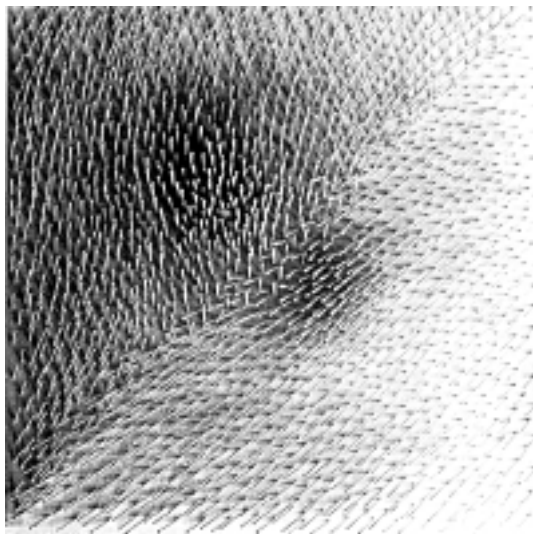


X

Первичные фотопроцессы в биологических системах



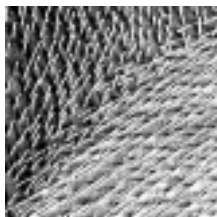
XXIX

Фотопревращения
бактериородопсина
и родопсина

XXX

Фоторегуляторные
и фотодеструктивные
процессы

Фотопревращения бактериородопсина и родопсина



Исследования молекулярных механизмов фотопревращений родопсина и бактериородопсина представляют собой важную область биофизики фотобиологических процессов, которая особенно бурно развивается в последние годы. Бактериородопсин Бр был обнаружен в пурпурной мембране галофильных бактерий (В. Стокениус, 1971), которая оказалась новым типом биологической мембраны, способной преобразовывать энергию света. Эта система, видимо, является наиболее простой из всех изученных систем запасаения световой энергии в форме разности электрохимических потенциалов H^+ . Каждая молекула Бр содержит один хромофор-ретиаль (полиеновый альдегид) в комплексе с белком — опсином — единственным белком, который содержится в пурпурной мембране. Опсин использует энергию света для активного перемещения протонов через мембрану, в результате чего происходит синтез АТФ и обеспечивается выполнение других физиологических функций. В основе этого биоэнергетического процесса лежит фотохимический цикл превращений Бр.

Зрительный пигмент родопсин, так же как и бактериородопсин, — практически единственный белок в фоторецепторной мембране зрительной клетки сетчатки глаза (на его долю приходится до 80% всего белка в мембране). Хромофором родопсина также служит ретиаль, находящийся в комплексе с опсином. Фотопревращения родопсина тесно сопряжены с ионными и ферментативными процессами, лежащими в основе зрительной рецепции, а также с возникновением трансмембранной разности потенциалов на фоторецепторной мембране за счет сдвига протона в мембране.

∇ По целому ряду свойств родопсин и бактериородопсин схожи (аминокислотный состав, молекулярная масса, химическая природа хромофора). Общие черты присущи и процессам фотохимических превращений, особенно на первых стадиях. Как будет показано в настоящей главе, первичные механизмы фотопревращений бактериородопсина и родопсина сходны во многом также и с механизмами процессов, проходящих в РЦ фотосинтеза (см. гл. XXVIII). Эти механизмы включают фотоиндуцированные конформационные изменения в белковой части фоточувствительного хромопротеина, осуществляющиеся согласно принципу электронно-конформационных взаимодействий. □

§ 1. Структура и функции пурпурных мембран

Пурпурные мембраны ПМ, локализованные в цитоплазме клеток некоторых экстремально галофильных бактерий, например *Halobacterium salinarium*, содержат единственный гидрофобный пигмент-белковый комплекс ПБК бактериородопсин (молекулярная масса $\sim 26\,000$), молекулы которого располагаются в ПМ строго упорядоченно.

Согласно электронно-микроскопическим данным, ПМ в интактных клетках и в изолированных препаратах представляют собой дискообразные образования диаметром около 0,5 мкм и толщиной 5–6 нм. Бр расположен в ПМ симметричными группами по три молекулы, причем каждый такой тример стабилизирован 12–14 молекулами структурных липидов. Размер ячейки составляет около 0,6 нм. Тримеры, в свою очередь, образуют двумерную гексагональную «кристаллическую» решетку в плоскости ПМ с периодом 6,3 нм.

Данные спектров кругового дихроизма в УФ-области свидетельствуют о высокой степени α -спирализации белковой цепи Бр (75–80% α -спирализации). Хромофор белка — ретиналь — содержится в белке в молярном соотношении 1 : 1, т. е. на каждую белковую цепь приходится один ретиналь.

Тщательный биохимический анализ молекулы Бр позволил расшифровать первичную последовательность аминокислот в белковой цепи (Ю. А. Овчинников, Корана, 1979), а также определить расположение молекулы Бр в ПМ. Концевая СООН-группа белковой молекулы находится на цитоплазматической стороне мембраны, а NH_2 -группа — на внешней стороне.

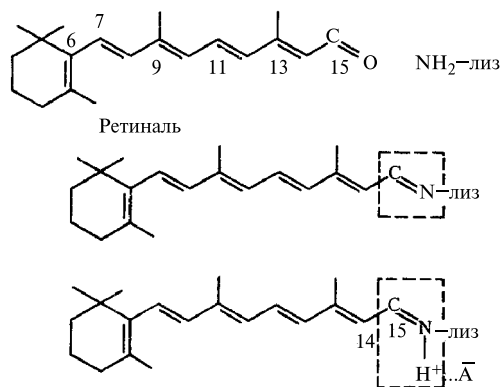


Рис. XXIX.1.

Образование альдиминовой связи между ретиналем и лизином в белковой цепи (шиффово основание)

Ретиналь ковалентно связан с опсином и образует альдиминную связь с одним из остатков лизина в белковой цепи (так называемое шиффово основание (рис. XXIX.1), которое может быть протонировано). Одна молекула Бр содержит 7 α -спиральных участков, пронизывающих ПМ. Три из этих «столбов» расположены почти перпендикулярно плоскости мембраны, остальные четыре образуют небольшие углы с нормалью к плоскости мембраны. На рис. XXIX.2 приведена трехмерная модель строения Бр, построенная на основании данных по

дифракции электронов в опытах с использованием низкотемпературной микроскопии образцов (Хендерсон). Ретиналь в Бр прикреплен к *лиз*-216, находящемуся в конце *Gα*-спирального столба (рис. XXIX.2). Место прикрепления ретиналя к белку расположено ближе к цитоплазматической стороне ПМ — на расстоянии 0,6–1,0 нм от поверхности, в то время как иононовое кольцо ретиналя находится внутри мембраны, почти в ее центре. Эксперименты по дифракции нейтронов на препаратах ПМ с дейтерированным ретиналем показали, что величина угла между переходным дипольным моментом ретиналя, практически совпадающим с его длинной осью, и плоскостью ПМ лежит в диапазоне 19°–25°.

Как видно из рис. XXIX.2, в состав ближайшего белкового окружения ретиналя помимо *лиз*-216 входят и другие аминокислоты, которые играют важную роль в структурной стабилизации и функционировании Бр (подробнее см. ниже). Они расположены от ретиналя на разных расстояниях (4–10 Å) и могут играть роль сложного противоиона A^- для протона шиффова основания (см. рис. XXIX.1).

Макромолекулы Бр гораздо менее подвижны, чем другие мембранные белки. Из температурной зависимости спектров кругового дихроизма ПМ видно, что при температурах выше 30° С взаимодействие молекул Бр внутри тримеров практически исчезает и в ПМ существует только мономерная форма Бр.

Следует отметить, что термостабильность Бр зависит от степени гидратированности препаратов ПМ. Так, методом синхротронного рассеяния рентгеновских лучей было показано, что в водной суспензии двумерная гексагональная структура ПМ имеет точку фазового перехода из твердого в жидкое состояние при температуре 69° С, а необратимая денатурация белка происходит при 90° С. Однако в обезвоженных мембранах многочасовой нагрев даже до 140° С не вызывает структурных и функциональных повреждений Бр. Такая высокая термоустойчивость, по существу, является рекордной для всех известных белков и ферментов и, очевидно, является результатом природной самосборки пигмент-белковых комплексов с липидами в двумерный квазикристалл.

В спектре поглощения ПМ один из максимумов, расположенный около 280 нм, соответствует поглощению ароматических аминокислот в белке. В модельных системах максимум поглощения шиффова основания в протонированной форме находится около 440 нм, в непротонированной — около 360 нм. Однако в Бр максимумы, соответствующие протонированной форме шиффова основания, расположены около 560–570 нм, а непротонированной — около 412 нм.

Различие в положении максимума поглощения ретиналя с протонированным шиффовым основанием в белке Бр (570 нм) по сравнению с положением его максимума в полярных растворителях (440 нм) называется «опсиновым» спектральным сдвигом (440 → 570 нм). В обоих случаях в протонированном шиффовом основании происходит смещение максимума в спектре поглощения ретиналя в длинноволновую область по сравнению с непротонированной формой. Это обусловлено электростатическим влиянием положительного заряда протона, образующего одновременно и водородную связь с отрицательно заряженным противоионом A^- в ближайшем окружении шиффова основания (рис. XXIX.2). Чем сильнее эта водородная связь, тем слабее влияние протона, и тем меньше длинноволновый сдвиг в положении максимума ретиналя с протонированным шиффовым основанием по сравнению с непротонированной формой.

Цитоплазма

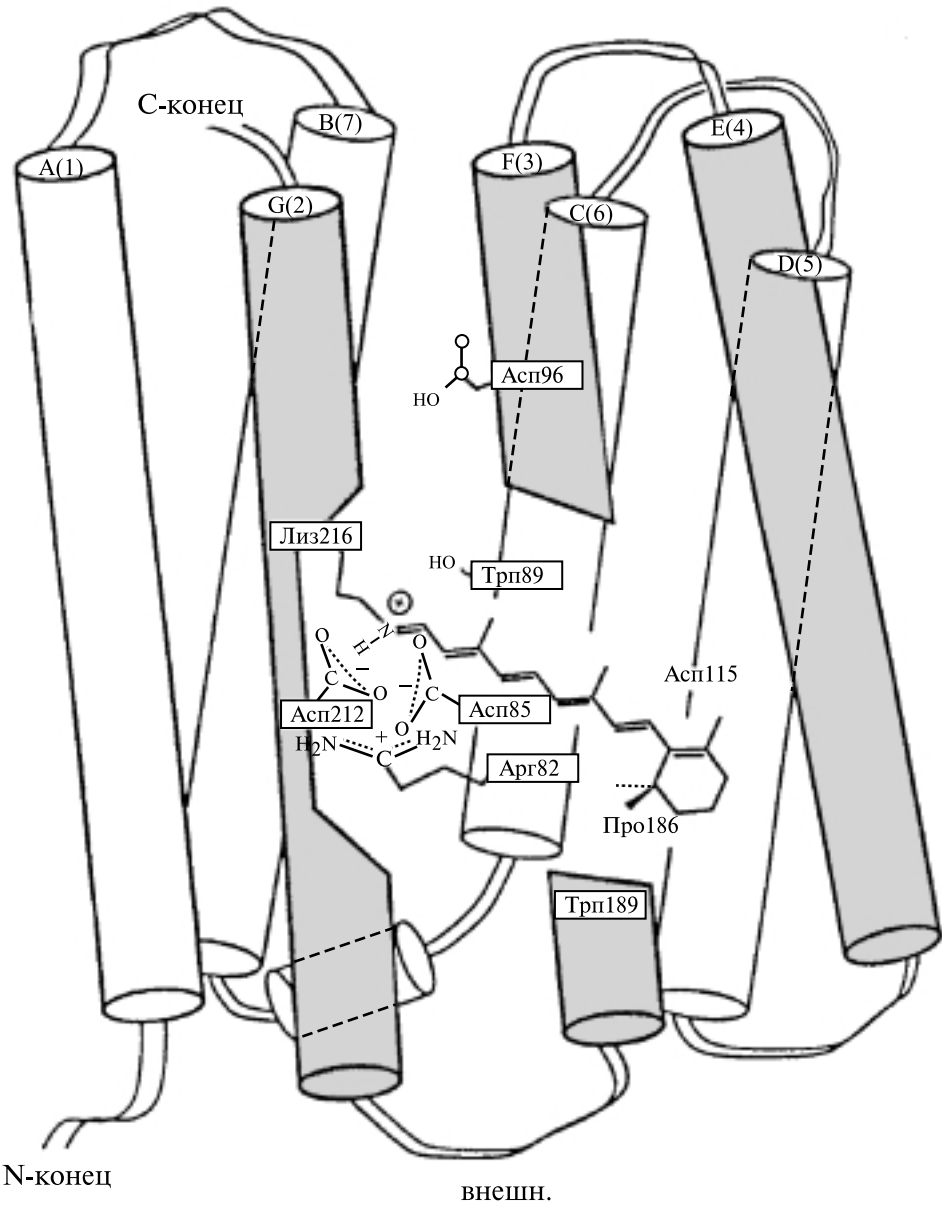
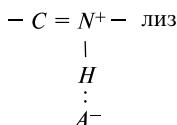


Рис. XXIX.2.
Трехмерная структура молекулы бактериородопсина (по R. Henderson et al., 1990).

Очевидно, влияние отрицательного заряда противоиона A^- , образующего водородную связь с протоном шиффова основания, одновременно уменьшает величину этого длинноволнового сдвига. В растворе роль такого отрицательного противоиона выполняют, например, ионы Cl^- . Однако в белке роль отрицательных противоионов принадлежит уже ионизированным аминокислотным остаткам с меньшими зарядами вблизи ретиналя (рис. XXIX.2).



Вследствие этого водородная связь ослабляется, а влияние положительного заряда протона шиффова основания в Бр возрастает. Это и приводит к «опсиновому» спектральному сдвигу ($440 \rightarrow 570$ нм) Бр по сравнению с модельными системами. Помимо основных противоионов Асп 212, Асп 85, свое влияние могут оказывать и заряды других остатков (Арг 82), а также триптофан (Трп 189) в гидрофобном кармане опсина, где находится ретиналь.

Так, было показано, что в мутантах, где отрицательно заряженный аспарат Асп 85 замещен на нейтральный аспарагин Асн, максимум поглощения Бр сдвигается еще дальше в красную область до 590 нм. Отрицательный заряд на Асп 85 исчезает и при протонировании этого остатка с соответствующим длинноволновым смещением положения $\lambda_{\text{макс}}$. Этот эффект можно также вызвать и заменой положительно заряженного Арг 82 на другой нейтральный остаток (Ала, Глю), в результате чего Асп 85 может протонироваться. Таким образом, положительный ион Арг 82 стабилизирует Асп 85 в его депротонированном состоянии.

Таким образом, при оценке состояния протонированного шиффова основания в Бр надо учитывать эффект не одного противоиона, а аминокислотного окружения ретиналя в целом с участием нескольких остатков.

Другой причиной длинноволнового сдвига является дополнительная делокализация π -электронов в полиеновой цепи ретиналя (см. гл. XII, § 1). Это происходит при 6 цис \rightarrow 6 транс (C_6-C_7 -связь) изомеризации свободной полиеновой цепи ретиналя при ее связывании с иононовым кольцом и включением из-за этого двойной связи кольца в общую систему π -электронов (рис. XXIX.1).

Бр в ПМ может находиться в двух различных состояниях: после адаптации к темноте или к свету. Эти состояния отличаются по спектрам поглощения Бр. Максимум полосы поглощения Бр в образцах, адаптированных к темноте, расположен около 560 нм. После освещения максимум сдвигается до 570 нм. По данным химических анализов, ПМ, адаптированные к темноте, содержат эквимольные количества молекул БР, имеющих ретиналь в 13-цис и полностью транс-формах. Светоадаптированные ПМ содержат Бр только с полностью транс-ретиналем (рис. XXIX.3). \square

Изомеры Бр (13-цис- + транс-) при возбуждении светом вовлекаются в различные циклы превращений. В темноте наблюдается медленный процесс релаксации части Бр (транс-) в Бр (13-цис) до достижения темноадаптированного состояния.

Скорость изомеризации обладает сильной температурной зависимостью

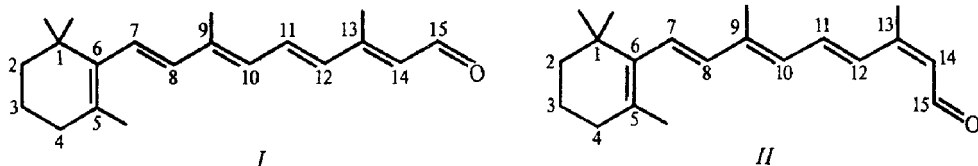
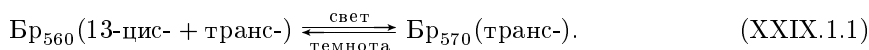


Рис. XXIX.3.

Структурные формулы полностью транс-ретиная (I) и 13-цис-ретиная (II).

§ 2. Фотоцикл бактериородопсина

Общие свойства. В основе функционирования Бр как протонной помпы лежит его способность за счет энергии света переносить протоны с цитоплазматической на внешнюю сторону клеточной мембраны.

Эксперименты с применением рН-индикаторных красителей на модельных системах (замкнутые везикулы, содержащие ПМ в такой же ориентации, как и в нативной клетке) показали, что выброс протона происходит на внешней стороне ПМ, а захват — на цитоплазматической. Следовательно, наблюдающееся закисление среды, суспендирования клеток галобактерий при их освещении обусловлено выходом протонов при функционировании протонной помпы, роль которой выполняет Бр. Кроме того, при освещении суспензии галобактерий наблюдается увеличение содержания АТФ в клетках и торможение дыхания. Процессы фотоиндуцированного переноса протонов через ПМ включают электрогенные стадии, протекание которых сопровождается образованием на мембране фотопотенциала. □

Поглощение света ретином дает начало фотохимическому циклу превращений Бр, в ходе которого он претерпевает переходы между разными формами на пути возвращения в исходное состояние. Отдельные стадии фотоцикла сопровождаются характерными спектральными изменениями Бр, что позволяет экспериментально изучать кинетику переходов между формами в фотоцикле. Каждая из стадий соответствует определенному этапу трансмембранного транспорта протона.

Особенно плодотворным подходом к изучению функционирования Бр оказался направленный точечный мутагенез, в результате которого отдельные аминокислоты в молекуле Бр можно заменить на другие. Сопоставление функциональной активности мутагенного белка с белком дикого типа позволяет сделать обоснованный вывод об участии определенных аминокислотных остатков в конкретных фотохимических реакциях Бр и этапах переноса протона. Исследованиями, выполненными на точечных мутантах галобактерий, было показано, что первичным донором и акцептором протона в молекуле Бр являются остатки аспартата Асп 96 и Асп 85

соответственно. После поглощения кванта света ретиналь изомеризуется и переходит из полностью-транс в 13-цис форму (рис. XXIX.3). При этом протон с шиффова основания переносится на Асп 85, после чего образовавшаяся вакансия заполняется протоном, перешедшим с Асп 96.

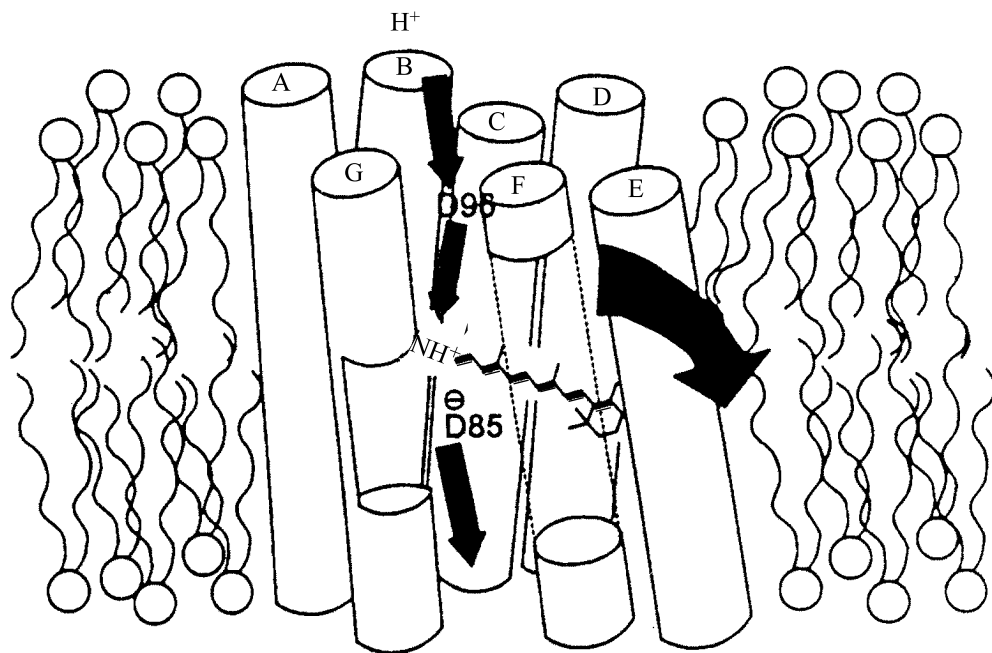


Рис. XXIX.4.

Схематическое изображение бактериородопсина. Путь протона показан прямыми стрелками. Изогнутая стрелка показывает направление изгиба спирали F в ходе фотохимического цикла (по J. K. Lanyi, 1995)

Такой внутримолекулярный перенос протона инициирует эстафетную цепочку транспортных реакций, в результате которых происходит высвобождение протона на внешней стороне мембраны и поглощение протона из внутриклеточного пространства. В схематическом виде это показано на рис. XXIX.4.

В ходе цикла фотохимических превращений Бр испытывает конформационные переходы, которые по сути сходны с таковыми у большинства ферментов (см. гл. XIV). Эти конформационные переходы инициируются кулоновским взаимодействием в донорно-акцепторных парах аминокислот: между положительно заряженным внутримолекулярным донором и отрицательно заряженным акцептором протона. До поглощения кванта света структура белка стабилизирована энергией связи комплекса, образованного протонированным шиффовым основанием, заряженными группами в локусе ретиналя и связанной водой (рис. XXIX.2).

В этом конформационном состоянии (конформация *E*) протон шиффова основания координационно связан с Асп 85 и находится в контакте с наружной стороной мембраны. Фотоизомеризация ретиналя смещает шиффово основание относительно Асп 85, но возникающие в молекуле Бр напряжения способствуют переносу

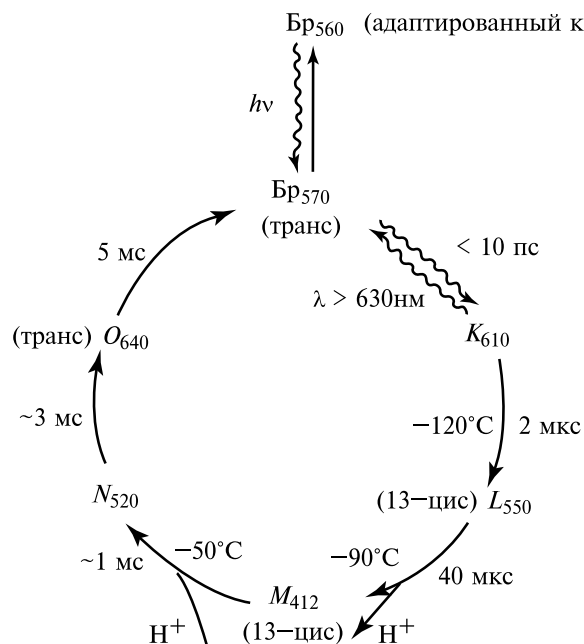


Рис. XXIX.5.

Фотохимический цикл бактериородопсина: цифрами указаны положения максимумов поглощения, времена жизни и нижние температурные пределы соответствующих переходов; остальные пояснения см. в тексте

протона с шиффова основания на аспарат 85. Данные структурных исследований показывают, что Бр при этом переходит в новую конформацию (конформация *C*), отличающуюся сдвигом спирали *G* от цитоплазматической стороны мембраны к центру молекулы (см. рис. XXIX.4). В конформации *C* шиффово основание уже находится в контакте с цитоплазматической стороной мембраны, а его контакт с Асп 85 и, следовательно, с наружной стороной мембраны нарушен.

Таким образом, Бр представляет собой ионный насос с переменным доступом активного центра к противоположным сторонам мембраны. В терминах конформационной динамики Бр представляет собой систему с двумя устойчивыми состояниями, причем избыточная конформационная энергия запасается в ходе фотоцикла в виде трансмембранного градиента электрохимического потенциала ионов водорода.

Первые исследования цикла фотоиндуцированных превращений Бр в суспензии ПМ при комнатной температуре, выполненные методом импульсной абсорбционной спектроскопии, показали наличие шести промежуточных состояний. Каждое из этих состояний, обозначаемых буквами латинского алфавита от *K* до *O* в порядке возрастания длительности жизни, характеризуется определенными спектральными свойствами. Упрощенная последовательность переходов между обнаруженными состояниями активированного Бр представлена на рис. XXIX.5. Образующаяся вслед

за поглощением света форма K_{610} при температурах ниже 140 К является стабильной (Литвин, Балашов, 1975). Однако она фотоактивна и может быть переведена обратно в исходное состояние Br_{570} (транс-) воздействием красного света с длиной волны > 630 нм. Установлена независимость от температуры (в интервале от 77 до 9 К) фотоиндуцированного перехода Br_{570} транс- $\rightarrow K_{610}$ и обратной реакции, квантовые выходы которых равны соответственно 0,64 и 0,67. Показано, что форме K_{610} предшествует образование продукта J_{625} (см. ниже). Исходная форма Br_{570} содержит ретиналь только в транс-конфигурации, а уже на стадии интермедиата J_{625} ретиналь находится в полностью 13-цис-состоянии.

Образование промежуточной формы M_{412} в фотоцикле Бр, по многочисленным данным, связано с переносом протона через мембрану. Процесс образования M_{412} сопряжен с освобождением протона и выходом его во внешнюю среду. Распад формы M_{412} сопровождается связыванием протона на другой стороне мембраны (В. Стокениус, 1978). □

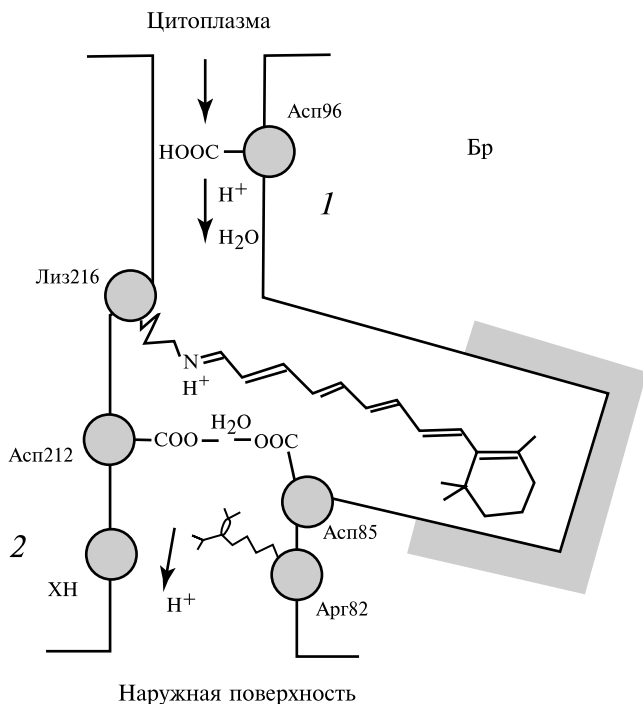


Рис. XXIX.6.

Схема переноса протона в Бр по цитоплазматическому (1) и периплазматическому (2) каналам. Показано расположение основных участников переноса протона. ХН — терминальный донор протона во внешнюю среду

Механизмы переноса протона. Современные модели переноса протона в цикле Бр основаны на представлениях о двух протонных каналах, связывающих ретиналь с внутренней и наружной сторонами мембраны. Ретиналь служит своего рода молекулярным переключателем, регулирующим общий трансмембранный перенос протонов по цитоплазматическому и периплазматическому каналам (рис. XXIX.6). Первичным акцептором протона от шиффова основания является Асп 85. Груп-

па X , определенная как Глю-204, непосредственно отдает протон в наружную среду. Остаток Асп 96 репротонирует шиффово основание, восполняя дефицит протонов за счет цитоплазматического источника.

Основным фактором, определяющим направление и скорость движения протона между участками транспортной системы, является степень их сродства к протону, или, как известно из биохимии, величина pK_a . Поскольку аминокислотные остатки находятся друг от друга на коротких расстояниях, то pK_a каждого из них определяется также и влиянием электрических зарядов соседних групп. Величина pK_a остатка, или сродство к протону, увеличивается или уменьшается, если в непосредственной близости от него на соседних молекулярных группах появляются соответственно отрицательный или положительный заряды. Именно это обстоятельство определяет движущую силу и механизм регуляции транспорта протона в Бр.

Первичный акт фотопроцесса Бр, природу которого мы более детально рассмотрим ниже, включает фотоизомеризацию транс-13-цис ретиналя. В результате изменения конфигурации ретиналя шиффово основание смещается в гидрофобную область белка с более низким значением диэлектрической постоянной. Это приводит к увеличению взаимодействия между положительным протоном основания и отрицательным зарядом противоиона Асп 85, в результате чего pK_a шиффова основания уменьшается. Теперь протон может перейти на отрицательно заряженный остаток Асп 85 и протонировать его. Изменения электростатических взаимодействий, индуцированные актом транс-13-цис-фотоизомеризации ретиналя тесно сопряжены с поляризацией и соответствующими конформационными изменениями белка Бр.

Переход протона на Асп 85 происходит в несколько стадий, соответствующих последовательному появлению форм J_{625} , K_{610} , L_{550} и M_{412} в фотоцикле (см. рис. XXIX.5).

Транс-13-цис-фотоизомеризация ретиналя в исходном Бр₅₇₀ сопряжена с изменениями плоскостного расположения и небольшими изгибами полиеновой цепи и по другим связям. Наблюдаемый красный сдвиг спектра $570 \rightarrow 610$ нм в состоянии K_{610} вызван отмеченным выше ослаблением взаимодействия шиффова основания с отрицательным противоионом (Асп 85) и увеличенной делокализацией π -электронов.

В состоянии K_{610} 13-цис-ретиналь и его ближайшее белковое окружение находятся в напряженном состоянии, которое постепенно релаксирует к плоскостному расположению 13-цис-ретиналя в L -форме.

В состоянии L_{550} шиффово основание еще протонировано, однако сдвиг положения максимума в коротковолновую сторону ($610 \rightarrow 550$ нм) указывает на усиление влияния акцепторного отрицательного противоиона Асп 85. Принципиальный этап в транспорте протона связан с распадом формы L_{550} , вызванным депротонированием шиффова основания, переносом протона на Асп 85 и образованием в результате формы M_{412} . Положительный заряд при этом смещается к внешней стороне мембраны за ~ 25 мкс, что соответствует движению протона к Асп 85 и появлению Асп-СООН. В состоянии M_{412} ретиналь находится в полностью отрелаксированном 13-цис положении (рис. XXIX.7). Протонирование Асп 85 и нейтрализация отрицательного заряда его группы COO^- понижает pK_a протонированной терминальной аминокислотной группы ХН от 9,4 до 4,7, что способствует ее депротонированию и выбросу протона во внешнюю среду ($\text{XH} \rightarrow \text{X}^- + \text{H}^+$). При этом Асп 85 остается все еще в

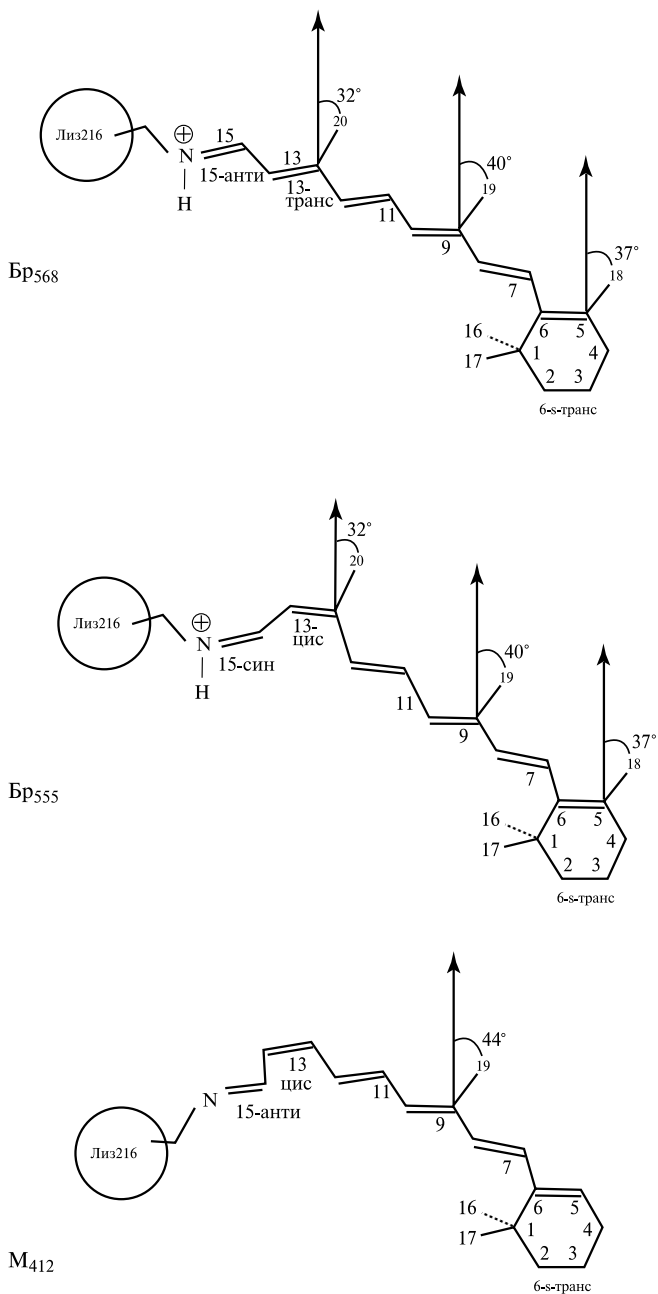
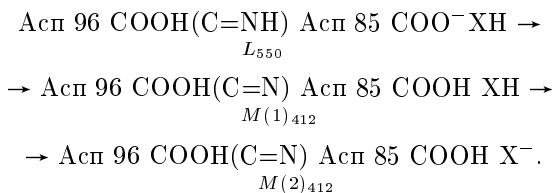


Рис. XXIX.7.

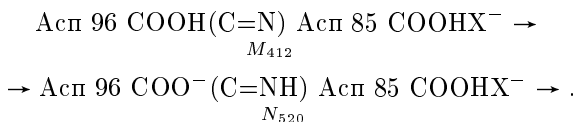
Конфигурация ретиналя в формах Бр₅₇₀, *L*, *M* по данным ЯМР (по М. Engelhard, В. Bechinger, 1995)

протонированном состоянии, причем ее pK_a повышается с 3 до 7 единиц. Очевидно, существуют два состояния формы M_{412} , в каждом из которых остаток Асп 85 протонирован. В первом состоянии формы M_{412} приход протона на Асп 85 застаёт терминальный акцептор ХН исходно протонированным, а во втором состоянии ХН уже отдает протон во внешнюю среду. Таким образом, выброс протонов на периплазматической стороне мембраны в первые 1–2 мс происходит при сохранении остатка Асп в протонированной форме Асп–СООН.

Переходы между формами $L \rightarrow M$ можно представить в виде:

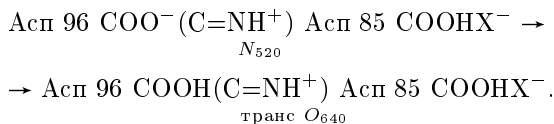


Вторая часть фотоцикла Бр связана с репротонированием шиффова основания и распадом M_{412} . Вначале происходит перенос протона по цитоплазматическому каналу от Асп 96 СООН через «посредников» (Трионин, H_2O) с образованием формы



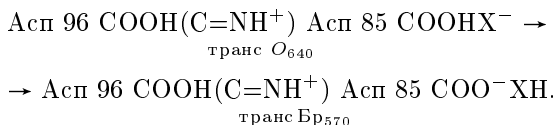
В мутантах, где Асп 96 замещен на другие остатки (аспарагин), резко замедляется транспорт протонов и исчезновение формы M_{412} .

Состояние N_{520} распадается далее за 1 мс с репротонированием Асп 96 COO^- за счет цитоплазматического источника протонов. Одновременно хромофор реизомеризуется из 13-цис в исходную форму полностью транс-ретиаль, что соответствует форме O_{640}



Сдвиг 520 \rightarrow 640 нм при переходе $N_{520} \rightarrow O_{640}$ вызван ослабленным влиянием нейтрализованного протонированного противоиона Асп 85 СООН на положительный заряд протона шиффова основания.

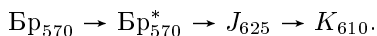
Как показали опыты по тепловой изомеризации ретиналя Бр, в темноте барьер для цис \rightarrow транс переходов снижается, если Асп 85 протонирован (см. XXIX.1.1). Это происходит за счет ослабления водородной связи шиффова основания с противоионным окружением и большей делокализацией π -электронов хромофора. Эту роль в ускорении темновой реизомеризации ретиналя и возвращении в исходное состояние на этапе $O_{640} \rightarrow \text{Бр}_{570}$ и выполняет Асп 85 СООН.



Таким образом, помимо своего значения как протондонора и акцептора протона от шиффового основания Асп 85 играет также регуляторную роль. В депротонированном состоянии Асп COO^- препятствует превращению в темноте активного транс-Бр в неактивную 13-цис-форму до начала освещения. Наоборот, в протонированном состоянии Асп COOH облегчает темновую реизомеризацию хромофора на последней стадии фотоцикла. В этой связи особое значение имеет и положительно заряженный Арг 82, который одновременно стабилизирует отрицательный заряд на Асп COO^- .

§ 3. Первичный акт фотопревращений бактериородопсина

Начальные стадии фотопревращений Бр включают образование промежуточной формы J_{625} и первого относительно стабильного продукта, который по своим спектральным свойствам идентичен форме K_{610} (батопорма Бр)



Именно на этом этапе фотоцикла происходит запасание энергии поглощенного кванта, которая потом используется в процессах транслокации протона.

Фотоцикл Бр не включает каких-либо окислительно-восстановительных реакций, где подобно фотосинтезу, происходил бы отрыв и перенос электрона между разными молекулами. Под действием поглощенного кванта света в Бр лишь смещается электронная плотность вдоль полиеновой цепи при возбуждении ароматического кольца ретиналя. Происходящая в результате транс-цис фотоизомеризация ретиналя является триггером, «запускающим» всю дальнейшую цепь последовательных превращений фотоцикла Бр.

Это аналогично событиям в первичных реакциях фотосинтеза, где начальная стадия разделения зарядов в РЦ дает «толчок» всей цепи переноса электрона. Как мы увидим ниже, в фотоцикле Бр, как и в фотосинтезе, фотоиндуцированные электронные переходы тесно сопряжены с колебательными и конформационными изменениями ближайшего белкового окружения хромофора.

Основные экспериментальные подходы и методы исследований первичных реакций фотоцикла Бр, а также характер получаемой с их помощью информации во многом сходны с таковыми в случае фотосинтеза, и были уже подробно описаны выше (гл. XXVII–XXVIII).

Здесь также применяются методы резонансной раман- и инфракрасной дифференциальной спектроскопии, которые позволяют наблюдать колебания атомов в отдельных химических связях и определять частоты этих колебаний. На рис. XXIX.8 представлен раман-спектр Бр, где обозначены пики колебаний одинарных $\text{C}-\text{C}$ и двойных $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$ связей, а также внеплоскостных колебаний протона.

Оказалось, что переход $\text{Br}_{570} \rightarrow K_{610}$ сопровождается уменьшением частоты (1640 см^{-1}) колебаний связи $\text{C}=\text{N}$ в протонированном шиффовом основании $\text{C}=\text{N}^+\text{H}$ на $15\text{--}30 \text{ см}^{-1}$. Это свидетельствует об увеличении расстояния между группой COO^- белка и протоном в шиффовом основании, в результате которого происходит делокализация положительного заряда протона с уменьшением частоты колебаний связи $\text{C}=\text{N}$. Происходящее при образовании K_{610} некоторое удаление

протона шиффового основания может быть первым этапом на пути его дальнейшей транслокации.

В форме K_{610} шиффово основание еще частично протонировано, хотя состояние протона уже успевает существенно измениться. Об этом также свидетельствуют изменения полосы колебаний при 1646 см^{-1} связи $\text{C}=\text{NH}$, происходящие в пикосекундном временном диапазоне. В форме M_{412} группа COO^- белка уже протонирована (пик при 1760 см^{-1}). \square

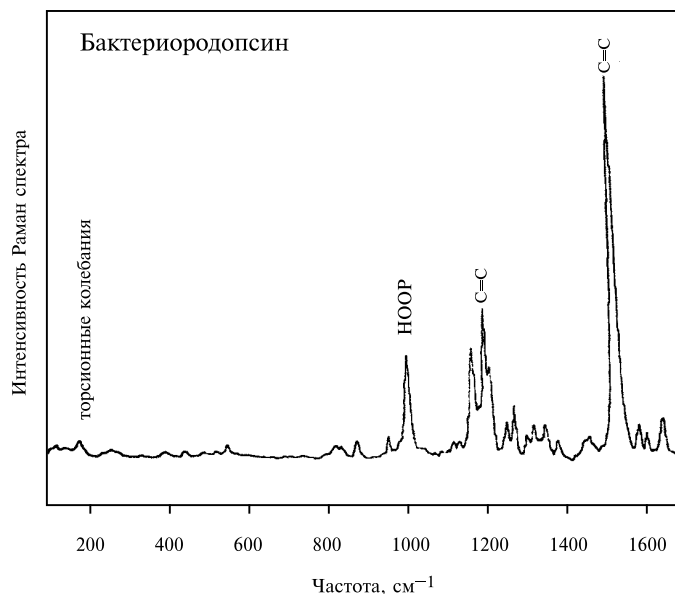


Рис. XXIX.8.

Раман-спектр бактериородопсина в диапазоне $100\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ (по G. G. Kochenderfer, R. A. Mathies, 1995)

НООР — внеплоскостные колебания протона, C—C, C=C — колебания связей. Торсионные колебания в полиеновой цепи наблюдаются при 187 см^{-1} .

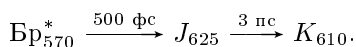
С помощью метода рамановской спектроскопии при низкой температуре, а также динамической спектроскопии в наносекундном и пикосекундном временном диапазонах показано, что уже на стадии существования K_{610} хромофор обладает характеристиками, свидетельствующими о наличии в нем 13-цис-конформации (область $1100\text{--}1400\text{ см}^{-1}$ в раман-спектре. Раман-спектр ретиналя в 13-цис-конфигурации в форме K_{610} характеризуется появлением новых линий (при 811 и 957 см^{-1}) по сравнению с модельным 13-цис-ретиналем, что указывает на усиление внеплоскостных колебаний протонов, принадлежащих винильным группам полиеновой цепи. Очевидно, в этих условиях 13-цис-конфигурация хромофора находится в возмущенном состоянии вследствие влияния белкового окружения, вызывающего, по всей видимости, торсионную деформацию («скручивание») полиеновой цепи ретиналя (рис. XXIX.7).

Процесс изомеризации ретиналя сопровождается также и изменениями поглощения в области 260–450 нм. Совокупность этих данных позволяет сделать заключение, что процесс транс-цис-изомеризации ретиналя растянут во времени. Он начинается раньше образования K_{610} .

На протяжении всего времени жизни интермедиата K_{610} хромофор существует в некоем переходном состоянии, которое, строго говоря, не является ни транс-, ни 13-цис-конфигурацией. Полностью завершается процесс изомеризации к моменту образования формы L_{550} и M_{412} .

Применение методов фемтосекундной и пикосекундной лазерной спектроскопии позволило детально изучить кинетику быстрых начальных процессов в фотоцикле Бр. Нарастание фотоиндуцированных абсорбционных изменений при 625 нм происходит за время ~ 500 фс, что соответствует появлению формы J_{625} .

Колебательная релаксация первичного фотопродукта J_{625} сопровождается диссипацией избытка колебательной энергии, дальнейшей структурной перестройкой скелета молекулы в ходе изомеризации ретиналя и образования за 3 пс формы K_{610}



Однако эта последовательность событий включает и другие сверхбыстрые структурные изменения, сопровождающие фотоизомеризацию ретиналя. Они затрагивают молекулы ретиналя и аминокислотные остатки ближайшего белкового окружения, взаимодействие с которыми играет важную роль в обеспечении высокой скорости и эффективности фотоизомеризации. Оказалось, что динамика начальных спектральных изменений поглощения Бр в диапазоне до 100 фс носит колебательный характер, связанный с когерентными колебаниями ядерного волнового пакета при движении вдоль потенциальной поверхности возбужденного состояния в первые 100–200 фс (ср. рис. XXVIII.37, 38). Моделирование такого рода движений ядер на частоте торсионных колебаний при 187 см^{-1} показало, что поворот на 90° действительно может завершиться за 100–200 фс (Воршел).

Очевидно, начальный этап фотоизомеризации ретиналя происходит за время 100–200 фс при адиабатическом переходе вдоль поверхности потенциальной энергии возбужденного состояния.

Транс-13-цис-поворот представляет собой электронную релаксацию Br^* по выделенной степени свободы торсионного вращения (ср. § 1 гл. XXVIII). Он носит направленный микроструктурный характер. Высокая скорость сопряженных с ним движений ядер приводит к наблюдаемому в экспериментах уширению полос поглощения Бр в первые 100–200 фс после светового возбуждения. После транс-13-цис-поворота происходит безизлучательный переход за 500 фс на потенциальную поверхность фотопродукта J_{625} с его последующей колебательной релаксацией и переходом в K_{610} за 3 пс. Это сопряжено с дальнейшими структурными перестройками в других частях скелета ретиналя. Время образования J_{625} в несколько раз (~ 5 раз) меньше, чем время затухания флуоресценции Br^* или время существования электронного возбуждения Br^* , которое составляет 2,5 пс (> 500 фс). Следовательно, возбуждение в Br^* сохраняется некоторое время после образования J_{625} , что говорит о сложном характере адиабатического перехода $\text{Br}^* \rightarrow J_{625}$.

Об этом же свидетельствует и слабая температурная зависимость скоростей начальных процессов $\text{Br}^* \rightarrow J_{625} \rightarrow K_{610}$ в области (295–77 К), с небольшой энергией активации ($\sim 0,5$ кДж/моль).

На рис. XXIX.9 изображена гипотетическая схема расположения кривых потенциальных энергий состояний $\text{Br}^* \rightarrow J_{625} \rightarrow K_{610}$. Кривая состояния Br^* имеет небольшой промежуточный барьер транс-цис-изомеризации, разделяющий флуоресцирующее состояние Br^* и область перехода J_{625} . Видно, что часть молекул Br^* возвращается на основной уровень с испусканием кванта флуоресценции, и не участвует в реакции. Другая часть претерпевает фотоизомеризацию, находясь в возбужденном состоянии.

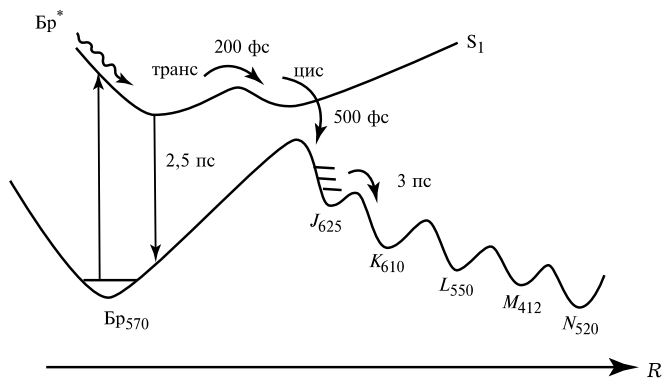


Рис. XXIX.9.

Схема расположения кривых потенциальных энергий состояний $\text{Br}^* \rightarrow J_{625} \rightarrow K_{610}$. R — ядерная координата.

Скорость фотоизомеризации ретиналя ($\tau \sim 200$ фс) в плотном белке Бр намного выше, чем изолированного ретиналя в растворе ($\sim 10^{-11}$ с). Эта особенность определяется, очевидно, своеобразием белкового окружения и взаимодействием ретиналя с аминокислотными остатками, которое ответственно за форму кривой потенциальной энергии состояния Br^* .

В прямых экспериментах измерялась скорость фотоизомеризации Бр в мутантах, где с помощью точечного метагенеза были замечены функционально-активные аминокислотные остатки, входящие в состав сложного противоиона шиффова основания. Оказалось, что замена заряженных остатков Асп 85, Асп 212 и Арг 82 на нейтральные Асн и Глн снижала скорость фотоизомеризации в несколько раз (Эль-Саид). По-видимому, наличие отрицательно заряженных компонентов противоиона способствует снижению активационного барьера фотоизомеризации за счет кулоновского отталкивания между ними и отрицательным зарядом ароматического кольца ретиналя, куда смещается электронная плотность при световом возбуждении хромофора.

Роль белка в фотоцикле Бр. Процесс транслокации протона связан не только с локальными изменениями значений рК компонентов протонных каналов (рис. XXIX.6), но и сопряжен с изменениями конформации белка.

На начальном этапе образования *K*-формы из ~ 210 кДж/моль энергии поглощенного кванта света запасается около 40 кДж/моль вследствие структурных перестроек и электростатических взаимодействий в окружении ретиналя. Эти процессы могут включать и поляризацию белка, сопровождающуюся его конформационными изменениями не только на начальных этапах фотоцикла. Так, образование формы M_{412} сопровождается увеличением энтальпии за счет уменьшения энтропии (0,3 кДж/моль) с соответствующими конформационными перестройками белка. На следующем этапе перехода $N_{520} \rightarrow O_{640}$ происходит вновь увеличение энтропии ($\sim 0,2$ кДж/моль), и конформация белка возвращается к исходному состоянию. Очевидно, свободная энергия, запасенная за счет уменьшения энтропии на этапе образования M_{412} , затем используется для обратной 13-цис-транс-изомеризации ретиналя.

В целом можно представить себе, что в результате первичного фотоакта происходит стабилизация системы на новом основном уровне, более высокоэнергетическом по сравнению с исходным Br_{570} , который достигается в результате внутримолекулярных перестроек и поляризации ближайшего окружения ретиналя. При этом происходит запасание энергии электронного возбуждения в форме K_{610} .

Обратный спонтанный переход в исходное состояние отсюда уже затруднен, так как он потребовал бы перестройки молекулярных групп в Br , которая в этом случае уже не обеспечена внешней энергией. Регенерация $K_{610} \rightarrow Br_{570}$ может осуществляться здесь под действием света ($\lambda > 630$ нм). По существу, весь каскад превращений Br происходит вдоль кривой потенциальной энергии основного состояния Br_{570} , которое в конформационном отношении неравновесно.

▽ Поглощение света обеспечивает исходный сдвиг электронной плотности в Br_{570}^* и поляризацию белкового окружения ретиналя. За счет соответствующих внутримолекулярных перестроек на кривой появляются новые минимумы, попадая в которые, система стабилизируется. На стадии K_{610} перестройки включают транс-цис-изомеризацию ретиналя, частичный сдвиг протона шиффового основания и изменения в ближайшем белковом окружении. Постепенное снижение энергетических минимумов вдоль кривой основного состояния и изменение барьера между ними каждый раз приводит к соответствующему увеличению времени жизни промежуточного продукта в фотоцикле Br . В результате не только достигается общая стабилизация энергии возбуждения, за счет которого протекает весь цикл, но и обеспечиваются функционально направленные конформационные перестройки в макромолекулярном комплексе ретиналь-опсин. Такой молекулярный механизм возможен лишь вследствие вполне определенного «устройства» составных частей макромолекулярного комплекса. □

Переходы между конформационными оостояниями белка регулируются кулоновскими взаимодействиями в активном центре Br , включающем шиффово основание и его ближайшее окружение. Напомним, что в конформации *E* протон шиффового основания связан с Асп 85 и, соответственно, с периплазматическим каналом. В результате фотоизомеризации происходит перестройка активного центра и переход белка в конформацию *C*. Здесь уже шиффово основание связано с цитоплазматическим каналом и готово к приему протона от Асп 96. Интересно, что переходы между *E*- и *C*-конформациями могут происходить и без освещения в мутантах,

где Асп 85 заменен на нейтральный аспарагин (Асп 85), и где депротонирование шиффова основания осуществляется в темноте при увеличении рН.

Очевидно, фотоизомеризация ретиналя является тем триггером, который исходно вызывает соответствующие электростатические взаимодействия в активном центре Бр. Последние уже непосредственно регулируют каскад конформационных изменений белка, необходимых для переноса протона. Таким образом принцип электронно-конформационных взаимодействий справедлив и в случае Бр.

Молекулярная динамика фотоцикла. В литературе накоплен большой экспериментальный материал, частично рассмотренный выше, который показывает, какие изменения в расположении отдельных молекулярных групп белкового окружения ретиналя сопровождают фотопревращения Бр.

Результаты по численному моделированию молекулярной динамики (гл. XI, § 3) иллюстрируют кооперативный характер конформационных движений белка в фотоцикле Бр (Шултен). Оказалось, что спектральный сдвиг $570 \rightarrow 625$ нм, сопровождающий образование фотопродукта J_{625} , вызван поляризацией белковой матрицы за 500 фс под действием измененного дипольного момента возбужденного ретиналя. Сама по себе изомеризация по $C_{13}-C_{14}$ связи ретиналя не дает вклада в спектральный сдвиг, а служит только триггерным механизмом для его осуществления. Это аналогично действию электрического поля в темноте на модельные пленки Бр, вызывающему спектральные эффекты за счет поляризационных перестроек макромолекулярных компонентов Бр (§ 4).

В исходном состоянии в Бр происходит образование водородной связи между шиффовым основанием и молекулой воды, которая служит мостиком для протона на Асп 85. После переноса протона к Асп 85 нарушается связь шиффова основания с водой, что дает возможность ретиналю завершить транс-13-цис-изомеризацию. Одновременно изменяется и ориентация атома азота основания, так что он становится направленным в сторону остатка Асп 96 для принятия от него протона при последующем репротонировании.

Динамическое моделирование подтвердило также, что превращения интермедиата M_{412} сопряжены с последовательными изменениями конформаций белка и скелета ретиналя. Оказалось, что здесь также участвуют молекулы воды (три), связывающие гидроксильные группы Тир 57 и Тир 89, но не Асп 85. Это препятствует обратному переносу протона от Асп 85 к ретиналю на стадии M_{412} . На этом же этапе происходит увеличение наклона G спирали до 60° в сторону от центра Бр, которое открывает цитоплазматический канал Бр и обеспечивает в него доступ молекул воды с образованием ее водородной связи с азотом шиффова основания. Дополнительные молекулы воды, входящие затем в канал, формируют теперь сетку водородных связей для переноса по ним протона от Асп 96 к ретиналю.

Таким образом, шиффово основание действует как активный переключатель потока протонов, который за счет транс-цис-поворота разъединяет проводящую сетку водородных связей между ретиналем и Асп 85 и формирует новую сетку между ретиналем и Асп 96.

Изменение взаимосвязи внутримолекулярных степеней свободы, определяющих релаксацию белка, изомеризацию ретиналя, смещение и перенос протона, может приводить к появлению других фотопродуктов. Так, предполагают, что наблюдаемое при низких температурах преимущественное образование псевдобактериоро-

допсина вместо формы K_{610} происходит, когда этот переход не сопровождается одновременной релаксацией «замороженной» белковой части Бр. Остается неясным, насколько полно в этих условиях может осуществляться изомеризация самого ретиналя, которая и при комнатной температуре проходит быстрее, чем в растворах, вследствие влияния специфического белкового микроокружения.

§ 4. Модельные системы, содержащие бактериородопсин

В экспериментальных исследованиях принципов функционирования Бр широкое применение нашли разнообразные модельные системы и особенно пленки ПМ. На этих объектах изучают преобразование световой энергии в электростатическую энергию разделенных зарядов и энергию поляризации макромолекулярных компонентов Бр. Найдено, что внешнее электрическое поле напряженностью 10^7 В · м⁻¹,

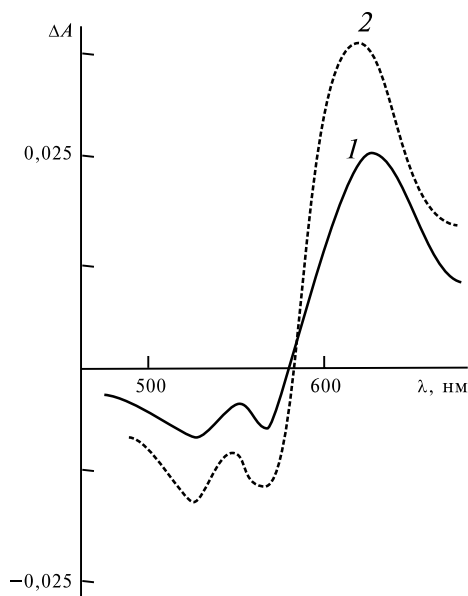


Рис. XXIX.10.

Дифференциальный спектр изменений поглощения бактериородопсина, индуцированных электрическими полями (1) и светом при -190°C (2) (Borisevitch G. et al., 1977).

приложенное в темноте при комнатной температуре к пленке ПМ, вызывает обратимые изменения спектра поглощения Бр. Соответствующий дифференциальный спектр указывает на длинноволновый сдвиг полосы поглощения Бр под влиянием электрического поля и характеризуется отрицательной полосой в области 430–580 нм со слабо выраженной структурой и интенсивной широкой положительной полосой с максимумом около 630 нм (рис. XXIX.10). Полученное электроиндуцированное состояние Бр спектрально подобно первому продукту (батопформа) нормального цикла фотопревращений Бр, обнаруженному при низких температурах.

Кинетика нарастания и релаксации электроиндуцированных спектральных изменений носит двухкомпонентный характер — начальные быстрые фазы сменяются медленными изменениями в секундном диапазоне. Вместе с тем, в отличие от фотоиндуцированной батопормы электроиндуцированный батопродукт не дает начало

циклу дальнейших темновых превращений Бр. Возможно, что электрическое поле изменяет распределение электронной плотности в молекуле Бр аналогично тому, как это происходит при световой активации, что и проявляется в длинноволновом сдвиге полосы поглощения.

☐ Существование медленных компонентов в кинетике электроиндуцированных сигналов свидетельствует об одновременном протекании процессов диэлектрической поляризации, в которые вовлекаются относительно малоподвижные элементы структуры макромолекулярного комплекса Бр. Электроиндуцированный батохромный сдвиг в Бр существенно ингибируется при понижении температуры уже до -20°C . Это и означает, что внешнее электрическое поле действует на ретиналь, главным образом возбуждая в опсине конформационные перестройки, формирующие эффективное реакционное поле в микроокружении ретиналя. ☐

Трансмембранное электрическое поле способно, по-видимому, и изменять величину рК аминокислотных остатков, участвующих в транспорте H^+ , и, возможно, самого шиффова основания. Однако в Бр дикого типа основание Шиффа имеет очень высокое сродство к протону ($\text{pK} \sim 13$), и изменение рК во внешнем электрическом поле порядка 10^7 В/м не приводит к его депротонированию. Поэтому эффект появления максимума при 630 нм вызван в основном поляризационными перестройками белка, а также, возможно, протонированием остатка Асп 85 от протонов, находящихся в периплазматическом канале и не связанных с шиффовым основанием. Однако в некоторых мутантах, где Асп 85 заменен на нейтральный Асн, основание Шиффа имеет гораздо меньшую аффинность к протону ($\text{pK} \sim 8-9$) вследствие нарушения баланса зарядов в акцепторном сегменте. В таких мутантах электрическое поле индуцирует в темноте переход в форму с депротонированным основанием Шиффа. Причем эффект имеет выраженный векторный характер и проявляется при отрицательном потенциале на периплазматической стороне мембраны мутантного штамма, т. е. в условиях, когда поле стимулирует перенос протона от основания Шиффа в акцепторный участок канала к Асп 212 (рис. XXIX.6).

Эксперименты по импульсному фотовозбуждению пленки ПМ в присутствии внешнего электрического поля показывают, что количество молекул Бр, вовлеченных в этих условиях в цикл фотопревращений, уменьшается примерно на 30%. Таким образом, если в нормальных условиях в клетке произойдет повышение трансмембранной разности потенциалов до определенной величины, то это приведет к снижению количества молекул Бр, вовлекающихся в фотоцикл. В результате создастся препятствие для дальнейшего увеличения фотоиндуцированного потенциала на мембране, что может быть важно с точки зрения сохранения ее целостности.

Внешнее электрическое поле способно влиять на фотоиндуцированные процессы в пленке ПМ не только на начальных стадиях фотоцикла. Важным проявлением этого является электростимуляция образования ключевого промежуточного продукта фотоцикла Бр — формы M_{412} .

В темноте электрическое поле не вызывает изменений в полосе поглощения M_{412} . Однако включение электрического поля на фоне сине-зеленого света, вызывающего переход $\text{Br}_{570} \rightarrow M_{412}$, приводит к существенному увеличению стационарной концентрации формы M_{412} (рис. XXIX.11). Проявление эффекта электростимуляции не зависит от последовательности включения света и поля.

Приложение электрического поля не вызывает изменения кинетики фотоиндуцированного образования формы M , однако наблюдается заметное торможение распада этой формы, ведущего к регенерации исходного Бр. Этим, видимо, и определяется сдвиг равновесия в сторону накопления промежуточного продукта на свете в присутствии поля.

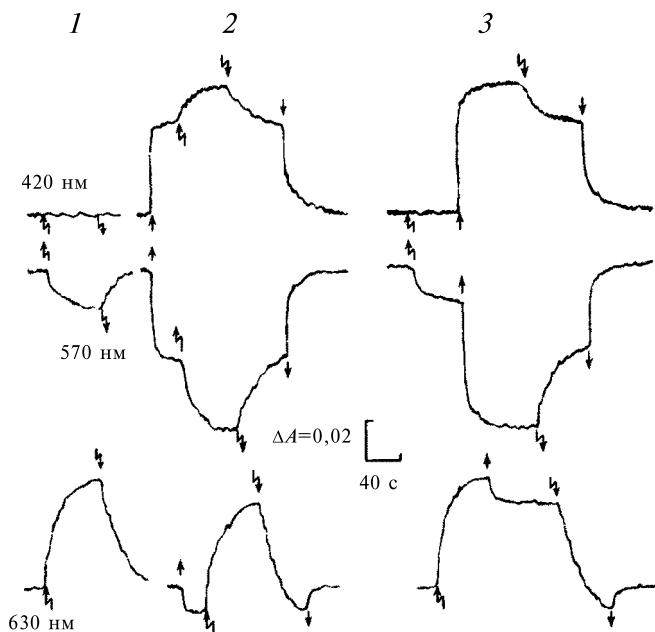


Рис. XXIX.11.

Кинетика электро- и фотоиндуцированных изменений поглощения Бр при 420, 570 и 630 нм в воздушно-сухих пленках ПМ. Зигзагообразными стрелками отмечено включение (вверх) и выключение (вниз) электрического поля ($2 \times 10^7 \text{ В} \cdot \text{м}^{-1}$), прямыми стрелками — включение и выключение постоянного действующего света ($380 \text{ нм} < \lambda < 580 \text{ нм}$; $80 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$); 1 — темновые изменения под влиянием поля, 2 — электроиндуцированные изменения на фоне действующего света, 3 — фотоиндуцированные изменения на фоне приложенного поля (Lukashev E. et al., 1980).

Следует отметить, что электроиндуцированные изменения поглощения Бр в темноте (при 630 нм) и на свету (при 420 нм; рис. XXIX.11) характеризуются практически одной и той же кинетикой нарастания и спада сигнала с медленными компонентами в секундном диапазоне.

Торможение распада формы M_{412} и увеличение ее концентрации, по-видимому, обусловлено необходимостью преодолеть дополнительный энергетический барьер при перемещении протона на этой стадии фотоцикла от первичного донора Асп 96 к депротонированному основанию Шиффа (рис. XXIX.6). Эффект носит векторный

характер и наблюдается в том случае, если к цитоплазматической стороне ПМ приложен отрицательный потенциал, препятствующий движению протона от Асп 96 к ретиналю. В поле противоположного знака, ускоряющего движение протона, следует ожидать уменьшение стационарной концентрации продукта M_{412} на свету из-за ускорения его распада. Экспериментальное подтверждение этого было получено на пленках пурпурных мембран с высокой степенью ориентации.

Можно предположить существование молекулярного механизма регуляции фотопревращений Бр, который зависит от электрического поля и действует по принципу отрицательной обратной связи. На стадии K_{630} регуляция осуществляется посредством управления фондом потенциально активных макромолекул Бр. Далее на этапе образования M_{412} регулируется скорость превращений тех молекул Бр, которые уже вовлечены в фотоцикл. В физиологических условиях такой механизм может поддерживать протонный градиент в ПМ на уровне, соответствующем энергетическим потребностям клетки. Это обеспечивается за счет уменьшения скорости превращения Бр на завершающей стадии (переход формы M в исходное состояние) в случае нежелательного возрастания напряженности мембранного электрического поля, не компенсированного другими факторами.

Торможение перехода $M \rightarrow$ Бр в электрическом поле следует, вероятно, связывать с уменьшением эффективности (увеличение энергии активации) взаимодействия депротонированного шиффова основания с протон-донорными группами аминокислотных остатков, формирующих протонный канал в макромолекуле Бр. \square

Диэлектрическая поляризация и конформационные перегруппировки в местоположении ретиналя проявляются в возникновении электрического потенциала между поверхностями пленки ПМ при ее освещении.

На искусственных лецитиновых мембранах, содержащих ориентированные ПМ, при возбуждении коротким лазерным импульсом (10 нс) зарегистрирован фотопотенциал значением около 100 мВ (В. П. Скулачев). Первая быстрая фаза нарастания потенциала ($\tau < 200$ нс) отрицательна по знаку и обусловлена изменением дипольного момента возбужденного ретиналя. Остальные стадии с временами от десятков микросекунд и больше положительны по знаку и отражают уже процесс транслокации протона через мембрану.

На сухих пленках ПМ, обладающих высокой степенью ориентации мембран, получены фотопотенциалы до нескольких вольт. Кинетика медленных стадий генерации и разрядки фотопотенциала и кинетика образования и распада промежуточной формы M фотоцикла Бр имеют близкий характер. Этот результат подтверждает представление о том, что прохождение стадии M в фотоцикле Бр, контролируемое электрическим полем, отражает конформационные поляризационные перестройки макромолекулярного ПБК в процессе его фотопревращений.

Применение в биотехнологии. Своеобразное сочетание фотохромных и фотоэлектрических свойств пленок ПМ, содержащих Бр, делает этот белок перспективным материалом в биотехнических быстродействующих устройствах записи, хранения и считывания информации. Развитие этой области, получившей название нанобиология, основано на использовании механизмов быстрого преобразования энергии света в макромолекулярных фоточувствительных комплексах белок-хромофор (белок-хлорофилл, белок-ретиаль).

В перспективе намечается создание нанобиомолекулярных компьютеров, элементы которых будут отличаться чрезвычайно малыми габаритами (нанометры) и высокими скоростями обработки информации.

Посмотрим, каким образом можно использовать Бр для этих целей. Фотоцикл Бр сопровождается возникновением и сменой хорошо разрешаемых спектральных максимумов поглощения (рис. XXIX.5), причем продукты фотоцикла (формы Бр) сами обладают светочувствительностью и способны изменять свое состояние и спектральные свойства при дополнительном освещении. Например, образованная под действием желтого (570 нм) света форма M_{412} может под действием синего света регенерировать в исходное состояние Br_{570} .

Кроме того, при переходе $Br_{570} \rightarrow M_{412}$ под действием желтого света в сухих пленках ориентированных ПМ может возникать фотопотенциал до нескольких вольт в результате смещения протона от шифова основания к первичному акцептору Асп 85. Этот фотоэлектрический сигнал может быстро уменьшаться при освещении синим светом, индуцирующим обратное движение протона и регенерацию M_{412} к исходному состоянию Br_{570} как при комнатной, так и при низких температурах. Такой эффект связан с обратимостью перехода Бр из исходного состояния в относительно стабильный интермедиат фотоцикла M_{412} . Имеется возможность увеличения времени жизни данного продукта различными способами: путем понижения температуры и степени гидратации, химической модификации, замены ретиналя синтетическими аналогами, а также в результате направленного мутагенеза. Все это и является основой для использования пленок ПМ в качестве перспективного материала для записи, хранения и обработки оптической информации. Информация будет записана при воздействии на Бр желтым светом, и может считываться путем регистрации соответствующего электрического сигнала на ПМ, т. е. способом, не разрушающим сделанную запись. Стирание этой записи осуществляется при облучении пленок синим светом и возвращении в исходное состояние Br_{570} .

На тонких пленках ориентированных ПМ (толщиной менее 50 нм) можно достичь разрешения между активными элементами памяти в 60 Å (расстояние между центрами тримеров Бр в структуре ПМ), а возможно, и 30 Å (расстояние между отдельными молекулами Бр в тримере). Техническая проблема состоит в том, как электрическим путем считывать информацию, записанную оптическим способом, с таким же высоким разрешением.

§ 5. Молекулярные основы зрительной рецепции. Зрительные клетки (палочки)

Способность рецепторных клеток сетчатки глаза реагировать на изменение светового потока лежит в основе зрительного восприятия позвоночных и беспозвоночных животных. Процесс трансформации энергии света в фоторецепторный сигнал у позвоночных происходит в светочувствительных клетках сетчатки — палочках и колбочках. Палочки обеспечивают сумеречное зрение. Наиболее подробно молекулярные и мембранные механизмы зрительной рецепции изучены в палочках позвоночных. Палочка способна генерировать зрительный сигнал в ответ на поглощение одного кванта. На рис. XXIX.12 приведена схема палочки.

Наружный сегмент палочки состоит из стопки многочисленных дисков, расположенных перпендикулярно длинной оси клетки. Например, палочка лягушки

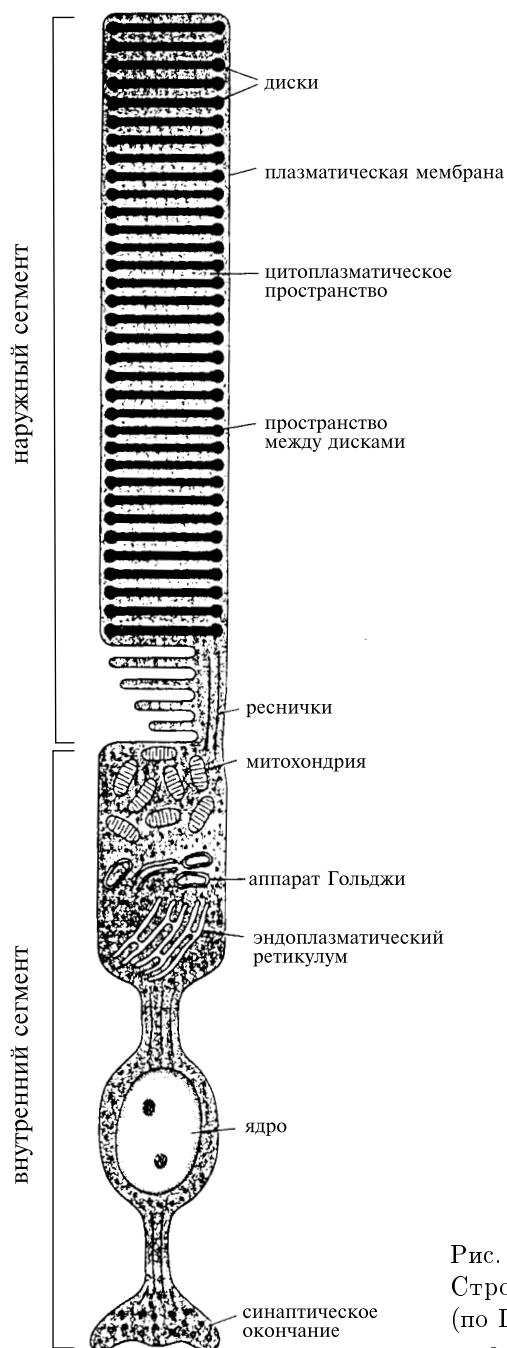


Рис. XXIX.12.
Строение зрительной клетки позвоночных
(по L. Stryer, 1987). Подробные объяснения
в тексте

достигает 60 мкм в длину, 6–8 мкм в диаметре, а ее наружный сегмент содержит 1000–1500 дисков. Диск толщиной 15–16 нм образован двумя соединенными по краям мембранами толщиной около 7 нм. Внутреннее расстояние между почти прилегающими друг к другу мембранами не более 1,5–2,0 нм. Основной молекулярной фоточувствительной структурой зрительной клетки является фоторецепторная мембрана дисков. В ее фосфолипидном бислое встроены молекулы зрительного пигмента родопсина, который по своей структуре во многом сходен с бактериородопсином. Ниже мы подробно рассмотрим фотохимические свойства и превращения родопсина, а сейчас остановимся на основных процессах, ведущих к появлению зрительного сигнала в палочке позвоночных.

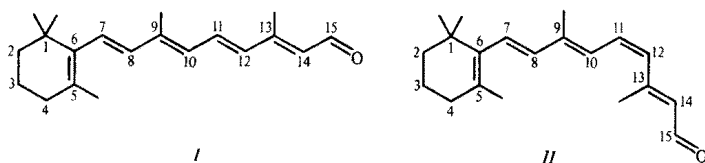


Рис. XXIX.13.

Структурные формулы полностью транс-ретиная (I) и 11-цис-ретиная (II).

В темноте ретиналь-хромофор родопсина находится в 11-цис-положении. Поглощение кванта света переводит его в транс-состояние (рис. XXIX.13). Фотоизомеризация ретиная и дает начало последовательности событий, ведущих к появлению зрительного пигмента. Мембрана палочки обладает селективной проницаемостью для разных ионов. В состоянии покоя это приводит к поляризации мембраны и созданию разности потенциалов между протоплазмой палочки и наружной средой (–40 мВ). Освещение палочки вызывает увеличение исходного отрицательного потенциала внутри клетки, т. е. гиперполяризацию клеточной мембраны (до –80 мВ). Это происходит вследствие того, что под действием света резко уменьшается проницаемость клеточной мембраны для ионов натрия, несущих положительный заряд. Поглощение только одного кванта приводит к закрытию 100–300 натриевых каналов в наружной мембране. Возникающий светоиндуцированный электрический сигнал гиперполяризации передается от наружного сегмента к синаптическому окончанию на внутреннем сегменте палочки и приводит к появлению нервного импульса. Таким образом, в основе нейрофизиологического зрительного сигнала лежит индуцированное фотоизомеризацией ретиная изменение проницаемости наружной мембраны палочки для ионов натрия.

Очевидно, фотоизомеризация ретиная в мембране дисков может приводить к закрытию натриевых каналов во внешней мембране палочки лишь при участии большого числа (более 100) молекул особого внутриклеточного медиатора (посредника), находящихся в цитоплазме наружного сегмента.

Первоначальная гипотеза относительно природы этого посредника отводила его роль ионам Са. Согласно «кальциевой гипотезе», в ответ на действие света ионы Са выбрасываются изнутри фоторецепторных дисков в цитоплазму наружного сегмента, диффундируют к плазматической мембране и блокируют в ней Na^+ -каналы.

В темноте же Ca^{2+} активно «закачивается» из цитоплазмы снова внутрь дисков. Однако опыты Фесенко (1985) показали, что проводимость наружной мембраны палочки не изменяется под действием Ca^{2+} , который, следовательно, не является клеточным медиатором в процессе зрительной рецепции. В то же время оказалось, что циклический нуклеотид цГМФ (3', 5'-циклический гуанозин-монофосфат) способен непосредственно открывать натриевые каналы мембраны палочек. В темно-адаптированном рецепторе концентрация цГМФ в цитоплазме наружного сегмента весьма велика, поэтому очевидно, что циклический нуклеотид цГМФ в темноте поддерживает Na^+ -каналы в открытом состоянии. Если происходит гидролиз цГМФ (под действием фермента фосфодиэстеразы ФДЕ), то концентрация цГМФ резко падает, а натриевые каналы переходят в закрытое состояние.

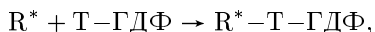
Именно на этом основана роль цГМФ как клеточного медиатора. Изменение его концентрации в наружном сегменте регулирует состояние Na^+ -каналов внешней мембраны и, как следствие, величину трансмембранного электрического потенциала палочки. Между световым возбуждением родопсина и гидролизом цГМФ фосфодиэстеразой существует сложная многоступенчатая функциональная связь, природа которой установлена в конце 30-х годов благодаря работам целого ряда лабораторий. Было показано, что на свету в наружном сегменте действительно резко уменьшается уровень цГМФ при одновременной активации нескольких сот молекул фермента ФДЕ. Для этого требуется присутствие также ГТФ, как источника энергии. Фактором, связывающим ГТФ в клетке, является особый G-белок трансдуцин Т, ответственный за активацию ФДЕ. Молекула трансдуцина состоит из трех субъединиц α, β, γ ($T_{\alpha, \beta, \gamma}$).

Трансдуцин может также связывать ГДФ, но в этом состоянии он не способен активировать ФДЕ. Переход трансдуцина в активное состояние из неактивного происходит при обмене ГДФ на ГТФ

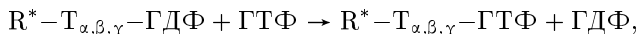


В образованном комплексе $T_{\alpha, \beta, \gamma}$ -ГТФ отщепляется активная α -субъединица трансдуцина T_α и связанная с ней молекула ГТФ. Отделенный от $T_{\alpha, \beta, \gamma}$ комплекс Т-ГТФ в свою очередь активирует фермент ФДЕ. Активация ФДЕ также основана на разной функциональной роли субъединиц α, β, γ , входящих в состав молекулы фермента, из которых γ -субъединица подавляет активность ФДЕ. Именно отщепление γ -субъединицы, ингибирующей фермент, приводит его в активное состояние.

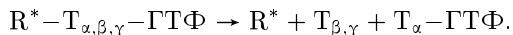
Сложная последовательность реакций запускается при фотоизомеризации ретиналя в родопсине и переводе родопсина R в активированное состояние R^* . Активированный родопсин мигрирует латерально в фоторецепторной мембране, обладающей крайне низкой вязкостью, и образует комплекс с трансдуцином



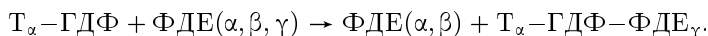
в которой затем ГДФ замещается на ГТФ



с последующей его диссоциацией



Фрагмент Т-ГТФ и активирует непосредственно ФДЕ, «отбирая» у нее γ -субъединицу



Последовательность этих событий представлена на рис. XXIX.14.

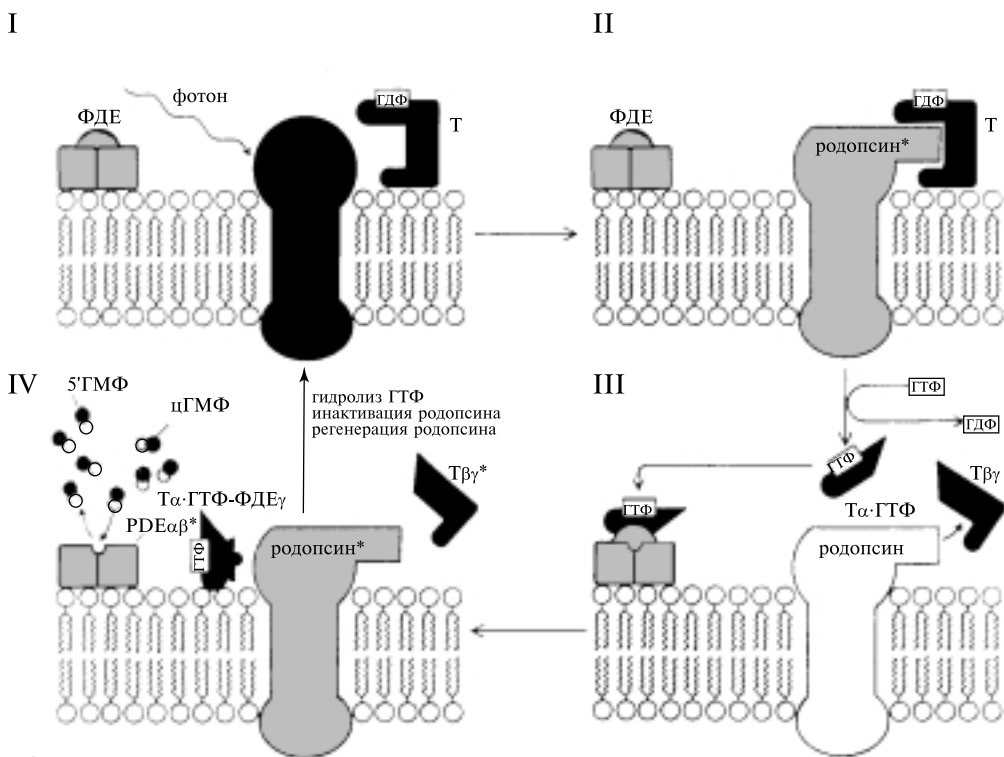


Рис. XXIX.14.

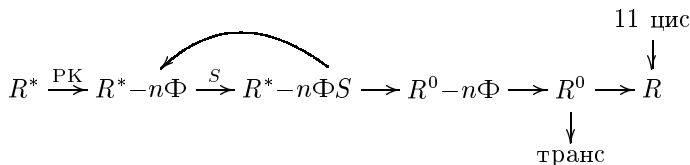
Каскад реакций, лежащих в основе зрительной рецепции (по L. Stryer, 1987)

I — поглощение кванта света активирует родопсин R^* , который затем реагирует с белком-трансдуцином Т; II — происходит замена ГДФ на ГТФ в α -субъединице T_{α} трансдуцина; III — отщепленная T_{α} -ГТФ активирует фосфодиэстеразу ФДЕ, отщепляя ее γ -субъединицу, IV — активированная ФДЕ гидролизует тысячи молекул цГМФ. Через некоторое время ГТФ в α -субъединице T_{α} расщепляется и превращается в ГДФ, T_{α} -ГДФ присоединяется к $T_{\beta\gamma}$. Трансдуктин и ФДЕ восстанавливаются. Родопсин R^* инактивируется и регенерирует в исходное состояние.

Центральное место в этом каскаде реакций занимает стадия IV (рис. XXIX.14), где возникает эффект многократного усиления действия кванта света за счет того, что одна активная молекула ФДЕ(α, β) гидролизует тысячи молекул цГМФ.

Регенерация активированного родопсина R^* осуществляется в ходе последовательных реакций его фосфорилирования родопсин-киназой РК с образованием $R-n\text{Ф}$, где n — число фосфатных групп ($n \simeq 9$). $R^*-n\text{Ф}$ связывается с белком S ,

образуя комплекс $R^* - n\Phi \cdot S$. В этом состоянии уже не происходит дальнейшая активация G -белка трансдуцина родопсином, который релаксирует из активированного состояния $R^* - n\Phi S \rightarrow R^0 - n\Phi S$. Окончательная репарация родопсина осуществляется через ~ 30 минут после его дефосфорилирования (фосфатазой) и присоединения новой молекулы 11-цис-ретиная взамен покинувшего родопсин транс-ретиная:



Обращает на себя внимание сходство приведенной последовательности событий с общей схемой гормональной рецепции (гл. XXVI), протекающей с участием сигнальных G -белков, к классу которых принадлежит и трансдуцин. Этапу связывания гормона с мембранным рецептором и активации G -белка с появлением фрагмента G_α -ГТФ соответствует возбуждение родопсина и перевод трансдуцина в активное состояние T_α -ГТФ.

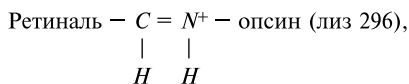
В обоих случаях активные α -субъединицы G -белков (G_α -ГТФ и T_α -ГДФ) в свою очередь активируют соответствующие ферменты (аденилатциклаза и фосфодиэстераза), которые уже модифицируют молекулы клеточных медиаторов сигнала рецепции. Роль последних выполняют циклические нуклеотиды: цАМФ в гормональной рецепции, цГМФ в зрительной рецепции.

Такова основная схема биохимических превращений, лежащих в основе зрительной рецепции. С точки зрения биофизики, центральное место здесь занимает механизм активации родопсина при поглощении кванта света и фотоизомеризации. В основе этого процесса лежат фотохимические превращения, или фотохимический цикл родопсина.

§ 6. Фотохимический цикл родопсина

Родопсин. Фоторецепторная мембрана образована фосфолипидным бислоем, в который встроены молекулы зрительного пигмента родопсина. Вследствие крайне низкой вязкости фоторецепторной мембраны молекула родопсина испытывает в ней быструю вращательную и более медленную латеральную диффузию. Родопсин — хромопротеин с молекулярной массой порядка 40 000. Большой гидрофобный фрагмент молекулы (около 26 000) находится внутри рецепторной мембраны. В этом отношении родопсин напоминает Бр, однако в отличие от последнего он еще содержит меньший гидрофильный фрагмент (12 000) с С-концевым участком в гидрофильной области и на поверхности мембраны. Как и в случае Бр, хромофором родопсина служит ретиналь, представляющий собой половину молекулы β -каротина. Из всех изомеров этой сопряженной полиеновой структуры только 11-цис-форма является хромофором всех известных зрительных пигментов (рис. XXIX.11). В некоторых условиях может образовываться так называемый изородопсин, хромофор которого представляет собой не 11-цис-, а 9-цис-ретиналь. Полипептидная цепь опсина содержит около 400 аминокислот, половина из которых — гидрофобные. Ковалентная связь ретиная с опсином осуществляется при образовании альдиминной связи

между ϵ -аминогруппой лизина (Лиз-296) и альдегидной группой ретиналя. Эта альдиминная связь протонирована и представляет собой протонированное шиффово основание



находящееся в опсине в гидрофобном окружении.



Рис. XXIX.15.

Схема расположения ретиналя в зрительном белке опсине (по Li Tang et al., 1995). Латинские буквы соответствуют принятым в биохимии названиям аминокислот. На светлом поле обозначены аминокислоты, обращенные к плоскости рисунка.

На рис. XXIX.15 показана схема строения зрительного белка опсина, состоящего из семи α -спиралей. Спирали II, III и IV близко расположены друг к другу. Гли 90 (*G*-90) в спирали II и Глю 113 (*E* 113) в спирали III находятся близко к шиффову основанию и эффективно взаимодействуют с ним. Спирали IV, V и VI расположены близко к β -иононовому кольцу хромофора. Отрицательно заряженный остаток Глю 113 является противоионом положительно заряженного протонированного шиффова основания в зрительных пигментах различных позвоночных животных. Он расположен близко ($\sim 3 \text{ \AA}$) к атому C_{12} ретиналя. Однако, в отличие

от Бр (см. § 1), водородная связь между протонированным шиффовым основанием и противоионом в родопсине не является слабой. Она близка по своим свойствам к водородным связям в модельных системах, содержащих ионы Cl^- в качестве противоионов. По-видимому, величина батохромного сдвига в родопсине определяется взаимодействием с отрицательным противоионом, которое стабилизирует положительный заряд около атома азота, а также влиянием иононового кольца, связанного с полиеновой цепью в области 6-*S*-цис-связи ретиналя.

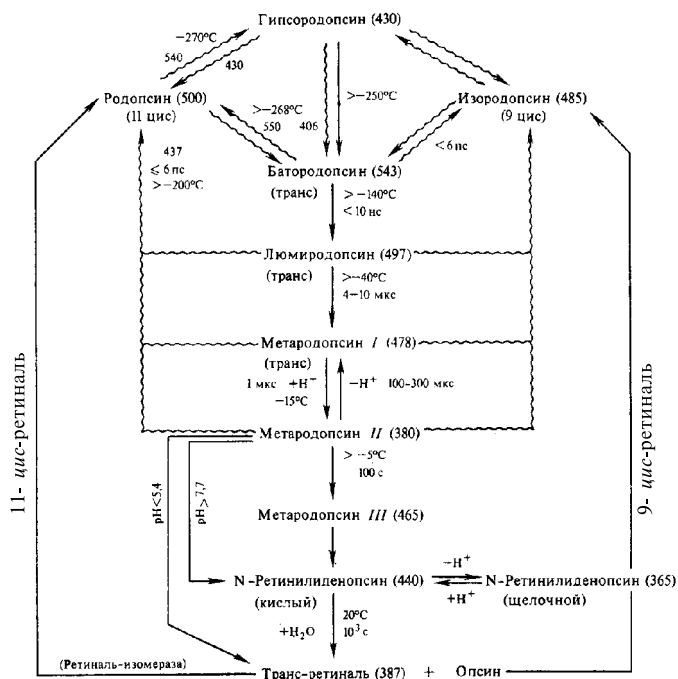


Рис. XXIX.16.
Фотолиз родопсина

Волнистыми стрелками обозначены фотореакции, сплошными — темновые переходы, остальные объяснения см. в тексте.

Фотолиз родопсина. Фотопревращения родопсина запускаются в результате поглощения видимого света. При этом происходит обесцвечивание родопсина и сдвиг максимума в спектре поглощения хромофора с 500 нм в коротковолновую область. В то же время положение полосы поглощения при 278 нм, принадлежащей опсину, и ее интенсивность остаются практически неизменными.

В исходном состоянии в родопсине ретиналь находится в 11-цис, 12-*s*-цис-конфигурации. В результате фотолиза происходит цис-транс-изомеризация хромофора и депротонирование шиффоа основания. Эти процессы сопровождаются изменением взаимодействия ретиналя с опсином и конформации последнего. На конечной стадии разрывается альдиминная связь и высвобождается свободный ретиналь в транс-конфигурации. На рис. XXIX.16 приведена схема фотолиза родопсина, где отмечены максимумы спектров поглощения промежуточных продуктов, температуры, выше которых начинается переход к следующему продукту фотолиза, характерные времена отдельных стадий при комнатной температуре.

Изородопсин, содержащий 9-цис-ретиаль, легко получается в качестве побочного продукта процесса фотолиза: родопсин \rightleftharpoons батородопсин \rightleftharpoons изородопсин, но в рецепторах позвоночных или беспозвоночных он не обнаружен. Как видно, стадии фотолиза до метародопсина *II* при комнатной температуре протекают существенно быстрее, чем последующие превращения. Именно быстрые стадии вплоть до метародопсина *II* относятся непосредственно к фоторецепторному акту — акту трансдукции.

Наибольший физиологический интерес представляет переход метародопсина *I* (478 нм) в метародопсин *II* (380 нм). «Синий» сдвиг максимума поглощения метародопсина *II* до 380 нм означает, что на этой стадии шиффово основание уже полностью депротонировано. На стадии образования метародопсина *II* фосфолипиды, ранее тесно связанные с опсином, могут быть экстрагированы, а опсин частично фосфорилируется, пептидные и SH-группы белка становятся доступными действию внешних агентов; появляются дополнительно титруемые SH-группы; увеличивается объем, занимаемый липидным окружением опсина. Все это указывает на некоторое разрыхление третичной структуры белка при сохранении его вторичной структуры. В самой фоторецепторной мембране вследствие изменения белок-липидных взаимодействий увеличивается микровязкость гидрофобного окружения спин-зонда, погруженного в фоторецепторную мембрану. \square

Огромное количество ненасыщенных жирных кислот в наружном сегменте и высокий уровень потребления кислорода создают опасность фотоокисления липидов (см. гл. XVI) при поглощении света родопсином. Защита осуществляется системой антиоксидантов (α -токоферол), препятствующих развитию процессов перекисного окисления в сетчатке глаза.

Распад образовавшегося в ходе фотолиза метародопсина *II* может идти либо через образование метародопсина *III* с его последующей деградацией, либо благодаря прямому гидролизу с появлением конечного продукта — свободного транс-ретинала.

Восстановление родопсина может происходить на свету (фотореактивация) практически из любого промежуточного продукта фотолиза, включая метародопсин *II* (рис. XXIX.16). Однако физиологическое значение имеет темновая реизомеризация свободного полностью транс-ретинала в 11-цис-конфигурацию и, как следствие, биохимическая регенерация родопсина.

Структурные перестройки родопсина. Фотоцикл родопсина сопровождается структурными перестройками как в скелете ретинала, так и в его ближайшем белковом окружении. В последние годы получены данные, позволяющие связать эти перестройки с функциональной активностью промежуточных продуктов фотоцикла. Первый батointермедиат фотоцикла содержит ретиаль в скрученной 11-транс-15-анти-конформации, образование которой сопровождается тесным взаимодействием с белком, включая противоион Глю 113 вблизи C₁₂.

Спектральные измерения высокого временного разрешения показали, что процесс превращения бато- в люмиродопсин включает промежуточный продукт, который поглощает в более синей области около 477 нм и, соответственно, поэтому получил свое название *BSI* (blue-shifted):



Изучая изменение линейного дихроизма главной полосы поглощения при фотолизе родопсина, удалось определить характер движения хромофора на этих этапах фототикла. Угол, образованный хромофором с плоскостью мембраны, увеличивается от 16° до 24° с появлением бато-продукта.

Однако при образовании *BSI* этот угол опять уменьшается до 5° , а хромофор возвращается к плоскостному расположению в родопсине. В люми-продукте хромофор вновь выходит из плоскости мембраны (16°).

Барьер превращения бато- в *BSI*-продукт связан с необходимостью движения атома водорода 8—Н мимо метильной группы 5— CH_3 . Особое значение имеет также движение метильной группы в положении C_{13} .

В отличие от продукта мета *I*, который фиксируется при низких температурах (рис. XXIX.16), *BSI* проявляет свое присутствие при физиологических температурах.

В состоянии люми происходит релаксация скрученных частей скелета хромофора. Группа $\text{C}=\text{N}$ попадает в среду, где водородные связи становятся очень слабыми, что предшествует последующему депротонированию шиффового основания. В мета *I* продукте водородная связь протона шиффового основания становится еще слабее, так что противоион Глю 113 протонируется. В то же время аминокислота Глю 122 депротонируется, образуя тем самым новый противоион.

Физиологически активное состояние родопсина представлено продуктом мета *II*, который активирует трансдуцин. В этом состоянии шиффовое основание депротонировано. Поскольку депротонирование шиффового основания в мета *II* не сопровождается выбросом протонов, в родопсине должен существовать внутренний акцептор протона (противоион Глю 113). Вместе с тем из внешней среды фоторецепторным диском в мета *II* поглощаются дополнительно два протона.

После замены Глю 134 на Глн в мутантах поглощение протонов извне прекращается, что делает Глю 134 их вероятным акцептором. Остаток Глю 134 находится в спирали III на границе с цитоплазмой.

Наиболее интересные данные, касающиеся природы активированного состояния мета *II*, связаны с существованием мутантов родопсина, не содержащих ретиналя, которые могут активировать трансдуцин в темноте.

В этих мутантах отрицательно заряженный противоион Глю 113 был заменен на нейтральный Глн или неполярный Ала. Способность активировать в темноте трансдуцин проявлялась в них в отсутствии ретиналя. Однако в таких мутантах присоединение 11-цис ретиналя к родопсину мешало их активности в темноте и вновь делало их светочувствительными. Напомним, что в состоянии мета *II* депротонированное шиффовое основание и протонированный противоион Глю 113 становятся одновременно электронейтральными. Отсюда было сделано предположение, что в нормальных физиологических условиях активность родопсина непосредственно обусловлена нейтрализацией противоиона Глю 113 при протонировании его боковой цепи и, как следствие, разрывом солевого мостика между Глю 113 и Лиз 296.

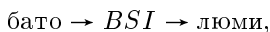
С этой точки зрения можно было бы ожидать также и спонтанного темнового восстановления Глю 113 от внутренних источников протонов помимо шиффового основания. Это привело бы к непредусмотренной активации трансдуцина в темноте. Предотвращение этого эффекта и достигается присутствием ретиналя, который в состоянии 11-цис является, кроме того, стерическим антогонистом темновой

активации родопсина. На свету полностью транс-ретиаль включает электрический механизм активации родопсина, что сопровождается соответствующими конформационными перестройками белка. Однако в темноте 11-цис-ретиаль за счет стерических ограничений препятствует конформационным перестройкам белка, необходимым для активирования родопсина.

Таким образом, само по себе депротонирование шиффова основания не является необходимым для процесса активации родопсина, а служит лишь механизмом его электростатического включения.

Основным фактором здесь является нейтрализация заряда боковой цепи Глю 113. Ретиаль, переходя в состояние полностью-транс, запускает этот процесс, а в темноте в 11-цис форма препятствует «стерически» любым конформационным перестройкам белка, ведущим к активации родопсина. Существуют однако и другие факторы, определяющие характер связывания активного родопсина с трансдуцином. Они включают положения спиралей III и IV в состоянии мета II, стабилизированное дисульфидными связями между ними на внешней поверхности фоторецептора.

Большую роль в образовании связи с трансдуцином играет и взаимодействие β -иононового кольца и метильной группы 9—CH₃ полностью транс-ретиаля с аминокислотными остатками на поверхности спиралей III, IV. Так, освещение зрительного пигмента, содержащего ретиаль без метильной группы 9—CH₃ (цис-9-деметилованный ретиаль), приводило к падению активирования им G-белка на 80%. Движение метильной группы 13—CH₃ влияет на скорость перехода



которое резко возрастает при удалении этой метильной группы, очевидно, вследствие появления свободного объема вблизи ретиаля.

Взаимодействия белок-хромофор около C-13 также важны для достижения необходимой конформации белка на стадии регенерации родопсина и его фосфорилирования родопсинкиназой.

§ 7. Первичный акт фотопревращения родопсина

В настоящее время можно считать полностью доказанным, что начальный этап фотоцикла и образование бато-продукта происходит в результате цис-транс-фотоизомеризации ретиаля. Однако доказательство этого факта потребовало не только больших экспериментальных исследований. Необходимо было также достичь теоретического понимания механизмов быстрой фотоизомеризации ретиаля в плотной белковой среде при участии и других молекулярных групп, со скоростями, превышающими таковые в модельных растворах с малой вязкостью. Мы остановимся кратко на развитии этого направления, где имеется много общего с соответствующими работами в области фотосинтеза и фотопревращений бактериородопсина.

▽ **Цис-транс-фотоизомеризация.** Простое сравнение химических конфигураций родопсина (11-цис) и изородопсина (9-цис) показывает, что их взаимопревращение через единственный общий интермедиат батородопсин возможно, если этот процесс включает цис-транс-фотоизомеризацию. Иными словами, в батородопсине ретиаль должен находиться в транс-конфигурации, что подтверждено в настоящее

время большим количеством работ. Если исходить из 11-цис-, 12-*s*-цис-исходной формы ретиналя, то начальная стадия фотолиза родопсина включает следующие изменения конформации ретиналя: 11-цис, 12-*s*-цис \rightarrow 11-транс, 12-*s*-цис \rightarrow 11-транс, 12-*s*-транс. \square

Цис-транс-изомеризация на стадии образования батородопсина была подтверждена структурными исследованиями, а также данными по круговому дихроизму, резонансной раман-спектроскопии. Так исследованы фотохимические реакции синтетических аналогов родопсина, где атомы углерода C_{10} и C_{13} в полиеновой цепи 11-цис-ретиналя были соединены трехуглеродным алкильным мостиком. Такая модификация не мешала изменениям электронной плотности или смещениям протона в ретинале, но предотвращала возможность цис-транс-фотоизомеризации около двойной связи $C_{11}=C_{12}$. Фотопревращения этого химически модифицированного родопсина носили уже совсем другой характер по сравнению с нативным родопсином. Продукты фотохимических реакций резко отличались по своим свойствам от батородопсина. Они не содержали транс-изомер ретиналя, но образовывались также в пикосекундном временном диапазоне.

Показано также, что при комнатной температуре батородопсин образуется за время порядка 3 пс не только из родопсина (11-цис), но и из изородопсина (9-цис) (Альфано). Это может происходить, только если ретиналь батородопсина находится в транс-состоянии, поскольку такая конфигурация является единственной общей для обоих 9-цис- и 11-цис-изомеров. Аналогичный вывод следует и из транс-формации метародопсина *I*, который, находясь в полностью транс-конфигурации, претерпевает фотопревращения в те же самые 11-цис- и 9-цис-изомеры.

Роль протона. Поглощение света и изменение электронного состояния должно привести к соответствующим молекулярным перестройкам в хромофоре и его ближайшем белковом окружении. Цис-транс-изомеризация ретиналя может быть не единственной из таких фотоиндуцированных перестроек. Эти вопросы изучали методами низкотемпературной спектроскопии, с помощью которых исследовали фотопереход родопсин \rightarrow батородопсин. Применение абсорбционного флеш-фотолиза с пикосекундным лазерным возбуждением позволило измерить скорость этой реакции в широкой области температур. Оказалось, что при комнатной температуре время образования батородопсина < 6 пс, а при 4 К оно составляет 36 пс (Рентцепис). Кривая зависимости константы скорости от температуры носит двухфазный характер и, кроме того, обнаруживает явно выраженный изотопный эффект уменьшения (в 7 раз) скорости реакции при дейтерировании (рис. XXIX.17).

Очевидно, изменение состояния протона осуществляется на ранней стадии фотолиза, которая, таким образом, не может быть сведена лишь к обычной цис-транс-изомеризации ретиналя. Действительно, методами резонансной раман-спектроскопии удалось показать, что образование батородопсина сопровождается появлением трех сильных линий при 853, 875 и 921 см^{-1} , которые соответствуют высокочастотным ($\approx 10^{-12}$ с) колебаниям протонов. Замена водорода на дейтерий в батородопсине у атомов углерода C_{10} , C_{11} , C_{12} вызывает сдвиг этих линий. Данные результаты указывают на появление в батородопсине сильных внеплоскостных колебаний атомов Н, связанных с СН_3 -группами ретиналя.

Особенностью наблюдаемого эффекта является уменьшение частоты (на 60 см^{-1}) колебаний протона H_{12} около C_{12} и внеплоскостных колебаний протонов

H_{11} и H_{12} в батородопсине по сравнению с родопсином, изородопсином и свободным полностью транс-ретином. Предполагают, что наблюдаемый эффект обусловлен сильным электрическим полем в области C_{12} , вызванным отрицательно заряженными группами опсина COO^- , вблизи которых оказывается протон H_{12} ретиналя.

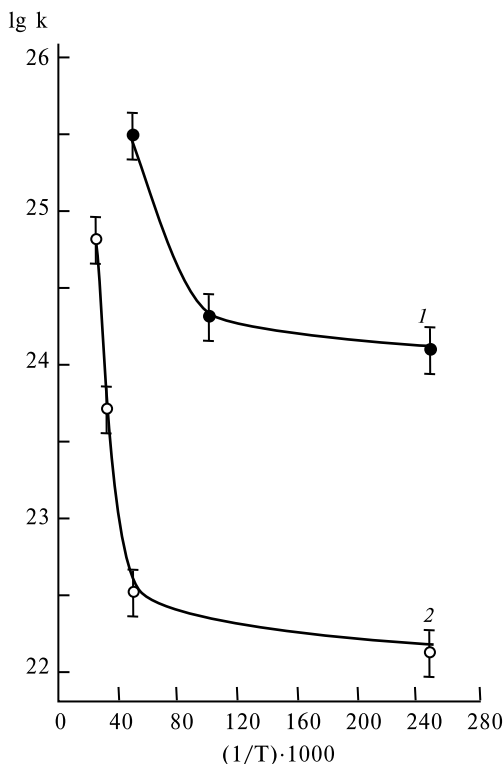


Рис. XXIX.17.

Кривые температурной зависимости константы скорости k перехода родопсин — батородопсин в аррениусовских координатах (по К. S. Peters et al., 1977):

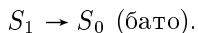
1 — обычные образцы родопсина, 2 — дейтерированные образцы родопсина.

Очевидно, в батородопсине происходит не только образование транс-конфигурации («излом» цепи ретиналя) по двойной связи $C_{11}=C_{12}$, но и дополнительное скручивание вокруг одиночной связи $C_{10}-C_{11}$. В результате этого протоны метильных групп $C_{11}-C_{14}$ попадают в поле заряженных групп белка, который, таким образом, может влиять на формирование батоформы. Изучение раман-спектров родопсина показало также, что в 11-цис-ретиале происходят сильные смещения по нескольким нормальным координатам низкочастотных колебаний. Это говорит о том, что фотоизомеризация вызывает изменения во многих частях скелета ретиналя, затрагивая большое количество координат торсионного вращения.

Фемтосекундные изменения. Эксперименты, выполненные с применением фемтосекундной техники (Матис, Шенк), позволили зарегистрировать изменения поглощения родопсина в области 480–580 нм на временах до 500 фс. Оказалось, что выцветание полосы поглощения родопсина при 500 нм и образование первичного фотопродукта полностью заканчиваются в течение 200–300 фс. Это намного короче, чем время обычной электронно-колебательной релаксации (10^{-11} – 10^{-12} с).

Были обнаружены также когерентные колебания абсорбции в области полосы поглощения бато-продукта (530–580 нм) с периодом 0,1 пс. Авторы приписали эту колебательную моду торсионным осцилляциям скелета ретиналя. На рис. XXIX.18 приведена схема возникновения этих колебаний. Как видно, при движении вдоль торсионной координаты по поверхности потенциальной энергии S_1 синглетного возбужденного состояния родопсина в течение 200 фс происходит переход на кривую основного состояния S_0 батопродукта. Этот быстрый переход в области пересечения кривых S_1 и S_0 совершается без потери когерентности колебаний волнового ядерного пакета и не сопровождается колебательной релаксацией в возбужденном состоянии родопсина (см. рис. XXIX.9). Высокая скорость достижения области пересечения и большая вероятность перехода на поверхность S_0 бато-продукта определяют высокий квантовый выход образования бато-продукта. Согласно экспериментальным данным, соотношение квантовых выходов переходов из возбужденного состояния S_1 в исходную форму и бато-продукт составляет 0,33 : 0,67.

В модельных системах скорость фотоизомеризации ретиналя намного ниже, чем в опсине. Так, в метаноле время образования фотопродукта 11-цис-ретиналя в комплексе с протонированным шиффовым основанием составляло ~ 8 пс, а квантовый выход 0,15. Очевидно, опсин ускоряет фотоизомеризацию ретиналя. Это определяется особенностями белок-хромофорного взаимодействия. Среди факторов, способствующих этому, можно назвать электростатическое отталкивание между 13-CH₃-группой и 10-N в родопсине, которое ускоряет скручивание скелета ретиналя и переход



В целом, слабая температурная зависимость (до 4 К) и высокая скорость фотоизомеризации в родопсине являются следствием специфического белкового окружения ретиналя.

В растворах, где полярные молекулы растворителя создают плотную сольватную оболочку, изомеризация затруднена вследствие причин стерического характера. При учете свободной энергии сольватации в растворе изменяется потенциальная кривая, так что на ней уже появляется барьер, затрудняющий цис-транс-

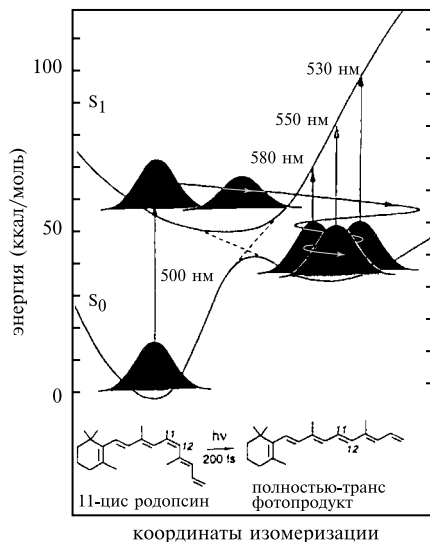


Рис. XXIX.18.

Поверхности потенциальной энергии состояний S_0 и S_1 при фотоизомеризации ретиналя в фемтосекундном диапазоне (по G. G. Kochenderfer, R. A. Mathies, 1995). Показаны колебательные изменения поглощения при 530, 550, 580 нм.

переход в возбужденном состоянии. В этом состоит причина того, что в родопсине время фотоизомеризации (6 пс) намного меньше, чем в растворах ($\sim 1 \div 5$ нс). \square

Из рис. XXIX.19 видно, что свободная энергия ($\Delta F = \Delta U - T\Delta S$) батородопсина больше (на ~ 55 кДж) энергии исходного родопсина. Поскольку цис-транс-изоме-

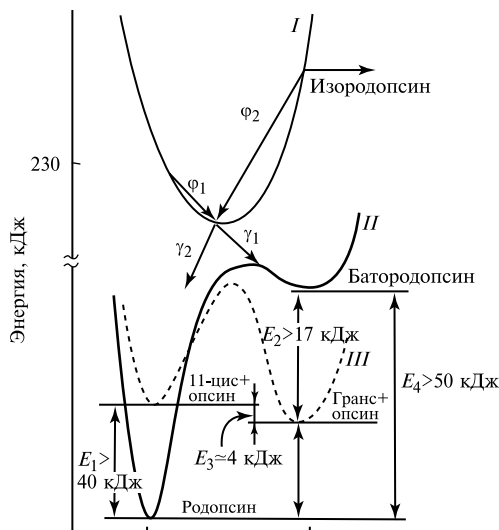


Рис. XXIX.19.

Кривые потенциальной энергии основного и возбужденного состояний в родопсине по торсионной координате C_{11-12}

I — возбужденное состояние родопсина и батородопсина, II — основное состояние родопсина и батородопсина; III — основное состояние изолированного хромофора; ϕ_1, ϕ_2 — эффективности достижения потенциального минимума родопсином и батородопсином по C_{11-12} ; γ_1, γ_2 — эффективности перехода с этого минимума в конфигурации полностью транс- и 11-цис-основного состояния.

ризация при 77 К не сопровождается большими изменениями энтропии, эта разница отражает непосредственное запасание энергии света за счет повышения внутренней энергии в конформации батородопсина. Свободный ретиналь не обладает способностью запасть энергию при цис-транс-переходе (см. рис. XXIX.19, III). Поэтому этот эффект обусловлен особым микроокружением ретиналя в белке и, в частности, его электростатическими воздействиями с противоионом. Например, увеличение внутренней энергии и напряженности конформации произойдет, если в результате поворота ретиналя при цис-транс-переходе протонированный атом азота (^+NH) закрепится в новом положении, при котором увеличится расстояние между ним и противоионом белка COO^- .

∇ Безбарьерный характер кривой общего возбужденного состояния родопсина и батородопсина является следствием специфического белкового окружения ретиналя и обеспечивает его быструю изомеризацию. \square