*транс* ретиналя, и с разфазировкой волнового пакета. На дифференциальных спектрах этот процесс проявляется как дальнейший сдвиг сигнала  $\Delta A_{GSA}$  от 580 до 570 нм, сопровождающийся небольшим падением коэффициента экстинкции (Рисунок 3.2, кривые 12–15).

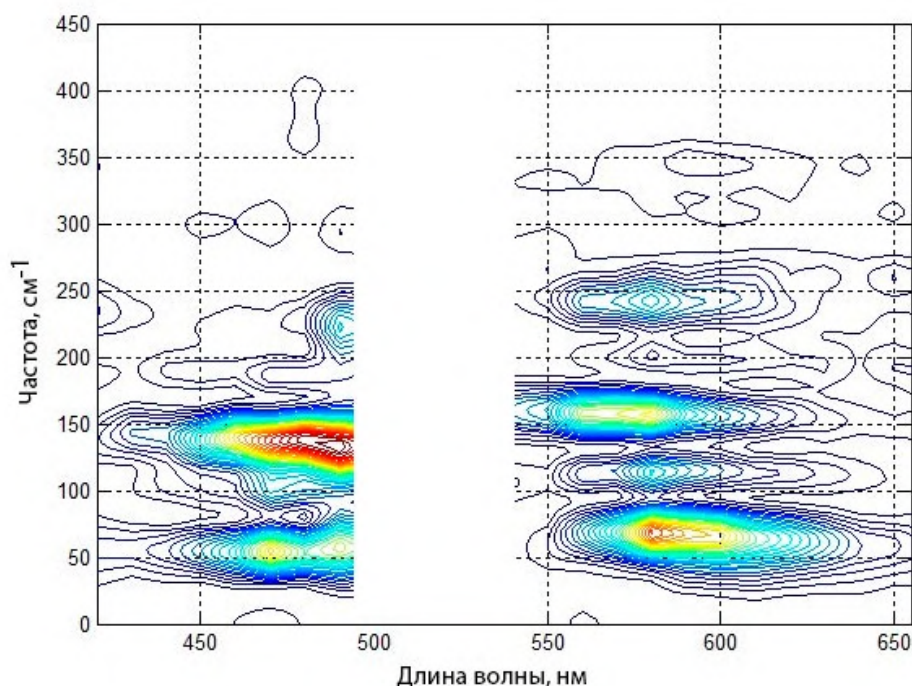
Исходя из полученных данных, можно заключить, что: (1) время образования возбужденного состояния  $R_{510}^*$  составляет менее 30 фс; (2) процесс распада  $R_{510}^*$  и, соответственно, достижения  $CI$  составляет  $\sim 60$  фс; (3) движение волновых пакетов по  $S_0$  ППЭ продуктов реакции,  $PhoTo_{570}$  и  $R_{498}'$ , до области, где эти состояния максимально поглощают, происходит с близкими временами  $\sim 70$  и  $\sim 80$  фс, соответственно; (4) возвращение части молекул из нереакционного возбужденного состояния в исходное состояние  $R_{498}$  и переход  $PhoTo_{570} \rightarrow BaTo_{535}$  также протекают с близкими временами 2,4 и 2,2 пс, соответственно.

При построении модельных кривых вида (3.1) не учитывалась осцилляционная динамика волнового пакета, связанная с когерентным характером реакции фотоизомеризации ретиналя в  $R$ . Построение для каждой кинетической кривой модельной кривой вида (3.1) помогло выделить



из общего сигнала на фоне релаксационных составляющих осцилляционную компоненту (Рисунок 3.7, кривые 6 и 7). Эта составляющая отражает когерентные процессы, происходящие в ходе реакции, и характеризует движение волновых пакетов вдоль  $S_0$  ППЭ продуктов реакции. Анализ частотных компонент осцилляций может дать информацию о колебательных модах, входящих в состав соответствующих волновых пакетов.

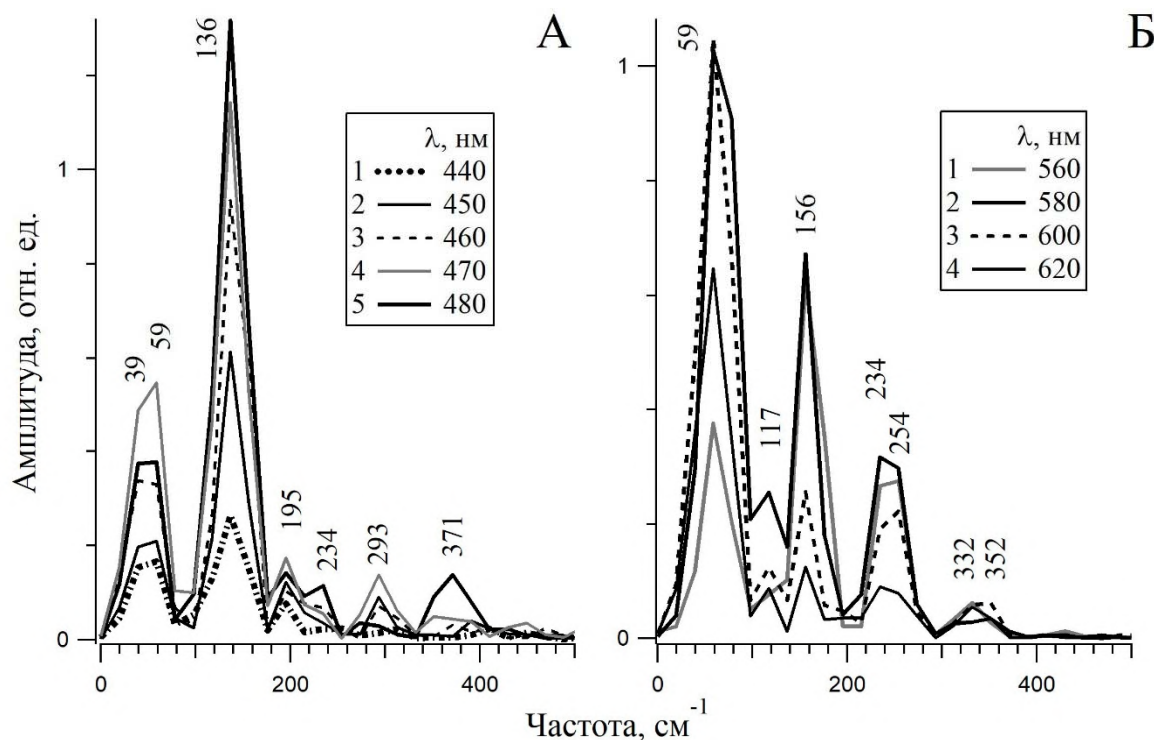
Для определения частот и амплитуд различных осцилляционных компонент сигнала  $\Delta A(t)$  Р во временном диапазоне 0,09–1 пс был проведен Фурье-анализ, результаты которого представлены на Рисунках 3.8 и 3.9. На Рисунке 3.8 представлена двумерная диаграмма спектров мощности Фурье-компонент, полученных в диапазоне длин волн 420–655 нм и частот до  $450\text{ см}^{-1}$ . На Рисунке 3.9 представлены спектры мощности Фурье-компонент в диапазоне частот 0–500  $\text{см}^{-1}$  в двух диапазонах зондирования – в полосах поглощения  $R_{498}'$  (А) и  $\text{Фото}_{570}$  (Б).



**Рисунок 3.8** – Двумерная диаграмма спектра мощности Фурье-компонент в диапазоне частот 0–450  $\text{см}^{-1}$  и диапазоне длин волн 420–655 нм, полученных при анализе осцилляций сигналов  $\Delta A(t)$  родопсина в интервале времен задержки 0,09–1 пс. В спектральном диапазоне 490–540 нм данные не представлены из-за артефактного сигнала, связанного с рассеянием возбуждающего импульса

Как видно из Рисунков 3.8 и 3.9, во всей полосе поглощения  $R_{498}'$  (420–490 нм) был получен одинаковый набор частот осцилляций со следующими значениями: 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  $\text{Фото}_{570}$  (540–655 нм) также был получен одинаковый набор частот с похожими, но немного сдвинутыми в высокочастотную область, значениями: 59, 117, 156, 234, 254, 332 и

$352\text{ см}^{-1}$  с доминирующими частотами  $59\text{ см}^{-1}$  и в меньшей степени  $156\text{ см}^{-1}$ . Полученные частоты осцилляций соответствуют низкочастотным колебательным модам, задействованным в процессе образования продуктов фотореакции Р – Фото<sub>570</sub> и Р<sub>498</sub>'.



**Рисунок 3.9** – 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 [ $\text{см}^{-1}$ ]

### 3.2. Фотохромизм родопсина

В работе [221] методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии была показана возможность инициирования фемтосекундным импульсом обратной фотореакции Р из первых двух продуктов его фотолиза, Фото<sub>570</sub> и Бато<sub>535</sub>, на временах 0,1–6 пс в исходное состояние Р<sub>498</sub> без образования побочных продуктов. Также в работе [221] была высказана гипотеза о зависимости эффективности обратного фотоперехода Фото<sub>570</sub> → Р<sub>498</sub> от когерентных эффектов прямой фотореакции.

В настоящей работе был более подробно изучен механизм обратной фотореакции Р из продуктов Фото<sub>570</sub> и Бато<sub>535</sub> на временах 0,2–3,775 пс [217–220]: (1) была исследована динамика обратного фотоперехода Фото<sub>570</sub> → Р<sub>498</sub> (Пункт 3.2.1.); (2) была подтверждена гипотеза о влиянии когерентного характера прямой фотореакции Р на эффективность обратной

фотореакции  $\text{Фото}_{570} \rightarrow \text{Р}_{498}$  (Пункт 3.2.1.); (3) был рассчитан квантовый выход обратной фотореакции Р из продуктов  $\text{Фото}_{570}$  и  $\text{Бато}_{535}$  (Пункт 3.2.2.).

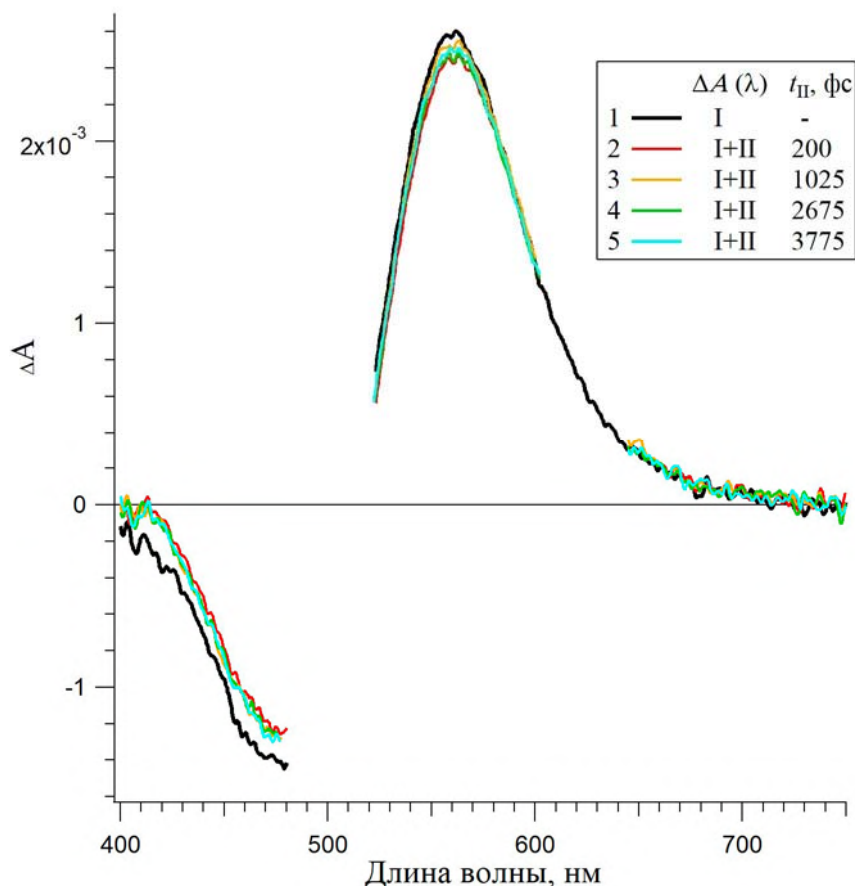
### 3.2.1. Обратная фотореакция родопсина, инициированная из первых двух продуктов прямой фотореакции

На Рисунке 3.10 представлены дифференциальные спектры ф/и поглощения Р, полученные при действии одного возбуждающего импульса 500 нм (импульс I) и двух возбуждающих импульсов 500 и 620 нм (импульсы I и II, соответственно) при времени задержки импульса II  $t_{II} = 200, 1025, 2675$  и  $3775$  фс и зондирующего импульса  $t = 100$  пс. При этой задержке  $t$  в спектральном диапазоне 400–750 нм наблюдается только положительная полоса поглощения второго продукта прямой фотореакции Р,  $\Delta A_{\text{GSA}}(\text{Бато}_{535})$ , и отрицательная полоса выцветания,  $\Delta A_{\text{GSB}}(\text{Р}_{498})$ . Как видно из Рисунка 3.10, действие на образец импульса II приводит к уменьшению темнового образования  $\text{Бато}_{535}$  и одновременно к увеличению поглощения исходного  $\text{Р}_{498}$ . Это свидетельствует о том, что под действием импульса II протекает обратная фотореакция, в которой часть молекул  $\text{Фото}_{570}$  (при  $t_{II} = 200$  и  $1025$  фс) или  $\text{Бато}_{535}$  (при  $t_{II} = 2675$  и  $3775$  фс) при действии второго кванта света переходит в исходное состояние  $\text{Р}_{498}$ . При этом происходит обратная фотоизомеризация остатка ретиналя: *транс* ретиналь  $\rightarrow$  *11-цис* ретиналь. Форма дифференциальных спектров после действия импульса II не меняется при разной задержке  $t_{II}$ , что подтверждает отсутствие побочных продуктов.

Для понимания механизма обратной фотореакции Р важно экспериментально наблюдать ее протекание в реальном времени. С этой целью были зарегистрированы время-разрешенные ф/и сигналы Р в фемто- и пикосекундном временных диапазонах. На Рисунке 3.11 приведено сравнение нормированных кинетических кривых ф/и поглощения Р, зарегистрированных после действия одного и двух возбуждающих импульсов (сигналы  $\Delta A^I(t)$  и  $\Delta A^{I+II}(t)$ , соответственно) с задержкой импульса II  $t_{II} = 200$  фс. Кинетические кривые представлены во временном диапазоне -0,2–3 пс на длинах волн зондирования 490 (область сигнала  $\Delta A_{\text{GSB}+\text{GSA}}(\text{Р}_{498})$ ) и 610 нм (область сигнала  $\Delta A_{\text{GSA}}(\text{Фото}_{570}$  и  $\text{Бато}_{535})$ ).

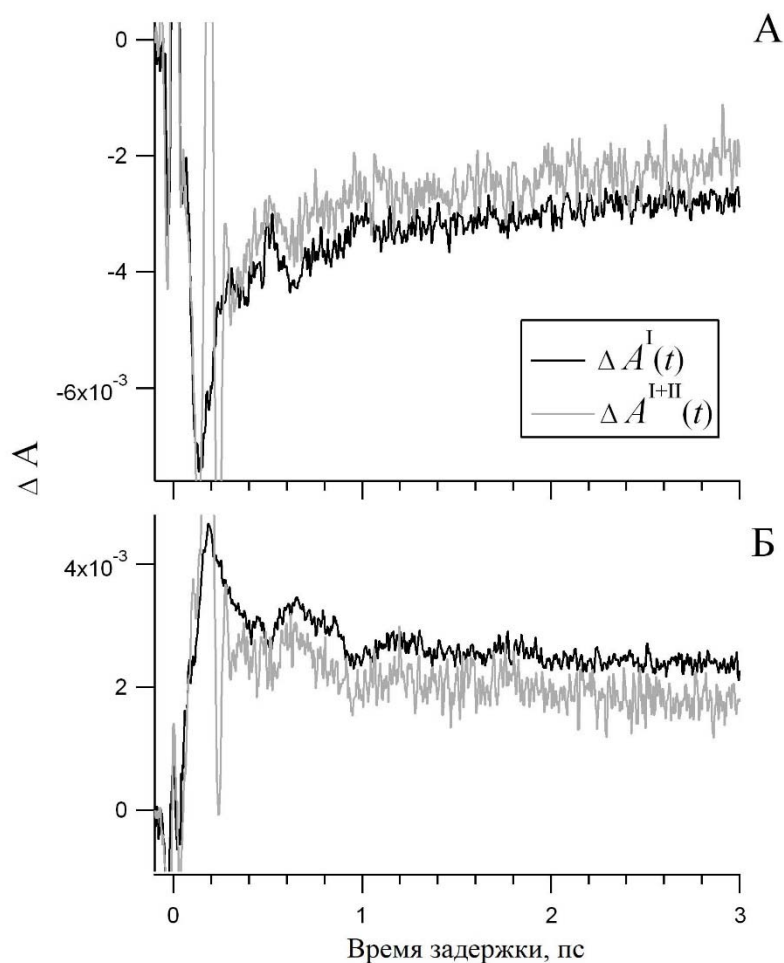
На временах задержки  $t = 0 \pm 50$  (для сигналов  $\Delta A^I(t)$  и  $\Delta A^{I+II}(t)$ ) и  $200 \pm 100$  фс (для сигнала  $\Delta A^{I+II}(t)$ ) в кинетических кривых присутствуют когерентные лазерные артефакты (Рисунок 3.11), по которым можно судить о времени прихода импульсов I и II. В некоторых случаях регистрация ф/и сигнала от контрольного образца, не содержащего Р, помогает исключить артефактные сигналы (Рисунок 3.3). В данном случае артефактные сигналы не удалось скорректировать без искажения экспериментальных данных. Данные, полученные до прихода импульса II,  $\Delta A^I(t < 100$  фс) и  $\Delta A^{I+II}(t < 100$  фс), были использованы для нормировки кинетических кривых.

Это позволило увидеть непосредственный эффект действия импульса II на динамику первичных реакций Р.



**Рисунок 3.10** – Дифференциальные спектры фотоиндуцированного 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

Если до прихода импульса II (-100–100 фс) нормированные кинетические кривые  $\Delta A^I(t)$  и  $\Delta A^{I+II}(t)$  практически совпадают, то на временах 300–500 фс после действия импульса I и соответственно через 100–300 фс после действия импульса II характер кинетических кривых  $\Delta A^{I+II}(t)$  резко меняется по сравнению с  $\Delta A^I(t)$  (Рисунок 3.11). На более поздних временах  $t > 500$  фс кинетические кривые  $\Delta A^{I+II}(t)$  следуют аналогично кривым  $\Delta A^I(t)$ , но с более высокими значениями дифференциального поглощения на длине волны 490 нм (Рисунок 3.11А) и с более низкими значениями дифференциального поглощения на длине волны 610 нм (Рисунок 3.11Б). Такое поведение кинетических кривых  $\Delta A^{I+II}(t)$  характеризует динамику обратной фотореакции Р.



**Рисунок 3.11** – Сравнение кинетических кривых фотоиндуцированного поглощения родопсина, зарегистрированных на длинах волн зондирования 490 (А) и 610 нм (Б) после действия одного (черные кривые) и двух возбуждающих импульсов (серые кривые) при задержке импульса II  $t_{II} = 200$  фс. Кривые были нормированы по временному диапазону -100–100 фс

Таким образом, падение сигнала в дифференциальном спектре в полосе поглощения Бато<sub>535</sub>, вызванное действием импульса II и наблюдаемое на времени  $t = 100$  пс (Рисунок 3.10), происходит уже в фемтосекундном временном диапазоне ( $t > 500$  фс) и связано с завершением процессов  $S_1 \rightarrow S_0$  перехода энергии фотовозбуждения и вторичным образованием продуктов Фото<sub>570</sub> и в дальнейшем Бато<sub>535</sub>, но с квантовым выходом меньше единицы.

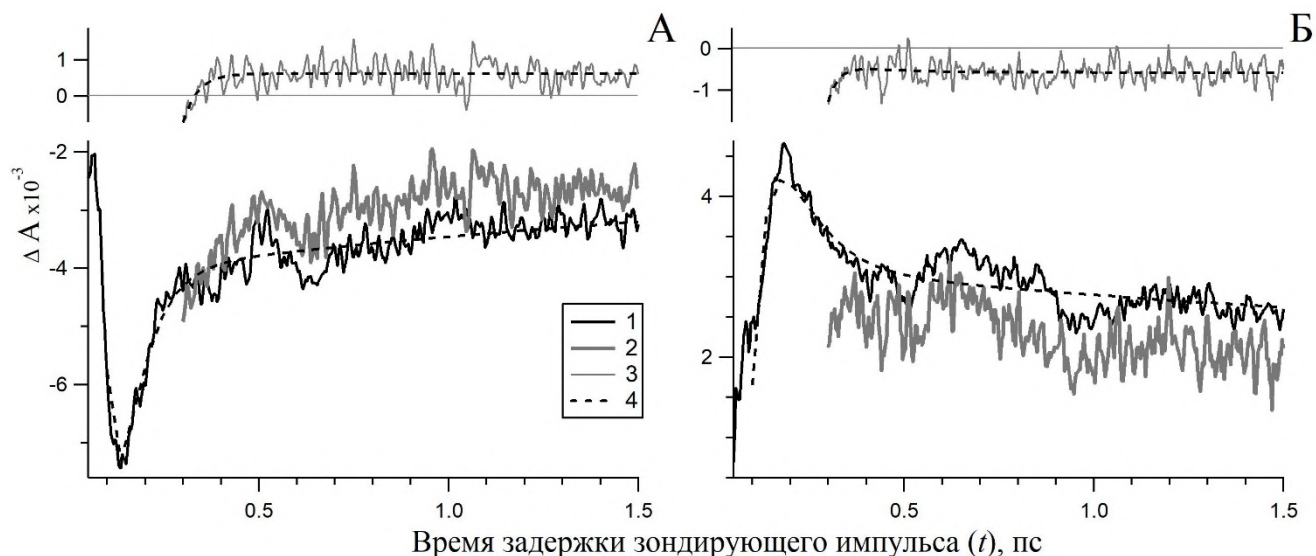
Сигнал ф/и поглощения  $\Delta A^{I+II}(t)$  на временах задержки  $t > 500$  фс уменьшается в 1,3 раза по сравнению с сигналом  $\Delta A^I(t)$ . Количественно величина падения сигнала  $\Delta A'(t) = \Delta A^{I+II}(t) - \Delta A^I(t)$  определяется не только квантовым выходом обратной фотореакции, но и концентрацией образца и энергией импульса II, и не несет важной информации, поскольку зависит от условий эксперимента. Но поскольку колебательный характер кинетических кривых  $\Delta A^{I+II}(t)$  по сравнению с  $\Delta A^I(t)$  и фаза колебаний сохраняются в пикосекундном временном диапазоне, можно заключить, что процессы, связанные с протеканием прямой фотореакции Р доминируют в ф/и сигналах. Можно предположить, что лишь небольшая часть молекул Фото<sub>570</sub> возбуждается

импульсом II, а основная часть молекул идет по пути прямой фотореакции с образованием продукта Бато<sub>535</sub>.

Для наглядности на Рисунке 3.12 представлены те же кинетические кривые  $\Delta A^I(t)$  (кривые 1) во временном диапазоне 0,05–1,5 пс и кривые  $\Delta A^{I+II}(t)$  (кривые 2) во временном диапазоне 0,3–1,5 пс, начиная со времени задержки, когда артефактные сигналы, индуцированные импульсами I и II, уже не вносят вклада в экспериментальные данные. Несмотря на высокий уровень шумов в сигнале  $\Delta A^{I+II}(t)$ , из Рисунка 3.12 видно, что на временах  $t > 500$  фс кривые  $\Delta A^I(t)$  и  $\Delta A^{I+II}(t)$  практически повторяют друг друга, включая осцилляционную компоненту, но характеризуются разной амплитудой сигнала. До этого времени задержки кривые  $\Delta A^I(t)$  и  $\Delta A^{I+II}(t)$  отличаются, что более наглядно видно на разностных кривых  $\Delta A'(t)$  (Рисунок 3.12, кривые 3), которые повторяют исходные кинетические кривые  $\Delta A^I(t)$ , но в меньшем масштабе и с запаздыванием по времени.

Для сравнения кинетических параметров кривых  $\Delta A^I(t)$  и  $\Delta A'(t)$  были построены модельные экспоненциальные кривые вида (3.1) (Рисунок 3.12, кривые 4), параметры которых приведены в Таблице 3.2. На длине волны 490 нм на временах задержки  $t = 300$  фс наблюдается небольшой отрицательный сигнал  $\Delta A'_{\text{GSB}}(t)$ , связанный с обесцвечиванием продукта Фото<sub>570</sub>, возбужденного импульсом II (Рисунок 3.12А, кривая 3). Далее сигнал  $\Delta A'(t)$  начинает возрастать, примерно через 50 фс он становится положительным и к  $t = 500$  фс выходит на плато. Это возрастание сигнала наиболее вероятно связано с образованием Р<sub>498</sub> в ходе обратной фотореакции. Характерное время этого процесса составило  $\tau_2 = 37$  фс (Таблица 3.2). Рост кинетической кривой  $\Delta A^I(t)$  на временах задержки  $t > 150$  фс в основном описывается близким по значению характерным временем  $\tau_2 = 63$  фс, но также имеет пикосекундную компоненту  $\tau_3 = 2,2$  пс (Таблица 3.2).

На длине волны 610 нм на времени задержки  $t = 300$  фс также наблюдается отрицательный сигнал  $\Delta A'_{\text{GSB}}(\text{Фото}_{570})$ , который к 400 фс возрастает с характерным временем  $\tau_1 = 29$  фс и далее немного убывает с характерным временем  $\tau_2 = 130$  фс (Рисунок 3.12Б, кривая 3; Таблица 3.2). Эти изменения сигнала  $\Delta A'(t)$  скорее всего связаны с образованием Фото<sub>570</sub> как продукта обратной фотореакции и аналогичны изменениям сигнала  $\Delta A^I(t)$  на той же длине волны. Для кинетической кривой  $\Delta A^I(t)$  рост сигнала характеризуется временем  $\tau_1 = 42$  фс, а спад сигнала – временами  $\tau_2 = 92$  фс и  $\tau_3 = 2,3$  пс (Таблица 3.2). Можно предположить, что у сигнала  $\Delta A'(t)$  также присутствует пикосекундная компонента спада, отражающая Фото<sub>570</sub> → Бато<sub>535</sub> переход, которую невозможно зафиксировать из-за высокого уровня шумов.



**Рисунок 3.12** – Нормированные кинетические кривые фотоиндуцированного 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)

**Таблица 3.2** – Сравнение параметров модельных экспоненциальных кривых, построенных для экспериментальных кинетических кривых фотоиндуцированного 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

	$\lambda$ , 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	$29 \pm 18$	$130 \pm 100$	–

Таким образом, после действия на образец импульса II, следующего с задержкой 200 фс, удалось наблюдать изменения в сигналах ф/и поглощения Р, аналогичные тем, которые происходят в ходе прямой фотореакции при образовании продуктов Фото<sub>570</sub> и Р<sub>498'</sub>. Характерные времена  $S_1 \rightarrow S_0$  переходов из возбужденного состояния Фото<sub>570</sub> (Фото<sub>570</sub><sup>\*</sup>), происходящих в ходе обратной фотореакции, сравнимы или несколько меньше характерных времен аналогичных переходов из возбужденного состояния Р<sub>510</sub><sup>\*</sup>, происходящих в ходе прямой фотореакции.

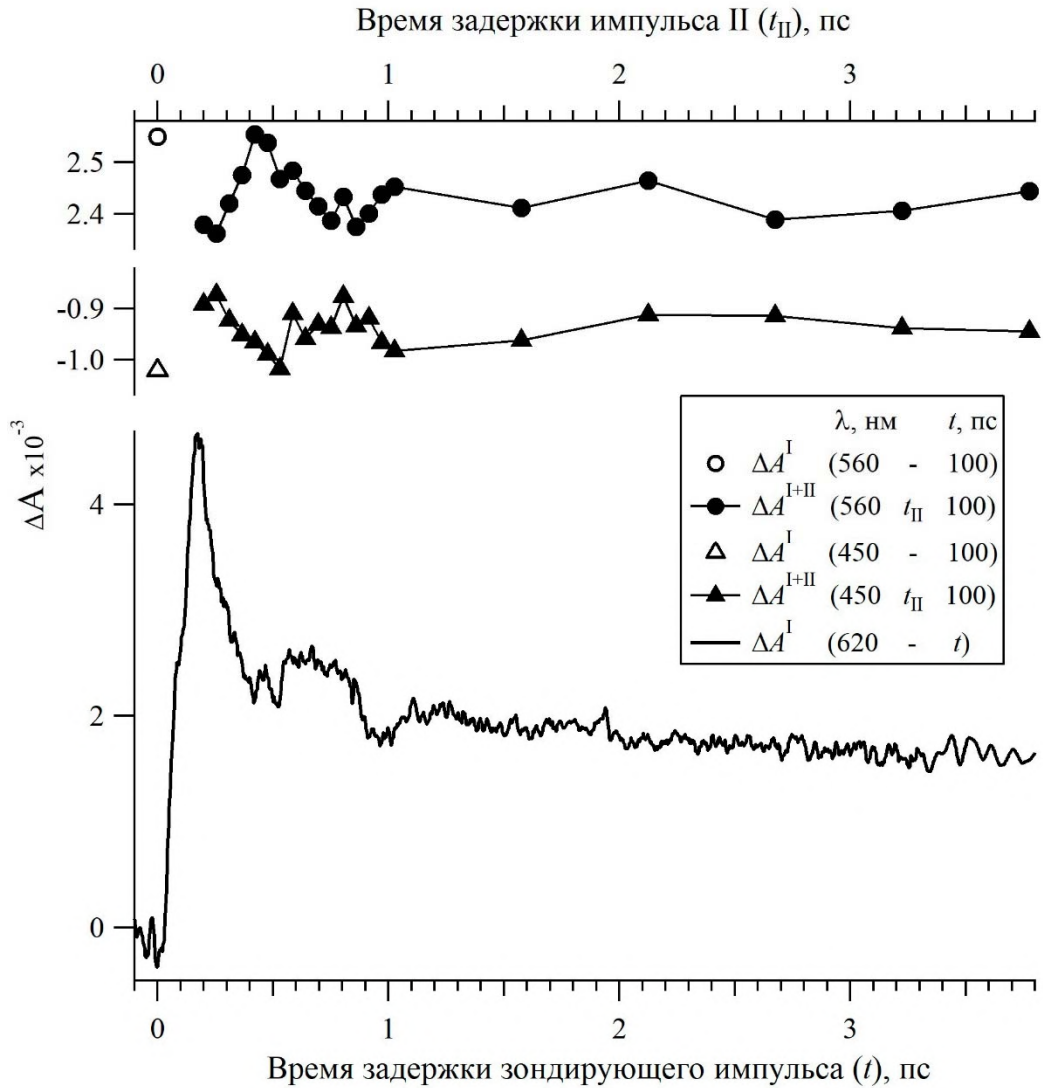
Квантовый выход обратной фотореакции, инициированной из продуктов Фото<sub>570</sub> ( $\phi_2$ ) и Бато<sub>535</sub> ( $\phi_3$ ), определяли, как долю возбужденных при действии импульса II молекул Фото<sub>570</sub><sup>\*</sup> и Бато<sub>535</sub><sup>\*</sup>, соответственно, возвратившихся в Р<sub>498</sub> (Пункт 3.2.2.).

Как уже было сказано ранее, осцилляции, наблюдаемые в кинетических кривых Фото<sub>570</sub> – первого продукта прямой фотореакции Р (Рисунок 3.9), отражают динамику волнового пакета,

или, другими словами, наличие в колебательно-возбужденном продукте Фото<sub>570</sub> квантовой интерференции различных колебательных состояний, которая зависит от времени. В работе были проведены эксперименты, в которых варьировалось время задержки между импульсами I и II с шагом 55 фс в диапазоне 200–1025 фс и с шагом 550 фс в диапазоне 1025–3775 фс. Таким образом, время прихода импульса II было синхронизировано с фазой основных осцилляций с частотой  $59 \text{ см}^{-1}$  (период  $\sim 550$  фс), присутствующих в сигналах поглощения продукта Фото<sub>570</sub> на временах до  $\sim 2$  пс (Пункт 3.1.2.), а также захватывало временной диапазон продукта Бато<sub>535</sub>. Мерой эффективности обратной фотореакции служило значение ф/и поглощения  $P$ , зарегистрированное на времени задержки  $t = 100$  пс в полосе  $\Delta A_{\text{GSA}}$ (Бато<sub>535</sub>) на длине волны 560 нм и в полосе  $\Delta A_{\text{GSB+GSA}}$ (P<sub>498</sub>) на длине волны 450 нм (Рисунок 3.13, вверху).

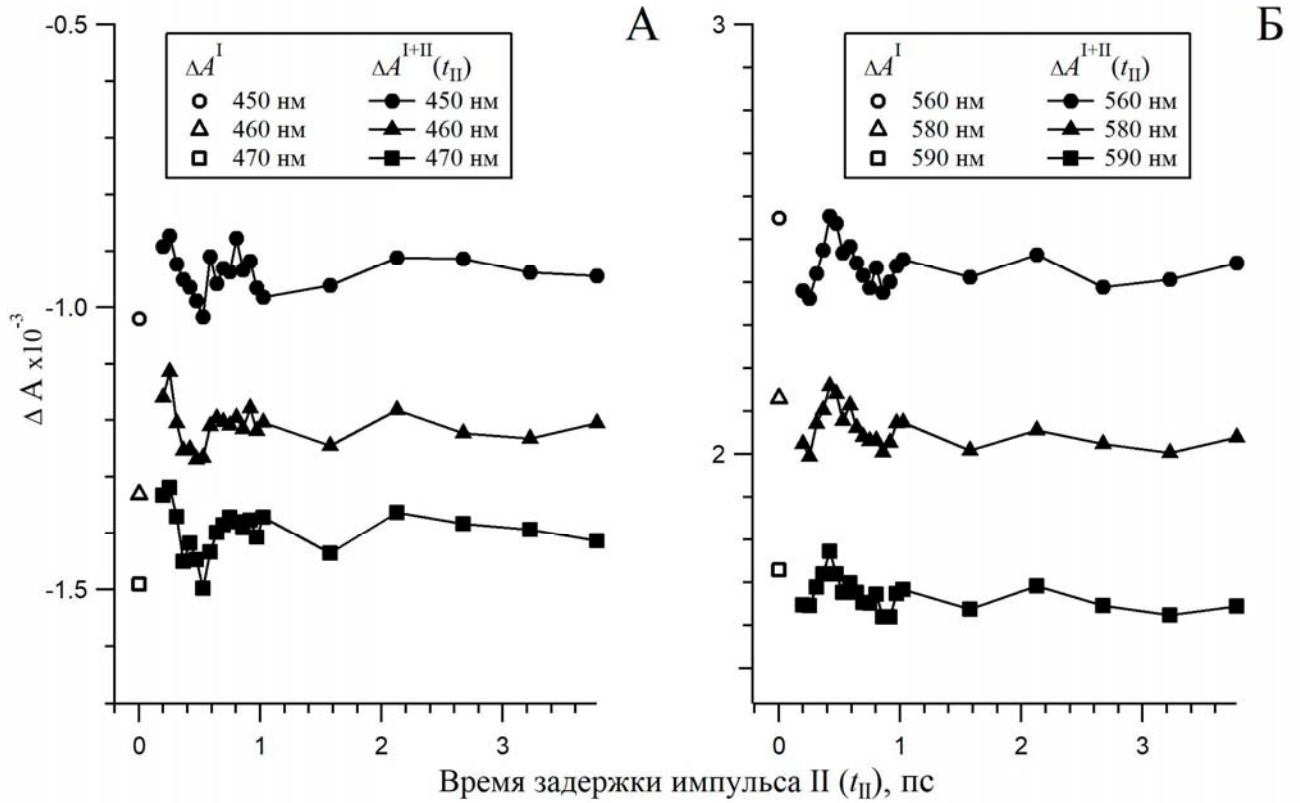
На Рисунке 3.13 (внизу) представлена кинетическая кривая ф/и поглощения  $P \Delta A^I(t)$ , полученная при возбуждении импульсом I на длине волны зондирования 620 нм, соответствующей длине волны импульса II. На Рисунке 3.13 (вверху) представлены значения ф/и поглощения  $P \Delta A^{I+II}(\lambda = 560 \text{ нм}; t_{II}; t = 100 \text{ пс})$  и  $\Delta A^{I+II}(\lambda = 450 \text{ нм}; t_{II}; t = 100 \text{ пс})$ , полученные при возбуждении импульсами I и II на времени задержки  $t = 100$  пс и представленные в зависимости от времени задержки  $t_{II}$ . В качестве контрольных были использованы значения ф/и поглощения  $P \Delta A^I(\lambda = 560 \text{ нм}; t = 100 \text{ пс})$  и  $\Delta A^I(\lambda = 450 \text{ нм}; t = 100 \text{ пс})$ , полученные при возбуждении только импульсом I. Как видно из Рисунка 3.13, чем больше поглощение продукта Фото<sub>570</sub> –  $\Delta A^I(\lambda = 620 \text{ нм}; t)$ , тем более эффективно происходит обратная фотореакция  $P$  и тем меньше образуется продукта Бато<sub>535</sub> ко времени задержки 100 пс после возбуждения. Например, в случае, когда импульс II приходит в момент максимума поглощения Фото<sub>570</sub> ( $t = 200$ – $255$  фс), эффективность обратной фотореакции становится максимальной. При этом в дифференциальном спектре  $\Delta A^{I+II}(\lambda; t_{II} = 200$ – $255 \text{ фс}; t = 100 \text{ пс})$  наблюдается максимальное падение сигнала на длине волны 560 нм и максимальное увеличение сигнала на длине волны 450 нм (Рисунок 3.10, кривая 2). 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 420–475 фс (Рисунок 3.13, вверху).





**Рисунок 3.13** – Внизу – Кинетическая кривая фотоиндуцированного поглощения родопсина  $\Delta A^I$ , зарегистрированная на длине волны 620 нм (нижняя ось абсцисс). Вверху – Значения фотоиндуцированного 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 фотоиндуцированного поглощения родопсина  $\Delta A^I$ , зарегистрированные на длинах волн 450 и 560 нм на времени задержки  $t = 100$  пс

Аналогичные результаты были получены в широком спектральном диапазоне зондирования 420–620 нм (Рисунок 3.14). Фотохромное переключение наблюдается как на временах жизни Фото<sub>570</sub> (0,2–2 пс), так и на стадии образования Бато<sub>535</sub> (2–3,775 пс) (Рисунки 3.13 и 3.14). По мере затухания осцилляций кинетической кривой  $\Delta A^I(\lambda = 620$  нм;  $t > 1,5$  пс), когда завершается колебательная релаксация продукта Фото<sub>570</sub> и его переход в Бато<sub>535</sub>, происходит выход сигнала  $\Delta A^{I+II}(\lambda = 450-590$  нм;  $t_{II} > 1,5$  пс;  $t = 100$  пс) на плато.



**Рисунок 3.14** – Значения фотоиндуцированного поглощения родопсина  $\Delta A^{I+II}$ , зарегистрированные на длинах волн 450, 460, 470 нм (А) и 560, 580, 590 нм (Б) на времени задержки  $t = 100$  пс и представленные в зависимости от времени задержки импульса II  $t_{II} = 0,2-3,775$  пс. На времени задержки  $t_{II} = 0$  фс представлены контрольные значения фотоиндуцированного поглощения родопсина  $\Delta A^I$ , зарегистрированные на длинах волн 450, 460, 470 нм (А) и 560, 580, 590 нм (Б) на времени задержки  $t = 100$  пс

### 3.2.2. Расчет квантового выхода обратной фотореакции родопсина

Квантовый выход обратной фотореакции  $P$  вычисляли для двух случаев, когда задержка импульса II составила 200 фс и протекала реакция  $\text{Фото}_{570} \rightarrow \text{Р}_{498}$  с квантовым выходом  $\varphi_2$ , и когда задержка импульса II составила 3,775 пс и протекала реакция  $\text{Бато}_{535} \rightarrow \text{Р}_{498}$  с квантовым выходом  $\varphi_3$  [217, 219].

В первом случае квантовый выход  $\varphi_2$  был рассчитан по соотношению (3.2):

$$\varphi_2 = N_2/N_1^*, \quad (3.2)$$

где  $N_2$  – количество возбужденных импульсом II молекул  $\text{Фото}_{570}$ , перешедших в  $\text{Р}_{498}$  в результате обратной фотореакции,

$N_1^*$  – количество возбужденных импульсом II молекул  $\text{Фото}_{570}$  в объеме образца  $V$  [см<sup>3</sup>].

$V$  – объем образца, который подвергся действию импульсов I и II и зондирующего импульса, можно выразить следующим образом:

$$V = l S_{\text{probe}}, \quad (3.3)$$

где  $l$  – оптический путь,

$S_{\text{probe}}$  – площадь кюветы с образцом, через которую прошел зондирующий импульс.

Значения  $N_2$  и  $N_1^*$  рассчитывали из экспериментальных данных прямого  $R_{498} \rightarrow \text{Фото}_{570}$  и обратного  $\text{Фото}_{570} \rightarrow R_{498}$  переходов.

Согласно закону Бугера-Ламберта-Бэра, изменение интенсивности света в импульсе II при прохождении через образец будет описываться следующим выражением:

$$\Delta I = I_0 - I = I_0 (1 - e^{-2,303 \varepsilon_{\text{Фото}620} C l}), \quad (3.4)$$

где  $I_0$  – исходная интенсивность света в импульсе II,

$I$  – интенсивность света в импульсе II, прошедшем через образец,

$\varepsilon_{\text{Фото}620}$  – коэффициент экстинкции  $\text{Фото}_{570}$  на длине волны импульса II ( $\lambda = 620$  нм),

$C$  – концентрация молекул  $\text{Фото}_{570}$  к моменту прихода импульса II (200 фс после действия импульса I).

При условии  $2,303 \varepsilon_{\text{Фото}620} C l \ll 1$  ( $2,303 \varepsilon_{\text{Фото}620} C l = 0,06$  в нашем эксперименте),  $\Delta I$  может быть представлено следующим образом:

$$\Delta I = I_0 (2,303 \varepsilon_{\text{Фото}620} C l). \quad (3.5)$$

$\Delta I$  может быть выражено через величину  $N_1^*$  следующим образом:

$$\Delta I = \Delta E / (S_{\text{probe}} t) = N_1^* E_{\text{ph}} / (S_{\text{probe}} t), \quad (3.6)$$

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).

$I_0$  может быть представлено аналогично:

$$I_0 = N E_{\text{ph}} / (S_{\text{probe}} t), \quad (3.7)$$

где  $N$  – число фотонов в импульсе II, прошедших через площадь  $S_{\text{probe}}$ .

$N$  можно выразить как:

$$N = E_{\text{pump2}} S_{\text{probe}} / (E_{\text{ph}} S_{\text{pump2}}), \quad (3.8)$$

где  $E_{\text{pump2}}$  – энергия импульса II ( $7 \cdot 10^{-7}$  Дж),

$S_{\text{pump2}}$  – площадь кюветы с образцом, через которую прошел импульс II.

Используя выражения (3.3) и (3.5) – (3.8), значение  $N_1^*$  может быть представлено следующим образом:

$$\begin{aligned} N_1^* &= N (2,303 \varepsilon_{\text{Фото}620} C l) = 2,303 \varepsilon_{\text{Фото}620} N N_1 / (N_A V) = \\ &= 2,303 \varepsilon_{\text{Фото}620} N N_1 / (N_A S_{\text{probe}}) = 2,303 \varepsilon_{\text{Фото}620} E_{\text{pump2}} N_1 / (E_{\text{ph}} S_{\text{pump2}} N_A), \end{aligned} \quad (3.9)$$

где  $N_1$  – число молекул Фото<sub>570</sub>, которые образовались в результате прямой фотореакции в объеме  $V$ ,

$N_A$  – число Авогадро ( $6,02 \cdot 10^{23}$  моль<sup>-1</sup>).

Значение  $\epsilon_{\text{Фото620}}$  было взято из работы [80] и составило  $1,25 \cdot 10^7$  см<sup>2</sup> моль<sup>-1</sup> (Рисунок 2.6А). Используя значение диаметра светового пучка импульса  $\Pi$   $d = 1,8 \cdot 10^{-2}$  см, получаем  $S_{\text{pump2}} = \pi (1,8 \cdot 10^{-2}/2)^2 = 2,54 \cdot 10^{-4}$  см<sup>2</sup>. Подставляя значения  $\epsilon_{\text{Фото620}}$ ,  $E_{\text{pump2}}$ ,  $E_{\text{ph}}$ ,  $S_{\text{pump2}}$  и  $N_A$  в выражение (3.9), получаем:

$$N_1^* = 0,41 N_1. \quad (3.10)$$

Количество молекул Бато<sub>535</sub> и, соответственно, Фото<sub>570</sub>, образовавшихся в результате прямой фотореакции ( $N_1$ ), можно соотнести со значением ф/и поглощения  $R$   $\Delta A^I_{560}(\lambda = 560 \text{ нм}; t = 100 \text{ пс})$ , зарегистрированным после действия импульса  $I$  в максимуме полосы поглощения Бато<sub>535</sub> в дифференциальном спектре, при помощи следующего выражения:

$$\Delta A^I_{560} = (\epsilon_{\text{Бато560}} - \epsilon_{\text{Р560}}) I N_1 / (N_A V) = k_0 N_1, \quad (3.11),$$

где  $\epsilon_{\text{Бато560}}$  и  $\epsilon_{\text{Р560}}$  – коэффициенты экстинкции Бато<sub>535</sub> и Р<sub>498</sub>, соответственно, на длине волны 560 нм. Из выражения (3.11) получаем:

$$N_1 = \Delta A^I_{560} / k_0 \quad (3.12)$$

Величину  $N_2$  можно выразить через величину изменения поглощения в дифференциальном спектре  $|\Delta A'_{560}| = |\Delta A^{I+\Pi}_{560} - \Delta A^I_{560}|$ , зарегистрированного после действия импульса  $\Pi$  на длине волны 560 нм на времени задержки 100 пс, используя ту же константу  $k_0$ :

$$|\Delta A'_{560}| = k_0 N_2. \quad (3.13)$$

Из выражения (3.13) получаем:

$$N_2 = |\Delta A'_{560}| / k_0. \quad (3.14)$$

Следует отметить, что величина  $N_2$  может быть выражена через  $|\Delta A'_{560}| = |\Delta A^{I+\Pi}_{560} - \Delta A^I_{560}|$ , поскольку сигнал  $\Delta A^{I+\Pi}_{560}$  был скорректирован на величину поглощения импульса  $\Pi$  молекулами Р<sub>498</sub>, и, следовательно, сигнал  $|\Delta A'_{560}|$  в выражении (3.13) отражает поглощение импульса  $\Pi$  только молекулами Фото<sub>570</sub>.

Основываясь на выражениях (3.11), (3.12) и (3.14), квантовый выход фотореакции Фото<sub>570</sub>  $\rightarrow$  Р<sub>498</sub>,  $\phi_2$ , может быть представлен как:

$$\phi_2 = |\Delta A'_{560}(t_{\Pi} = 200 \text{ фс})| / (0,41 \Delta A^I_{560}). \quad (3.15)$$

Подставляя экспериментальные значения  $\Delta A^{I_{560}} = 2,59 \cdot 10^{-3}$  еоп. и  $|\Delta A'_{560}(t_{II} = 200 \text{ фс})| = 1,5 \cdot 10^{-4}$  еоп. (Рисунок 3.14, вверху) в выражение (3.15), получаем значение квантового выхода обратного фотоперехода  $\text{Фото}_{570} \rightarrow \text{P}_{498}$   $\varphi_2 = 0,14$ .

Для фотореакции  $\text{Бато}_{535} \rightarrow \text{P}_{498}$  квантовый выход  $\varphi_3$  можно выразить аналогично выражению (3.2):

$$\varphi_3 = N_4/N_3^*, \quad (3.16)$$

где  $N_4$  – количество возбужденных импульсом II молекул  $\text{Бато}_{535}$ , перешедших обратно в  $\text{P}_{498}$ , в результате обратной фотореакции,

$N_3^*$  – количество возбужденных импульсом II молекул  $\text{Бато}_{535}$  в объеме образца  $V$ .

Используя аналогичный ход рассуждений, представленных в выражениях (3.5) – (3.14) и значение  $\epsilon_{\text{Бато}_{620}} = 8 \cdot 10^6 \text{ см}^2 \text{ моль}^{-1}$  (Рисунок 2.6А) [80], получаем:

$$\varphi_3 = |\Delta A'_{560}(t_{II} = 3,775 \text{ пс})| / (0,26 \Delta A^{I_{560}}). \quad (3.17)$$

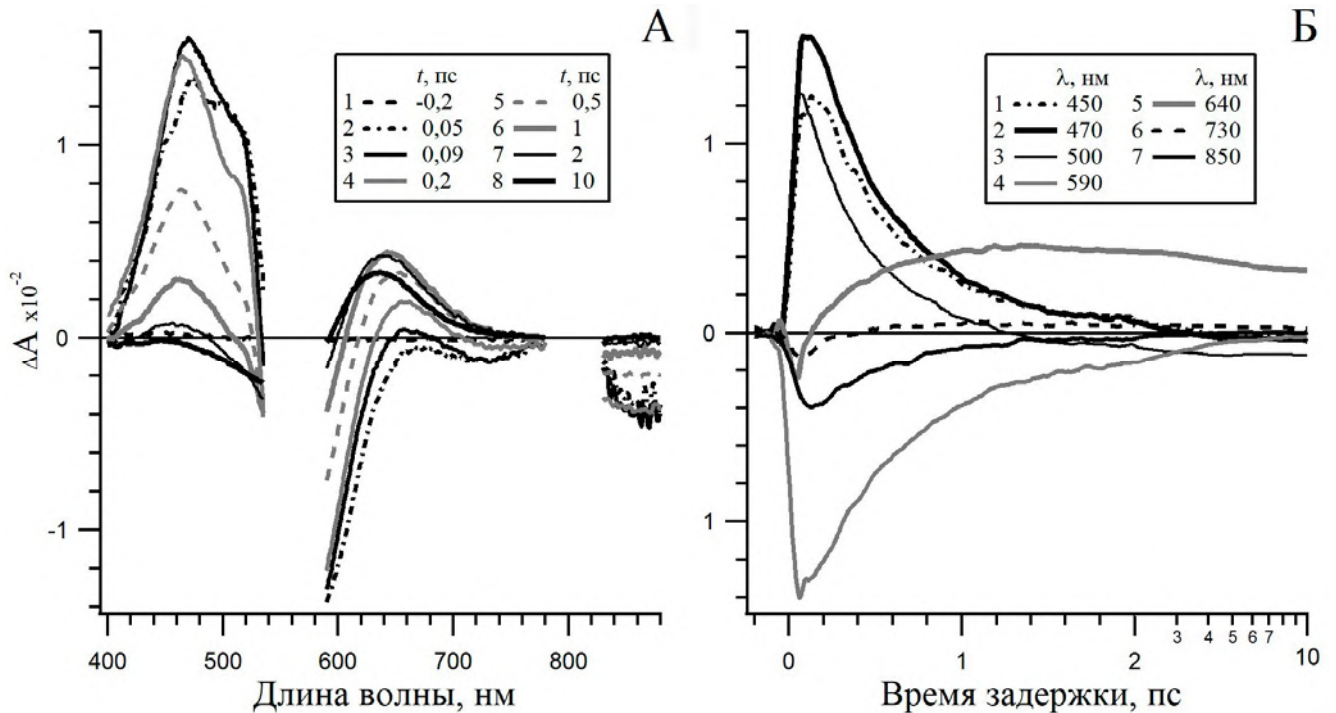
Подставляя экспериментальные значения  $|\Delta A'_{560}(t_{II} = 3,775 \text{ пс})| = 1 \cdot 10^{-4}$  еоп. и  $\Delta A^{I_{560}} = 2,59 \cdot 10^{-3}$  еоп. (Рисунок 3.13, вверху) в выражение (3.17), получаем значение квантового выхода обратного фотоперехода  $\text{Бато}_{535} \rightarrow \text{P}_{498}$   $\varphi_3 = 0,15$ .

### 3.3. Динамика прямой фотореакции бактериородопсина

Динамика прямой фотореакции SA формы БР исследовалась при возбуждении фемтосекундными импульсами 560 нм в  $\alpha$ -полосе поглощения [219, 220, 222, 223]. На Рисунке 3.15 представлены спектры (А) и кинетические кривые (Б) ф/и поглощения БР на характерных временах задержки и длинах волн зондирования, соответственно.

Как видно из Рисунка 3.15А, во временном диапазоне до 1,5–2 пс наблюдается положительный сигнал  $S_n \leftarrow S_1$  поглощения ( $\Delta A_{\text{ESA1}}$ , 400–530 нм) и отрицательный сигнал вынужденного  $S_1 \rightarrow S_0$  испускания ( $\Delta A_{\text{SE}}$ , 680–900 нм) из возбужденного состояния (интермедиат  $I_{460}$ ), которое образуется к  $\sim 100$  фс из начального ФК состояния. Полоса  $\Delta A_{\text{ESA1}}$  имеет небольшое плечо в области 510 нм, характерное для многих микробинальных родопсинов [98, 101, 224]. Это плечо образуется и исчезает раньше, чем основной пик на  $\sim 460$  нм, что приводит к сдвигу максимума поглощения основного пика (474  $\rightarrow$  466 нм) на временах задержки 50–200 фс (Рисунок 3.15А, кривые 2–4; Рисунок 3.15Б, кривые 1–3). Сигнал  $\Delta A_{\text{SE}}$  слабо выражен по сравнению с полосой  $\Delta A_{\text{ESA1}}$ , особенно в диапазоне 680–780 нм, что связано с присутствием в этой спектральной области длинноволновой полосы  $S_3 \leftarrow S_1$  поглощения ( $\Delta A_{\text{ESA2}} > 0$ ), которая предполагается у всех микробинальных родопсинов [54, 94, 225]. Исчезновение полос поглощения

и испускания интермедиата  $I_{460}$  отражает распад возбужденного состояния при  $S_1 \rightarrow S_0$  переходе, который соответствует переходам  $I_{460} \rightarrow J_{625}$  и  $I_{460} \rightarrow \text{BP}_{568}$ , осуществляемым через CI  $S_1/S_0$  ППЭ.



**Рисунок 3.15** – А – Дифференциальные спектры фотоиндуцированного поглощения бактериородопсина, представленные на характерных временах задержки. В спектральных диапазонах 535–590 и 780–830 нм данные не представлены из-за артефактного сигнала, связанного с рассеянием возбуждающего импульса. Б – Кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения бактериородопсина, представленные на характерных длинах волн зондирования в линейном (–0,2–2 пс) и логарифмическом (2–10 пс) масштабах времени

Сигнал поглощения первого продукта в основном состоянии с изомеризованным 13-цис ретиналом ( $\Delta A_{GSA}(J_{625})$ ) появляется в спектральном диапазоне 600–680 нм ко временам задержки 1–1,5 пс (Рисунок 3.15А, кривая 6; Рисунок 3.15Б, кривая 5). В этом спектральном диапазоне сигнал  $\Delta A_{GSA}(J_{625})$  частично перекрывается с сигналами  $\Delta A_{SE}$  и  $\Delta A_{ESA2}$ , что является причиной появления положительного поглощения на временах до  $\sim 300$  фс, скорее всего связанного не с образованием продукта, а с коротковолновым сдвигом сигнала  $\Delta A_{ESA2}$  [95, 226]. Полоса  $\Delta A_{GSA}(J_{625})$  после своего образования за последующие несколько пикосекунд немного сдвигается в коротковолновую область с уменьшением интенсивности (Рисунок 3.15А, кривая 7), что отражает образование следующего интермедиата  $K_{590}$  как результат колебательной релаксации ретиналя [227]. Полоса  $\Delta A_{ESA1}$  частично перекрывается с отрицательным сигналом  $\Delta A_{GSB}(\text{BP}_{568})$ , который наблюдается в области 520–640 нм. В пикосекундном временном диапазоне этот сигнал уменьшается и смещается в коротковолновую область в результате процессов распада возбужденного состояния ( $I_{460}$ ), образования интермедиата  $J_{625}$  и возвращения части

возбужденных молекул в исходное состояние БР<sub>568</sub>. Эти данные соответствуют многочисленным исследованиям в этой области [24, 169, 173, 228]. Через 10 пс после возбуждения дифференциальный спектр состоит только из полосы поглощения интермедиата **K**<sub>590</sub> ( $\Delta A_{GSA}$ ) и полосы выцветания БР<sub>568</sub> ( $\Delta A_{GSB}$ ) (Рисунок 3.15А, кривая 8).

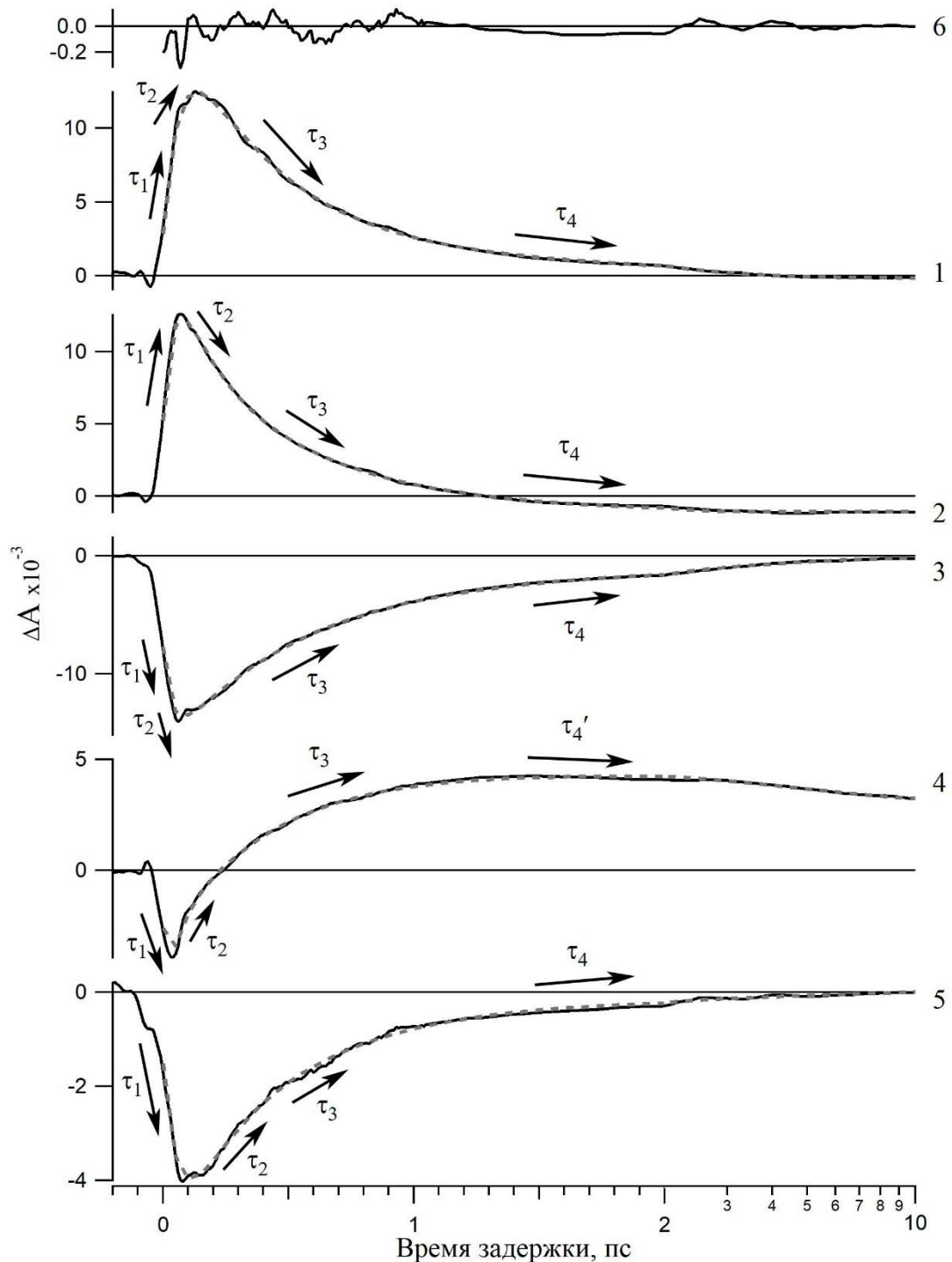
Для исследования динамики прямой фотореакции БР кинетические кривые в характерных диапазонах зондирования, начиная со времени задержки 0 фс, были аппроксимированы четырех-экспоненциальными модельными кривыми (Рисунок 3.16), аналогичными модельной кривой вида (3.1). Полученные времена затухания  $\tau_1$ – $\tau_4$  ( $\tau_4'$ ) и значимые амплитуды ( $a_3$  и  $a_4$ ) экспоненциальных компонент, позволившие охарактеризовать наблюдаемые процессы, представлены в Таблице 3.3 для диапазонов зондирования: 440–460 нм (коротковолновое плечо полосы  $\Delta A_{ESA1}$ ), 490–510 нм (длинноволновое плечо полосы  $\Delta A_{ESA1}$ ), 585–600 нм ( $\Delta A_{GSB}$ ), 620–640 нм ( $\Delta A_{ESA2} + \Delta A_{GSA}$  (**J**<sub>625</sub> и **K**<sub>590</sub>)) и 870–890 нм ( $\Delta A_{SE}$ ).

Времена  $\tau_1$ – $\tau_4$  и  $\tau_4'$  позволили охарактеризовать пять процессов первичных реакций БР. Процесс  $\tau_1 = 40$  фс, очевидно, связан с переходом из состояния ФК в интермедиат **I**<sub>460</sub> и соответствует литературным данным [95, 171]. Характерное время следующего процесса ( $\tau_2$ ) сильно зависит от длины волны зондирования и варьируется в диапазоне 90–230 фс при среднем значении 130 фс. С этим характерным временем происходит коротковолновый сдвиг полос поглощения интермедиата **I**<sub>460</sub> ( $\Delta A_{ESA1}$  и  $\Delta A_{ESA2}$ ), наблюдаемый на временах задержки 50–200 фс, обсуждавшийся ранее и не связанный с распадом возбужденного состояния. Этот процесс также сопровождается длинноволновым сдвигом сигнала  $\Delta A_{SE}$ . Таким образом, время  $\tau_2$  скорее всего отражает процесс движения волнового пакета вдоль  $S_1$  ППЭ и сопровождающей его колебательной релаксации при образовании интермедиата **I**<sub>460</sub>.

Процесс  $\tau_3 = 480$  фс является основным путем распада возбужденного состояния БР и лучше всего наблюдается в полосах  $\Delta A_{ESA1}$  (Рисунок 3.16, кривые 1 и 2) и  $\Delta A_{SE}$  (Рисунок 3.16, кривая 5). При этом в том же масштабе времени наблюдается образование продукта **J**<sub>625</sub> (Рисунок 3.16, кривая 4) и исходного состояния БР<sub>568</sub> (Рисунок 3.16, кривая 3). Следовательно, эту составляющую можно отнести к реакционному пути распада возбужденного состояния через  $S_1/S_0$  CI по двум каналам – переходу **I**<sub>460</sub> → **J**<sub>625</sub> как результат изомеризации ретиналя, и переходу **I**<sub>460</sub> → БР<sub>568</sub> как результат возвращения ретиналя в *транс* форму.

Следующий процесс  $\tau_4 = 2,4$  пс, который можно наблюдать в полосах  $\Delta A_{ESA1}$ ,  $\Delta A_{SE}$  и  $\Delta A_{GSB}$ , связан с дополнительным нереакционным путем распада возбужденного состояния, поскольку в этом временном диапазоне формируется только исходное состояние БР<sub>568</sub> (Рисунок 3.16, кривая 3; Таблица 3.3). Соотношение реакционного и нереакционного путей составляет 0,96/0,04 (Таблица 3.3). В спектральной области 620–640 нм в том же пикосекундном временном

диапазоне небольшое падение сигнала  $\Delta A_{GSA}$  отражает отдельный процесс – переход из интередиата  $J_{625}$  в интередиат  $K_{590}$  (Рисунок 3.16, кривая 4). Характерное время этого процесса –  $\tau_4' = 1,8$  пс (Таблица 3.3).



**Рисунок 3.16** – Кинетические кривые фотоиндуцированного 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).

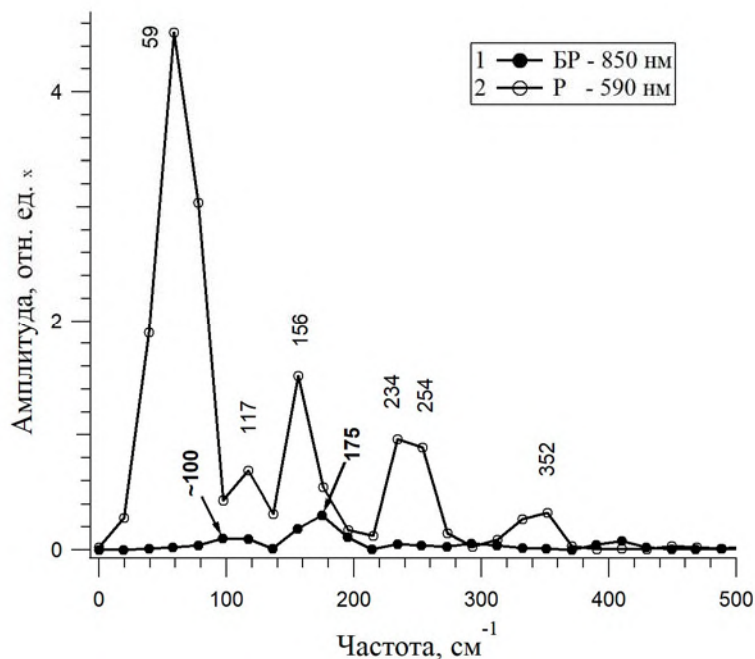


**Таблица 3.3** – Параметры модельных экспоненциальных кривых, построенных для экспериментальных кинетических кривых фотоиндуцированного поглощения бактериородопсина во временном диапазоне 0–10 пс в характерных спектральных диапазонах зондирования

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

Как видно из Рисунков 3.15Б и 3.16, в кинетических кривых ф/и поглощения БР осцилляционная составляющая не выражена так ярко, как в случае Р (Рисунки 3.3, 3.5–3.7). Фурье-анализ осцилляционной составляющей сигнала  $\Delta A_{SE}(t)$  БР (Рисунок 3.16, кривая б) показал наличие слабо выраженных осцилляций с частотами  $\sim 100$  и  $175 \text{ см}^{-1}$  (Рисунок 3.17, кривая 1), соответствующих литературным данным [192].

Для сравнения на Рисунке 3.17 также представлен спектр мощности Фурье-компонент, полученный для Р в области сигнала  $\Delta A_{GSA}(t)$  продукта Фото570 (кривая 2). Основные пики спектра мощности Р также находятся в низкочастотной области ( $59$ ,  $156 \text{ см}^{-1}$  и другие), как обсуждалось ранее (Пункт 3.1.2.), но их амплитуда значительно больше, чем в случае БР.



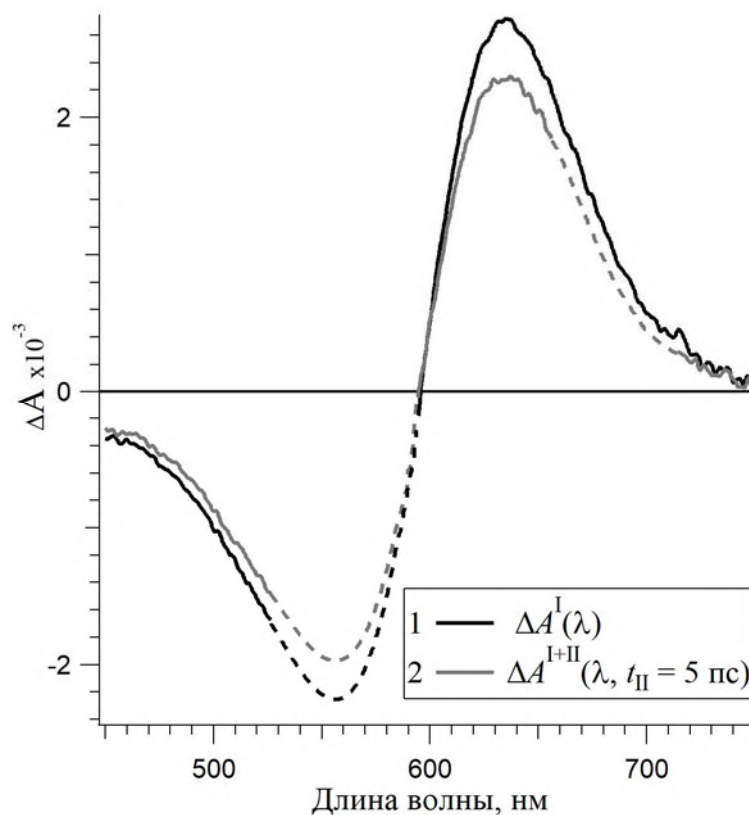
**Рисунок 3.17** – Сравнение спектров мощности Фурье-компонент, полученных при анализе осцилляций нормированных кинетических кривых фотоиндуцированного поглощения бактериородопсина на длине волны 850 нм (1) и родопсина на длине волны 590 нм (2) в интервале времен задержки 0,09–1 пс. Частоты пиков подписаны на Рисунке в [см<sup>-1</sup>]

### 3.4. Фотохромизм бактериородопсина

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

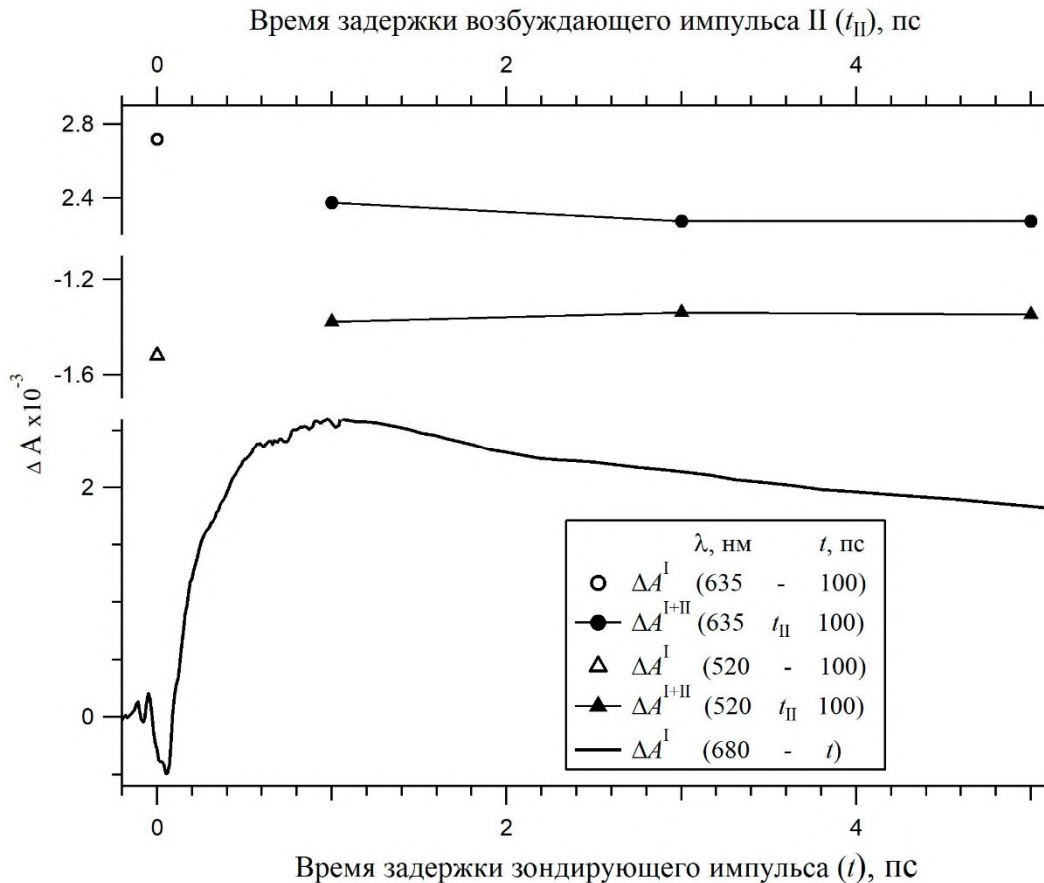
В работе были исследованы обратные фотореакции БР, инициированные в раннем пикосекундном диапазоне времен [219]. С этой целью были зарегистрированы дифференциальные спектры ф/и поглощения БР при действии одного возбуждающего импульса 560 нм (импульс I) и двух возбуждающих импульсов 560 и 680 нм (импульсы I и II, соответственно) при времени задержки импульса II  $t_{II} = 1, 3$  и 5 пс и зондирующего импульса  $t = 100$  пс. На этом времени задержки зондирования дифференциальный спектр состоит только из положительной полосы  $\Delta A_{GSA}(K_{590})$  в области 600–750 нм и отрицательной полосы  $\Delta A_{GSB}(BR_{568})$  в области 450–600 нм. На Рисунке 3.18 представлены спектры ф/и поглощения БР, полученные при времени задержки  $t_{II} = 5$  пс, когда импульс II возбуждает продукт  $K_{590}$ . Как видно из Рисунка 3.18, при действии импульса II наблюдается уменьшение поглощения интермедиата  $K_{590}$  в дифференциальном спектре и увеличение поглощения исходного состояния БР<sub>568</sub>. Это свидетельствует о том, что импульс II в части молекул БР прерывает фотоцикл и инициирует обратную фотореакцию со стадии интермедиата  $K_{590}$  в исходное состояние.

Сохранение формы дифференциальных спектров при действии импульса II, как и в случае P, свидетельствует об отсутствии побочных продуктов при протекании обратной фотореакции.



**Рисунок 3.18** – Дифференциальные спектры фотоиндуцированного 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 достроены модельными кривыми (пунктирные кривые)

Данные, полученные при времени задержки  $t_{II} = 1, 3$  и  $5$  пс, представлены на Рисунке 3.19 (вверху). Это значения ф/и поглощения БР, зарегистрированные на длинах волн зондирования 520 и 635 нм в зависимости от времени задержки  $t_{II}$ . При времени задержки  $t_{II} = 1$  пс инициируется обратная фотореакция из продукта  $J_{625}$ , поскольку эта временная задержка соответствует максимальному поглощению продукта  $J_{625}$  в дифференциальных сигналах (Рисунок 3.19, внизу), а время его перехода в следующий продукт  $K_{590}$  составляет 1,8 пс. Как видно из Рисунка 3.19, изменение сигнала ф/и поглощения БР после действия импульса II на длинах волн 520 и 635 нм более выражено на временах задержки  $t_{II} = 3$  и  $5$  пс, когда инициируется обратная фотореакция  $K_{590} \rightarrow \text{БР}_{568}$ . Это может быть связано как с различием коэффициентов экстинкции продуктов  $J_{625}$  и  $K_{590}$  на длине волны действия импульса II, так и с разным значением квантового выхода обратных фотореакций  $J_{625} \rightarrow \text{БР}_{568}$  и  $K_{590} \rightarrow \text{БР}_{568}$ .



**Рисунок 3.19** – Внизу – Кинетическая кривая фотоиндуцированного поглощения бактериородопсина  $\Delta A^I$ , зарегистрированная на длине волны 680 нм (нижняя ось абсцисс). Вверху – Значения фотоиндуцированного поглощения бактериородопсина  $\Delta A^{I+II}$ , зарегистрированные на длинах волн 520 и 635 нм на времени задержки зондирования  $t = 100$  пс и представленные в зависимости от времени задержки импульса  $t_{II} = 1, 3$  и  $5$  пс (верхняя ось абсцисс). На времени задержки  $t_{II} = 0$  фс представлены контрольные значения фотоиндуцированного поглощения бактериородопсина  $\Delta A^I$ , зарегистрированные на длинах волн 520 и 635 нм на времени задержки  $t = 100$  пс

### 3.4.2. Расчет квантового выхода обратной фотореакции бактериородопсина

Квантовый выход  $\phi_4$  обратной фотореакции  $K_{590} \rightarrow BR_{568}$  ( $t_{II} = 5$  пс) был вычислен аналогично расчету, представленному в Пункте 3.2.2. для Р, с использованием выражений (3.2) – (3.15) [219]. При этом были использованы значения:  $\lambda_{\text{pump II}} = 680$  нм,  $E_{\text{ph}} = 2,92 \cdot 10^{-19}$  Дж,  $E_{\text{pump II}} = 5,6 \cdot 10^{-7}$  Дж,  $\epsilon_{K680} = 6,95 \cdot 10^6$  см<sup>2</sup> моль<sup>-1</sup> (Рисунок 2.6Б) [214]. В случае БР для времени задержки  $t_{II} = 5$  пс выражение (3.15) имеет вид:

$$\phi_4 = |\Delta A'_{635}(t_{II} = 5 \text{ пс})| / (0,2 \Delta A^I_{635}). \quad (3.18)$$

Подставляя в выражение (3.18) значения  $\Delta A^I_{635} = 2,72 \cdot 10^{-3}$  еоп. и  $|\Delta A'_{635}(t_{II} = 5 \text{ пс})| = 4,4 \cdot 10^{-4}$  еоп., получаем  $\phi_4 = 0,81$ .

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 4.1. Динамика первичных фотопревращений родопсина

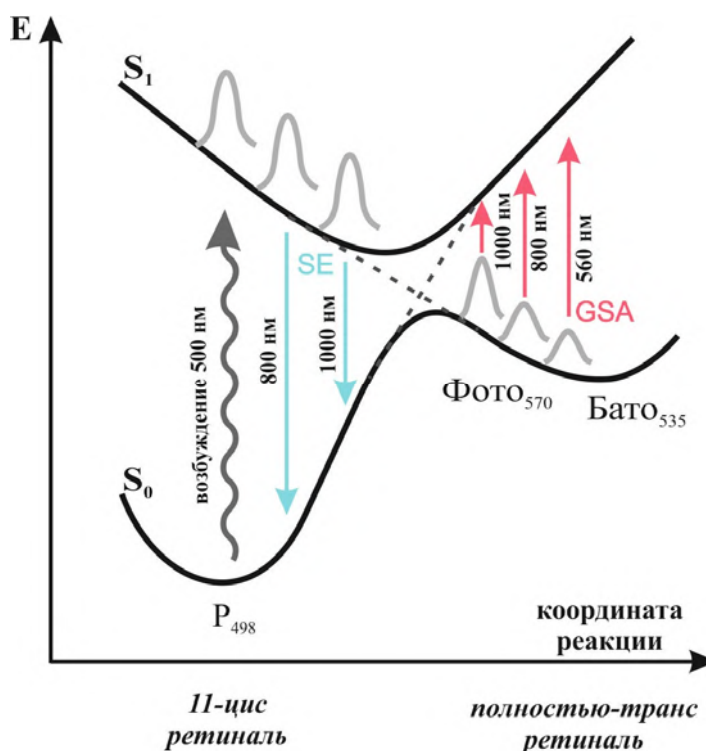
#### 4.1.1. Дифференциальные спектры и кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения родопсина

В работе при возбуждении Р фемтосекундными импульсами в  $\alpha$ -полосе поглощения были получены дифференциальные сигналы ф/и поглощения  $\Delta A(\lambda; t)$  (Рисунки 3.2–3.7), которые отражают процесс образования самых первых продуктов его фотолиза ( $\Delta A_{GSA}$ ) – Фото<sub>570</sub>, Бато<sub>535</sub> и колебательно-возбужденного исходного состояния Р<sub>498'</sub> [217–220]. Также были получены сигналы поглощения ( $\Delta A_{ESA1}$  и  $\Delta A_{ESA2}$ ) и испускания ( $\Delta A_{SE}$ ) из возбужденного состояния Р\*<sub>510</sub>. Эти данные хорошо согласуются с данными работ [53, 55, 87, 91, 92, 216, 229].

Последовательность индуцированных светом событий, происходящих в молекуле Р, можно представить следующим образом. После поглощения кванта света на S<sub>1</sub> ППЭ образуется ФК состояние, которое в результате движения волнового пакета с участием С-С и С=С колебательных мод молекулы ретиналя к 30 фс переходит в возбужденное состояние Р\*<sub>510</sub> с максимумом поглощения в коротковолновой области 510 нм. Из этого состояния наблюдаются сигналы  $\Delta A_{ESA}$  и  $\Delta A_{SE}$ . Полосу поглощения Р\*<sub>510</sub> в области 500 нм наблюдали ранее в работах [53, 87] на времени задержки 33 фс и в работе [55] на временах задержки 0–30 фс. В настоящей работе эта полоса поглощения наблюдается на тех же временах задержки в спектральном диапазоне 400–550 нм (Рисунок 3.2, кривые 2–10; Рисунок 3.6), она может быть приписана S<sub>n</sub> ← S<sub>1</sub> поглощению Р ( $\Delta A_{ESA1}$ ).

В длинноволновой спектральной области наблюдается сигнал  $\Delta A_{SE}$  из Р\*<sub>510</sub> (Рисунок 3.2, кривые 2–5; Рисунок 3.4, контуры 1–2; Рисунок 3.5, кривые 3–7). Этот сигнал интересен тем, что динамика его появления и исчезновения, сопровождаемая возникновением и дальнейшим смещением сигнала  $\Delta A_{GSA}$ , отражает процесс движения волнового пакета по S<sub>1</sub> ППЭ Р<sub>498</sub> и S<sub>0</sub> ППЭ его первого продукта Фото<sub>570</sub>. Как видно из Рисунка 3.2, в области 540–720 нм на временах задержки 0–20 фс возникает сигнал  $\Delta A_{SE}$  сложной формы с отрицательными пиками около 560, 610 и 640–720 нм (Рисунок 3.2, кривые 2–4). К 30 фс остается только одна широкая полоса  $\Delta A_{SE}$ (640–720 нм). Вероятно, такая сложная форма сигнала  $\Delta A_{SE}$  на ранних временах связана с наличием дополнительной длинноволновой полосы S<sub>3</sub> ← S<sub>1</sub> поглощения ( $\Delta A_{ESA2}$ ) из возбужденного состояния Р\*<sub>510</sub>, которая конкурирует с сигналом  $\Delta A_{SE}$ . Аналогичная полоса S<sub>3</sub> ← S<sub>1</sub> поглощения предполагается в длинноволновых ф/и сигналах микробактериальных родопсинов [54, 94, 225, 230]. Если проследить эволюцию полосы  $\Delta A_{SE}$ (640–720 нм) в диапазоне времени 0–50 фс, то можно наблюдать небольшой сдвиг в длинноволновую область (Рисунок 3.4,

красная стрелка), который отражает движение волнового пакета по  $S_1$  ППЭ  $P_{498}$  в сторону CI  $S_1/S_0$  ППЭ. На времени задержки  $\sim 50$  фс в области 700 нм отрицательный сигнал  $\Delta A_{SE}$  переходит в положительный сигнал  $\Delta A_{GSA}$  (Рисунок 3.4, 50 фс, контур 3), отражая переход волнового пакета через CI. Сигнал  $\Delta A_{GSA}$  на длине волны 720 нм нарастает к 100–130 фс и сдвигается в более коротковолновую область к 580–600 нм ко времени задержки 200 фс (Рисунок 3.4, синяя стрелка), формируя классическую полосу поглощения продукта Фото<sub>570</sub> в дифференциальном спектре. Смещение сигнала  $\Delta A_{GSA}$  связано с движением волнового пакета уже по  $S_0$  ППЭ Фото<sub>570</sub>. Эти процессы также хорошо видны на Рисунке 3.5 на временах задержки до 200 фс. В работе [55] подобную динамику сигналов  $\Delta A_{SE}$  и  $\Delta A_{GSA}$  наблюдали в спектральном диапазоне до 1000 нм со сменой отрицательного сигнала  $\Delta A_{SE}$  на положительный сигнал  $\Delta A_{GSA}$  на времени  $\sim 80$  фс. Схематическое движение волнового пакета показано на Рисунке 4.1.



Движение волнового пакета также хорошо прослеживается по наличию осцилляций в кинетических кривых  $\Delta A_{GSA}(t)$  колебательно-возбужденных фотопродуктов – Фото<sub>570</sub> и  $P_{498}'$  (Рисунки 3.3, 3.5–3.7). Сохранение волнового пакета в основном электронном состоянии после  $S_1 \rightarrow S_0$  перехода свидетельствует о когерентном характере реакции фотоизомеризации в

молекуле Р. Реакция фотоизомеризации ретиналя в других РСБ – БР, галородопсине, ASR, и в ПШО ретиналя в растворе также имеет когерентный характер [23, 192, 231].

#### 4.1.2. Анализ кинетических кривых фотоиндуцированного поглощения родопсина

При анализе кинетических кривых ф/и поглощения Р были получены характерные времена процессов, наблюдаемых в фемто- и пикосекундном временных диапазонах (Таблица 3.1). Было получено характерное время распада возбужденного состояния  $P^*_{510}$  (~60 фс), которое отражает скорость достижения волновым пакетом области С1 и перехода на  $S_0$  ППЭ с образованием продуктов. Это значение хорошо согласуется с работами [53, 55, 74–76, 90, 232], в которых оно составило 50–100 фс. Теоретические расчеты показали, что торсионный угол  $C_{11}=C_{12}$  связи ретиналя в процессе достижения области С1 меняется от  $-13^\circ$  до  $-88^\circ$  [55] (Пункт 1.2.5.).

Таким образом, анализ кинетических кривых показал, что характерное время перехода  $P^*_{510} \rightarrow \text{Фото}_{570}$  составило ~60 фс. Окончательное образование  $\text{Фото}_{570}$  требует дополнительной стадии, которая протекает уже на  $S_0$  ППЭ этого продукта с характерным временем ~70 фс (Таблица 3.1) и заключается в движении волнового пакета, сопровождаемом дальнейшим торсионным поворотом связи  $C_{11}=C_{12}$  до  $-141^\circ$  [55] и перераспределением колебательной энергии внутри ретиналя. При этом полоса поглощения  $\text{Фото}_{570}$  сдвигается от 1000 до 580 нм и достигает максимального поглощения в дифференциальном спектре ко времени задержки 200 фс [55]. В настоящей работе этот процесс был продемонстрирован в спектральном диапазоне 570–720 нм (Рисунок 3.2, кривая 12; Рисунок 3.4, синяя стрелка).

Образование следующего продукта  $\text{Бато}_{535}$  характеризуется временем 2,2 пс (Таблица 3.1), в течение которого завершаются процессы колебательной релаксации и дефазировки различных колебательных мод ретиналя после его изомеризации, вероятно связанные с перераспределением энергии между ретиналем и его белковым окружением. Время 2,2 пс согласуется с характерным временем образования  $\text{Бато}_{535}$  (3 пс), полученным тем же методом в работах [53, 83], а также с данными работы [89], в которой методом время-разрешенной Рамановской спектроскопии было показано исчезновение антистоксовых частот, характеризующих продукт  $\text{Фото}_{570}$ , за время 2,5 пс.

Часть волнового пакета, созданного при возбуждении, проходит через С1 в том же временном масштабе ~60 фс с образованием  $P_{498}'$  и продолжает движение по  $S_0$  ППЭ этого состояния. При этом с характерным временем ~80 фс происходит обратный поворот торсионной  $C_{11}=C_{12}$  связи от  $-88^\circ$  в сторону 11-цис изомера, сопровождаемый торсионными колебаниями с большой амплитудой [233], что завершает процесс образования  $P_{498}'$ . С этим характерным временем в кинетических кривых в области сигнала  $\Delta A_{GSB}$  наблюдается рост дифференциального

поглощения на временах задержки 100–400 фс (Рисунок 3.6; Таблица 3.1). Можно предположить, что далее в пикосекундном масштабе времени происходит перераспределение колебательной энергии ретиналя, аналогичное происходящему в продукте Фото<sub>570</sub>, которое также может сопровождаться коротковолновым сдвигом полосы поглощения Р<sub>498'</sub>. Этот процесс трудно увидеть в дифференциальных спектрах из-за наложения различных сигналов. В кинетических кривых в спектральном диапазоне 430–480 нм на временах до 4–5 пс наблюдается дополнительный рост дифференциального поглощения с характерным временем 2,4 пс (Рисунок 3.3; Таблица 3.1). Этот рост сигнала может быть связан как с упомянутым выше процессом колебательной релаксации в продукте Р<sub>498'</sub>, так и с возвращением части возбужденных молекул в исходное состояние Р<sub>498</sub> из нереакционного возбужденного состояния, обнаруженного в работе [93].

Фотореакция Р имеет нестационарный когерентный характер, одним из признаков которого являются осцилляции время-разрешенных сигналов, характеризующих динамику реакции. Поскольку время жизни возбужденного состояния крайне мало, не было зарегистрировано осцилляций в сигналах поглощения и испускания из возбужденного состояния Р\*<sub>510</sub> (Рисунки 3.6 и 3.5, соответственно). Тем не менее, экспериментально наблюдаются осцилляции сигналов поглощения первых фотопродуктов – Фото<sub>570</sub> и Р<sub>498'</sub>, когда волновой пакет переходит с S<sub>1</sub> на S<sub>0</sub> ППЭ в процессе реакции, частично сохраняя свои когерентные свойства (Рисунки 3.8 и 3.9) [217–219]. Ранее с помощью метода фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии с разрешением 35 фс во время-разрешенных сигналах поглощения фотопродуктов Р наблюдались осцилляции с частотами 60 и 135 см<sup>-1</sup> [53, 91]. В настоящей работе тем же методом были получены аналогичные частоты осцилляций сигналов ф/и поглощения Р (59 и 136 см<sup>-1</sup>), а также дополнительные частоты в диапазоне 39–371 см<sup>-1</sup> (Рисунок 3.9). Осцилляции с более высокими частотами выявить не удалось из-за ограничений, связанных с временным разрешением метода (20–30 фс). Частоты осцилляций, полученные в настоящей работе (Таблица 4.1, столбцы 7 и 8), коррелируют с частотами, полученными для Р и его фотопродуктов методами стационарной и пикосекундной Рамановской спектроскопии (Таблица 4.1, столбцы 1–4), а также методом резонансных лазерных решеток с гетеродин-детектированием (Таблица 4.1, столбцы 5–6), и приписанных определенным колебательным модам ретиналя [56, 74, 89, 131].

Сравнение частот, представленных в Таблице 4.1, позволило отнести некоторые частоты, полученные в настоящей работе, к определенным колебательным модам ретиналя, а именно, к ТК (59 и 332 см<sup>-1</sup>), делокализованным ТК (117, 136, 156 и 195 см<sup>-1</sup>), колебаниям на изгиб С<sub>10</sub>-С<sub>13</sub> участка полиеновой цепи ретиналя (234 см<sup>-1</sup>) и С<sub>10</sub>-С<sub>13</sub> А<sub>2</sub> ТК (254 см<sup>-1</sup>). В теоретической работе [129] были обнаружены осцилляции разности энергии S<sub>0</sub> и S<sub>1</sub> ППЭ продукта Фото<sub>570</sub> с частотой



120  $\text{cm}^{-1}$ , аналогичной по мнению авторов работы частоте осцилляций время-разрешенных сигналов поглощения этого продукта 60  $\text{cm}^{-1}$  [91, 92]. Эти осцилляции  $\Delta E_{S_0-S_1}$  были приписаны ТК, включающим всю полиеновую цепь ретиналя с  $\beta$ -иононовым кольцом и атомом азота а.о. К296, где торсионные повороты осуществляются по  $C_9=C_{10}$  и  $C_{14}-C_{15}$  связям.

**Таблица 4.1** – Сравнение низкочастотных ( $< 500 \text{ cm}^{-1}$ ) колебательных мод, характеризующих структуру  $P_{498}$ ,  $P_{510}^*$ ,  $\text{Фото}_{570}$ ,  $\text{Бато}_{535}$  и  $P_{498}'$  и полученных методами: стационарной (столбец 1) [131] и пикосекундной (столбцы 2–4) [56, 89] Рамановской спектроскопии; резонансных лазерных решеток с гетеродин-детектированием (столбцы 5 и 6) [74] и фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии (столбцы 7 и 8) [217–219]

	1	2	3	4	5	6	7	8
характер колебаний	$P_{498}$	$P_{510}^*$	$\text{Фото}_{570}$	$\text{Бато}_{535}$	$P_{498}'$	$\text{Фото}_{570}$	$P_{498}'$	$\text{Фото}_{570}$
–	–	–	–	–	31	36	39	–
ТК	–	–	–	–	58	67	59	59
делокализованные ТК	93	–	–	–	–	–	–	117
	131	–	167	167	149	132	136	156
	–	–	–	–	–	162	195	–
$C_{10}-C_{13}$ изгиб	246	–	244	244	–	238	234	234
$C_{10}-C_{13}$ $A_2$ ТК	260	–	–	–	256	–	–	254
–	–	290	300	–	301	285	293	–
ТК	321	–	–	320	–	–	–	332
–	–	–	–	–	–	356	371	352
–	410	–	401	401	417	411	–	–
–	446	–	–	–	–	–	–	–

Метод резонансных лазерных решеток с гетеродин-детектированием с разрешением 11 фс [74] позволил определить в полосе поглощения  $\text{Фото}_{570}$  не только низкочастотные колебательные моды ретиналя (Таблица 4.1, столбцы 5 и 6), во многом аналогичные полученным в настоящей работе, но и более высокочастотные моды, а именно, локализованную торсионную моду  $A_1$   $C_{11}=C_{12}$  связи, НООР, С-С и С=С моды. Авторами работы [74] был сделан вывод о том, что элементарный акт фотоизомеризации ретиналя в Р определяется одним актом локализованного торсионного движения с частотой 570  $\text{cm}^{-1}$ , половина периода которого ( $\sim 30$  фс) сравнима со временем жизни возбужденного состояния ( $\sim 60$  фс). Это торсионное движение непосредственно сопряжено с Н- $C_{11}=C_{12}$ -Н НООР (716  $\text{cm}^{-1}$ ) и  $C_{11}=C_{12}$  (1675  $\text{cm}^{-1}$ ) модами. Аналогичные данные

были получены методами Рамановской спектроскопии [56, 89, 125], фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии [126] и QM/MM моделирования [129].

Теоретические расчеты [114, 140] и анализ интенсивности Рамановских спектров [232] показывают, что  $S_1$  ППЭ  $P_{498}$  при движении вдоль низкочастотных колебательных мод характеризуется крутым наклоном, что приводит к быстрой релаксации вдоль этих координат. Но поскольку период данных колебаний (100–850 фс) в среднем сильно превышает время жизни возбужденного состояния (~60 фс), то можно предположить, что основная структурная эволюция, связанная с низкочастотными колебаниями, происходит на  $S_0$  ППЭ в продуктах реакции, что наблюдается в настоящей работе. В то время как реакция фотоизомеризации Р требует торсионного движения, сильно локализованного в области  $C_{11}=C_{12}$  связи, более масштабные торсионные движения активируются уже после перехода на  $S_0$  ППЭ.

Таким образом, в работе была исследована динамика когерентного процесса фотоизомеризации 11-цис ретиналя в Р методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии. Была измерена временная эволюция дифференциальных спектров ф/и поглощения Р при зондировании в спектральном диапазоне 410–740 нм на временах до 10 пс. Было показано, что фотоизомеризация ретиналя протекает в два этапа с характерными временами ~60 и ~70 фс. Первый этап определяется достижением волновым пакетом области  $C1$  и переходом на  $S_0$  ППЭ, а второй – дальнейшим движением волнового пакета вдоль  $S_0$  ППЭ продукта Фото<sub>570</sub>. Время образования следующего продукта Бато<sub>535</sub> составило 2,2 пс. Процесс возвращения части возбужденных молекул в исходное состояние Р по реакционному пути протекает также в два этапа с характерными временами ~60 и ~80 фс, а по нереакционному – с характерным временем 2,4 пс. Доля нереакционного пути в общей динамике распада возбужденного состояния Р составила 0,04.

В работе были исследованы осцилляции время-разрешенных сигналов поглощения продуктов реакции Фото<sub>570</sub> и  $P_{498}'$ , отражающие динамику когерентных колебательных волновых пакетов, образованных при возбуждении. Методом Фурье-анализа были определены частоты и амплитуды различных колебательных мод, входящих в волновые пакеты Фото<sub>570</sub> (59, 117, 156, 234, 254, 332 и 352  $cm^{-1}$ ) и  $P_{498}'$  (39, 59, 136, 195, 234, 293 и 371  $cm^{-1}$ ). Данные частоты были приписаны делокализованным торсионным колебаниям полиеновой цепи ретиналя, активным в процессе образования данных продуктов реакции. Полученные результаты подтверждают нестационарный когерентный характер прямой фотореакции Р.

## 4.2. Фотохромизм родопсина

Изменение дифференциальных спектров ф/и поглощения Р, зарегистрированных после действия одного и двух возбуждающих импульсов (Рисунок 3.10), показало наличие обратных фотопереходов на временах 0,2–3,775 пс из первых двух продуктов прямой фотореакции Р – Фото<sub>570</sub> и Бато<sub>535</sub>. При этом происходит обратная фотоизомеризация остатка ретиналя: *транс* ретиналь → 11-*цис* ретиналь. Сохранение формы дифференциальных спектров после действия импульса II свидетельствует об отсутствии образования побочных продуктов в процессе обратных фотореакций, поскольку образование состояний, отличающихся от Р<sub>498</sub> конформацией ретиналя и/или белка, будет отражаться на максимуме поглощения, как, например, в случае изородопсина ( $\lambda_{\text{max}} = 480$  нм) [234]. Анализ динамики обратной фотореакции Фото<sub>570</sub> → Р<sub>498</sub>, инициированной через 200 фс после возбуждения импульсом I, показал также отсутствие промежуточных продуктов в этом процессе.

Строение S<sub>0</sub> и S<sub>1</sub> ППЭ Р<sub>498</sub>, а также отсутствие побочных и промежуточных продуктов в обратной фотореакции, позволяет предположить на основе модели двух состояний, представленной на Рисунках 1.8, 4.1 и 4.2, следующий механизм ее протекания. Если возбудить молекулу Р<sub>498</sub> импульсом I в  $\alpha$ -полосе поглощения (Рисунок 4.2), то во ФК состоянии образуется волновой пакет, который будет двигаться вдоль левой ветви электронно-возбужденного состояния S<sub>1</sub> ППЭ к области CI, где он разделяется на два подпакета. Один подпакет переходит на S<sub>0</sub> ППЭ продукта Фото<sub>570</sub>, а второй подпакет – на S<sub>0</sub> ППЭ Р<sub>498</sub>. Волновой пакет, образованный импульсом I, существует на S<sub>0</sub> ППЭ Фото<sub>570</sub> на временах 0,1–2 пс и движется вдоль этой ППЭ. Импульс II с длиной волны 620 нм, соответствующей полосе поглощения Фото<sub>570</sub>, но не Р<sub>498</sub>, пришедший в образец через  $t_{II} = 0,2–2$  пс, инициирует S<sub>1</sub> ← S<sub>0</sub> переход из колебательно-возбужденного состояния Фото<sub>570</sub>, эволюционирующего во времени, на правую ветвь той же S<sub>1</sub> ППЭ, которая участвовала в прямой фотореакции. Это объясняет, почему время задержки импульса II влияет на эффективность обратного фотоперехода. Можно предположить, что обратная фотореакция Р также будет протекать в когерентном режиме независимо от того, из какого состояния она инициирована – Фото<sub>570</sub> или Бато<sub>535</sub>.

Как было сказано ранее, импульс II создает на S<sub>1</sub> ППЭ волновой пакет, который начинает двигаться в область вероятно того же CI S<sub>1</sub>/S<sub>0</sub> ППЭ. В этой области также происходит разделение волнового пакета на два подпакета, один из которых переходит на S<sub>0</sub> ППЭ Р<sub>498</sub>, содержащего 11-*цис* ретиналь, а другой подпакет – на S<sub>0</sub> ППЭ Фото<sub>570</sub> с неизомеризованным *транс*-ретиналем. Если задержка импульса II составляет 2–3,775 пс, то обратная фотореакция инициируется из продукта Бато<sub>535</sub>. Это качественное объяснение наблюдаемого фотохромизма.



**Рисунок 4.2** – Строение поверхностей потенциальной энергии родопсина, иллюстрирующее его фотохромную реакцию в фемто- и пикосекундном временных диапазонах. Красным цветом обозначены параметры прямой фотореакции, синим – обратной фотореакции

При рассмотрении время-разрешенных сигналов ф/и поглощения  $P$  при действии одного и двух возбуждающих импульсов, следующих с задержкой  $t_{II} = 200$  фс,  $\Delta A^I(t)$  и  $\Delta A^{I+II}(t)$ , соответственно (Рисунки 3.11 и 3.12), после действия на образец импульса II наблюдалось небольшое падение поглощения продуктов, как  $\text{Фото}_{570}$  на времени  $0,3 < t < 2$  пс, так и  $\text{Бато}_{535}$  на времени  $t > 2$  пс. При этом в полосе  $\Delta A_{GSV}$  наблюдалось небольшое увеличение сигнала. Таким образом, в настоящей работе в реальном времени наблюдалась динамика протекания обратной фотореакции  $P$ , инициированной из продукта  $\text{Фото}_{570}$ .

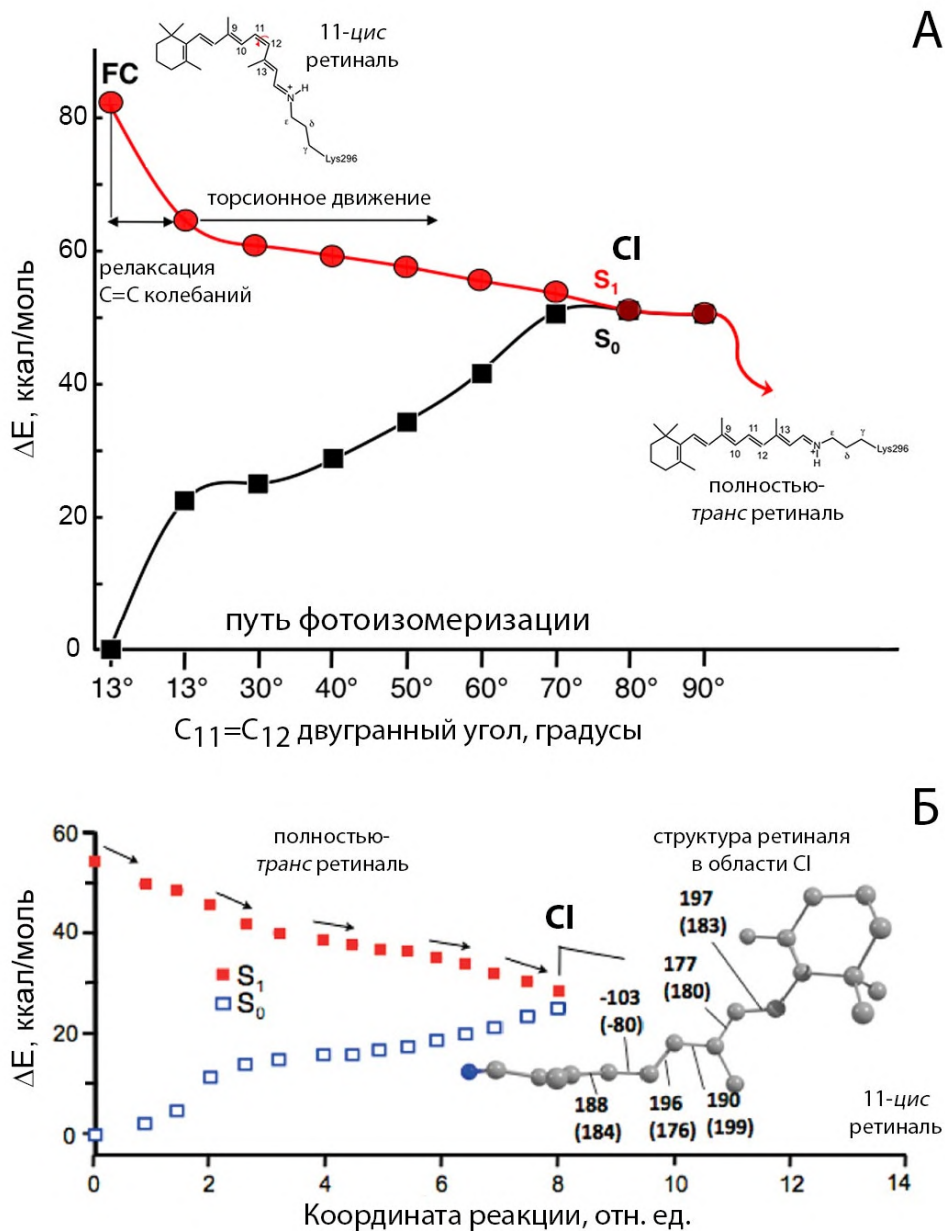
Основные изменения время-разрешенных сигналов  $\Delta A^{I+II}(t)$  по сравнению с  $\Delta A^I(t)$  наблюдались на временах 300–500 фс, и именно они характеризовали переход из возбужденного состояния  $\text{Фото}_{570}^*$  в продукты обратной фотореакции –  $P_{498}$  и  $\text{Фото}_{570}$  (с последующим образованием  $\text{Бато}_{535}$ ). На разностных кривых  $\Delta A'(t) = \Delta A^{I+II}(t) - \Delta A^I(t)$  лучше всего видны эти изменения (Рисунок 3.12, кривая 3), они повторяют изменения кривых  $\Delta A^I(t)$  только с запаздыванием по времени, связанным со временем действия импульса II. Все основные процессы возрастания сигнала  $\Delta A'(t)$ , характеризующие образование первых фотопродуктов обратной фотореакции, завершаются к 400–450 фс после действия импульса I, и, соответственно, к 200–250 фс после действия импульса II, что сравнимо со временем протекания прямой фотореакции  $P$ .

Оценка времен наблюдаемых процессов показала, что рост разностной кривой  $\Delta A'(\lambda = 490 \text{ нм}; t_{II} = 200 \text{ фс}; t)$  характеризуется временем  $\tau_2 = 37 \pm 7 \text{ фс}$ , что несколько меньше, чем характерное время роста кривой  $\Delta A^1(\lambda = 490 \text{ нм}; t)$   $\tau_2 = 63 \pm 5 \text{ фс}$  (Рисунок 3.12А, Таблица 3.2). Это возрастание сигнала связано с  $S_1 \rightarrow S_0$  переходом из  $P_{510}^*$  в  $P_{498}$  в случае прямой фотореакции и из  $\text{Фото}_{570}^*$  в то же состояние  $P_{498}$  в случае обратной фотореакции. Разностная кривая  $\Delta A'(\lambda = 610 \text{ нм}; t_{II} = 200 \text{ фс}; t)$  возрастает и убывает с характерными временами  $\tau_1 = 29 \pm 18 \text{ фс}$  и  $\tau_2 = 130 \pm 100 \text{ фс}$ , соответственно, после чего выходит на плато (Рисунок 3.12Б, Таблица 3.2). В сигнале  $\Delta A^1(\lambda = 610 \text{ нм}; t)$  наблюдаются аналогичные изменения, происходящие с характерными временами  $\tau_1 = 42 \pm 5 \text{ фс}$  и  $\tau_2 = 92 \pm 12 \text{ фс}$ . Учитывая большую погрешность вычисления времен  $\tau_1$  и  $\tau_2$  сигнала  $\Delta A'(\lambda = 610 \text{ нм}; t_{II} = 200 \text{ фс}; t)$ , можно заключить, что они сравнимы с аналогичными временами сигнала  $\Delta A^1(\lambda = 610 \text{ нм}; t)$ . Время  $\tau_1$  в случае обратной фотореакции характеризует вторичное образование продукта  $\text{Фото}_{570}$ , а в случае прямой фотореакции – первичное образование этого продукта. Время  $\tau_2$  в обоих случаях отражает коротковолновый сдвиг спектра поглощения  $\text{Фото}_{570}$ , как было продемонстрировано ранее (Пункт 3.1.1. и 3.1.2). Пикосекундная компонента, отражающая  $\text{Фото}_{570} \rightarrow \text{Бато}_{535}$  переход, наличие которой можно было бы предположить в кривых  $\Delta A'(\lambda = 490 \text{ нм}; t_{II} = 200 \text{ фс}; t)$  и  $\Delta A'(\lambda = 610 \text{ нм}; t_{II} = 200 \text{ фс}; t)$ , не была выявлена вероятно из-за высокого уровня шумов. Таким образом, можно заключить, что скорость обратной фотореакции, инициированной из продукта  $\text{Фото}_{570}$ , сравнима или меньше скорости прямой фотореакции.

В целом *транс*  $\rightarrow$  *цис* фотоизомеризация ПШО ретиналя протекает медленнее [23, 24, 77, 97, 98, 101, 139, 175, 196, 224, 235, 236], чем *цис*  $\rightarrow$  *транс* фотоизомеризация [53, 55, 77–79, 130, 141, 237], как в газовой фазе и растворе, так и в белке, что будет подробно обсуждаться в Пункте 4.5.1. Это связывают с формой  $S_1$  ППЭ ПШО полностью-*транс* ретиналя, имеющей небольшой барьер (Рисунок 1.12), который затрудняет движение волнового пакета в процессе реакции. Исходя из этого можно предположить, что обратная фотореакция Р с переходом ретиналя из полностью-*транс* в 11-*цис* форму будет протекать медленнее прямой 11-*цис*  $\rightarrow$  полностью-*транс* фотореакции. Но данное предположение не подтверждается экспериментальными данными, полученными в настоящей работе, а также теоретическими данными, полученными в работе [140].

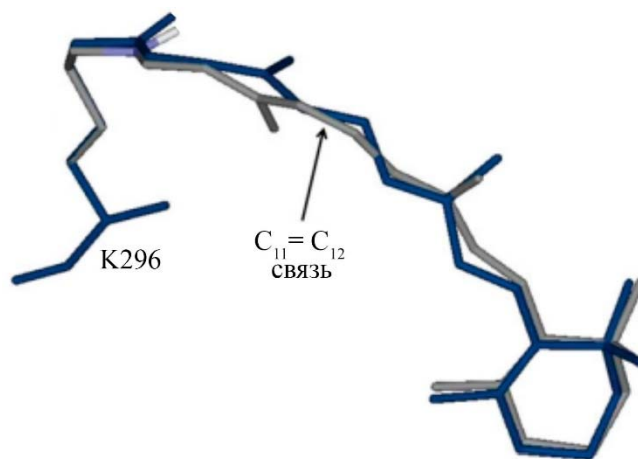
В работе [140] методами QM/MM моделирования исследовалась обратная фотореакция Р из продукта  $\text{Фото}_{570}$ , инициированная через 200 фс после действия первого возбуждающего импульса. Было показано, что эта фотореакция протекает вдоль безбарьерной  $S_1$  ППЭ даже с несколько большей скоростью (Рисунок 4.3Б), чем прямая фотореакция (Рисунок 4.3А) [138]. В теоретической работе [104] исследовался обратный фотопереход  $\text{Бато}_{535} \rightarrow P_{498}$ , и было показано,

что скорость этой фотореакции немного больше, чем скорость прямой фотореакции. Вероятно, это связано с тем, что конформация ретиналя при переходе  $R_{498} \rightarrow \text{Фото}_{570}(\text{Бато}_{535})$  меняется только в центральной части молекулы в результате торсионного движения связей  $C_9=C_{10}$  и  $C_{11}=C_{12}$  в противоположных направлениях [144] (Рисунок 4.4). Это связано с тем, что, с одной стороны,  $\beta$ -иононовое кольцо жестко зафиксировано в хромофорном центре благодаря взаимодействию с а.о. W265, F212 и E122, а с другой стороны, ПШО ретиналя взаимодействует с противоионом посредством водородной связи [238–240]. Стоит отметить, что из-за инверсии длины двойных и одинарных связей полиеновой цепи ретиналя, происходящей при переходе в возбужденное состояние  $S_1$ , связи  $C_9=C_{10}$  и  $C_{11}=C_{12}$  не являются двойными, а скорее одинарными, что облегчает их торсионное движение. При этом торсионный угол  $C_9=C_{10}$  связи поворачивается на  $44^\circ$ , а торсионный угол  $C_{11}=C_{12}$  связи – на  $-128^\circ$ , достигая значения  $-141^\circ$ , которое соответствует 11-*транс* изомеру ретиналя, скрученному на  $39^\circ$  в сторону 11-*цис* изомера [55] (Пункт 1.2.5.). Это скручивание должно сильно облегчить обратную фотореакцию именно по 11-*транс* связи, при этом происходит поворот  $C_9=C_{10}$  и  $C_{11}=C_{12}$  связей в обратном направлении также по типу «движения велосипедных педалей» [140]. Несмотря на то, что по данным работы [140] структуры ретиналя в момент достижения области CI в процессе прямой и обратной фотореакции немного отличаются (Рисунок 4.3Б), они соответствуют одной многомерной области CI [241], как было представлено на Рисунках 1.8, 4.1 и 4.2. Таким образом, возбуждение  $\text{Фото}_{570}$ , приводит к созданию и эволюции по  $S_1$  ППЭ волнового пакета, который безбарьерно достигает той же области CI, что и в случае возбуждения  $R_{498}$ , и переходит на  $S_0$  ППЭ тех же продуктов –  $\text{Фото}_{570}$  и  $R_{498}$ . При моделировании обратной фотореакции в работе [140] была обнаружена траектория только  $\text{Фото}_{570}^* \rightarrow R_{498}$  перехода. Тем не менее, экспериментальные данные, полученные в настоящей работе, подтверждают вторичное образование продукта  $\text{Фото}_{570}$  в процессе обратной фотореакции с квантовым выходом 0,85, в то время как исходное состояние  $R_{498}$  образуется с квантовым выходом 0,15 вне зависимости от того, осуществляется ли обратный фотопереход из продукта  $\text{Фото}_{570}$  или из продукта  $\text{Бато}_{535}$  (Пункт 3.2.2.). Таким образом, бóльшая часть возбужденных молекул  $\text{Фото}_{570}^*$  и возбужденных молекул  $\text{Бато}_{535}^*$ , проходя через CI, переходят в продукт  $\text{Фото}_{570}$ .



**Рисунок 4.3** – А – Строение  $S_0$  и  $S_1$  ППЭ родопсина, вычисленное с помощью QM/MM гибридного метода [138] и иллюстрирующее его прямую фотореакцию  $P_{498} \rightarrow \text{Фото}_{570}$  в фемтосекундном временном диапазоне. Б – строение  $S_0$  и  $S_1$  ППЭ  $\text{Фото}_{570}$ , вычисленное с помощью QM/MM гибридного метода [140] и иллюстрирующее обратную фотореакцию родопсина  $\text{Фото}_{570} \rightarrow P_{498}$  в фемтосекундном временном диапазоне. На Рисунке также представлена структура ретиналя в области CI  $S_1(\text{Фото}_{570})/S_0(P_{498})$  ППЭ, участвующего в обратной фотореакции, с указанием значений двугранных углов; в скобках приведены значения двугранных углов структуры ретиналя в области CI  $S_1(P_{498})/S_0(\text{Фото}_{570})$  ППЭ, участвующего в прямой фотореакции. Рисунок модифицирован из работ [138, 140]

Ранее предпринимались попытки оценить квантовый выход обратной фотореакции Р из продукта  $\text{Бато}_{535}$  как теоретически [104], так и экспериментально при 77 К [202]. В обоих исследованиях были получены значения  $\sim 0,5$ , которые примерно в три раза больше, чем в настоящей работе.



**Рисунок 4.4** – Структуры 11-*цис* ретиналя (серый) в составе темного родопсина ( $P_{498}$ ) и полностью-*транс* ретиналя в составе продукта Бато<sub>535</sub> (синий), полученные методами QM/MM моделирования [144] на основе рентгеновских структур 1HZX [242] и 2G87 [239], соответственно

Кинетические кривые ф/и поглощения  $P$  в полосе поглощения Фото<sub>570</sub> характеризуются осцилляциями, отражающими динамику волнового пакета этого продукта. Волновой пакет эволюционирует во времени, поэтому эффективность обратного фотоперехода Фото<sub>570</sub>→ $P_{498}$  существенно зависит от того, в максимуме или минимуме осцилляций приходит импульс  $\Pi$ . Полученные результаты показали, что количество молекул Фото<sub>570</sub>, принявших участие в обратной фотореакции, напрямую зависит от синхронизации времени задержки импульса  $\Pi$  с фазовыми характеристиками волнового пакета в Фото<sub>570</sub>. В случае, когда импульс  $\Pi$  приходит в момент максимального поглощения Фото<sub>570</sub> ( $t_{\Pi} = 200$  фс), эффективность обратной фотореакции становится максимальной. При этом в дифференциальном спектре, зарегистрированном через 100 пс после возбуждения, наблюдается максимальное падение сигнала на длине волны 560 нм и максимальное увеличение сигнала на длине волны 450 нм (Рисунок 3.13, вверху). Фотохромное переключение регистрируется в меньшей степени, когда импульс  $\Pi$  приходит в момент противофазы движения волнового пакета, и совсем не регистрируется в минимуме осцилляций при времени задержки 475 фс (Рисунок 3.13, вверху). Аналогичные результаты были получены в широком спектральном диапазоне зондирования 420–620 нм (Рисунок 3.14).

Таким образом, в работе была подробно исследована обратная фотореакция  $P$  на временах 0,2–3,775 пс из продуктов прямой фотореакции Фото<sub>570</sub> и Бато<sub>535</sub> в спектральном диапазоне 400–750 нм при комнатной температуре. Было показано, что скорость обратной фотореакции Фото<sub>570</sub> →  $P_{498}$  сравнима со скоростью прямой фотореакции  $P_{498}$  → Фото<sub>570</sub>, а эффективность фотохромного переключения зависит от динамики волнового пакета в продукте Фото<sub>570</sub>. Квантовый выход обратной фотореакции  $P$ , инициированной как из продукта Фото<sub>570</sub>, так и из продукта Бато<sub>535</sub>, составляет  $\sim 0,15$ .



### 4.3. Динамика первичных фотопревращений бактериородопсина

При изучении прямой фотореакции БР были получены дифференциальные спектры и кинетические кривые ф/и поглощения этого белка в широком спектральном диапазоне зондирования (400–900 нм) на временах до 10 пс. Полученные результаты согласуются с литературными данными [24, 167, 169, 173, 243]. Экспериментально наблюдалось образование первых интермедиатов фотоцикла БР –  $I_{460}$ ,  $J_{625}$  и  $K_{590}$ , и были определены характерные времена этих процессов.

Всего в динамике первичных реакций БР было выявлено пять функциональных процессов, первые два из которых характеризуют баллистическое движение волнового пакета в возбужденном состоянии к небольшому барьеру на  $S_1$  ППЭ, и, как следствие, их характерные времена сильно зависят от длины волны зондирования (Рисунок 3.16; Таблица 3.3). Первый и второй процессы отражают динамический сдвиг Стокса, наиболее ярко наблюдаемый в микробиальных родопсинах по сигналам флуоресценции [96, 199].

Первый процесс с характерным временем 40 фс представляет собой выход волнового пакета из ФК состояния с образованием интермедиата  $I_{460}$  (Таблица 3.3), из которого наблюдаются сигналы  $\Delta A_{ESA1}$ ,  $\Delta A_{ESA2}$  и  $\Delta A_{SE}$  (Рисунок 3.15А, кривая 2). Этот процесс определяется сверхбыстрым (30–50 фс) движением волнового пакета вдоль высокочастотных симметричных колебательных мод (колебания С-С и С=С связей) [171, 186]. Также на этих временах может проявляться инерционный диэлектрический отклик белка (50 фс [244] и  $< 200$  фс [245]), влияющий на динамику реакции.

Второй процесс с характерным временем 130 фс связан с движением волнового пакета в потенциальной яме интермедиата  $I_{460}$  (Таблица 3.3). Этот процесс проявляется в дифференциальных спектрах в виде коротковолнового сдвига сигналов  $\Delta A_{ESA1}$  и  $\Delta A_{ESA2}$  и длинноволнового сдвига сигнала  $\Delta A_{SE}$  (Рисунок 3.15А, кривые 2–4). Экспериментально коротковолновый сдвиг полосы  $S_n \leftarrow S_1$  поглощения ( $\Delta A_{ESA1}$ ) наблюдался ранее в микробиальных родопсинах, в том числе и в БР на временах 50–250 фс [24, 175, 195, 236], коротковолновый сдвиг полосы  $S_3 \leftarrow S_1$  поглощения ( $\Delta A_{ESA2}$ ) наблюдался при исследовании фотореакции ПШО полностью-*транс* ретиналя в газовой фазе [77], а длинноволновый сдвиг  $S_1 \rightarrow S_0$  испускания был продемонстрирован в БР методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии с фемтосекундным временным разрешением [24, 95, 96, 167, 169, 226, 246].

Динамика сигналов поглощения и испускания из возбужденного состояния отражает изменение энергии  $S_n \leftarrow S_1$ ,  $S_3 \leftarrow S_1$  и  $S_1 \rightarrow S_0$  переходов в процессе движения волнового пакета вдоль  $S_1$  ППЭ, а также сопутствующий процесс колебательной релаксации. Смещение полос  $\Delta A_{ESA2}$  и  $\Delta A_{SE}$  в противоположные стороны приводит к появлению в области 650 нм на временах

задержки 90–250 фс положительного сигнала (Рисунок 3.15А, кривые 3 и 4), не связанного с образованием продукта  $J_{625}$ . Появление этого сигнала в дифференциальных спектрах БР с модифицированным ретиналем, не способным к изомеризации, вероятно, привело к временному сомнению в том, что интермедиат  $J_{625}$  является продуктом изомеризации ретиналя в основном состоянии [95]. Все эти изменения в дифференциальных спектрах БР отражают процесс, который может быть связан с перераспределением колебательной энергии в ретинале, протекающим в диапазоне времени 50–250 фс и приводящим к активному заселению НООР и торсионных мод, непосредственно участвующих в реакции. Этот процесс наблюдался в БР методами абсорбционной спектроскопии на временах 100–200 фс [170] и фемтосекундной стимулированной Рамановской спектроскопии с характерным временем 260 фс [171].

Третий процесс в первичных реакциях БР с характерным временем 480 фс представляет собой распад возбужденного состояния (интермедиата  $I_{460}$ ), происходящий по реакционному пути (Таблица 3.3). Это приводит к образованию интермедиата  $J_{625}$ , содержащего 13-цис ретиналь, и исходного состояния БР<sub>568</sub>, содержащего полностью-транс ретиналь, в фемтосекундном масштабе времени (Рисунок 3.15А, кривая 6; Рисунок 3.15Б, кривые 4–5).

Четвертый процесс с характерным временем 2,4 пс, наблюдаемый в спектральных диапазонах 400–600 и 700–900 нм, связан с нереакционным путем  $S_1 \rightarrow S_0$  перехода, приводящим к образованию только исходного состояния БР<sub>568</sub> с гораздо бóльшим характерным временем, чем посредством реакционного пути (Рисунок 3.15А, кривая 7). Соотношение вкладов реакционного и нереакционного путей составило 0,96/0,04 (Таблица 3.3), что хорошо согласуется с работами [95, 97, 195, 228]. Наличие двух характерных времен распада возбужденного состояния свидетельствует о его гетерогенности.

Можно отметить, что в том же пикосекундном интервале времени протекает пятый процесс с характерным временем 1,8 пс, связанный с  $J_{625} \rightarrow K_{590}$  переходом, который наблюдается в области 600–700 нм (Рисунок 3.15А, кривые 6–7; Рисунок 3.15Б, кривая 5).

Наличие нескольких путей распада возбужденного состояния, некоторые из которых могут быть нереакционными, в целом характерно для микробинальных родопсинов и, в частности, для протонных помп [24, 94–98, 101, 170, 175, 176]. Как правило, реакционное время составляет сотни фемтосекунд, а нереакционное – несколько пикосекунд. Вклад этих процессов может зависеть от рН, например, для протеродопсина характерны три времени распада возбужденного состояния – одно реакционное (300–700 фс) и два нереакционных (1–5 и 11–21 пс) [98]. Значения этих времен уменьшаются, а вклад реакционного времени увеличивается с увеличением рН. Для БР чаще выделяют два времени распада возбужденного состояния (реакционное 400–500 фс и нереакционное 2–3 пс) [94–97, 170, 175, 176, 195], также, как и для других протонных помп –

ксантородопсина (700 фс и 3,3 пс) [97], родопсина бактерии рода *Gloeobacter* (350 фс и 2,5 пс), родопсина бактерии *Thermus thermophilus* (400 фс и 1 пс) [175]; и некоторых других микробных родопсинов [198, 247].

Существует две основные гипотезы о причине возникновения нескольких путей  $S_1 \rightarrow S_0$  перехода в родопсинах. Первая гипотеза предполагает разделение путей реакции во ФК состоянии на несколько каналов, преимущественно ведущих или не ведущих к изомеризации ретиналя [199, 201, 248, 249]. В ряде других исследований предполагалась исходная гетерогенность белка, связанная с существованием молекул, которые из-за особой конформации хромофорного центра не способны к фотоизомеризации [95, 98, 101]. Последнее предположение было подтверждено для натриевого насоса бактерии *Krokinobacter eikastus* (KR2) [20, 101], а также для протеородопсина [98]. Причина гетерогенности была выявлена в различном взаимодействии протона ШО ретиналя и первичного акцептора в зависимости от pH.

Конформация ретиналя также может существенно влиять на динамику фотореакции. Например, скорости *цис*  $\rightarrow$  *транс* и *транс*  $\rightarrow$  *цис* фотопереходов ПШО ретиналя сильно отличаются, как в РСБ, так и в небелковом окружении (Пункт 4.2.). БР в СА форме содержит небольшое количество 13-*цис* ретиналя (< 10%) [151–153, 156], но маловероятно, что наличие медленного нереакционного пути, продемонстрированного для БР в настоящей работе со временем 2,4 пс, связано с присутствием в некоторых молекулах ретиналя в 13-*цис* форме. Скорее динамика фотоизомеризации этой формы ретиналя должна вносить вклад на временах, меньших, чем время фотоизомеризации *транс* формы ( $t < 480$  фс).

Вероятнее наличие исходной гетерогенности белковой части молекулы БР, влияющей на возможность изомеризации полностью-*транс* ретиналя. Это приводит к двухкомпонентной динамике распада возбужденного состояния, наблюдаемой в сигналах  $\Delta A_{ESA}$  и  $\Delta A_{SE}$ . Однако эта гетерогенность видимо не влияет на начальную динамику волнового пакета в возбужденном состоянии на временах < 250 фс, которая связана не с торсионным движением по  $C_{13}=C_{14}$  связи, а с колебательной релаксацией высокочастотных мод и перераспределением энергии с заселением более низкочастотных мод. Аналогичное заключение было сделано в работе [169], в которой предпринимались попытки доказать исходную гетерогенность СА формы БР. Можно предположить, что в некоторых молекулах БР изменение конформации и протонированного состояния окружающих ретиналь а.о. может привести к увеличению барьера на  $S_1$  ППЭ, а также к изменению топологии области  $C_1$ , и тем самым к появлению долгоживущего возбужденного состояния и нереакционного пути его распада.

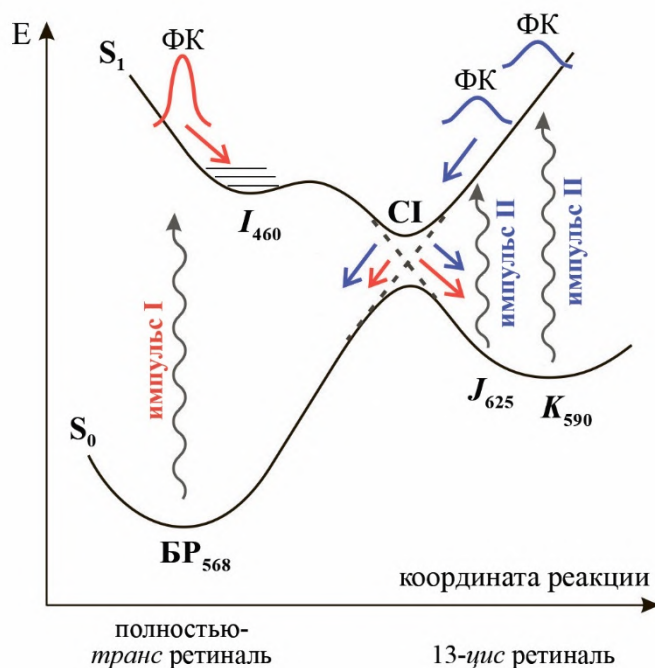
Таким образом, в работе были исследованы самые ранние процессы фотоцикла БР, протекающие в фемто- и пикосекундном диапазоне времени. Была описана двухкомпонентная

динамика сдвига Стокса, происходящего при образовании интермедиата  $I_{460}$  с временами 40 и 130 фс. Было подтверждено наличие двух путей распада возбужденного состояния – реакционного, приводящего к изомеризации ретиналя и образованию интермедиата  $J_{625}$  с характерным временем 480 фс, и нерекционного, приводящего только к образованию исходного состояния  $BP_{568}$  за время 2,4 пс. Наличие двух путей распада возбужденного состояния вероятно связано с исходной гетерогенностью исследуемого белка. Завершение процессов колебательной релаксации, происходящее на стадии  $J_{625} \rightarrow K_{590}$  перехода, было охарактеризовано временем 1,8 пс.

#### 4.4. Фотохромизм бактериородопсина

При изучении обратной фотореакции БР изменение дифференциальных спектров ф/и поглощения этого белка, зарегистрированных после действия одного и двух возбуждающих импульсов (Рисунки 3.18 и 3.19), показало наличие обратного фотоперехода на временах 1–5 пс из первых двух продуктов прямой фотореакции –  $J_{625}$  и  $K_{590}$ . При этом происходит обратная фотоизомеризация остатка ретиналя (13-*цис* ретиналь  $\rightarrow$  полностью-*транс* ретиналь). Сохранение формы дифференциальных спектров после действия импульса II, следующего с задержкой 1, 3 и 5 пс (Рисунок 3.19), свидетельствует об отсутствии побочных продуктов при обратных фотопереходах  $J_{625} \rightarrow BP_{568}$  и  $K_{590} \rightarrow BP_{568}$ .

Для описания механизма фотохромной реакции БР можно воспользоваться схемой, представленной на Рисунке 4.5 и во многом повторяющей схему, иллюстрирующую механизм фотохромной реакции Р (Рисунок 4.2). Импульс I с длиной волны 560 нм возбуждает молекулу  $BP_{568}$  и создает на левой ветви  $S_1$  ППЭ во ФК состоянии волновой пакет, который начинает двигаться вдоль этой ветви и, преодолевая небольшой барьер и частично теряя свои когерентные свойства, попадает в область CI  $S_1/S_0$  ППЭ. Далее волновой пакет, разделившись на два подпакета, переходит на  $S_0$  ППЭ продукта  $J_{625}$  и исходного состояния  $BP_{568}$  (Рисунок 4.5, красные стрелки). Интермедиат  $J_{625}$  полностью образуется ко времени 1–1,5 пс, и импульс II с длиной волны 680 нм, подаваемый с задержкой 1 пс, будет возбуждать именно этот интермедиат. При этом на правой ветви  $S_1$  ППЭ образуется новый волновой пакет, который начинает двигаться вдоль этой ветви вероятно к той же области CI, которая участвует в прямой фотореакции. При достижении области CI происходит переход на  $S_0$  ППЭ с образованием как  $BP_{568}$ , являющегося продуктом этой фотореакции, так и исходного состояния, интермедиата  $J_{625}$  (Рисунок 4.5, синие стрелки).



**Рисунок 4.5** – Строение  $S_0$  и  $S_1$  поверхностей потенциальной энергии бактериородопсина, иллюстрирующее его фотохромную реакцию в раннем пикосекундном временном диапазоне. Красным цветом обозначены параметры прямой фотореакции, синим – обратной фотореакции

Поскольку время образования интермедиата  $K_{590}$  составляет 1,8 пс, то импульс II, следующий с задержкой 3 и 5 пс, инициирует фотореакцию  $K_{590} \rightarrow \text{BP}_{568}$ , механизм которой можно описать аналогично фотореакции  $J_{625} \rightarrow \text{BP}_{568}$  (Рисунок 4.5, синие стрелки).

В процессе прямой фотореакции БР, как и в случае Р, изомеризация ретиналя происходит по типу асинхронного движения «велосипедных педалей» с сохранением занимаемого ретиналем объема в хромофорном центре (Пункт 1.3.2.). При этом изначальное скручивание ретиналя по  $C_{13}=C_{14}$  связи на  $20^\circ$  по направлению к 13-*цис* конфигурации сильно облегчает изомеризацию и делает ее такой селективной [181]. При образовании интермедиатов  $J_{625}$  и  $K_{590}$  двугранный угол  $C_{13}=C_{14}$  связи поворачивается на  $140^\circ$  (от  $-160^\circ$  до  $-20^\circ$ ). Таким образом, при инициировании обратной фотореакции в пикосекундном временном диапазоне ретиналь также скручен на  $20^\circ$  по направлению к полностью-*транс* изомеру, что должно облегчить обратную фотореакцию, что подтверждается данными, полученными в настоящей работе.

Можно предположить, что обратная фотореакция  $J_{625}(K_{590}) \rightarrow \text{BP}_{568}$  будет проходить быстрее, чем прямая фотореакция  $\text{BP}_{568} \rightarrow J_{625}$ , поскольку она инициируется из *цис* изомера ретиналя (Пункт 4.5.1.). Методом пикосекундной флуоресцентной спектроскопии [250] было показано, что для возбужденного состояния интермедиата  $K_{590}$  характерен меньший сдвиг Стокса, чем для возбужденного состояния  $\text{BP}_{568}$ , что свидетельствует о меньших структурных перестройках ретиналя при фотопереходе  $K_{590} \rightarrow \text{BP}_{568}$  и предполагает большую скорость этой фотореакции по сравнению с фотореакцией  $\text{BP}_{568} \rightarrow J_{625}$ . В работе [169] методом

фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии было оценено время жизни возбужденного состояния  $K_{590}^*$ , которое составило  $\sim 100$  фс, что сравнимо как со временем 11-*цис*  $\rightarrow$  полностью-*транс* фотоизомеризации ретиналя в Р ( $\sim 60$  фс), так и со временем 13-*цис*  $\rightarrow$  полностью-*транс* фотоизомеризации ретиналя в ASR (100–160 фс) [23, 236]. Таким образом, можно предположить, что обратная фотореакция БР (13-*цис*  $\rightarrow$  полностью-*транс* ретиналь), инициированная из интермедиатов  $J_{625}$  и  $K_{590}$ , протекает безбарьерно и по своей динамике напоминает прямую фотореакцию Р и ASR, содержащего 13-*цис* изомер.

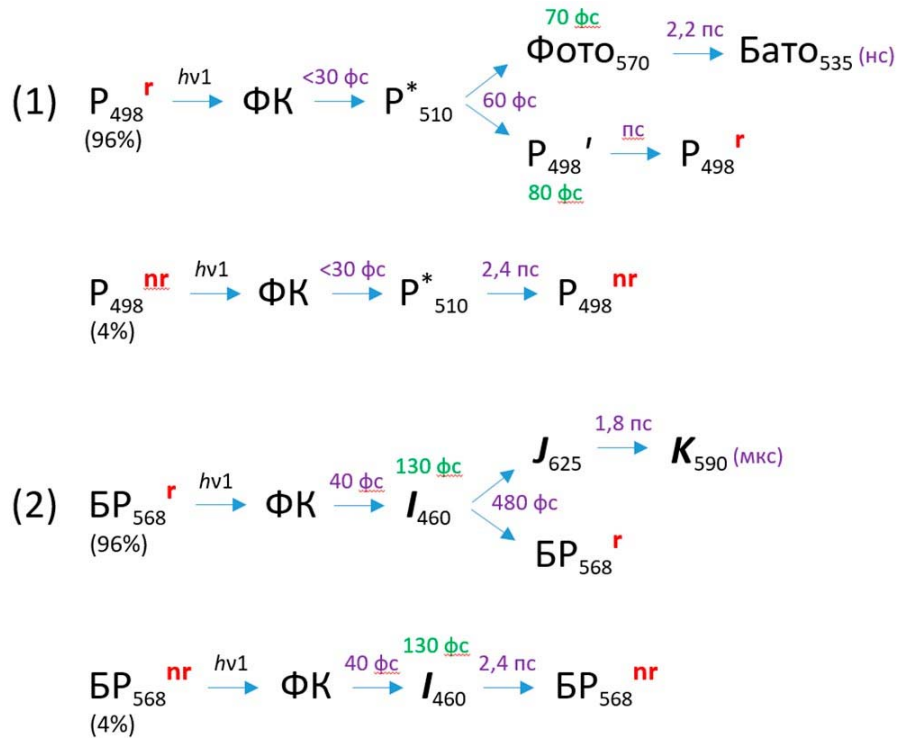
Квантовый выход обратной фотореакции  $K_{590} \rightarrow \text{БР}_{568}$  ( $\phi_4$ ) был оценен с использованием выражения (3.16) как часть молекул, вернувшихся в исходное состояние  $\text{БР}_{568}$  после действия импульса П, следующего с задержкой 5 пс. Он составил  $\phi_4 = 0,81$ , что в целом близко к значениям, полученным ранее методом низкотемпературной спектрофотометрии и время-разрешенной спектроскопии (0,93–0,96) [14, 251, 252].

Таким образом, в работе впервые продемонстрирована обратная фотореакция БР, инициированная в диапазоне времени 1–5 пс из первых продуктов прямой фотореакции  $J_{625}$  и  $K_{590}$  при комнатной температуре. Квантовый выход обратной фотореакции БР, инициированной со стадии продукта  $K_{590}$ , составил 0,81, что соответствует литературным данным [14, 251, 252].

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

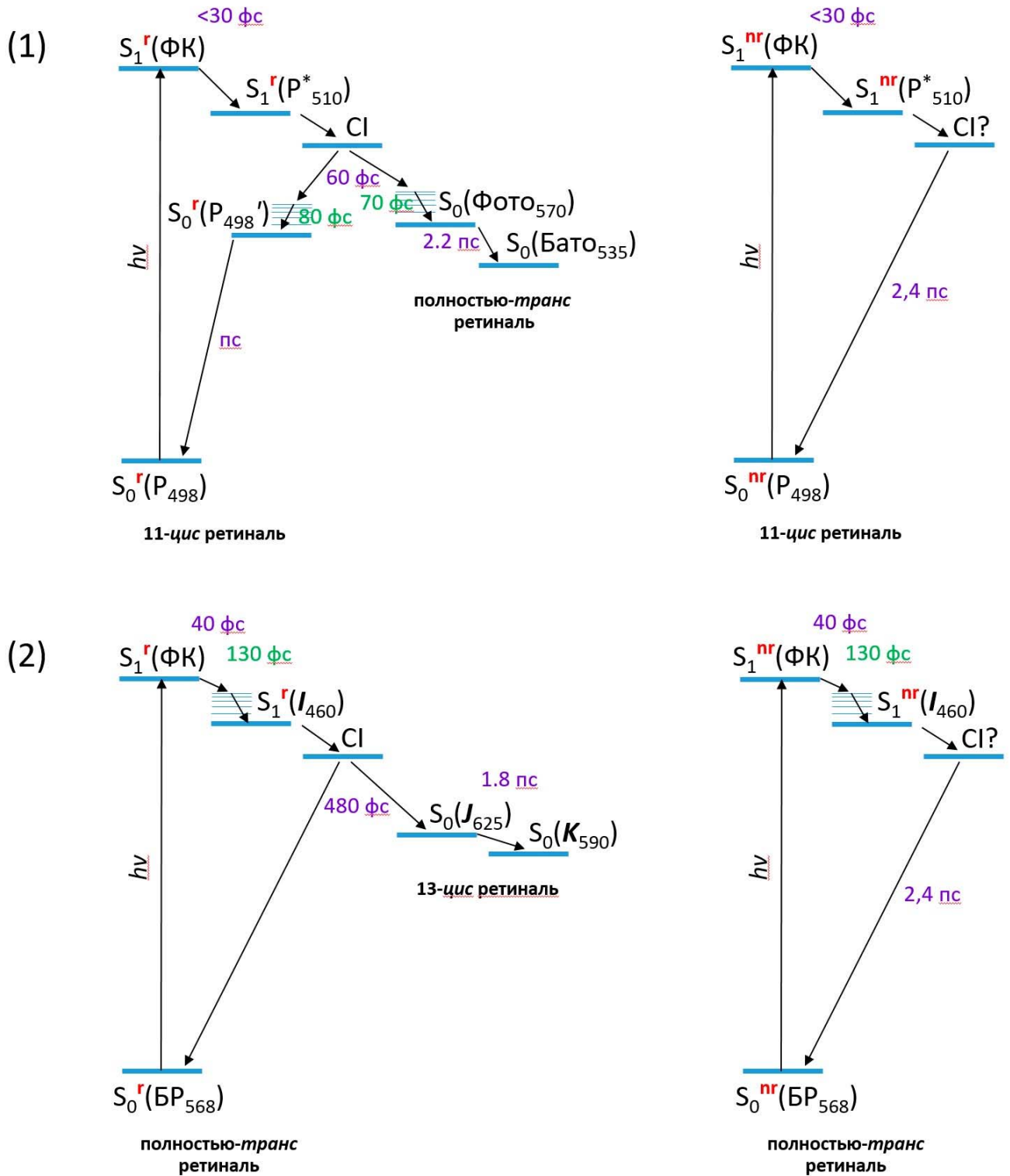
##### 4.5.1. Сравнение прямых фотореакций бактериородопсина и родопсина

На основе данных, полученных в настоящей работе и характеризующих прямые фотореакции РСБ, Р (Пункт 3.1.) и БР (Пункт 3.3.), с учетом литературных данных, можно составить следующие модельные кинетические схемы (Рисунки 4.6 и 4.7). Эти схемы отражают предположение, что гетерогенность возбужденных состояний исследуемых белков связана с гетерогенностью их начальных состояний, среди которых можно выделить одно реакционное состояние ( $\text{Р}_{498}^r$  и  $\text{БР}_{568}^r$ ), способное при возбуждении частично перейти в продукт с изомеризованным ретиналем, и одно нереакционное ( $\text{Р}_{498}^{nr}$  и  $\text{БР}_{568}^{nr}$ ), не способное к фотоизомеризации.



**Рисунок 4.6** – 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. Фиолетовым цветом отмечены времена переходов между различными состояниями, зеленым цветом отмечены времена колебательной релаксации, наблюдаемой при образовании продуктов Фото<sub>570</sub>, P<sub>498</sub>' и интермедиата I<sub>460</sub>

Схемы, описывающие прямые фотореакции Р и БР, имеют много общего. Это образование в процессе реакции аналогичных по своим свойствам интермедиатов: P\*<sub>510</sub>, Фото<sub>570</sub> и Бато<sub>535</sub> в случае Р, и I<sub>460</sub>, J<sub>625</sub> и K<sub>590</sub> в случае БР. Элементарный акт изомеризации ретиналя протекает в возбужденном состоянии путем перехода через CI S<sub>1</sub>/S<sub>0</sub> 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) [14, 56].



**Рисунок 4.7** – Схемы прямых фотореакций родопсина (1) и бактериородопсина (2), отражающие гетерогенность исходных состояний этих белков, среди которых можно выделить реакционные (<sup>r</sup>) и нереакционные (<sup>nr</sup>) состояния. Фиолетовым цветом отмечены времена переходов между различными состояниями, зеленым цветом отмечены времена колебательной релаксации, наблюдаемой при образовании продуктов Фото<sub>570</sub>, Р<sub>498'</sub> и интермедиата I<sub>460</sub>.

Реакция фотоизомеризации ПШО ретиналя, как в белке [53, 55, 91, 192, 236], так и в растворе [196], протекает в когерентном режиме. При возбуждении фемтосекундный импульс



формирует волновые пакеты во ФК состоянии, и когерентность сохраняется при переходе через СІ. Наиболее ярко это видно в случае Р. В кинетических кривых, отражающих образование продукта Фото<sub>570</sub> и исходного состояния, можно выявить осцилляционные компоненты с основными частотами 39, 59, 136 и 156 см<sup>-1</sup> (Рисунок 3.9). В случае БР в кинетических кривых образования и распада первых интермедиатов фотоцикла не наблюдается ярко выраженных осцилляций. В работе было показано наличие низкочастотных осцилляций с частотами 100 и 175 см<sup>-1</sup> только в сигналах  $\Delta A_{SE}(t)$  БР с амплитудой, значительно меньшей, чем в случае Р (Рисунок 3.17). Данные частоты коррелируют с литературными данными (100 и 170 см<sup>-1</sup>) [192], полученными тем же методом с тем же временным разрешением (~25 фс). Применение в работе [174] более коротких возбуждающих импульсов (~10 фс) при иницировании фотореакции БР позволило наблюдать осцилляции в широком диапазоне частот, как в сигналах из возбужденного состояния (интермедиата  $I_{460}$ ), так и первого фотопродукта (интермедиата  $J_{625}$ ), что подтверждает сохранение когерентного режима фотореакции БР, как и в случае Р. В случае ПШО полностью-*транс* ретиналя в растворе наблюдаются осцилляции сигналов  $\Delta A_{SE}$  с частотой 117 см<sup>-1</sup> [253], что свидетельствует о когерентном характере фотореакции как внутреннем свойстве ретиналя. Особенностью когерентных реакций является возможность управления ими путем создания различной топологии S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> и S<sub>2</sub> ППЭ, что активно используется биологическими молекулами РСБ.

Как уже было упомянуто ранее, сходство первичных реакций Р и БР заключается также в наличии одного дополнительного нереакционного пути распада возбужденного состояния, который приводит к образованию только исходного состояния белка за время 2,4 пс и реализуется в небольшой доле молекул, 0,04, (Таблицы 3.1 и 3.3, Рисунки 4.6 и 4.7). Во многих микробальных родопсинах доля нереакционного пути (или нескольких нереакционных путей) при нейтральном значении рН может достигать гораздо большего значения, например, в родопсине почвенной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) она составляет ~0,2 [223], а в KR2 – 0,4 [101]. Некоторые исследователи предполагают, что этот путь также проходит через СІ S<sub>1</sub>/S<sub>0</sub> ППЭ и с крайне малой вероятностью может привести к образованию продукта изомеризации [98], что трудно проверить экспериментально.

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 (Рисунки 4.2 и 4.5) [139], 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 двух состояний, в которой в фотореакции принимают участие только S<sub>0</sub> и S<sub>1</sub> ППЭ. Это приводит к быстрому (за время ~60 фс), направленному и безбарьерному S<sub>1</sub> → S<sub>0</sub> переходу волнового пакета

в процессе фотореакции с сохранением значительной доли когерентности. В теоретической работе [116] было показано, что в Р все траектории движения энергии фотовозбуждения по  $S_1$  ППЭ идут практически синхронно в течение первых 100 фс после возбуждения до достижения основного состояния  $S_0$ . Такой тип динамики  $S_1 \rightarrow S_0$  перехода называется баллистическим или импульсным. В результате становится возможным наблюдение за движением волновых подпакетов вдоль  $S_0$  ППЭ первичных продуктов – Фото<sub>570</sub> и Р<sub>498'</sub>. Движение волновых подпакетов сопровождается колебательной релаксацией этих продуктов, которая протекает в два этапа (Рисунки 4.6 и 4.7). Первый этап (70–80 фс) совпадает с окончательным образованием продуктов Фото<sub>570</sub> и Р<sub>498'</sub> и, вероятно, связан с перераспределением колебательной энергии внутри ретиналя. Второй этап (2,2 пс в случае продукта Фото<sub>570</sub>) совпадает с образованием продукта Бато<sub>535</sub> и отрелаксированного исходного состояния Р<sub>498</sub> и, вероятно, отражает передачу избытка колебательной энергии от ретиналя к белковому окружению. На этом этапе завершаются процессы *цис*  $\rightarrow$  *транс* изомеризации ретиналя и возвращения ретиналя в 11-*цис* форму.

В случае микробиальных родопсинов прямая фотореакция описывается моделью трех состояний, в рамках которой влияние  $S_2$  ППЭ на  $S_1$  ППЭ приводит к появлению небольшого барьера на пути распада возбужденного состояния, сильно влияющего на динамику реакции [139]. Время жизни возбужденного состояния БР<sub>568</sub> (интермедиата  $I_{460}$ ) гораздо больше (480 фс), и динамика его образования и распада лучше разрешается во времени, чем в Р (Рисунки 4.6 и 4.7). Образуясь с характерным временем 40 фс, интермедиат  $I_{460}$  претерпевает колебательную релаксацию, время которой было оценено в 130 фс, после чего начинается изомеризация ретиналя. В результате преодоления барьера на  $S_1$  ППЭ различные компоненты волнового пакета к моменту достижения  $S_1$  сильно теряют когерентные свойства. В теоретической работе [254] было показано, что траектории движения энергии фотовозбуждения по  $S_1$  ППЭ в БР не синхронизированы и достигают  $S_0$  ППЭ в разное время от 50 до 500 фс. Такой тип динамики  $S_1 \rightarrow S_0$  перехода называется диффузным. В результате при образовании интермедиатов  $J_{625}$  и  $K_{590}$ , а также исходного состояния БР<sub>568</sub>, трудно проследить движение уже значительно разфазированных волновых подпакетов. Дополнительного этапа колебательной релаксации при образовании первых продуктов фотореакции БР, как в случае Р, не наблюдается.

Приведенные выше различия в динамике прямой фотохимической реакции родопсинов 1 и 2 типа во многом определяются изомерной формой ретиналя, что подтверждается как экспериментальными [23–25, 55, 141, 235, 236], так и теоретическими [30, 55, 235] исследованиями. Как обсуждалось ранее (Пункт 4.2.), в белковом окружении *цис*  $\rightarrow$  *транс* фотоизомеризация в целом протекает быстрее, чем *транс*  $\rightarrow$  *цис* фотопереход. Например, исследование динамики фотореакции ТА и СА форм БР и ASR методом фемтосекундной

абсорбционной лазерной спектроскопии показало, что в одном и том же белковом окружении полностью-*транс* → 13-*цис* фотоизомеризация протекает за 500–800 фс, а 13-*цис* → полностью-*транс* – за 100–200 фс [23, 24, 235, 236]. В Р и родопсине осьминога 11-*цис* → полностью-*транс* фотоизомеризация протекает еще быстрее за 50–100 фс [55, 141].

В растворе и в газовой фазе для ПШО ретиналя наблюдается такая же закономерность для скоростей *цис* ↔ *транс* фотопереходов. В растворе ПШО 11-*цис* ретиналя фотоизомеризуется за 90–600 фс [78], а ПШО полностью-*транс* ретиналя – за 2–2,8 пс [196, 255]. В газовой фазе фотопереход 11-*цис* → полностью-*транс* протекает за 400 фс, в то время как фотопереход полностью-*транс* → 11-*цис* – за 3 пс [77]. Теоретические расчеты, осуществленные в той же работе [77], показали, что скорость фотореакции напрямую связана с формой S<sub>1</sub> ППЭ ретиналя вдоль координаты реакции, которая в случае полностью-*транс* ПШО ретиналя характеризуется небольшим барьером, увеличивающим время достижения С<sub>1</sub> и, соответственно, время образования продукта. Наименьший барьер, а, следовательно, наиболее вероятный фотопереход, был обнаружен при образовании 11-*цис* изомера. В случае 9-*цис*, 11-*цис* и 13-*цис* изомеров ПШО ретиналя в S<sub>1</sub> состоянии не было обнаружено барьера, но S<sub>1</sub> ППЭ 11-*цис* изомера более крутая и, соответственно, может способствовать бóльшей скорости фотореакции, чем в других изомерах.

Кроме конформационного состояния хромофора на скорость и другие характеристики фотореакции родопсинов 1 и 2 типа может также влиять различная структура хромофорного центра этих белков. Это предположение подтверждается тем, что, например, в микробиальных родопсинах наблюдается большой разброс времени (в среднем 200–700 фс) [96–98, 101, 167, 175, 224, 228, 236] и квантового выхода (в среднем 0,3–0,7) [197, 256–259] полностью-*транс* → 13-*цис* фотоизомеризации.

Влияние белкового окружения ретиналя в РСБ в целом приводит к ускорению фотоизомеризации ретиналя по сравнению с наблюдаемой в газовой фазе и в растворе. При этом характер (наличие/отсутствие барьера) S<sub>1</sub> ППЭ ПШО ретиналя, который наблюдается в газовой фазе, может сохраниться, как в случае Р и БР (Пункты 1.2.4., 1.2.5. и 1.3.2.), а может достаточно сильно измениться. Например, в некоторых микробиальных родопсинах влияние белкового окружения может привести как к сильному уменьшению барьера на S<sub>1</sub> ППЭ полностью-*транс* ретиналя (например, время протекания фотореакции KR2 составляет всего 180 фс [260]), так и к созданию барьера на S<sub>1</sub> ППЭ 13-*цис* ретиналя (например, в случае СА формы ASR, содержащей 13-*цис* ретиналь [30]).

Также белковое окружение ретиналя меняет структуру С<sub>1</sub> и характеристики задействованных в реакции колебательных мод, значительно увеличивая вероятность

фотоизомеризации, как это было показано экспериментально [14, 123, 124, 261, 262,] и теоретически на примере Р [263] и других РСБ [130].

Взаимодействие ретиналя с окружающими а.о. белкового окружения может быть причиной возникновения гетерогенности начального состояния белка, поскольку в газовой фазе она не наблюдается [77]. В результате возникают нереакционные формы белка, наличие которых в некоторых случаях сильно отражается на общем квантовом выходе реакции. Причину гетерогенности некоторые исследователи видят в разрыве водородной связи между протоном ШО и отрицательно заряженным противоионом, что сильно меняет структуру электронных уровней ретиналя и делает фотоизомеризацию маловероятной [98, 101, 130].

Следует отметить, что механизм взаимодействия хромофора с белковым окружением несколько отличается в Р и БР. Например, хорошо известно, что хромофорный центр БР достаточно просторный и не препятствует процессу темновой адаптации, в результате которой в части молекул происходит тепловая изомеризация ретиналя с образованием 13-*цис* формы [154]. В Р, напротив, объем хромофорного центра очень ограничен, и наблюдается сильное стерическое и электростатическое взаимодействие между 11-*цис* ретиналем и а.о. ароматического кластера [48, 49] и противоиона, которое играет важную роль в поддержании скрученной напряженной конфигурации хромофора [50, 51]. Возможно это является причиной того, что характер взаимодействия хромофора с белковым окружением в случае Р практически исключает тепловую изомеризацию 11-*цис* ретиналя в *полностью-транс* форму [52] и таким образом препятствует темновой активации молекулы. А это принципиально важное условие для поддержания низкого теплового «темнового шума» фоторецепторной клетки, что необходимо для ее работы в условиях низких освещенностей. В то же время, фотоизомеризованный *полностью-транс* ретиналь действует в долгоживущем продукте фотолиза Р – метародопсине II, как мощный агонист, способствующий запуску процесса фототрансдукции.

Еще одно следствие разного механизма взаимодействия хромофора с белковым окружением в Р и БР заключается в том, что в результате фотореакции в продукте Бато<sub>535</sub> запасается в два раза большее количество энергии из поглощенного кванта света (приблизительно 60% [84]) по сравнению с интермедиатом  $K_{590}$  (приблизительно 30% [179]). И, если в случае Р механизм запасаения энергии связан с созданием напряженной структуры ретиналя, благодаря взаимодействию с окружающими а.о., то в случае БР, энергия, кроме напряженной структуры ретиналя, частично запасается в структурных изменениях пентагонального кластера, координирующего протон ШО ретиналя.

Таким образом, можно заключить, что РСБ используют особенности различных изомерных форм ретиналя для осуществления быстрой, эффективной и направленной реакции

фотоизомеризации, которая лежит в основе механизма их функционирования. Вероятно, изначальное использование полностью-*транс* ретиналя в качестве хромофора более «древними» родопсинами 1 типа связано с большей термодинамической стабильностью и доступностью этого изомера. Но 11-*цис* ретиналь в качестве хромофора более «молодых» родопсинов 2 типа, несмотря на трудности регенерации, дал этой группе белков значительные преимущества. Это значительно бóльшая скорость фотоизомеризации, которая позволяет сохранить ярко выраженный когерентный характер при достижении С1 и тем самым лучше управлять различными параметрами реакции.

Но почему различная конформация ПШО ретиналя так сильно влияет на динамику фотореакции? В работе [30] методами QM/MM моделирования было показано, что ключевым фактором является длина системы сопряженных связей полиеновой цепи ретиналя, в которую могут входить единственная двойная связь  $\beta$ -иононового кольца, а также  $C_{15}=N$  связь ШО. Как было сказано ранее, возбуждение ретиналя приводит к инверсии длины двойных и одинарных связей, что значительно облегчает изомеризацию. Но, чем больше сопряжение двойных связей в основном состоянии, тем меньше будет выражена инверсия в возбужденном состоянии (из-за взаимодействия  $S_1$  и  $S_2$  ППЭ) и тем труднее будет проходить изомеризация. Родопсины 1 типа содержат полностью-*транс* ретиналь с  $\beta$ -иононовым кольцом в *6-s-транс* конформации. Несмотря на то, что в хромофорном центре структура ретиналя немного скручена, особенно по  $C_{13}=C_{14}$  и  $C_6-C_7$  связям (в случае БР на  $20^\circ$  и  $-19^\circ$ , соответственно [181]), тем не менее, создается удлиненная система сопряженных двойных связей, что приводит к диффузной динамике  $S_1 \rightarrow S_0$  перехода и увеличению времени фотоизомеризации по сравнению с родопсинами 2 типа. В 11-*цис* ретинале система сопряженных двойных связей нарушается за счет  $C_{11}=C_{12}$  связи в *цис* положении. Белковое окружение в родопсинах 2 типа значительно усиливает этот эффект за счет  $\beta$ -иононового кольца в *6-s-цис* положении с поворотом на  $-65^\circ$  [47] и скручивания полиеновой цепи ретиналя, особенно по  $C_{11}=C_{12}$  связи на  $-13^\circ$  (в случае Р) [55]. Это влияет на положение и топологию  $S_0$ ,  $S_1$  и  $S_2$  ППЭ таким образом, что не только ускоряет фотоизомеризацию по сравнению с родопсинами 1 типа, но также уменьшает длину волны поглощения и увеличивает барьер тепловой изомеризации [139, 264].

Ускорение фотореакции в родопсинах 2 типа, как было сказано ранее, возникает за счет создания безбарьерной  $S_1$  ППЭ, на которую не оказывает влияние  $S_2$  ППЭ, что приводит к баллистическому движению волнового пакета в процессе реакции с сохранением когерентности различных колебательных мод. Это, в свою очередь, вероятно дает возможность белку более тонко управлять такими параметрами фотореакции как квантовый выход.

Уменьшение длины волны поглощения ретиналя, возникающее при создании его *цис* изомеров, особенно не планарных, активно используется родопсинами 2 типа как один из факторов для спектральной настройки, поскольку максимум поглощения ПШО ретиналя без влияния окружения (в газовой фазе) составляет ~610 нм [62], и его необходимо сдвинуть в коротковолновую область, чтобы иметь возможность поглощать свет во всем видимом и (для некоторых организмов) ультрафиолетовом диапазоне. Другие факторы спектральной настройки включают в себя взаимодействие ретиналя с заряженными и полярными а.о. и молекулами воды (Пункт 1.2.2.).

Уменьшение длины волны поглощения родопсинов сопряжено с увеличением барьера тепловой изомеризации (корреляция Барлоу) и сначала было предсказано [265], а позже исследовано экспериментально [266] и теоретически [139, 264]. Это дает большие преимущества родопсином 2 типа, сильно увеличивая время тепловой изомеризации и делая ее крайне маловероятной. Например, тепловая изомеризация одной молекулы Р может произойти в среднем в течение 420 лет [3].

Все перечисленные выше последствия нарушения системы сопряженных С=С связей ретиналя могут быть использованы родопсинами 2 типа для создания высокой светочувствительности, что крайне важно для функционирования этих белков, выполняющих фотоинформационную функцию. Например, фоторецепторные клетки палочки, содержащие Р, детектируют одиночный квант света при адаптации к низким освещенностям [36], что важно для сумеречного зрения. Незрительные родопсины могут присутствовать в разных органах совсем в небольшом количестве и/или располагаться глубоко внутри таких органов как мозг, куда доступ света затруднен. На светочувствительность влияют такие характеристики родопсинов как спектральная настройка в соответствии с физиологическими условиями, высокий квантовый выход фотоизомеризации и низкая скорость тепловой изомеризации. Скрученная структура ПШО 11-*цис* ретиналя, возникающая при взаимодействии с белковым окружением в ограниченном объеме хромофорного центра родопсинов 2 типа, позволяет решить эти задачи. 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 заключить, что белковые структуры этих двух групп развивались независимо путем оптимизации электронных свойств хромофорной группы, конформация которой различается. Таким образом, разные аминокислотные последовательности родопсинов 1 и 2 типа определяются разным характером взаимодействия белок-хромофор. 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. Общность функции можно отдаленно проследить на примере родопсинов 2 типа и сенсорных родопсинов 1 типа, особенно тех, которые взаимодействуют с растворимым белком-переносчиком, как, например, ASR. Стоит отметить, что большое количество родопсинов 1 типа, выполняющих различные функции, близки по строению и происхождению и могут приобретать чужие функции при крайне малом числе аминокислотных замен [267], а многие сенсорные родопсины 1 типа в отсутствие белка-переносчика могут функционировать как протонные насосы. Поэтому родопсины 1 и 2 типа не так далеки друг от друга по выполняемым функциям, как может показаться на первый взгляд.

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 [32]. Наличие в большинстве РСБ а.о. лизина в ТМ  $\alpha$ -спирали Н7, необходимого для связывания ретиналя, и двух ароматических а.о. триптофана и тирозина в ТМ  $\alpha$ -спирали Н6, необходимых для закрепления в хромофорном центре  $\beta$ -иононового кольца ретиналя, позволило предположить, что родопсины 2 типа могли возникнуть путем перетасовки экзонов, вызванной рекомбинацией родопсинов 1 типа и прототипов G-белок-связывающих рецепторов. Экзоны для Н6 и Н7 спиралей могли быть предоставлены родопсинами 1 типа, а для Н1–Н5 спиралей – G-белок-связывающими рецепторами [268]. 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 [30].

Таким образом, сравнение спектрально-кинетических данных, полученных в настоящей работе методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии для прямой фотореакции Р (родопсина 2 типа) и БР (родопсина 1 типа), проведенное совместно с литературными данными, показало, что элементарный акт фотоизомеризации ретиналя можно интерпретировать как переход через С1 с сохранением когерентности колебательных волновых пакетов, образующихся при возбуждении. Скорость фотоизомеризации ретиналя в Р примерно в 8 раз выше, чем в БР, как следствие безбарьерного движения вдоль ППЭ  $S_1$  возбужденного состояния, что также приводит к ярко выраженному когерентному характеру реакции. На основе проведенного сравнения можно заключить, что различия в динамике прямых фотохимических реакций родопсинов 1 и 2 типов в основном связаны с различиями исходных изомерных форм их

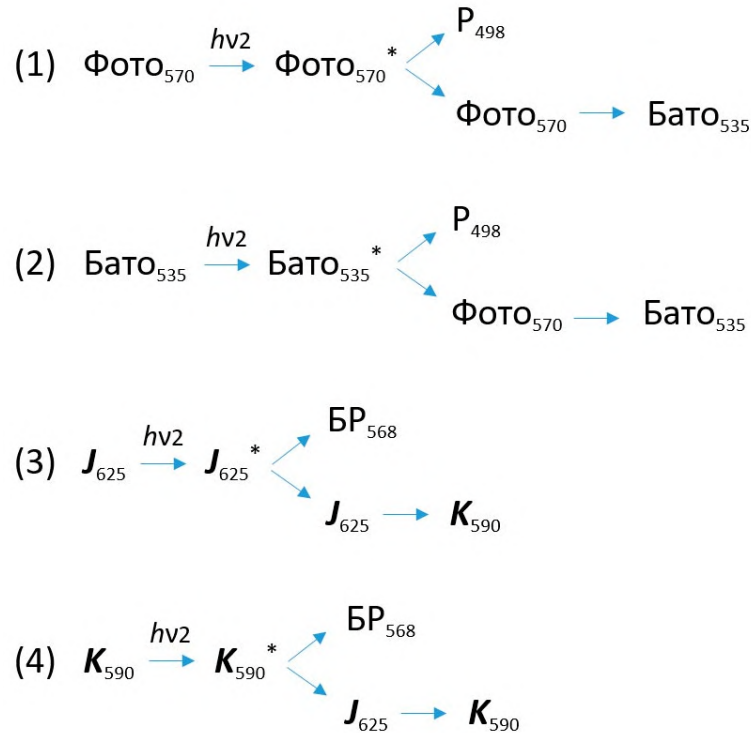
хромофоров (полностью-*транс* и 11-*цис* ретиналя, соответственно), электронные свойства которых оптимизированы посредством взаимодействия с белковым окружением, которое может быть гетерогенным. Таким образом, белковое окружение, как в родопсинах 1, так и 2 типа, использует внутренние свойства разных изомерных форм ПШО ретиналя, ускоряя их фотореакцию в несколько раз и делая ее более эффективной и селективной, при этом вероятно подстраивая различные параметры реакции под условия функционирования. 11-*цис* форма ретиналя дает родопсинам 2 типа значительные преимущества по сравнению с родопсинами 1 типа, содержащими полностью-*транс* ретиналь, поскольку позволяет достигнуть высокой светочувствительности, что крайне важно для белков, выполняющих фотоинформационную функцию. Видимо различия в конформации хромофора в родопсинах 1 и 2 типа направляют путь эволюции РСБ, что приводит к крайне различающейся первичной структуре, но, тем не менее, к большой структурной гомологии и общности механизма их работы.

#### 4.5.2. 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*<sub>625</sub> и *K*<sub>590</sub>) в фемто- и пикосекундном масштабе времени (Пункты 3.2. и 3.4., соответственно). Схемы обратных фотопереходов представлены на Рисунке 4.8. Было высказано предположение, что эти фотопереходы осуществляются с участием тех же S<sub>1</sub> ППЭ и CI, которые участвовали в прямой фотореакции, как представлено на Рисунках 4.2 и 4.5 и теоретически показано для Р [241].

Несмотря на то, что квантовые выходы прямой фотореакции Р и БР практически совпадают (~0,65), квантовые выходы обратных фотореакций из первых фотопродуктов сильно отличаются (~0,15 и 0,81, соответственно). Эти различия могут быть связаны с колебательными модами, задействованными в данных фотореакциях, с динамикой волнового пакета, созданного при возбуждении, а также со строением области CI [140], что требует теоретического исследования. Видимо определяющим фактором является влияние белкового окружения на динамику обратных фотопереходов полностью-*транс* → 11-*цис* ретиналь в Р и 13-*цис* → полностью-*транс* ретиналь в БР, поскольку в растворе метанола эти фотореакции идут с квантовыми выходами, близкими по значению (0,14 и 0,11, соответственно [73]). Можно отметить, что с функциональной точки зрения столь маленький квантовый выход обратной фотореакции Р по сравнению с БР является преимуществом, способствующим более эффективному осуществлению процесса фототрансдукции.





**Рисунок 4.8** – Кинетические схемы обратных фотореакций родопсина (1 и 2) и бактериородопсина (3 и 4), инициированных из продуктов прямой фотореакции:  $\text{Фото}_{570}$  (1),  $\text{Бато}_{535}$  (2),  $\text{J}_{625}$  (3) и  $\text{K}_{590}$  (4). Знаком \* отмечены возбужденные ( $S_1$ ) состояния

Общепризнано, что фотопревращение РСБ сопровождается преобразованием световой энергии в структурные перестройки ретинального хромофора и его белкового окружения. Поглощение света микробиальными родопсинами может служить различным функциям. У исследованных к настоящему времени представителей этого семейства белков это в основном фотоэнергетическая и в меньшей степени сенсорная и фоторегуляционная функции. Вполне вероятно, что в случае микробиальных родопсинов обратные фотореакции не могут существенно повлиять на эффективность выполнения этих функций.

Однако в случае родопсинов животных, которые являются G-белок-связывающими рецепторами, 11-цис ретиналь действует как эффективный лиганд-антагонист, поддерживающий низкий тепловой «темной шум» фоторецепторной клетки (Пункт 4.5.1.). 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 фотореакции, 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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была подробно исследована когерентная фотохромная (фотообратимая) реакция изомеризации ретиналя в бактериородопсине галоархеи *H. salinarum* и зрительном родопсине быка *B. taurus* как в типичных представителях родопсинов 1 и 2 типа, соответственно. Исследование проводилось методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии с разрешением 20–30 фс при комнатной температуре в широком диапазоне зондирования 400–900 нм. Прямая фотореакция была инициирована из темного состояния зрительного родопсина и SA состояния бактериородопсина. Обратная фотореакция была инициирована из первых двух продуктов прямой фотореакции – Фото<sub>570</sub> и Бато<sub>535</sub> в случае зрительного родопсина, и интермедиатов J<sub>625</sub> и K<sub>590</sub> в случае бактериородопсина. Были получены дифференциальные спектры и кинетические кривые ф/и поглощения исследуемых белков на временах зондирования до 10 пс, а также спектры ф/и поглощения на времени зондирования 100 пс.

Анализ полученных данных позволил составить кинетические схемы прямых фотореакций исследуемых белков и определить времена наблюдаемых процессов.

В случае зрительного родопсина наблюдалось быстрое и направленное движение волнового пакета, созданного возбуждающим импульсом, сначала вдоль S<sub>1</sub> ППЭ исходного состояния (P\*<sub>510</sub>), и далее после прохождения CI вдоль S<sub>0</sub> ППЭ первого продукта Фото<sub>570</sub>. Время достижения волновым пакетом CI и образования продуктов, содержащих изомеризованный ретиналь (Фото<sub>570</sub>) и неизомеризованный ретиналь (P<sub>498</sub>'), было оценено путем анализа спектрально-кинетических данных (~60 фс). Полученное значение хорошо согласуется с литературными данными [53, 55, 74–76, 90, 232]. Время движения волнового пакета вдоль S<sub>0</sub> ППЭ при образовании продукта Фото<sub>570</sub> было оценено в ~70 фс и приписано перераспределению колебательной энергии внутри ретиналя. Время образования следующего продукта Бато<sub>535</sub> составило 2,2 пс и было приписано перераспределению колебательной энергии между ретиналем и белковым окружением.

Когерентный характер прямой фотореакции зрительного родопсина ярко проявляется в наличии осцилляций время-разрешенных сигналов поглощения первых продуктов Фото<sub>570</sub> и P<sub>498</sub>', отражающих динамику волновых пакетов в этих состояниях. Анализ частот осцилляций выявил набор низкочастотных колебательных мод, характеризующих структуру ретиналя в продуктах реакции и соответствующих делокализованным торсионным движениям. Основные выявленные частоты составили 59 и 156 см<sup>-1</sup> (Фото<sub>570</sub>) и 39, 59 и 136 см<sup>-1</sup> (P<sub>498</sub>'). Полученные результаты подтверждают нестатистический, когерентный характер фотореакции зрительного родопсина.

В случае бактериородопсина когерентный характер прямой фотореакции не так сильно выражен, как в случае зрительного родопсина, благодаря особенностям строения S<sub>1</sub> ППЭ,

имеющей небольшой барьер. Это приводит к гораздо большему времени жизни возбужденного состояния и, соответственно, большему времени образования первого продукта, интермедиата  $J_{625}$  (480 фс). Данная особенность бактериородопсина, как и других родопсинов 1 типа, позволяет лучше разрешить процессы, протекающие в возбужденном состоянии, по сравнению со зрительным родопсином и другими родопсинами 2 типа. Это дало возможность не только определить время образования интермедиата  $I_{460}$  (возбужденное состояние, аналог состояния  $P^*_{510}$  зрительного родопсина), которое составило 40 фс, но и наблюдать последующий процесс колебательной релаксации в этом состоянии, время которого составило 130 фс. Время  $J_{625} \rightarrow K_{590}$  перехода составило 1,8 пс.

На основании двухкомпонентной динамики распада возбужденного состояния бактериородопсина было предположено наличие нереакционного возбужденного состояния, не ведущего к изомеризации ретиналя и характерного для многих родопсинов 1 типа. В случае зрительного родопсина на основании полученных в работе данных совместно с данными работы [93] также было предположено наличие нереакционного возбужденного состояния. Время жизни такого возбужденного состояния в обоих исследованных белках составило 2,4 пс со вкладом в общую динамику распада 4%.

В работе была подробно исследована обратная фотореакция зрительного родопсина, инициированная из первых двух продуктов прямой фотореакции,  $Photo_{570}$  и  $Bato_{535}$ , на временах 0,2–3,775 пс. Впервые была экспериментально оценена скорость протекания обратной фотореакции  $Photo_{570} \rightarrow R_{498}$ , инициированной через 0,2 пс после возбуждения первым импульсом, которая сравнима со скоростью прямой фотореакции  $R_{498} \rightarrow Photo_{570}$ , что хорошо согласуется с данными теоретической работы [140]. В работе также было подтверждено, что эффективность фотохромного переключения зависит от времени прихода второго возбуждающего импульса. Эта зависимость определяется динамикой волнового пакета в продукте  $Photo_{570}$ . Квантовый выход обратной фотореакции зрительного родопсина, инициированной как из продукта  $Photo_{570}$ , так и из продукта  $Bato_{535}$ , составил  $\sim 0,15$ .

В случае бактериородопсина в работе была впервые экспериментально продемонстрирована возможность обратного фотоперехода, инициированного из первых двух продуктов прямой фотореакции этого белка,  $J_{625}$  и  $K_{590}$ , в раннем пикосекундном диапазоне времени (1–5 пс). Было показано, что эффективность обратной фотореакции  $J_{625} \rightarrow BR_{568}$  практически не зависит от времени задержки второго возбуждающего импульса, что связано с отсутствием ярко выраженных когерентных эффектов в этом продукте, в отличие от продукта  $Photo_{570}$  в случае зрительного родопсина. Квантовый выход обратной фотореакции  $K_{590} \rightarrow BR_{568}$  составил 0,81, что значительно выше, чем в случае зрительного родопсина.

На основе полученных данных было проведено сравнение прямых и обратных фотореакций бактериородопсина и зрительного родопсина как типичных представителей родопсинов 1 и 2 типа, соответственно. Сравнение прямых фотореакций показало, что: (1) для описания прямой фотореакции исследованных белков можно применить одну кинетическую схему; (2) элементарный акт фотоизомеризации ретиналя можно интерпретировать как переход через  $S_1$  с сохранением когерентности колебательных волновых пакетов, образующихся при возбуждении; (3) когерентный характер реакции наиболее выражен в зрительном родопсине как следствие безбарьерного движения вдоль ППЭ  $S_1$  возбужденного состояния, что также приводит к крайне высокой скорости изомеризации ретиналя по сравнению с бактериородопсином и вероятно позволяет белку лучше управлять квантовым выходом реакции. Различия в динамике фотохимических реакций родопсинов 1 и 2 типов могут быть связаны, во-первых, с различиями исходных изомерных форм их хромофоров (полностью-*транс* и 11-*цис* ретиналь, соответственно) и, во-вторых, с влиянием белкового окружения на хромофор, которое может быть гетерогенным. Таким образом, белковое окружение хромофора в родопсинах, как 1, так и 2 типа, использует внутренние свойства разных изомерных форм ПШО ретиналя, ускоряя их фотореакцию в несколько раз и делая ее более эффективной и селективной, при этом, вероятно, подстраивая различные параметры реакции под условия функционирования. Можно заключить, что 11-*цис* форма ретиналя дает родопсинам 2 типа значительные преимущества по сравнению с родопсинами 1 типа, содержащими полностью-*транс* ретиналь, поскольку позволяет достигнуть высокой светочувствительности, что крайне важно для белков, выполняющих фотоинформационную функцию. Видимо различия в конформации хромофора в родопсинах 1 и 2 типа направляют путь эволюции РСБ, что приводит к крайне различающейся первичной структуре, но, тем не менее, к большой структурной гомологии и общности механизма их работы.

Сравнение обратных фотореакций зрительного родопсина и бактериородопсина, инициированных в фемто- и раннем пикосекундном диапазоне времени, показало, что: (1) поглощение кванта света первыми двумя продуктами прямой фотореакции приводит к обратному переходу в исходное состояние без образования побочных продуктов; (2) эффективность обратного фотоперехода зависит от когерентного характера прямой фотореакции, что ярко выражено в случае зрительного родопсина; (3) квантовый выход обратной фотореакции, инициированной в раннем пикосекундном временном диапазоне, в зрительном родопсине и бактериородопсине значительно отличается (0,15 и 0,81, соответственно), что может быть связано с большей надежностью фотобиологического механизма преобразования света в информационный процесс в эволюционно более «молодых» родопсинах 2 типа по сравнению с

механизмом преобразования света в фотоэнергетический процесс в эволюционно более «древних» родопсинах 1 типа.

## ВЫВОДЫ

1. В процессе прямой реакции фотоизомеризации 11-*цис* ретиналя в зрительном родопсине волновой пакет достигает области конического пересечения за время  $\sim 60$  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**<sub>625</sub> и **K**<sub>590</sub>, в раннем пикосекундном диапазоне времени. Квантовый выход обратной фотореакции из продукта **K**<sub>590</sub> 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.

**БЛАГОДАРНОСТИ**

Выражаю глубокую благодарность Михаилу Аркадьевичу Островскому за чуткое и терпеливое руководство работой и всем сотрудникам лаборатории физико-химических основ рецепции ИБХФ РАН, особенно Татьяне Борисовне Фельдман за помощь в работе, внимание и поддержку и Мозговой М.Н. за плодотворное участие в работе. Выражаю огромную благодарность за соавторство, планирование, осуществление и обсуждение экспериментов сотрудникам лаборатории био- и нанофотоники ФИЦ ХФ РАН – Надточенко В.А., Гостеву Ф.Е. и Шелаеву И.В. Также выражаю благодарность Гребенникову Е.П. и сотрудникам ОАО ЦНИТИ "Техномаш" за любезно предоставленные пурпурные мембраны.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

PCB	–	ретинаяльсодержащие белки
БР	–	бактериородопсин галофильной археи <i>Halobacterium salinarum</i>
P	–	зрительный родопсин быка <i>Bos taurus</i>
фс	–	фемтосекунды ( $10^{-15}$ с)
пс	–	пикосекунды ( $10^{-12}$ с)
KR2	–	родопсин бактерии <i>Krokinobacter eikastus</i> , функционирующий как натриевый насос
TM	–	трансмембранный
а.о.	–	аминокислотный остаток
ШО	–	Шиффово основание
ПШО	–	протонированное Шиффово основание
ASR	–	сенсорный родопсин цианобактерии <i>Anabaena sp.</i>
ТА	–	темноадаптированный
СА	–	светоадаптированный
ф/и	–	фотоиндуцированный
НСП	–	наружные сегменты палочки
ППЭ	–	поверхность потенциальной энергии
Фото <sub>570</sub>	–	фотородопсин (максимум поглощения 570 нм)
P <sub>498</sub>	–	основное S <sub>0</sub> электронное состояние зрительного родопсина <i>B. taurus</i> (максимум поглощения 498 нм)
Бато <sub>535</sub>	–	батородопсин (максимум поглощения 535 нм)
BSI <sub>470</sub>	–	синий интермедиат (blue-shifted intermediate, максимум поглощения 470 нм)
P* <sub>510</sub>	–	электронно-возбужденное S <sub>1</sub> состояние зрительного родопсина <i>B. taurus</i> (максимум поглощения 510 нм)
P <sub>498</sub> '	–	колебательно-возбужденное основное S <sub>0</sub> электронное состояние зрительного родопсина <i>B. taurus</i>
MD	–	метод молекулярной динамики
QM/MM	–	гибридный метод квантовой механики/молекулярной механики
ТК	–	торсионные колебания полиеновой цепи ретиналя
НООР	–	внеплоскостные колебания атомов водорода (hydrogen-out-of-plane)
ФК	–	Франк-Кондоновский

CI	–	коническое квазипересечение поверхностей потенциальной энергии (conical intersection)
$I_{460}$	–	электронно-возбужденное $S_1$ состояние бактериородопсина <i>H. salinarum</i> (максимум поглощения 460 нм)
$J_{625}$	–	первый интермедиат фотоцикла бактериородопсина с изомеризованным ретиналем (максимум поглощения 625 нм)
$K_{590}$	–	второй интермедиат фотоцикла бактериородопсина с изомеризованным ретиналем (максимум поглощения 590 нм)
BP <sub>568</sub>	–	основное $S_0$ электронное состояние бактериородопсина <i>H. salinarum</i> (максимум поглощения 568 нм)
HTG	–	н-нонил- $\beta$ -D-гептилтиоглюкозид
еоп.	–	единицы оптической плотности
$\Delta A_{ESA}$	–	поглощение из электронно-возбужденного $S_1$ состояния (excited state absorption)
$\Delta A_{GSA}$	–	поглощение из основного $S_0$ электронного состояния (ground state absorption)
$\Delta A_{GSB}$	–	выцветание основного $S_0$ электронного состояния, обусловленное обеднением его заселенности при возбуждении (ground state bleaching)
$\Delta A_{SE}$	–	вынужденное испускание из электронно-возбужденного $S_1$ состояния (stimulated emission)
$\Delta A_{ESA1}$	–	$S_n \leftarrow S_1$ поглощение из электронно-возбужденного состояния
$\Delta A_{ESA2}$	–	$S_3 \leftarrow S_1$ поглощение из электронно-возбужденного состояния
Фото <sub>570</sub> *	–	электронно-возбужденное $S_1$ состояние фотородопсина
Бато <sub>535</sub> *	–	электронно-возбужденное $S_1$ состояние батородопсина
$J_{625}$ *	–	электронно-возбужденное $S_1$ состояние интермедиата $J_{625}$
$K_{590}$ *	–	электронно-возбужденное $S_1$ состояние интермедиата $K_{590}$

**СПИСОК ТЕРМИНОВ**

фотолиз: Фотоактивируемые процессы в молекуле зрительного родопсина

трансдуцин: G-белок, активируемый зрительным родопсином

изородопсин: Модифицированный зрительный родопсин, содержащий 9-*цис* ретиналь в качестве хромофора

волновой пакет: Когерентный колебательный волновой пакет

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Terakita, A. The opsins / A. Terakita // *Genome Biol.* – 2005. – V. 6. – N. 3. – P. 213.
2. Spudich, J. L. Retinylidene proteins: Structures and functions from archaea to humans / J. L. Spudich, C.-S. Yang, K.-H. Jung, E. N. Spudich // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2000. – V. 16. – P. 365–392.
3. Ernst, O. P. Microbial and animal rhodopsins: Structures, functions, and molecular mechanisms / O. P. Ernst, D. T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L. S. Brown, H. Kandori // *Chem. Rev.* – 2014. – V. 114. – P. 126–163.
4. Lamb, T. D. Evolution of the vertebrate eye: Opsins, photoreceptors, retina and eye cup / T. D. Lamb, S. P. Collin, E. N. Pugh Jr. // *Nature Rev. Neurosci.* – 2007. – V. 8. – P. 960–975.
5. Островский, М. А. Родопсин: Эволюция и сравнительная физиология / М. А. Островский // *Палеонтол. журнал* – 2017. – № 5. – P. 103–113.
6. Yoshizawa, T. Pre-lumirhodopsin and the bleaching of visual pigments / T. Yoshizawa, G. Wald // *Nature.* – 1963. – V. 197. – P. 1279–1286.
7. Birge, R. R. A spectroscopic, photocalorimetric, and theoretical investigation of the quantum efficiency of the primary event in bacteriorhodopsin / R. R. Birge, T. M. Cooper, A. F. Lawrence, M. B. Masthay, C. Vasilakis, C.-F. Zhang, R. Zidovetzki // *J. Am. Chem. Soc.* – 1989. – V. 111. – P. 4063–4074.
8. Takahashi, T. Evidence that the long-lifetime photointermediate of s-rhodopsin is a receptor for negative phototaxis in *Halobacterium halobium* / T. Takahashi, Y. Mochizuki, N. Kamo, Y. Kobatake // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1985. – V. 127. – P. 99–105.
9. Koyanagi, M. Gq-coupled rhodopsin subfamily composed of invertebrate visual pigment and melanopsin / M. Koyanagi, A. Terakita // *Photochem. Photobiol.* – 2008. – V. 84. – N. 4. – P. 1024–1030.
10. Kawanabe, A. Photoreactions and structural changes of *Anabaena* sensory rhodopsin / A. Kawanabe, H. Kandori // *Sensors.* – 2009. – V. 9. – N. 9. – P. 741–804.
11. Bruun, S. Light–dark adaptation of channelrhodopsin involves photoconversion between the all-*trans* and 13-*cis* retinal isomers / S. Bruun, D. Stoeppler, A. Keidel, U. Kuhlmann, M. Luck, A. Diehl, M.-A. Geiger, D. Woodmansee, D. Trauner, P. Hegemann, H. Oschkinat, P. Hildebrandt, K. Stehfest // *Biochemistry.* – 2015. – V. 54. – N. 35. – P. 5389–5400.
12. Ostrovsky, M. A. Octopus rhodopsin photoreversibility of a crude extract from whole retina over several weeks' duration / M. A. Ostrovsky, H. H. Weetall // *Biosens. Bioelectron.* – 1998. – V. 13. – N. 1. – P. 61–65.
13. Paternolli, C. Photoreversibility and photostability in films of octopus rhodopsin isolated from octopus photoreceptor membranes / C. Paternolli, M. Neebe, E. Stura, F. Barbieri, P. Ghisellini, N. Hampp, C. Nicolini // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2009. – V. 88A. – N. 4. – P. 947–951.
14. 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.
15. Bazhenov, V. Nanosecond photolytic interruption of bacteriorhodopsin photocycle K-590 → BR-570 reaction / V. Bazhenov, P. Schmidt, G. H. Atkinson // *Biophys. J.* – 1992. – V. 61. – P. 1630–1637.

16. Delaney, J. K. Photochemistry of K-590 in the room-temperature bacteriorhodopsin photocycle / J. K. Delaney, P. K. Schmidt, T. L. Brack, G. H. Atkinson // *J. Phys. Chem. B.* – 2000. – V. 104. – P. 10827–10834.
17. Yan, M. Femtosecond dynamics of rhodopsin photochemistry probed by a double pump spectroscopic approach / M. Yan, L. Rothberg, R. Callender // *J. Phys. Chem. B.* – 2001. – V. 105. – P. 856–859.
18. Kandori, H. Ion-pumping microbial rhodopsins / H. Kandori // *Front. Mol. Biosci.* – 2015. – V. 2. – P. 52.
19. Kandori, H. Biophysics of rhodopsins and optogenetics / H. Kandori // *Biophys. Rev.* – 2020. – V. 12. – P. 355–361.
20. Kato, H. E. Structural basis for Na<sup>+</sup> transport mechanism by a light-driven Na<sup>+</sup> pump / H. E. Kato, K. Inoue, R. Abe-Yoshizumi, Y. Kato, H. Ono, M. Konno, S. Hososhima, T. Ishizuka, M. R. Hoque, H. Kunitomo, J. Ito, S. Yoshizawa, K. Yamashita, M. Takemoto, T. Nishizawa, R. Taniguchi, K. Kogure, A. D. Maturana, Y. Iino, H. Yawo, R. Ishitani, H. Kandori, O. Nurek // *Nature.* – 2015. – V. 521. – P. 48–53.
21. Oesterhelt, D. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* / D. Oesterhelt, W. Stoeckenius // *Nat. New Biol.* – 1971. – V. 233. – P. 149–152.
22. Kuhne, W. On the photochemistry of the retina and on visual purple / W. Kuhne // Macmillan and Co. London. – 1878.
23. Wand, A. Asymmetric toggling of a natural photoswitch: Ultrafast spectroscopy of *Anabaena* sensory rhodopsin / A. Wand, R. Rozin, T. Eliash, K.-H. Jung, M. Sheves, S. Ruhman // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – V. 133. – P. 20922–20932.
24. Wand, A. Ultrafast photochemistry of light-adapted and dark-adapted bacteriorhodopsin: Effects of the initial retinal configuration / A. Wand, N. Friedman, M. Sheves, S. Ruhman // *J. Phys. Chem. B.* – 2012. – V. 116. – P. 10444–10452.
25. Wand, A. Probing ultrafast photochemistry of retinal proteins in the near-IR: Bacteriorhodopsin and *Anabaena* sensory rhodopsin vs retinal protonated Schiff base in solution / A. Wand, B. Loevsky, N. Friedman, M. Sheves, S. Ruhman // *J. Phys. Chem. B.* – 2013. – V. 117. – P. 4670–4679.
26. Wand, A. Shedding new light on retinal protein photochemistry / A. Wand, I. Gdor, J. Zhu, M. Sheves, S. Ruhman // *Annu. Rev. Phys. Chem.* – 2013. – V. 64. – P. 437–458.
27. Devine, E. L. Relocating the active-site lysine in rhodopsin and implications for evolution of retinylidene proteins / E. L. Devine, D. D. Oprrian, D. L. Theobald // *PNAS USA.* – 2013. – V. 110. – N. 33. – P. 13351–13355.
28. Mackin, K. A. An empirical test of convergent evolution in rhodopsins / K. A. Mackin, R. A. Roy, D. L. Theobald // *Mol. Biol. Evol.* – 2014. – V. 31. – P. 85–95.
29. Shen, L. The evolutionary relationship between microbial rhodopsins and metazoan rhodopsins / L. Shen, C. Chen, H. Zheng, L. Jin // *Sci. World J.* – 2013. – V. 2013. – P. 435651.
30. Luk, H. L. Molecular bases for the selection of the chromophore of animal rhodopsins / H. L. Luk, F. Melaccio, S. Rinaldi, S. Gozem, M. Olivucci // *PNAS USA.* – 2015. – V. 112. – P. 15297–15302.

31. Sudo, Y. A microbial rhodopsin with a unique retinal composition shows both sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin-like properties / Y. Sudo, K. Ihara, S. Kobayashi, D. Suzuki, H. Irieda, T. Kikukawa, H. Kandori, M. Homma // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – N. 8. – P. 5967–5976.
32. Yamauchi, Y. Engineered functional recovery of microbial rhodopsin without retinal-binding lysine / Y. Yamauchi, M. Konno, D. Yamada, K. Yura, K. Inoue, O. Beja, H. Kandori // *Photochem. Photobiol.* – 2019. – V. 95. – P. 1116–1121.
33. Hegemann, P. Algal sensory photoreceptors / P. Hegemann, M. Fuhrmann, S. J. Kateriya // *J. Phycol.* – 2001. – V. 37. – P. 668–676.
34. Miesenbock, G. Optogenetic control of cells and circuits / G. Miesenbock // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* – 2011. – V. 27. – P. 731–758.
35. Terakita, A. Optogenetic potentials of diverse animal opsins / A. Terakita, T. Nagata, T. Sugihara, M. Koyanagi // In: Yawo H., Kandori H., Koizumi A. (eds) *Optogenetics.* – Springer. – Tokyo. – 2015. – P. 77–88.
36. Каламкаров, Г. Р. Молекулярные механизмы зрительной рецепции / Г. Р. Каламкаров, М. А. Островский. – М.: Наука, 2002. – 279 с.
37. Овчинников, Ю. А. Полная аминокислотная последовательность зрительного родопсина / Ю. А. Овчинников, Н. Г. Абдулаев, Н. Ю. Фейгина, И. Д. Артамонов, А. С. Золотарев // *Биоорган. Хим.* – 1982. – Т. 8. – № 10. – С. 1424–1427.
38. Palczewski, K. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor / K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano // *Science.* – 2000. – V. 289. – P. 739–745.
39. Okada, T. The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure / T. Okada, M. Sugihara, A. N. Bondar, M. Elstner, P. Entel, V. Buss // *J. Mol. Biol.* – 2004. – V. 342. – P. 571–583.
40. Wald, G. The molecular basis of visual excitation / G. Wald // *Nature.* – 1968. – V. 219. – P. 800–807.
41. Lin, S. W. Analysis of function microdomains of rhodopsin / S. W. Lin, M. Han, T. P. Sakmar // *Meth. Enzymol.* – 2000. – V. 315. – P. 116–130.
42. Menon, S. T. Rhodopsin: Structural basis of molecular physiology / S. T. Menon, M. Han, T. P. Sakmar // *Physiol. Rev.* – 2001. – V. 81. – N. 4. – P. 1659–1688.
43. Hofmann, K. P. A G protein-coupled receptor at work: The rhodopsin model / K. P. Hofmann, P. Scheerer, P. W. Hildebrand, H.-W. Choe, J. H. Park, M. Heck, O. P. Ernst // *Trends Biochem. Sci.* – 2009. – V. 34. – N. 11. – P. 540–552.
44. Okada, T. Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography / T. Okada, Y. Fujiyoshi, M. Silow, J. Navarro, E. M. Landau, Y. Shichida // *PNAS USA.* – 2002. – V. 99. – N. 9. – P. 5982–5987.
45. Shichida, Y. Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals / Y. Shichida, H. Imai // *CMLS.* – 1998. – V. 54. – N. 12. – P. 1299–1315.
46. Matsumoto, H. Existence of a  $\beta$ -ionone ring-binding site in the rhodopsin molecule / H. Matsumoto, T. Yoshizawa // *Nature.* – 1975. – V. 258. – P. 523–526.
47. Salgado, G. F. J. Deuterium NMR structure of retinal in the ground state of rhodopsin / G. F. J. Salgado, A. V. Struts // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43. – P. 12819–12828.

48. Kholmurodov, K. T. Molecular dynamics of rhodopsin and free opsin: Computer simulation / K. T. Kholmurodov, T. B. Feldman, M. A. Ostrovskii // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2007. – V. 37. – P. 161-174.
49. Spooner, P. J. R. The ring of the rhodopsin chromophore in a hydrophobic activation switch within the binding pocket / P. J. R. Spooner, J. M. Sharples, S. C. Goodall, P. H. M. Bovee-Geurts, M. A. Verhoeven, J. Lugtenburg, A. M. A. Pistorius, W. J. DeGrip, A. Watts // *J. Mol. Biol.* – 2004. – V. 343. – P. 719–730.
50. Saam, J. Molecular dynamics investigation of primary photoinduced events in the activation of rhodopsin / J. Saam, E. Tajkhorshid, S. Hayashi, K. Schulten // *Biophys. J.* – 2002. – V. 83. – P. 3097–3112.
51. Creemers, A. F. (1)H and (13)C MAS NMR evidence for pronounced ligand-protein interactions involving the ionone ring of the retinylidene chromophore in rhodopsin / A. F. Creemers, S. Kiihne, P. H. Bovee-Geurts, W. J. DeGrip, J. Lugtenburg, H. J. de Groot // *PNAS USA.* – 2002. – V. 99. – P. 9101–9106.
52. Baylor, D. A. The photocurrent, noise and spectral sensitivity of rods of the monkey *Macaca fascicularis* / D. A. Baylor, B. J. Nunn, J. L. Schnapf // *J. Physiol.* – 1984. – V. 357. – P. 575–607.
53. Schoenlein, R. W. The first step in vision: Femtosecond isomerization of rhodopsin / R. W. Schoenlein, L. A. Peteanu, R. A. Mathies, C. V. Shank // *Science.* – 1991. – V. 254. – P. 412–415.
54. Kobayashi, T. Femtosecond spectroscopy of halorhodopsin and rhodopsin in a broad spectral range of 400–1000 nm / T. Kobayashi, M. Kim, M. Taiji, T. Iwasa, M. Nakagawa, M. Tsuda // *J. Phys. Chem. B.* – 1998. – V. 102. – P. 272–280.
55. Polli, D. Conical intersection dynamics of the primary photoisomerization event in vision / D. Polli, P. Altoè, O. Weingart, K. M. Spillane, C. Manzoni, D. Brida, G. Tomasello, G. Orlandi, P. Kukura, R. A. Mathies, M. Garavelli, G. Cerullo // *Nature.* – 2010. – V. 467. – P. 440–443.
56. 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.
57. Shichi, H. Biochemistry of visual pigments: I. Purification and properties of bovine rhodopsin / H. Shichi, M. S. Lewis, F. Irreverre, A. L. Store // *J. Biol. Chem.* – 1969. – V. 244. – P. 529–536.
58. Smith H.G. The isolation and purification of osmotically intact discs from retinal rod outer segments / H. G. Smith, G. W. Stubb, B. J. Litman // *Exp. Eye Res.* – 1975. – V. 20. – P. 211–217.
59. Okada, T. Highly selective separation of rhodopsin from bovine rod outer segment membranes using combination of divalent cation and alkyl(thio)glucoside / T. Okada, K. Takeda, T. Kouyama // *Photochem. Photobiol.* – 1998. – V. 67. – N. 5. – P. 495–499.
60. Becker, R. S. A comprehensive investigation of the mechanism and photophysics of isomerization of a protonated and unprotonated Schiff base of 11-*cis*-retinal / R. S. Becker, K. J. Freedman // *J. Am. Chem. Soc.* – 1985. – V. 107. – P. 1477–1485.
61. Fasick, J. I. Adaptations of cetacean retinal pigments to aquatic environments / J. I. Fasick, P. R. Robinson // *Front. Ecol. Evol.* – 2016. – V. 4. – P. 70.
62. Nielsen, I. B. S1 and S2 excited states of gas-phase Schiff-base retinal chromophores / I. B. Nielsen, L. Lammich, L. H. Andersen // *Phys. Rev. Lett.* – 2006. – V. 96. – P. 018304.

63. Coughlan, N. J. A. Photoisomerization action spectrum of retinal protonated Schiff base in the gas phase / N. J. A. Coughlan, K. J. Catani, B. D. Adamson, U. Wille, E. J. Bieske // *Chem. Phys.* – 2014. – V. 140. – P. 164307.
64. Bravaya, K. An opsin shift in rhodopsin: Retinal S<sub>0</sub>–S<sub>1</sub> excitation in protein, in solution, and in the gas phase / K. Bravaya, A. Bochenkova, A. Granovsky, A. Nemukhin // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – V. 129. – N. 43. – P. 13035–13042.
65. Palczewski, K. G protein–coupled receptor rhodopsin / K. Palczewski // *Annu. Rev. Biochem.* – 2006. – V. 75. – P. 743–767.
66. Wang, W. The photochemical determinants of color vision / W. Wang, J. H. Geiger, B. Borhan // *BioEssays.* – 2013. – V. 36. – N. 1. – P. 65–74.
67. Kaila, V. R. I. The Effect of protein environment on photoexcitation properties of retinal / V. R. I. Kaila, R. Send, D. Sundholm // *J. Phys. Chem. B.* – 2012. – V. 116. – N. 7. – P. 2249–2258.
68. Yoshizawa, T. Low-temperature spectroscopy of intermediates of rhodopsin / T. Yoshizawa, Y. Shichida // *Meth. Enzimol.* – 1982. – V. 8. – P. 333–354.
69. Shichida, Y. Formation of photorhodopsin, a precursor of bathorhodopsin, detected by picosecond laser photolysis at room temperature / Y. Shichida, S. Matuoka, T. Yoshizawa // *Photobiochem. Photobiophys.* – 1984. – V. 7. – P. 221–228.
70. Kandori, H. Mechanism of isomerization of rhodopsin studied by use 11-*cis*-locked rhodopsin analogues excited with a picosecond laser pulse / H. Kandori, S. Matuoka, Y. Shichida, T. Yoshizawa, M. Ito, K. Tsukida, V. Balogh-Nair, K. Nakanishi // *Biochemistry.* – 1989. – V. 28. – P. 6460–6467.
71. Kawamura, S. Orientational changes of the transition dipole moment of retinal chromophore on the disk membrane due to the conversion of rhodopsin to bathorhodopsin and to isorhodopsin / S. Kawamura, F. Tokunaga, T. Yoshizawa, A. Sarai, T. Kakitani // *Vision Res.* – 1979. – V. 19. – N. 8. – P. 879–884.
72. Callender, R. An introduction to visual pigments and purple membranes and their primary processes / R. Callender // *In Biological Events Probed by Ultrafast Laser Spectroscopy.* Academic Press, New York. – 1982. – P. 239–257.
73. 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, H. Yasuda, Y. Mukai // *Photochem. Photobiol.* – 1991. – V. 54. – N. 3. – P. 433–443.
74. Johnson, P. J. M. Local vibrational coherences drive the primary photochemistry of vision / P. J. M. Johnson, A. Halpin, T. Morizumi, V. I. Prokhorenko, O. P. Ernst, R. J. D. Miller // *Nat. Chem.* – 2015. – V. 7. – P. 980–986.
75. Mathies, R. A. A coherent picture of vision / R. A. Mathies // *Nat. Chem.* – 2015. – V. 7. – P. 945–947.
76. Johnson, P. J. M. The primary photochemistry of vision occurs at the molecular speed limit / P. J. M. Johnson, M. H. Farag, A. Halpin, T. Morizumi, V. I. Prokhorenko, J. Knoester, T. L. C. Jansen, O. P. Ernst, R. J. D. Miller // *Phys. Chem. B.* – 2017. – V. 121. – N. 16. – P. 4040–4047.



77. Kiefer, H. V. Intrinsic photoisomerization dynamics of protonated Schiff-base retinal / H. V. Kiefer, E. Gruber, J. Langeland, P. A. Kusocek, A. V. Bochenkova, L. H. Andersen // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10. – P. 1210.
78. Kandori, H. Femtosecond fluorescence study of the rhodopsin chromophore in solution / H. Kandori, Y. Katsuta, I. Msayoshi, H. Sasabe // *J. Am. Chem. Soc.* – 1995. – V. 117. – P. 2669–2670.
79. Bassolino, G. Barrierless photoisomerization of 11-*cis* retinal protonated Schiff base in solution / G. Bassolino, T. Sovdat, A. S. Duarte, J. M. Lim, C. Schnedermann, M. Liebel, B. Odell, T. D. W. Claridge, S. P. Fletcher, P. Kukura // *J. Am. Chem. Soc.* – 2015. – V. 137. – P. 12434–12437.
80. 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.
81. Li, J. Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form / J. Li, P. C. Edwards, M. Burghammer, C. Villa, G. F. X. Schertler // *J. Mol. Biol.* – 2004. – V. 343. – N. 5. – P. 1409.
82. Yoshizawa, T. Chemistry of the rhodopsin cycle / T. Yoshizawa, Y. Kito // *Nature.* – 1958. – V. 182. – P. 1604–1605.
83. Yan, M. Ultrafast spectroscopy of the visual pigment rhodopsin / M. Yan, D. Manor, G. Weng, H. Chao, L. Rothberg, T. M. Jedju, R. R. Alfano, C. H. Callender // *PNAS USA.* – 1991. – V. 88. – P. 9809–9812.
84. Cooper, A. Energy uptake in the first step of visual excitation // *Nature.* – 1979. – V. 282. – P. 531–533.
85. Hug, S. J. Nanosecond photolysis of rhodopsin: Evidence for a new blue-shifted intermediate / S. J. Hug, J. W. Lewis, C. M. Einterz, T. E. Thorgeirsson, D. S. Kliger // *Biochemistry.* – 1990. – V. 29. – N. 6. – P. 1475–1485.
86. Rieke, F. Single-photon detection by rod cells of the retina / F. Rieke, D. A. Baylor // *Rev. Mod. Phys.* – 1998. – V. 70. – N. 3. – P. 1027–1036.
87. Peteanu, L. A. The first step in vision occurs in femtoseconds: Complete blue and red spectral studies / L. A. Peteanu, R. W. Shoenlein, Q. Wang, R. A. Mathies, C. V. Shank // *PNAS USA.* – 1993. – V. 90. – P. 11762–11766.
88. Doig, S. J. Picosecond time-resolved resonance Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin's J, K, and KL intermediates / S. J. Doig, P. J. Reid, R. A. Mathies // *J. Phys. Chem.* – 1991. – V. 95. – P. 6372–6379.
89. Kim, J. E. Anti-Stokes Raman study of vibrational cooling dynamics in the primary photochemistry of rhodopsin / J. E. Kim, R. A. Mathies // *J. Phys. Chem. A.* – 2002. – V. 106. – P. 8508–8515.
90. Kochendoerfer, G. G. Spontaneous emission study of the femtosecond isomerization dynamics of rhodopsin / G. G. Kochendoerfer, R. A. Mathies // *J. Phys. Chem.* – 1996. – V. 100. – P. 14526–14532.
91. Wang, Q. Vibrationally coherent photochemistry in the femtosecond primary event of vision / Q. Wang, R. W. Shoenlein, L. A. Peteanu, R. A. Mathies, C. V. Shank // *Science.* – 1994. – V. 266. – N. 5184. – P. 422–424.

92. Смитиенко, О. А. Когерентные процессы при образовании первичных продуктов фотолиза зрительного пигмента родопсина / О. А. Смитиенко, И. В. Шелаев, Ф. Е. Гостев, Т. Б. Фельдман, В. А. Надточенко, О. М. Саркисов, М. А. Островский // ДАН. – 2008. – Т. 421. – № 2. – С. 277–281.
93. Kandori, H. Excited-state dynamics of rhodopsin probed by femtosecond fluorescence spectroscopy / H. Kandori, Y. Futurani, S. Nishimura, Y. Shichida, H. Chosrowjan, Y. Shibata, N. Mataga // Chem. Phys. Letters. – 2001. – V. 334. – P. 271–276.
94. Hasson, K. C. The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin: Experimental evidence for a three-state model / K. C. Hasson, F. Gai, P. A. Anfinrud // PNAS USA. – 1996. – V. 93 – P. 15124–15129.
95. Ye, T. On the nature of the primary light-induced events in bacteriorhodopsin: Ultrafast spectroscopy of native and C13=C14 locked pigments / T. Ye, N. Friedman, Y. Gat, G. H. Atkinson, M. Sheves, M. Ottolenghi, S. Ruhman // J. Phys. Chem. B. – 1999. – V. 103. – P. 5122–5130.
96. Schmidt, B. Excited-state dynamics of bacteriorhodopsin probed by broadband femtosecond fluorescence spectroscopy / B. Schmidt, C. Sobotta, B. Heinz, S. Laimgruber, M. Braun, P. Gilch // BBA. – 2005. – V. 1706. – P. 165–173.
97. Slouf, V. Carotenoid response to retinal excitation and photoisomerization dynamics in xanthorhodopsin / V. Slouf, S. P. Balashov, J. K. Lanyi, T. Pullerits, T. Polivka // Chem. Phys. Lett. – 2011. – V. 516. – P. 96–101.
98. 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, R. Abe-Yoshizumi, T. Tsukuda, H. Kandori, T. Tahara // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2019. – V. 21. – P. 25728–25734.
99. Kochendoerfer, G. G. Ultrafast spectroscopy of rhodopsins – photochemistry at its best! / G. G. Kochendoerfer, R. A. Mathies // Isr. J. Chem. – 1995. – V. 35. – P. 211–226.
100. Diller, R. Primary reactions in retinal proteins / R. Diller // In: Braun M., Gilch P., Zinth W. (eds) Ultrashort laser pulses in biology and medicine. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. Springer, Berlin. Heidelberg, Germany. – 2008. – Chapter 10. – P. 243–277.
101. 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, K. Inoue, H. Ohtani, H. Kandori, T. Tahara // J. Phys. Chem. B. – 2018. – V. 122. – P. 4784–4792.
102. Warshel, A. Bicycle-pedal model for the first step in the vision process / A. Warshel // Nature. – 1976. – V. 260. – N. 5553. – P. 679–683.
103. Warshel, A. The dynamics of the primary event in rhodopsin revisited / A. Warshel, Z. T. Chu, J.-K. Hwang // Chem. Phys. – 1991. – V. 158. – P. 304–314.
104. Birge, R. R. Molecular dynamics of *trans-cis* isomerization in bathorhodopsin / R. R. Birge, L. M. Hubbard // Biophys. J. – 1981. – V. 34. – P. 517–534.
105. Tallent, J. R. Molecular dynamics of the primary photochemical event in rhodopsin / J. R. Tallent, E. W. Hyde, L. A. Finsen, G. C. Fox, R. R. Birge // J. Am. Chem. Soc. – 1992. – V. 114. – P. 1581–1592.

106. Rohrig, U. F. Early steps of the intramolecular signal transduction in rhodopsin explored by molecular dynamics simulation / U. F. Rohrig, L. Guidoni, U. Rothlisberger // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41. – P. 10799–10809.
107. Salem, L. The sudden polarization effect and its possible role in vision // *Acc. Chem. Res.* – 1979. – V. 119 – P. 12687–12688.
108. Garavelli, M. Photoisomerization path for a realistic retinal chromophore model: The nonatetraeniminium cation / M. Garavelli, T. Vreven, P. Celani, F. Bernardi, M. A. Robb, M. Olivucci // *J. Am. Chem. Soc.* – 1998. – V. 120. – P. 1285–1288.
109. Gonzalez-Luque, R. Computational evidence in favor of a two-state, two-mode model of the retinal chromophore photoisomerization / R. Gonzalez-Luque, M. Garavelli, F. Bernardi, M. Merchan, M. A. Robb, M. Olivucci // *PNAS USA*. – 2000. – V. 97. – P. 9379–9384.
110. Ben-Num, M. The role of intersection topography in bond selectivity of *cis-trans* photoisomerization / M. Ben-Num, F. Molnar, K. Schulten, T. J. Martinez // *PNAS USA*. – 2002. – V. 99. – P. 1769–1773.
111. Weingart, O. Photochemistry of visual pigment chromophore models by *ab initio* molecular dynamics / O. Weingart, I. Schapiro, V. Buss // *J. Phys. Chem. B*. – 2007. – V. 111. – P. 3782–3788.
112. Fujimoto, K. Theoretical studies on color tuning mechanism in retinal proteins / K. Fujimoto, S. Hayashi, J. Hasegawa, H. Nakatsuji // *J. Chem. Theory Comput.* – 2007. – V. 3. – P. 605–618.
113. Andruniow, T. Structure, initial excited-state relaxation, and energy storage of rhodopsin resolved at the multiconfigurational perturbation theory level / T. Andruniow, N. Ferre, M. Olivucci // *PNAS USA*. – 2004. – V. 101. – P. 17908–17913.
114. Frutos, L. M. Tracking the excited-state time evolution of the visual pigment with multiconfigurational quantum chemistry / L. M. Frutos, T. Andruniow, F. Santoro, N. Ferre, M. Olivucci // *PNAS USA*. – 2007. – V. 104. – P. 7764–7769.
115. Wanko, M. Calculating absorption shift for retinal proteins: Computational challenges / M. Wanko, M. Hoffman, P. Strodel, A. Koslowski // *J. Phys. Chem. B*. – 2005. – V. 109. – P. 3606–3615.
116. Hayashi, S. Photochemical reaction dynamics of the primary event of vision studied by means of a hybrid molecular simulation / S. Hayashi, E. Tajkhorshid, K. Schulten // *Biophys. J.* – 2009. – V. 96. – P. 403–416.
117. Саркисов, О. М. Фемтохимия / О. М. Саркисов, С. Я. Уманский // *Успехи химии*. – 2001. – Т. 70 – № 6. – С. 515–538.
118. Zewail, A. H. Femtochemistry. Atomic-scale dynamics of the chemical bond using ultrafast laser / A. H. Zewail // *Nobel Lecture*. – Dec. 8. 1999.
119. Барановский, В. И. Квантовая механика и квантовая химия / В. И. Барановский. – М.: Академия, 2008. – 302 с.
120. Ландау, Л. Д. К теории передачи энергии при столкновениях / Л. Д. Ландау // *II Phys. Ztschr. Sow.* – 1932. – Bd. 2. – S. 46.
121. Zener, C. Non-adiabatic crossing of energy levels / C. Zener // *Proc. Roy. Soc. A*. – 1932. – V. 137. – N. 833. – P. 696–702.

122. Wang, Q. Femtosecond spectroscopy of a 13-demethylrhodopsin visual pigment analogue: The role of nonbonded interactions in the isomerization process / Q. Wang, G. G. Kochendoerfer, R. W. Schoenlein, P. J. E. Verdegem, J. Lugtenburg, R. A. Mathies, C. V. Shank // *J. Phys. Chem.* – 1996. – V. 100. – P. 17388–17394.
123. Schoenlein, R. W. Femtosecond dynamics of *cis-trans* isomerization in a visual pigment analog: isorhodopsin / R. W. Schoenlein, L. A. Peteanu, Q. Wang, R. A. Mathies, C. V. Shank // *J. Phys. Chem.* – 1993. – V. 97. – P. 12087–12092.
124. Kim, J. E. Analysis of the mode-specific excited-state energy distribution and wavelength-dependent photoreaction quantum yield in rhodopsin / J. E. Kim, M. J. Tauber, R. A. Mathies // *Biophys. J.* – 2003. – V. 84. – P. 2492–2501.
125. Kukura, P. Structural observation of the primary isomerization in vision with femtosecond-stimulated Raman / P. Kukura, D. W. McCamant, S. Yoon, D. B. Wandschneider, R. A. Mathies // *Science.* – 2005. – V. 310. – P. 1006–1009.
126. Schnedermann, C. Mode-specificity of vibrationally coherent internal conversion in rhodopsin during the primary visual event / C. Schnedermann, M. Liebel, P. Kukura. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2015. – V. 137. – P. 2886–2891.
127. Schnedermann, C. Evidence for a vibrational phase dependent isotope effect on the photochemistry of vision / C. Schnedermann, X. Yang, M. Liebel, K. Spillane, J. Lugtenburg, I. Fernandez, A. Valentini, I. Schapiro, M. Olivucci, P. Kukura, R. A. Mathies // *Nat. Chem.* – 2018. – V. 10. – P. 449.
128. Weingart, O. The role of HOOP-modes in the ultrafast photoisomerization of retinal models / O. Weingart // *Chem. Phys.* – 2008. – V. 349. – N. 1. – P. 348–355.
129. Weingart, O. Modelling vibrational coherence in the primary rhodopsin photoproduct / O. Weingart, M. Garavelli // *J. Chem. Phys.* – 2012. – V. 137. – N. 22A. – P. 523.
130. El-Tahawy, M. M. T. Relationship between excited state lifetime and isomerization quantum yield in animal rhodopsins: Beyond the one-dimensional Landau–Zener model / M. M. T. El-Tahawy, A. Nenov, O. Weingart, M. Olivucci, M. Garavelli // *Phys. Chem. Lett.* – 2018. – V. 9. – N. 12. – P. 3315–3322.
131. 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, P. Verdegem, J. Lugtenburg, R. A. Mathies // *J. Phys. Chem. B.* – 1998. – V. 102. – P. 2787–2806.
132. Hahn, S. Quantum-mechanical modeling of the femtosecond isomerization in rhodopsin / S. Hahn, G. Stock // *J. Phys. Chem. B.* – 2000. – V. 104. – P. 1146–1149.
133. Garavelli, M. The C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup> protonated Schiff base: An *ab initio* minimal model for retinal photoisomerization / M. Garavelli, P. Celani, F. Bernardi, M. A. Robb, M. Olivucci // *J. Am. Chem. Soc.* – 1997. – V. 119. – P. 6891–6901.
134. Klessinger, M. Conical intersections and the mechanism of singlet photoreactions / M. Klessinger // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 1995. – V. 34. – N. 5. – P. 549–551.
135. Yarkony, D. R. Conical intersections: The new conventional wisdom / D. R. Yarkony // *J. Phys. Chem. A.* – 2001. – V. 105. – P. 6277–6293.

136. Graham, A. Cederbaum beyond Born-Oppenheimer: Molecular dynamics through a conical intersection / A. Graham, L. Worth // *Annu. Rev. Phys. Chem.* – 2004. – V. 55. – P. 127–158.
137. Farrow, D. A. Polarized pump-probe measurements of electronic motion via a conical intersection / D. A. Farrow, W. Qian, E. R. Smith, A. A. Ferro, D. M. Jonas // *J. Chem. Phys.* – 2008. – V. 128. – P. 144510.
138. Rivalta, I. Modelling time-resolved two-dimensional electronic spectroscopy of the primary photoisomerization event in rhodopsin / I. Rivalta, A. Nenov, O. Weingart, G. Cerullo, M. Garavelli, S. Mukamel // *J. Phys. Chem. B.* – 2014. – V. 118. – N. 28. – P. 8396–8405.
139. Gozem, S. Theory and simulation of the ultrafast double-bond isomerization of biological chromophores / S. Gozem, H. L. Luk, I. Schapiro, M. Olivucci // *Chem. Rev.* – 2017. – V. 117. – N. 22. – P. 13502–13565.
140. 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, N. Ferré, R. Lindh, M. Olivucci // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – V. 133. – P. 3354–3364.
141. Yabushita, A. Time-resolved spectroscopy of ultrafast photoisomerization of octopus rhodopsin under photoexcitation / A. Yabushita, T. Kobayashi, M. Tsuda // *J. Phys. Chem. B.* – 2012. – V. 116. – P. 1920–1926.
142. Martin, K. Conical intersections and the mechanism of singlet photoreactions / K. Martin // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 1995. – V. 34. – N. 5. – P. 549–551.
143. Yan, E. C. Y. Resonance Raman analysis of the mechanism of energy storage and chromophore distortion in the primary visual photoproduct / E. C. Y. Yan, Z. Ganim, M. A. Kazmi, B. S. W. Chang, T. P. Sakmar, R. A. Mathies // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43. – N. 34. – P. 10867–10876.
144. Khrenova, M. G. Modeling reaction routes from rhodopsin to bathorhodopsin / M. G. Khrenova, A. V. Bochenkova, A. V. Nemukhin // *Proteins.* – 2010. – V. 78. – P. 614–622.
145. Henderson, R. Crystallization of purple membrane in three dimensions / R. Henderson, D. Shotton // *J. Mol. Biol.* – 1980. – V. 139. – P. 99–109.
146. Bogomolni, R. A. Light-driven proton translocations in *Halobacterium halobium* / R. A. Bogomolni, R. A. Baker, R. H. Lozier // *BBA.* – 1976. – V. 440. – P. 68–88.
147. Hartmann, R. Quantitative aspects of energy conversion in halobacteria / R. Hartmann, H. D. Sickinger, D. Oesterhelt // *FEBS Lett.* – 1977. – V. 82. – P. 1–6.
148. Henderson, R. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy / R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, F. E. Beckmann, K. H. Downing // *J. Mol. Biol.* – 1990. – V. 213. – P. 899–929.
149. Luecke, H. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution / H. Luecke, B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler, J. K. Lanyi // *J. Mol. Biol.* – 1999. – V. 1. – P. 899–911.
150. Oesterhelt, D. Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-*cis* and all-*trans* retinal as its chromophores / D. Oesterhelt, M. Meentzen, L. Schuhmann // *Eur. J. Biochem.* – 1973. – V. 40. – P. 453–463.
151. Dencher, N. A. Photochemical cycle and light-dark adaptation of monomeric and aggregated bacteriorhodopsin in various lipid environments / N. A. Dencher, K. D. Kohl, M. P. Heyn // *Biochemistry.* – 1983. – V. 22. – P. 1323–1334.

152. Scherrer, P. Retinal isomer ratio in dark-adapted purple membrane and bacteriorhodopsin monomers / P. Scherrer, M. K. Mathew, W. Sperling, W. Stoeckenius // *Biochemistry*. – 1989. – V. 28. – P. 829–834.
153. Gonzalez-Manas, J. M. The interaction of Triton X100 with purple membrane: Effect of light-dark adaptation / J. M. Gonzalez-Manas, G. Montoya, C. Rodriguez Fernandez, J. I. G. Gurtubay, F. M. Goni // *BBA*. – 1990. – V. 1019. – P. 167–169.
154. Balashov, S. P. Effect of the arginine-82 to alanine mutation in bacteriorhodopsin on dark adaptation, proton release, and the photochemical cycle / S. P. Balashov, R. Govindjee, M. Kono, E. Imasheva, E. Lukashev, T. G. Ebrey, R. K. Crouch, D. R. Menick, Y. Feng // *Biochemistry*. – 1993. – V. 32. – N. 39. – P. 10331–10343.
155. Balashov, S. P. The two pK's of aspartate-85 and control of thermal isomerization and proton release in the arginine-82 to lysine mutant of bacteriorhodopsin / S. P. Balashov, R. Govindjee, E. S. Imasheva, S. Misra, T. G. Ebrey, Y. Feng, R. K. Crouch, D. R. Menick // *Biochemistry*. – 1995. – V. 34. – P. 8820–8834.
156. Song, L. Retinal isomer composition in some bacteriorhodopsin mutants under light and dark adaptation conditions / L. Song, D. Yang, M. A. El-Sayed, J. K. Lanyi // *J. Phys. Chem.* – 1995. – V. 99. – P. 10052–10055.
157. Lozier, R. H. Bacteriorhodopsin: A light-driven proton pump in *Halobacterium halobium* / R. H. Lozier, R. A. Bogomolni, W. Stoeckenius // *Biophys. J.* – 1975. – V. 15. – P. 955–962.
158. Birge, R. R. Nature of the primary photochemical event in rhodopsin and bacteriorhodopsin / R. R. Birge // *BBA*. – 1990. – V. 1016. – P. 293–323.
159. Lanyi, J. K. Proton transfer and energy coupling in the bacteriorhodopsin photocycle / J. K. Lanyi // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1992. – V. 24. – N. 2. – P. 169–179.
160. Balashov, S. P. Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin / S. P. Balashov // *BBA – Bioenergetics*. – 2000. – V. 1460. – N. 1. – P. 75–94.
161. Hendler, R. W. Theory and procedures for finding a correct kinetic model for the bacteriorhodopsin photocycle / R. W. Hendler, R. I. Shrager, S. Bose // *J. Phys. Chem. B*. – 2001. – V. 105. – P. 3319–3328.
162. Hendler, R. W. An apparent general solution for the kinetic models of the bacteriorhodopsin photocycles / R. W. Hendler // *J. Phys. Chem. B*. – 2005. – V. 109. – P. 16515–16528.
163. Varo, G. Thermodynamics and energy coupling in the bacteriorhodopsin photocycle / G. Varo, J. K. Lanyi // *Biochem.* – 1991. – V. 30. – P. 5016–5022.
164. Edman, K. High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle / K. Edman, P. Nollert, A. Royant, H. Belrhali, E. Pebay-Peyroula, J. Hajdu, R. Neutze, E. M. Landau // *Nature*. – 1999. – V. 401. – P. 822–826.
165. Li, Y.-T. A review on bacteriorhodopsin-based bioelectronic devices / Y.-T. Li, Y. Tian, H. Tian, T. Tu, G.-Y. Gou, Q. Wang, Y.-C. Qiao, Y. Yang, T.-L. Ren // *Sensors*. – 2018. – V. 18. – N. 5. – P. 1368.
166. Sharkov, A. V. Primary events in bacteriorhodopsin probed by subpicosecond spectroscopy / A. V. Sharkov, A. V. Pakulev, S. V. Chekalin, Y. A. Matveetz // *BBA*. – 1985. – V. 88. – P. 94–102.

167. Dobler, J. Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy / J. Dobler, W. Zinth, W. Kaiser, D. Oesterhelt // Chem. Phys. Lett. – 1988. – V. 144. – P. 215–220.
168. Mathies, R. A. Direct observation of the femtosecond excited-state *cis-trans* isomerization in bacteriorhodopsin / R. A. Mathies, C. H. Brito Cruz, W. T. Pollard, C. H. V. Shank // Science. – 1988. – V. 240. – P. 777–779.
169. Gai, F. Chemical dynamics in proteins: The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin / F. Gai, K. C. Hasson, J. C. McDonald, P. A. Anfinrud // Science. – 1998. – V. 279. – P. 1886–1891.
170. Kobayashi, T. Real-time spectroscopy of transition states in bacteriorhodopsin during retinal isomerization / T. Kobayashi, T. Saito, H. Ohtani // Nature. – 2001. – V. 414. – P. 531–534.
171. McCamant, D. W. Femtosecond stimulated Raman study of excited-state evolution in bacteriorhodopsin / D. W. McCamant, P. Kukura, R. A. J. Mathies // Phys. Chem. B. – 2005. – V. 109. – P. 10449–10457.
172. Yabushita, A. Primary conformation change in bacteriorhodopsin on photoexcitation / A. Yabushita, T. Kobayashi // Biophys. J. – 2009. – V. 96. – P. 1447–1461.
173. Briand, J. Ultrafast photo-induced reaction dynamics in bacteriorhodopsin and its Trp mutants / J. Briand, J. Leonard, S. J. Haacke // Opt. – 2010. – V. 12. – P. 084004.
174. Johnson, P. J. M. The photocycle and ultrafast vibrational dynamics of bacteriorhodopsin in lipid nanodiscs / P. J. M. Johnson, B. Hou, N. Friedman, M. Ottolenghi, M. Sheves, S. Ruhman // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2014. – V. 16. – P. 21310–21320.
175. Iyer, E. S. S. Temperature independence of ultrafast photoisomerization in thermophilic rhodopsin: Assessment versus other microbial proton pumps / E. S. S. Iyer, R. Misra, A. Maity, O. Liubashevski, Y. Sudo, M. Sheves, S. J. Ruhman // J. Am. Chem. Soc. – 2016. – V. 138. – P. 12401–12407.
176. Herbst, J. Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization / J. Herbst, K. Heyne, R. Diller // Science. – 2002. – V. 297. – P. 822–825.
177. Terentis, A. C. Primary events in the bacteriorhodopsin photocycle: Torsional vibrational dephasing in the first excited electronic state / A. C. Terentis, L. Ujj, H. Abramczyk, G. H. Atkinson // Chem. Phys. – 2005. – V. 313. – P. 51–62.
178. Liebel, M. Direct observation of the coherent nuclear response after the absorption of a photon / M. Liebel, C. Schnedermann, G. Bassolino, G. Taylor, A. Watts, P. Kukura // Phys. Rev. Lett. – 2014. – V. 112. – P. 238–301.
179. Birge, R. R. Energy storage in the primary step of the photocycle of bacteriorhodopsin / R. R. Birge, T. M. Cooper // Biophys. J. – 1983. – V. 42. – P. 61–69.
180. Hayashi, S. Role of hydrogen-bond network in energy storage of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump revealed by *ab initio* normal-mode analysis / S. Hayashi, E. Tajkhorshid, H. Kandori, K. Schulten // J. Am. Chem. Soc. – 2004. – V. 126. – P. 10516–10517.
181. 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, M. Garavelli // PNAS USA. – 2010. – V. 107. – N. 47. – P. 20172–20177.

182. Kandori, H. Protein-controlled ultrafast photoisomerization in rhodopsin and bacteriorhodopsin / H. Kandori // *Supramolecular Photochemistry: Controlling Photochemical Processes*. – 2011. – Chapter 14. – P. 571–595.
183. Ruhman, S. Following evolution of bacteriorhodopsin in its reactive excited state via stimulated emission pumping / S. Ruhman, B. Hou, N. Friedman, M. Ottolenghi, M. J. Sheves // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – V. 124. – P. 8854–8858.
184. Tachikawa, H. TD-DFT calculations of the potential energy curves for the *trans-cis* photoisomerization of protonated Schiff base of retinal / H. Tachikawa, T. Iyama // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2004. – V. 76. – P. 55–60.
185. Shapiro, S. L. Picosecond and steady state, variable intensity and variable temperature emission spectroscopy of bacteriorhodopsin / S. L. Shapiro, A. J. Campillo, A. Lewis, G. J. Perreault, J. P. Spoonhower, R. K. Clayton, W. Stoeckenius // *Biophys. J.* – 1978. – V. 23. – N. 3. – P. 383–393.
186. Yu, J. First principles characterization of the elusive I fluorescent state and the structural evolution of retinal protonated Schiff base in bacteriorhodopsin / J. Yu, R. Liang, F. Liu, T. J. J. Martinez // *J. Am. Chem. Soc.* – 2019. – V. 141. – P. 18193–18203.
187. Gozem, S. Excited state vibronic dynamics of bacteriorhodopsin from 2D electronic photon echo spectroscopy and multi-configurational quantum chemistry / S. Gozem, P. J. M. Johnson, A. Halpin, H. L. Luk, T. Morizumi, V. I. Prokhorenko, O. P. Ernst, M. Olivucci, R. J. D. Miller // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2020. – V. 11. – N. 10. – P. 3889–3896.
188. Cembran, A. Structure, spectroscopy, and spectral tuning of the gas-phase retinal chromophore: The beta-ionone “handle” and alkyl group effect / A. Cembran, R. Gonzalez-Luque, P. Altoe, M. Merchan, F. Bernardi, M. Olivucci, M. Garavelli // *J. Phys. Chem. A*. – 2005. – V. 109. – P. 6597–6605.
189. Song, L. Primary step in bacteriorhodopsin photosynthesis: Bond stretch rather than angle twist of its retinal excited-state structure / L. Song, M. A. El-Sayed // *J. Am. Chem. Soc.* – 1998. – V. 120. – N. 34. – P. 8889–8890.
190. Schenkl, S. Ultrafast energy relaxation in bacteriorhodopsin studied by time-integrated fluorescence / S. Schenkl, E. Portuondo, G. Zgrablic, M. Chergui, S. Haacke, N. Friedman, M. Sheves // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2002. – V. 4. – N. 20. – P. 5020–5024.
191. Logunov, S. L. The relaxation dynamics of the excited electronic states of retinal in bacteriorhodopsin by two-pump-probe femtosecond studies / S. L. Logunov, V. V. Volkov, M. Braun, M. A. El-Sayed // *PNAS USA*. – 2001. – V. 98. – P. 8475–8479.
192. Hou, B. Comparing photoinduced vibrational coherences in bacteriorhodopsin and in native and locked retinal protonated Schiff bases / B. Hou, N. Friedman, M. Ottolenghi, M. Sheves, S. Ruhman // *Chem. Phys. Lett.* – 2003. – V. 381. – P. 549–555.
193. Prokhorenko, V. I. Coherent control of retinal isomerization in bacteriorhodopsin / V. I. Prokhorenko, A. M. Nagy, S. A. Waschuk, L. S. Brown, R. R. Birge, R. J. D. Miller // *Science*. – 2006. – V. 313. – P. 1257–1261.
194. Prokhorenko, V. I. On the mechanism of weak-field coherent control of retinal isomerization in bacteriorhodopsin / V. I. Prokhorenko, A. M. Nagy, L. S. Brown, R. J. D. Miller // *Chem. Phys.* – 2007. – V. 341. – P. 296–309.



195. Wu, Y. S. Ultrafast isomerization dynamics of retinal in bacteriorhodopsin as revealed by femtosecond absorption spectroscopy / Y. S. Wu, S. Zhong, X. C. Ai, K. S. Hu, J. P. Zhang // *Chin. Sci. Bull.* – 2008. – V. 53. – P. 1972–1977.
196. Zgrablic, G. Population branching in the conical intersection of the retinal chromophore revealed by multipulse ultrafast optical spectroscopy / G. Zgrablic, A. M. Novello, F. Parmigiani // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – V. 134. – P. 955–961.
197. Kandori, H. Primary photochemical events in halorhodopsin studied by subpicosecond time-resolved spectroscopy / H. Kandori, K. Yoshihara, H. Tomioka, H. Sasabe // *J. Phys. Chem.* – 1992. – V. 96. – N. 14. – P. 6066–6071.
198. Arlt, T. The initial reaction dynamics of the light-driven chloride pump halorhodopsin / T. Arlt, S. Schmidt, W. Zinth, U. Haupts, D. Oesterhelt // *Chem. Phys. Lett.* – 1995. – V. 241. – P. 559–565.
199. Lenz, M. O. First steps of retinal photoisomerization in proteorhodopsin / M. O. Lenz, R. Huber, B. Schmidt, P. Gilch, R. Kalmbach, M. Engelhard, J. Wachtveitl // *Biophys. J.* – 2006. – V. 91. – P. 255–262.
200. Nakamura, T. Ultrafast pump-probe study of the primary photoreaction process in *Pharaonis* halorhodopsin: Halide ion dependence and isomerization dynamics / T. Nakamura, S. Takeuchi, M. Shibata, M. Demura, H. Kandori, T. Tahara // *J. Phys. Chem. B.* – 2008. – V. 112. – P. 12795–12800.
201. Rupenyana, A. Reaction pathways of photoexcited retinal in proteorhodopsin studied by pump-dump-probe spectroscopy / A. Rupenyana, I. H. M. van Stokkum, J. C. Arents, R. van Grondelle, K. J. Hellingwerf, M. L. Groot // *J. Phys. Chem. B.* – 2009. – V. 113. – P. 16251–16256.
202. Suzuki, T. Primary photochemistry and photoisomerization of retinal at 77 K in cattle and squid rhodopsin / T. Suzuki, R. H. Callender // *Biophys. J.* – 1981. – V. 34. – P. 261–270.
203. Hampp, N. Bacteriorhodopsin as a photochromic retinal protein for optical memories / N. Hampp // *Chem. Rev.* – 2000. – V. 100. – N. 5. – P. 1755–1776.
204. Кронгауз, В. А. Фотохромия зрительных пигментов. 1. Образование изохромных продуктов в течение обратимых фотопревращений родопсина лягушки / В. А. Кронгауз, И. Б. Федорович, Р. Р. Шифрина, М. А. Островский // *Биофизика.* – 1975. – Т. 20. – № 2. – С. 219–224.
205. US Patent 5559732. Branched photocycle optical memory device. – 1996.
206. Kandori, H. Photoisomerization of the rhodopsin chromophore in clay interlayers at 77 K / H. Kandori, T. Ichioka, M. Sasaki // *Chem. Phys. Lett.* – 2002. – V. 354. – P. 251–255.
207. Spalink, J. D. Bathorhodopsin intermediates from 11-*cis*-rhodopsin and 9-*cis*-rhodopsin / J. D. Spalink, A. H. Reynolds, P. M. Rentzepis, W. Sperling, M. L. Applebury // *PNAS USA.* – 1983. – V. 80. – P. 1887–1891.
208. Kandori, H. Dependency of photon density on primary process of cattle rhodopsin / H. Kandori, S. Matuoka, Y. Shichida, T. Yoshizawa // *Photochem. Photobiol.* – 1989. – V. 49. – N. 2. – P. 181–184.
209. Kovalenko, S. A. Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing / S. A. Kovalenko, A. L. Dobryakov, J. Ruthmann, N. P. Ernsting // *Phys. Rev. A.* – 1999. – V. 59. – P. 2369–2384.

210. Петрухин, А. Н. Методика регистрации спектров фотоиндуцированного поглощения в фемтосекундном масштабе времени. Фотоизомеризация спироафтооксазина / А. Н. Петрухин, С. А. Антипин, Ф. Е. Гостев, В. С. Маревцев, А. А. Титов, Д. Г. Товбин, В. А. Барачевский, Ю. П. Строкач, О. М. Саркисов // Хим. Физ. – 2000. – Т. 19. – № 2. – С. 90–97.
211. Фролов, А. К. Фемтосекундная динамика и когерентные эффекты в фотореакции бифункционального соединения / А. К. Фролов, Ф. Е. Гостев, И. В. Шелаев, А. И. Шиенок, Н. Л. Зайченко, Л. С. Кольцова, В. А. Барачевский, О. М. Саркисов // Хим. Физ. – 2007. – Т. 26. – № 1. – С. 10–21.
212. Shelaev, I. V. Femtosecond primary charge separation in *Synechocystis sp.* PCC 6803 photosystem I / I. V. Shelaev, F. E. Gostev, M. D. Mamedov, O. M. Sarkisov, V. A. Nadtochenko, V. A. Shuvalov, A. Yu. Semenov // BBA – Bioenergetics. – 2010. – V. 8. – P. 1410–1420.
213. Blanchard, D. Picosecond time-resolved absorption and fluorescence in the bacteriorhodopsin photocycle: Vibrationally-excited species / D. Blanchard, D. A. Gilmore, T. L. Brack, H. Lemaire, G. H. Atkinson // Chem. Phys. – 1991. – V. 154. – P. 155–170.
214. Zimanyi, L. Deriving the intermediate spectra and photocycle kinetics from time-resolved difference spectra of bacteriorhodopsin. The simpler case of the recombinant D96N protein / L. Zimanyi, J. K. Lanyi // Biophys. J. – 1993. – V. 64. – P. 240–251.
215. Dobryakov, A. L. Femtosecond transient absorption with chirped pump and supercontinuum probe: Perturbative calculation of transient spectra with general lineshape functions, and simplifications / A. L. Dobryakov, J. L. Perez Lustres, S. A. Kovalenko, N. P. Ernsting // Chem. Phys. – 2008. – V. 347. – P. 127–138.
216. Смитиенко, О. А. Фемтосекундная динамика образования первичных продуктов фотопревращения зрительного пигмента родопсина / О. А. Смитиенко, М. Н. Мозговая, И. В. Шелаев, Ф. Е. Гостев, Т. Б. Фельдман, В. А. Надточенко, О. М. Саркисов, М. А. Островский // Биохимия. – 2010. – Т. 75. – № 1. – С. 34–45.
217. 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.
218. 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.
219. 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: Biology. – 2016. – V. 164. – P. 296–305.
220. 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 // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2020. – Т. 56. – № 7. – С. 519–523.

221. Мозговая, М. Н. Фотохромизм зрительного пигмента родопсина в фемтосекундной шкале времени: Когерентное управление фотоизомеризацией хромофора ретины / М. Н. Мозговая, О. А. Смитиенко, И. В. Шелаев, Ф. Е. Гостев, Т. Б. Фельдман, В. А. Надточенко, О. М. Саркисов, М. А. Островский // ДАН. – 2010. – Т. 435. – № 2. – С. 262–266.
222. 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.
223. 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.
224. Iyer, E. S. S. Efficient femtosecond energy transfer from carotenoid to retinal in *Gloeobacter* rhodopsin-salinixanthin complex / E. S. S. Iyer, I. Gdor, T. Eliash, M. Sheves, S. J. Ruhman // Phys. Chem. B. – 2015. – V. 119. – P. 2345–2349.
225. Haran, G. Excited state dynamics of bacteriorhodopsin revealed by transient stimulated emission spectra / G. Haran, K. Wynne, A. Xie, Q. He, M. Chance, R. M. Hochstrasser // Chem. Phys. Lett. – 1996. – V. 261. – P. 389–395.
226. Zhong, Q. Reexamining the primary light-induced events in bacteriorhodopsin using a synthetic C13=C14-locked chromophore / Q. Zhong, S. Ruhman, M. Ottolenghi, M. Sheves, N. Friedman, G. H. Atkinson, J. K. Delaney // J. Am. Chem. Soc. – 1996. – V. 118. – P. 12828–12829.
227. Brack, T. L. Vibrationally excited retinal in the bacteriorhodopsin photocycle: Picosecond time-resolved anti-Stokes resonance Raman scattering / T. L. Brack, G. H. Atkinson // J. Phys. Chem. – 1991. – V. 95. – P. 2351–2356.
228. Logunov, S. L. Excited-state dynamics of a protonated retinal Schiff base in solution / S. L. Logunov, L. Song, M. A. El-Sayed // J. Phys. Chem. – 1996. – V. 100. – P. 18586–18591.
229. Haran, G. Femtosecond polarized pump-probe and stimulated emission spectroscopy of the isomerization reaction of rhodopsin / G. Haran, E. A. Morlino, J. Matthes, R. H. Callender, R. M. J. Hochstrasser // J. Phys. Chem. A. – 1999. – V. 103. – P. 2202–2207.
230. Gdor, I. Membrane independence of ultrafast photochemistry in *Pharaonis* halorhodopsin: Testing the role of bacterioruberin / I. Gdor, M. Mani-Hazan, N. Friedman, M. Sheves, S. Ruhman // J. Phys. Chem. B. – 2017. – V. 121. – P. 2319–2325.
231. Bismuth, O. Deciphering excited state evolution in halorhodopsin with stimulated emission pumping / O. Bismuth, P. Komm, N. Friedman, T. Eliash, M. Sheves, S. Ruhman // J. Phys. Chem. B. – 2010. – V. 114. – N. 8. – P. 3046–3051.
232. Loppnow, G. R. Excited-state structure and isomerization dynamics of the retinal chromophore in rhodopsin from resonance Raman intensities / G. R. Loppnow, R. A. Mathies // Biophys. J. – 1988. – V. 54. – P. 35–43.

233. Weingart, O. Product formation in rhodopsin by fast hydrogen motions / O. Weingart, P. Altoè, M. Stenta, A. Bottoni, G. Orlandi, M. Garavelli // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2011. – V. 13. – N. 9. – P. 3645.
234. Hurley, J. B. Temperature and wavelength effects on the photochemistry of rhodopsin, isorhodopsin, bacteriorhodopsin and their photoproducts / J. B. Hurley, T. G. Ebrey, B. Honig, M. Ottolenghi // *Nature*. – 1977. – V. 270. – N. 5637. – P. 540–542.
235. Schapiro, I. Ultrafast photochemistry of *Anabaena* sensory rhodopsin: Experiment and theory / I. Schapiro, S. Ruhman // *BBA*. – 2014. – V. 1837. – P. 589–597.
236. Cheminal, A. 100 fs photo-isomerization with vibrational coherences but low quantum yield in *Anabaena* Sensory Rhodopsin / A. Cheminal, J. Leonard, S.-Y. Kim, K.-H. Jung, H. Kandori, S. Haacke // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2015. – V. 17. – P. 25429–25439.
237. Polli, D. Tracking the primary photoconversion events in rhodopsins by ultrafast optical spectroscopy / D. Polli, I. Rivalta, A. Nenov, O. Weingart, M. Garavelli, G. Cerullo // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2015. – V. 14. – P. 213.
238. Pan, D. Time-resolved resonance Raman analysis of chromophore structural changes in the formation and decay of rhodopsin's BSI intermediate / D. Pan, Z. Ganim, J. E. Kim, M. A. Verhoeven, J. Lugtenburg, R. A. Mathies // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – V. 124. – P. 4857–4864.
239. Nakamichi, H. Crystallographic analysis of primary visual photochemistry / H. Nakamichi, T. Okada // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2006. – V. 45. – P. 4270–4273.
240. Nakamichi, H. Local peptide movement in the photoreaction intermediate of rhodopsin / H. Nakamichi, T. Okada // *PNAS USA*. – 2006. – V. 103. – P. 12729–12734.
241. Strambi, A. Relationship between the excited state relaxation paths of rhodopsin and isorhodopsin / A. Strambi, P. B. Coto, L. M. Frutos, N. Ferre, M. J. Olivucci // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – V. 130. – P. 3382–3388.
242. Teller, D. C. Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs) / D. C. Teller, T. Okada, C. A. Behnke, K. Palczewski, Stenkamp R. E. // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40. – P. 7761–7777.
243. Wang, J. Comparison of the dynamics of the primary events of bacteriorhodopsin in its trimeric and monomeric states / J. Wang, S. Link, C. D. Heyes, M. A. El-Sayed // *Biophys. J.* – 2002. – V. 83. – P. 1557–1566.
244. Kennis, J. T. M. Ultrafast protein dynamics of bacteriorhodopsin probed by photon echo and transient absorption spectroscopy / J. T. M. Kennis, D. S. Larsen, K. Ohta, M. T. Facciotti, R. M. Glaeser, G. R. Fleming // *J. Phys. Chem. B*. – 2002. – V. 106. – P. 6067–6080.
245. Schenkl, S. Probing the ultrafast charge translocation of photoexcited retinal in bacteriorhodopsin / S. Schenkl, F. van Mourik, G. van der Zwan, S. Haacke, M. Chergui // *Science*. – 2005. – V. 309. – P. 917–920.
246. Du, M. Femtosecond time-resolved fluorescence spectroscopy of bacteriorhodopsin: Direct observation of excited state dynamics in the primary step of the proton pump cycle / M. Du, G. R. Fleming // *Biophys. Chem.* – 1993. – V. 48. – P. 101–111.
247. Inoue, K. Spectroscopic study of proton transfer mechanism of inward proton pump rhodopsin, *Parvularcula oceani* xenorhodopsin / K. Inoue, S. Tahara, Y. Kato, S. Takeuchi, T. Tahara, H. Kandori // *J. Phys. Chem. B*. – 2018. – V. 122. – P. 6453–6461.

248. Huber, R. pH-Dependent photoisomerization of retinal in proteorhodopsin / R. Huber, T. Kohler, M. O. Lenz, E. Bamberg, R. Kalmbach, M. Engelhard, J. Wachtveitl // *Biochemistry*. – 2005. – V. 44. – P. 1800–1806.
249. Amsden, J. J. Subpicosecond protein backbone changes detected during the green-absorbing proteorhodopsin primary photoreaction / J. J. Amsden, J. M. Kralj, L. R. Chieo, X. Wang, S. Erramilli, E. N. Spudich, J. L. Spudich, L. D. Ziegler, K. J. Rothschild // *J. Phys. Chem. B*. – 2007. – V. 111. – P. 11824–11831.
250. Atkinson, G. H. Picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy of K-590 in the bacteriorhodopsin photocycle / G. H. Atkinson, D. Blanchard, H. Lemaire, T. L. Brack, H. Hayashi // *Biophys. J.* – 1989. – V. 55. – N. 2. – P. 263–274.
251. Zimanyi, L. Transient spectroscopy of bacterial rhodopsins with an optical multichannel analyzer. 1. Comparison of the photocycles of bacteriorhodopsin and halorhodopsin / L. Zimanyi, L. Keszthelyi, J. K. Lanyi // *Biochemistry*. – 1989. – V. 28. – P. 5165–5172.
252. Balashov, S. P. Quantum yield ratio of the forward and back light reactions of bacteriorhodopsin at low temperature and photosteady-state concentration of the bathoproduct K / S. P. Balashov, E. S. Imasheva, R. Govindjee, T. G. Ebrey // *Photochem. Photobiol.* – 1991. – V. 54. – N. 6. – P. 955–961.
253. Hou, B. Ultrafast spectroscopy of the protonated Schiff bases of free and C13=C14 locked retinals / B. Hou, S. Friedman, M. Cheves, M. Ottolenghi // *J. Phys. Chem. B*. – 2001. – V. 105. – P. 7042–7048.
254. Hayashi, S. Molecular dynamics simulation of bacteriorhodopsin's photoisomerization using *ab initio* forces for the excited chromophore / S. Hayashi, E. Tajkhorshid, K. Schulten // *Biophys. J.* – 2003. – V. 85. – N. 3. – P. 1440–1449.
255. Hamm, P. Femtosecond spectroscopy of the photoisomerisation of the protonated Schiff base of all-*trans* retinal / P. Hamm, M. Zurek, T. R. Schinger, H. Patzelt, D. Oesterhelt, W. Zinth // *Chem. Phys. Lett.* – 1996. – V. 263. – P. 613–621.
256. Tittor, J. The quantum yield of bacteriorhodopsin / J. Tittor, D. Oesterhelt // *FEBS Lett.* – 1990. – V. 263. – N. 2. – P. 269–273.
257. Rupenyan, A. Characterization of the primary photochemistry of proteorhodopsin with femtosecond spectroscopy / A. Rupenyan, I. H. M. van Stokkum, J. C. Arents, R. van Grondelle, K. Hellinger, M. L. Groot // *Biophys. J.* – 2008. – V. 94. – P. 4020–4030.
258. Wada, Y. Quantum yields for the light adaptations in *Anabaena* sensory rhodopsin and bacteriorhodopsin / Y. Wada, A. Kawanabe, Y. Furutani, H. Kandori, H. Ohtani // *Chem. Phys. Lett.* – 2008. – V. 453. – N. 1–3. – P. 105–108.
259. Hontani, Y. Reaction dynamics of the chimeric channelrhodopsin C1C2 / Y. Hontani, M. Marazzi, K. Stehfest, T. Mathes, I. H. M. van Stokkum, M. Elstner, P. Hegemann, J. T. M. Kennis // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – P. 7217.
260. Tahara, S. Ultrafast photoreaction dynamics of a light-driven sodium-ion-pumping retinal protein from *Krokinobacter eikastus* revealed by femtosecond time-resolved absorption spectroscopy / S. Tahara, S. Takeuchi, R. Abe-Yoshizumi, K. Inoue, H. Ohtani, H. Kandori, T. Tahara // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2015. – V. 6. – N. 22. – P. 4481–4486.

261. Meyer, T. E. Photoactive yellow protein from the purple phototrophic bacterium, *Ectothiorhodospira halophila*. Quantum yield of photobleaching and effects of temperature, alcohols, glycerol, and sucrose on kinetics of photobleaching and recovery / T. E. Meyer, G. Tollin, J. H. Hazzard, M. A. Cusanovich // *Biophysical Journal*. – 1989. – V. 56. – N. 3. – P. 559–564.
262. Okano, T. Photosensitivities of iodopsin and rhodopsins / T. Okano, Y. Fukada, Y. Shichida, T. Yoshizawa // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – V. 56. – N. 6. – P. 995–1001.
263. Coto, P. B. Effect of opsin on the shape of the potential energy surfaces at the conical intersection of the Rhodopsin chromophore / P. B. Coto, A. Strambi, M. Olivucci // *Chem. Phys.* – 2008. – V. 347. – N. 1–3. – P. 483–491.
264. Rinaldi, S. Comparison of the isomerization mechanisms of human melanopsin and invertebrate and vertebrate rhodopsins / S. Rinaldi, F. Melaccio, S. Gozem, F. Fanelli, M. Olivucci // *PNAS USA*. – 2014. – V. 111. – N. 5. – P. 1714–1719.
265. Barlow, H. B. Purkinje shift and retinal noise / H. B. Barlow // *Nature*. – 1957. – V. 179 – P. 255–256.
266. Ala-Laurila, P. On the relation between the photoactivation energy and the absorbance spectrum of visual pigments / P. Ala-Laurila, J. Pahlberg, A. Koskelainen, K. Donner // *Vision Res.* – 2004. – V. 44. – P. 2153–2158.
267. Inoue, K. Asymmetric functional conversion of eubacterial light-driven ion pumps / K. Inoue, Y. Nomura, H. Kandori // *J. Biol. Chem.* – 2016. – V. 291. – N. 19. – P. 9883–9893.
268. Gehring, W. J. The evolution of vision / W. J. Gehring // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. – 2012. – V. 3. – N. 1. – P. 1–40.