

ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЕ ПРОЦЕССЫ И РЕАКЦИОННАЯ ДИНАМИКА БАКТЕРИОРОДОПСИНА

© 2015 г. Е.Л. Терпугов, О.В. Дегтярева

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пуцино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: olga_degt@mail.ru

Поступила в редакцию 28.01.15 г.

В последние годы накоплено большое количество информации о структуре и динамических свойствах бактериородопсина на атомном уровне с большим временным и пространственным разрешением, которая обобщена во многих обзорах. В обзоре рассмотрены последние достижения в наблюдении фотоиндуцированного поведения бактериородопсина и понимании все еще неясных механизмов ретиналь-белковых взаимодействий. Обсуждаются собственные новые спектроскопические данные, полученные на бактериородопсине дикого типа и на модельных соединениях аминокислот с помощью эмиссионной ИК-Фурье-спектроскопии и спектроскопии в УФ-видимой области. Основываясь на характеристиках структуры и оптических свойствах глицина и лизина, моделирующих фотозависимое поведение опсина в естественных условиях, авторы пытаются найти ответ на один из наиболее важных вопросов, касающихся роли белка в первичных процессах.

Ключевые слова: бактериородопсин, глицин, L-лизин, фотоактивация аминокислот, стимулированная ИК-эмиссия, эмиссионная ИК-Фурье-спектроскопия.

Открытый в 1971-м году фоточувствительный белок архебактерий *Halobacterium salinarum*, бактериородопсин (БР), относится к семи-членным α -спиральным мембранным белкам, функционирующим как протонная помпа и выполняющим такие биологические функции, как зрение, фототаксис и фотосинтез [1]. Протонная помпа запускается реакцией *полностью-транс-13-цис*-изомеризацией, которую можно отследить с помощью адсорбционной спектроскопии через образование промежуточных состояний, называемых интермедиатами К, L, М, N и О [2,3]. Реакция фотоизомеризации происходит на временной шкале меньше чем несколько пикосекунд и приводит белок к метастабильному состоянию (К-интермедиат), запасенная энергия которого в последующем утилизируется в серии термально запускаемых переходов (К \rightarrow L \rightarrow М \rightarrow N \rightarrow О \rightarrow БР) для достижения специфической функции намного более длительной (~15–20 мс) временной шкале.

Бактериородопсин является одним из самых изученных на сегодняшний день мембранных белков. Он является одним из тех немногих, для которых проведен детальный структурный и спектральный анализ микросекундных интер-

медиатов. В последние годы появился ряд обзорных статей [4–6], в которых отображены итоги и прогресс, достигнутый в отслеживании и понимании биологической активности белка на атомном уровне с очень высоким пространственным разрешением.

В настоящее время вполне доказано, что существенной чертой процесса активного переноса протона является фотоизомеризация хромофора в фотохимическом цикле и хромофор непосредственно участвует в переносе протона, инициируя цепь превращений в БР. Из большого числа накопленных данных следует, что протонный насос включает в себя несколько стадий:

- перенос протона от основания Шиффа на аспартат Asp85 на L \rightarrow M-переходе;

- выделение протона из комплекса, содержащего глутаминовые остатки Glu194 – Glu204 (так называемый «протонвыделяющий комплекс»);

- перенос протона от Asp96 на основание Шиффа;

- перенос протона из цитоплазмы на Asp96 происходит при переходе из N в О.

Перенос протона от Asp85 на протонвыделяющий комплекс происходит при переходе от О к БР.

Сокращения: БР – бактериородопсин, ШО – основание Шиффа, ЖК – жидкие кристаллы, ПШО – протонированное ШО.

При перемещении протона в одном направлении энергия света, запасенная на стадии образования К-формы, распределяется на несколько стадий, что обеспечивает регуляцию сродства основания Шиффа (ШО), Asp85 и Asp96 к протону. Реакция изомеризации – переход *из полностью-транс-* в *13-цис-*конформацию – является ключевой в функционировании БР. Она является тем самым триггером, который запускает фотоцикл и собственно обуславливает все последующие структурные преобразования в белке.

Совсем недавно казалось, что рассмотренный выше сценарий функционирования БР как протонной помпы является завершенным и область исследований, связанных с бактериородопсином, практически исчерпана [4–6]. Необходимо было определить лишь уточняющие детали в работе БР, касающиеся времени сверхбыстрой изомеризации и взаимодействия изомеризации с другими сверхбыстрыми процессами, которые были слабо изученными и не позволяли построить единую, не противоречивую реакционную модель. Для решения этой задачи требовалась разработка новых подходов и методов с более высокой чувствительностью и более высоким временным и пространственным разрешением.

В этот период часть исследователей сосредоточилась на поиске новых систем, которые могли содержать белки, подобные БР. В результате близкородственные архейным родопсинам белки были обнаружены в грибах (*Eucarya*), зубактериях (*Bacteria*) в морском планктоне [7–10]. Оказалось, что фотоциклы новых ретинальсодержащих белков являются сходными с фотоциклом БР дикого типа. Хотя в грибах ретинальсодержащий белок выполняет сенсорную функцию, то в биопланктоне он функционирует как протонная помпа. Эти открытия привели к переосмысливанию роли архейных родопсинов (бактериородопсин, галородопсин, сенсорные родопсины I и II), которые, как до недавнего времени полагали, могут выступать в роли источников энергии и фоторецепторов только у узкой группы видов. Открытие же ретинальсодержащих белков у видов, принадлежащих к разным таксонам, показало, что эти белки, будучи ответственными за утилизацию солнечной энергии, могут оказаться важной компонентой всей земной биосферы.

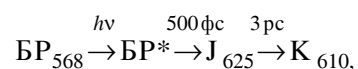
Исследования сверхбыстрой электронной и структурной динамики были продолжены, как только стали доступны лазеры с субпикосекундной длительностью импульса. Результаты последних исследований с использованием сверхбыстрой спектроскопии ретинальсодержащих

белков регулярно рассматриваются в обзорных статьях [11–14]. В данном обзоре в центре внимания находятся достижения, касающиеся понимания механизмов фотоактивации белка и хромофор-белковых взаимодействий, которые остаются все еще слабо понятными. Исходя из особенностей строения и электро-оптических свойств БР, мы пытались найти ответ на один из наиболее важных вопросов, касающихся роли белка в первичных процессах и механизмов, которые могут активировать первичные структурные перестройки в белке.

РАННИЕ СОБЫТИЯ В ФОТОЦИКЛЕ БАКТЕРИОРОДОПСИНА И МОДЕЛИ ПЕРВИЧНЫХ РЕАКЦИЙ

Первоначальные события в фотоцикле задают направление, выход и временную шкалу (от фемто- до пикосекунд) реакции изомеризации [15–19]. Хотя в большинстве полученных данных существует совпадение по наблюдаемым константам первичных реакций, основные споры ведутся по вопросам, связанным с вовлечением в фотодинамику элементарных внутри- и межмолекулярных процессов и, соответственно, связанных с этими процессами реакционными схемами и молекулярными моделями реакций изомеризации (подробно см. обзоры [11–13] и ссылки в них).

Превалирующая модель ранних реакций ретинальсодержащих белков предполагала схему с одномерным профилем потенциальной энергии и эффективной реакционной координатой, связанной с изменением угла поворота вокруг критической двойной СС-связи, упрощенная схема которой выглядит следующим образом:



где БР_{568} соответствует исходному светоадаптированному состоянию БР с *полностью-транс-*изомером ретиналя, БР^* – состояние Франка-Кондона в электронном возбужденном состоянии, J_{625} и K_{610} – два интермедиата основного электронного состояния.

Согласно этой модели $\text{J}_{625} \rightarrow \text{K}_{590}$ переход содержит в себе два процесса – колебательную релаксацию (так называемое колебательное «охлаждение») и последующие конформационные изменения [20]. На начальном этапе возбуждения хромофора происходит перегруппировка ядер, которая включает в себя торсионное движение по направлению к наиболее подвижному состоянию, приводящее к тому, что хромофор в возбужденном состоянии частично ($\sim 90^\circ$) закручивается относительно координаты

$S_{13}=S_{14}$) [21]. Из возбужденного электронного состояния (BR^*) помимо флуоресценции совершается переход в основное состояние по двум путям: с образованием батопродукта – изомеризованного J_{625} интермедиата и, соответственно, путь, по которому возбужденная молекула возвращается в исходное, неизомеризованное состояние BR_{568} . При этом предполагается, что в J_{625} состоянии 13-цис-изомеризация завершается и хромофор закручен уже на $\sim 180^\circ$. Таким образом, инициация *полностью-транс* \rightarrow 13-цис-изомеризации считается самым первым следствием поглощения света.

Однако улучшенное временное разрешение в кинетических экспериментах показало, что происходит активация не только торсионного, но и высокочастотного, связанного с растяжением валентной $C=C$ -связи колебания, что привело к появлению модели двух состояний/двух мод [22]. Доминирующее положение в этой модели занимает предположение об изменении порядка $C=C$ -связи, которое связано с $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходом. Активация двух мод происходит на разной временной шкале: релаксация возбужденного состояния акцептирующей $C=C$ -моды происходит за первые 50 фс, тогда как связанное с первоначальным растяжением длины $C=C$ -связи торсионное движение занимает 0,4–0,5 пс [23]. Эта модель дает самое простое описание изомеризационного процесса, и в настоящее время она наиболее широко принята и используется не только в теоретических подходах квантовой химии, но также для интерпретации экспериментальных данных в электронных и колебательных спектрах.

Последующие эксперименты с использованием методов резонансного комбинационного рассеяния и спектроскопии когерентного антистоксова рассеяния света представили веские доказательства важности колебаний метильных групп (так называемые НООР-колебания) в течение времени жизни возбужденных состояний [24–26], что привело к уточнению рассмотренной выше модели и появлению улучшенной модели двух состояний/трех мод. Интересно, что новые изомеризационные модели, рассматривающие участие двух или трех состояний, одной или нескольких колебательных мод, не привнесли особой ясности в вопрос, касающийся первичности и времени изомеризации. В настоящее время активно дискутируется вопрос, когда происходит изомеризация или точнее, протекает ли фотоизомеризация BR в фемтосекундном диапазоне или нет?

Чрезвычайно быстрый (~ 100 фс) распад состояния Франка–Кондона с образованием флуоресцирующего промежуточного I_{460} состояния

выявили уже первые лазерные эксперименты с фемтосекундным временным разрешением [27–29]. Хотя перепроверка сверхбыстрой динамики в BR , проведенная с улучшенным временным разрешением подтвердила результаты этих ранних исследований, она выявила ряд новых и неожиданных фактов, которые привели к ревизии существующих моделей. Кинетические эксперименты с субпикосекундным временным разрешением показали, что первичная динамика в BR дикого типа и искусственных пигментах с реконструированным неизомеризующимся ретиналом ($BR-5.12$ и $BR-5.13$), у которых блокирование «критической» связи $S_{13}=S_{14}$ предотвращало образование J- и K-продуктов [30,31], протекает сходным образом. В частности, было обнаружено, что все эти пигменты одинаково поглощали в длинноволновой области при 600 нм и выше и испускали стимулированную флуоресценцию на длине волны 460 нм в одном и том же временном диапазоне. Но согласно логике этих экспериментов в искусственных пигментах простая торсионная изомеризация вокруг $S_{13}=S_{14}$ -связи должна быть исключена из первичной реакционной динамики. Из чего следовало, что в образование возбужденного флуоресцирующего состояния I_{460} вовлечены другие степени свободы, которые одинаково проявлялись в нативном и реконструированных белках. Таким образом, из реакционной динамики было исключено простое закручивание вокруг двойной $S_{13}=S_{14}$ -связи и показано вовлечение в первичную динамику других степеней свободы. Дальнейшие эксперименты и теоретические расчеты подтвердили многомерность реакционной координаты в течение времени жизни возбужденного состояния и показали доминирование связанных между собой $C=C$ -валентных и деформационных колебаний в динамике возбужденного электронного состояния. В этих экспериментах также подтверждалась точка зрения, что первоначальное растяжение $C=C$ -связи скелета ретиналя является первичным событием, которое предшествует его изомеризации, и именно это событие является ключевым свойством изомеризационной модели первичного акта и двух состояний. Другое наблюдение сверхбыстрых кинетических экспериментов, показавшее в отсутствие изомеризации изменение в поглощении на длине волны 600 нм (по которой отслеживают образование J- и K-продуктов), ставило также под сомнение вопрос о характере J-продукта как продукта основного электронного состояния BR [12,32,33].

Таким образом, появление новой измерительной техники, позволяющей более детально (с более высоким временным и пространствен-

ным разрешением) проследить события в ретинальных белках, вместо окончательного решения, устраняющего противоречие во временном несоответствии в изомеризационных моделях, поставило ряд совершенно новых вопросов. В настоящее время временное несоответствие – это только часть дискуссии по вопросам динамики возбужденного состояния БР. Наибольшие споры вызывает вопрос о том, является ли изомеризация истинно первичным процессом или она происходит на более поздней стадии фотоцикла БР.

Реальной альтернативой изомеризационному механизму первичного акта является механизм сдвига электронной плотности и делокализация заряда в ретинале в возбужденном состоянии. Согласно этой модели диэлектрический ответ белка, а не фотоизомеризация ретиналя, может быть первичным светоиндуцированным событием, который может запускать последующие структурные изменения на более поздней временной шкале. Поляризация изменяет высоту энергетического барьера ретиналя и, таким образом, облегчает его продвижение вдоль реакционной координаты. При поглощении света происходит резкий сдвиг электронной плотности в ретинале в направлении от β -ионового кольца к основанию Шиффа. Оценки, сделанные на основании теоретических расчетов и экспериментальных данных, показали, что при действии света изменение дипольного момента ретиналя составляет 15–30 D [34–37]. Это сопоставимо с перемещением электрона вдоль полиеновой цепи на расстояние в 2,6 Å [38]. Сдвиг заряда по длительности является сверхбыстрым, и в настоящее время еще не существует экспериментальных методов, которые смогли бы точно определить момент возникновения напряженности, связанной с этим процессом [39]. Но согласно рассматриваемой модели этот временный зарядовый сдвиг является ключевым компонентом первичных событий, потому что именно он инициирует события, связанные с движением белка, приводящим к изомеризации ретиналя. В результате зарядового сдвига иминная связь становится более отрицательной, и между этой областью хромофора и двумя близлежащими аминокислотными остатками Asp85 и Asp212 устанавливается отталкивательное взаимодействие [38]. Последнее запускает изомеризацию вокруг 13-*цис*-двойной связи хромофора [20,38]. Эта, изначально базирующаяся на теоретических расчетах, точка зрения в последние годы нашла серьезное экспериментальное подтверждение [12,13].

В результате в настоящее время общепризнанным считают только то, что подтвержда-

ется многочисленными теоретическими расчетами и экспериментальными данными – первичное электронное возбуждение хромофора вызывает изменения в порядке C=C-связи и зарядовом распределении вдоль полиеновой цепи [13]. Это способствует растяжению C=C-связи, которое облегчает движение ретиналя по потенциальной поверхности возбужденного электронного состояния. Удлинение C=C-связи является событием, предшествующим изомеризации ретиналя. Очевидно, что торсионная координата изомеризации вокруг двойной связи является только одной из целого ряда координат, которые вовлечены в первичную фотохимию и которые облегчают его специфическую по связи, быструю и эффективную изомеризацию. Число и природа участвующих степеней свободы ядер, их временное развитие и как они связаны друг с другом и с электронными состояниями зависят от специфической формы кривой потенциальной поверхности энергии в основном и возбужденном состояниях и от хромофор-белкового взаимодействия в каждом отдельном белке.

ХРОМОФОР-БЕЛКОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ В БАКТЕРИОРОДОПСИНЕ

Взаимодействие между ретинальным хромофором и его белковым окружением в изомеризационном механизме первичного акта обычно рассматривают в двух разных аспектах, связанных с быстрой и более медленной реакциями белка [15]. Первое – это влияние стерических и электростатических факторов ближайшего к ретиналу белкового окружения на первичную реакцию, т.е. контроль со стороны белка, который обеспечивает избирательность, квантовый выход и временной диапазон первичной реакции. Второе – это запускаемая фотоизомеризацией активация опсина, которая приводит к специфической биологической функции определенного ретинального белка.

Роль внешних зарядов во время жизни возбужденного состояния и их влияние на квантовую эффективность изомеризации хорошо изучены в экспериментах с белком БР дикого типа и мутантах, а также на модельных соединениях – свободных протонированных ШО (ПШО) в растворе [40–42]. Эти данные подтвердили, что динамика БР в возбужденном состоянии не определяется исключительно конформационными изменениями хромофора и зависит также от таких факторов, как движение микроокружения в белке. Под микроокружением подразумевают заряженные или полярные

группы вокруг ретиналя. С помощью генетических замен в БР дикого типа было установлено, что близкорасположенная группа аминокислот из Arg82, Asp85 и Asp212 в большей степени, чем все остальные аминокислоты, влияет на скорость изомеризации внутри белка [43,44]. Роль белка в обеспечении селективности реакции по C13=C14-связи была определена в сравнительных экспериментах на модельных соединениях ПШО в растворе и БР, где было показано, что селективность изомеризационного процесса, вероятнее всего, обусловлена стерическими ограничениями, существующими в окружении ретиналя в «кармане» белковой глобулы, которые вынуждают ретиналь изомеризоваться только по определенной C13=C14-связи.

В настоящее время экспериментальное изучение поведения белка в фотоцикле на сверхбыстрой временной шкале является все еще достаточно сложным [13,39]. В целом, большинство исследователей сходятся в том, что белок, помимо того, что он обеспечивает необходимое запасание энергии, играет между тем более или менее пассивную роль в переносе ионов водорода через плазматическую мембрану. По существу, белок задает лишь подходящую пространственную перегруппировку кофакторов и модулирует их редокс-свойства. Хотя до сих пор неизвестно, какие именно свойства белка катализируют реакцию изомеризации.

При теоретическом рассмотрении свойств белка выделяют инерциальный, диэлектрический ответ белка, который включает в себя сильную поляризацию и последующую за распадом возбужденного состояния ретиналя сильную диэлектрическую релаксацию на временной шкале 100 фс. Помимо диэлектрической релаксации, отмечают важную роль диффузных флуктуаций, которые существуют в основном состоянии и не изменяются при фотовозбуждении, но которые могут контролировать фотоизомеризацию ретиналя. Изменение длины связей ретиналя при возбуждении уменьшает жесткость скелета ретиналя в возбужденном состоянии. Диффузные крупномасштабные флуктуации белка, которые не оказывают существенного влияния на жесткую структуру в основном невозбужденном состоянии могут подталкивать ретиналь к 13-цис-форме в возбужденном состоянии, когда жесткость структуры ретиналя сильно снижена. Основным условием для изомеризации является то, что 13-цис-конфигурация хорошо вписывается в соответствующее белковое окружение. По такому сценарию фотоизомеризация ретиналя не создает стерических ограничений в белковом окружении, ко-

торые часто рассматриваются в качестве движущих сил для конформационных изменений в белке. Наоборот, изомеризация ретиналя должна скорее служить для того, чтобы разрывать водородные связи вокруг ретиналя, обеспечивая функционально важные изменения в белке.

Однако первая экспериментальная проверка показала, что опсин в БР не проявляет какого-либо движения диффузного типа на субпикосекундной временной шкале, что связывали с ковалентными напряжениями и полимерной природой белка. Эти результаты послужили заключению о том, что основные структурные перестройки белка не происходят на временной шкале фотоизомеризации ретиналя [45]. Но последующие эксперименты с улучшенным временным разрешением, напротив, показали, что самые быстрые движения белок совершает уже на субпикосекундной временной шкале [46,47]. В частности, с помощью сверхкоротких импульсных ИК-лазеров были впервые идентифицированы движения белка в средней ИК-области на субпикосекундной временной шкале. Эти изменения наблюдали в спектрах ИК-поглощения в области колебаний Амид I и Амид II на временах 0,3 и 3 пс соответственно [46,47]. Отметим, что изменения в средней ИК-области (в интервале 3000–1800 см⁻¹) были ранее зарегистрированы в нано- и микросекундном временном диапазоне. Эти изменения, зарегистрированные в пределах временного разрешения техники, связывают с движением молекул связанной воды и водных кластеров [48].

С помощью импульсных УФ-лазеров была обнаружена динамика белка в течение первых 200 фс после возбуждения. Эти сверхбыстрые изменения наблюдали при длине волны 280 нм, где обычно поглощают ароматические аминокислоты. Из всех аминокислот, как известно, в ближней УФ-области между 265 и 280 нм поглощают только три аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан), которые имеют в своей структуре бензольное кольцо с системой сопряженных двойных связей. Максимум длины волны тирозина и триптофана находится возле 280 нм. Коэффициент поглощения триптофана выше, чем у тирозина и фенилаланина, который поглощает на длине волны 260 нм. Исходя из этих соображений и того факта, что ПШО поглощает в той же самой ближней УФ-области, было сделано предположение о появлении раннего отклика на 280 нм в результате экситонного взаимодействия между близкорасположенным к ретиналю триптофановым остатком и ПШО [49–51]. Перепроверка этих фактов с

помощью варьирования техники «накачки–зондирования» на образцах БР дикого типа и на мутантах подтвердила влияние генетических замен в местах расположения триптофановых остатков на динамику раннего УФ-отклика БР не только в области 280 нм, но и в более длинноволновой области между 305–315 нм [14,49–51]. Теоретическое моделирование показало, что длинноволновый сдвиг в спектрах УФ-поглощения связан с наличием диполь-дипольного взаимодействия между возбужденным ретиналем и близкорасположенными триптофановыми остатками, среди которых Trp86 вносит наибольший вклад [14].

Таким образом, сверхскоростные кинетические измерения в ближней УФ- и средней ИК-областях показали, что в самую раннюю динамику БР могут быть вовлечены аминокислоты и водные кластеры, расположенные вблизи ПШО. Связанная вода, как показали последние структурные и спектроскопические исследования, играет ключевую роль в функционировании БР [52–54]. Внутримолекулярные водные кластеры и полярные связи между заряженными или полярными группами могут активироваться посредством взаимодействия с возбужденным ретиналем на временах более коротких, чем время изомеризации ретиналя. Следовательно, электронная поляризация, так же как и связанные с изомеризацией структурные изменения являются двумя фотоактивационными каналами. В таком случае возникает вопрос, каков же механизм, который лежит в основе активации этих структурных изменений в белке? Действительно ли фотовозбуждение ретиналя является единственной причиной активации белка? Может ли происходить фотоактивация белка по механизмам, которые не связаны с движением населенностей электронных уровней ретиналя? Может ли белок играть активную, а не пассивную роль в ион-транспортном механизме? Ответ на эти вопросы мы постарались найти в этой статье.

ЭЛЕКТРО- И ФОТОАКТИВАЦИЯ ОПСИНА

На бактериородопсине еще в 1980-х годах было показано, что электрические поля способны вызывать структурные изменения не только в ретинале, но и в самой белковой глобуле. Такие данные были получены на пурпурных мембранах и апомембранах при воздействии электрического поля напряженностью $E = 2 \cdot 10^5 - 3 \cdot 10^6$ В/м² [55–58]. Проведенные оптоэлектрические измерения в суспензии пурпурных мембран показали, что сильное элек-

трическое поле приводит к изменению оптических свойств в БР на длине волны поглощения хромофора ($\lambda = 565$ нм) и в области 400 нм. Причем вклад от компоненты, поглощающей при 400 нм, иногда был больше, чем от компоненты, поглощающей при 565 нм [55]. Тем самым было показано, что в БР существуют две чувствительные к электрическому полю компоненты – ретиналь и лабильные заряженные или полярные компоненты белковой структуры. Особенно важно, что внешнее поле влияет на электрооптические свойства ретиналя как напрямую, так и через локальную перегруппировку опсиновых групп в окружении ретиналя благодаря электрическим наведенным зарядам в положении различных заряженных, полярных и поляризуемых групп [55]. Таким образом, во взаимодействии БР с электрическим полем определяющую роль играют высокополярные свойства не только ретиналя, но и самой белковой глобулы. Взаимодействие БР с электрическим полем происходит по ориентационному механизму, включающему перемещение заряженных групп, и кооперативные эффекты, обусловленные высокой степенью упорядоченности структуры БР в пурпурных мембранах. Электрические дипольные моменты ориентационных процессов, в особенности наведенных дипольных моментов, являются в белке сравнительно большими. Это обусловлено, с одной стороны, тем, что дипольный момент одной из семи альфа-спиралей является не скомпенсированным противоположно направленным дипольным моментом другой альфа-спирали. С другой стороны, в результате взаимодействия может происходить ионизация боковых групп и/или возникать ориентационные эффекты. Например, структурные и спектроскопические данные показывают, что лизин, аргинин, заряженные СОО-группы аспарагиновой и глутаминовой аминокислот могут формировать ионные пары типа $\text{COO}^- \dots \text{NH}^+$. Такие системы являются сильно поляризуемыми и могут давать дополнительно дипольные моменты до 11 D. Ориентационные изменения в опсине с синхронизированным выстраиванием ионных групп могут затрагивать изменения в моменте перехода ретиналя [55,59].

Интересно, что в сильном электрическом, как и в электромагнитном поле световой волны, БР проявляет циклическую реакционную способность, проходя через ряд промежуточных конформационных состояний. В экспериментах на сухих пленках было показано, что образующиеся при воздействии электрического поля промежуточные состояния имеют большое сходство с интермедиатами фотоцикла БР [56].

Таким образом, было установлено, что в отсутствие поглощения света сильное импульсное электрическое поле способно было не только активировать белок, но и вызывать в БР конформационные переходы. Несмотря на то, что эти эффекты очень важны для понимания механизмов переноса протона в БР, они до сих пор тщательно не исследовались. Согласно распространенным убеждениям в естественных условиях малые напряженности оптических полей не могут оказывать прямого влияния на электрические свойства белка. В основном полагают, что появление при освещении в БР фотонапряжения связано с первоначальным возбуждением и/или фотоизомеризацией ретиналя. Хотя время подъема первоначальной фазы в фотовольтаическом отклике БР еще точно не определено, в работе [59] было показано, что возникновение фотонапряжения происходит за время менее чем 1,68 пс.

Между тем хорошо известно, что мембранные белки по своей структурной организации являются жидкими кристаллами (ЖК) с соответствующей подвижностью скелета и специфических молекулярных остатков и выраженной анизотропией оптических и электрических свойств. Это означает, что слабые световые потоки, так же как и внешние электрические поля, способны вызвать сильную наведенную зарядовую анизотропию и тем самым активировать белок. В настоящее время уже накоплен достаточно большой экспериментальный материал, свидетельствующий о том, что жидкие кристаллы могут достаточно легко переориентироваться относительно слабыми оптическими полями, которые вызывают в них сильную наведенную зарядовую анизотропию и нелинейные оптические эффекты, такие как образование второй или третьей гармоники, стимулированное комбинационное рассеяние и электрооптический эффект Керра [60,61]. При взаимодействии со светом в жидких кристаллах возникают высокие напряженности электрических полей, которые на несколько порядков превышают таковые в обычных материалах. Показано, что оптическое излучение мощностью в несколько милливольт создает в жидких кристаллах электрическое поле пространственного заряда величиной более 10^5 В/м [61]. Следовательно, электрическое поле световой волны так же, как и внешнее электрическое импульсное поле, может взаимодействовать не только с ретиналем, но и с его высоко структурно- и электроанизотропной опсиновой частью, активируя ее посредством полярных эффектов и ориентационных механизмов.

ФОТОЗАВИСИМОЕ ПОВЕДЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ В УСЛОВИЯХ ОСВЕЩЕНИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ ВИДИМЫМ СВЕТОМ

С целью определения возможного влияния оптического излучения на физические и химические свойства белка мы провели эксперименты с аминокислотами, моделирующими поведение белка в естественных условиях. Мы публикуем здесь наши последние данные о спектральных свойствах аминокислот L-лизина моногидрохлорида (L-Lys-HCl) и глицина в ближней УФ-, видимой и средней ИК-области.

Прежде всего, наши эксперименты показали, что аминокислоты, входящие в состав опсиновой части БР, способны самоорганизовываться в растворах в сложные структуры самопроизвольно и индуцировано под действием низкоинтенсивного оптического света [62,63].

Спонтанная самоорганизация L-лизина моногидрохлорида и глицина приводит к появлению в спектрах поглощения нового пика при 270–280 нм (см. рис. 1 в [62]). Закономерно, что интенсивность этой полосы увеличивается пропорционально росту концентрации от 0,01 до 1,5 М. Хотя авторы работы [64], впервые обнаружившие это свойство в растворе лизина, полагали, что оно обусловлено уникальной способностью лизина к агрегации в жидкой среде, другие авторы [65], повторившие эти опыты с лизином и другими веществами, установили, что появление 280 нм пика в спектре поглощения может с разной интенсивностью наблюдаться в спектрах других органических веществ и даже неорганических солей (NaCl, KCl и др.). На основании этих данных был сделан вывод о том, что появление пика около 280 нм обусловлено свойствами воды и поверхностными эффектами на границе раздела фаз, а не физико-химическими свойствами исследованных веществ. Однако литературные данные указывают на то, что кристаллы аминокислот (L-Lys-HCl и Gly) так же, как и их растворы, способны поглощать в ближней УФ-области [66], где нет влияния воды и поверхностных эффектов. Следовательно, необычные спектральные свойства обусловлены нековалентными полярными связями и ориентационными взаимодействиями, существующими как в кристаллах, так и водных растворах аминокислот. При освещении может происходить усиление внутри- и межмолекулярного взаимодействия в образцах аминокислот. Действительно, последние наши эксперименты показали, что в случае индуцированного действия света могут наблюдаться необратимые изменения в структуре и свойствах растворов

аминокислот, включая образование агрегатов, димеров и зародышей кристаллов [62]. Об индуцированном действии видимого света на аминокислоты можно было судить на основании спектральных данных и наблюдений с помощью оптической техники, которая позволила обнаружить появление в прозрачных растворах центров окраски и пространственно-ориентированных структур и твердых агрегатов. В спектральных измерениях с помощью адсорбционной и флуоресцентной спектрометрии в ближней УФ- и видимой области было обнаружено одновременное присутствие в растворах различных структурных образований, поглощающих между 310 и 400 нм и излучающих в видимой области. В частности, в спектрах L-Lys-HCl было выявлено как минимум три структурных компонента, поглощающих при 320, 345, 374 нм) и излучающих при 383, 426 и 475 нм (см. рис. 2 в работе [62]). Похожие спектральные свойства были выявлены также в растворе глицина [62] и других органических веществ [64,65].

Ассоциирование молекул аминокислот в сложные молекулярные комплексы, физические и спектральные характеристики которых принципиально отличаются от их мономерных форм, связано с тем, что аминокислоты обладают особыми свойствами, такими, как способность к образованию цвиттерионной структуры ($\text{NH}_3^+ - \text{СНН} - \text{COO}^-$), водородных связей и слабым ван-дер-ваальсовым взаимодействиям, образуя межмолекулярные соединения или сольваты определенного стехиометрического состава, каждый из которых может дать спектр, смещенный относительно главного на определенный небольшой интервал частот [67]. Вода, как растворитель, содержит ОН-группу, которая способна вступать в водородную связь с концевыми имино-, amino- и карбонильными группами аминокислот, образуя различные по составу и ориентации межмолекулярные соединения. Подобные полярные связи и водные кластеры образуются внутри белков. Действительно, структурные и спектроскопические данные показали, что лизин, аргинин, заряженные СОО-группы аспарагиновой и глутаминовой аминокислот формируют в БР ионные пары типа $\text{COO}^- \dots \text{NH}^+$, а также кластеры с участием молекул связанной воды [53,54].

Таким образом, основная картина, которая может сложиться из наших последних экспериментов, это то, что ионные пары типа $\text{COO}^- \dots \text{NH}^+$, а также сложные структурные образования с участием молекул связанной воды и заряженных и/или полярных боковых аминокислотных групп могут существовать в БР как в исходном состоянии, так и образовываться под

действием низкоинтенсивного видимого света. Эти белковые компоненты способны вносить определенный вклад в соответствующие сигналы, выявляемые сверхскоростной динамической спектроскопией на субпико- и пикосекундной временной шкале (см. выше). Вероятно, что подобные полярные и заряженные структуры и/или связи могут участвовать в ИК-эмиссионном отклике БР, которые мы регистрировали ранее с помощью эмиссионной ИК-Фурье-спектроскопии [68,69]. Для того чтобы проверить это, в данной работе проведены ИК-эмиссионные исследования на модельных системах с использованием образцов лизина и глицина в пленке и растворе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные методы, относящиеся к разделу «Фотозависимое поведение аминокислот в условиях освещения низкоинтенсивным видимым светом» описаны в деталях в работе [68]. Данные, опубликованные в разделе «Материалы и методы», получены с помощью ИК-Фурье-спектрофотометра ФС-02 (Россия), снабженного низкотемпературными МСТ-приемниками. Спектры ИК-эмиссии записывали со спектральным разрешением 4 см^{-1} и накоплением 400 сканов. Подробное описание техники и принципов этого метода дано в работах [68–70]. Кратко, многочастотный видимый свет от ксеноновой лампы 100 Вт используется для того, чтобы возбудить эмиссию в средней ИК-области. ИК-эмиссия возникает в результате бигармогического смешивания волн в нелинейной среде с образованием биений на разностных частотах, резонансно взаимодействующих с собственными частотами молекулы БР (см. рис. 1).

Образцы L-лизина моногидрохлорида (L-Lys-HCl) и глицина (Sigma-Aldrich, США) использовали без предварительной очистки. Измерения проводили в пленках и растворах с концентрацией 0,5–1,0 М. Аминокислоты растворяли в деионизованной воде при $\text{pH} \sim 6,8$ и фильтровали через фильтр (Millex[®]CV с размером пор 0,22 мк). Для предотвращения попадания глицериновой смазки с фильтра, последний перед заполнением рабочим раствором несколько раз ополаскивали деионизованной водой. Чистота воды тестирована по величине электропроводимости в 18 МОм.

Пленку получали путем высаживания образца из концентрированного водного раствора на подложку из кремния или CaF_2 . Равномерно распределенный по гладкой поверхности подложки образец высушивали на воздухе при ком-

натной температуре. Толщина слоя лизиновой пленки составляла приблизительно 0,5–1,0 мм.

Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Данные обрабатывали с помощью программы Origin (версия 6.0) и компьютерной программы, входящей в программное обеспечение прибора. Полученные спектры усредняли по данным пяти экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе показано, что в отсутствие поглощения исследуемые образцы аминокислот (в растворе и пленке) были способны под действием низкоинтенсивного видимого света генерировать ИК-излучение с большим набором частот в широкой средней ИК-области между 2300–700 см⁻¹. Анализ спектров показал, что в них содержатся все базовые колебания заряженных COO- и NH₃⁺-групп в соответствующих областях и колебания протонированной COOH-группы в области 1800–1700 см⁻¹ (C=O-валентное колебание) и возле 1260 см⁻¹ (C–O(H)-валентное колебание). Описание колебательных спектров было проведено на основе совпадающих литературных данных [71,72]. Помимо базовых колебаний был выявлен целый ряд деформационных колебаний, включая те, что были расположены в области ниже 1000 см⁻¹. Также в области 1750–800 см⁻¹ были выявлены колебания, типичные для биполярных (+NH₃–CH₂–COO⁻) форм и (+NH₃–CH₂–COO⁻)₂ димеров аминокислот. В высокочастотной области выше 1800 см⁻¹ присутствовал целый ряд колебаний, который мог быть обусловлен молекулами связанной воды или сильноводородосвязанными группами. Протонированная система водородных связей определяется в поглощении по так называемому «континиуму» в широкой спектральной области в среднем ИК-диапазоне между 3000–1850 см⁻¹. Это показано в экспериментальных и теоретических работах модельных систем [73,74].

На рис. 2 представлен спектр ИК-эмиссии раствора L-Lys-HCl в 1700–1000 см⁻¹ области, где расположены наиболее сильные и характеристичные колебания молекулы лизина. Как видно, в спектре присутствуют колебания заряженных групп – карбоксильной группы при 1570 и 1632 см⁻¹ (антисимметричное колебание) и при 1405 см⁻¹ (симметричное колебание) и деформационные NH₃⁺-колебания возле 1599, 1526, 1506 см⁻¹ и при 1138 см⁻¹, колебания CH₂-групп возле 1328, 1350 и 1440 см⁻¹, а также валентные колебания C–O(H)- и C–N-групп, расположенные в области 1160–1090 см⁻¹ и при 1029 см⁻¹ соответственно. Следует отметить

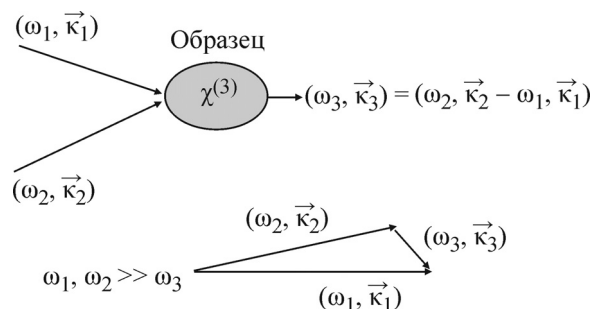


Рис. 1. Схематическое изображение процесса образования ИК-эмиссии путем бигармонического смешивания электромагнитных волн в нелинейной среде при возбуждении многочастотным видимым светом. Обозначения: χ^3 – нелинейная восприимчивость среды третьего порядка; (ω_3, \mathbf{k}_3) разностные частота и волновой вектор, образующиеся при бигармоническом смешивании электромагнитных волн с частотами ω_1 и ω_2 и волновыми векторами \mathbf{k}_1 и \mathbf{k}_2 соответственно.

присутствие в этом спектре двух достаточно интенсивных полос при 1485 и 1665 см⁻¹, которые являются нетипичными для растворов и мономерных форм лизина, но характерны для протон-связанного димера лизина (Lys)₂H⁺ [75]. Этот результат нам представлялся особенно важным, поскольку он свидетельствует о фотоиндуцированном образовании ионных пар в осветленном растворе. Учитывая преобладание в эмиссионном спектре полос, обусловленных полярными O–H...O=C-, (CO)O⁻.... (NH₂)H⁺-, C=O-, N–H-, C–H-связями, можно утверждать, что они играют основную роль в происхождении нелинейного ИК-эмиссионного отклика лизина. Колебания, выявляемые в спектрах в области выше 1800 см⁻¹, указывают на то, что сильноводородосвязанные группы, включая молекулы связанной воды, также участвуют в ИК-эмиссионном отклике, хотя их вклад не столь значителен по сравнению с вкладом от рассмотренных выше заряженных и полярных групп. Аналогичный результат был получен на образцах глицина.

В работе показано, что интенсивность ИК-сигнала квадратично увеличивается с увеличением мощности действующего света (рис. 3). При этом отмечено, что спектры ИК-эмиссии обоих образцов аминокислот проявляют высокую чувствительность к изменению мощности возбуждающего излучения, что хорошо иллюстрируют рис. 4 и 5. Как видно на рис. 4, небольшие изменения в мощности действующего света способны были вызывать заметные изменения (перераспределение интенсивности, сдвиг максимумов полос, появление новых полос) в спектре. Например, полоса при 917 см⁻¹

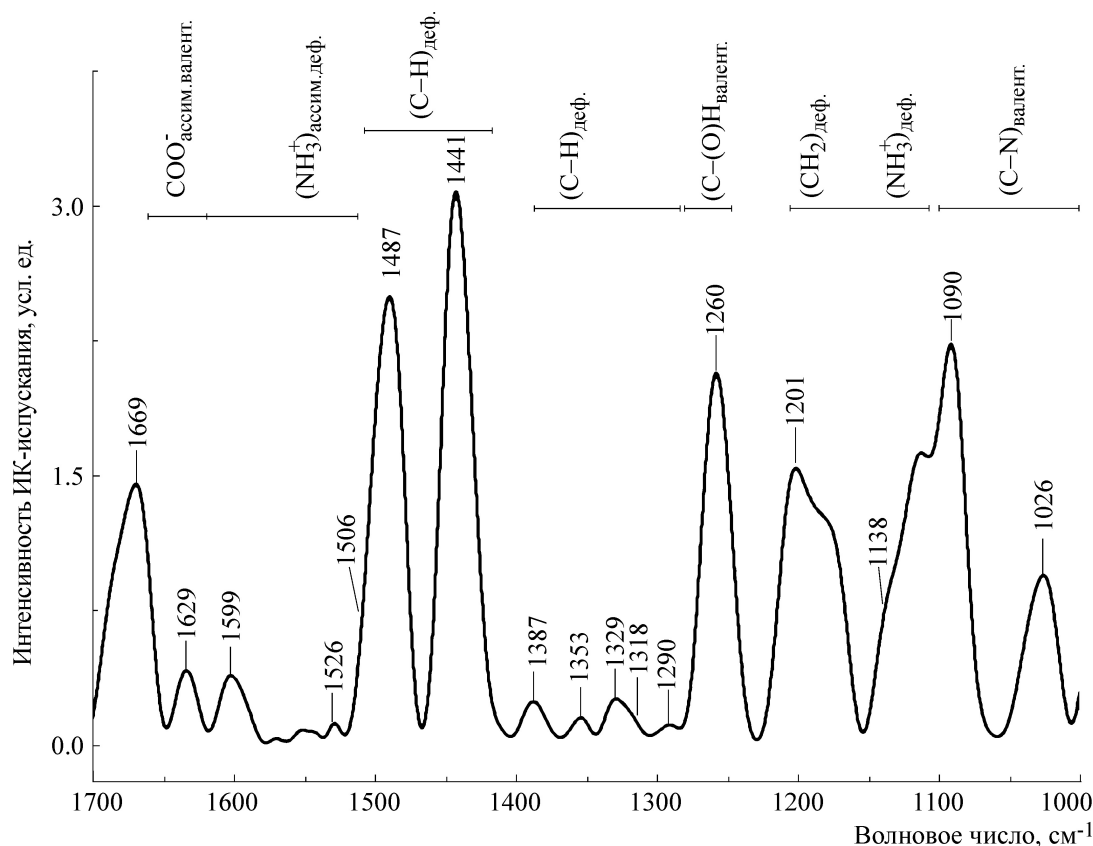


Рис. 2. Спектр ИК-эмиссии 1,0 М раствора L-Lys-HCl, записанный со спектральным разрешением 4 см^{-1} и накоплением 400 сканов при возбуждении видимым светом ($340 < \lambda < 700 \text{ нм}$, 92 мВт).

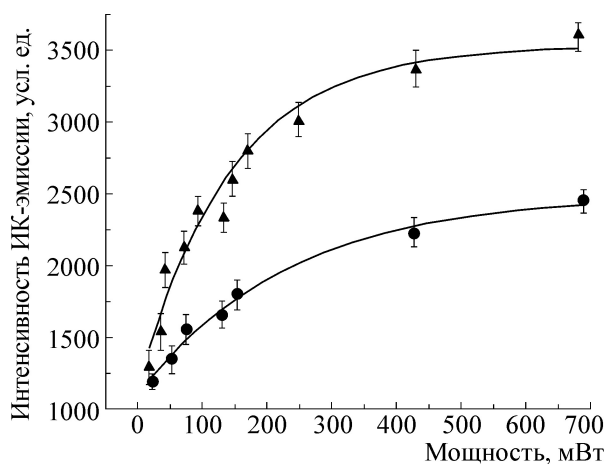


Рис. 3. Зависимость интегрального сигнала ИК-эмиссии L-Lys-HCl от мощности возбуждающего света ($340 < \lambda < 700 \text{ нм}$): треугольники – пленка; кружки – раствор в концентрации 1,0 М.

в спектре, изображенном на рис. 5а, включающая в себя ряд колебаний, в том числе и деформационные колебания СН-групп, претерпела сдвиг максимума на 12 см^{-1} в низкочастотную область. Как известно, на положение

максимума этой полосы влияет характер упаковки пространственных групп в кристалле глицина, что используют для спектрального распознавания чистых α - и γ -форм глицина. Полоса при 892 см^{-1} , которая является другой компонентой сложной полосы между 940 – 880 см^{-1} (см. рис. 5б), испытывала заметные изменения относительной интенсивности. Эта полоса обусловлена колебаниями, обладающими особой чувствительностью к силе водородной связи между заряженными COO^- и NH_3^+ группами в глицине. Очевидно, что наблюдаемые в интервале 960 – 840 см^{-1} изменения в поведении спектральных полос – сдвиг максимума полосы от 917 см^{-1} к 905 см^{-1} и изменение относительного распределения интенсивности между полосой при 892 см^{-1} и другими низкочастотными полосами – отражают изменения в пространственной ориентации подвижных групп и межмолекулярных взаимодействий.

Другая картина представлена на рис. 6а, где увеличение мощности действующего света от 42 мВт до 660 мВ не приводило к перераспределению интенсивности или сдвигу максимумов полос, расположенных в области 1470 –

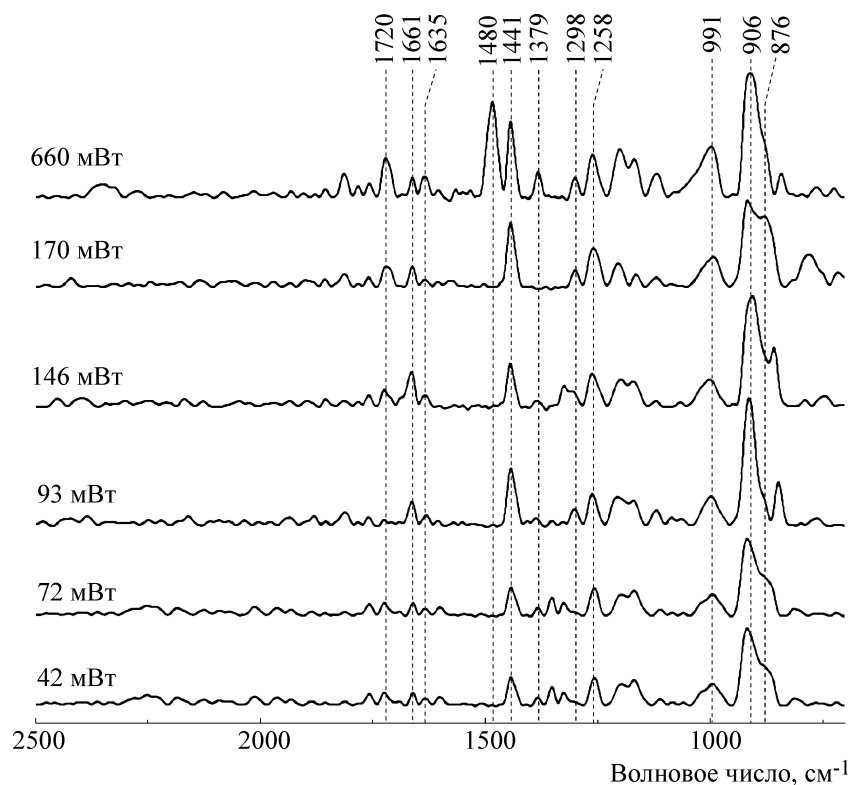


Рис. 4. Спектры ИК-эмиссии пленочного образца глицина в спектральном интервале $2400\text{--}700\text{ см}^{-1}$ в зависимости от мощности возбуждающего света ($340 < \lambda < 700\text{ нм}$).

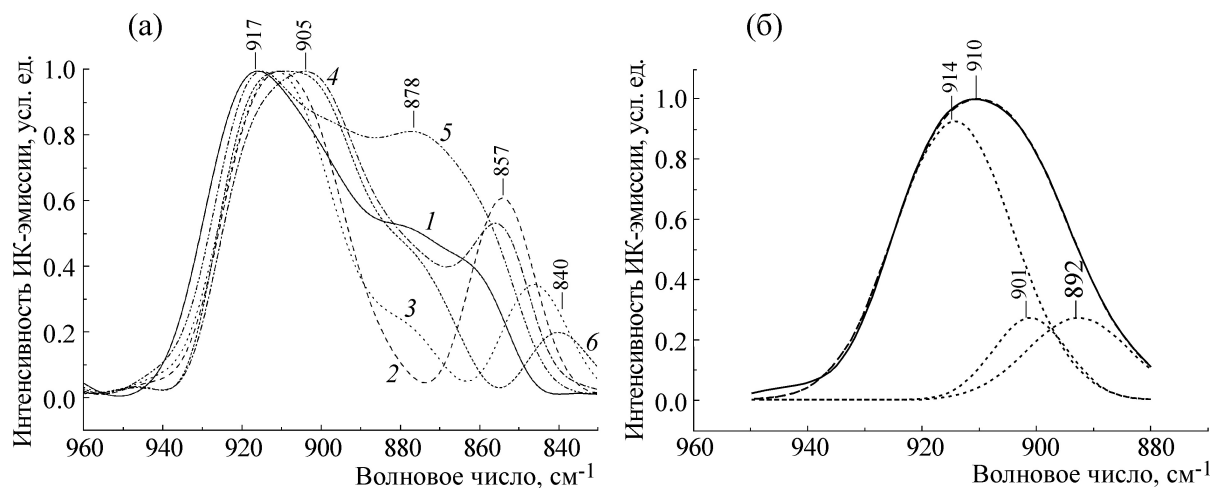


Рис. 5. (а) – Спектр ИК-эмиссии пленочного образца глицина в области $960\text{--}830\text{ см}^{-1}$ при варьировании мощности (мВт): 1 – 42; 2 – 72; 3 – 93; 4 – 146; 5 – 170; 6 – 660. Спектры записаны со спектральным разрешением 4 см^{-1} и накоплением 400 сканов при освещении видимым светом $340 < \lambda < 700\text{ нм}$. Спектры нормированы к максимуму интенсивности полосы при 917 см^{-1} . (б) – Аппроксимация спектра ИК-эмиссии (кривая 2) с компонентами в разложении с помощью приближения Лоренца.

1400 см^{-1} . Как видно на рис. 6б, увеличение мощности возбуждающего света приводило к пропорциональному росту интенсивности сильной полосы при 1446 см^{-1} , обусловленной деформационными колебаниями СН-групп. Од-

нако этот рост носил немонотонный характер, что четко видно на рис. 6б. Такое поведение в большей степени характерно для переориентации связей. Это может означать то, что оптическое излучение вызывает ответ среды, ко-

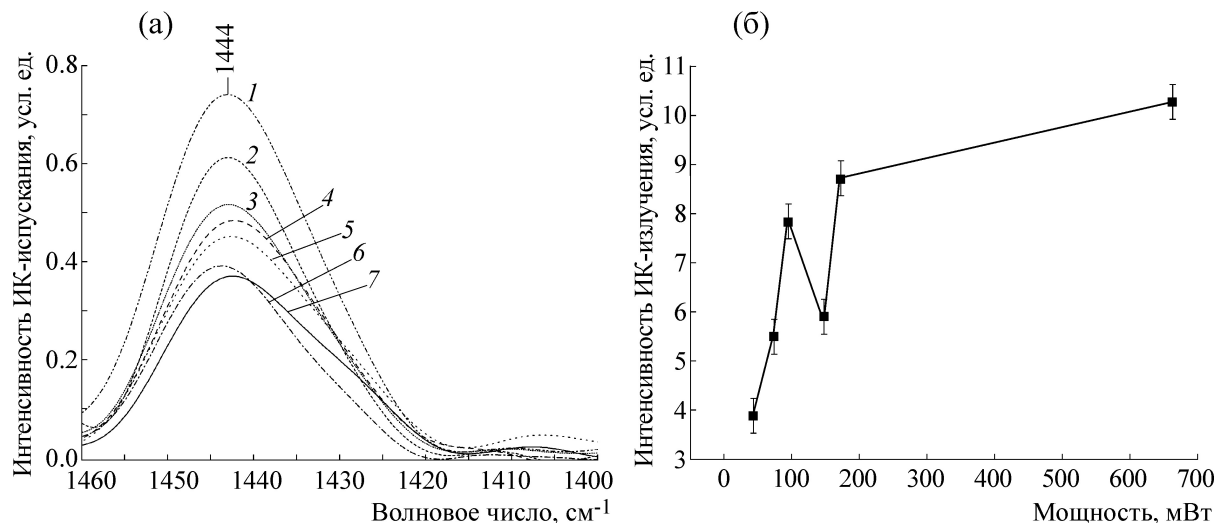


Рис. 6. (а) – Спектр ИК-эмиссии пленочного образца глицина в области $1470\text{--}1400\text{ см}^{-1}$ при варьировании мощности (мВт): 1 – 42; 2 – 72; 3 – 93; 4 – 146; 5 – 170; 6 – 660. Спектры записаны со спектральным разрешением 4 см^{-1} и накоплением 400 сканов при освещении видимым светом $340 < \lambda < 700\text{ нм}$. Спектры нормированы к максимуму интенсивности спектральной полосы при 917 нм . (б) – Зависимость интенсивности в максимуме полосы при 1444 см^{-1} с изменением мощности возбуждающего света от 42 до 660 мВт.

торый в значительной степени зависит от локального поля, действующего на индивидуальный излучатель, а не от среднего макроскопического поля.

Таким образом, представленные результаты позволяют заключить, что видимый свет может напрямую активировать белок не через движение населенностей электронных уровней, а посредством полярных эффектов, включая наведенную зарядовую анизотропию и ориентационные эффекты. Последние играют ключевую роль во взаимодействиях между молекулами, вызывая усиление в связях и структурные перестройки. Пространственное выстраивание анизотропных полярных молекул в опсине может включать ряд механизмов, включая те, которые обуславливают нелинейный показатель преломления, образование третьей гармоники, когерентное антистоксово рассеяние света или вынужденное комбинационное рассеяние света, генерацию ИК-излучения в средней ИК-области. Факт появления последнего был подтвержден неоднократно в наших работах и работах других авторов [36,37,76]. Появление внутри протонпереносящего канала внутренних источников инфракрасного излучения, содержащих в своем составе резонансные частоты, способно дополнительно активировать аминокислоты, переводя их в колебательно-возбужденное состояние. Реакционное состояние и структура аминокислот, как известно, проявляют особую чувствительность к колебательному возбуждению, что позволяет легко преодолевать акти-

вационные барьеры и изменять конформацию молекулы.

Особенно важно отметить, что недавние эксперименты, выполненные с высоким временным разрешением, показали, что возникающее в БР ИК-излучение носит осциллирующий характер [37,77]. Это означает, что внутри протонпереносящего канала в создаваемом наведенными зарядами электрическом поле к силам, определяющим невалентные (поляризационные, дисперсионные и электростатические) взаимодействия, добавляются еще периодические силы, которые могут выступать в роли движущих сил, осуществляющих самосогласование донорно-акцепторных взаимодействий при функционировании БР.

ВЫВОДЫ

В аспекте настоящего исследования существенно подчеркнуть, что процессы, вовлеченные в функционирование БР, построены на различных по своей природе и свойствам механизмах. Обнаруженные в настоящей работе факты показали, что белок, как и ретинальный хромофор, может напрямую активироваться видимым светом. Однако в отличие от ретиналя активация белка не связана с поглощением кванта видимого света, а происходит посредством поляризационных эффектов, включающих ориентационный механизм и механизм, связанный с генерацией стимулированного ИК-излучения. Анализ литературы показал, что эти

процессы внутри бактериородопсина происходят на временной шкале реакции изомеризации.

Таким образом, проведенный анализ полученных и литературных данных дает основание заключить, что ориентационные механизмы и нелинейные эффекты в белках ключевым образом определяют их функциональную активность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Oesterhelt and B. Hess, *Nature New Biology* **233**, 149 (1971).
2. R. H. Lozier, R. A. Bogomolni, and W. Stoerkenius, *Biophys. J.* **15**, 955 (1975).
3. Л. А. Драчев, А. Д. Каулен, В.П. Скулачев и др., *Биохимия* **46**, 5897 (1981).
4. U. Haupts, J. Tittor and D. Oesterhelt, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 367 (1999).
5. J. K. Lanyi and H. Luecke, *Membrane* **11**, 415 (2001).
6. J. Heberle, J. Fitter, H. J. Saas, and G. Büldt, *Biophys. Chem.* **85**, 229 (2000).
7. O. Béjà, L. Aravind, and E. F. DeLong, *Science* **289**, 1902 (2000).
8. J. L. Spudich, C. S. Yang, K. H. Jung, and E. N. Spudich, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 365 (2000).
9. T. Friedrich, S. Geibel, R. Kalmbach, et al., *J. Mol. Biol.* **321**, 821 (2002).
10. J. A. Fuhrman, M. S. Schwalbach, and U. Stingl, *Nat. Rev. Microbiol.* **6** 488 (2008).
11. R. A. Mathies, S.W. Lin, J. B. Ames, and W.T. Pollard, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 491 (1991).
12. H. Abramczyk, *J. Chem. Phys.* **120**, 11120 (2004).
13. R. Diller, in *Ultrashort Laser Pulses in Biology and Medicine*, Ed. by M. Braun, P. Gilch and W. Zinth (Springer Berlin, 2008), pp. 243–277.
14. J. Briand, J. Leonard, and S. Haacke, *J. Opt.* **12**, 064004 (2010).
15. П. Г. Крюков, Ю. А. Лазарев, В. С. Летохов и др., *Биофизика* **123**, 171 (1978).
16. M. C. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser, et al., *Chem. Phys. Lett.* **117**, 1 (1985).
17. H.-J. Pollard, M. A. Franz, W. Zinth, et al., *Biophys. J.* **49**, 651 (1986).
18. R. A. Mathies, C. H. Cruz Brito, W. T. Pollard, and C. V. Shank, *Science* **240**, 4853 (1988).
19. R. Diller, S. Maiti, G. C. Walker, et al., *Chem. Phys. Lett.* **241**, 109 (1995).
20. D. Xu, C. Martin, and K. Schulten, *Biophys. J.* **70**, 453 (1996).
21. G. G. Kochendoerfer and R. A. Mathies, *Isr. J. Chem.* **35**, 211 (1995).
22. R. González-Luque, M. Garavelli, and M. Olivucci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9379 (2000).
23. T. Ye, E. Gershgoren, N. Friedman, et al., *Chem. Phys. Lett.* **314**, 429 (1999).
24. A. C. Terentis, Y. Zhou, and G. H. Atkinson, *J. Phys. Chem. A* **107**, 10787 (2003).
25. G. H. Atkinson, L. Ujj, and Y. Zhou, *Biophys. J.* **55**, 263 (1989).
26. L. Ujj, Y. Zhou, M. Sheves, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 96 (2000).
27. A. V. Sharkov, A. V. Pakulev, S. V. Chekalin, and Yu. A. Matveetz, *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 94 (1985).
28. R. A. Mathies, C. H. Cruz Brito, W. T. Pollard, and C. V. Shank, *Science* **240**, 777 (1988).
29. M. C. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser, et al., *Chem. Phys. Lett.* **117**, 1 (1985).
30. А. Аарони, Б. Хоу, Н. Фридман и др., *Биохимия* **66** (11), 1499 (2001).
31. A. Aharoni, L. Weiner, M. Ottolenghi, and M. Sheves, *J. Biol. Chem.* **275**, 21010 (2000).
32. G. H. Atkinson, L. Ujj, and Y. Zhou, *J. Phys. Chem. A* **104**, 4130 (2000).
33. S. L. Logunov, V. V. Volkov, M. Braun, and M. A. El-Sayed, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8475 (2001).
34. S. A. Locknar, A. Chowdhury, and L. A. Peteanu, *J. Phys. Chem.* **104**, 5816 (2000).
35. O. Bouevitch, A. Lewis, and M. Sheves, *J. Phys. Chem.* **99**, 10648 (1995).
36. G. I. Groma, A. Colonna, J. C. Lambry, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7971 (2004).
37. A. Colonna, G. I. Groma, J. L. Martin, et al., *J. Phys. Chem. B* **111**, 2707 (2007).
38. R. R. Birge, N. B. Gillespie, E. W. Izaguirre, et al., *J. Phys. Chem. B* **103**, 10746 (1999).
39. J. Herbst, K. Heyne, and R. Diller, *Science* **297**, 822 (2002).
40. O. Bismuth, N. Friedman, M. Sheves, and S. Ruhman, *Chem. Phys.* **341**, 267 (2007).
41. G. Zgrablić, Haacke, and Chergui, *Chem. Phys.* **338**, 168 (2007).
42. H. Kandori, Y. Furutani, S. Nishimura, et al., *Chem. Phys. Lett.* **334**, 271 (2001).
43. L. Song, M. A. El-Sayed, and J. K. Lanyi, *Science* **261**, 891 (1993).
44. K. Heyne, J. Herbst, B. Dominguez-Herradon, et al., *J. Phys. Chem.* **104**, 6053 (2000).
45. J. T. M. Kennis D. S. Larsen, K. Ohta, et al., *J. Phys. Chem. B* **106**, 6067 (2002).
46. J. Herbst, K. Heyne, and R. Diller, *Science* **297**, 822 (2002).
47. R. Gross, M. M. Wolf, C. Schumann, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14868 (2009).
48. F. Garczarek, J. Wang, M. A. El-Sayed, and K. Gerwert, *Biophys. J.* **87**, 2676 (2004).
49. S. Schenkl, F. van Mourik, G. van der Zwan, et al., *Science* **309**, 917 (2005).
50. S. Schenkl, F. van Mourik, N. Friedman, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 4101 (2006).
51. J. Léonard, E. Portuondo-Campa, A. Cannizzo, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 7718 (2009).

52. K. Edman, P. Nollert, A. Royant, et al., *Nature* **401**, 822 (1999).
53. H. Luecke, *Biochim. Biophys. Acta.* **1460**, 133 (2000).
54. H. Kandori, *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 177 (2000).
55. K. Tsuji and E. Neumann, *Int. J. Biol. Macromol.* **3**, 231 (1981).
56. A. A. Kononenko, E. P. Lukashev, S. K. Chamorovsky, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **892**, 56 (1987).
57. R. Simmeth and G. W. Rayfield, *Biophys. J.* **57**, 1099 (1990).
58. G. I. Groma, J. Hebling, C. Ludwig, and J. Kuhl, *Biophys. J.* **69**, 2060 (1995).
59. J. Xu, A. V. Stickrath, P. Bhattacharya, et al., *Biophys. J.* **85**, 1128 (2003).
60. I-Ch. Khoо, *Liquid crystals: physical properties and non-linear optical phenomena* (Wiley & Sons, 1995).
61. Е. В Руденко и А. В. Сухов, *Письма ЖЭТФ* **59** (2), 133 (1994).
62. О. В. Дегтярева, В. Н. Афанасьев, Н. Н. Хечинашвили и Е. Л. Терпугов, *Современные проблемы науки и образования* **4** (2013) (URL: <http://www.science-education.ru/110-10010>).
63. О. В. Дегтярева, Дис. д-ра биол. наук (Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, 2014).
64. L. Homchaudhuri and R. Swaminathan, *Chem. Lett.* **844** (2001).
65. B. - H. Chai, J.-M. Zheng, Q. Zhao, and G. H. Pollack, *J. Phys. Chem. A* **112**, 2242 (2008).
66. S. Suresh, A. Ramanand, D. Jayaraman, and S. M. Navis Priya, *J. Minerals & Materials Characterization & Engineering* **9**, 1071 (2010).
67. А. Н. Теренин, *Фотоника молекул красителей* (Наука, Л., 1967).
68. А. Г. Гагаринов, О. В. Дегтярева, А. А. Khodonov, and Е. Л. Терпугов, *Vibrat. Spectrosc.* **42**, 231 (2006).
69. Е. Л. Терпугов и О. В. Дегтярева, *Биохимия (Москва)* **66** (11), 1628 (2001).
70. Е. Л. Терпугов и О. В. Дегтярева, *Письма в ЖЭТФ* **73** (6), 320 (2001).
71. M. Wolpert and P. Hellwig, *Spectrochim. Acta Part A* **64**, 987 (2006).
72. J. Kim, U. W. Schmitt, J. A. Gruetzmacher, et al., *J. Chem. Phys.* **116**, 737 (2002).
73. J. Lobaugh and G. A. Voth, *J. Chem Phys.* **104**, 2056 (1996).
74. G. Zundel, *Adv. Chem. Phys.* **111**, 1 (2000).
75. R. Wu, R. A. Marta, J. K. Martens, et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 1651 (2011).
76. J. Wang and M. A. El-Sayed, *Biophys. J.* **83**, 1589 (2002).
77. I. G. Groma, A. Colonna, J.-L. Martin, and M. H. Vos, *Biophys. J.* **100**, 1578 (2011).

Photo-induced Processes and Reaction Dynamics in Bacteriorhodopsin

E.L. Terpugov and O.V. Degtyareva

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Puschchino, Moscow Region, 142290 Russia*

In this review we have focused on the advances made in observing the photo-induced response in bacteriorhodopsin and understanding the mechanisms of retinal-protein interactions which are still obscure. We discuss our recent data obtained on the wild type of bacteriorhodopsin and model compounds. This paper presents our new spectroscopic data on amino acids obtained using FT-IR emission spectroscopy. Based on the characteristics of the structure and optical properties of glycine and L-lysine that simulate a photo-induced behaviour of an opsin under natural conditions we tried to find an answer to one of the most important questions concerning the role of protein in the primary processes in bacteriorhodopsin.

Key words: bacteriorhodopsin, glycine, L-lysine, photoactivation of opsin, stimulated IR-emission, FT-IR emission spectroscopy