

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 577.541.124

ФЕМТОХИМИЯ РОДОПСИНОВ

© 2021 г. М. А. Островский^{1*}, В. А. Надточенко²

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

²Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова
Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: ostrovsky3535@mail.ru

Поступила в редакцию 01.10.2020;

после доработки 01.10.2020;

принята в печать 20.10.2020

Дан обзор спектрально-кинетических данных, полученных нами методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии, для фотохромной реакции изомеризации ретиналя в родопсине животных (II типа) — зрительном родопсине быка, и в микробиальных родопсинах (I типа) — родопсине *Exiguobacterium sibiricum* и бактериородопсине *Halobacterium salinarum*. Показано, что элементарный акт фотореакции изомеризации ретиналя в родопсинах I и II типов можно интерпретировать как переход через коническое пересечение с сохранением когерентности колебательных волновых пакетов, образующихся при возбуждении. Когерентный характер реакции наиболее выражен в зрительном родопсине как следствие безбарьерного движения по возбужденной поверхности потенциальной энергии, что также приводит к крайне высокой скорости изомеризации ретиналя по сравнению с микробиальными родопсинами. Различия в динамике фотохимических реакций родопсинов I и II типов могут быть связаны как с различиями исходных изомерных форм их хромофоров (полностью-*транс*- и 11-*цис*-ретиналь, соответственно), а также с влиянием белкового окружения на хромофор. Несмотря на практически одинаковые значения квантовых выходов прямой фотореакции зрительного родопсина и бактериородопсина, обратная фотореакция зрительного родопсина гораздо менее эффективна ($\phi = 0.15$), чем в случае бактериородопсина ($\phi = 0.81$). Можно предположить, что фотобиологический механизм преобразования света в информационный процесс в эволюционно более “молодых” зрительных родопсинах (родопсины II типа) должен быть надежнее, нежели механизм преобразования света в фотоэнергетический процесс в эволюционно более “древних” микробиальных родопсинах (родопсины I типа). Низкое значение квантового выхода обратной реакции зрительного родопсина можно рассматривать как повышение надежности прямой реакции, запускающий процесс фототрансдукции.

Ключевые слова: фотохимия, фемтосекундная абсорбционная лазерная спектроскопия “возбуждение—зондирование”, первичные реакции, когерентные реакции, микробиальные родопсины, ретиналь-содержащие белки, зрительный родопсин, родопсин *Exiguobacterium sibiricum*, бактериородопсин *Halobacterium salinarum*.

DOI: 10.31857/S0207401X21040117

ВВЕДЕНИЕ

Светочувствительные белки родопсины представлены во всех царствах живых организмов. Они делятся на микробиальные родопсины (I типа) и родопсины животных (II типа). Большинство представителей родопсинов I типа функционируют как ионные насосы, выполняя фотоэнергетическую функцию (простейший фотосинтез); некоторые из них, функционируя как катионные или анионные каналы или связываясь с белком-переносчиком в ответ на световой сигнал, выполняют фотосенсорную функцию. Обширное семейство микробиальных родопсинов продолжает пополняться. Так, недавно обнаружено два новых семейства. К первому относятся так называемые гелиородопсины, био-

логическая функция которых пока не ясна [1]. Ко второму — родопсины, обладающие ферментативной активностью, обнаруженные у грибов, зеленых водорослей и одноклеточных воротничковых жгутиконосцев (хоанофлагеллят); см. обзор [2]. У этих “ферментативных” родопсинов имеются, в отличие от “классических” родопсинов, не семь альфа-спиральных трансмембранных “тяжей”, а восемь или даже девять. Так, например, у родопсиновой фосфодиэстеразы дополнительный восьмой “тяж” вместе с длинным N-концевым полипептидным фрагментом ответственен за ее ферментативную активность [3]. Структура консервативного хромофорного центра у всех микробиальных родопсинов имеет много общего. Что

касается животных родопсинов II типа, то большинство из них функционируют как G-белок-связывающие рецепторы, обеспечивая фотоинформационные функции, основная из которых — зрительная.

Таким образом, в современном понимании термин “родопсин” распространяется на ретиналь-содержащие белки и микробиального, и животного происхождения. Все они, за исключением ферментативных микробиальных родопсинов, имеют одинаковую архитектуру семи альфа-спиралей, пересекающих биологическую мембрану. Но между микробиальными и животными родопсинами нет гомологии аминокислотной последовательности (см. обзор [4]).

Наиболее консервативный домен у каждого из 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.

Фотохимической реакцией родопсинов является изомеризация их хромофорной группы — ретиналя. В случае зрительного родопсина это изомеризация из 11-*цис*- в полностью-*транс*-форму, в случае микробиальных родопсинов — из полностью-*транс*- в 13-*цис*-форму. Родопсины, как светочувствительные молекулы, представляют собой идеальную модель для исследования и понимания механизма фотохимической реакции изомеризации вообще.

После открытия Р. Хаббардом (R. Hubbard) и Дж. Уолдом (G. Wald) фотоизомеризации хромофорной группы зрительного родопсина — ретиналя из 11-*цис*- в полностью-*транс*-форму как первичной реакции зрения [5], механизм этой уникальной фотохимической реакции по сей день активно исследуется. В отношении зрения важно подчеркнуть, что поглощения всего одного кванта света одной из примерно 10^9 молекул родопсина в зрительной клетке сетчатки — палочке, достаточно, чтобы инициировать ферментативный каскад усиления и генерацию фоторецепторного, т.е. зрительного сигнала.

Основные вопросы, на которые предстояло дать ответ, были: “Каковы скорость и квантовый выход *цис-транс*-изомеризации, и каков механизм этой реакции?” Ответ на первый вопрос в настоящее время дан. Изомеризация совершается за фемтосекундные времена [6], ее эффективность весьма высока — квантовый выход равен 0.65 [7], при этом 58% поглощенной энергии запасается в молекуле. В последние годы достигнуты большие успехи в понимании механизма этой ре-

акции. Коротко: изомеризация происходит через коническое пересечение (conical intersection (CI)) поверхностей потенциальной энергии (ППЭ), которое связывает возбужденное состояние ретиналя (S_1) с первым продуктом реакции, фотородопсином (Фото), в основном состоянии (S_0) [8, 9]. Показано, что *цис-транс*-переход в зрительном родопсине совершается за фантастически короткое время — 50–100 фс, и что это — когерентная реакция. Становится очевидным, что высочайшая скорость и эффективность этого перехода обеспечивается взаимодействием хромофорной группы с ее ближайшим белковым окружением в хромофорном центре молекулы родопсина. Механизм этого взаимодействия еще предстоит выяснить (см. обзоры [10, 11]). Действительно, от взаимодействия ретиналя с его ближайшим белковым окружением в тесном хромофорном центре прямо зависят такие фундаментальные характеристики молекулы родопсина, как положение максимума спектра поглощения, время жизни возбужденного состояния, квантовый выход изомеризации и колебательная когерентность, наблюдаемые в первом фотопродукте реакции.

В молекуле зрительного родопсина объем хромофорного центра составляет всего $660 \text{ \AA}^3$, а поверхность взаимодействия 11-*цис*-ретиналя с белковым окружением равна $\sim 230 \text{ \AA}^2$ [12]. Это означает, что тесное белковое окружение 11-*цис*-ретиналя не только не препятствует, а наоборот, активно способствует сверхбыстрому и эффективному процессу фотоиндуцированного изменения геометрии хромофорной группы. Еще предстоит выяснить, каким именно образом столь тесное белковое окружение способствует ускорению и повышению эффективности этой фотохимической реакции.

Сравнение времен достижения CI родопсинов I и II типа показывает, что для зрительного родопсина — как бычьего [13–17], так и осьминога [18] — оно в несколько раз короче, чем для микробиального родопсина архебактерий бактериородопсина [19, 20]. Это различие может быть связано как с разными *цис-транс*- и *транс-цис*-переходами в зрительном и микробиальном родопсинах соответственно, так и с различной структурой их хромофорных центров. Первое предположение подтверждается тем, что в газовой фазе фотоизомеризация 11-*цис*-ретиналя в полностью-*транс*-форму совершается почти в восемь раз быстрее, чем фотоактивируемый переход из полностью-*транс*-ретиналя в *цис*-изомеры [21]. Белковое окружение ретиналя как в молекуле зрительного родопсина, так и бактериородопсина ускоряет эту реакцию в несколько раз. В любом случае большую скорость фотоизомеризации 11-*цис*-ретиналя в молекуле зрительного родопсина по сравнению с фотоизомеризацией *транс*-ретиналя в бактериальном родопсине можно рассматри-

вать как свидетельство большего совершенства зрительного родопсина как эволюционно более “молодого” и предназначенного для фотоинформационного процесса.

С точки зрения эволюции ретиналь-содержащих белков представляет интерес сравнение параметров фотохимических реакций микробиальных (I типа) и зрительных (II типа) родопсинов. Складывается впечатление, что несмотря на внешнюю похожесть, происхождение родопсинов I и II типа неодинаково. Помимо различий в аминокислотной последовательности родопсинов, до сих пор не найдено промежуточных форм, указывающих на их родство. Иными словами, речь идет, судя по всему, о конвергентной эволюции этих двух типов родопсинов, связанной с их физиологическими функциями. Удивительно, что в ходе такой конвергентной (независимой) эволюции и топография, и структура хромофорного центра оказались похожими (подробнее см. [22]). Сравнение динамики фотоизомеризации ретиналевого хромофора в родопсинах животного и микробиального происхождения, в том числе сравнение их прямой и обратной фотореакций, с точки зрения молекулярной эволюции ретиналь-содержащих белков представляет существенный интерес.

СРАВНЕНИЕ МИКРОБИАЛЬНЫХ РОДОПСИНОВ (I ТИПА) И РОДОПСИНОВ ЖИВОТНЫХ (II ТИПА)

Нами было проведено сравнение спектральных характеристик, изомерного состава ретиналей, скоростей и квантовых выходов фотохимических реакций трех различных родопсинов [14–17, 20, 23–27]. Два из них — представители микробиальных родопсинов I типа — бактериородопсин галофильной археобактерии *Halobacterium salinarum* (BR) и недавно открытый родопсин (ESR) почвенной психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum*, найденной в сибирской вечной мерзлоте, возраст которой около трех млн лет [28]. Третий родопсин — это классический зрительный родопсин II типа — родопсин палочек быка *Bos taurus* (Rh).

Фотохромные реакции родопсинов I типа (BR и ESR) и II типа (Rh), протекающие в фемто- и пикосекундном диапазоне времен, исследовались нами методом фемтосекундной поляризации абсорбционной лазерной спектроскопии в схемах “возбуждение—зондирование” и “возбуждение—возбуждение—зондирование”. Подробный анализ временной эволюции дифференциальных спектров этих систем после импульса (импульсов) фемтосекундного возбуждения приведен в работах [14–17, 20, 23–27].

Фемтосекундная лазерная спектроскопия с временным разрешением 25 фс и зондированием в широком спектральном диапазоне (400–900 нм)

позволила выявить спектры промежуточных состояний, образующихся в процессе первичных реакций исследуемых белков и имеющих много общего, и определить характерные времена переходов между этими состояниями. Рисунок 1 показывает типичные спектры ($\Delta A(\lambda)$) и кинетические кривые ($\Delta A(t)$) дифференциального фотоиндуцированного (ф/и) поглощения Rh, BR и ESR. Сигнал дифференциального поглощения ($\Delta A(\lambda, t)$) состоит из трех компонент: сигнала поглощения с положительным знаком $\Delta A(\lambda, t) > 0$, связанного с переходом из электронно-возбужденного состояния (ESA — excited state absorption) и/или из основного состояния продукта реакции (GSA — ground state absorption); отрицательного сигнала $\Delta A(\lambda, t) < 0$ выцветания полосы поглощения основного состояния, обусловленного обеднением заселенности основного состояния после возбуждения (BL — bleach), и отрицательного сигнала $\Delta A(\lambda, t) < 0$ вынужденного излучения из электронно-возбужденного состояния (SE — stimulated emission). Спектры, представленные на рис. 1а–в, содержат все три спектральные компоненты: ΔA_{ESA} , ΔA_{BL} и ΔA_{SE} .

Сигнал ΔA_{ESA} отражает $S_n \leftarrow S_1$ -поглощение, доминирующее в коротковолновой области спектра: 410–490 (Rh) и 400–510 нм (BR и ESR). Сигнал ΔA_{SE} проявляется в длинноволновой области спектра 610–710 (Rh) и 690–880 нм (BR и ESR). Эти сигналы происходят из возбужденного состояния (Rh* в случае Rh и интермедиата I в случаях BR и ESR), отличного от франк-кондоновского (ФК), образование которого связано с особой топологией S_1 -ППЭ 11-цис- и полностью-транс-ретиналя.

В спектральной области 550–650 нм для всех систем можно отметить долгоживущую полосу поглощения, которая возникает по мере исчезновения сигналов ΔA_{ESA} и ΔA_{SE} , вследствие чего эта полоса была приписана поглощению первых продуктов реакции фотоизомеризации ретиналя в основном состоянии (ΔA_{GSA}). Эти продукты — фотородопсин и батородопсин (Бато) в случае Rh ($\lambda_{\text{max}} \sim 570$ и 535 нм соответственно) и интермедиаты J и K в случаях BR ($\lambda_{\text{max}} \sim 625$ и 590 нм соответственно) и ESR ($\lambda_{\text{max}} \sim 590$ и 555 нм соответственно), последовательно сменяют друг друга. Переход Фото → Бато, как и переход J → K, связан с колебательной релаксацией ретиналя и завершением его изомеризации. В дифференциальных спектрах этот переход проявляется как коротковолновый сдвиг полосы поглощения продукта реакции, наблюдаемый в пикосекундном временном диапазоне (рис. 1а, кривые 4–6; рис. 1б и в, кривые 5, 6).

В области стационарного поглощения Rh, BR и ESR ($\lambda_{\text{max}} = 498, 568$ и 528 нм соответственно) наблюдается сигнал ΔA_{BL} , который на ранних

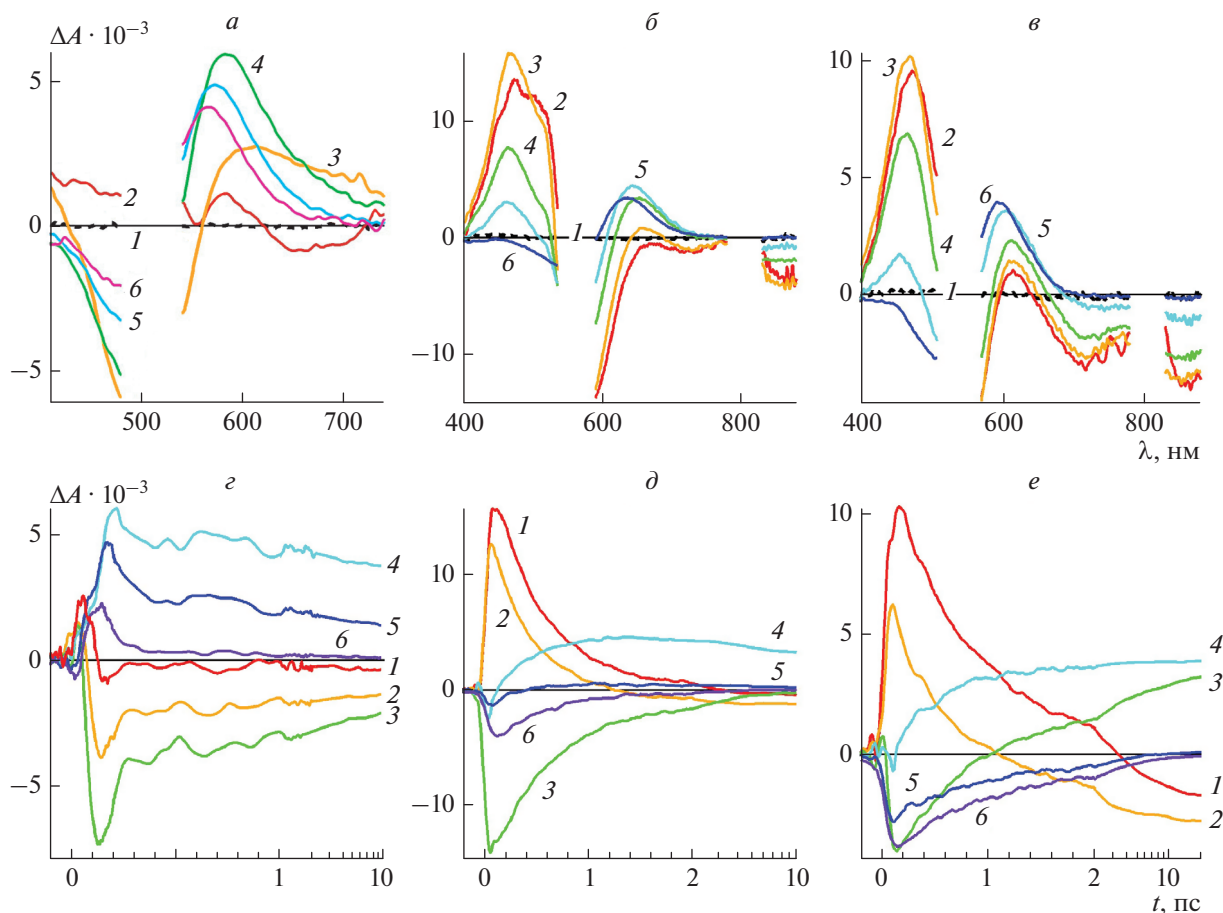


Рис. 1. Дифференциальные спектры фотоиндуцированного поглощения Rh (а), BR (б) и ESR (в), зарегистрированные на временах задержки: -0.2 (1), 0.03 (2), 0.1 (3), 0.2 (4), 0.8 (5) и 9 (6) пс в случае Rh; -0.2 (1), 0.05 (2), 0.12 (3), 0.5 (4), 1 (5) и 10 (6) пс в случае BR; -0.2 (1), 0.12 (2), 0.2 (3), 0.5 (4), 2 (5) и 10 (6) пс в случае ESR. Кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения Rh (г), BR (д) и ESR (е), зарегистрированные на длинах волн зондирования: 410 (1), 450 (2), 480 (3), 580 (4), 620 (5) и 700 (6) нм в случае Rh; 470 (1), 500 (2), 590 (3), 640 (4), 730 (5) и 850 (6) нм в случае BR; 470 (1), 500 (2), 575 (3), 605 (4), 730 (5) и 850 (6) нм в случае ESR. Кинетические кривые представлены в линейном масштабе времени задержки до 1 (2) пс и далее — в логарифмическом масштабе времени задержки для Rh (BR и ESR).

временах задержки перекрывается сигналом ΔA_{ESA} , затем по мере распада возбужденного состояния достигает максимальной интенсивности примерно к 100 – 200 фс и на более поздних временах уменьшается в результате появления сигнала ΔA_{GSA} (рис. 1г, кривая 3; рис. 1д и е, кривые 3).

На качественном уровне из сравнения систем Rh, BR и ESR можно отметить, что релаксация возбужденного состояния и образование первичных продуктов изомеризации в Rh происходят быстрее, чем в BR и ESR, как это видно из сравнения кинетических кривых накопления продуктов изомеризации (рис. 2).

Построение модельных экспоненциальных кривых для экспериментальных кинетических кривых в широком диапазоне зондирования [14, 15, 17, 20, 26], а также применение программы CONTIN для анализа [27] позволили охарактеризовать времена наблюдаемых процессов и прояс-

нить схемы первичных реакций исследованных белков. Приближенные схемы элементарного процесса изомеризации ретиналя в зрительном и микробальных родопсинах, основанные на анализе фемтосекундных данных, представлены на рис. 3 и 4.

Как было сказано ранее, элементарный процесс изомеризации ретиналя во всех исследованных белках протекает в возбужденном состоянии путем перехода через CI S_1/S_0 -ППЭ, который приводит к образованию первого короткоживущего продукта с изомеризованным ретиналем. Участие CI также подразумевает переход части возбужденных молекул в исходное состояние с неизомеризованным ретиналем (рис. 3 и 4). Этот процесс происходит в том же временном масштабе, что и образование основного продукта изомеризации.

Реакция фотоизомеризации ретиналя как в белке [14, 15, 17, 20, 29, 30], так и в растворе [31] протекает в когерентном режиме. При возбуждении фемтосекундный импульс формирует когерентные колебательные квантовые волновые пакеты (волновые пакеты) в ФК-состоянии, и когерентность сохраняется при переходе через CI. Наиболее ярко это видно в случае Rh. На кинетических кривых, отражающих образование продукта Фото и исходного состояния, можно выявить осцилляционные компоненты (рис. 1з, кривые 3 и 4; рис. 2, кривая 1), что, по-видимому, связано с безбарьерным переходом из электронно-возбужденного состояния ретиналя в продукты изомеризации (рис. 3а). В случае микробиальных родопсинов, в частности BR и ESR, структура полностью-*транс*-ретиналя и его взаимодействие с окружающими аминокислотными остатками определяют наличие на S_1 -ППЭ небольшого барьера, благодаря которому происходит задержка волнового пакета на пути к CI (рис. 3б). Продукты фотореакции BR и ESR образуются медленнее по сравнению с Rh и без ярко выраженных когерентных эффектов (рис. 2). Тем не менее применение коротких возбуждающих импульсов (~ 10 фс) при инициировании фотореакции BR позволяет наблюдать осцилляции с широким диапазоном частот как в сигналах из возбужденного состояния (интермедиата I), так и первого фотопродукта (интермедиата J) [32], что говорит о когерентном режиме фотореакции BR, как и в случае Rh.

При анализе времяразрешенных данных исследованных нами родопсинов были получены следующие времена наблюдаемых процессов. Время релаксации начального франк-кондоновского состояния оценивается в ~ 30 – 50 фс для всех систем. Время прохождения через CI для Rh оценивается по исчезновению сигнала ΔA_{ESA} в ~ 50 фс, после чего образуется первичный продукт изомеризации, Фото, содержащий полностью-*транс*-ретиналь с сильно скрученной и напряженной структурой и избытком колебательной энергии. Колебательная релаксация ретиналя протекает в два этапа с характерными временами 60 фс и 2.1 пс. Первый этап, вероятно, связан с перераспределением колебательной энергии внутри ретиналя, что проявляется в ф/и сигналах как коротковолновый сдвиг широкой полосы поглощения Фото к ~ 580 нм на временах задержки 100–200 фс (рис. 1а, кривые 3 и 4). Второй этап, вероятно, отражает передачу избытка колебательной энергии от ретиналя к белковому окружению и проявляется как дальнейший сдвиг полосы $\Delta A_{\text{GSA}}(\text{Фото})$ примерно на 10 нм при образовании следующего продукта Бато. На этом этапе завершается *цис* $\rightarrow$ *транс*-изомеризация ретиналя.

Время жизни возбужденного состояния в BR и ESR гораздо больше, чем в Rh. Динамика образо-

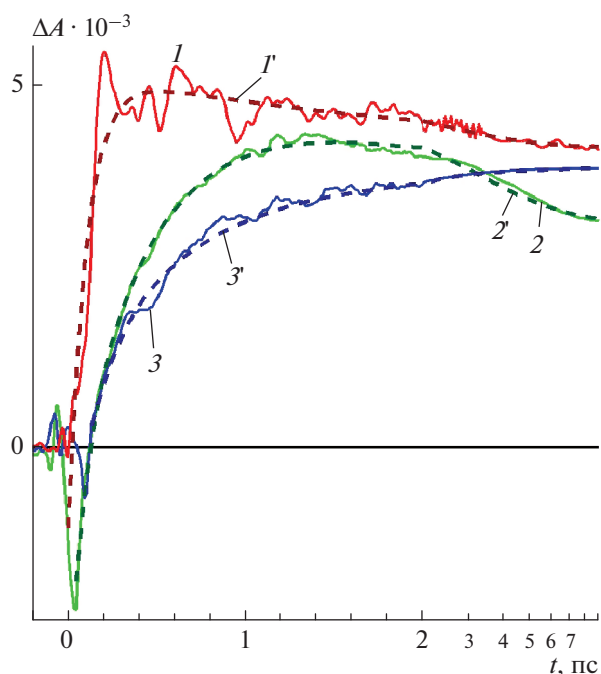


Рис. 2. Ненормированные кинетические кривые образования продуктов изомеризации Rh (1), BR (2) и ESR (3) и соответствующие модельные экспоненциальные кривые (1'–3'), представленные на длинах волн зондирования 570, 640 и 605 нм соответственно. Кинетические кривые представлены в линейном (-0.2 – 2 пс) и логарифмическом (2 – 9 пс) масштабах времени задержки.

вания и распада интермедиата I разрешается во времени [27]. При образовании с характерным временем 40–50 фс он претерпевает колебательную релаксацию, время которой было оценено в 130 (BR) и 160 фс (ESR), после чего начинается изомеризация ретиналя, которая протекает заметно медленнее, чем в Rh. Так, характерное время образования первого продукта с изомеризованным 13-*цис*-ретиналем – интермедиата J, составляет 480 (BR) и 690 фс (ESR). Интермедиат K, также как в случае Rh, образуется в пикосекундном временном диапазоне за 1.8 (BR) и 6.3 пс (ESR).

Еще одной особенностью первичных реакций является наличие в случае микробиальных родопсинов гетерогенности возбужденного состояния, которую многие исследователи связывают с гетерогенностью начального состояния этих белков. Это приводит к фотоактивации нескольких параллельных процессов, некоторые из которых проходят через так называемые нереакционные возбужденные состояния, не ведущие к изомеризации ретиналя (рис. 4). Для BR и ESR было выявлено одно такое нереакционное состояние, время жизни и вклад которого в общий процесс распада были оценены в 2.4 пс/6% (BR) и 5 пс/19% (ESR) (рис. 4, реакции (2) и (3) соответственно). Для Rh также предполагают наличие нереакционного возбужденного состояния, судя

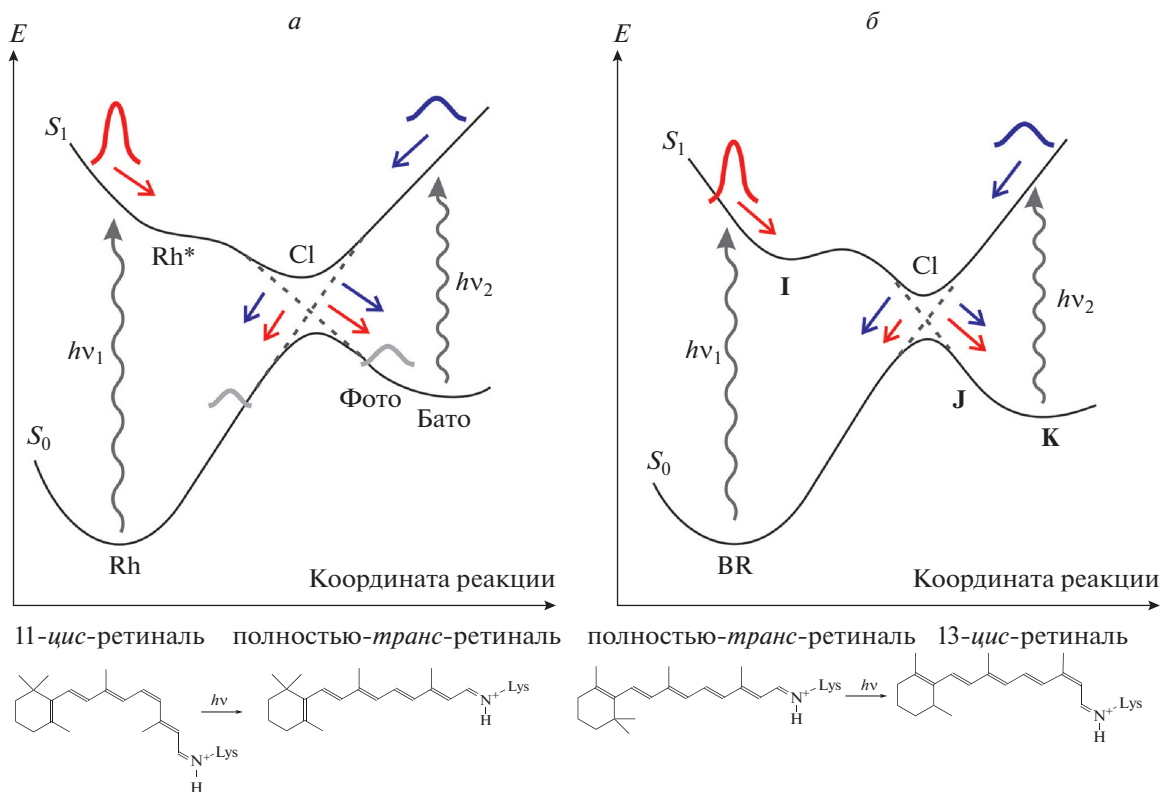


Рис. 3. Строение поверхностей потенциальной энергии родопсинов II типа на примере Rh (а) и I типа на примере BR (б), показывающее реакционный путь их прямой и обратной фотореакций в фемто- и пикосекундном временных диапазонах. На рисунке также представлено строение 11-цис-, 13-цис- и полностью-транс-ретиная в составе молекул Rh (а) и BR (б).

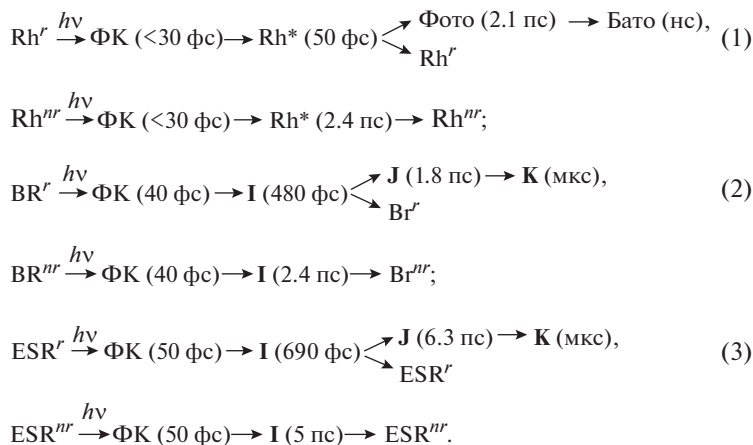


Рис. 4. Схемы элементарной реакции фотоизомеризации в родопсине II типа – Rh (1), и в родопсинах I типа – BR (2) и ESR (3). На схемах представлены реакционные (индекс “r”) и нереакционные (индекс “nr”) пути распада возбужденного состояния. В круглых скобках приведены времена жизни промежуточных состояний.

по динамике исчезновения флуоресценции, которая характеризуется двумя временами в фемто- и пикосекундном диапазонах [33]. Время жизни и вклад этого состояния были оценены нами в 2.4 пс/4% (рис. 4, реакция (1)).

Соотношение процессов изомеризации и релаксации в исходное состояние определяет квантовый выход 11-цис $\rightarrow$ полностью-транс и полностью-транс $\rightarrow$ 13-цис-фототизомеризации ретиная в Rh и микробальных родопсинах соответствен-

но. Квантовые выходы этой реакции довольно высоки и составляют $\phi(\text{Rh} \rightarrow \text{Бато}) = 0.65$ [7] и $\phi(\text{BR} \rightarrow \text{К}) = 0.64$ [34, 35].

Таким образом, несмотря на общую схему, которая может быть применена для описания фотореакции всех исследованных родопсинов (рис. 4), фотореакция Rh имеет значительное отличие от микробиальных родопсинов. Это — безбарьерный переход через CI, осуществляемый с высокой скоростью и высокой степенью когерентности реакционных колебательных мод.

Можно заключить, что динамика фотохимической реакции родопсинов I и II типа напрямую связана с изомерной формой их хромофоров. Так, фотореакция 11-*цис*-ретиная в газовой фазе, когда нет влияния окружения, протекает безбарьерно в фемтосекундном диапазоне времени (400 фс), в то время как фотореакция полностью-*транс*-ретиная из-за небольшого барьера на S_1 -ППЭ — в пикосекундном диапазоне времени (3 пс) [21]. В хромоформном центре белковой части молекулы взаимодействие ретиналя с ближайшими аминокислотными остатками существенно ускоряет реакцию фотоизомеризации и исключает образование альтернативных продуктов. Также белковое окружение ретиналя меняет структуру CI, намного увеличивая вероятность перехода родопсина в продукт фотореакции, по сравнению с возвращением в исходное состояние, как это было показано методами QM/MM на примере Rh [36].

Как видно из рис. 3, представление элементарного акта процесса изомеризации как прохождения через CI предполагает возможность обратных фотореакций с изомеризацией ретиналя: полностью-*транс* (Бато) $\rightarrow$ 11-*цис* (Rh) и 13-*цис* (интермедиат К) $\rightarrow$ полностью-*транс* (BR). Нами была показана возможность таких переходов, инициированных в раннем пикосекундном диапазоне времени, а также оценен их квантовый выход [17, 20, 23]. С этой целью были проведены эксперименты методом трехимпульсной фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии. Первый импульс действия (actinic) с длиной волны поглощения ретиналя в соответствующем родопсине запускал реакцию изомеризации. После образования продукта изомеризации (Бато в случае Rh и интермедиата К в случае BR) подавался второй импульс накачки, спектрально настроенный на длину волны поглощения этого состояния. Этот второй импульс инициировал обратную фотореакцию. Третий, спектрально широкий импульс белого континуума позволял измерить количество перешедшего в исходное состояние ретиналя и, таким образом, оценить квантовые выходы в Rh и BR: в случае зрительного родопсина $\phi(\text{Бато} \rightarrow \text{Rh}) = 0.15$ [17, 20], и в случае бактериородопсина — $\phi(\text{К} \rightarrow \text{BR}) = 0.81$ [20].

Как можно объяснить значительно меньшую эффективность обратной фотореакции зрительного родопсина по сравнению с бактериальным, при том, что квантовые выходы прямой фотореакции у них практически совпадают, несмотря на различия в S_1 -ППЭ возбужденного состояния этих белков? Одно из возможных объяснений состоит в том, что изомеризация полностью-*транс*-ретиная в 11-*цис*-форму затруднена по сравнению с изомеризацией 11-*цис*- $\rightarrow$ полностью-*транс*-ретиная. Причем квантовый выход перехода полностью-*транс*- $\rightarrow$ 13-*цис*-ретиная выше, чем полностью-*транс*- $\rightarrow$ 11-*цис*-ретиная, как это показано в работе [37]. Но в Rh образование 13-*цис*-ретиная в результате обратной фотореакции маловероятно, поскольку хромоформный центр Rh способен “воспринять” в качестве хромоформной группы именно 11-*цис*-ретиная. Иными словами, эффективность обратной фотохимической реакции Rh и BR также связана как с характеристиками полностью-*транс*- и 13-*цис*-ретиналей, соответственно, так и с влиянием белкового окружения. Меньшая эффективность обратной фотореакции Rh, повышающая таким образом надежность прямой фотореакции, может рассматриваться как один из аргументов в пользу отбора в ходе конвергентной эволюции 11-*цис*-изомера в качестве хромоформной группы всех зрительных пигментов беспозвоночных и позвоночных животных.

Еще одним преимуществом 11-*цис* изомерной формы ретиналя в качестве хромоформной группы животных родопсинов как G-белок-связывающих рецепторов является то, что 11-*цис*-ретиная является мощным лигандом-антагонистом. Благодаря этому, будучи в 11-*цис*-форме, он препятствует темновой активации молекулы. А это — принципиально важное условие — поддерживать низкий тепловой “темновой шум” фоторецепторной клетки, что необходимо для ее работы в условиях низких освещенностей. В то же время фотоизомеризованный полностью-*транс*-ретиная действует в долгоживущем продукте фотоллиза родопсина — метародопсине II, как мощный агонист, способствующий запуску процесса фототрансдукции. Представляется очевидным, что фотобиологический механизм преобразования света в информационный процесс в эволюционно более “молодых” зрительных родопсинах (родопсины II типа) должен быть надежнее, нежели механизм преобразования света в фотоэнергетический процесс в эволюционно более “древних” микробиальных родопсинах (родопсины I типа).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фемтосекундная лазерная спектроскопия позволяет в определенной мере понять роль белка в контроле фотоизомеризации хромофора родоп-

сина – ретиналя. Асимметричное окружение ретиналя в реакционном состоянии опсина способствует быстрому достижению области СИ и прохождению этой области в когерентном режиме с образованием первичного продукта изомеризации. Напротив, в газовой фазе этот процесс происходит значительно медленнее и с меньшим квантовым выходом [21, 36]. На особую роль белкового окружения ретиналя в протекании первичных реакций указывает гетерогенность динамики возбужденного состояния в случае микробиальных родопсинов, которая выявляется методами фемтосекундной спектроскопии. Такая гетерогенность обусловлена, по-видимому, гетерогенностью начального состояния белка, определяемой аминокислотным окружением ретиналя. Это, вероятно, является причиной нескольких параллельных, фотоактивируемых процессов, некоторые из которых проходят через так называемые нереакционные возбужденные состояния, не ведущие к изомеризации ретиналя. Различия же в динамике первичных фотохимических реакций родопсинов I и II типов можно объяснить разными исходными изомерными формами их хромофоров (полностью-*транс*- и 11-*цис*-ретиналь соответственно), а также влиянием белкового окружения на хромофор, которое может быть гетерогенным.

Эволюционное происхождение родопсинов I и II типов остается предметом дискуссий. Считается, что родопсины I типа (например, BR) появились одновременно с возникновением биосферы Земли около 3 млрд лет назад, а родопсины II типа – G-белок-связывающие рецепторы – около 1 млрд лет назад (подробнее см. [22]). Скорее всего, они могли возникнуть независимо, в результате конвергентной эволюции. В ходе такой независимой эволюции несколько различными стали хромофорные центры, внутримолекулярный механизм взаимодействия ретиналя с ближайшим белковым окружением и изомерная форма хромофорной группы. В зрительном родопсине это проявляется в более быстром переходе ретиналя из электронно-возбужденного состояния в продукты фотоизомеризации и в меньшей вероятности – в обратной фотореакции. Для зрительных родопсинов как фотоинформационных белков, по сравнению с микробиальными как в основном фотоэнергетическими, такого рода различия могут иметь функциональный смысл, повышая надежность и эффективность прямой реакции изомеризации 11-*цис*-ретиналя, запускающей процесс фототрансдукции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2020-795, внутренний номер 13.1902.21.0027).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tahara S., Singh M., Kuramochi H. et al. // J. Phys. Chem. B. 2019. V. 123. № 11. P. 2507; <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b00887>
2. Mukherjee S., Hegemann P., Broser M. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2019. V. 57. P. 118; <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.02.003>
3. Ikuta T., Shihoya W., Sugiura M.E. et al. // BioRxiv preprint. 2020; <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.04064>
4. Ernst O.P., Lodowski D.T., Elstner M. et al. // Chem. Rev. 2014. V. 114. P. 126; <https://doi.org/10.1021/cr4003769>
5. Hubbard R., Wald G. // J. Gen. Physiol. 1952. V. 36. P. 269; <https://doi.org/10.1085/jgp.36.2.269>
6. Schoenlein R.W., Peteanu L.A., Mathies R.A. et al. // Science. New Series. 1991. V. 254. P. 412; <https://doi.org/10.1126/science.1925597>
7. Kim J.E., Tauber M.J., Mathies R.A. // Biochemistry. 2001. V. 40. № 46. P. 13774; <https://doi.org/10.1021/bi0116137>
8. Garavelli M., Vreven T., Celani P. et al. // J. Amer. Chem. Soc. 1998. V. 120. P. 1285; <https://doi.org/10.1021/ja972695i>
9. Hahn S., Stock G. // J. Phys. Chem. B. 2000. V. 104. P. 1146; <https://doi.org/10.1021/jp992939g>
10. Островский М.А., Фельдман Т.Б. // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 11. С. 1071.
11. Mathies R.A. // Nature Chem. 2015. V. 7. P. 945; <https://doi.org/10.1038/nchem.2406>
12. Li J., Edwards P.C., Burghammer M. // J. Mol. Biol. 2004. V. 343. № 5. P. 1409; <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.090>
13. Polli D., Altoè P., Weingart O. et al. // Nature. 2010. V. 467. P. 440; <https://doi.org/10.1038/nature09346>
14. Смитиенко О.А., Шелаев И.В., Гостев Ф.Е. и др. // ДАН. 2008. Т. 421. № 2. С. 277.
15. Смитиенко О.А., Мозговая М.Н., Шелаев И.В. и др. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 1. С. 34.
16. Надточенко В.А., Смитиенко О.А., Фельдман Т.Б. и др. // ДАН. 2012. Т. 446. № 4. С. 460.
17. Smitienko O., Nadtochenko V., Feldman T. et al. // Molecules. 2014. V. 19. P. 18351; <https://doi.org/10.3390/molecules191118351>
18. Yabushita A., Kobayashi T., Tsuda M. // J. Phys. Chem. B. 2012. V. 116. № 6. P. 1920; <https://doi.org/10.1021/jp209356s>
19. Kobayashi T., Saito T., Ohtani H. // Nature. 2001. V. 414. № 6863. P. 531; <https://doi.org/10.1038/35107042>
20. Feldman T.B., Smitienko O.A., Shelaev I.V. et al. // J. Photochem. Photobiol., B. 2016. V. 164. P. 296; <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.09.041>

21. Kiefer H.V., Gruber E., Langeland J. et al. // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 1210;
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09225-7>
22. Островский М.А. // Палеонтологический журн. 2017. Т. 51. № 5. С. 103.
23. Мозговая М.Н., Смитиенко О.А., Шелаев И.В. и др. // ДАН. 2010. Т. 435. № 2. С. 262.
24. Шелаев И.В., Мозговая М.Н., Смитиенко О.А. и др. // Хим. физика. 2014. Т. 33. № 7. С. 39.
25. Smitienko O., Nadtochenko V., Feldman T. et al. // MSSMBS-2014 and DSCMBS-2014 Intern. Workshops "Molecular Simulation Studies in Material and Biological Research". N.Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2015. P. 29.
26. Смитиенко О.А., Некрасова О.В., Кудрявцев А.В. и др. // Биохимия. 2017. Т. 82. № 4. С. 664.
27. Smitienko O.A., Feldman T.B., Petrovskaya L.E. et al. // J. Phys. Chem. B. 2020 (in press).
28. Rodrigues D.F., Ivanova N., He Z. et al. // BMC Genom. 2008. V. 9. P. 547;
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-547>
29. Wang Q., Shoenlein R.W., Peteanu L.A. et al. // Science. 1994. V. 266. № 5184. P. 422;
<https://doi.org/10.1126/science.7939680>
30. Johnson P.J.M., Halpin A., Morizumi T. et al. // Nature Chem. 2015. V. 7. P. 980;
<https://doi.org/10.1038/NCHEM.2398>
31. Hou B., Friedman N., Ottolenghi M. et al. // Chem. Phys. Lett. 2003. V. 381. P. 549;
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2003.10.038>
32. Johnson P.J.M., Halpin A., Morizumi T. et al. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2014. V. 16. P. 21310;
<https://doi.org/10.1039/C4CP01826E>
33. Kandori H., Furutani Y., Nishimura S. et al. // Chem. Phys. Lett. 2001. V. 334. P. 271;
[https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(00\)01457-3](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(00)01457-3)
34. Govindjee R., Balashov S.P., Ebrey T.G. // Biophys. J. 1990. V. 58. P. 597;
[https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(90\)82403-6](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(90)82403-6)
35. Tittor J., Oesterhelt D. // FEBS Lett. 1990. V. 263. P. 269;
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81390-A](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81390-A)
36. Coto P.B., Strambi A., Olivucci M. // Chem. Phys. 2008. V. 347. P. 483;
<https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2008.03.035>
37. Liu R.S.H., Hammond G.S. // Photochem. Photobiol. Sci. 2003. V. 2. P. 835;
<https://doi.org/10.1039/B304027E>