

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ



*На правах рукописи*

**Кусочек Павел Александрович**

**Моделирование механизмов первичных фотохимических реакций и  
фотоиндуцированной динамики ретиналь-содержащих белков**

1.4.4 – Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

к.ф.-м.н. Боченкова А.В.

Москва – 2022

# Оглавление

---

Введение .....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	13
1.1. Микробиальные родопсины и родопсины животных .....	13
1.1.1. Бактериородопсин .....	15
1.1.2. KR2 родопсин .....	18
1.1.3. Зрительный родопсин .....	21
1.2. Исследование влияния окружения на фотофизические свойства реакции фотоизомеризации РПШО .....	24
1.2.1. Исследование влияния окружения на спектральные свойства РПШО.....	27
1.2.2. Исследование динамики возбужденного состояния РПШО в растворе.....	30
1.2.3. Исследование динамики возбужденного состояния РПШО в газовой фазе ....	31
1.2.4. Исследование влияния белкового окружения на динамику возбужденного состояния РПШО в родопсинах.....	34
1.2.5. Исследование нереакционноспособных состояний в родопсинах.....	37
1.2.6. Фотохромные реакции родопсинов.....	41
1.3. Методы теоретической химии .....	42
1.3.1. Метод EFP .....	42
1.3.2. Метод CASSCF .....	44
1.3.3. Метод ХМСQDPT2 .....	46
Глава 2. Расчетная часть .....	53
2.1 Описание свойств изомеров и модифицированных форм РПШО в газовой фазе .....	53
2.1.1 Расчет энергий и градиентов методом ХМСQDPT2 .....	53
2.1.2 Расчет времен жизни возбужденных состояний .....	54
2.2 Описание свойств РПШО в белковом окружении родопсина KR2, бактериородопсина и зрительного родопсина .....	55
2.2.1 Молекулярно-динамическое моделирование .....	55
2.2.2 Оптимизация геометрии структур и проведение колебательного анализа методом КМ/ММ.....	56
2.2.3 Молекулярная метадинамика.....	59
2.2.4 Расчет энергий и электронно-колебательных спектров методом ХМСQDPT2 .....	60
Глава 3. Обсуждение результатов .....	63
3.1 Исследование фотофизических свойств изомеров РПШО в газовой фазе .....	63

3.1.1	Построение профилей потенциальной энергии для изомеров РПШО при вращении вдоль координаты изомеризации в первом возбужденном состоянии .....	63
3.1.2	Анализ $S_1-S_n$ переходов в изомерах РПШО.....	66
3.1.3	Заключение .....	68
3.2	Исследование фотофизических свойств модифицированных форм РПШО .....	70
3.2.1	Исследование фотофизических свойств ДМ-РПШО.....	71
3.2.2	Исследование фотофизических свойств Л-РПШО .....	73
3.2.3	Заключение .....	77
3.3	Исследование фотофизических свойств РПШО в реагентах и первичных интермедиатах реакции фотоизомеризации родопсина KR2, бактериородопсина и зрительно родопсина .....	78
3.3.1	Исследование структур реагентов и первичных интермедиатов родопсина KR2 и зрительного родопсина .....	79
3.3.2	Исследование электронно-колебательных спектров реагентов и первичных интермедиатов родопсина KR2 и зрительного родопсина.....	85
3.4.3	Исследование структур реагента и первичного интермедиата бактериородопсина.....	93
3.4.4	Исследование электронно-колебательных спектров реагента и первичного интермедиата бактериородопсина .....	96
3.4.5	Заключение .....	101
3.4	Исследование гетерогенности основного состояния родопсина KR2 и ее влияния на фотофизические свойства РПШО .....	104
3.4.1	Исследование гетерогенности активного центра мономера родопсина KR2 в водном растворе методом молекулярного моделирования .....	104
3.4.2	Исследование гетерогенности активного центра пентамера родопсина KR2 в липидном бислое методом молекулярной метадинамики .....	109
3.4.3	Расчет энергий вертикальных переходов и исследование электронно-колебательных спектров конформеров родопсина KR2 .....	112
3.4.4	Заключение .....	122
	Основные результаты и выводы .....	124
	Список сокращений.....	125
	Список литературы.....	127
	Благодарности.....	146
	Приложения.....	147
	Приложение 1. ....	147
	Приложение 2. ....	150

# Введение

---

**Актуальность темы.** Родопсины – широкое семейство трансмембранных фоточувствительных белков, которые присутствуют в эукариотах, бактериях и археях. Хромофорная группа родопсинов, протонированное основание Шиффа ретиналя (РПШО), способна поглощать фотон определенной длины волны, что приводит к первичной реакции изомеризации ретиналя по двойной связи и обеспечивает возможность родопсинов использовать энергию света для выполнения различных биологических функций. Родопсины включают в себя две группы белков. Первая группа представлена микробиальными родопсинами, относимыми к типу I и присутствующими в бактериях, археях и низших эукариотах. Вторая группа обозначается как тип II и состоит из белков, называемых родопсинами животных и найденных в многоклеточных организмах. Две группы различаются аминокислотной последовательностью, но имеют схожую структуру из семи альфа-спиралей, расположенных в мембране. РПШО принимает полностью-*транс* конфигурацию в микробиальных родопсинах и после фотоизомеризации становится 13-*цис* изомером. В родопсинах животных фотоизомеризация протекает из 11-*цис* конфигурации РПШО в полностью-*транс*. Микробиальные родопсины используются организмами в качестве ионных насосов, каналов и светочувствительных сенсоров. Родопсины II типа ответственны за зрение и сенсорные функции у животных.

Реакция фотоизомеризации РПШО в родопсинах является сверхбыстрой и протекает на фемтосекундном временном диапазоне с высоким квантовым выходом, что является одним из самых быстрых биологических процессов. Сверхбыстрые времена фотоизомеризации, сотни фемтосекунд, заметно увеличиваются, когда РПШО подвергается фотовозбуждению в растворе вне белкового окружения. Так, например, известно, что для РПШО в метаноле время образования первичного фотопродукта составляет 15 пс. Также известно, что даже в белковом окружении сверхбыстрые реакции фотоизомеризации РПШО в разных родопсинах могут отличаться в несколько раз. Долгое время считалось, что наибольшей скоростью фотоизомеризации из всех родопсинов I и II типов обладает бычий зрительный родопсин (ЗР), который находится в фоторецепторных клетках сетчатки глаза и ответственен за сумеречное зрение. Фотоизомеризация РПШО в ЗР занимает 200 фс, в результате чего образуется

первичный интермедиат. Во многом тот факт, что реакция фотоизомеризации протекает наиболее быстро именно в животных родопсинах, связывали с исходной 11-*цис* конфигурацией хромофорной группы. Так как в родопсинах I типа находится полностью *транс*-ретиаль, то на протяжении всего времени изучения этого белкового семейства считалось, что микробиальные родопсины не могут достичь скорости фотоизомеризации, сопоставимой с таковой в ЗР. Действительно, одним из самых изученных и репрезентативных микробиальных родопсинов является протонный насос из археи *Halobacterium salinarum*, бактериородопсин (БР), для которого время образования первичного интермедиата более чем двукратно уступает таковому в ЗР и составляет 500 фс, что является характерным для других родопсинов I типа. Тем не менее, недавно был открыт микробиальный родопсин KR2 (KR2) из бактерии *Krokinobacter eikastus*, который обладает двумя характеристиками, меняющими представление о функционировании родопсинов и микробиальных родопсинов, в частности. Во-первых, данный белок является первым открытым родопсином, обладающим функцией натриевого насоса, что раньше считалось невозможным. И второй отличительной чертой KR2 является время образования первичного интермедиата, которое составляет 180 фс и сопоставимо со временем образования первичного интермедиата в зрительном родопсине. Таким образом, окружение, в котором находится хромофорная группа, существенным образом влияет на ее фотохимические свойства.

Задача по установлению факторов, которые влияют на скорость и специфичность изомеризации РПШО в различных средах, имеет фундаментальное значение для объяснения механизмов высокоэффективного функционирования родопсинов, что и определяет ее актуальность. Решение данной задачи с теоретической точки зрения требует комплексного подхода, который предполагает проведение расчетов свойств изомеров РПШО как в изолированном состоянии, так и в белковом окружении. Для корректного сравнения результатов расчеты в различном окружении должны быть выполнены на одном уровне теории с использованием методов квантовой химии, позволяющих сбалансированно описывать большие области поверхностей потенциальной энергии (ППЭ) основного и возбужденных электронных состояний, в том числе вблизи их пересечений, что особенно важно для исследования механизмов фотоизомеризации биологических хромофоров.

**Степень разработанности темы исследования.** Теоретические исследования свойств РПШО, проведенные ранее, обладают несколькими недостатками. При моделировании механизмов фотохимических реакций хромофорных групп родопсинов в основном использовались либо однореференсные методы квантовой химии, которые не подходят для исследования широких областей изменения геометрических параметров молекулярных систем, либо многоконфигурационный метод самосогласованного поля в полном активном пространстве (CASSCF), не учитывающий динамическую электронную корреляцию, что в случае систем, содержащих РПШО, может приводить к некорректным результатам даже на качественном уровне. Также во многих исследованиях отсутствовало комплексное рассмотрение свойств изомеров РПШО в изолированном состоянии и белковом окружении на одном уровне теории. В таком случае невозможно правильно оценить роль и вклад белкового окружения в изменение фотофизических и фотохимических свойств РПШО по сравнению с газовой фазой.

В данной работе для описания первичных фотохимических реакций и фотофизических свойств РПШО в изолированном состоянии и белковом окружении предлагается использовать инвариантный метод многоконфигурационной квазивырожденной теории возмущений второго порядка (ХМCQDPT2) и комбинированный метод квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) на его основе. Инвариантность метода относительно ортогональных преобразований базиса модельного пространства является одним из его главных достоинств и позволяет исследовать области ППЭ вблизи пересечения электронных состояний, характеризующихся сильным смешением векторов нулевого приближения.

Механизмы фотоизомеризации РПШО в зрительном родопсине и бактериородопсине изучаются уже давно, однако ни в одной из теоретических работ не проводилось сравнение фотоиндуцированной динамики первичных фотохимических реакций данных белков на ранних временах с явным учетом вибронных взаимодействий при фотовозбуждении. Родопсин KR2 открыт недавно и исследован в значительно меньшей степени, чем ЗР и БР. В литературе отсутствуют теоретические работы, посвященные изучению динамики первичной фотохимической реакции белка KR2 на ранних временах с явным учетом вибронных взаимодействий при фотовозбуждении, а также ни в одной из теоретических работ не изучался вопрос о природе реакционноспособных и нереакционноспособных форм белка, приводящих к

существенно различным временам жизни электронно-возбужденного состояния.

**Целью работы** является определение роли белкового окружения в механизме первичных фотохимических реакций и фотоиндуцированной динамике ретиналь-содержащих белков первого и второго типов с помощью современных методов молекулярного моделирования.

**Объектами исследования** в данной работе являются изомеры РПШО и их химические модификации в изолированном состоянии, а также изомеры РПШО в белковом окружении родопсинов первого и второго типов.

**Предметом исследования** являются первичные фотохимические реакции РПШО в различном окружении.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Построение и анализ поверхностей потенциальной энергии низшего синглетного электронно-возбужденного состояния 9-*цис*, 11-*цис*, 13-*цис* и полностью-*транс* изомеров РПШО в газовой фазе. Определение кинетических параметров реакции фотоизомеризации изолированных хромофорных групп ретиналь-содержащих белков и интерпретация экспериментальных данных по фемтосекундной спектроскопии с временным разрешением.

2. Определение факторов, влияющих на скорость фотоизомеризации изолированного РПШО, путем введения химических модификаций в структуру хромофорной группы и интерпретация экспериментальных данных по фемтосекундной спектроскопии с временным разрешением.

3. Расчет и анализ колебательной структуры полос поглощения при переходе в первое синглетное электронно-возбужденное состояние активных центров родопсинов первого и второго типов и определение роли белкового окружения в фотоиндуцированной динамике ретиналь-содержащих белков на ранних временах.

4. Изучение структурной гетерогенности активного центра родопсина KR2 в реальном окружении и исследование природы реакционноспособных и неактивных состояний данного микробального родопсина.

## Научная новизна.

1. Показано, что динамика релаксации первого синглетного электронно-возбужденного состояния 11-*цис* изомера РПШО сопоставима с характеристическими временами фотоизомеризации в белках зрительной рецепции, тогда как специфичность реакции и средние времена жизни в возбужденном состоянии полностью-*транс* изомера РПШО значительно различаются в изолированном состоянии и белковом окружении микробиальных родопсинов.

2. Определены факторы, влияющие на скорость реакции фотоизомеризации РПШО, и предложен модифицированный аналог полностью-*транс* изомера, время жизни возбужденного состояния которого на порядок меньше по сравнению с исходным хромофором, что подтверждается экспериментальными данными.

3. На основе систематического анализа вибронной структуры электронно-колебательных спектров различных изомеров РПШО в изолированном состоянии и белковом окружении родопсинов первого и второго типов установлена связь фотоиндуцированной динамики на ранних временах со сверхбыстрой скоростью изомеризации в белках с определенной структурой активного центра.

4. Показано, что активный центр родопсина KR2 является структурно гетерогенным, и установлена связь структуры его активного центра и фотоиндуцированной динамики РПШО на ранних временах, что позволяет объяснить наличие реакционноспособных и нереакционноспособных состояний в данном белке.

**Теоретическая значимость.** В данной работе с применением высокоточных неэмпирических методов квантовой химии изучена реакция фотоизомеризации РПШО, что является одним из ключевых процессов, лежащих в основе человеческого зрения и разных биологических функций ряда организмов. Результаты исследования позволяют оценить влияние факторов среды на фотофизические и фотохимические свойства изомеров РПШО, что имеет фундаментальный интерес для понимания механизмов и динамики сверхбыстрых первичных фотохимических реакций.

**Практическая значимость.** Разработанная методология расчета фотофизических и фотохимических свойств изомеров РПШО в разных окружениях может быть использована для описания свойств РПШО в новых открываемых родопсинах и свойств РПШО, содержащих разные структурные модификации. Полученные в рамках

диссертационной работы результаты могут быть использованы в практических целях для создания сверхбыстрых молекулярных моторов и улучшения свойств оптических устройств для хранения, записи и передачи информации, в качестве активной среды которых выступают родопсины.

**Методология и методы исследования.** В работе применялся широкий арсенал современных методов квантовой химии, а также метод молекулярной динамики и метадинамики. Методы молекулярной динамики и метадинамики применялись для поиска различных структур активного центра ретиналь-содержащих белков. Комбинированный метод КМ/ММ с использованием теории функционала электронной плотности (DFT) в варианте PBE0/(aug)-cc-pVDZ/AMBER использовался для оптимизации геометрических параметров активных центров родопсинов, расчета матрицы Гессе и проведения колебательного анализа в основном электронном состоянии. Для расчета профилей ППЭ в возбужденном электронном состоянии и поиска конических пересечений различных электронных состояний РПШО в газовой фазе, а также для расчета энергий вертикальных электронных переходов и градиентов энергии на ППЭ основного и возбужденного состояний РПШО в различном белковом окружении использовался метод ХМСQDPT2. Для учета белкового окружения использовался метод потенциалов эффективных фрагментов (EFP), позволяющий учесть поляризацию электронной плотности основного и возбужденного состояний под действием электростатического поля, создаваемого окружением. Метод CASSCF применялся для построения референсных волновых функций модельного пространства метода ХМСQDPT2. Для моделирования электронно-колебательных спектров в приближении Кондона использовался метод расчета перекрытия колебательных волновых функций различных состояний в модели смещенных многомерных гармонических поверхностей с параллельными нормальными модами.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Динамика релаксации возбужденного состояния изолированного 11-*цис* изомера протонированного основания Шиффа ретиналя (РПШО) является сопоставимой с характеристическими временами фотоизомеризации в белках зрительной рецепции, тогда как специфичность реакции и пикосекундные средние времена жизни изолированного полностью-*транс* изомера РПШО значительно отличаются от данных параметров в белковом окружении микробиальных родопсинов.

2. Предложенная химическая модификация полностью-*транс* изомера РПШО за счёт значительного понижения энергетического барьера при вращении вокруг двойной связи в возбужденном состоянии приводит к снижению среднего времени жизни данного состояния на порядок, которое становится сопоставимым с временами релаксации в бактериородопсине.

3. Родопсины первого и второго типов с определенным структурным мотивом активного центра, в котором присутствует водородная связь между основанием Шиффа и его противоионом, уже на ранних этапах фотоиндуцированной динамики приводят к возбуждению именно тех колебательных мод изомеров РПШО, которые способствуют сверхбыстрой реакции фотоизомеризации.

4. Активный центр микробиального родопсина KR2 обладает структурной гетерогенностью в основном электронном состоянии, что позволяет объяснить природу реакционноспособных и нереакционноспособных состояний данного белка.

**Личный вклад автора** состоит в изучении и систематизации литературных данных, разработке стратегии решения поставленных задач, реализации расчетов методами молекулярной динамики и метадинамики, методами КМ/ММ и методами квантовой химии, обработке полученных данных, в написании статей и подготовке докладов по теме диссертационной работы.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность полученных в диссертационной работе результатов гарантируется применением современных методов квантовой химии, подходящих для описания электронно-возбужденных состояний биологических хромофоров в различном окружении и в широком диапазоне изменения геометрических параметров, а также верификацией полученных результатов путем сопоставления с экспериментальными данными.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы представлены на 14 международных и всероссийских конференциях: международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва 2018, 2019, 2020, 2021, 2022), XXXVI всероссийском симпозиуме молодых ученых по химической кинетике (Московская область 2019), международной школе-конференции Hybrid QM/MM Approaches to Biochemistry and Beyond (Лозанна 2019), научных молодежных школах-конференциях «Химия, физика, биология: пути интеграции»

(Москва 2019, 2022), The CataLight Young Scientist Symposium (Германия 2020), Virtual Winter School on Computational Chemistry (Швейцария 2021), ACS Spring Meeting 2021 (США 2021), ACS Fall Meeting 2021 (США 2021) и 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ (Москва 2021).

### **Публикации по теме диссертации**

Основное содержание работы в полной мере изложено в 9 публикациях: из них 4 статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.4 – «Физическая химия», и 5 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях. В работах, опубликованных в соавторстве, вклад Кусочек П.А. является основным в части квантовохимического моделирования.

*Публикации в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности:*

1) Gruber E., Kabylda A.M., Nielsen M.B., Rasmussen A.P., Teiwes R., **Kusochek P.A.**, Bochenkova A. V., Andersen L.H. Light Driven Ultrafast Bioinspired Molecular Motors: Steering and Accelerating Photoisomerization Dynamics of Retinal // Journal of the American Chemical Society. — 2022. — Vol. 144, № 1. — P. 69–73; - **IF: 15.419 (Web of Science 2020)**

2) **Kusochek P.A.**, Scherbinin A. V., Bochenkova A. V. Insights into the Early-Time Excited-State Dynamics of Structurally Inhomogeneous Rhodopsin KR2 // The Journal of Physical Chemistry Letters. — 2021. — Vol. 12, № 35. — P. 8664–8671; - **IF: 6.475 (Web of Science 2020)**

3) **Kusochek P.A.**, Logvinov V. V., Bochenkova A. V. Role of the Protein Environment in Photoisomerization of Type I and Type II Rhodopsins: a Theoretical Perspective // Moscow University Chemistry Bulletin. — 2021. — Vol. 76, № 6. — P. 407–416; - **IF: 0.171 (Scopus 2021)**

4) Kiefer H. V., Gruber E., Langeland J., **Kusochek P.A.**, Bochenkova A. V., Andersen L.H. Intrinsic photoisomerization dynamics of protonated Schiff-base retinal // Nature Communications. — 2019. — Vol. 10, № 1. — P. 1210; - **IF: 12.121 (Web of Science 2019)**

*Список публикаций в сборниках материалов и тезисов конференций:*

5) **Кусочек П.А.**, Логвинов В.В. Связь динамики фотохромных реакций на ранних

временах со структурой активного центра в различных микробильных и животных родопсинах // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», секция «Химия». — М.: Издательство «Перо» [Электронное издание], Москва, 2022. — С. 728.

6) **Кусочек П.А.**, Логвинов В.В., Боченкова А.В. Роль белкового окружения в механизме реакции фотоизомеризации хромофорных групп родопсинов I и II типов // Труды 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ. Электроника, фотоника и молекулярная физика. — Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, 2021. — С. 40-42.

7) **Кусочек П.А.** Исследование структурной гетерогенности активного центра бактериальных родопсинов // Материалы XXVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020», секция «Химия». — М.: Издательство «Перо» [Электронное издание], Москва, 2020. — С. 1108.

8) **Кусочек П.А.**, Боченкова А.В. Моделирование структуры и электронно-колебательных спектров протонированного основания Шиффа ретиналя в фотоцикле бактериального родопсина KR2 // Сборник тезисов докладов VII научной молодежной школы-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции». — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (ИХФ РАН), Москва, 2019. — С. 44.

9) **Кусочек П.А.**, Боченкова А.В. Механизм и кинетика фотоизомеризации хромофорных групп ретиналь-содержащих фоторецепторных белков в газовой фазе: теория и эксперимент // XXXVI Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике. Сборник трудов. — Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, 2019. — С. 56.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы из 194 наименований, благодарности, 2 приложений. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста и включает 50 рисунков и 10 таблиц.

**Финансовая поддержка работы.** Работа поддержана грантом РФФИ «Аспиранты» 19-33-90254.

# Глава 1. Обзор литературы

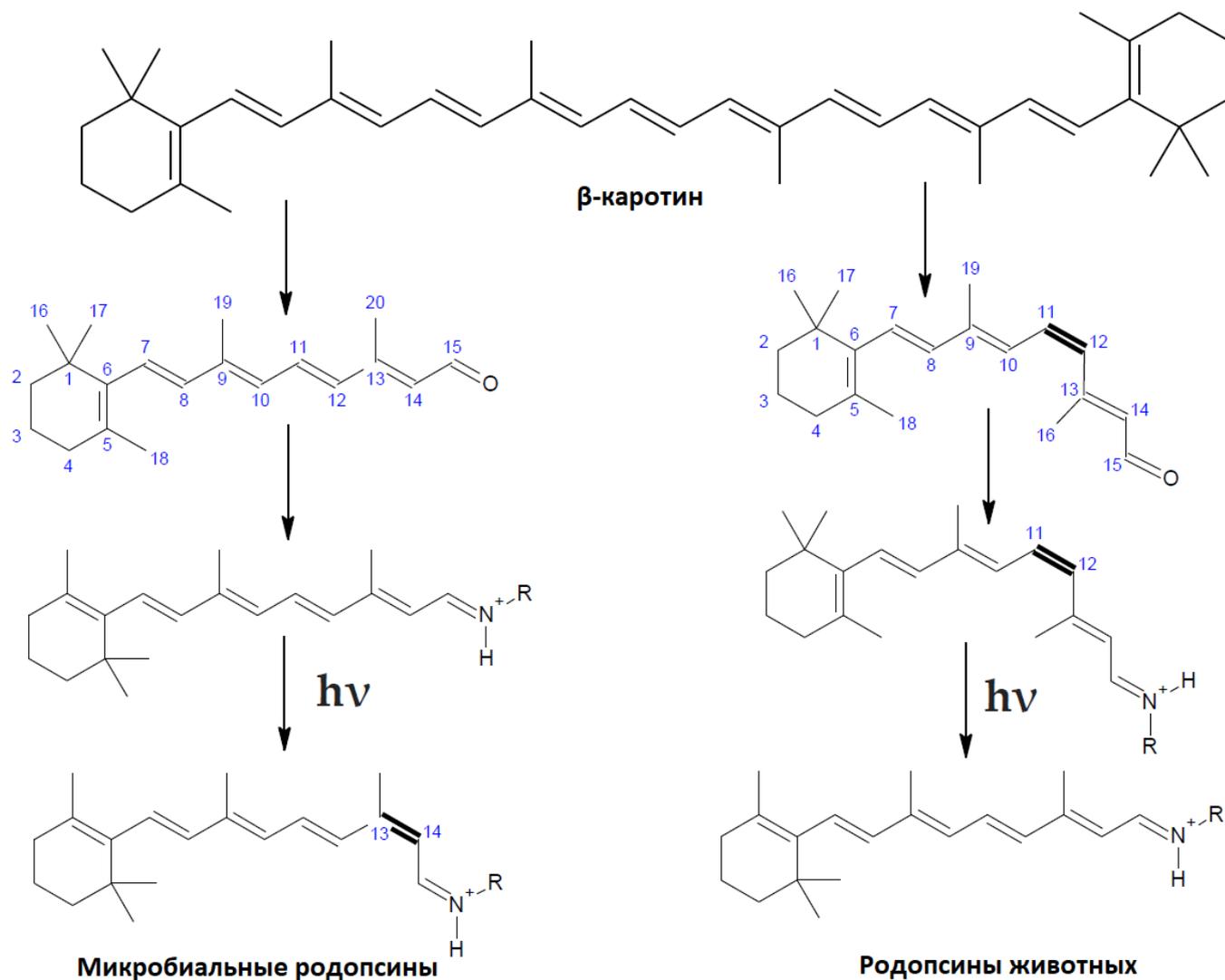
---

## 1.1. Микробиальные родопсины и родопсины животных

Родопсины – фотоактивные белки, расположенные в мембране и способные использовать энергию света для осуществления различных биологических функций в клетках бактерий и животных. Семейство этих белков принято разделять на два типа. Выделяют микробиальные родопсины (тип I), которые встречаются в бактериях, археях, вирусах и низших эукариотах, и родопсины животных (тип II), которые находятся в клетках животных [1,2]. Микробиальные родопсины [3–6] могут нести сенсорные функции, обеспечивая положительный или отрицательный фототаксис [7,8], выступать в качестве катионных или анионных насосов [9], а также в качестве катионных или анионных каналов [10]. Родопсины животных выполняют зрительную функцию [11,12], участвуют в поддержании циркадных ритмов [13,14].

Родопсины первого и второго типов имеют низкий процент гомологии аминокислотной последовательности, но при этом у них наблюдается схожая третичная структура, состоящая из семи трансмембранных  $\alpha$ -спиралей, а N- и C-концевые аминокислотные остатки которой устремлены из и внутрь клетки, соответственно [2,15]. Светочувствительность данных белков обусловлена наличием в их составе хромофорной группы, протонированного основания Шиффа ретиналя (РПШО). Ретиналь является альдегидом витамина А и синтезируется из  $\beta$ -каротина (рисунок 1). Ретиналь соединяется с  $\epsilon$ -аминогруппой боковой цепи лизина в середине седьмой  $\alpha$ -спирали через протонированное основание Шиффа.

Поглощение фотона родопсином приводит к фотоизомеризации РПШО, которая протекает во фемтосекундном временном диапазоне, что позволяет назвать данный процесс одним из самых быстрых в живых организмах. Фотоизомеризация РПШО запускает цепь последовательных реакций, включающих дальнейшее изменение конформации ретиналя, конформации белка и образование промежуточных интермедиатов. Такая последовательность реакций в родопсинах называется фотоциклом. РПШО находится в полностью-*транс* конфигурации в микробиальных родопсинах и изомеризуется в 13-*цис* форму, тогда как в родопсинах животных изомеризация протекает из 11-*цис* в полностью-*транс* форму [2] (рисунок 1).



**Рисунок 1. Образование хромофора микробиальных родопсинов и родопсинов животных в виде протонированного основания Шиффа ретиналя из β-каротина. Первичная фотохимическая реакция в родопсинах I и II типа.**

Поглощенная энергия фотона запасается внутри родопсинов через формирование нерелаксированной изомеризованной структуры РПШО, которая претерпевает дальнейшую релаксацию и обеспечивает функционирование фотоцикла [16]. Первичные продукты фотоцикла, которые образуются сразу после фотоизомеризации РПШО, обладают спектрами поглощения, лежащими в более длинноволновой красной области по сравнению со спектрами белка в темновом состоянии до поглощения фотона. Данные первичные фотопродукты в микробиальных родопсинах принято называть, как J и K интермедиаты, а в родопсинах животных они носят название фотородопсин и батородопсин [1], [17]. Далее, в одной из последующих стадий фотоцикла образуется интермедиат, в котором основание Шиффа становится нейтрально заряженным, так как происходит перенос протона с атома азота основания Шиффа ретиналя на другой

аминокислотный остаток. Такие нейтрально заряженные интермедиаты с депротонированным основанием Шиффа в родопсинах типа I и родопсинах типа II называются M интермедиат и метародопсин II, соответственно [1]. Возвращение фотоцикла в исходное состояние у данных двух типов родопсинов происходит по-разному. В микробиальных родопсинах 13-*цис* РПШО переходит в исходный полностью-*транс* изомер в результате тепловой изомеризации. В родопсинах животных полностью-*транс* ретиналь отщепляется от апобелка опсина, который затем соединяется с 11-*цис* ретиналем, регенерированным при помощи ферментов [18].

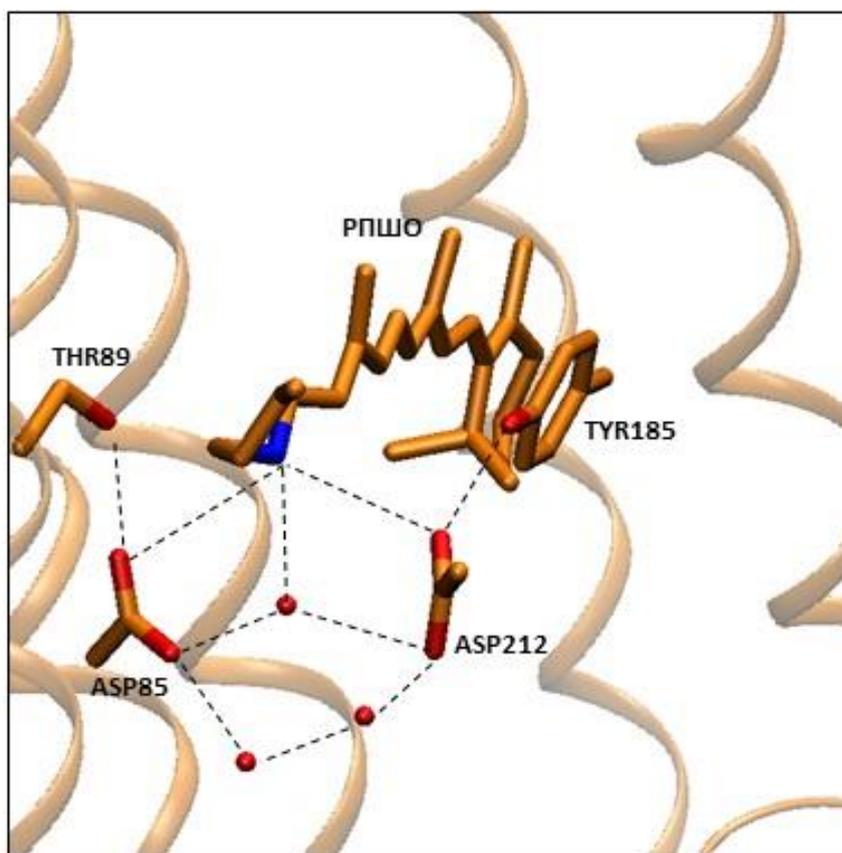
### **1.1.1. Бактериородопсин**

Бактериородопсин (БР) – микробиальный родопсин из археи *Halobacterium salinarum*, выполняющий роль протонного насоса и служащий для переноса протона через плазматическую мембрану. БР - первый обнаруженный родопсин [19]. Данный белок является одним из наиболее исследованных родопсинов и служит основой для изучения других представителей этого семейства. Молекулы БР в мембранах *Halobacterium salinarum* формируют тримеры, которые собираются вместе и образуют двумерную гексагональную кристаллическую решётку, называемую пурпурной мембраной [20]. БР способен преобразовывать энергию света в электрохимический потенциал, который возникает на мембране клетки и нужен для синтеза молекул АТФ [21]. Максимум поглощения БР составляет 568 нм.

БР состоит из 248 аминокислот и содержит 7 трансмембранных  $\alpha$ -спиралей [22], [23]. Структура БР уточнялась разными методами, в том числе с помощью рентгеноструктурного анализа была получена структура с высоким разрешением 1,55 Å [24], также структура с разрешением 1,47 Å [25]. Положительно заряженное РПШО в бактериородопсине, состоящее из полностью-*транс* ретиналя и аминокислотного остатка лизина 216, имеет комплексный противоион, состоящий из остатков D85, D212 и трех молекул воды (рисунок 2).

Фотоцикл БР состоит из интермедиатов  $I_{460}$ ,  $J_{625}$ ,  $K_{590}$ ,  $L_{550}$ ,  $M_{412}$ ,  $M'_{412}$ ,  $N_{584}$  и  $O_{640}$ , начальное состояние обозначается как  $BR_{568}$  [26,27] (рисунок 3). Интермедиаты характеризуются изменениями конформации РПШО и белкового окружения и были идентифицированы по спектральным и кинетическим характеристикам. Основной чертой интермедиатов, предшествующих  $K_{590}$ , являются изменения, которые

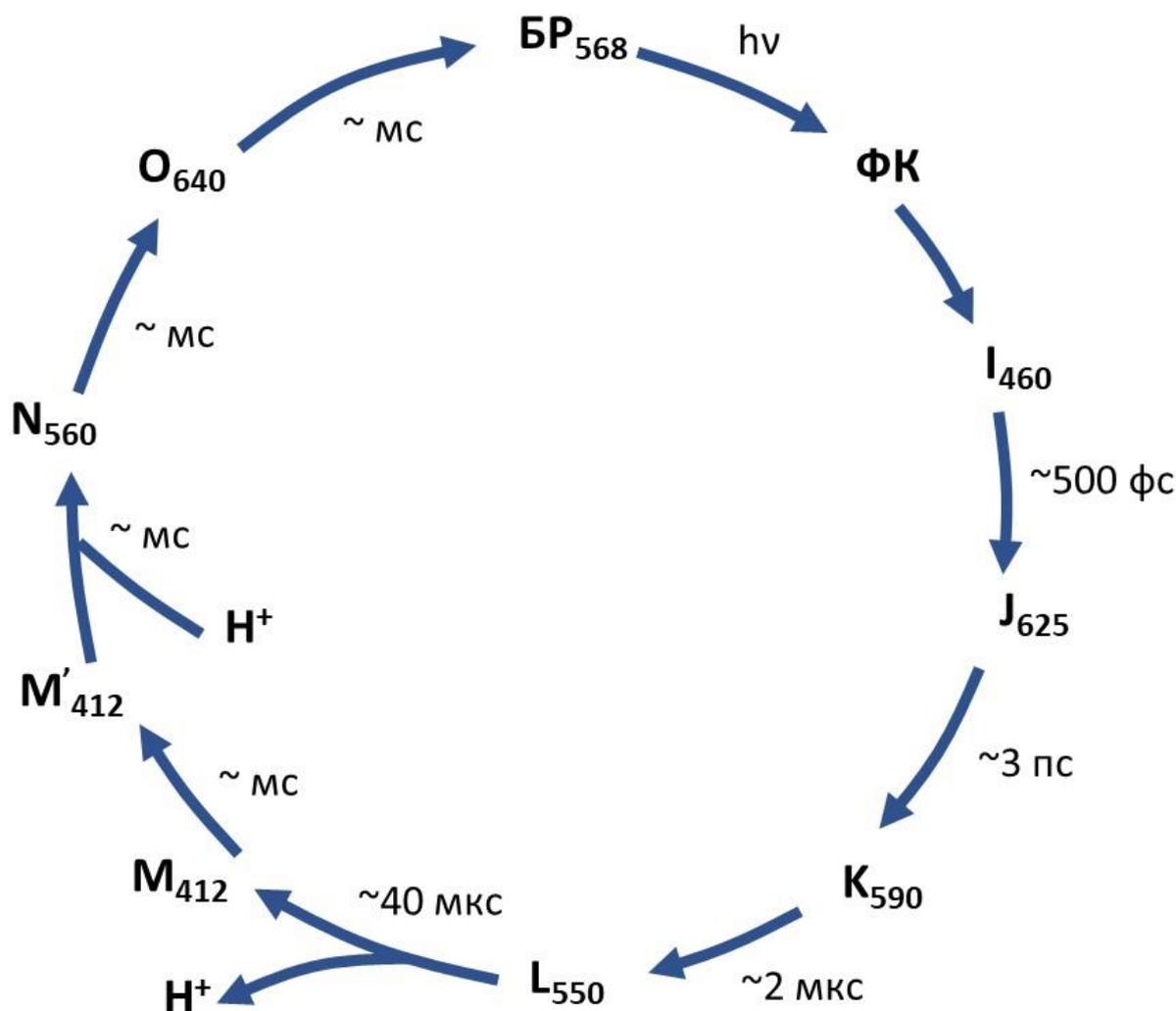
преимущественно затрагивают конформацию РПШО. Интермедиаты, следующие за  $K_{590}$ , уже несут конформационные изменения, связанные с белковой глобулой. Основная функция БР, перенос протона из клетки во внешнюю среду, осуществляется постепенно в ходе фотоцикла. При превращении интермедиата  $L_{550}$  в  $M_{412}$  и  $M'_{412}$  протон с РПШО последовательно переходит сначала на остаток D85, а потом – на R82, и затем высвобождается во внеклеточную среду. В этот момент основание Шиффа становится направленным в сторону цитоплазмы и репротонируется на стадии  $M'_{412} \rightarrow N_{584}$  при помощи донора протона D96. Переход из 13-*цис* обратно в полностью-*транс* ретиналь происходит на поверхности основного состояния, при этом протекает трансформация  $N_{584}$  состояния в  $O_{640}$  состояние [28].



**Рисунок 2.** Активный центр БР из кристаллической структуры PDB 1M0L [25], состоящий из РПШО и комплексного противоиона, включающего остатки D212, D85 и три молекулы воды.

Первые несколько стадий фотоцикла являются сверхбыстрыми, протекают за сотни фс и интенсивно изучаются, так как являются ключевыми в реакции фотоизомеризации РПШО. Для изучения таких сверхбыстрых реакций в БР использовались разные виды спектроскопий с временным разрешением: фемтосекундная абсорбционная

спектроскопия [29–31], инфракрасная спектроскопия с временным разрешением [32–34], рамановская спектроскопия с временным разрешением [35–37]. Установлено, что фотоцикл начинается с того, что после поглощения фотона возникает возбужденное состояние бактериородопсина в точке Франка-Кондона, которое за 100-200 фс переходит в состояние  $I_{460}$ , соответствующее минимуму на поверхности  $S_1$ .



**Рисунок 3. Фотоцикл БР. Рисунок модифицирован из работы [38].**

Образование  $I_{460}$  из состояния Франка-Кондона сопровождается релаксацией длин связей между атомами углерода в сопряженной полиеновой цепи РПШО, основная релаксация происходит по связи  $C_{13}=C_{14}$ , но скрученность по связи  $C_{13}=C_{14}$  еще не так сильно выражена [39–42]. Затем через коническое пересечение ППЭ  $S_1$  и  $S_0$  происходит переход за  $\sim 500$  фс от возбужденного состояния  $I_{460}$  к состоянию  $J_{625}$ , находящемуся на поверхности  $S_0$  [43,44]. Этот переход сопровождается полностью-транс  $\rightarrow$  13-цис фотоизомеризацией РПШО. Затем в интермедиате  $J_{625}$  за 3 пс происходит релаксация 13-цис изомера РПШО с образованием интермедиата  $K_{590}$  [40]. Остальные реакции

связаны с конформационными изменениями белковой глобулы и протекают в мкс и мс временных диапазонах.

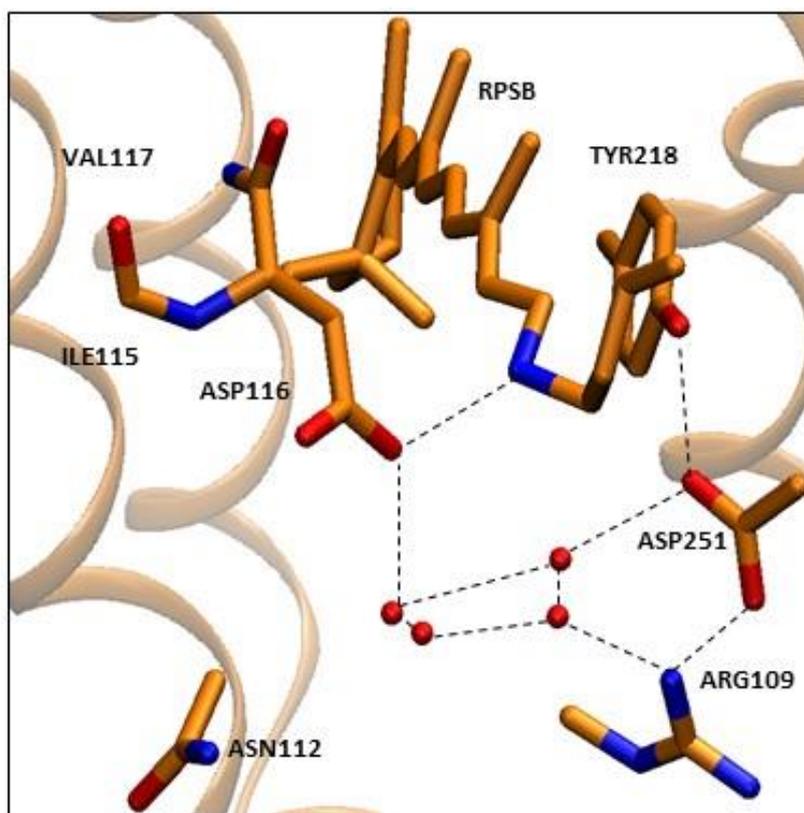
### **1.1.2. KR2 родопсин**

Несмотря на длительный период изучения семейства родопсинов, до сих пор появляются сообщения о новых ретиналь-содержащих белках [45], [46], [47]. Так, сравнительно недавно был открыт микробный родопсин KR2 (KR2) из бактерии *Krokinobacter eikastus* [48], являющийся насосом ионов  $\text{Na}^+$ . Открытию KR2 препятствовало мнение, что родопсины не способны транспортировать положительно заряженные ионы, отличные от протонов, из-за наличия отталкивающего положительного заряда на РПШО [48].

KR2 содержит 275 аминокислотных остатков и 7 трансмембранных  $\alpha$ -спиралей [49]. Структура данного белка была впервые определена в 2015 году независимо друг от друга двумя научными группами [50,51]. Обе группы определяли структуры в разных диапазонах pH. Так, одна группа кристаллов была получена при pH не выше, чем 5,6. Разрешение данных структур составило 1,45 Å (pH 4,3) [50] и 2,3 Å (pH 4,0) [51]. В обеих структурах белок находится в мономерной форме, а сами структуры практически полностью совпадают друг с другом. Еще одной важной задачей являлось определение структур данного белка при физиологических условиях, при более высоком значении pH, так как именно в физиологических условиях KR2 способен наиболее активно переносить ионы  $\text{Na}^+$ . В работе [51] такая структура была получена в диапазоне pH от 7,5 до 8,5 путем замачивания кристаллов, выращенных при pH 4 в буфере pH от 8 до 9. Единственным отличием от структуры, полученной при pH 4,0, была ориентация остатка Asp116. При кислых значениях pH Asp116 не взаимодействует с РПШО, тогда как при щелочных значениях pH Asp116 становится ближе к РПШО и образует с ним водородную связь. Структура, полученная при pH от 7,5 до 8,5, была названа авторами работы основной модельной структурой для белка KR2 в физиологических условиях. В работе [50] еще одна структура была получена при более высоком значении pH 5,6 с разрешением 2,8 Å. И при повышении pH произошли изменения в олигомерной форме белка: белок стал находиться в пентамерной форме вместо мономерной. Asp116 в структуре, полученной при pH 5,6, образует водородную связь с РПШО, при этом ориентация остатка по отношению к РПШО осталась такой же, как и в структуре, полученной при pH 4,3. Для разрешения противоречий между результатами двух групп,

касающихся олигомерной формы белка и положения аспартата 116, в работе [49] были получены кристаллы белка KR2, выращенные при pH 8.0. Структура данных кристаллов была определена с разрешением 2,2 Å и совпала со структурой белка из работы [50]. В работе [49] также, как и в работе [50], белок находился в пентамерной форме, и ориентация аспартата 116 в данных работах совпадала. Поэтому авторы сделали выводы, что пентамерная форма белка отражает реальную олигомерную форму родопсина KR2 при физиологических условиях. Структура из работы [49] была уточнена в работе [52] и получена с более высоким разрешением 2,0 Å.

Активный центр родопсина KR2 состоит из полностью-*транс* ретиналя, соединенного с остатком лизина 255 через протонированное основание Шиффа, аминокислотных остатков аспартата 251, аргинина 109, аспарагина 112, тирозина 218 и комплексного противоиона, включающего остаток аспартата 116 и четыре молекулы воды (рисунок 4).



**Рисунок 4.** Активный центр KR2 из кристаллической структуры PDB 6YC3 [52], состоящий из РПШО, остатков D251, R109, N112, Y218 и комплексного противоиона, включающего остаток D116 и четыре молекулы воды.

Так как KR2 открыт недавно, то пока для данного белка известно мало данных о его

фотоцикле. Эксперименты по рамановской спектроскопии [53] и абсорбционной спектроскопии [54] с временным разрешением обнаружили, что после поглощения фотона родопсином KR2 через 200 фс происходит переход РПШО из полностью-*транс* в 13-*цис* форму и образуется интермедиат J, который, как предполагают, является колебательно возбужденным первичным фотопродуктом. Максимум поглощения интермедиата J смещен в длинноволновую красную область по сравнению с исходным реагентом, который поглощает на длине волны 525 нм. Затем через 3 пс образуется K интермедиат, который является первичным фотопродуктом, в котором произошла колебательная релаксация. За счет колебательной релаксации максимум спектра поглощения K интермедиата смещается в более коротковолновую область по сравнению с J интермедиатом, но относительно реагента максимум поглощения K интермедиата остается смещенным в длинноволновую область [53]. Затем за микросекунды образуется интермедиат L, который обратимо переходит в M интермедиат. Во время образования M интермедиата протон с РПШО переходит на остаток D116 [48,55]. Перенос иона Na<sup>+</sup> происходит при переходе от M интермедиата к O интермедиату, который занимает миллисекунды. Предполагается, что ион Na<sup>+</sup> попадает из цитоплазмы в родопсин KR2 через так называемые «цитоплазматические» ворота, образованные остатком Q123 и нейтральным основанием Шиффа, и временно связывается в центральной области белка около остатков D116, N112, и D251 в O-интермедиате [49,52,56,57]. Также предложено, что на стадии распада O-интермедиата происходит выход иона Na<sup>+</sup> во внеклеточное пространство через остаток R109 и группу остатков E11, E160 и R243 [50,51] (рисунок 5).

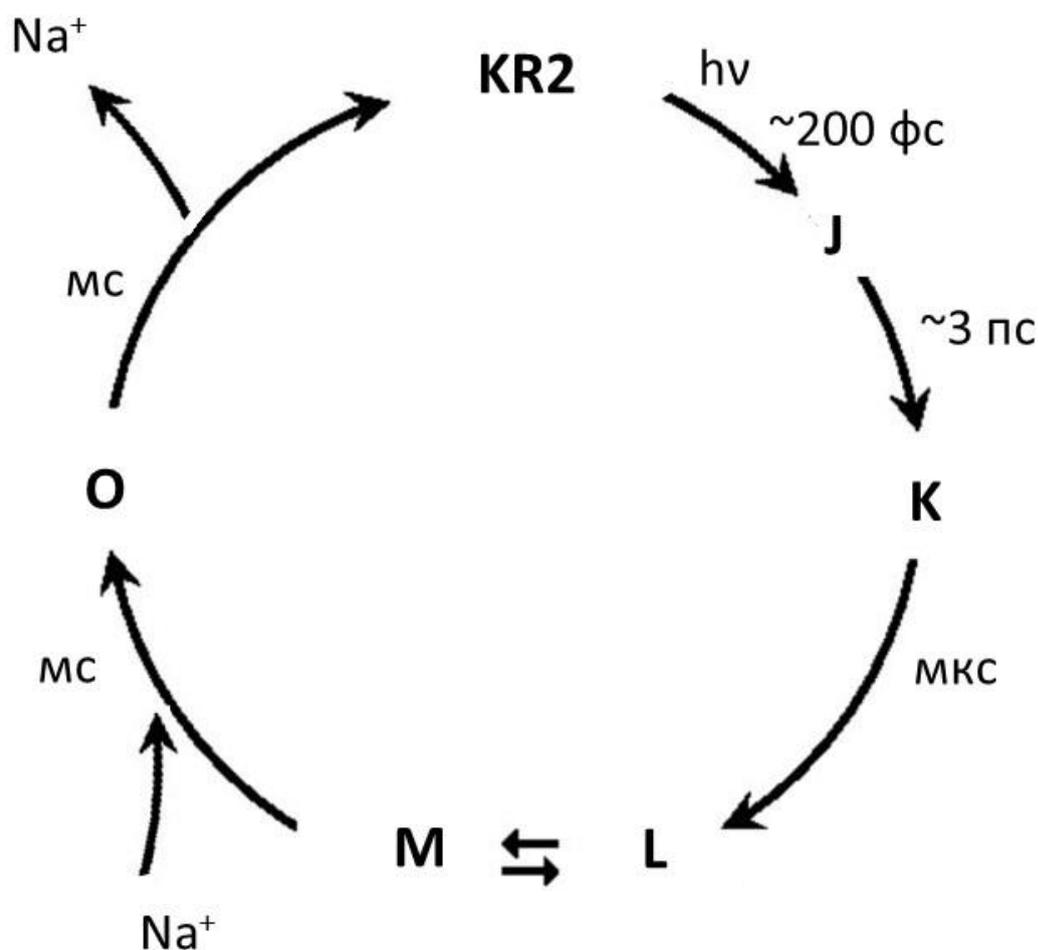


Рисунок 5. Фотоцикл родопсина KR2. Рисунок модифицирован из работы [58].

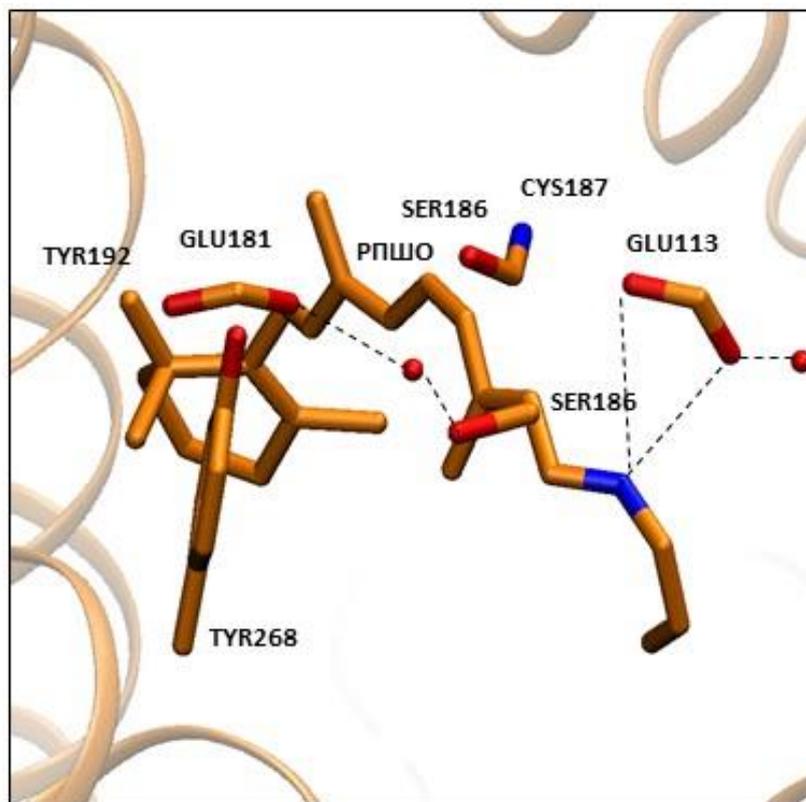
### 1.1.3. Зрительный родопсин

Зрительный родопсин (ЗР) – белок, располагающийся в мембране светочувствительных клеток глаза, палочках, обеспечивающих сумеречное зрение [11]. ЗР участвует в формировании нервного импульса, поступающего от глаза в мозг и обеспечивающий зрительный процесс. Поглощение фотона приводит к изомеризации РПШО внутри ЗР, что влечет конформационные изменения в структуре опсина и запускает цепь биохимических реакций, называемых зрительных каскадом, или фототрансдукцией, которая вызывает образование нервного импульса [11]. Апопротеин опсин ЗР состоит из 348 аминокислотных остатков и содержит 7 трансмембранных  $\alpha$ -спиралей. 11-*цис* ретиналь присоединяется к остатку лизина 296 через протонированное основание Шиффа ретиналя. Посттрансляционные модификации белка включают присоединение двух молекул пальмитиновой кислоты, гликозилирование двумя остатками олигосахаридов и ацетилирование N-концевого участка [59].

За время исследования ЗР был получен ряд кристаллических структур этого белка с разрешениями 2,8 Å [60] и 2,6 Å [61]. Противоионом РПШО в ЗР является отрицательно заряженный остаток глутамата 113, также через сеть водородных связей с РПШО взаимодействует остаток глутамата 181, остаток серина 186 и две молекулы воды (рисунок 6).

Фотоцикл в ЗР начинается с поглощения фотона и перехода молекулы в возбужденное состояние  $S_1$ . Как было установлено методом фемтосекундной абсорбционной спектроскопии [62], первым в цепочке интермедиатов, уже на поверхности основного электронного состояния  $S_0$ , образуется фотородопсин (Фото<sub>570</sub>) за 200 фс. Структура Фото<sub>570</sub> уже соответствует полностью-*транс* ретиналю, но находится ещё в нерелаксированной, напряженной форме. Максимум поглощения данного интермедиата составляет 570 нм, а для темнового состояния белка, ЗР<sub>498</sub>, максимум поглощения составляет 498 нм. Затем через 2-3 пс происходит образование следующего интермедиата батородопсина (Бато<sub>535</sub>), сопровождаемое релаксацией хромофора [63,64]. Структура Бато<sub>535</sub> не до конца релаксирована, но уже менее скручена, чем структура Фото<sub>570</sub>. Бато<sub>535</sub> имеет максимум поглощения в области 535 нм. Далее в наносекундном временном диапазоне образуется интермедиат BSI<sub>470</sub>, максимум поглощения которого по сравнению с ЗР<sub>498</sub> сдвинут в синюю область спектра и составляет 470 нм [65]. BSI<sub>470</sub> за 150 нс переходит в следующий интермедиат люмиродопсин, в котором структура РПШО становится более плоской, а водородная связь основания Шиффа с противоионом ослабевает, а максимум поглощения составляет 497 нм [66]. Затем в течение 150 мкс путём дальнейшей релаксации хромофора образуется интермедиат метародопсин I (мета I) с максимумом поглощения 478 нм, но при этом сила водородной связи РПШО с противоионом восстанавливается по сравнению с люмиродопсином [66]. Метародопсин I за несколько мс переходит в метародопсин II (мета II). Метародопсин II за счет особой конформации белка может взаимодействовать с G-белком трансдуцином. Это взаимодействие нужно, чтобы в дальнейшем сгенерировать нервный импульс. Основание Шиффа в метародопсине II находится в депротонированном состоянии, что приводит к тому, что максимум поглощения сдвинут в коротковолновую область и составляет 380 нм. Метародопсин II в течение минут переходит в метародопсин III с максимумом поглощения 465 нм. В этом интермедиате основание Шиффа становится опять протонированным. Далее РПШО

подвергается гидролизу и хромофорная группа отделяется от белка. Свободный полностью-*транс* ретиналь в ходе ряда биохимических реакций переходит в 11-*цис* изомер, который затем соединяется с опсином и образует исходное состояние ЗР [1] (рисунок 7).



*Рисунок 6. Активный центр ЗР кристаллической структуры PDB 1L9H [61], состоящий из РПШО и комплексного противоиона, включающего остатки E181, E113, S186 и две молекулы воды.*

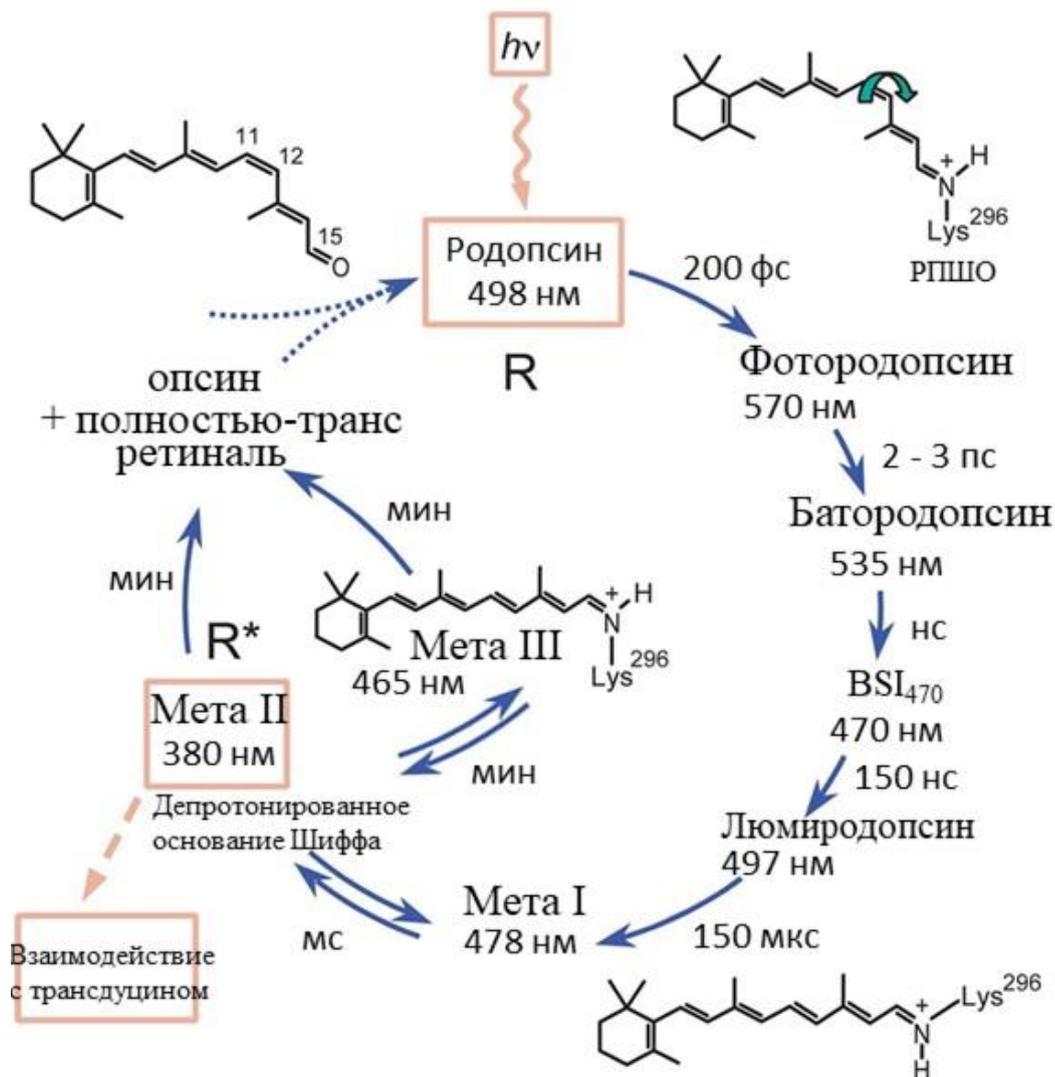
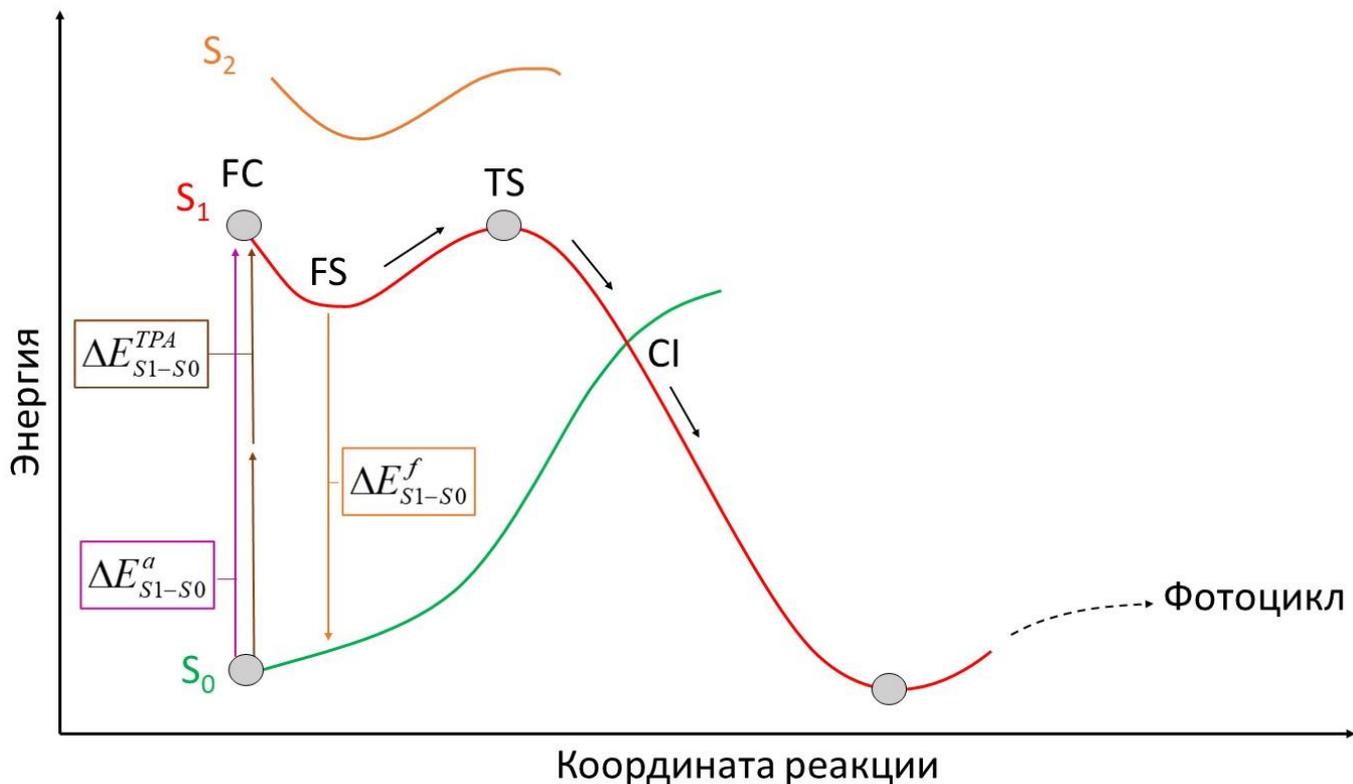


Рисунок 7. Фотоцикл ЗР. Рисунок модифицирован из работы [67].

## 1.2. Исследование влияния окружения на фотофизические свойства реакции фотоизомеризации РПШО

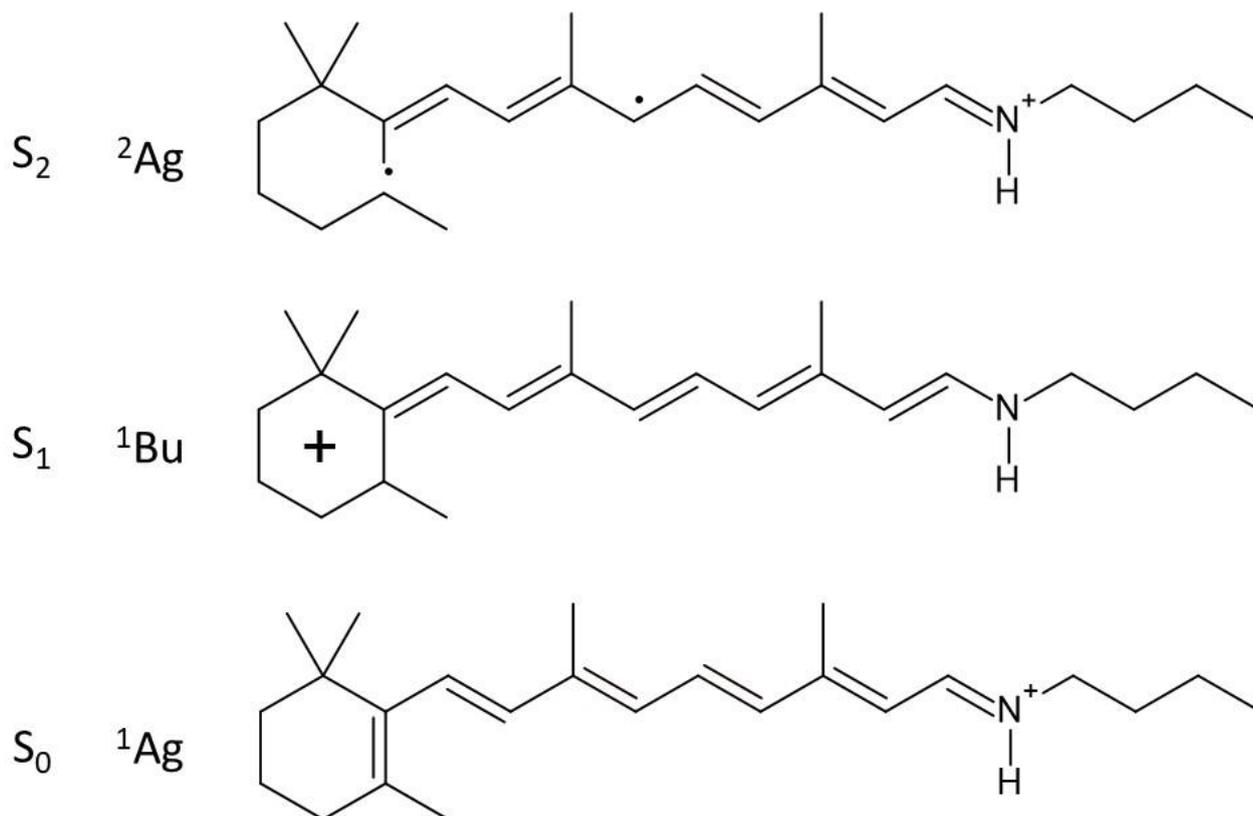
Путь реакции фотоизомеризации РПШО на поверхности потенциальной энергии (ППЭ) основного ( $S_0$ ) и первого электронно-возбужденного ( $S_1$ ) состояния схематично изображен на рисунке 8, также в реакции может быть задействовано второе электронно-возбужденное состояние ( $S_2$ ). В качестве координаты реакции может выступать изменение угла вращения вокруг связи, которая подвергается фотоизомеризации. Поглощение одного фотона с энергией  $h\nu$  вызывает вертикальный электронный  $\pi\text{-}\pi^*$  переход с ППЭ основного электронного состояния на ППЭ первого возбужденного состояния в точке Франка-Кондона (FC). Энергия перехода в точке FC обозначена как  $\Delta E_{S_1-S_0}^a$ . Переход в точку FC также возможен при одновременном поглощении двух фотонов с энергией  $\Delta E_{S_1-S_0}^{TPA}$  при процессе двухфотонного поглощения [68]. Энергия  $\Delta E_{S_1-S_0}^{TPA}$  отвечает половине энергии однофотонного поглощения  $\Delta E_{S_1-S_0}^a$ .



**Рисунок 8. Схематическое изображение пути реакции фотоизомеризации РПШО.**

После фотовозбуждения начинается релаксация РПШО с участием торсионных вращательных и высокочастотных валентных колебательных мод. В зависимости от формы ППЭ состояния  $S_1$  релаксация РПШО вдоль координаты реакции либо может достичь минимума, соответствующего флюоресцентному состоянию (FS) (рисунок 8), либо может проследовать далее по ППЭ. FS является долгоживущим возбужденным состоянием, которое претерпевает переход обратно в исходное основное состояние в результате флуоресценции. В этом случае испускается фотон с энергией  $\Delta E_{S1-S0}^f$ . В том случае, когда минимум, соответствующий FS, является неглубоким или отсутствует, то РПШО постепенно скручивается по двойной C=C связи и достигает конического пересечения (CI) ППЭ  $S_0/S_1$  (рисунок 8). И далее на поверхности  $S_0$  происходят остальные этапы фотоцикла.

Электронные состояния  $S_0$ ,  $S_1$  и  $S_2$ , а также возможные взаимодействия между состояниями  $S_1$  и  $S_2$  были исследованы в ряде работ [69–72]. Электронные состояния полиенов принято классифицировать по симметрии. Состояния  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  относятся к типам симметрии  ${}^1A_g$ ,  ${}^1B_u$  и  ${}^2A_g$ , соответственно (рисунок 9).



**Рисунок 9.** Схематическое изображение структуры основного электронного состояния  $S_0$  и структур первых двух электронных возбужденных состояний  $S_1$ ,  $S_2$  молекулы РПШО.

$S_0$  соответствует ковалентному состоянию, при котором происходит чередование длин одинарных и двойных связей в полиеновой цепи, а положительный заряд локализован на атоме азота основания Шиффа. Разницу между средней длиной одинарной связи и средней длиной двойной связи принято называть «альтернированием длин связей» (BLA). BLA в состоянии  $S_0$  положительное. В состоянии  $S_1$  происходит инверсия длин одинарных и двойных связей полиеновой цепи, а BLA становится отрицательным. Отрицательное значение BLA способствует реакции фотоизомеризации. Также состояние  $S_1$  имеет характер переноса заряда, что означает миграцию положительного заряда с атома азота основания Шиффа к бета-иононовому кольцу. Состояние  $S_2$  имеет бирадикальный характер с сильно уменьшенным BLA. По сравнению с  $S_1$  фотоизомеризация в  $S_2$  затруднена. Аналогично  $S_0$  в состоянии  $S_2$  положительный заряд остается локализованным на атоме азота основания Шиффа [73]. Разное распределение зарядов в данных состояниях приводит к тому, что разность их энергий,  $\Delta E(S_1-S_0)$  и  $\Delta E(S_2-S_1)$ , становится очень чувствительной к окружению РПШО.

Микробильные родопсины и родопсины животных с помощью белкового

окружения оказывают электростатическое и стерическое влияние на хромофорную группу [74–76] и, таким образом, могут изменять такие параметры реакции фотоизомеризации РПШО, как время жизни возбужденного состояния и квантовый выход. Сравнение динамики реакции изомеризации РПШО в белках с динамикой изомеризации РПШО в вакууме [77] и растворе [78–80] помогает понять роль белкового окружения в обеспечении эффективного фотоответа в родопсинах.

Исследование ретиналь-содержащих белков, как модельных систем, в которых протекает неадиабатическая динамика реакции фотоизомеризации РПШО, представляет большой научный интерес, так как позволяет установить влияние разных межмолекулярных и внутримолекулярных факторов на реакционную способность РПШО. Фундаментальное понимание того, как родопсины управляют эффективностью реакции фотоизомеризации, позволяет продумать стратегию химических модификаций, которые могут быть введены в ретиналь-содержащие хромофоры и похожие соединения с целью создания искусственных фотоактивных молекул с контролируемой реакционной способностью, а также продумать мутации в родопсинах для получения белков с заданными динамическими и спектральными свойствами. Например, для развития методики исследования различных типов клеток под воздействием света, оптогенетики [81–84], важно получить мутантные формы родопсинов с увеличенным временем жизни возбужденного состояния, что поможет увеличить квантовый выход флюоресценции, а также мутантные формы родопсинов со спектром поглощения, сдвинутым в красную область [85,86]. Понимание взаимосвязи между структурой и фотофизическими свойствами химического соединения позволяет разработать молекулярные девайсы, основанные на сверхбыстрой реакции фотоизомеризации вокруг двойной связи РПШО, для создания фотопереключателей или молекулярных моторов, обладающих высокой эффективностью [87].

Протонированное основание Шиффа ретиналя поглощает в видимой области спектра, что значительно отличает его от хромофоров, поглощающих в ультрафиолетовой области и функционирующих в форме депротонированного основания Шиффа [88].

### ***1.2.1. Исследование влияния окружения на спектральные свойства РПШО***

Так как фотоцикл запускается при поглощении фотона, то важной характеристикой

родопсинов является их спектр поглощения. Длина сопряженной полиеновой цепи ретиналя, а также протонированное/депротонированное состояние РПШО определяют энергию перехода [89], так что большинство родопсинов поглощают в видимой области (400 – 700 нм). Несмотря на то, что хромофором во всех белках семейства родопсинов является протонированное основание Шиффа ретиналя, максимумы поглощения белков значительно различаются, что подразумевает влияние белкового окружения на энергию перехода между основным и возбужденным состояниями хромофора. Влияние белкового окружения на спектральные свойства родопсинов изучается уже давно, и было выявлено несколько факторов, ответственных за это влияние.

Состояние протонированности основания Шиффа ретиналя играет важную роль в определении спектра поглощения родопсинов. Так, непротонированное основание Шиффа поглощает в ультрафиолетовой области (360 – 380 нм), и спектр поглощения является практически нечувствительным к окружению, в отличие от протонированного основания Шиффа, которое демонстрирует значительную гибкость в спектре поглощения и обладает возможностью поглощать фотоны во всем диапазоне видимого спектра. Другими факторами, определяющими спектр поглощения ретиналя, являются взаимодействия хромофор – белок, например, такие как электростатические взаимодействия с заряженными полярными аминокислотными остатками. Так, в работе [90] влияние электростатического взаимодействия было продемонстрировано на модельной системе на основе клеточного ретинол-связывающего белка II. Данная белковая система была сконструирована так, чтобы ковалентно связывать полностью-*транс* ретиналь, и максимум ее поглощения менялся с 425 до 644 нм при различной замене аминокислотных остатков, которые изменяли электростатический потенциал в ретиналь-связывающем кармане. Такой широкий диапазон изменения спектра поглощения свидетельствует о сильном влиянии электростатического поля ближайшего окружения ретиналя на структуру его электронных уровней. Взаимодействие ретиналя с заряженными, полярными и ароматическими аминокислотными остатками изменяет энергию электронных уровней хромофора. Также электронную энергию изменяет образование водородных связей и эффекты, связанные со стерическим взаимодействием. Сильные водородные связи могут привести к переносу заряда, а стерические контакты могут привести к скручиванию полиеновой цепи ретиналя.

Одним из наиболее важных факторов в формировании спектра поглощения

родопсина является взаимодействие хромофорной группы с противоионами. В основном состоянии хромофор заряжен положительно. Возбужденное состояние имеет выраженный перенос заряда, когда положительный заряд смещается в сторону бета-иононового кольца, что приводит к нейтрализации заряда на РПШО [91,92]. Взаимодействие РПШО с отрицательно заряженными противоионами в микробиальных родопсинах и родопсинах животных приводит к электростатической стабилизации основного электронного состояния ретиналя, что сопровождается увеличением  $pK_a$  РПШО. В результате стабилизация основного состояния приводит к синему сдвигу поглощения ретиналя в белке по сравнению с газовой фазой [93,94].

Если отрицательный заряд находится вблизи бета-иононового кольца, то происходит стабилизация возбужденного состояния, что приводит к уменьшению энергии возбуждения при переходе из основного в возбужденное состояние и, следовательно, к красному смещению длины волны электронного возбуждения. Максимум поглощения изолированного полностью-*транс* РПШО в газовой фазе составляет 610 нм [93]. Микробиальные родопсины и родопсины животных, как правило, обладают максимумом поглощения меньшим, чем 600 нм, что говорит о том, что отрицательный заряд расположен именно вблизи РПШО, что реально наблюдается в кристаллических структурах родопсинов I и II типа.

На спектр поглощения могут также влиять другие факторы. Так, например, ретиналь в родопсинах бактерий и животных отличается не только конфигурацией двойных связей, но и конформацией одинарной связи  $C_6-C_7$ . Для бычьего родопсина известно, что связь  $C_6-C_7$  находится в конформации *6-s-цис* [95,96], что делает полиеновую цепь и бета-иононовое кольцо не лежащими в одной плоскости из-за стерического взаимодействия между водородом атома  $C_8$  и метильной группой атома  $C_5$ . В результате сопряженная система сокращается, что приводит к синему сдвигу максимума поглощения. Для микробиальных родопсинов связь  $C_6-C_7$  находится в конформации *6-s-транс* несмотря на то, что *6-s-цис* конформер более устойчив в растворе [62]. Это приводит к красному сдвигу, наблюдаемому в бактериальных родопсинах, по сравнению с бычьим родопсином.

В исследовании [97] авторы рассматривали способ получения модифицированного белка KR2 со смещенным в красную область спектром поглощения путем помещения и

ориентирования диполей аминокислотных остатков, окружающих ретиналь, определенным образом относительно него, при этом при такой модификации активность транспорта ионов  $\text{Na}^+$  не изменялась. Было показано, что изменение в дипольном моменте остатков 219 и 254 при двойной мутации P219T/S254A приводит к сдвигу максимума длины волны поглощения в данных белках в красную область на 40 нм. Для модифицированных белков были также проведены расчеты вертикальных энергий возбуждения с помощью метода CASPT2/CASSCF(12,12)/6-31G\* в рамках КМ/ММ, которые воспроизвели экспериментально наблюдаемый максимум поглощения, сдвинутый в красную область.

### ***1.2.2. Исследование динамики возбужденного состояния РПШО в растворе***

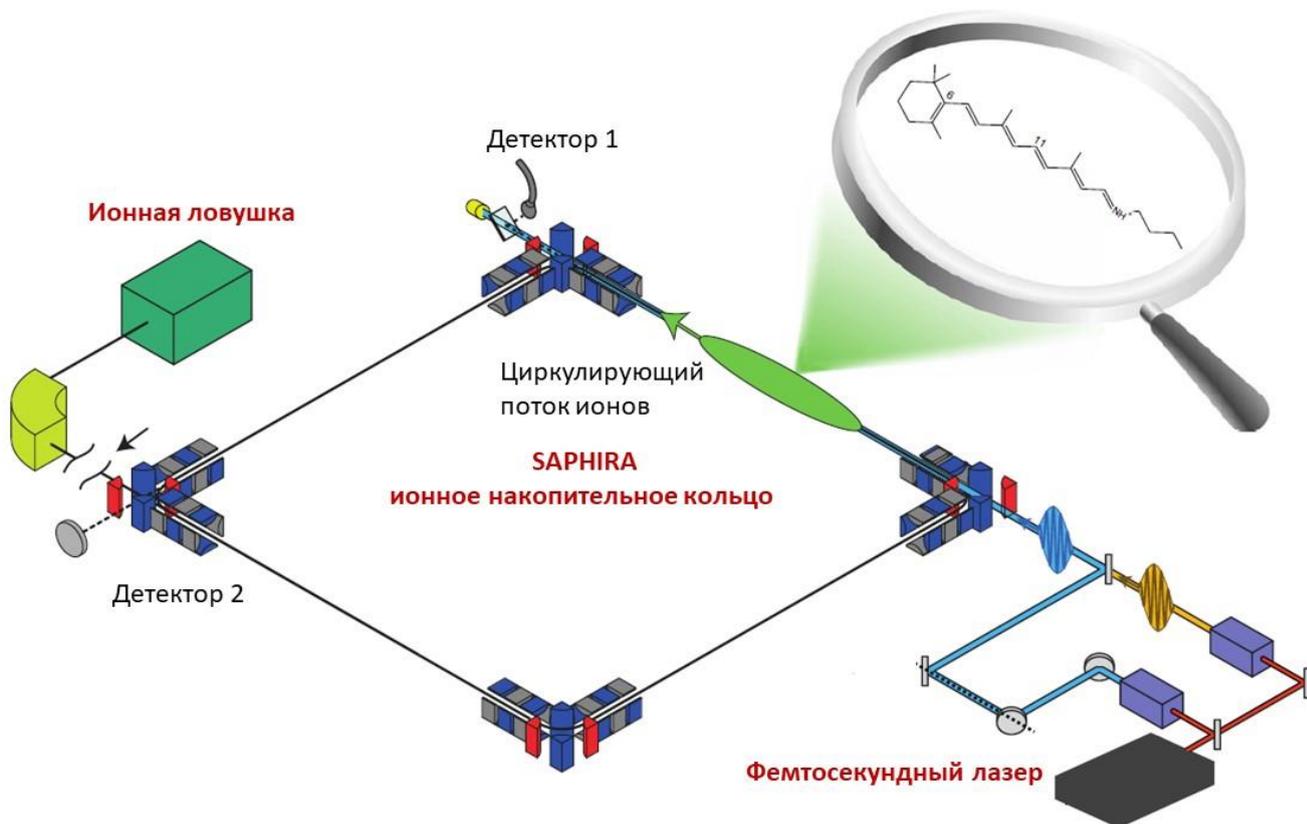
Так как полностью-*транс* и 11-*цис* изомеры ретиналя являются хромофорами микробиальных родопсинов и родопсинов животных, соответственно, то данные молекулы подвергались интенсивному исследованию не только в белковом окружении, но также в растворе и газовой фазе. Одно из первых наблюдений состояло в том, что спектры поглощения в растворе значительно сдвинуты в синюю область спектра по сравнению со спектрами, наблюдающимися в белковом окружении. Это явление, называемое опсиновым сдвигом, связывают с тремя основными факторами. Одним из факторов является увеличение системы  $\pi$ -сопряженных связей в белковом окружении, особенно выраженное для микробиальных родопсинов, в которых ретиналь находится в *6-s-транс* конформации в отличие от *6-s-цис* конформации в растворе [98]. Также вклад в опсиновый сдвиг вносит взаимодействие хромофора с полярными и поляризуемыми остатками внутри белка [94,99–101]. Фотоизомеризация 11-*цис* изомера РПШО в растворе приводит к образованию именно полностью-*транс* изомера, как и в белках. Тем не менее, квантовый выход фотоизомеризации в разных растворителях находится на уровне только 25% по сравнению со зрительным родопсином, в котором квантовый выход составляет 67%. Напротив, при фотоизомеризации полностью-*транс* изомера РПШО в растворе образуются разные изомеры с квантовым выходом около 15%, что отличается от фотоизомеризации в белке, которая протекает селективно по определенной двойной связи [102–104].

Эксперименты по фемтосекундной спектроскопии поглощения и флуоресцентной спектроскопии демонстрируют, что времена жизни возбужденного состояния и времена

реакции фотоизомеризации РПШО в растворе значительно выше, чем в белках, при этом основная компонента распада возбужденного состояния имеет характеристическое время 3-4 пс как для 11-*цис* изомера РПШО, так и для полностью-*транс* изомера [78,79,105–108].

### **1.2.3. Исследование динамики возбужденного состояния РПШО в газовой фазе**

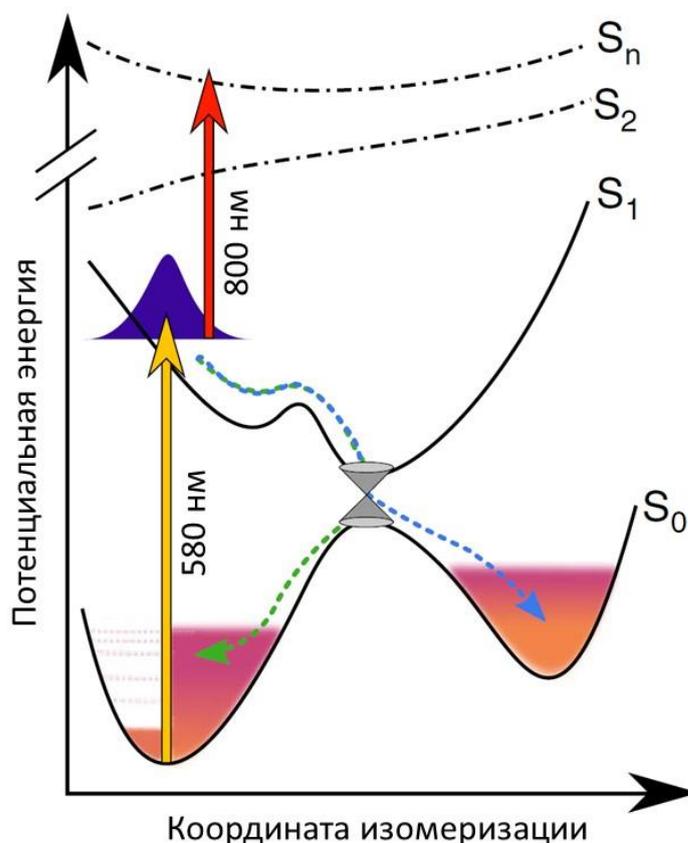
Спектры поглощения полностью-*транс* и 11-*цис* изомеров РПШО в газовой фазе при отсутствии противоиона или какого-либо поляризуемого окружения, сдвинуты в красную область спектра по сравнению со спектрами, полученными в белках, что связано с относительной дестабилизацией основного электронного состояния  $S_0$  [93,109]. Энергии электронных переходов в ультрафиолетовом и видимом диапазонах получают при использовании спектроскопии действия, в которой происходит регистрирование фотофрагментации катионных хромофоров, находящихся в ионном накопителе. Недавно данный подход был модифицирован с применением двух лазерных импульсов, что позволило измерить времена жизни возбужденных состояний в вакууме [77]. Для проведения эксперимента в работе [77] было использовано ионное накопительное кольцо SAPHIRA [110] (рисунок 10). Ионы хромофора РПШО в данном кольце находятся несколько миллисекунд. Поглощение квантов света заряженными катионами детектируется при помощи того факта, что после поглощения фотонов происходит индуцируемая фрагментация молекулы и дальнейшая регистрация нейтральных фотофрагментов. Общая внутренняя энергия ионов определяет скорость статистической фрагментации, и, таким образом, эта скорость зависит от числа поглощенных фотонов [111]. Скорость фрагментации даёт возможность понять, в какое время после импульса накачки, инициирующего  $S_0 \rightarrow S_1$  переход, может быть поглощен второй фотон зондирующего импульса, обладающий определенной энергией и определенным временем задержки. Этот метод может быть реализован в двух разных вариантах, которые позволяют наблюдать как распад возбужденного состояния, так и восстановление основного состояния.



*Рисунок 10. Схема экспериментальной установки ионного накопительного кольца SAPHIRA. Исследуемые ионы получают путем электрораспыления в протонированной форме 11-цис и полностью-транс изомеров основания Шиффа ретиналя, предварительно растворенных в метаноле. Ионы находятся в кольце SAPHIRA и облучаются фемтосекундными лазерными импульсами. Рисунок модифицирован из работы [77].*

В статье [77] данный метод реализован следующим образом. Сначала РПШО под действием импульса накачки претерпевает  $S_0$ - $S_1$  переход, которому соответствует широкая полоса поглощения между 550 и 650 нм [93,109,112]. Зондирующий импульс длиной волны 800 или 900 нм используется для изучения динамики возбужденного состояния. При данных длинах волн могут происходить переходы на более высоколежащие уровни  $S_1 \rightarrow S_n$ . При этом после последовательного поглощения двух фотонов от импульса накачки и зондирующего импульса происходит внутренняя конверсия в основное электронное состояние  $S_0$ , за которой следует быстрая статистическая фрагментация молекулы. На длине волны зондирующего импульса не происходит возбуждения основного состояния, и поэтому после того, как система покидает возбужденное состояние  $S_1$  и возвращается в основное состояние  $S_0$ , сигнал быстрой двухфотонной фрагментации пропадает (рисунок 11). Напротив, если длина

волны зондирующего импульса способна инициировать  $S_0 \rightarrow S_1$  переход, то возвращение системы в основное состояние можно отследить по нарастающему сигналу двухфотонной фрагментации при увеличении времени задержки зондирующего импульса.



**Рисунок 11.** *Схема исследования динамики первого возбужденного состояния РПШО в газовой фазе методом фемтосекундной спектроскопии действия. Длина волны импульса накачки и зондирующего импульса составляет 580 нм и 800 нм, соответственно. Рисунок модифицирован из работы [77].*

В работе [77] длина волны импульса накачки и зондирующего импульса составляла 580 нм и 800 нм, соответственно, а зондирующий импульс переводил систему в третье электронно-возбужденное состояние при переходе  $S_1 \rightarrow S_3$  (рисунок 11). В серии экспериментов, которые также учитывали влияние температуры, было установлено, что в вакууме при комнатной температуре 11-*цис* изомер РПШО распадается практически безбарьерно за 400 фс, тогда как полностью-*транс* изомер демонстрирует медленный распад за 3 пс, контролируемый барьером на поверхности возбужденного состояния.

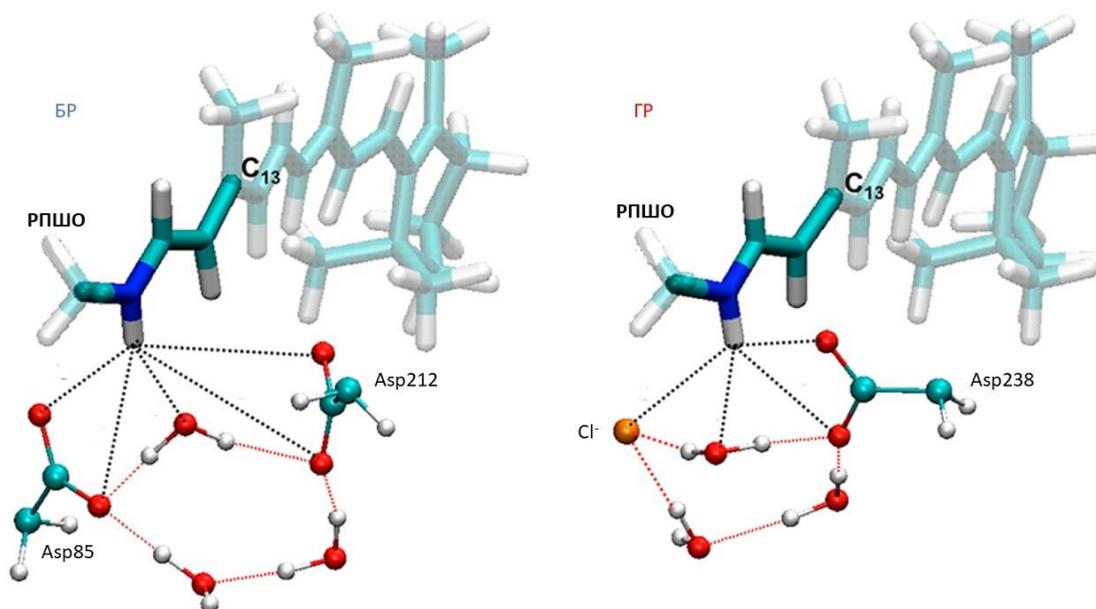
#### 1.2.4. Исследование влияния белкового окружения на динамику возбужденного состояния РПШО в родопсинах

Таким образом, результаты экспериментов в растворе и газовой фазе свидетельствуют о том, что фотофизические характеристики РПШО в зрительном родопсине обусловлены внутренними свойствами его 11-*цис* хромофора [77,108], тогда как микробильные родопсины изменяют поверхность потенциальной энергии полностью-*транс* РПШО, влияя на величину барьера и селективность связи, участвующей в фотоизомеризации [77,107].

Эксперименты, направленные на изучение роли белкового окружения в обеспечении высокой эффективности и селективности реакции фотоизомеризации РПШО в родопсинах, часто используют метод мутагенеза определенных аминокислотных остатков. В работах [91,113] рассматривали мутантные формы бактериородопсина, D85N, D212N и R82Q, в которых отрицательно заряженные Asp85, Asp212 и положительно заряженный Arg82, соответственно, расположенные около протонированного основания Шиффа, замены на нейтральные аналоги. Установлено, что в данных мутантных формах увеличивается время жизни возбужденного состояния, и, следовательно, время фотоизомеризации в 5-20 раз. При этом замены незаряженных аминокислотных остатков в таких мутантах, как D115N или Y185F, напротив, не приводят к значительному изменению времен жизни возбужденных состояний. Данные результаты объясняются авторами с помощью теории резонанса в рамках теории валентных связей. Так, возбужденное состояние описывается линейной комбинацией волновых функций, электронные плотности которых таковы, что положительный заряд смещен от основания Шиффа ретиналя к нечетным атомам углерода полиеновой цепи. Это приводит к тому, что для каждой связи, которая является двойной в основном состоянии, становится присущ характер одинарной связи в возбужденном состоянии, что увеличивает потенциальную реакционную способность данных связей в реакции фотоизомеризации, а степень реакционной способности зависит от доли локального положительного заряда. Ближайшие отрицательно заряженные остатки D85 и D212, по мнению авторов, лучше всего стабилизируют положительный заряд на атоме углерода C<sub>13</sub> в возбужденном состоянии бактериородопсина дикого типа, что может объяснить селективность процесса фотоизомеризации из полностью-*транс* РПШО в 13-*цис* форму. Выраженный характер одинарной связи C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> в возбужденном состоянии обеспечивает

сверхбыструю фотоизомеризацию вдоль данной связи. Такие эффекты отсутствуют при замене отрицательно заряженных остатков D85 и D212 нейтральными остатками или если данные остатки находятся в протонированной (нейтральной) форме, что, например, наблюдается в мутантной форме R82Q при pH среды равной 4 [91].

Авторы работы [114] проводили теоретические исследования, в которых варьировали заряды на противоионах хромофоров ряда родопсинов с целью изучения влияния величины заряда на скорость фотоизомеризации РПШО. Такие исследования являются хорошим дополнением к экспериментальным работам по мутагенезу противоионов [91,113], так как появляется возможность полностью сохранить начальное окружение РПШО, в частности, не прерывать цепочку водородных связей между РПШО и противоионом. В работе [114] меняли заряды на противоионах протонированного основания Шиффа ретиналя в бактериородопсине (противоион D85) и галородопсине (противоион CI-) (рисунок 12), и при помощи метода *ab initio* ядерной динамики (Ab Initio Multiple Spawning (AIMS)) в рамках комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) исследовали неадиабатическую динамику изомеризации ретиналя. Затем сравнивали скорости изомеризации для бактериородопсина и галородопсина с их аналогами с модифицированным противоионом. Авторы делают вывод о том, что при увеличении/уменьшении отрицательного заряда скорость изомеризации замедляется/ускоряется, соответственно, что связано со скоростью миграции положительного заряда при фотовозбуждении от положительно заряженного РПШО к бета-иононовому кольцу: чем выше скорость миграции заряда, тем выше скорость изомеризации.



**Рисунок 12. Протонированное основание Шиффа ретиналя вместе с комплексным противоионом в бактериородопсине (БР) и галородопсине (ГР). Комплексный противоион состоит из отрицательно заряженных аминокислотных остатков и/или отрицательно заряженных атомов и молекул воды, образующих водородные связи и находящихся вблизи ретиналя. Рисунок модифицирован из работы [114].**

В работе [115] исследовали неадиабатическую динамику фотоизомеризации ретиналя в каналородопсине-2 методом АИМС в рамках КМ/ММ. Рассчитаны спектры поглощения, вынужденного испускания, стоксов сдвиг, а также времена жизни возбужденного состояния. Установлено, что белковое окружение существенно ускоряет изомеризацию и обеспечивает ее специфичность. Так, по расчетам время жизни возбужденного состояния в каналородопсине-2 составляет 400 фс, тогда как в метаноле – 2-10 пс, в белке изомеризация протекает через одно коническое пересечение по связи  $C_{13}=C_{14}$ , а в метаноле – через несколько конических пересечений по связям  $C_{13}=C_{14}$ ,  $C_{11}=C_{12}$  и  $C_9=C_{10}$ . Такую высокую специфичность авторы связывают со стерическими ограничениями, возникающими из-за объемных остатков F226, W124, W223, C128 в белке. Сделано предположение о том, что объемные аминокислотные остатки обуславливают специфичность изомеризации ретиналя.

Влияние белкового окружения также приводит к тому, что при поглощении фотона в РПШО возбуждаются определенные колебательные моды, способствующие реакции фотоизомеризации. Так, в зрительном родопсине в первые ~20 фс после фотовозбуждения становятся активными С-С и С=С валентные колебания РПШО, что

приводит к тому, что двойные связи становятся длиннее, а одинарные становятся короче [116,117]. Затем происходит возбуждение внеплоскостных колебаний атомов водорода (НООР) полиеновой цепи ретиналя и торсионных колебаний полиеновой цепи ретиналя. При помощи фемтосекундной рамановской спектроскопии с временным разрешением установлено, что колебательная НООР мода приобретает высокую интенсивность после 200 фс после фотовозбуждения и в значительной степени способствует реакции фотоизомеризации. В результате изучения фотодинамики зрительного родопсина методами КМ/ММ также было установлено, что НООР мода и торсионная колебательная мода участвуют в реакции фотоизомеризации [116,118,119]. В бактериородопсине после поглощения фотона также возбуждаются высокочастотные валентные С-С и С=С колебания полиеновой цепи ретиналя и через ~100-150 фс происходит образование интермедиата I<sub>460</sub> [39,120]. Затем становятся активными НООР и торсионные колебательные моды, и за 400-500 фс происходит переход через коническое пересечение на поверхность основного состояния и образование интермедиата J<sub>625</sub>. Как и в случае зрительного родопсина было установлено, что НООР и торсионные колебательные моды принимают участие в реакции фотоизомеризации [26,121,122].

### ***1.2.5. Исследование нереакционноспособных состояний в родопсинах***

Взаимодействие с белковым окружением значительно увеличивает эффективность реакции фотоизомеризации РПШО, но, тем не менее, белковое окружение также может быть ответственно за возникновение долгоживущей компоненты в фотоиндуцированной динамике родопсинов, которую связывают с нереакционноспособным состоянием белка, не приводящим к изомеризации при фотовозбуждении. В настоящее время широко распространено мнение, что нереакционноспособные состояния обусловлены различными путями релаксации в области Франка-Кондона сразу после фотовозбуждения. Так, в работе [123] авторы выполнили эксперименты по исследованию галородопсина при помощи спектроскопии с временным разрешением и обнаружили, что поглощение и индуцированная эмиссия из состояния S<sub>1</sub> убывают с временной константой 2,3 пс, в то время как абсорбция фотопродукта нарастает быстрее, с временной константой 1 пс. Для того, чтобы объяснить это явление, авторы работы предположили, что в области Франка-Кондона релаксация возможна по двум различным координатам реакции, и по одной из них происходит изомеризация вдоль двойной связи, а по второй – происходит образование нереакционноспособного состояния S<sub>1</sub>, релаксация которого

ведет к начальному состоянию  $S_0$  с временной константой 2,3 пс. В работе [124] также исследовали галородопсин при помощи спектроскопии с более высоким временным разрешением. Авторами было обнаружено, что синяя область индуцированной эмиссии распадается с временной константой 170 фс, в то время как эмиссия, происходящая в оставшейся области длин волн, показывала биэкспоненциальный распад с временными константами 1,5 и 8,5 пс. На основании полученных данных был сделан вывод, что разветвление в возбужденном состоянии  $S_1$  в области Франка-Кондона происходит за время 170 фс, при этом образуются реакционноспособное и нереакционноспособное состояния  $S_1$ , у которых временные константы распада составляют 1,5 и 8,5 пс соответственно. Впоследствии, такая модель разветвления в состоянии  $S_1$  была принята и для других родопсинов, таких как протеородопсины и сенсорный родопсин I.

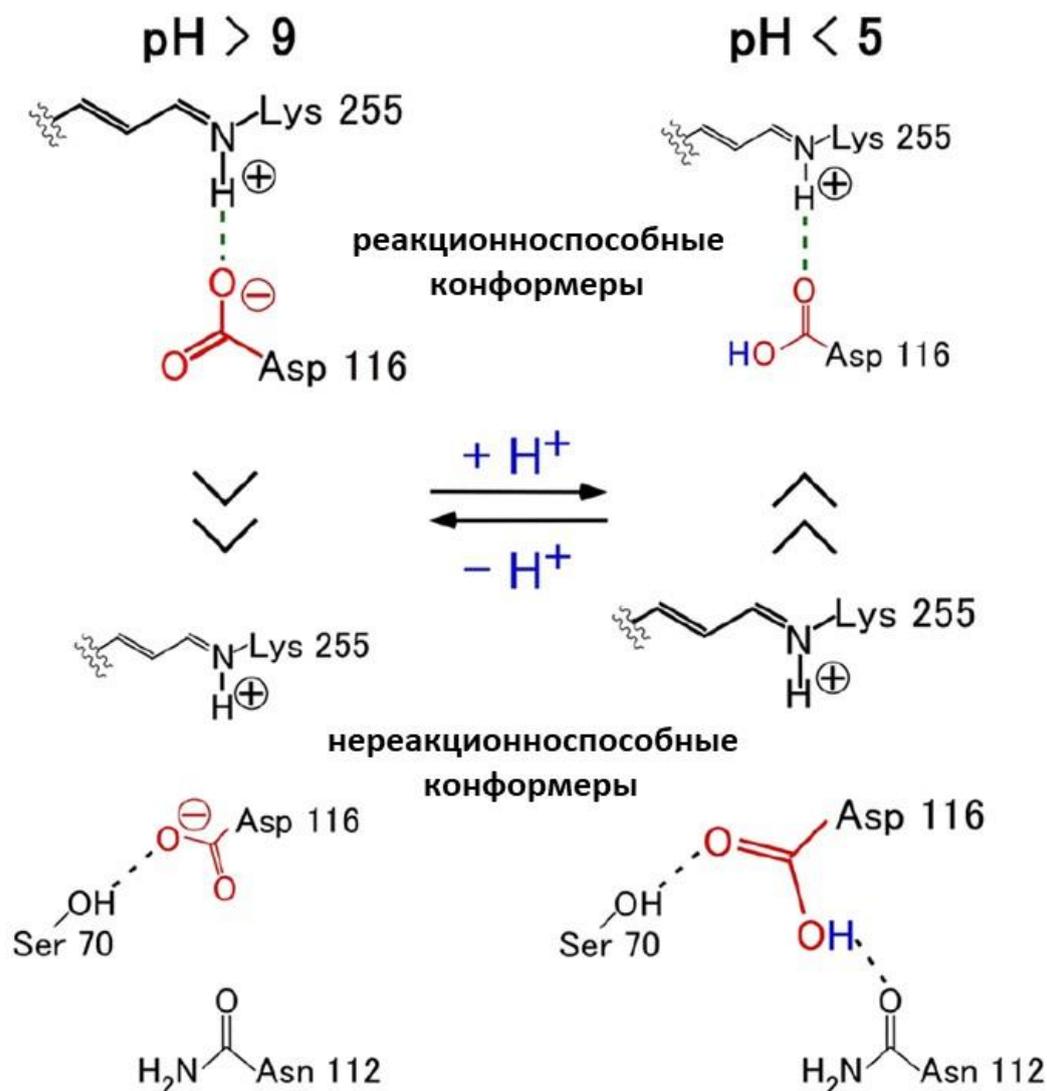
Также существуют работы, в которых образование множественных состояний  $S_1$  связывают с гетерогенностью основного состояния. Так, в работе [76] исследовали первичные процессы в сенсорном родопсине I. Было обнаружено, что абсорбция из возбужденного состояния и вынужденная эмиссия имеют биэкспоненциальный характер распада при pH 6.11. Так как  $pK_a$  Asp76 составляет 6,5, то было предположено, что в данном сенсорном родопсине сосуществуют два состояния с протонированным и депротонированным остатком аспартата, что приводит к появлению двух состояний  $S_1$  с разными временами жизни. В работе [70] было установлено, что вынужденная эмиссия и абсорбция из возбужденного состояния бактериородопсина показывают биэкспоненциальный распад. На основании этих результатов и спектроскопии выжигания было предположено, что возникновение множественных состояний  $S_1$  обусловлено неомогенностью основного состояния.

Фотоизомеризация в микробиальном родопсине KR2 протекает сверхбыстро за 180 фс. Тем не менее динамика распада возбужденного состояния KR2 является многоэкспоненциальной при физиологических pH, и две неосновные компоненты с характерным временем жизни 3 пс и 30 пс приписываются нереакционноспособным  $S_1$  состояниям, которые не приводят к фотоизомеризации и образованию фотопродуктов [54].

В работе [125] авторы исследуют природу нереакционноспособных состояний родопсина KR2. Для этого была проведена серия экспериментов по фемтосекундной

спектроскопии с временным разрешением при разных значениях рН от 4 до 11. Обнаружено, что реакционноспособное состояние  $S_1$  преимущественно образуется при значениях рН  $> 9$  и стремительно уменьшается при снижении рН, в то время как нереакционноспособное состояние начинает расти при снижении рН. рН зависимость относительной популяции реакционноспособного состояния  $S_1$  коррелирует с рН кривой титрования остатка Asp116, который является противоионом основания Шиффа ретиналя. На основании этого делается вывод, что депротонирование/протонирование Asp116 напрямую связано с возникновением нескольких состояний  $S_1$  в белке KR2. Также на образование нереакционноспособных состояний родопсина влияет положение остатка Asp116 относительно РПШО: в зависимости от этого положения может образовываться или не образовываться водородная связь между Asp116 и РПШО. Авторы приходят к выводу, что, возможно, сам факт протонирования/депротонирования противоиона РПШО, в частности Asp116, не так важен, а важен факт образования водородной связи между противоионом и РПШО, при этом водородная связь может образовываться и в случае протонированного состояния противоиона (рисунок 13).

Также гетерогенность основного состояния родопсина KR2 наблюдается в ряде работ, в которых описывается кристаллическая структура данного белка. Родопсин KR2 содержит в третьей трансмембранной спирали характеристическую триаду аминокислотных остатков, Asn, Asp, Gln, (NDQ), которые играют важную роль в транспорте ионов  $Na^+$ . Кристаллические структуры KR2 позволили определить полный путь транспорта иона  $Na^+$  внутри белка, включая триаду NDQ, области вхождения или выхода иона металла, а также выявили конформационную подвижность ретиналь-связывающего кармана. Было показано, что KR2 кристаллизуется в мономерной форме при кислотном значении рН, тогда как белок образует пентамерную форму, когда кристаллизация происходит при рН 4.9 или выше [51], [50], [57]. Установлено, что образование пентамера родопсином KR2 при физиологических условиях важно для осуществления функции транспорта иона натрия [49], [57]. Также в зависимости от условий сильно меняются спектральные свойства родопсина KR2, так при рН 4.0 максимум поглощения наблюдается при 566 нм, а при рН 5,6 – при 528 нм [50].



*Рисунок 13. Предполагаемые структуры ближайшего окружения ретиналя в белке KR2, которые ответственны за возникновение реакцияноспособных и нереакцияноспособных состояний родопсина при  $\text{pH} < 5$  и  $\text{pH} > 9$ . Рисунок модифицирован из работы [125].*

Это указывает на то, что олигомерное состояние белка влияет на  $\text{pK}_a$  Asp116, который является одним из консервативных остатков характеристической триады и противоионом РПШО. Сравнение мономерной и пентамерной структур показывает, что водородная связь между основанием Шиффа ретиналя и Asp116 отсутствует в мономерной форме при кислом  $\text{pH}$  и присутствует в пентамерной форме при физиологических условиях [51], [50], [125]. С использованием дифференциальной ИК спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR) и резонансной рамановской спектроскопии было показано, что РПШО образует сильную водородную связь с противоионом в темновом состоянии при физиологических условиях [55,126]. Этот факт

резко отличается от того, что наблюдается в другом микробальном белке, бактериородопсине, который содержит связанную молекулу воды между РПШО и его противоположной стороной, что, как полагают, является одним из ключевых элементов в механизме действия бактериородопсина [127].

Таким образом, несмотря на наличие большого числа экспериментальных работ, свидетельствующих о наличии многоэкспоненциальной кинетики релаксации возбужденного состояния в микробных родопсинах, до сих пор отсутствуют надежные теоретические исследования, однозначно объясняющие природу нереакционноспособных состояний в ретиналь-содержащих белках.

### ***1.2.6. Фотохромные реакции родопсинов***

Установлено, что ряд родопсинов могут проявлять фотохромные свойства. В таких родопсинах в результате реакции фотоизомеризации образуются промежуточные фотопродукты, некоторые из которых можно перевести в начальное состояние путем инициирования обратной реакции фотоизомеризации при поглощении фотона [128–131]. Обратные реакции фотоизомеризации РПШО с участием первичных интермедиатов фотоцикла практически не встречаются в природе. Но такие реакции проводятся экспериментально, так как их изучение позволяет приобрести дополнительные знания о механизме фотоизомеризации хромофорных групп родопсинов, находящихся в разных конформациях и в различных белковых окружениях. Исследование обратимых реакций уже проводилось экспериментально для ряда белков семейства родопсинов. Так, например, фотообратимость изучалась для бактериородопсина [132], [133], [134], бычьего зрительного родопсина [135], [136], [137], [138], родопсина осьминога [139], [140] и родопсина-1 прыгающего паука [141]. Например, в статье [135] были проведены исследования обратной реакции фотоизомеризации в батородопсине, первичном интермедиате бычьего зрительного родопсина, при помощи фемтосекундной спектроскопии с временным разрешением. В результате экспериментов было установлено, что батородопсин может поглощать фотон и переходить обратно в *cis* форму, наблюдающуюся в реагенте. В работе [31] проведен сравнительный анализ динамики обратных фотохромных реакций в бактериородопсине и бычьим зрительным родопсине, который показал, что эффективность обратной реакции фотоизомеризации при поглощении фотона первичным фотоинтермедиатом в случае бактериородопсина в пять раз выше по сравнению с бычьим зрительным родопсином.

Изучение фотохромных реакций интересно не только с точки зрения фундаментальной науки, но и полезно для создания устройств обработки информации. Способность различных родопсинов к фотохромизму, то есть обратимому переключению между двумя интермедиатами фотоцикла при поглощении фотона, позволяет рассматривать эти белки как прототипы молекулярных переключателей. Так, фотохромные свойства бактериородопсина позволили использовать этот белок в качестве светочувствительной среды в нескольких запатентованных устройствах для записи, передачи и хранения информации [142–145].

### 1.3. Методы теоретической химии

#### 1.3.1. Метод EFP

Моделирование свойств сольватированных молекулярных систем с учетом свойств растворителя - распространенная задача в современной теоретической химии. При решении данной задачи могут быть использованы явные и неявные модели растворителя. В данных моделях всю рассматриваемую систему разделяют на две части: классическую, куда входит растворитель, и квантово-механическую, которая состоит из изучаемой молекулы. Обе модели описывают влияние растворителя электростатическим полем, потенциал которого создается растворителем и которое влияет на квантово-механический гамильтониан растворенной молекулы, рассматриваемой на *ab initio* уровне.

Рассмотрим подробнее явную модель растворителя, реализованную в методе EFP. EFP использует *ab initio* гамильтониан для растворенного вещества, которое может представлять из себя простую молекулу или группу молекул и функциональных групп, а также может включать несколько ближайших молекул растворителя. Влияние окружения описывается наиболее важными вкладами одночастичных операторов межмолекулярного взаимодействия в оператор Гамильтона молекулы растворенного вещества, а именно: электростатического, поляризационного и обменного отталкивания.

Если  $\mathbf{H}_{AB}$  определить как *ab initio* гамильтониан, который описывает определенную часть (AB) рассматриваемой системы, то полный гамильтониан всей системы может быть записан следующим образом:

$$\mathbf{H} = \mathbf{H}_{AB} + \mathbf{V} \quad (1)$$

$v$  - потенциал, который обусловлен полем, создаваемым молекулами растворителя, не входящими в часть АВ. Для молекулы растворителя под номером  $\mu$  эффективный гамильтониан взаимодействия с квантовой подсистемой АВ записывается следующим образом:

$$V_{el}(\mu, s) = \sum_{k=1}^K V_k^{Elec}(\mu, s) + \sum_{l=1}^L V_l^{Pol}(\mu, s) + \sum_{m=1}^M V_m^{Rep}(\mu, s) \quad (2),$$

где  $s$  обозначает электронные координаты. Три слагаемых в уравнении 2 представляют электростатическое взаимодействие, поляризационное взаимодействие и обменный потенциал, соответственно.

Точное, относительно компактное представление электростатического потенциала, создаваемого молекулами растворителя, достигается с помощью распределенного мультипольного разложения [146]. Индекс в первом члене уравнения (2) обозначает количество точек на молекуле растворителя, на которых распределены заряды. Так, каждое атомное ядро и центр каждой связи выбираются в качестве таких точек (например, пять точек присутствуют на молекуле воды). В формуле разложения потенциала присутствуют высшие члены вплоть до октуполей [147]:

$$V_k^{Elec}(\mu, s) = \frac{q_k(\mu)q_s}{r_{sk}} - \sum_a^{x,y,z} \mu_a^k(\mu)F_a(r_{sk}) - \frac{1}{3} \sum_{a,b}^{x,y,z} \Theta_{ab}^k(\mu)F_{ab}(r_{sk}) - \frac{1}{15} \sum_{a,b,c}^{x,y,z} \Omega_{abc}^k(\mu)F_{abc}(r_{sk}) \quad (3),$$

где  $q$ ,  $\mu$ ,  $\Theta$  и  $\Omega$  обозначают заряд, диполь, квадруполь и октуполь, соответственно.

$F_a$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{abc}$  - электрическое поле растворенного вещества, градиент поля и гессиан поля [148].

Поляризация фрагментов системы в электрическом поле квантово-механической подсистемы (второе слагаемое в уравнении (2)) описывается в рамках самосогласованной модели. При этом отклик на внешнее поле каждой локализованной молекулярной орбитали фрагмента описывается своим тензором поляризуемости,  $\alpha_{ab}^l$ , который рассчитывается предварительно:

$$V_l^{Pol}(\mu) = - \sum_{a,b}^{x,y,z} F_a(r_l) \alpha_{ab}^l(\mu) \langle F_b(r_l) \rangle \quad (4a),$$

$$\alpha_{xy}^l = \lim_{F_y \rightarrow 0} \frac{\mu_x^l(F_y) - \mu_x^l(0)}{F_y} \quad (46),$$

где  $F$  - поле, обусловленное *ab initio* частью системы, тогда как  $\alpha_{xy}^l$  – составляющая поляризуемости молекулы-фрагмента на локализованной орбитали с индексом  $l$ .

В связи с трудностью задания аналитического выражения для отталкивательного потенциала, чаще всего он представляется в произвольном виде, как линейная комбинация гауссовых функций, локализованных на каждом атоме фрагмента и на центре масс фрагмента:

$$V_m^{Rep}(\mu, s) = \sum_j^J \beta_{m,j}(\mu) e^{-\alpha_{m,j}(\mu)r_{m,s}^2} \quad (5)$$

Для воды  $J = 2$  и имеется четыре центра на фрагменте ( $M = 4$ ): три ядра атомов и центр масс. Параметры гауссовых функций подбираются с помощью процедуры аппроксимации [149] по данным, полученным в ходе предварительных *ab initio* расчетов. *Ab initio* обменный потенциал получается путем вычитания суммы электростатической энергии и энергии поляризации из общего потенциала для получения члена  $E_{rem}^{(ab)}$ . Затем  $V_m^{Rep}$  аппроксимируется к значению  $E_{rem}^{(ab)}$ :

$$\Delta = \sum_p^P \omega_p \left[ \left\langle \Psi \left| \sum_m^M V_m^{Rep} \right| \Psi \right\rangle_p - E_{rem}^{(ab)}(p) \right]^2 \quad (6),$$

где  $\omega_p$  - весовой множитель, равный единице при аппроксимации в случае молекулы воды.  $\Psi$  - волновая функция части АВ рассматриваемой системы [148].

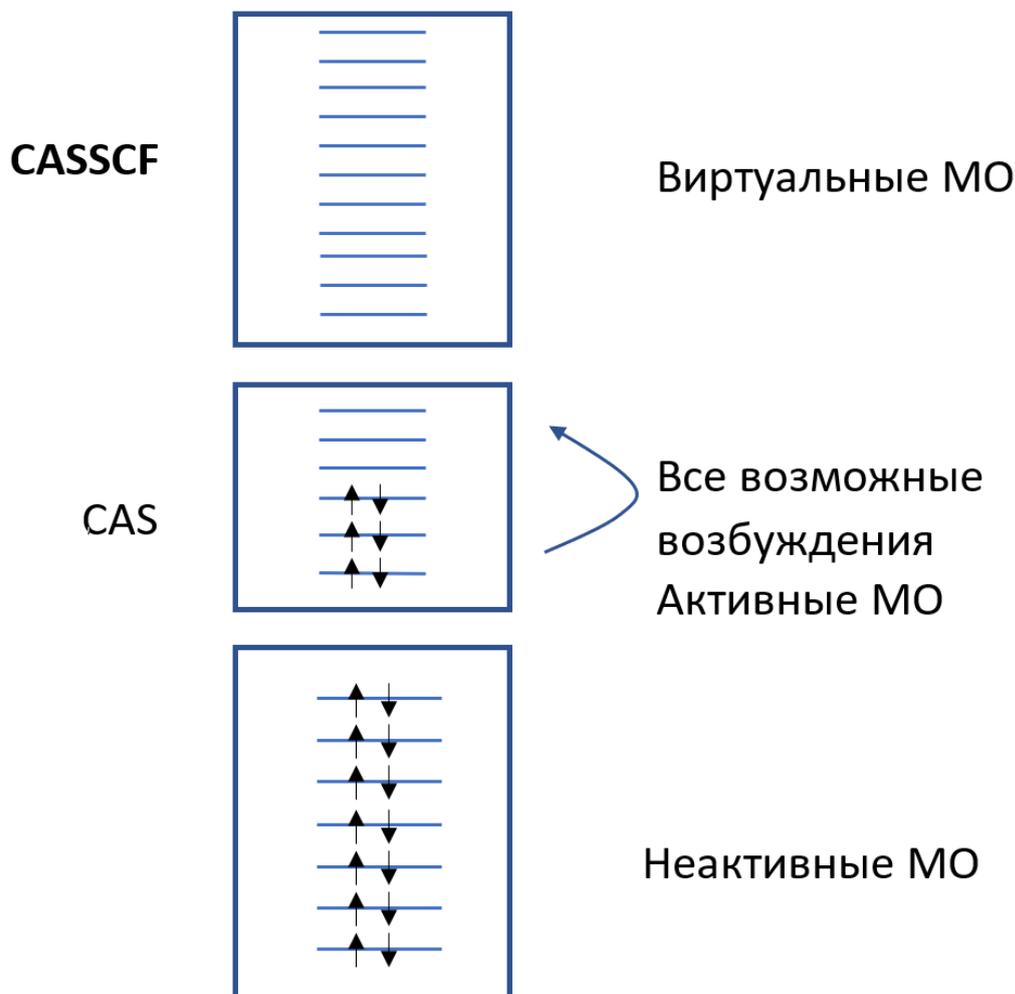
### 1.3.2. Метод CASSCF

Текущее развитие методов квантовой химии дает возможность с достаточной точностью вычислить характеристики молекул, связанные с их электронной структурой. Важным аспектом представленной работы является расчет таких фотофизических свойств изомеров и модифицированных форм РПШО, как энергий вертикальных электронных переходов и соответствующих им дипольных моментов и сил осцилляторов. Также в ряде случаев при расчете свойств важно учитывать наличие конического пересечения электронных уровней.

Для описания электронной структуры протонированного основания Шиффа ретиналя требуются методы, учитывающие многоконфигурационный характер волновых функций электронных состояний, а также их взаимодействие друг с другом. Многоконфигурационные многореференсные методы позволяют довольно хорошо учитывать эффекты электронной корреляции (статической и динамической) и описывать вырожденные и/или возбужденные состояния. Поэтому, одним из самых успешных методов для описания возбужденных состояний является инвариантный (расширенный) метод многоконфигурационной квазивырожденной теории возмущений второго порядка (ХМСQDPT2), который в качестве референсной волновой функции использует волновую функцию, полученную методом самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей (CASSCF).

В многоконфигурационных методах волновая функция представляется в виде суммы детерминантов Слейтера. В методе CASSCF одновременно оптимизируются как коэффициенты разложения волновой функции по детерминантам Слейтера или конфигурационным функциям состояния (последние являются собственными не только для оператора проекции спина на выделенную ось, но и для оператора квадрата спина, в связи с чем они имеют определенную мультиплетность), так и коэффициенты разложения молекулярных орбиталей по базисному атомному набору. В методе CASSCF молекулярные орбитали классифицируются по трем категориям в зависимости от роли, которую они играют в построении  $N$ -электронной волновой функции: неактивные, активные и вторичные (виртуальные) (рисунок 14). Неактивные орбитали являются всегда дважды занятыми, активные молекулярные орбитали могут иметь нецелочисленную заселенность, которая меняется в пределах от 0 до 2, тогда как оставшаяся часть орбитального пространства, определяемая размером используемого одноэлектронного базисного набора, состоит из виртуальных орбиталей. Неактивные орбитали дважды заняты во всех конфигурациях CASSCF. Остальные электроны занимают активные орбитали. Волновая функция CASSCF формируется линейной комбинацией всех возможных конфигураций, которые могут быть построены путем распределения активных электронов по активным орбиталям и согласуются с заданной пространственной и спиновой симметрией. Энергия CASSCF инвариантна к вращению активных орбиталей. Для сбалансированного описания энергий нескольких состояний в рамках одного расчета, а также разницы энергий между ними обычно используется

процедура усреднения по состояниям (SA), где минимизируемый функционал энергии определяется как средневзвешенная энергия нескольких состояний. В рамках такого расчета получается единый набор молекулярных орбиталей, который используется для построения многоконфигурационных волновых функций. Для данной пространственной и спиновой симметрии расчет энергий возбужденных состояний предпочтительно выполняется с использованием метода SA-CASSCF [150].



**Рисунок 14. Схема метода CASSCF**

Метод теории возмущений XMCQDPT2, использующий в качестве референсных многоконфигурационные волновые функции, полученные методом SA-CASSCF, позволяет учесть оставшиеся эффекты динамической электронной корреляции.

### **1.3.3. Метод XMCQDPT2**

Методы теории возмущений позволяют дополнительно учесть эффекты динамической электронной корреляции, которые отсутствуют в методе CASSCF. Перед описанием метода XMCQDPT2 для начала важно рассмотреть более простые методы

теории возмущений.

Так, методы теории возмущений представляют гамильтониан системы как сумму референсного гамильтониана и возмущения.

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{V} \quad (7)$$

В теории возмущений Меллера-Плессета (MP) одноэлектронные эффективные операторы фока суммируются и представляют  $\hat{H}_0$ .

$$\hat{H}_0 = \sum_i^N \hat{f}(i) \quad (8)$$

$$\hat{f}(i) = h(i) + \sum_j^{N/2} (2J_j(i) - K_j(i)) \quad (9)$$

$$v_{HF}(i) = \sum_j^{N/2} (2J_j(i) - K_j(i)) \quad (10)$$

$$h(i) = -\Delta_i / 2 - \sum_{\alpha} Z_{\alpha i} / R_{\alpha i} \quad (11)$$

$J_j$  и  $K_j$  - кулоновский и обменный операторы, соответственно.

Функцией нулевого приближения в случае закрытых оболочек служит детерминант Слейтера  $\Phi_0^{(0)} = \Phi_{RHF}$ :

$$\hat{H}_0 \Phi_{RHF} = E_0^{(0)} \Phi_{RHF} \quad (12)$$

$$E_0^{(0)} = \sum_i \varepsilon_i \quad (13)$$

Отличие полного электростатического взаимодействия от взаимодействия электронов в методе Хартри-Фока ( $v_{HF}$ ) является возмущением системы:

$$\hat{V} = \hat{H} - \hat{H}_0 = \sum_{i < j} \frac{1}{r_{ij}} - \sum_i v_{HF}(i) \quad (14)$$

Методы, в которых возмущение раскладывается в ряд с точностью до 2 (MP2) и 4

(MP4) порядков, является наиболее используемыми.

Теория возмущений MP в первом порядке позволяет воспроизвести энергию Хартри-Фока:

$$E_{RHF} = \left\langle \Phi_{RHF} \left| \hat{H} \Phi_{RHF} \right. \right\rangle = \left\langle \Phi_{RHF} \left| (\hat{H}_0 + \hat{V}) \Phi_{RHF} \right. \right\rangle = \left( \sum_i \varepsilon_i \right) + \left\langle \Phi_{RHF} \left| V \Phi_{RHF} \right. \right\rangle = E_0^{(0)} + E_0^{(1)} \quad (15)$$

Во втором порядке теории возмущений MP энергии понижается, за счет следующей отрицательной поправки к энергии:

$$E_0^{(2)} = \sum_j \frac{\left| \left\langle \Phi_j \left| V \right| \Phi_{RHF} \right\rangle \right|^2}{E_0^{(0)} - E_j^{(0)}} < 0 \quad (16)$$

$$E_j^{(0)} = \left\langle \Phi_j \left| H_0 \right| \Phi_j \right\rangle \quad (17)$$

$|\Phi_j\rangle$  представляет собой волновые функции, получающиеся из начального детерминанта возбуждением двух электронов.

Теория возмущений MP в варианте MP2 подходит для описания систем, состояния которых можно хорошо охарактеризовать единственным детерминантом Слейтера, а энергию корреляции – двойными возбуждениями электронов.

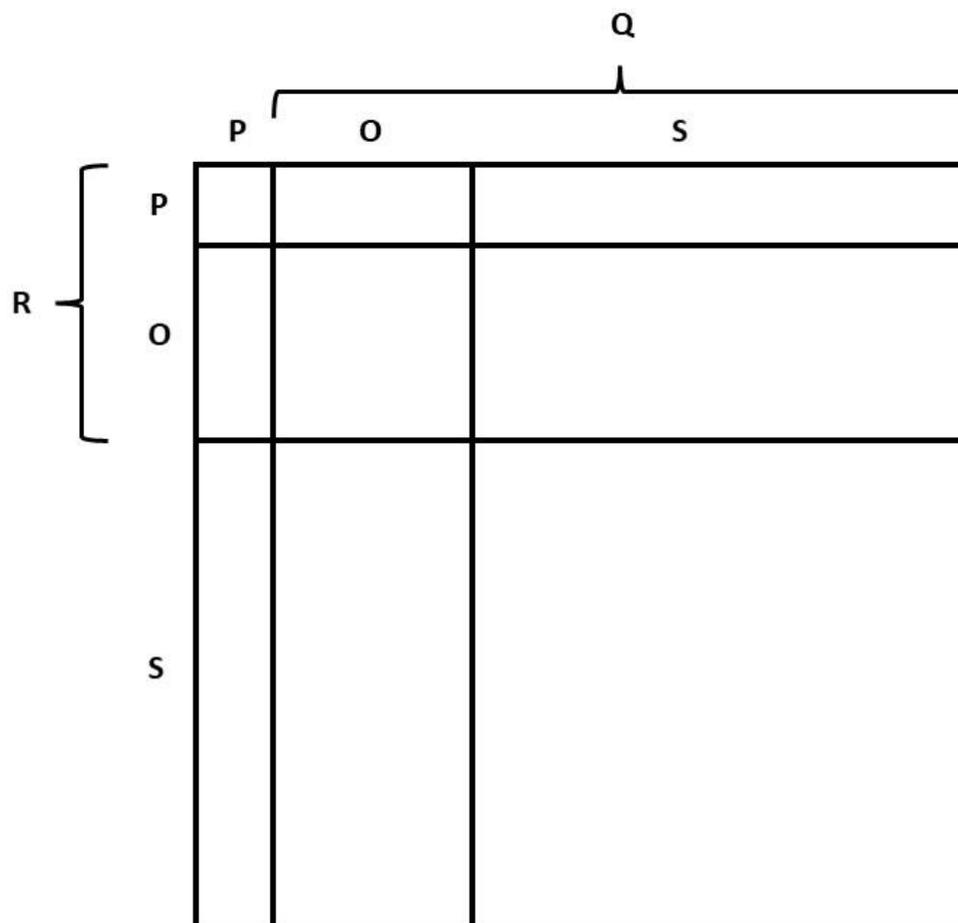
Для расчета систем, которые плохо описываются одним детерминантом Слейтера, используют многореференсную теорию возмущений (MRMP2) [151]. Важным отличием многореференсной теории возмущений от MP состоит в том, что в MRMP2 в качестве нулевого приближения используют функции, полученные методом CASSCF, которые содержат больше, чем один детерминант Слейтера, в отличие от нулевого приближения метода MP. Базис метода MRMP2 условно подразделяется на три блока (рисунок 15).

**P** – референсные функции, задающие **P** подпространство и полученные методом SA-CASSCF в активном пространстве целевых состояний.

**O** – функции, являющиеся ортогональными **P** подпространству и собственными для гамильтониана метода CASCI.

**S** – конфигурационные функции состояния, являющиеся ортогональными подпространствам **P** и **O**.

Полное подпространство CASCI, включающее  $P$  и  $O$  подпространства, обозначается как  $R$  подпространство. Подпространство  $Q$  состоит из  $O$  и  $S$  подпространств (рисунок 15).



*Рисунок 15. Изображение схематичного разделения базисных функций в многореференсных методах теории возмущений.*

В методе MRMP2 гамильтониан подвергается диагонализации в базисном наборе волновых функций в подпространстве  $R$ , состоящих из референсных конфигурационных функций состояния. Далее по теории возмущений находятся поправки только для диагональных элементов. Так как референсная волновая функция берется из метода CASSCF, то метод MRMP2 для рассчитываемых состояний позволяет учесть нединамическую корреляцию, при этом, так как в MRMP2 используется теория возмущения, то происходит учет также динамической электронной корреляции. Метод MRMP2 позволяет описывать ряд состояний, но поправки к диагональным элементам каждого состояния определяются независимо друг от друга, то есть модельное пространство, в котором происходит нахождение поправок, имеет размерность 1.

Метод MRMP2 можно использовать в тех случаях, когда референсные волновые

функции целевых состояний можно хорошо описать методом CASSCF. Но есть системы, когда этого сделать нельзя, так как целевые состояния либо вырождены, либо метод CASSCF дает неправильный порядок возбужденных состояний.

Если в системе наблюдается взаимодействие электронных уровней, которое надо учесть, то используют MS-MR-PT методы, как, например, метод MCQDPT2. Метод MCQDPT2 является развитием метода MRMP2 в случае квазивырождения и представляет многореференсную теорию возмущений, в которой волновые функции нулевого приближения являются усредненными по нескольким состояниям функциями, полученными в рамках метода CASSCF, а построение эффективного гамильтониана происходит путем расчета возмущения. Целевые состояния находятся одновременно путем диагонализации эффективного гамильтониана.

Гамильтониан состоит из референсного гамильтониана и возмущения. Референсный гамильтониан является аналогом того, который фигурирует в методе MRMP2 [152].

В этом методе с использованием эффективных гамильтонианов предполагается, что можно посчитать поправки не ко всем, а только к целевым низколежащим состояниям с сохранением их правильных собственных значений, то есть собственные значения полного и эффективного гамильтонианов для этих состояний будут совпадать.

Матричный блок, соответствующий оператору  $H_0$ , в методе MCQDPT2 устроен таким образом, что он полностью диагонален, что облегчает расчеты, но приводит к тому, что метод MCQDPT2 становится неинвариантным. При этом наблюдается тенденция к завышению недиагональных элементов эффективного гамильтониана. Также отсутствует явная зависимость эффективного гамильтониана от размера модельного пространства, то есть гамильтониан размерности  $n$  просто вложен в состав гамильтониана размерности  $n+1$ .

Метод XMCQDPT2 является расширенной многоконфигурационной квазивырожденной теорией возмущений [153]. В отличие от метода MCQDPT2 в данном методе учитывается тот факт, что в общем случае блок  $\mathbf{P}\mathbf{P}$  в базисе собственных векторов CASCI не является диагональным, то есть  $H_0$  не является диагональным в  $\mathbf{P}$  подпространстве. Важным преимуществом методу XMCQDPT2 перед методом MCQDPT2 является то, что метод XMCQDPT2 является инвариантным при ортогональных преобразованиях векторов модельного пространства. Еще одним улучшением является

то, что наблюдается явная зависимость эффективного гамильтониана от размера модельного пространства, и при расширении модельного пространства прослеживается сходимость.

Таким образом, MR-PT2 методы, а также усовершенствованные версии этих методов в виде MS-MR-PT2 подходов, позволяющих учитывать взаимодействие нескольких электронных состояний, являются важным шагом вперед при описании электронной структуры по сравнению с методом CASSCF. При этом не все методы MS-MR-PT2 пригодны для описания систем вблизи точек конического пересечения, так как их решения могут быть неустойчивыми из-за того, что волновые функции нулевого приближения, полученные методом CASSCF, могут сильно смешиваться между собой через разложение по КФС. Метод XMCQDPT2 является инвариантным при унитарных преобразованиях функций нулевого приближения CASSCF, что дает возможность описывать системы вблизи конических пересечений, что, в частности, было продемонстрировано в работе [77]. В данной работе рассчитанные методом XMCQDPT2 времена жизни возбужденных состояний изомеров РПШО хорошо согласуются с экспериментальными данными, полученными методом фемтосекундной спектроскопии действия с временным разрешением.

\*\*\*

Таким образом, анализ литературных данных свидетельствует о том, что фотодинамика и эффективность реакции фотоизомеризации РПШО в значительной степени зависят от окружения хромофора, которое оказывает электростатическое и стерическое воздействие на путь и механизм реакции фотоизомеризации. Целью настоящего диссертационного исследования стало изучение влияния белкового окружения на механизм первичных фотохимических реакций на примере целого ряда белков I и II типов: родопсина KR2, бактериородопсина, зрительного родопсина быка. Данные родопсины отличаются строением активного центра, что позволяет исследовать механизм реакции фотоизомеризации изомеров РПШО в разном белковом окружении. Для достижения поставленной цели была не только выполнена задача по исследованию фотофизических свойств РПШО в данных родопсинах, но также решены задачи по получению референсных значений фотофизических свойств изомеров и модифицированных форм РПШО в газовой фазе, что позволило зафиксировать

изменения этих свойств при помещении хромофора в белковое окружение. Расчет фотофизических свойств всех указанных объектов исследования был сделан с использованием методов квантовой химии единого высокого уровня теории, что позволило получить единый набор рассчитанных данных для выявления закономерности изменения фотодинамики реакции фотоизомеризации изомеров РПШО в разных окружениях.

## Глава 2. Расчетная часть

---

### 2.1 Описание свойств изомеров и модифицированных форм РПШО в газовой фазе

#### 2.1.1 Расчет энергий и градиентов методом ХМCQDPT2

Энергии и градиенты основного и возбужденных состояний для полностью-*транс* и 9-*цис*, 11-*цис* и 13-*цис* изомеров РПШО в газовой фазе были рассчитаны с использованием расширенной многоконфигурационной квазивырожденной теории возмущений (ХМCQDPT2) [153]. Геометрии структур в стационарных точках на поверхности  $S_1$ , геометрии структур в точках конического пересечения с минимальной энергией (МЕСИ) между состояниями  $S_1$  и  $S_0$ , а также релаксированные сканирования ППЭ вдоль координаты изомеризации на поверхности  $S_1$  получены с использованием метода ХМCQDPT2/SA(2)-CASSCF(12,12)/cc-pVDZ. Энергии вертикальных переходов  $S_1$ - $S_n$  вдоль путей реакции были рассчитаны с использованием метода ХМCQDPT2[7]/SA(7)-CASSCF(12,12)/cc-pVDZ. Программный пакет Firefly [154], версии 8.2.0, был использован для всех расчетов, касающихся электронной структуры исследуемых молекул.

Свойства модифицированных форм РПШО в газовой фазе были рассчитаны на уровне теории ХМCQDPT2/SA(2)-CASSCF(12,12)/cc-pVDZ.

Референсные волновые функции основного и целевых возбужденных состояний были получены в рамках многоконфигурационного метода самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей (CASSCF), активное пространство которого содержало 12 электронов, распределенных по 12 орбиталам. Все валентные орбитали  $\pi$ -типа были включены в активное пространство. Была применена процедура усреднения по состояниям (SA). Два низколежащих состояния CASSCF были включены в SA процедуру.

Волновые функции нулевого приближения CASSCF могли взаимодействовать друг с другом в рамках эффективного гамильтониана метода ХМCQDPT2. Энергии возмущенных состояний получены как собственные значения эффективного гамильтониана. Проекция возмущенных состояний на состояния нулевого приближения

определялись как соответствующие собственные вектора эффективного гамильтониана.

Во всех случаях оптически ярким оказывалось состояние  $S_1$ , рассчитанное на уровне теории ХМСQDPT2. Градиент на поверхности возбужденного состояния рассчитывался численно как двусторонняя производная на уровне теории ХМСQDPT2. Оптимизацию геометрии основного состояния проводили с использованием метода теории функционала электронной плотности на уровне теории PBE0/сс-pVDZ. Был применен колебательный анализ для проверки типа локализованных стационарных точек на поверхности потенциальной энергии.

Программный пакет Firefly [154], версии 8.2.0, был использован для всех расчетов, касающихся электронной структуры исследуемых молекул с использованием методов DFT и ХМСQDPT2.

### **2.1.2 Расчет времен жизни возбужденных состояний**

Профили,  $V(\theta)$ , поверхности потенциальной энергии  $S_1$  вдоль координаты изомеризации для полностью-*транс* РПШО и полностью-*транс* модифицированных РПШО были использованы для решения одномерного уравнения Шредингера для внутримолекулярного вращения методом Нумерова [155,156]:

$$H_{tr} = -\frac{\hbar^2}{2I_\theta} \frac{\partial^2}{\partial \theta^2} + V(\theta),$$

$$I_\theta = \frac{\hbar}{4\pi c B_{rot}(\theta)}$$

- приведенный момент инерции РПШО и соответствующих модифицированных РПШО, усредненный по всем геометриям вдоль координаты изомеризации, и  $B_{rot}(\theta)$  - усредненная вращательная постоянная.

Приведенный момент инерции рассчитывается относительно оси С-С, вокруг которой происходит внутримолекулярное вращение. При внутримолекулярном вращении центр масс молекулы изменяется, и поэтому приведенный момент инерции зависит от величины угла вращения, по которому происходит вращение. Оптимизированные геометрии молекулы на поверхности возбужденного состояния вдоль координаты изомеризации были использованы для расчета приведенного момента инерции, как функции от угла вращения. Поскольку изменения  $I_\theta$  малы, то итоговое значение получается как среднее по всем рассчитанным значениям.

Константы скорости изомеризации рассчитаны с помощью теории активированного комплекса по формуле  $k = L \frac{k_B T}{h} \frac{1}{\sum_{i=0}^n e^{-\frac{E_i}{k_B T}}} e^{-\frac{\Delta E_0}{k_B T}}$ . L – число эквивалентных путей,  $E_i$  – вращательные уровни энергии,  $\Delta E_0$  – энергетический барьер вращения на поверхности  $S_1$  с учетом энергии нулевых колебаний. Обратное значение константы скорости реакции первого порядка соответствует времени жизни возбужденного состояния. L равняется 2 для симметричного потенциала и равняется 1 для асимметричного потенциала.

Времена жизни возбужденных состояний были рассчитаны как обратное значение суммы констант скорости, которые описывают вращение вокруг трех двойных связей. Также предполагалось, что термическое распределение энергии по колебательным уровням в первом возбужденном состоянии  $S_1$  является таким же, как и в основном состоянии  $S_0$ , после того, как РПШО претерпевает возбуждение, по энергии близкое к адиабатическому переходу. Таким образом, избыток колебательной энергии, полученный после возбуждения, считался небольшим по сравнению со средней колебательной энергией молекул хромофора, находящихся в основном состоянии до возбуждения. Суммы по состояниям для реакционных мод были рассчитаны при помощи точных собственных значений, найденных при численном решении одномерного уравнения Шредингера в потенциале, образованном барьерами вращения вокруг двойных связей на поверхности  $S_1$  и рассчитанном с использованием метода ХМСQDPT2.

## **2.2 Описание свойств РПШО в белковом окружении родопсина KR2, бактериородопсина и зрительного родопсина**

### **2.2.1 Молекулярно-динамическое моделирование**

Полные атомистические модели белка KR2 в растворе были получены на основе двух альтернативных структур. Первая структура имеет идентификатор PDB ID 6REW [49], и ее более поздняя уточненная версия имеет идентификатор PDB ID 6YC3 [52]. Вторая использованная структура соответствует идентификатору PDB ID 3X3C [51].

Полные атомистические модели бычьего зрительного родопсина и бактериородопсина в водном растворе получены на основе кристаллических структур PDB ID 1L9H [61] и PDB ID 1M0L [25].

Для получения атомистических моделей белков к исходным кристаллическим структурам были добавлены недостающие атомы водорода, все аминокислотные остатки His рассматривали, как протонированные по  $\epsilon$  атомам азота. Моделирование проводилось с использованием мономеров указанных структур.

Общий заряд родопсина KR2 был сведен к нулю путем мутирования нескольких заряженных остатков Glu, обращенных в раствор на поверхности белковой глобулы, на их нейтральные аналоги Gln. Три аминокислотных остатка в случае структуры bREW и структуры bYС3 (Glu4, Glu90, Glu91) и два аминокислотных остатка в случае структуры 3X3C (Glu90, Glu91), которые не участвуют в образовании солевых мостов, были подвергнуты мутации.

Атомистические структуры были сольватированы путем добавления  $\sim 30\,000$  молекул воды. Оптимизация геометрии сольватированных моделей белков проводилась в течении 2000 шагов. Затем система подвергалась молекулярному моделированию в NPT ансамбле с использованием силового поля CHARMM36 [157]. Параметры силового поля для ретиналя были взяты из статей [158,159]. Молекулы воды описывались силовым полем с параметрами TIP3P [160]. Были использованы периодические граничные условия. Температура при уравнивании системы составляла 300К и поддерживалась при помощи термостата Ланжевена, давление составляло 1 атм и поддерживалось при помощи баростата Нозе-Гувера. Метод суммирования Эвальда применялся для расчета дальнедействующих электростатических взаимодействий в периодических граничных условиях. Молекулярное моделирование проводилось в течение 40 нс с временным шагом интегрирования 1 фс. Затем температура системы постепенно понижалась до 20 К с шагом 1 К в течение 1,06 нс. Конечная геометрия системы была получена после минимизации энергии в течение 10 000 шагов. Атомистические модели белков в одном растворе были собраны при помощи программы VMD [160]. Программа NAMD была использована для проведения молекулярного моделирования [160].

### ***2.2.2 Оптимизация геометрии структур и проведение колебательного анализа методом КМ/ММ***

Размер атомистических моделей белка в растворе, охлажденных методом молекулярного моделирования, был сокращен для последующей оптимизации структуры методом КМ/ММ. Уменьшение размера было достигнуто путем удаления молекул воды, которые находились дальше, чем 2.4 Å от поверхности белка, т.е. дальше первой

сольватной оболочки. Каждая из уменьшенных систем содержит примерно 480 молекул воды, и общее количество атомов, включая белок, составляет ~5800.

В родопсине KR2 все атомы РПШО и Asp116, а также боковые группы Lys255, Asn112, Tyr 218, Asp251, карбонильная группа Ile115, аминокетильная группа Val117, гуанидиновая группа Arg109 и молекулы воды, формирующие сеть водородных связей в ретиналь-связывающем кармане, составляли квантовую подсистему при оптимизации геометрии системы в основном состоянии комбинированным методом КМ/ММ. Все атомы, входившие в квантовую часть, показаны на рисунке 40 (атомы водорода РПШО также были включены в квантовую часть).

В зрительном родопсине в квантовую подсистему входила гидроксильная группа Tyr192, карбоксильные группы Glu181 и Glu113, РПШО, боковая группа Lys296, гидроксильная группа Ser186, также частично входили остатки Phe293, Ala292, Cys187 и молекулы воды, формирующие сеть водородных связей в ретиналь-связывающем кармане (рисунок 27, В).

Квантовая подсистема бактериородопсина включала гидроксильную группу Thr89, боковую группу Tyr185, карбоксильные группы Asp85, Asp212, РПШО и молекулы воды, формирующие сеть водородных связей в ретиналь-связывающем кармане (рисунок 35, Б).

Оптимизация основного состояния была проведена в рамках схемы КМ/ММ с механическим внедрением с использованием ~1500 базисных функций, функционала PBE0, базисного набора (aug)-cc-pVDZ, параметров силового поля AMBER [160]. Диффузные функции были добавлены только на атомы кислорода. В методе КМ/ММ с механическим внедрением ограничения были наложены на геометрию квантовой подсистемы, а взаимодействие между КМ и ММ подсистемами описывалось с использованием классического силового поля. Данный выбор КМ подсистемы позволяет описать весь ретиналь-связывающий карман на достаточно высоком уровне теории и корректно учесть все возникающие между хромофором и ключевыми аминокислотными остатками взаимодействия, такие как водородные связи и короткодействующее отталкивание. Дополнительные ограничения были наложены на внешнюю часть белка, расположенную более чем на 7 Å от хромофора, которая сохранялась неподвижной во время процедуры КМ/ММ оптимизации.

Полная атомистическая модель первичного К интермедиата родопсина KR2 ( $K_{KR2}$ ) была получена на основе кристаллической структуры с PDB ID 6TK5. Структура PDB ID 6TK5 была получена в статье [161], в которой структуры интермедиатов фотоцикла KR2 были определены при помощи фемтосекундной рентгеновской спектроскопии с временным разрешением. Структура PDB ID 6TK5 была снята через 2 пс после поглощения фотона, что соответствует времени образования  $K_{KR2}$ . Для наших расчетов нужно было получить атомистическую модель интермедиата  $K_{KR2}$ , в которой изменена только структура РПШО, а белковое окружение остается неизменным по сравнению с реагентом из-за сверхбыстрой скорости протекания реакции. Для этого геометрия РПШО, взятая из кристаллической структуры 6TK5, была вставлена в оптимизированную методом КМ/ММ структуру реагента конформера I родопсина KR2 вместо исходной геометрии РПШО. Затем была проведена оптимизация полученной структуры методом КМ/ММ на уровне теории PBE0/(aug)-cc-pVDZ//AMBER.

Полная атомистическая модель первичного интермедиата зрительного родопсина (Бато) была получена на основе кристаллической структуры PDB ID 2G87. Структура PDB ID 2G87 была получена в статье [162], при помощи рентгеноструктурного анализа облученных кристаллов реагента зрительного родопсина в криогенных условиях. Для наших расчетов нужно было получить атомистическую модель интермедиата Бато, в которой изменена только структура РПШО, а белковое окружение остается неизменным по сравнению с реагентом из-за сверхбыстрой скорости протекания реакции. Для этого геометрия РПШО, взятая из кристаллической структуры 2G87, была вставлена в оптимизированную методом КМ/ММ структуру реагента зрительного родопсина вместо исходной геометрии РПШО. Затем была проведена оптимизация полученной структуры методом КМ/ММ на уровне теории PBE0/(aug)-cc-pVDZ//AMBER.

Полная атомистическая модель первичного К интермедиата бактериородопсина ( $K_{BR}$ ) была получена на основе кристаллической структуры PDB ID 1M0K. Структура PDB ID 1M0K была получена в статье [25]. Кристаллы были сняты при 100 К. Для наших расчетов нужно было получить атомистическую модель интермедиата  $K_{BR}$ , в которой изменена только структура РПШО, а белковое окружение остается неизменным по сравнению с реагентом из-за сверхбыстрой скорости протекания реакции. Для этого геометрия РПШО, взятая из кристаллической структуры 1M0K, была вставлена в оптимизированную методом КМ/ММ структуру реагента бактериородопсина вместо

исходной геометрии РПШО. Затем была проведена оптимизация полученной структуры методом КМ/ММ на уровне теории PBE0/(aug)-cc-pVDZ//AMBER.

Частичный колебательный анализ был проведен в рамках того же подхода КМ /ММ, что и оптимизация геометрии. Были вычислены вторые производные полной энергии КМ/ММ по ядерным координатам РПШО и бокового остатка Lys255 в случае родопсина KR2 и  $K_{KR2}$ , по ядерным координатам РПШО и бокового остатка Lys296 в случае зрительного родопсина и Бато и по ядерным координатам РПШО и бокового остатка Lys216 в случае бактериородопсина и  $K_{BR}$ . Частично вычисленная матрица Гессе была диагонализирована, и все ее положительные собственные значения (действительные частоты) свидетельствуют, что найденные КМ/ММ стационарные точки являются истинными минимумами на поверхности потенциальной энергии основного состояния.

### **2.2.3 Молекулярная метадинамика**

Полная атомистическая модель белка KR2 в пентамерной форме была построена на основе рентгеновской структуры с PDB ID 6YC3 [52], которая является уточненной версией структуры PDB ID 6REW [49]. Пентамер был встроен в бислою липидов фосфатидилхолина (259 липидов) и затем сольватирован 31818 молекулами воды TIP3P с концентрацией  $\text{Na}^+ / \text{Cl}^-$  150 мМ с использованием онлайн-сервиса CHARMM-GUI Membrane Builder [163–165]. Заряд системы нейтрализовали добавлением десяти дополнительных ионов натрия. Общее количество атомов в модели составило 152390. Все аминокислотные остатки были стандартно протонированы при pH 8, остатки Asp116 и Asp251 были заряжены. Все аминокислотные остатки His рассматривались как нейтральные и были протонированы по  $\epsilon$  атомам азота.

Протоколы, рекомендованные программой CHARMM-GUI [163], были использованы для построения полной атомистической модели комплекса белка в мембране, а также для минимизации начальной энергии и уравнивания системы. Во время уравнивания на молекулы белка, воды, ионов и липидов были наложены различные ограничивающие гармонические потенциалы, которые постепенно уменьшались во время процедуры уравнивания. Всего онлайн-сервисом CHARMM-GUI Membrane Builder было выполнено 6 стандартных этапов по уравниванию системы. Динамика в NVT ансамбле использовалась на первых двух этапах, а динамика в NPT ансамбле использовалась на следующих четырех этапах при температуре 303,15 К.

Моделирование проводилось в NPT ансамбле при 303,15 К с использованием параметров силового поля CHARMM36. Длина траектории составляла 18 нс, что обеспечивало сходимость моделируемого профиля энергии Гиббса, который переставал изменяться с увеличением времени моделирования. Гауссовы функции добавлялись с интервалом 1 пс. Ширина и высота гауссовых пиков составляли 0,5 Å и 0,8 кДж / моль, соответственно, для CV I; 5 ° и 0,8 кДж / моль, соответственно, для CV II. Модуль Colvars в программном пакете NAMD [166] использовался для запуска молекулярной метадинамики.

#### ***2.2.4 Расчет энергий и электронно-колебательных спектров методом ХМСQDPT2***

Энергии вертикальных переходов были рассчитаны для КМ/ММ оптимизированных структур с использованием метода ХМСQDPT2/SA-CASSCF (12,12)/(aug)-cc-pVDZ [153] в сочетании с методом EFP [147] для учета влияния белкового окружения. Только монополи (частичные точечные заряды) ММ части были включены в эффективные потенциалы, взятые из силового поля AMBER, т.е. применялась схема КМ/ММ с электростатическим внедрением. Этот метод позволил учесть поляризацию электронной плотности квантовой подсистемы КМ в поле белка.

Референсные волновые функции основного и возбужденных состояний были получены в рамках метода CASSCF с активным пространством (12,12), содержащим 12 электронов, распределенных по 12 орбиталям. Все валентные орбитали  $\pi$ -типа были включены в активное пространство. Также была применена процедура усреднения по состояниям (SA). В процедуру SA были включены либо три низколежащих состояния CASSCF для реагентов родопсина KR2 и зрительного родопсина, либо четыре низколежащих состояния CASSCF для реагента бактериородопсина и для интермедиатов родопсина KR2, зрительного родопсина и бактериородопсина. Количество состояний, включенных в процедуру SA, было продиктовано порядком состояний на уровне CASSCF. Третьим или четвертым состоянием было целевое яркое состояние, неправильно расположенное по порядку из-за несовершенного описания на уровне CASSCF. Волновые функции CASSCF нулевого приближения могли взаимодействовать в рамках эффективного гамильтониан ХМСQDPT2. Энергии возмущенных состояний были получены как собственные значения эффективного гамильтониана. Проекция возмущенных состояний на состояния нулевого приближения определялись как соответствующие собственные вектора эффективного гамильтониана. Во всех случаях

оптически яркое состояние оказалось первым возбужденным состоянием ( $S_1$ ) на уровне теории XMCQDPT2. Модельное пространство эффективного гамильтониана XMCQDPT2 включало в себя 7 волновых функций CASCI в качестве волновых функций нулевого приближения. Энергии всех полуканонических орбиталей, используемых в теории возмущений, были определены как собственные значения соответствующих блоков основанного на DFT эффективного оператора Фока, диагонализированного в базисе вычисленных молекулярных орбиталей CASSCF. Гибридный функционал PBE0 использовался для построения матрицы Фока на основе DFT.

Расчеты градиента возбужденного состояния для реагентов и интермедиатов выполнялись либо на уровне теории XMCQDPT2/SA(3)-CASSCF(12,12) / (aug)-cc-pVDZ для реагентов родопсина KR2 и зрительного родопсина, либо на уровне теории XMCQDPT2/SA(4)-CASSCF (12,12)/(aug)-cc-pVDZ для реагента бактериородопсина и для интермедиатов родопсина KR2, зрительного родопсина и бактериородопсина. Модельное пространство эффективных гамильтонианов включало в себя либо три волновые функции нулевого приближения CASCI для реагентов родопсина KR2 и зрительного родопсина, либо четыре волновые функции нулевого приближения CASCI для реагента бактериородопсина и для интермедиатов родопсина KR2, зрительного родопсина и бактериородопсина. Уменьшенная размерность модельного пространства, которая уменьшала требования к вычислительным мощностям, была выбрана на основе анализа собственных векторов соответствующих эффективных гамильтонианов и степени смешивания референсных состояний CASSCF. Градиент возбужденного состояния XMCQDPT2 был рассчитан численно в виде двусторонней производной.

Для конформера I родопсина KR2 были также выполнены расчеты XMCQDPT2/SA(3)-CASSCF(12,12) с использованием более большого базисного набора (aug)-cc-pVTZ. В этих расчетах использовалась уменьшенная квантовая часть, которая включала РПШО, противоион Asp116 и молекулу воды, связанную с Asp116 посредством водородной связи. Для всех расчетов электронной структуры использовался программный пакет Firefly версии 8.2.0 [154], частично основанный на исходном коде GAMESS (США) [167].

$S_0$ - $S_1$  температурно-зависимые спектры Франка-Кондона были рассчитаны с использованием метода расчета перекрытия колебательных волновых функций различных состояний в модели смещенных многомерных гармонических поверхностей с

параллельными нормальными модами. Сдвиги вдоль нормальных мод РПШО внутри белкового окружения (63 атома и 183 нормальных моды) были вычислены в гармоническом приближении с использованием рассчитанного на уровне теории ХМСQDPT2/CASSCF(12,12)/(aug)-cc-pVDZ // EFP градиента возбужденного состояния в точке Франка-Кондона. Конечный градиент возбужденного состояния был скорректирован путем вычитания градиента основного состояния, рассчитанного на том же уровне теории.

Для расчета спектров фотопоглощения использовалась оригинальная программа (VibroniX). Максимальная энергия колебательного возбуждения в  $S_1$  была установлена равной  $10\,000\text{ см}^{-1}$ . В основном электронном состоянии для каждой колебательной моды рассматривалось максимум 50 колебательных уровней, которые считались заселенными в соответствии с распределением Больцмана, а уровень возбуждения для каждой моды не превышал 11. Эти параметры обеспечивали учет всех соответствующих вибронных возбуждений, так что сумма вероятностей переходов для каждой моды равнялась 1. Конечные формы спектров были получены путем свертки рассчитанных линейчатых спектров с функциями Гаусса. Ранее этот метод применялся для расчета формы вибронных полос биологических хромофоров в различных средах [168–170].

## Глава 3. Обсуждение результатов

### 3.1 Исследование фотофизических свойств изомеров РПШО в газовой фазе

Результаты, описанные в данном разделе, опубликованы в работе [77]<sup>1</sup>.

#### 3.1.1 Построение профилей потенциальной энергии для изомеров РПШО при вращении вдоль координаты изомеризации в первом возбужденном состоянии

В данной части работы были рассчитаны профили ППЭ вдоль координаты вращения в первом возбужденном состоянии для полностью-*транс* и 9-*цис*, 11-*цис* и 13-*цис* изомеров РПШО в газовой фазе.

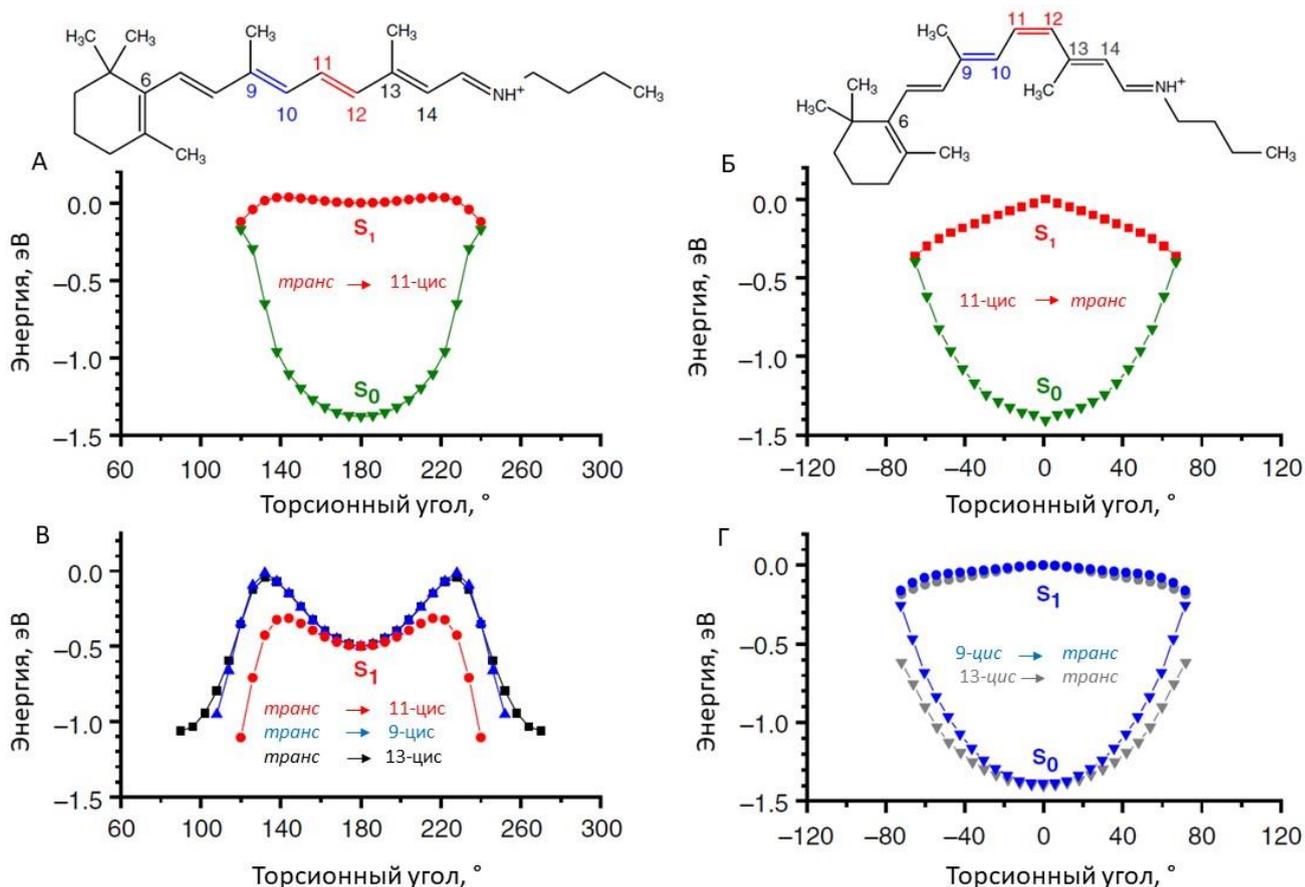
На рисунке 16 изображены профили ППЭ, полученные при релаксированном сканировании ППЭ вдоль координаты вращения для полностью-*транс* и 9-*цис*, 11-*цис* и 13-*цис* изомеров РПШО в газовой фазе. Было обнаружено, что для полностью-*транс* РПШО существуют барьеры вращения вокруг двойных связей  $C_9=C_{10}$ ,  $C_{11}=C_{12}$  и  $C_{13}=C_{14}$ , при этом наименьшее значение имеет барьер вращения вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$ , это значение примерно в 2,5 раза меньше величин барьеров вращения вокруг связей  $C_9=C_{10}$  и  $C_{13}=C_{14}$ . Значение барьеров вращения представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Значения барьеров вращения вокруг двойных связей для полностью-*транс* РПШО в первом возбужденном состоянии.**

Двойная связь	Барьер вращения, эВ
$C_9=C_{10}$	0,1
$C_{11}=C_{12}$	0,037
$C_{13}=C_{14}$	0,09

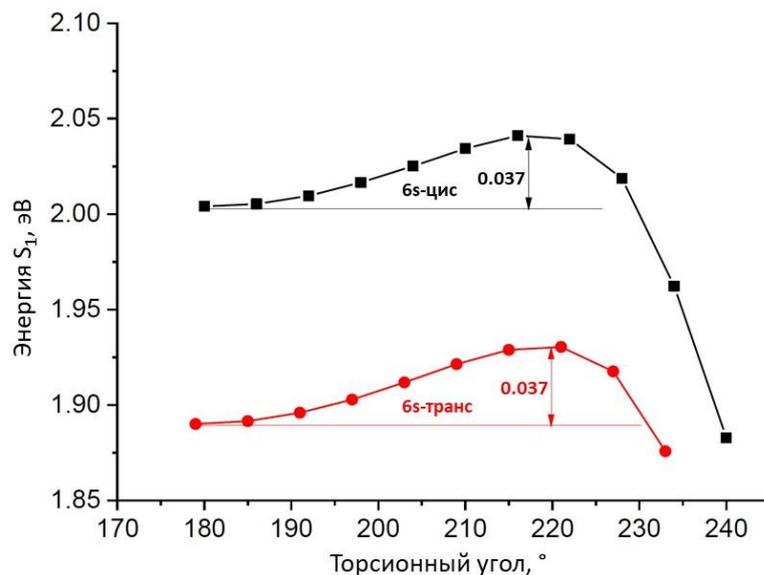
Для изомеризации из полностью-*транс* в 11-*цис* РПШО барьер вращения составляет 0,037 эВ, а значение энергии в точке конического пересечения на 0,3 эВ ниже, чем значение энергии в минимуме на поверхности  $S_1$ , что, таким образом, обеспечивает прямой путь реакции до основного состояния через коническое пересечение после преодоления энергетического барьера на поверхности  $S_1$  (рисунок 16, А).

<sup>1</sup>При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Kiefer H. V., Gruber E., Langeland J., Kusochek P.A., Bochenkova A. V., Andersen L.H. Intrinsic photoisomerization dynamics of protonated Schiff-base retinal // Nature Communications. — 2019. — Vol. 10, № 1. — P. 1210. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причём вклад Кусочка П.А. составляет 50%.



**Рисунок 16.** Рассчитанные профили ППЭ в первом возбужденном состоянии  $S_1$  вдоль координаты вращения вокруг определенной двойной связи для полностью транс (А,В), 9-цис (Г), 11-цис (Б) и 13-цис (Г) изомеров РПШО в газовой фазе. Показаны также энергии основного состояния  $S_0$ , рассчитанные для оптимизированных геометрий РПШО в  $S_1$  состоянии вдоль пути наименьшей энергии.

Рассчитанное время жизни полностью-транс РПШО составляет 4 пс при 300К и составляет 92 пс при 100 К. Эти значения находятся в хорошем соответствии с временами жизни возбужденных состояний, измеренных при 300К и 100 К в экспериментах по фемтосекундной спектроскопии действия с временным разрешением. Экспериментально измеренное время жизни возбужденного состояния полностью-транс РПШО составляет 3 пс при 300К и 77 пс при 100К [77]. Установлено, что *бс-цис* и *бс-транс* ротомеры полностью-транс РПШО имеют одинаковые барьеры фотоизомеризации (рисунок 17).



**Рисунок 17. Рассчитанные профили ППЭ вдоль координаты изомеризации для 6s-цис и 6s-транс ротомеров полностью-транс РПШО. Энергии первого возбужденного состояния показы относительно соответствующих минимумов в основном состоянии.**

Было также установлено, что 9-цис, 11-цис и 13-цис изомеры обладают практически плоскими ППЭ вблизи соответствующих минимумов в  $S_1$  состоянии и, следовательно, претерпевают сверхбыстрый, почти безбарьерный переход из состояния  $S_1$  в  $S_0$ . Самая крутая форма профиля ППЭ наблюдается для 11-цис изомера (рисунок 16 Б,Г), что свидетельствует о том, что 11-цис изомер обладает самой высокой скоростью фотоизомеризации из всех рассмотренных изомеров. Такой результат также согласуется с экспериментальными данными, полученными при помощи фемтосекундной спектроскопии действия с временным разрешением, которые свидетельствуют о наличии субпикосекундной быстрой компоненты при изомеризации 11-цис изомера РПШО [77]. Тем не менее, эта быстрая компонента проявляет температурную зависимость и возрастает с 400 фс при 300 К до 1,4 пс при 100 К. С использованием экспериментально определенного времени жизни при низкой температуре можно оценить высоту барьера фотоизомеризации для цис изомеров в состоянии  $S_1$ . Такие оценки свидетельствуют о том, что высота барьера для цис изомера на порядок меньше таковой, полученной для полностью-транс РПШО. Такое маленькое значение высоты барьера согласуется с рассчитанной, практически плоской ППЭ для цис-изомеров в первом возбужденном состоянии, в особенности для 9-цис и 13-цис РПШО.

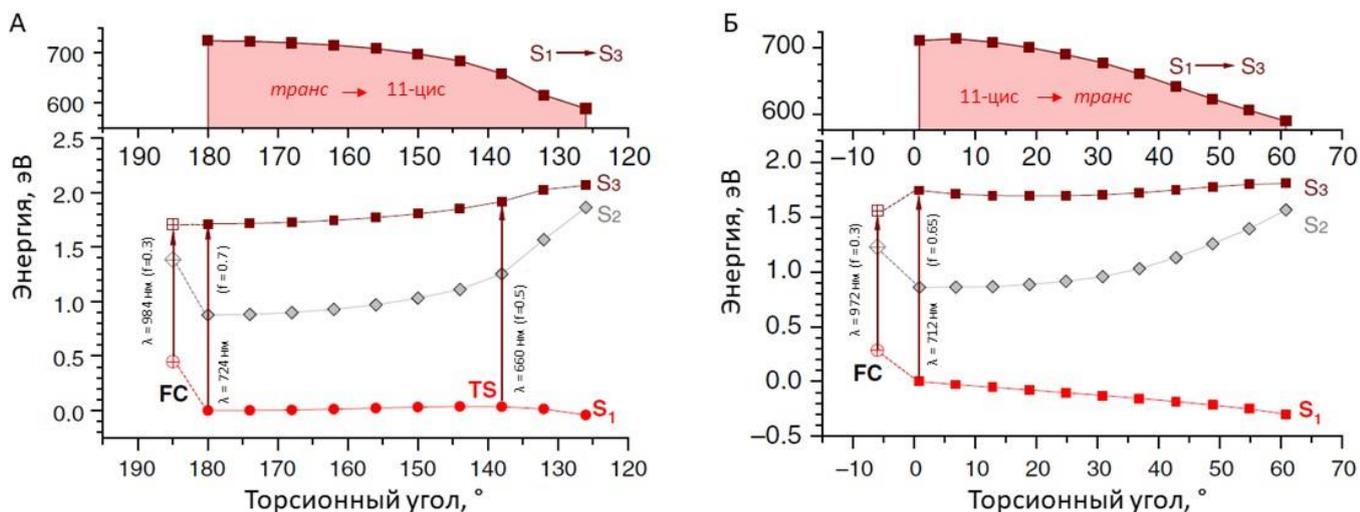
Практически безбарьерная фотоизомеризация в газовой фазе, описанная нами,

хорошо согласуется с результатами, которые получены на уровне теории CASPT2//CASSCF [171], [172] для 11-*цис* изомера и также свидетельствуют об отсутствии барьера на поверхности  $S_1$  при фотоизомеризации.

Отсутствие потенциального барьера вращения в *цис* изомерах РПШО может быть объяснено стерическими препятствиями, создаваемыми отталкивающими взаимодействиями метильных групп с атомами водорода сопряженной цепи хромофора, что приводит к дестабилизации плоских равновесных структур на поверхности  $S_1$  и к почти безбарьерной фотоизомеризации в *цис* изомерах. Так, равновесные структуры 9-*цис* и 13-*цис* РПШО лежат на 0.09 эВ и 0.12 эВ, соответственно, выше по энергии, по сравнению с полностью-*транс* РПШО. Плоская структура 11-*цис* изомера лежит на 0.22 эВ выше по энергии по сравнению с полностью-*транс* РПШО.

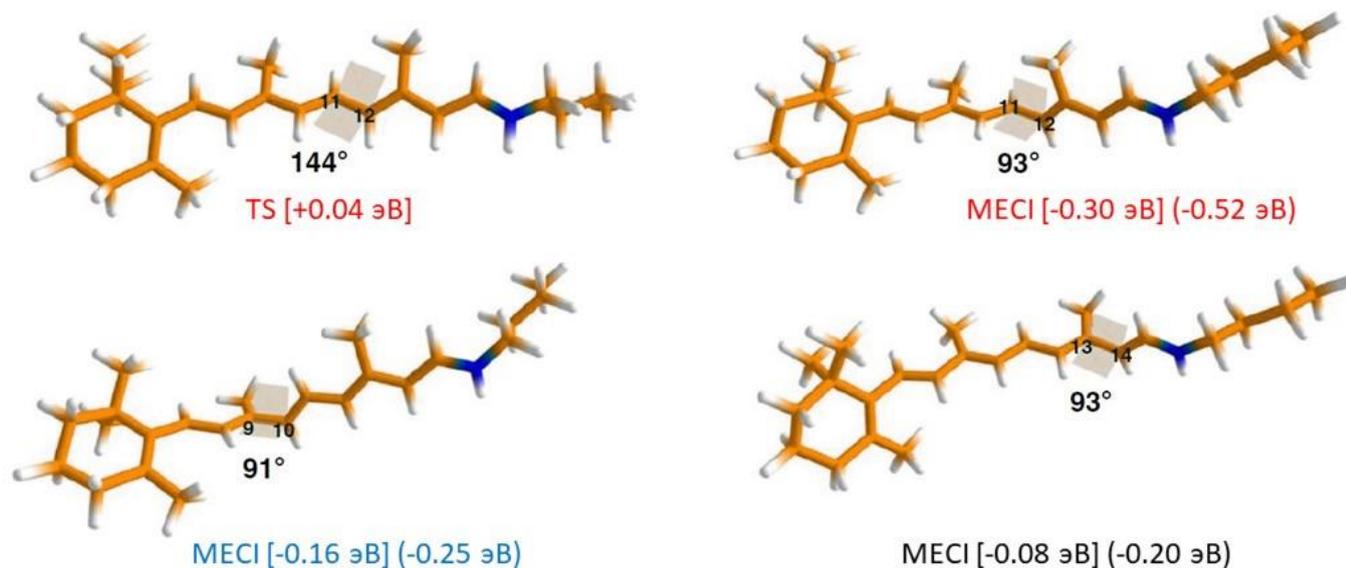
### 3.1.2 Анализ $S_1$ - $S_n$ переходов в изомерах РПШО

Рассчитанные энергии  $S_1$ - $S_n$  вертикальных переходов вдоль координаты изомеризации вокруг двойной связи  $C_{11}=C_{12}$  для полностью-*транс* и 11-*цис* изомеров РПШО (рисунок 18, А, Б) выявили, что переход из электронного состояния  $S_1$  в электронное состояние  $S_3$  является наиболее ярким вдоль всего пути реакции, и энергия данного перехода в разных точках пути реакции хорошо согласуется с интенсивными полосами поглощения зондирующего импульса в возбужденном  $S_1$  состоянии РПШО при проведении экспериментов по фемтосекундной спектроскопии действия с временным разрешением [77]. Энергии вертикальных переходов  $S_1$ - $S_3$  смещаются в более коротковолновую область по мере того, как колебательный волновой пакет в  $S_1$  состоянии приближается к коническому пересечению. Сигналы, наблюдаемые на 720 нм и 660 нм в экспериментах по фемтосекундной спектроскопии действия [77], хорошо совпадают с энергиями  $S_1$ - $S_3$  вертикальных переходов в геометриях РПШО, соответствующих минимуму и переходному состоянию (TS) на  $S_1$ , соответственно (рисунок 18, А). Структуры изомеров РПШО в TS и конических пересечениях показаны на рисунке 19.



**Рисунок 18.** Рассчитанные энергии вертикальных переходов  $S_1$ - $S_3$  вдоль координаты изомеризации вокруг двойной связи  $C_{11}=C_{12}$  для полностью-*транс* и 11-*цис* изомеров РПШО в газовой фазе. Силы осцилляторов  $f$  для переходов  $S_1$ - $S_3$  вдоль пути реакции показаны в скобках. FC – точка Франка-Кондона. TS – переходное состояние. Переходы  $S_1$ - $S_2$  обладают меньшими значениями силы осцилляторов ( $<0.1$ ), чем переходы  $S_1$ - $S_3$ , но приобретают большую интенсивность ( $f = 0.2$ ) из-за смешивания с состоянием  $S_3$  около точки Франка-Кондона и около точки конического пересечения между состояниями  $S_1/S_0$ .

Состояние  $S_2$  не взаимодействует в значительной степени с состоянием  $S_1$  вдоль пути реакции, что также показано и другими методами, например, таким как CASSCF [171]. Наименьшая разница в энергиях между  $S_0$  и  $S_2$  составляет 0,9 эВ и резко возрастает по мере скручивания хромофора (рисунок 18). Таким образом, механизм фотоизомеризации определяется исключительно взаимодействием между основным и первым возбужденными состояниями РПШО, при этом в последнем преобладает характер переноса заряда, что было также недавно продемонстрировано для РПШО в газовой фазе [173].



**Рисунок 19.** Оптимизированная геометрия переходного состояния (TS) на поверхности  $S_1$  для полностью-транс РПШО и оптимизированные геометрии в точке конического пересечения (MECI). Оранжевым изображены атомы углерода, атомы водорода – белым, атомы азота – синим. Энергии в квадратных и круглых скобках указаны по отношению к плоским структурам полностью-транс и соответствующего цис-РПШО на поверхности  $S_1$ , соответственно.

### 3.1.3 Заключение

Обнаружено, что изомеризация *цис* изомеров РПШО в газовой фазе происходит практически безбарьерно на поверхности  $S_1$ , тогда как полностью-транс РПШО обладает барьерами фотоизомеризации на поверхности  $S_1$ .

Рассчитанные времена жизни возбужденных состояний изомеров РПШО хорошо согласуются с экспериментальными данными по фемтосекундной спектроскопии действия с временным разрешением. Выявлено, что самым ярким переходом из первого возбужденного состояния является переход  $S_1$ - $S_3$ , энергия вертикальных переходов которых хорошо согласуются с интенсивными полосами поглощения, наблюдаемыми из экспериментов по фемтосекундной спектроскопии действия.

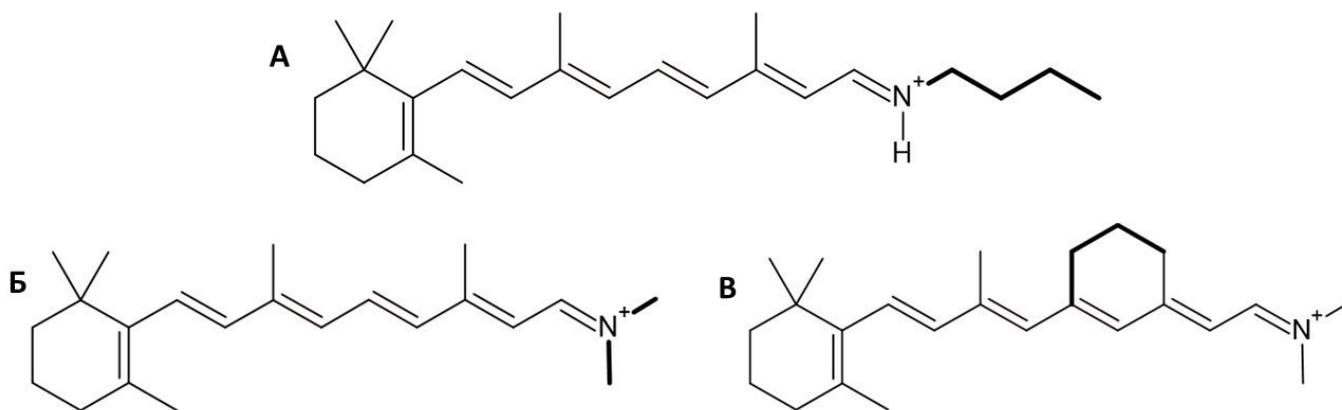
Время фотоизомеризации РПШО в родопсинах животных составляет  $\sim 200$  фс, а в микробных родопсинах составляет  $\sim 500$  фс. На основании приведенных расчётов можно предположить, что те родопсины, которые функционируют в качестве зрительных фоторецепторов, при осуществлении сверхбыстрой реакции фотоизомеризации полагаются на собственные фотофизические свойства 11-*цис* РПШО, который уже в газовой фазе демонстрирует сверхбыструю фотоизомеризацию на субпикосекундных

временах. Тогда как микробиальные родопсины, содержащие полностью-*транс* РПШО, вынуждены дополнительно изменять фотофизические свойства хромофора, снижая высоту энергетических барьеров вращения вокруг двойной связи  $C_{13} = C_{14}$ , тем самым уменьшая время фотоизомеризации с пикосекунд в газовой фазе до сотен фемтосекунд и увеличивая специфичность фотоизомеризации по связи  $C_{13} = C_{14}$  по сравнению с полностью-*транс* РПШО в газовой фазе, для которого наименьший барьер вращения наблюдается по связи  $C_{11} = C_{12}$ .

### 3.2 Исследование фотофизических свойств модифицированных форм РПШО

Результаты, описанные в данном разделе, опубликованы в работе [174]<sup>2</sup>.

В предыдущем разделе было показано, что фотоизомеризация 11-*цис* формы РПШО в газовой фазе протекает с более высокой скоростью, чем фотоизомеризация полностью-*транс* формы, тогда как в белковом окружении скорости этих процессов сопоставимы. В связи с этим становится важным определить факторы, способствующие увеличению скорости фотоизомеризации полностью-*транс* изомера РПШО в газовой фазе, например, путем введения химических модификаций в его структуру, чему посвящен данный раздел. В данном разделе описываются исследования фотохимических реакций модифицированных форм РПШО (рисунок 20).



**Рисунок 20.** Структуры полностью-*транс* РПШО (А) и двух его модификаций с заменой терминального заместителя основания Шиффа, ДМ-РПШО (Б), и с введением алифатического кольца, блокирующего вращение по связи  $C_{11}=C_{12}$ , Л-РПШО (В).

<sup>2</sup>При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Gruber E., Kabylda A.M., Nielsen M.B., Rasmussen A.P., Teiwes R., Kusochek P.A., Bochenkova A. V., Andersen L.H. Light Driven Ultrafast Bioinspired Molecular Motors: Steering and Accelerating Photoisomerization Dynamics of Retinal // Journal of the American Chemical Society. — 2022. — Vol. 144, № 1. — P. 69–73. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причём вклад Кусочека П.А. составляет 50%.

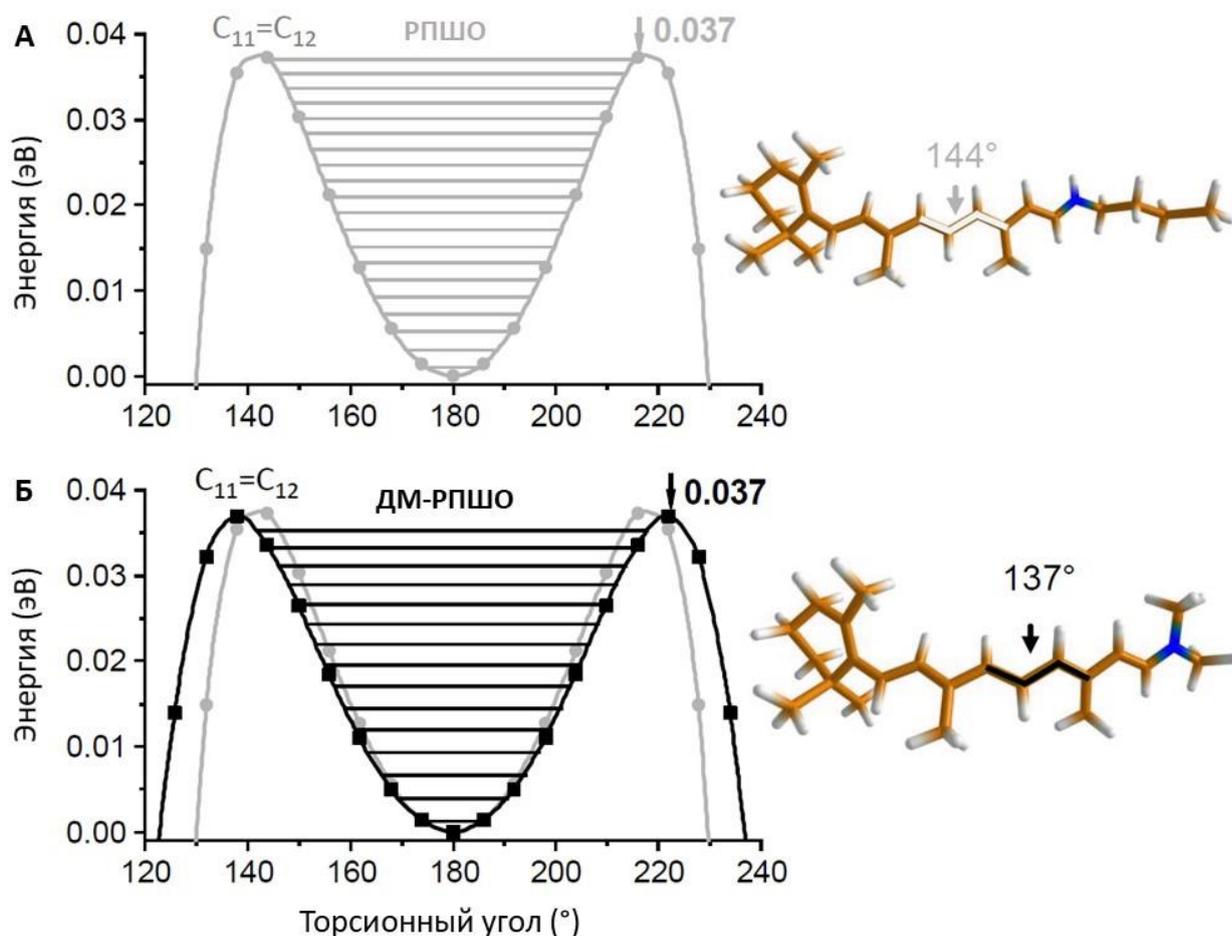
Одной из рассматриваемых модификаций является основание Шиффа ретиналя, атом азота которого содержит в качестве заместителей две метильные группы (ДМ-РПШО) (рисунок 20, Б). Вторая модификация РПШО содержит алифатическую углеродную группу, которая препятствует вращению вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$  (Л-РПШО) (рисунок 20, В).

### 3.2.1 Исследование фотофизических свойств ДМ-РПШО

Модификация, которую содержит ДМ-РПШО, не затрагивает связь  $C_{11}=C_{12}$  и не находится в непосредственной близости от нее, поэтому, предположительно, барьер вращения вокруг данной связи не должен отличаться от такового для РПШО. Действительно, расчеты продемонстрировали, что барьер вращения вокруг данной связи ДМ-РПШО не изменился по сравнению с РПШО и также составляет 0,037 эВ (рисунок 21).

Но несмотря на идентичные значения барьеров вращения, при помощи фемтосекундной спектроскопии действия с временным разрешением было установлено, что время жизни возбужденного состояния ДМ-РПШО сократилось практически вдвое по сравнению с РПШО: оно составляет  $3,0 \pm 0,4$  пс для РПШО при 300 К и  $1,7 \pm 0,4$  пс для ДМ-РПШО при 300 К [174] (таблица 2). Данное различие проистекает из того, что ДМ-РПШО обладает приведенным моментом инерции, который в два раза меньше такового для РПШО и, следовательно, ДМ-РПШО имеет постоянную внутримолекулярного вращения ( $B_{rot}$ ) большую, чем у РПШО. Для ДМ-РПШО она составляет  $0,128 \text{ см}^{-1}$ , а для РПШО –  $0,065 \text{ см}^{-1}$  (таблица 2). Различие во вращательной постоянной приводит к тому, что рассчитанное время жизни при 300 К для РПШО составляет 4 пс, а для ДМ-РПШО – 2,5 пс, что хорошо согласуется с экспериментальными данными. Так же, как и в случае с 11-цис РПШО, для 11-цис ДМ-РПШО расчеты не выявили минимума на поверхности  $S_1$ . Этот факт согласуется с экспериментальными данными по фемтосекундной спектроскопии действия с временным разрешением, которые свидетельствуют о том, что распад цис ДМ-РПШО может протекать за 100-200 фс при комнатной температуре. При проведении эксперимента при 100 К распад возбужденного состояния ДМ-РПШО протекает значительно дольше, и в нем были детектированы две компоненты. Так, распад 11-цис ДМ-РПШО стал медленнее и с ним можно соотнести компоненту с характерным временем жизни  $\sim 2$  пс [174]. Распад полностью-транс ДМ-РПШО также стал медленнее и с ним можно соотнести

компоненту с характерным временем жизни  $\sim 45$  пс, что согласуется с нашим теоретически рассчитанным временем жизни полностью-транс ДМ-РПШО при температуре 100К, которое составило 49 пс (таблица 2).



**Рисунок 21.** Рассчитанные профили ППЭ, полученные при релаксированном сканировании ППЭ вдоль координаты вращения в первом возбужденном состоянии: (А) для полностью-транс РПШО вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$ , (Б) для полностью-транс РПШО (серый) и ДМ-РПШО (черный) вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$ . Горизонтальные линии – рассчитанные вращательные уровни энергии. Показаны оптимизированные структуры для переходных состояний с минимальной энергией на поверхности  $S_1$  для РПШО (А) и ДМ-РПШО (Б).

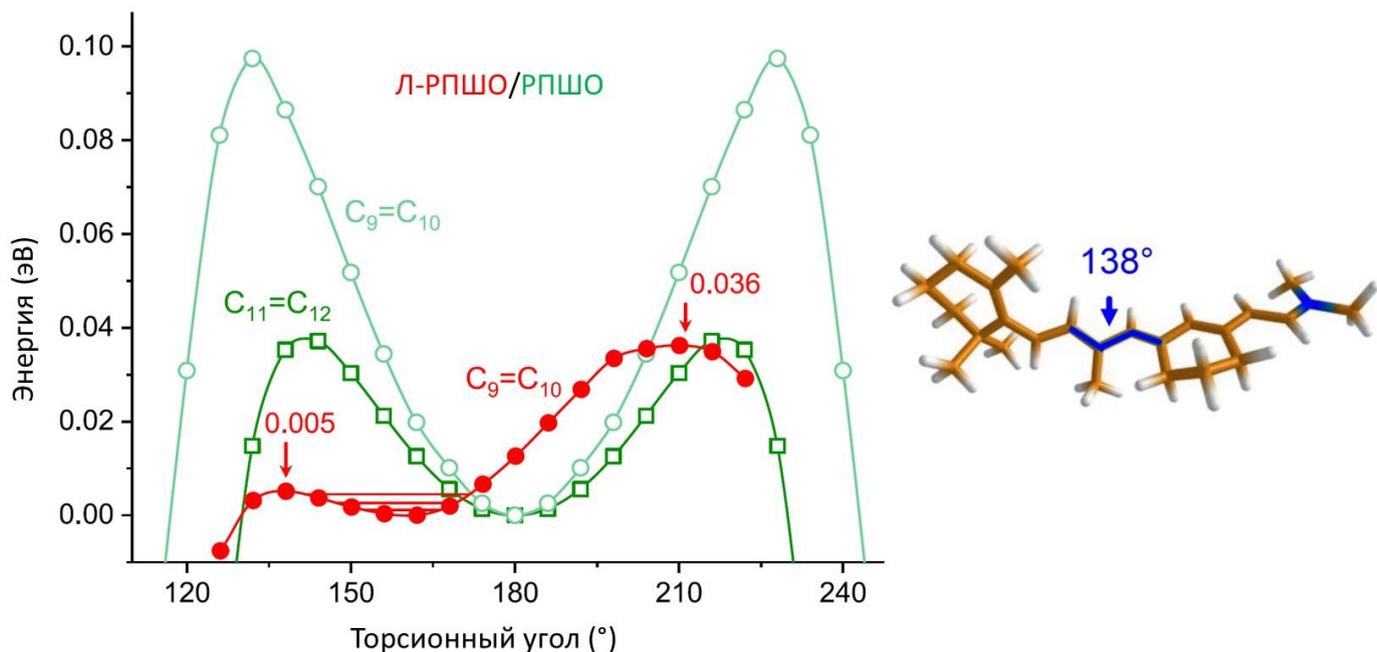
**Таблица 2. Экспериментальные и рассчитанные времена жизни возбужденного состояния  $S_1$  ( $\tau$ ), рассчитанные приведенные постоянные внутримолекулярного вращения ( $V_{rot}$ ) и барьеры вращения на поверхности возбужденного состояния для РПШО, ДМ-РПШО и Л-РПШО.**

Т, К	техр, пс	тcalc, пс	$V_{rot}$ , см <sup>-1</sup>	Барьер, эВ	отнесение, изомер
<b>РПШО</b>					
300	$0,4 \pm 0,15$				цис
	$3,0 \pm 0,4$	4,0	0,065	0,037	полностью-транс
100	$1,4 \pm 0,2$				цис
	$77 \pm 17$	92	0,065	0,037	полностью-транс
<b>ДМ-РПШО</b>					
300	$1,7 \pm 0,4$	2,5	0,128	0,037	полностью-транс
100	$2,3 \pm 0,5$				цис
	$45 \pm 30$	49	0,128	0,037	полностью-транс
<b>Л-РПШО</b>					
300	$0,7 \pm 0,1$	0,5	0,081	0,005	полностью-транс

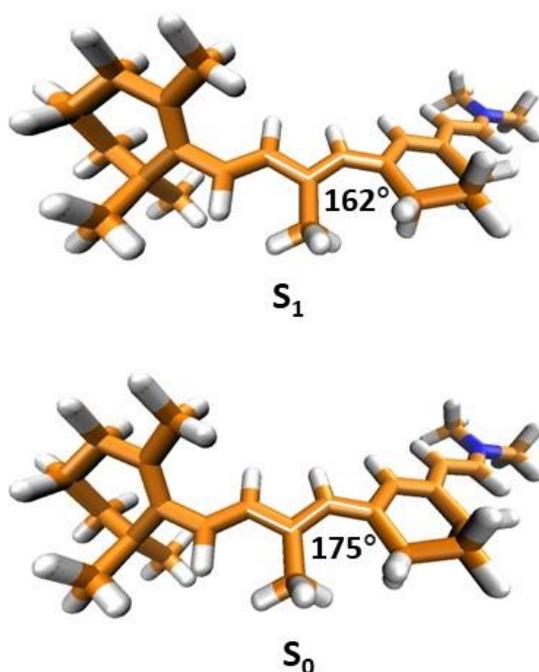
### 3.2.2 Исследование фотофизических свойств Л-РПШО

В полностью-транс РПШО изомеризация по связи  $C_{11}=C_{12}$  является наиболее вероятным каналом. Теперь в рассматриваемом модифицированном полностью-транс Л-РПШО эта связь заблокирована. Можно было бы ожидать, что это приведет к тому, что время жизни возбужденного состояния увеличится по сравнению с полностью-транс РПШО за счет изомеризации по связи  $C_9=C_{10}$ , для которой в обычном полностью-транс РПШО барьер вращения больше, чем по связи  $C_{11}=C_{12}$  (рисунок 22). Но в эксперименте, наоборот, было обнаружено снижение времени жизни возбужденного состояния Л-РПШО при комнатной температуре, которое составляет 700 фс и практически приближается к таковому времени в бактериородопсине [174].

Расчеты показывают, что в Л-РПШО барьер фотоизомеризации при переходе полностью-транс  $\rightarrow$  9-цис практически исчезает и становится равным 0,005 эВ (рисунок 22). При этом потенциал вращения в возбужденном состоянии  $S_1$  становится сильно асимметричным: барьер фотоизомеризации в другую сторону составляет 0,036 эВ (рисунок 22). Снижение барьера вращения в  $S_1$  и появление асимметрии потенциала возникает из-за скручивания Л-РПШО как в основном, так и в возбужденном состоянии вследствие возникновения стерических взаимодействий из-за введенной модификации (рисунок 23).



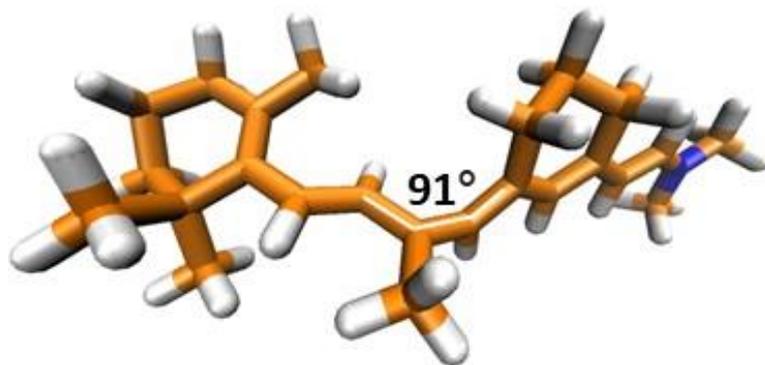
**Рисунок 22.** Рассчитанные профили ППЭ, полученные при релаксированном сканировании ППЭ вдоль координаты вращения в первом возбужденном состоянии для полностью-транс РПШО (бирюзовый) и Л-РПШО (красный) вокруг связи  $C_9=C_{10}$ , а также для полностью-транс РПШО (зеленый) вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$ . Горизонтальные линии – рассчитанные вращательные уровни энергии. Показана оптимизированная структура для переходного состояния с минимальной энергией на поверхности  $S_1$  для Л-РПШО.



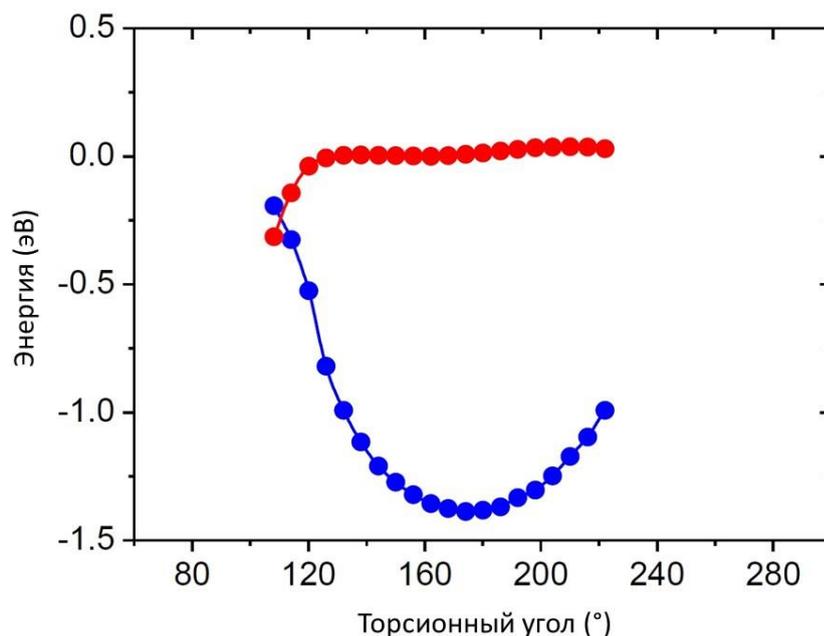
**Рисунок 23.** Оптимизированные структуры полностью-транс Л-РПШО в состояниях  $S_0$  и  $S_1$ .

Рассчитанное время жизни возбужденного состояния Л-РПШО составляет 500 фс при 300 К, что находится в хорошем соответствии с экспериментальными данными, которые соответствуют времени жизни  $700 \pm 100$  фс (таблица 2). Таким образом, время жизни возбужденного состояния в данном случае становится близким к таковому в бактериородопсине.

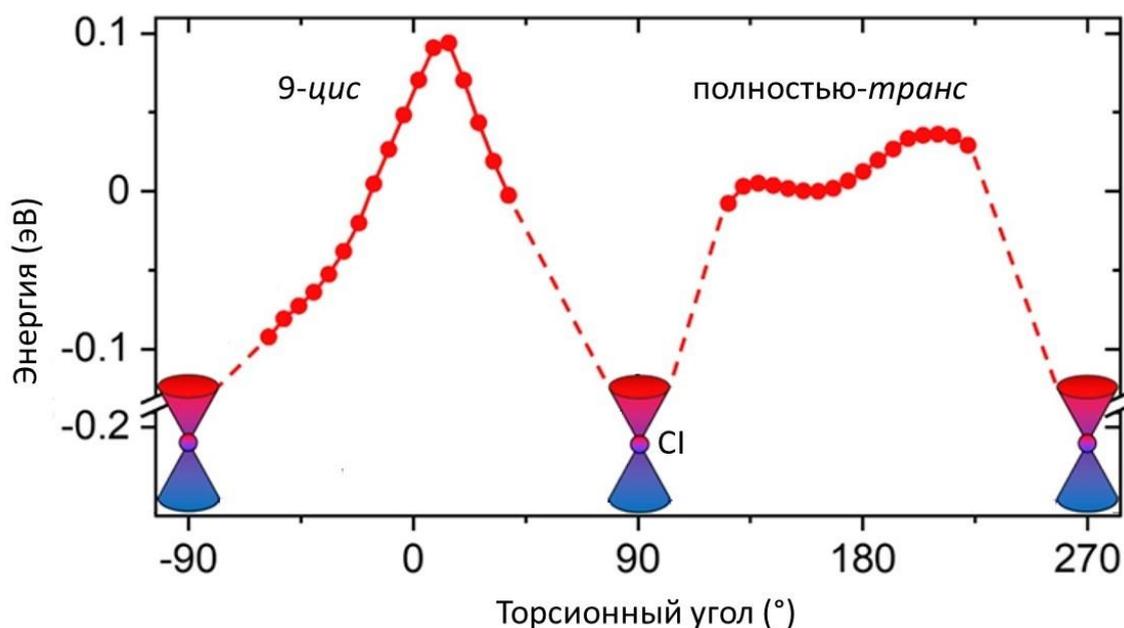
Структура Л-РПШО в точке конического пересечения скручена на  $\sim 90^\circ$  вокруг связи  $C_9=C_{10}$  (рисунок 24), а само коническое пересечение находится на 0,26 эВ ниже минимума на поверхности  $S_1$  для полностью-*транс* Л-РПШО, что, таким образом, предоставляет прямой путь до поверхности основного состояния после пересечения энергетического барьера на поверхности  $S_1$  (рисунок 25). *9-цис* Л-РПШО фотоизомеризуется обратно в полностью-*транс* форму без барьера. Потенциал вращения при переходе от *9-цис* формы в полностью-*транс* также является асимметричным (рисунок 26). При этом вращение при обратной реакции фотоизомеризации происходит в ту же сторону, как и при переходе из полностью-*транс* в *9-цис* форму, что позволяет рассматривать молекулу Л-РПШО в качестве молекулярного мотора.



**Рисунок 24.** Оптимизированная на уровне теории ХМСQDPT2 структура Л-РПШО в точке конического пересечения с минимальной энергией (МЕС1). Для РПШО МЕС1, соответствующее вращению вокруг связи  $C_9=C_{10}$ , лежит на 0,16 эВ ниже минимума на поверхности  $S_1$ , и структура также скручена на угол  $91^\circ$ .



*Рисунок 25. Рассчитанный профиль ППЭ, полученный при релаксированном сканировании ППЭ вдоль координаты вращения в первом возбужденном состоянии для полностью-транс Л-РПШО вокруг связи  $C_9=C_{10}$  (красный). Энергии основного состояния, рассчитанные для оптимизированных геометрий Л-РПШО в  $S_1$  состоянии вдоль пути наименьшей энергии, показаны синим.*



*Рисунок 26. Рассчитанные профили ППЭ, полученные при релаксированном сканировании ППЭ вдоль координаты вращения вокруг связи  $C_9=C_{10}$  в первом возбужденном состоянии для 9-цис и полностью-транс изомеров Л-РПШО в газовой фазе.*

### 3.2.3 Заключение

Таким образом, нами были исследованы фотофизические свойства двух разных модифицированных РПШО, которые содержали модификации, как не затрагивающие сопряженную полиеновую цепь, так и препятствующие вращению по двойной связи  $C_{11}=C_{12}$  ретиналя. В обоих случаях модификации привели к уменьшению жизни возбужденного состояния по сравнению с немодифицированным РПШО. В случае ДМ-РПШО потенциал вращения вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$  практически не меняется по форме по сравнению с РПШО, и значения барьеров вращения для РПШО и ДМ-РПШО по данной связи совпадают. При этом примерно двукратное уменьшение жизни возбужденного состояния ДМ-РПШО происходит за счет снижения приведенного момента инерции по сравнению с РПШО. Рассчитанное время жизни хорошо согласуется с экспериментальными данными по фемтосекундной спектроскопии действия.

В случае Л-РПШО фотоизомеризация протекает из полностью-*транс* формы в *9-цис* изомер, при этом снижение времени жизни возбужденного состояния происходит уже на порядок и приближается по значению к таковому в бактериородопсине. В данном случае уменьшение времени жизни обусловлено именно значительным снижением значения барьера вращения по связи  $C_9=C_{10}$  в возбужденном состоянии  $S_1$  Л-РПШО по сравнению с барьером вращения как по связи  $C_9=C_{10}$ , так и по связи  $C_{11}=C_{12}$  в  $S_1$  состоянии РПШО. Потенциалы вращения вокруг связи  $C_9=C_{10}$  в состоянии  $S_1$  для полностью-*транс* и *9-цис* изомеров Л-РПШО являются асимметричными из-за скрученности Л-РПШО как в основном, так и в возбужденном состоянии. Вращение вокруг связи  $C_9=C_{10}$  в *9-цис* и полностью-*транс* изомерах Л-РПШО происходит однонаправленно, что позволяет рассматривать молекулу Л-РПШО в качестве молекулярного мотора.

### 3.3 Исследование фотофизических свойств РПШО в реагентах и первичных интермедиях реакции фотоизомеризации родопсина KR2, бактериородопсина и зрительно родопсина

*Результаты, описанные в данном разделе, опубликованы в работе [175]<sup>3</sup>, [176]<sup>3</sup>, [177]<sup>3</sup>.*

Стерические взаимодействия в изолированных модифицированных формах РПШО способны приводить к изменению фотохимических свойств хромофора, поэтому важно изучить как взаимодействие с белковым окружением влияет на структуру РПШО, и как это, в свою очередь, сказывается на свойствах хромофорных групп в родопсинах I и II типов. Цель данного раздела – провести сравнение динамики на ранних временах прямой и обратной реакций фотоизомеризации различных изомеров РПШО в микробных родопсинах KR2, бактериородопсине и бычьим зрительным родопсином. В данном разделе с использованием метода ХМЦДПТ2 в сочетании с методом EFP проведен сравнительный анализ электронно-колебательных спектров Франка-Кондона РПШО в родопсине KR2, бактериородопсине и бычьим зрительным родопсином, а также спектров РПШО в первичных фотопродуктах этих родопсинов.

<sup>3</sup>При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования. Kusochek P.A., Logvinov V. V., Bochenkova A. V. Role of the Protein Environment in Photoisomerization of Type I and Type II Rhodopsins: a Theoretical Perspective // Moscow University Chemistry Bulletin. — 2021. — Vol. 76, № 6. — P. 407–416.

Кусочек П.А., Логвинов В.В. Связь динамики фотохромных реакций на ранних временах со структурой активного центра в различных микробных и животных родопсинах // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», секция «Химия». — М.: Издательство «Перо» [Электронное издание], Москва, 2022. — С. 728.

Кусочек П.А., Логвинов В.В., Боченкова А.В. Роль белкового окружения в механизме реакции фотоизомеризации хромофорных групп родопсинов I и II типов // Труды 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ. Электроника, фотоника и молекулярная физика. — Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, 2021. — С. 40-42.

Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причём вклад Кусочка П.А. во всех указанных работах составляет 80%.

### **3.3.1 Исследование структур реагентов и первичных интермедиатов родопсина KR2 и зрительного родопсина**

Микробиальный родопсин KR2 и зрительный родопсин обладают наибольшей скоростью фотоизомеризации среди микробиальных родопсинов и родопсинов животных, соответственно. Поэтому сравнение механизмов изомеризации этих представителей разных подсемейств родопсинов важно как с фундаментальной, так и прикладной точек зрения. Оптимизированные методом КМ/ММ структуры активных центров этих родопсинов представлены на рисунке 27. В микробиальном родопсине KR2 (рисунок 27, А) угол вращения вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$  составляет  $152^\circ$ , а угол вращения в зрительном родопсине вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$  составляет  $-15,7^\circ$  (рисунок 27, В). При этом в газовой фазе конформация изомеров РПШО является планарной (рисунок 28). Угол вращения вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$  в родопсине KR2 и угол вращения вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$  в зрительном родопсине перестают быть плоскими из-за наличия сильной водородной связи между протонированным основанием Шиффа ретиналя и первичным противополоионом. В родопсине KR2 противополоионом является остаток Asp116, и длина водородной связи составляет  $1.64 \text{ \AA}$  (рисунок 27, А), а в зрительном родопсине – остаток Glu113, и длина водородной связи -  $1.71 \text{ \AA}$  (рисунок 27, В). Атомистическая модель белка KR2, оптимизированная методом КМ/ММ, была получена на основе структуры с идентификатором 6REW. Через некоторое время после открытия структуры 6REW в литературе появилась уточненная версия этой структуры с более высоким разрешением. Уточненная структура имеет идентификатор 6Y33. Углы вращения вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$  в КМ/ММ оптимизированной структуре KR2, в структуре 6REW и структуре 6Y33 составляют  $152^\circ$ ,  $177^\circ$  и  $154^\circ$  (рисунок 29, А), соответственно. А расстояния между атомом кислорода боковой группы Asp116 и атомом азота основания Шиффа составляют  $2,68 \text{ \AA}$ ,  $2,84 \text{ \AA}$ , и  $2,63 \text{ \AA}$  в КМ/ММ оптимизированной структуре KR2, в структуре 6REW и структуре 6Y33, соответственно. Таким образом, структурные параметры КМ/ММ оптимизированной структуры KR2 близки к более новой, уточненной структуре 6Y33, что также согласуется с данными, полученными из расчетов методом метадинамики [178]. В статье [178] в результате молекулярной метадинамики структуры 6Y33 в липидном бислое было найдено, что наиболее энергетически выгодной структурой является та структура, у которой геометрические параметры совпадают с рассматриваемой в данном разделе КМ/ММ оптимизированной структурой KR2.

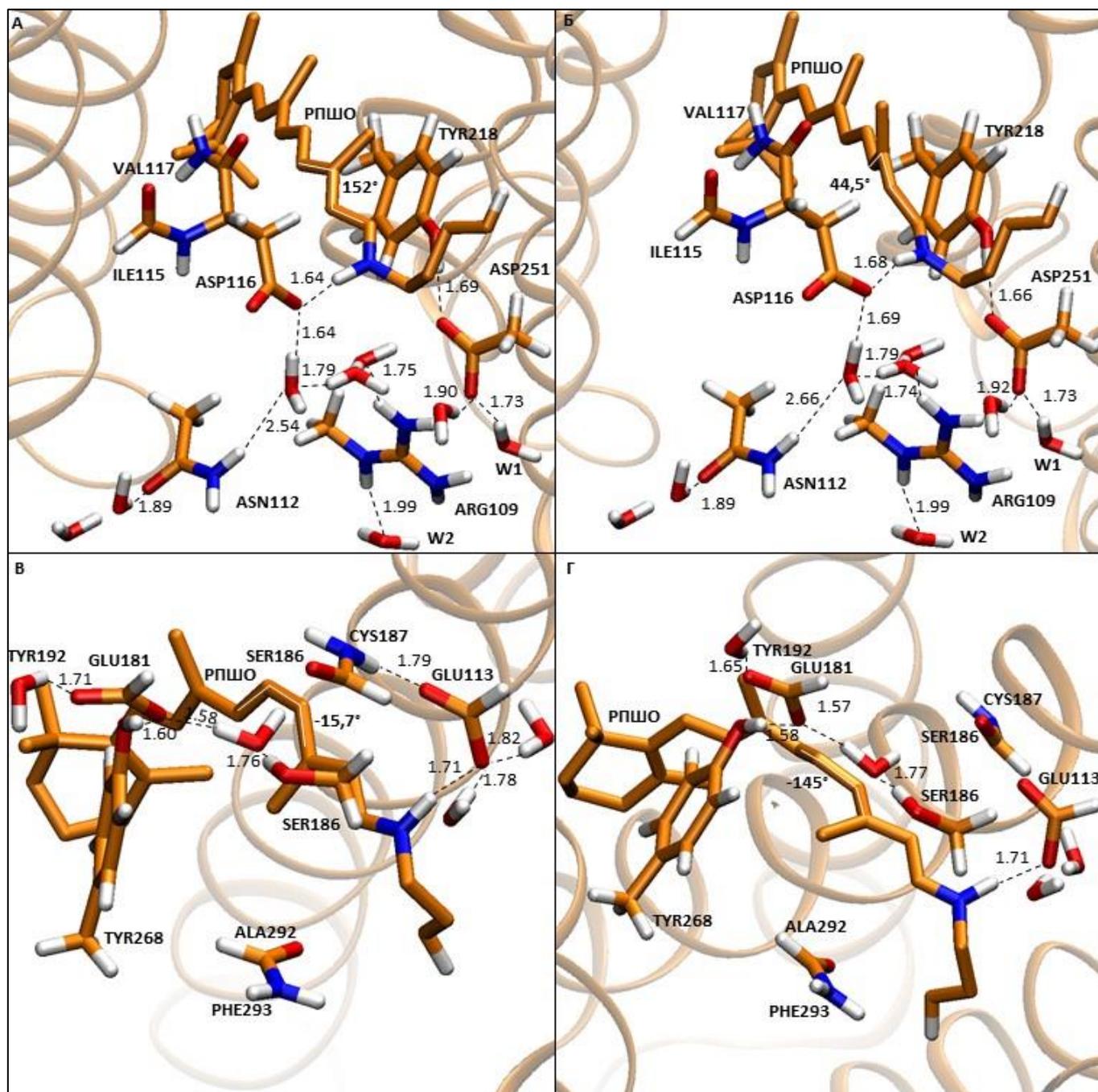
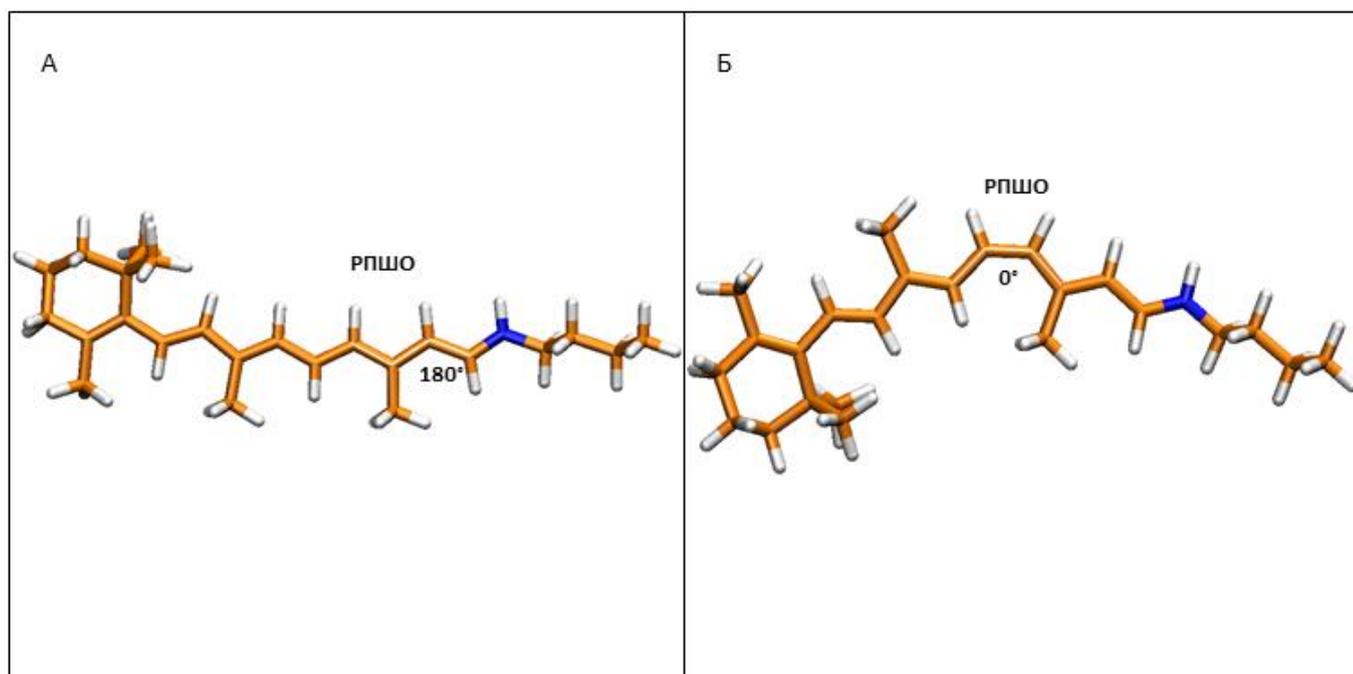
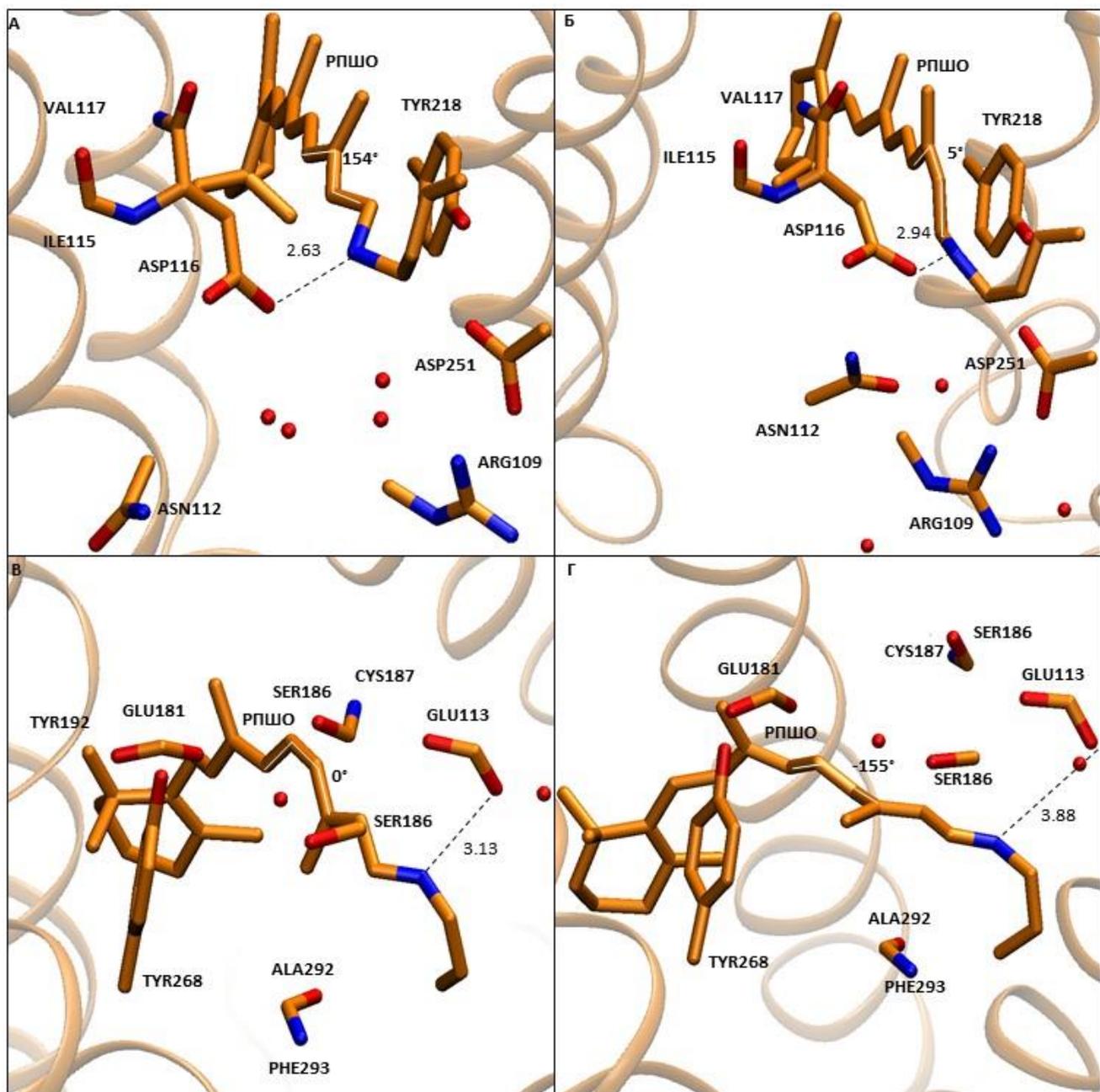


Рисунок 27. Конформации активных центров, полученных после охлаждения методом молекулярной динамики и оптимизации геометрии методом КМ/ММ, для (А) родопсина KR2 (получена на основе структуры PDB ID 6REW), (Б) интермедиата KR2 (получена частично на основе структуры PDB ID 6TK5), (В) зрительного родопсина (получена на основе структуры PDB ID 1L9H), (Г) интермедиата Бато (получена частично на основе структуры PDB ID 2G87). Все расстояния указаны в Å. Белым выделены угол вращения вокруг связи C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> (А,Б) и угол вращения вокруг связи C<sub>11</sub>=C<sub>12</sub> (В, Г).



**Рисунок 28.** Конформации оптимизированных методом DFT с использованием функционала PBE0 изолированных полностью-транс (А) и 11-цис (Б) изомеров РПШО. Белым показаны углы вращения вокруг связей  $C_{13}=C_{14}$  (А) и  $C_{11}=C_{12}$  (Б).

Угол вращения вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$  в зрительном родопсине после КМ/ММ оптимизации составил  $-15,7^\circ$ . При этом в исходной кристаллической структуре 1L9H данный угол составляет  $0^\circ$  (рисунок 29, В) [61]. Более сильная скрученность данного угла в КМ/ММ оптимизированной структуре зрительного родопсина по сравнению с исходной кристаллической структурой связана с тем, что в КМ/ММ оптимизированной структуре водородная связь между атомом кислорода боковой группы Glu113 и атомом азота основания Шиффа составляет  $2,75 \text{ \AA}$  и является более короткой по сравнению с данной водородной связью в исходной кристаллической структуре, которая составляет  $3,13 \text{ \AA}$ . Это соответствует выводам, сделанным в статье [178], которые свидетельствуют о том, что скрученность угла вращения вокруг определенной двойной связи из-за наличия сильной водородной связи между основанием Шиффа и противоионом способствует дальнейшей реакции фотоизомеризации.



*Рисунок 29. Конформации активных центров исходных кристаллических структур родопсина KR2, зрительного родопсина и их первичных интермедиатов: (А) KR2 (PDB ID 6YC3), (Б) K<sub>KR2</sub> (PDB ID 6TK5), (В) зрительный родопсин (PDB ID 1L9H), (Г) Бато (PDB ID 2G87). Все расстояния указаны в Å. Белым выделены угол вращения вокруг связи C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> (А,Б) и угол вращения вокруг связи C<sub>11</sub>=C<sub>12</sub> (В, Г).*

Важно отметить, что рассмотренные углы вращения в первичных интермедиатах скручены еще больше. Угол вращения вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$  в КМ/ММ оптимизированной структуре  $K_{KR2}$  составляет  $44,5^\circ$  (рисунок 27, Б), а угол вращения вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$  в КМ/ММ оптимизированной структуре *Бато* составляет  $-145^\circ$  (рисунок 27, Г). Более высокая скрученность первичных интермедиатов по сравнению с реагентами обусловлена тем, что первичные интермедиаты находятся в нерелаксированном состоянии, которое возникает сразу после поглощения фотона и фотоизомеризации. Изменения в структурных параметрах интермедиата  $K_{KR2}$  после оптимизации методом КМ/ММ по сравнению с исходной кристаллической структурой интермедиата аналогичны тем изменениям, которые происходят в структурах реагентов. Так, расстояние между атомом азота основания Шиффа ретиналя и атомом кислорода первичного противоиона уменьшается с  $2,94 \text{ \AA}$  (рисунок 29, Б) до  $2,68 \text{ \AA}$  (рисунок 27, Б), а угол вращения вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$  изменяется с  $5^\circ$  до  $44,5^\circ$  (рисунок 29, Б, рисунок 27, Б). Такое сильное изменение угла вращения в ходе КМ/ММ оптимизации по сравнению с исходной кристаллической структурой может быть объяснено недостаточно высоким разрешением исходной кристаллической структуры бТК5. Например, в случае реагента KR2 наблюдалась похожая ситуация. Так, уточнение структуры бREW, которая обладала разрешением  $2.2 \text{ \AA}$ , привело к структуре бУСЗ с более высоким разрешением  $2.0 \text{ \AA}$ , и при этом угол вращения вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$  изменился с практического плоского значения в  $177^\circ$  до сильно свернутого значения в  $154^\circ$ . Более короткое расстояние между атомом кислорода Glu113 и атомом азота основания Шиффа ( $2,74 \text{ \AA}$ , (рисунок 27, Г)) и более сильно скрученный угол вращения вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$  ( $-145^\circ$ , (рисунок 27, Г)) наблюдается в КМ/ММ оптимизированной структуре *Бато* по сравнению с исходной кристаллической структурой ( $3,88 \text{ \AA}$ ;  $-155^\circ$ , (рисунок 29, Г) ).

Рассчитанные значения гармонических частот различных колебаний зрительного родопсина находятся в хорошем соответствии с частотами, рассчитанными ранее в статье [179] и в ряде случаев превышают их по точности, а также находятся в хорошем соответствии с данными, полученными при помощи низкотемпературной резонансной рамановской спектроскопии [180]. Рассчитанные значения гармонических частот различных колебаний родопсина KR2 также хорошо коррелируют с результатами экспериментов с использованием рамановской спектроскопии с временным разрешением [53,55], инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR) с временным

разрешением [181], инфракрасной спектроскопии с временным разрешением (IR) [182], низкотемпературной FTIR спектроскопии ([126,183]). Рассчитанные гармонические частоты первичных интермедиатов этих родопсинов также показали хорошее соответствие с экспериментальными данными. Рассчитанные частоты для *Бато* родопсина хорошо согласуются с данными, полученными при помощи низкотемпературной резонансной рамановской спектроскопии с временным разрешением [180], а также рамановской спектроскопии с временным разрешением при комнатной температуре [184]. Рассчитанные частоты для  $K_{KR2}$  хорошо совпадают с частотами, полученными из экспериментов по низкотемпературной FTIR спектроскопии [183]. Таким образом, приведенное хорошее соответствие рассчитанных и экспериментальных частот подтверждает высокое качество полных атомистических моделей родопсина KR2, зрительного родопсина и их интермедиатов, использованных в данной работе. В таблице 3 представлено сравнение рассчитанных частот с экспериментальными данными.

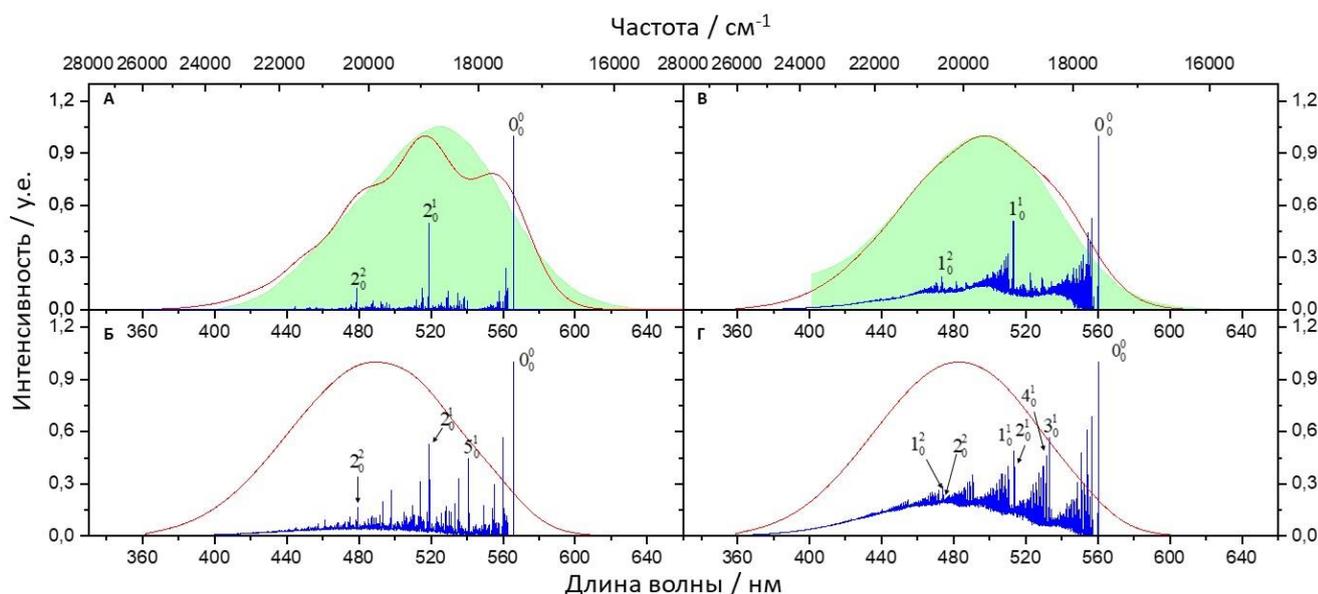
*Таблица 3. Экспериментальные и рассчитанные частоты (см<sup>-1</sup>) выбранных мод РПШО в активных центрах родопсина KR2,  $K_{KR2}$ , зрительного родопсина и Бато. Масштабированные частоты с коэффициентом 0,953 отмечены звездочкой. Валентное колебание обозначено как вк.*

Зрительный родопсин			<i>Бато</i>		
Тип частоты	Эксперимент	Расчет	Тип частоты	Эксперимент	Расчет
$C_{11}H = C_{12}H$ HOOP	970 [180]	1065/1015*	$C_{10}H$ HOOP	872 [180]	913/870*
$C_{10} - C_{11}$ вк	1097 [180]	1133/1080*	$C_{11}H$ HOOP	921 [180]	970/924*
$C_{14} - C_{15}$ вк	1189 [180]	1265/1206*	$C_{10} - C_{11}$ вк	1166 [180]	1203/1146*
$C_{11} = C_{12}$ вк	1551 [180]	1636/1559*	$C_{14} - C_{15}$ вк	1210 [180]	1268/1208*
$C_{15} - NH$ вк	1655 [180]	1746/1664*	$C_{11} = C_{12}$ вк	1561 [184]	1626/1550*
-	-	-	$C_{13} = C_{14}$ вк	1536 [180]	1614/1538*
-	-	-	$C_{15} - NH$ вк	1654 [180]	1740/1658*
KR2			$K_{KR2}$		
Тип частоты	Эксперимент	Расчет	Тип частоты	Эксперимент	Расчет
$C_{14}$ HOOP	877 [55]	905/862*	$C_{13} = C_{14}$ вк	1525 [183]	1593/1518*
$C_{13} = C_{14}$ вк	1532 [53,55,181,182]	1609/1533*	$C_{15} = NH$	1604 [183]	1714/1633*
N-D вк	2095 [126,183]	2084/1986*	$C_{10} - C_{11}, C_{14} - C_{15}$ вк	1194 [183]	1251/1192*
$C_{10} - C_{11}$ вк	1169 [183]	1210/1153*	-	-	-
$C_{14} - C_{15}$ вк	1203 [183]	1243/1185*	-	-	-

### 3.3.2 Исследование электронно-колебательных спектров реагентов и первичных интермедиатов родопсина KR2 и зрительного родопсина

Рассчитанные на уровне теории XMCQDPT2/(aug)-cc-pVDZ//EFP энергии вертикальных переходов (VEE) РПШО в KR2 и в  $K_{KR2}$  составляют 456 нм и 518 нм, соответственно. Значения экспериментальных максимумов поглощения для KR2 и  $K_{KR2}$  составляют 525 и 563 нм, соответственно [185]. Таким образом, разница в экспериментальных максимумах поглощения составляет 0,16 эВ, а разница рассчитанных VEE составляет 0,32 эВ. Еще лучшее согласие между рассчитанными и экспериментальными данными наблюдается для зрительного родопсина и *Бато*. Разница в значениях рассчитанных VEE составляет 0,17 эВ, и разница в экспериментальных максимумах поглощения также составляет 0,17 эВ. Рассчитанные на уровне теории XMCQDPT2/(aug)-cc-pVDZ//EFP VEE РПШО в зрительном родопсине и в *Бато* составляют 431 нм и 458 нм, соответственно. Значения экспериментальных максимумов поглощения для зрительного родопсина и *Бато* составляют 498 и 535 нм, соответственно [17]. Таким образом, рассчитанные нами значения VEE достаточно хорошо воспроизводят разницу между экспериментальными максимумами поглощения между первичным интермедиатом и реагентом для родопсина KR2 и зрительного родопсина, причем для зрительного родопсина соответствие между расчетом и экспериментом несколько выше. Причины систематической ошибки в рассчитанных абсолютных значениях энергий вертикальных переходов, которые сдвинуты в коротковолновую область спектра по сравнению с экспериментальными значениями максимумов поглощения, связаны с особенностью поведения метода XMCQDPT2 при описании ретиналь-содержащих систем и рассмотрены в статье [178] и разделе 3.4.3. Но даже несмотря на наличие систематической ошибки в абсолютных значениях энергий вертикальных переходов метод XMCQDPT2 позволяет надежно воспроизводить относительные значения энергий вертикальных переходов, он также позволяет получать результаты, устойчивые к небольшим изменениям параметров расчета и также позволяет произвести точный расчет градиентов в основном и возбужденных состояниях [178].

Рассчитанные электронно-колебательные спектры РПШО в данных белках и их первичных интермедиатах показаны на рисунке 30 [175].



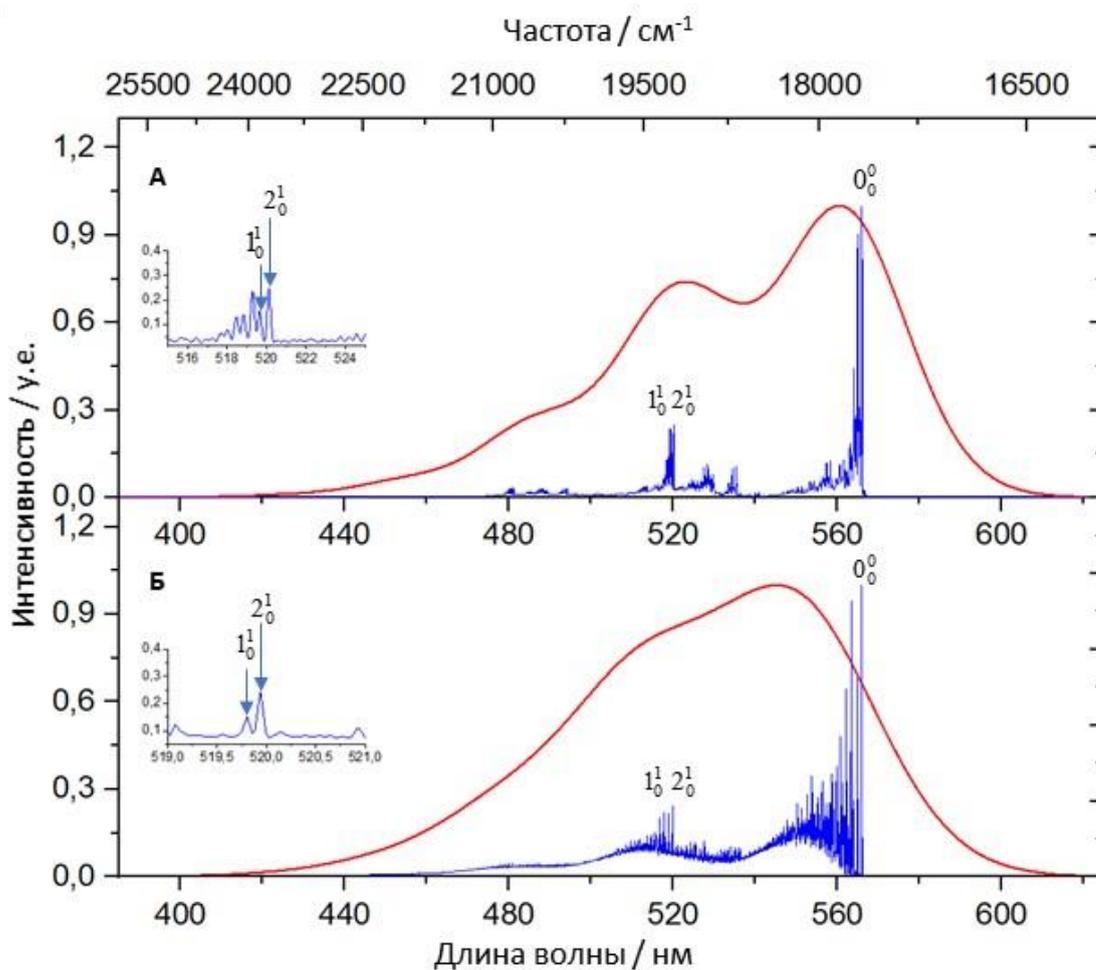
**Рисунок 30. Спектры фотопоглощения РПШО, рассчитанные при 300 К и свернутые с помощью функции Гаусса с полушириной на полувысоте (HWHM)  $471 \text{ см}^{-1}$ , в активных центрах (А) родопсина KR2, (Б)  $K_{KR2}$ , (В) зрительного родопсина, (Г) Бато. Показано сравнение с экспериментальными спектрами поглощения для реагентов, которые заштрихованы зеленым [17,48]. Также представлены линейчатые спектры, рассчитанные при 1 К и свернутые с помощью функции Гаусса с HWHM  $1 \text{ см}^{-1}$ . Числа над пиками обозначают определенные электронно-колебательные переходы, которые объясняются в основном тексте. Для удобства сравнения спектров реагентов и интермедиатов спектры интермедиатов сдвинуты так, чтобы их 0-0 переход совпадал с 0-0 переходом реагентов.**

Спектры Франка-Кондона рассчитываются с использованием метода расчета перекрывания колебательных волновых функций различных состояний в модели смещенных многомерных гармонических поверхностей с параллельными нормальными модами. Частоты рассматриваются без поправок, расчет происходит без учета ангармонизма мягких мод большой амплитуды, таких как вращение  $\beta$ -иононового кольца РПШО в газовой фазе, поскольку эти мягкие моды неактивны в первичной фотореакции. Рассчитанные формы вибронных полос полностью покрывают полную ширину экспериментальных спектров фотопоглощения РПШО в рассматриваемых белках (рисунок 30, А, В) [17,48]. Основной вклад в ширину вносят высокочастотные моды, в частности активные моды валентного  $C = C$  колебания, тогда как моды с низкими частотами способствуют спектральному размытию.

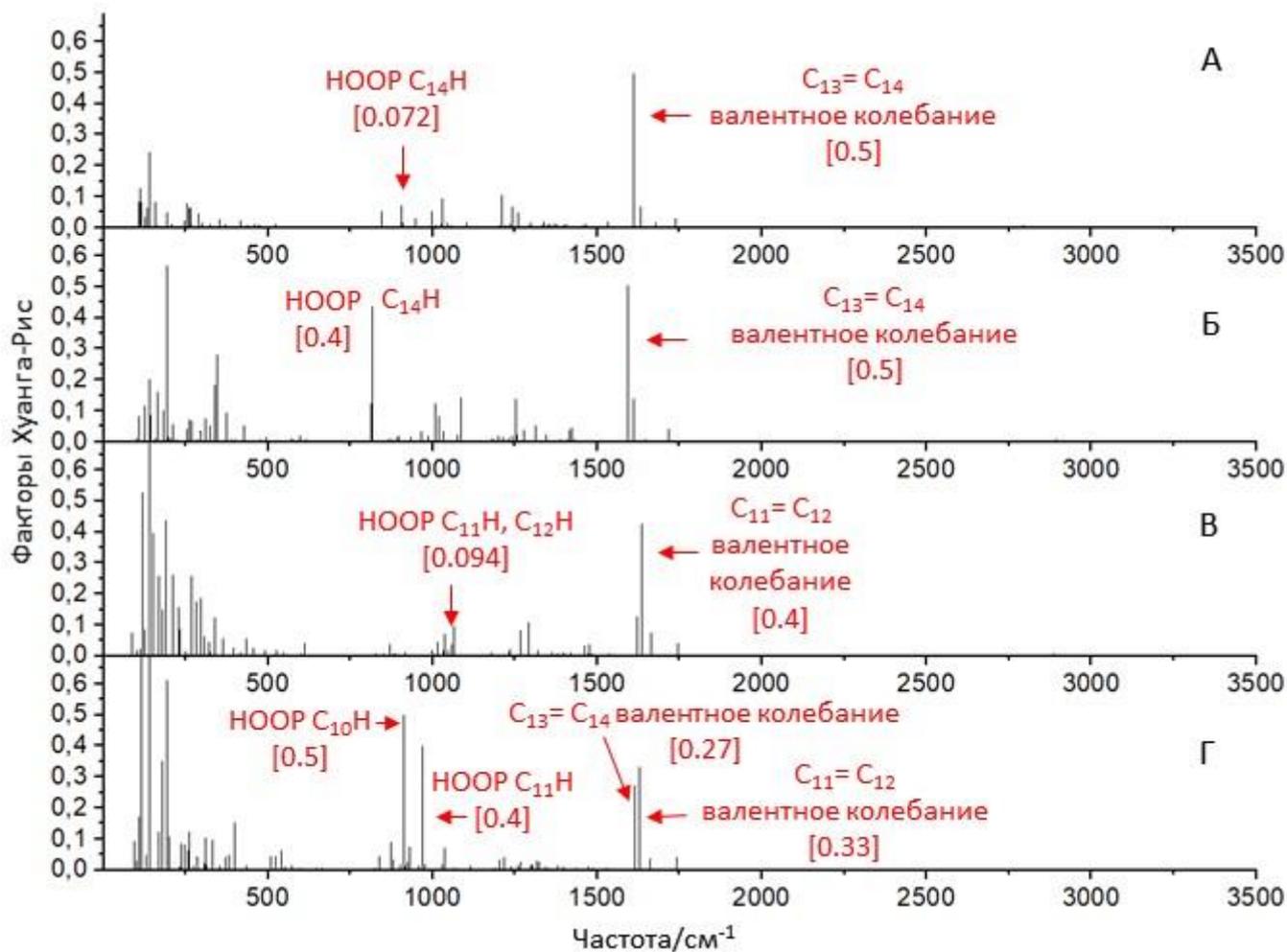
Белковое окружение и конформация РПШО влияют как на интенсивность, так и на

количество высокочастотных активных колебательных мод Франка-Кондона. Сравнение линейчатых спектров РПШО микробиального родопсина KR2 и зрительного родопсина животных помогает понять, как различное белковое окружение влияет на активные высокочастотные моды Франка-Кондона (рисунок 30, А, В). В родопсине KR2 при переходе  $S_0$ - $S_1$  наиболее активна мода валентного колебания  $C=C$ , преимущественно локализованная на связи  $C_{13}=C_{14}$  с немасштабированной частотой  $1609\text{ см}^{-1}$ . Пики, соответствующие 0-1 и 0-2 электронно-колебательным переходам для этого валентного колебания вдоль связи  $C_{13}=C_{14}$ , отмечены на рисунке 30 А, как  $2_0^1$  и  $2_0^2$ , соответственно. Число  $0_0^0$  на всех спектрах соответствует 0-0 электронно-колебательному переходу из основного состояния  $S_0$  в первое электронно-возбужденное состояние  $S_1$ . Линейчатый спектр зрительного родопсина по общему виду похож на линейчатый спектр родопсина KR2, но есть важное отличие. В спектре зрительного родопсина наибольшей интенсивностью обладает мода валентного  $C=C$  колебания, которая локализована на связи  $C_{11}=C_{12}$  с частотой  $1636\text{ см}^{-1}$ . Пики, соответствующие 0-1 и 0-2 электронно-колебательному переходу валентного колебания по связи  $C_{11}=C_{12}$ , отмечены на рисунке 30 В, как  $1_0^1$  и  $1_0^2$ , соответственно. В газовой фазе в полностью-*транс* и 11-*цис* изомерах РПШО валентные колебательные моды по связям  $C_{11}=C_{12}$  и  $C_{13}=C_{14}$  имеют сопоставимые между собой интенсивности, которые меньше интенсивностей этих мод в белковом окружении (рисунок 31). Факторы Хуанга-Рис, которые определяются как квадраты сдвига гармонических поверхностей  $S_0$  и  $S_1$  в безразмерных нормальных координатах, деленные на коэффициент два, полезны для определения интенсивности переходов для различных колебательных мод при фотовозбуждении. На рисунке 32 А и В представлены факторы Хуанга-Рис для родопсина KR2 и зрительного родопсина, соответственно. На этих спектрах видно, что в белковом окружении колебания, связанные с выходом атомов водорода при атомах углерода полиеновой цепи ретиналя из плоскости (НООР колебания), приобретают интенсивность, тогда как в газовой фазе НООР колебания отсутствуют (рисунок 33). НООР мода связана с колебанием атома водорода при атоме углерода  $C_{14}$  в родопсине KR2 и с колебанием атомов водорода при атомах углерода  $C_{11}$  и  $C_{12}$  в зрительном родопсине. Наиболее активным высокочастотным валентным колебанием является колебание вдоль связи  $C_{13}=C_{14}$  в случае родопсина KR2 и колебание вдоль связи  $C_{11}=C_{12}$  в случае зрительного родопсина. Таким образом, скрученность ретиналя по определенной двойной связи увеличивает интенсивность высокочастотной

валентной колебательной C=C моды вдоль данной связи, а также способствует появлению колебательной HOOP моды при данной связи. При этом высокочастотное валентное C=C колебание вместе с HOOP колебанием атома водорода при определенной двойной связи способствуют реакции фотоизомеризации при данной связи: в случае родопсина KR2 эти моды способствуют полностью-транс → 13-цис фотоизомеризации, а в случае зрительного родопсина способствуют 11-цис → полностью-транс фотоизомеризации [175], [176], [177].



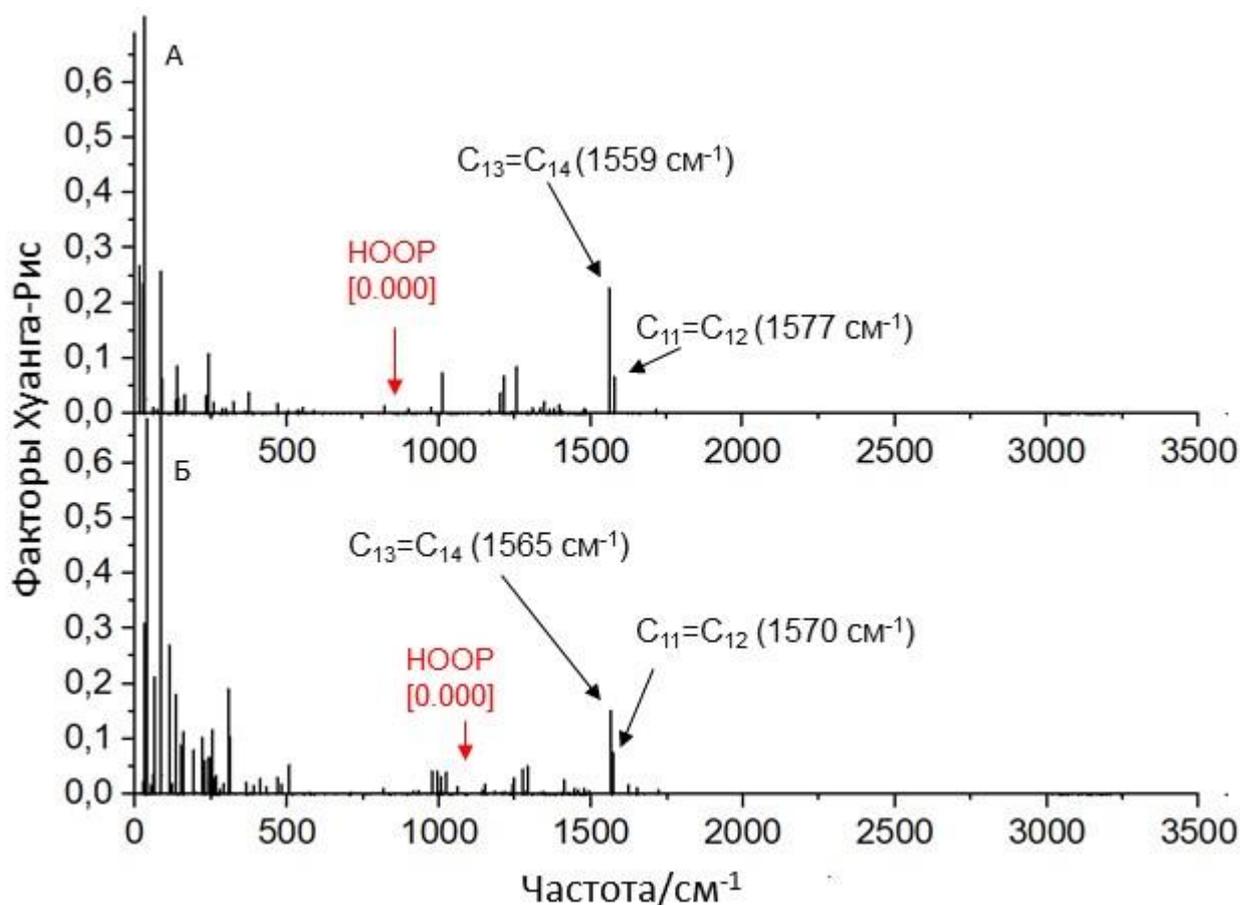
**Рисунок 31.** Спектры фотопоглощения РПШО для (А) полностью-транс и (Б) 11-цис изомеров РПШО, рассчитанные при 300 К и свернутые с помощью функции Гаусса с полушириной на полувысоте (НWHM) 471 см<sup>-1</sup>. Также представлены линейчатые спектры, рассчитанные при 1 К и свернутые с помощью функции Гаусса с НWHM 1 см<sup>-1</sup>. Пик, соответствующий 0-1 электронно-колебательному переходу валентного колебания по связи C<sub>11</sub>=C<sub>12</sub>, отмечен как 1<sub>0</sub><sup>1</sup>. Пик, соответствующий 0-1 электронно-колебательному переходу валентного колебания по связи C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>, отмечен как 2<sub>0</sub><sup>1</sup>.



**Рисунок 32.** Активные моды Франка-Кондона РПШО при переходе  $S_0$ - $S_1$  в активных центрах (А) родопсина KR2, (Б) Kкж, (В) зрительного родопсина, (Г) Бато. Красные стрелки обозначают HOOP моды и C=C валентные колебания с соответствующими факторами Хуанга-Рис, указанными в квадратных скобках.

В данном разделе был также проведен анализ того, как меняется перераспределение электронной плотности РПШО в газовой фазе и в белковом окружении. Возбужденное состояние РПШО имеет сильно выраженный характер переноса заряда (рисунок 34), что можно видеть как по разностной электронной плотности (приложение 1), так и по значительной разности дипольных моментов при переходе из основного в возбужденное состояние (приложение 2). Порядок двойных связей в полностью-транс и 11-цис изомерах ретиналя при фотовозбуждении в разных окружениях меняется похожим образом (рисунок 34). В газовой фазе, при плоской геометрии РПШО, порядки всех двойных связей уменьшаются практически идентично. В изолированном скрученном РПШО в геометрии из белка уменьшается сопряжение двойных связей, и самые большие изменения порядков связей происходят на концах молекулы, между которыми

происходит миграция заряда. В скрученном РПШО в белковом окружении электронная плотность наибольшим образом начинает меняться именно по середине в области двойных связей  $C_{11}=C_{12}$  и  $C_{13}=C_{14}$ .

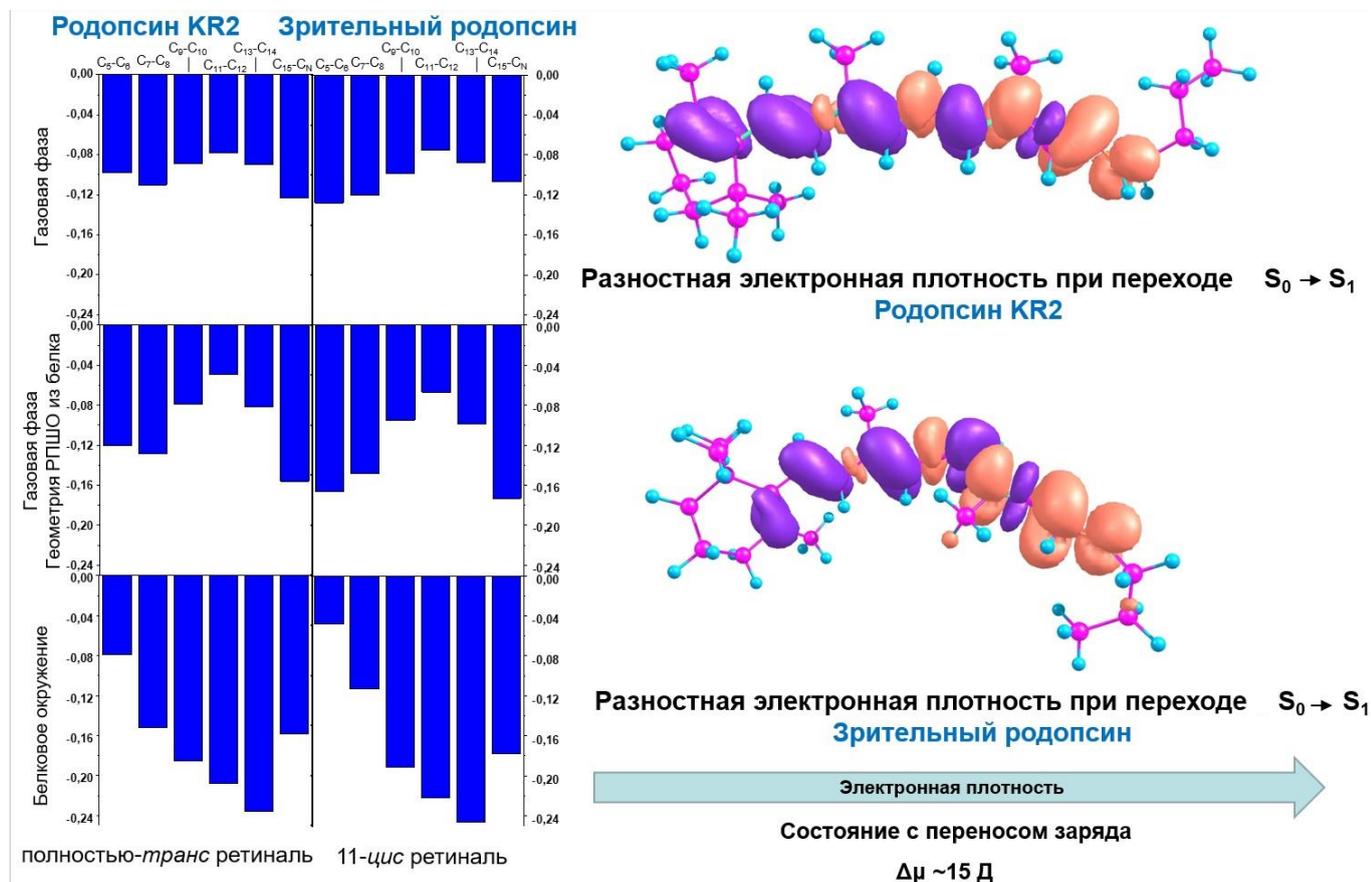


**Рисунок 33. Активные моды Франка-Кондона РПШО при переходе  $S_0-S_1$  в полностью-транс (А) и 11-цис (Б) изолированных изомерах РПШО. Красные стрелки обозначают НООР моды с соответствующими факторами Хуанга-Рис, указанными в квадратных скобках.**

Таким образом белковое окружение влияет не только стерически, изменяя конформацию РПШО, но и меняет перераспределение электронной плотности по сравнению с газовой фазой.

Спектры первичных интермедиатов  $K_{KR2}$  и *Бато* заметным образом отличаются от спектров реагентов. Из-за большей скрученности РПШО в интермедиатах по сравнению с реагентами интенсивность НООР колебаний становится выше в первичных интермедиатах, чем в реагентах. Пик, соответствующий 0-1 электронно-колебательному переходу НООР колебания атома водорода при атоме углерода  $C_{14}$  в  $K_{KR2}$  обозначен как  $5_0^1$  на рисунке 30, Б. Похожая картина наблюдается в *Бато*. Но в этом случае

значительную интенсивность приобретают сразу два НООР колебания. Первое НООР колебание связано с атомом водорода при атоме углерода  $C_{10}$ , и пик, соответствующий 0-1 электронно-колебательному переходу НООР колебания атома водорода при атоме углерода  $C_{10}$  в *Бато*, обозначен как  $3_0^1$  на рисунке 30, Г.



**Рисунок 34.** Изменение порядка двойных связей в полностью-транс и 11-цис изомерах РПШО в газовой фазе и белковом окружении родопсина KR2 и зрительного родопсина.

Второе НООР колебание связано с колебанием атома водорода при атоме углерода  $C_{11}$  и пик, соответствующий 0-1 электронно-колебательному переходу НООР колебания атома водорода при атоме углерода  $C_{11}$  в *Бато*, обозначен как  $4_0^1$  на рисунке 30, Г. Интенсивности НООР колебаний атомов водорода в интермедиатах сравнимы с интенсивностями высокочастотных валентных колебаний двойных  $C=C$  связей, что можно видеть из анализов факторов Хуанга-Рис на рисунке 32, Б,Г.

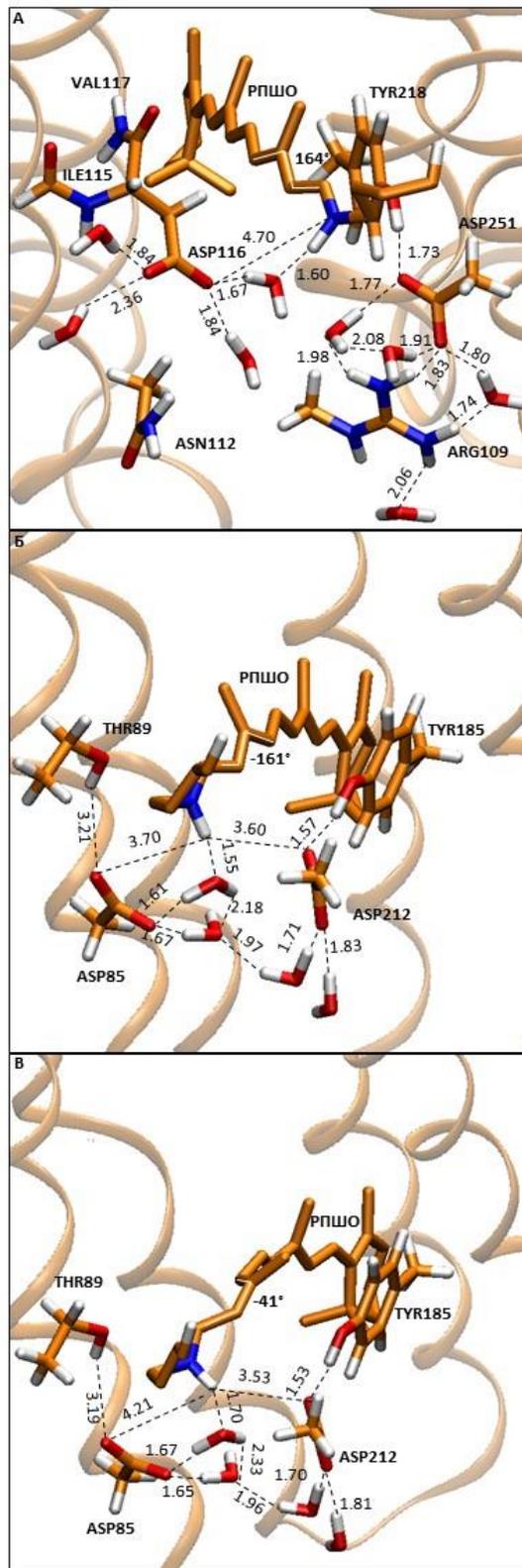
Наиболее активным высокочастотным валентным колебанием в  $K_{KR2}$  является колебание вдоль связи  $C_{13}=C_{14}$  с частотой  $1593 \text{ см}^{-1}$ . Пики, соответствующие 0-1 и 0-2 электронно-колебательным переходам для колебания вдоль связи  $C_{13}=C_{14}$  в  $K_{KR2}$ ,

обозначены как  $2_0^1$  и  $2_0^2$  на рисунке 30, Б. В *Bato* возбуждаются сразу две высокочастотные валентные колебательные моды, локализованные на двойных связях  $C_{11}=C_{12}$  и  $C_{13}=C_{14}$ . Частота колебания вдоль связи  $C_{13}=C_{14}$  составляет  $1614\text{ см}^{-1}$ . Пики, соответствующие 0-1 и 0-2 электронно-колебательным переходам для колебания вдоль связи  $C_{13}=C_{14}$  в *Bato*, обозначены как  $2_0^1$  и  $2_0^2$  на рисунке 30, Г. Частота колебания вдоль связи  $C_{11}=C_{12}$  в *Bato* составляет  $1626\text{ см}^{-1}$ . Пики, соответствующие 0-1 и 0-2 электронно-колебательным переходам для колебания вдоль связи  $C_{11}=C_{12}$  в *Bato*, обозначены как  $1_0^1$  и  $1_0^2$  на рисунке 30, Г. Из анализов факторов Хуанга-Рис можно видеть (рисунок 32, Г), что две высокочастотные колебательные моды по двойным связям в *Bato* сравнимы по интенсивности. Появление второй высокочастотной колебательной моды в *Bato* по связи  $C_{13}=C_{14}$  по сравнению с реагентом зрительного родопсина связано с тем, что угол вращения в *Bato* вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$  свернут и составляет  $-163^\circ$ , что ведет к увеличению интенсивности и локализации колебательной моды вдоль этой связи, тогда как в зрительном родопсине такого не происходит, так как угол вращения вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$  практически плоский и составляет  $175^\circ$ . При этом для полностью-*транс* РПШО в газовой фазе, так же как для 11-*цис* РПШО в газовой фазе, графики факторов Хуанга-Рис (рисунок 33) демонстрируют, что для этих изомеров в газовой фазе характерно наличие сразу двух высокочастотных валентных колебаний по связи  $C_{11}=C_{12}$  и по связи  $C_{13}=C_{14}$ . Таким образом, в  $K_{KR2}$ , так же как и в реагенте, активна только одна высокочастотная валентная колебательная мода, локализованная на связи  $C_{13}=C_{14}$ , которая вместе с активной колебательной НООР модой при атоме углерода  $C_{14}$ , способствует обратной реакции фотоизомеризации по связи  $C_{13}=C_{14}$ . В интермедиате *Bato* активны две высокочастотные валентные колебательные моды, локализованные на двойных связях  $C_{11}=C_{12}$  и  $C_{13}=C_{14}$ , но ни одна из них не являются доминирующей. Также в *Bato* присутствуют две колебательные НООР моды при разных двойных связях. Эти два фактора, то есть отсутствие доминирующей высокочастотной колебательной моды и наличие двух колебательных НООР мод при разных двойных связях, позволяют предположить более низкую селективность и более низкий квантовый выход обратной реакции фотоизомеризации в случае *Bato* интермедиата по сравнению с  $K_{KR2}$  интермедиатом [176], [177]. Это предположение находится в хорошем согласии с экспериментально измеренными квантовыми выходами обратных реакций фотоизомеризации для бактериородопсина и зрительного родопсина. Так, квантовый выход обратной реакции фотоизомеризации для

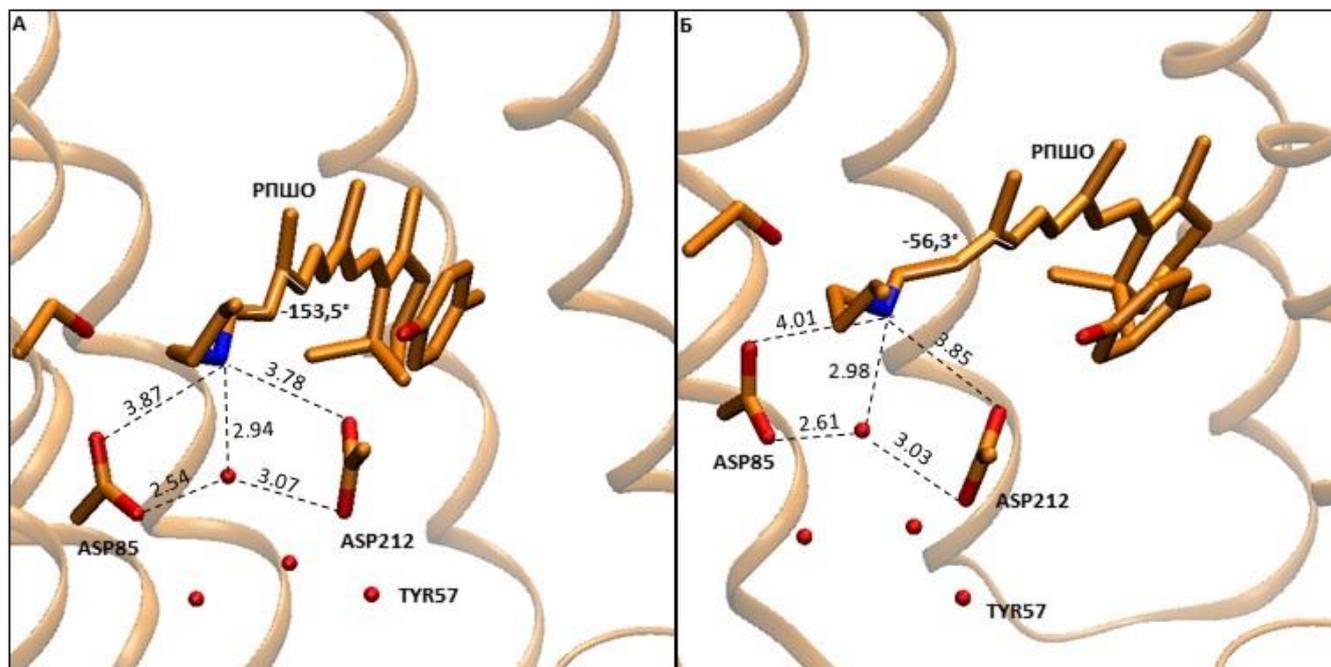
микробиального бактериородопсина в пять раз больше такового для зрительного родопсина [31].

### ***3.4.3 Исследование структур реагента и первичного интермедиата бактериородопсина***

Структура активного центра БР, оптимизированного методом КМ/ММ, представлена на рисунке 35, Б. В данном родопсине у РПШО есть два противоиона: Asp85 и Asp212. Расстояние между кислородом Asp85 и протоном основания Шиффа составляет 3,70 Å, а расстояние между кислородом Asp112 и протоном основания Шиффа равно 3,60 Å (рисунок 35, Б). РПШО связан с Asp85 цепочкой водородных связей с участием одной молекулы воды, расположенной между основанием Шиффа и Asp85. Длины этих водородных связей составляют 1,61 Å и 1,55 Å (рисунок 35, Б). Угол вращения вокруг связи C<sub>13</sub> = C<sub>14</sub> составляет -161°. Этот угол скручен в меньшей степени по сравнению с углом в исходной кристаллической структуре, который составляет -153,5° (рисунок 36, А). Это может быть связано с тем, что в исходной кристаллической структуре БР отсутствует водородная связь между противоионом и основанием Шиффа ретиналя, в отличие от родопсина KR2 и зрительного родопсина. Как показано в статье [178] и в разделе 3.4.1, водородная связь между противоионом и РПШО влияет на скрученность ретиналя сильнее, чем водородная связь той же длины, но образованная между молекулой воды и РПШО. При оптимизации методом КМ/ММ структура РПШО в БР релаксирует, и угол вращения вокруг связи C<sub>13</sub> = C<sub>14</sub> становится менее скрученным, потому что отсутствует сильная водородная связь между противоионом и основанием Шиффа, которая могла бы удерживать угол в более скрученном состоянии. Величина угла вращения вокруг связи C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> в БР после оптимизации составляет -161°, что по скрученности близко к величине этого угла в нереакционноспособном конформере II (mKR2) родопсина KR2 (164°). Конформер II обсуждается в разделе 3.4.1 и в статье [178] (рисунок 35, А). Важно отметить, что близкие значения этих углов вращения в оптимизированных структурах БР и mKR2 отчасти обусловлены сходством структур их активных центров. В обеих структурах есть противоион, который не имеет сильной водородной связи с основанием Шиффа. Оба родопсина имеют между РПШО и противоионом короткую цепь из двух водородных связей, включая Asp116 (mKR2) или Asp85 (БР), одну молекулу воды и РПШО. Каждая из этих двух водородных связей имеет длину примерно 1,6 Å, и именно эта короткая цепочка водородных связей обеспечивает взаимодействие между противоионом и РПШО и влияет на скрученность ретиналя.



**Рисунок 35. Структуры активных центров (А) *tKR2* (получена на основе структуры PDB ID 6REW), (Б) бактериородопсина (получена на основе структуры PDB ID 1M0L), (В) *KBR* (получена частично на основе структуры PDB ID 1M0K), полученных после охлаждения в ходе молекулярно-динамического моделирования и КМ/ММ оптимизации геометрии. Все расстояния указаны в Å. Белым выделен угол вращения вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$ .**



**Рисунок 36. Структуры активных центров исходных кристаллических структур бактериородопсина и его первичного интермедиата: (А) БР (PDB ID 1M0L), (Б)  $K_{BR}$  (PDB ID 1M0K). Все расстояния указаны в Å. Белым выделен угол вращения вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$ .**

Угол вращения РПШО вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$  в  $K_{BR}$  скручен сильнее, чем в реагенте, и составляет  $-41^\circ$  (рисунок 35, В). Эта величина по абсолютному значению близка к значению угла вращения вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$  в  $K_{KR2}$  ( $44,5^\circ$ ) и к значению угла вращения вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$  в *Бато* ( $-145^\circ$ ) (рисунок 27, Б, Г), что свидетельствует о том, что первичный интермедиат бактериородопсина, также как и два других первичных интермедиата, находится в нерелаксированном состоянии. Угол вращения вокруг связи  $C_{13} = C_{14}$  в оптимизированной структуре интермедиата ( $-41^\circ$ ) скручен меньше, чем в исходной кристаллической структуре ( $-56,3^\circ$ ), что может быть связано с ослаблением взаимодействия между РПШО и вторым противоположноим, Asp112, после КМ/ММ оптимизации, которое также может вносить вклад в скручивание ретиналя.

Рассчитанные значения гармонических частот различных колебаний бактериородопсина и его первичного интермедиата находятся в хорошем соответствии с частотами, полученными из экспериментов по резонансной рамановской спектроскопии [186,187] и фемтосекундной рамановской спектроскопии с временным разрешением [121]. Таким образом, приведенное хорошее соответствие рассчитанных и экспериментальных частот подтверждает качество полных атомистических моделей бактериородопсина и его первичного интермедиата. В таблице 4 приведено сравнение

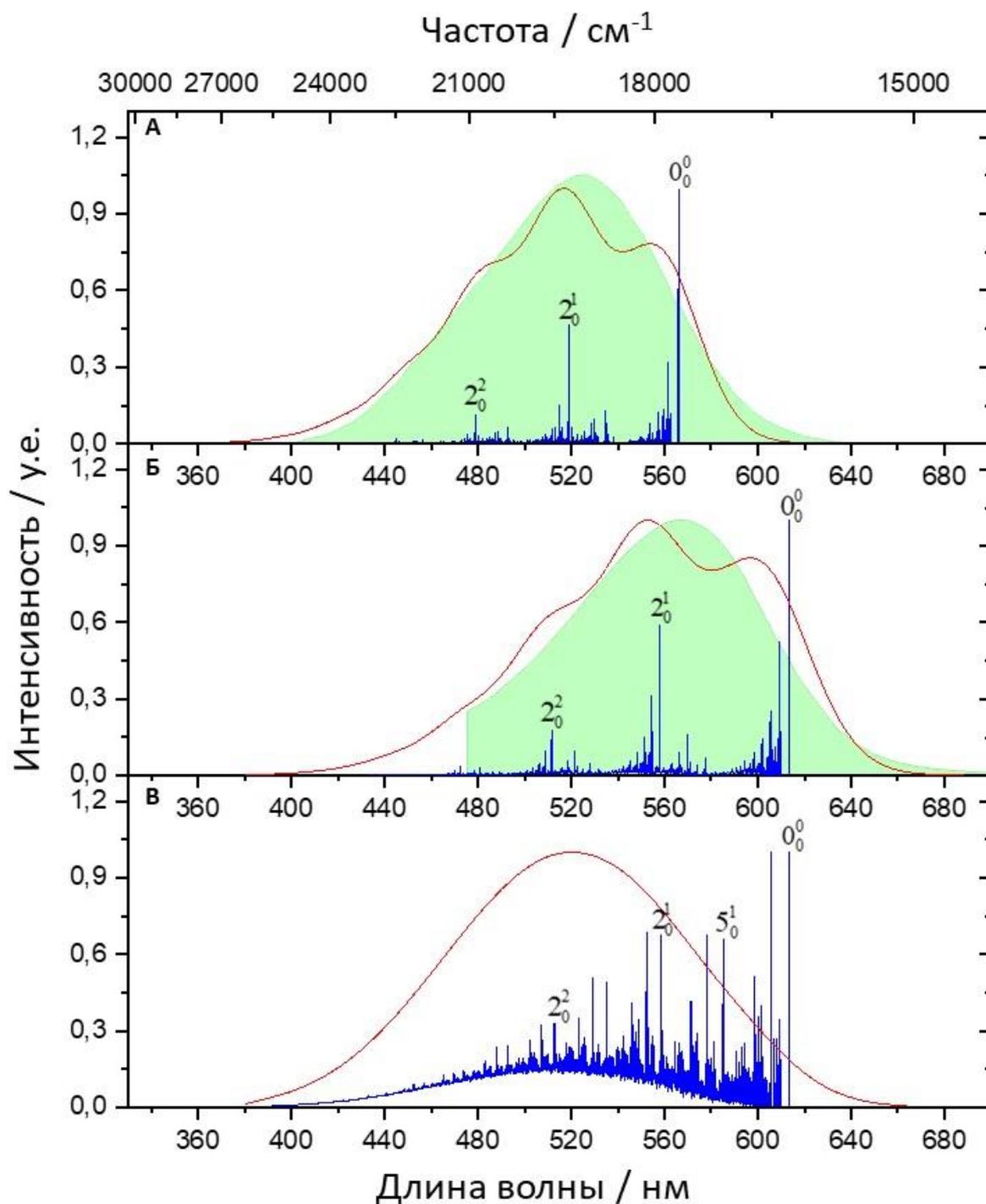
рассчитанных частот с экспериментальными данными. Для сравнения также приведены частоты mKR2.

**Таблица 4. Экспериментальные и рассчитанные частоты (см<sup>-1</sup>) выбранных мод РПШО в активных центрах родопсина mKR2, бактериородопсина и K<sub>BR</sub>. Масштабированные частоты с коэффициентом 0,953 отмечены звездочкой.**

<b>mKR2</b>		
<b>Тип частоты</b>	<b>Эксперимент</b>	<b>Расчет</b>
C <sub>14</sub> HOOP	877 [55]	915/872*
C <sub>13</sub> = C <sub>14</sub> валентное колебание	1532 [53,55,181,182]	1603/1528*
N-D валентное колебание	2095 [126,183]	2066/1969*
C <sub>10</sub> - C <sub>11</sub> валентное колебание	1169 [183]	1200/1144*
C <sub>14</sub> - C <sub>15</sub> валентное колебание	1203 [183]	1252/1193*
<b>Бактериородопсин</b>		
<b>Тип частоты</b>	<b>Эксперимент</b>	<b>Расчет</b>
C <sub>15</sub> = N валентное колебание	1640 [186,187]	1750/1668*
C <sub>13</sub> = C <sub>14</sub> валентное колебание	1527 [186,187]	1623/1547*
C <sub>10</sub> - C <sub>11</sub> валентное колебание	1171 [186,187]	1215/1158*
C <sub>8</sub> - C <sub>9</sub> валентное колебание	1214 [186]	1355/1291*
<b>K<sub>BR</sub></b>		
<b>Тип частоты</b>	<b>Эксперимент</b>	<b>Расчет</b>
C <sub>13</sub> = C <sub>14</sub> валентное колебание	1520 [121]	1600/1525*
C <sub>14</sub> - C <sub>15</sub> валентное колебание	1191 [121]	1195/1138*
C <sub>11</sub> = C <sub>12</sub> HOOP	955 [121]	998/951*
C <sub>14</sub> HOOP	808 [121]	791/754*

#### **3.4.4 Исследование электронно-колебательных спектров реагента и первичного интермедиата бактериородопсина**

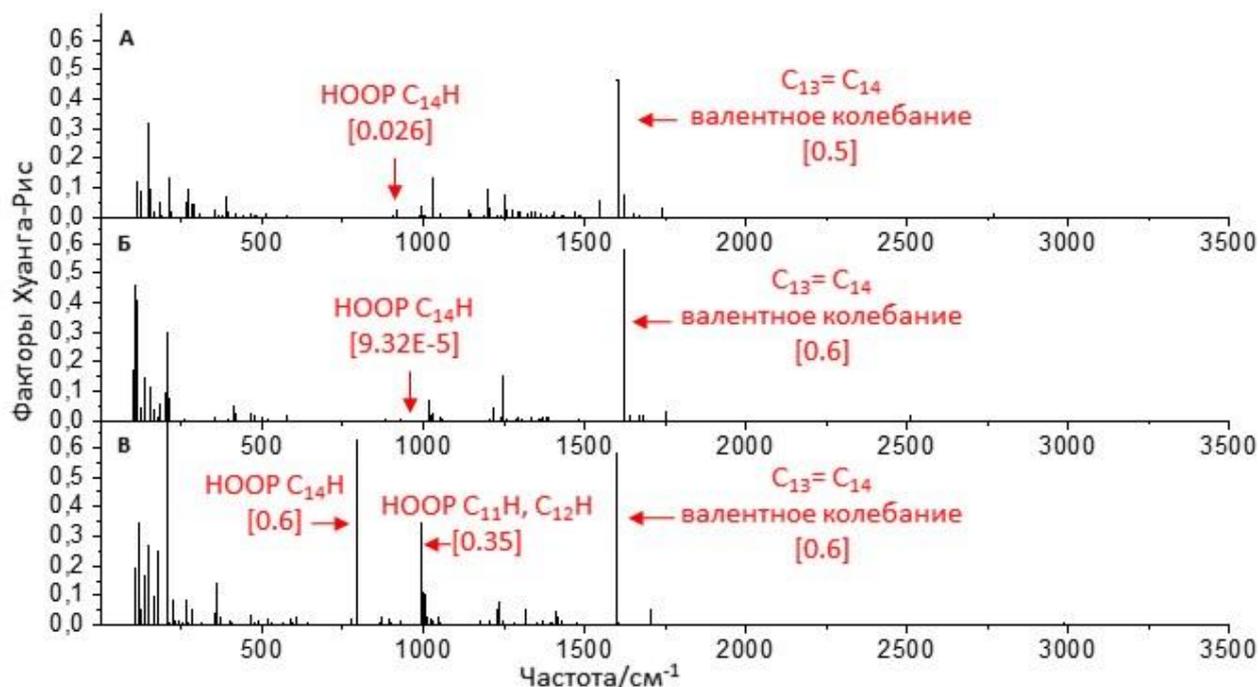
Рассчитанные на уровне теории ХМСQDPT2/(aug)-сс-рVDZ//EFP VEE для РПШО в БР и его интермедиате K<sub>BR</sub> составляют 444 нм и 501 нм, соответственно. Значения экспериментальных максимумов поглощения БР и K<sub>BR</sub> составляют 570 [188] и 610 нм [189], соответственно. Таким образом, разница в экспериментальных максимумах поглощения составляет 0,14 эВ, а разница в расчетных VEE — 0,32 эВ. Разница между экспериментальными и расчетными данными аналогична таковой для другого микробного родопсина КР2, рассмотренного выше.



**Рисунок 37.** Спектры фотопоглощения РПШО, рассчитанные при 300 К и свернутые с помощью функции Гаусса с полушириной на полувысоте (HWHM)  $471 \text{ см}^{-1}$ , в активных центрах (А) *mKR2*, (Б) *БР*, (В) *КВР*. Показано сравнение с экспериментальными спектрами поглощения для реагентов, которые заштрихованы зеленым [48] (А), [31] (Б). Также представлены линейчатые спектры, рассчитанные при 1 К и свернутые с помощью функции Гаусса с HWHM  $1 \text{ см}^{-1}$ . Числа над пиками обозначают определенные электронно-колебательные переходы, которые объясняются в основном тексте.

Рассчитанные электронно-колебательные спектры РПШО в mKR2, БР и K<sub>BR</sub> показаны на рисунке 37. Рассчитанные формы вибронных полос полностью покрывают полную ширину экспериментальных спектров фотопоглощения РПШО в рассматриваемых белках [48], [31] (рисунок 37, А, Б). Основной вклад в ширину вносят высокочастотные моды, в частности активные моды валентного C = C колебания, тогда как моды с низкими частотами просто способствуют спектральному размытию. Спектры БР и mKR2 похожи. В каждом из них наблюдаются отчетливые пики, соответствующие возбуждению колебательной моды, локализованной вдоль связи C<sub>13</sub> = C<sub>14</sub>. Частота этой моды составляет 1603 см<sup>-1</sup> и 1623 см<sup>-1</sup> в mKR2 и БР, соответственно. Пики, соответствующие 0-1 и 0-2 электронно-колебательным переходам этой моды, обозначены цифрами 2<sub>0</sub><sup>1</sup> и 2<sub>0</sub><sup>2</sup> на рисунке 37, А, Б, соответственно. Число 0<sub>0</sub><sup>0</sup> на всех спектрах обозначает 0-0 электронно-колебательный переход из основного состояния S<sub>0</sub> в первое электронно-возбужденное состояние S<sub>1</sub>.

На рисунке 38 А, Б показаны факторы Хуанга-Рис для mKR2 и БР, соответственно. Наиболее активной модой в этих белках является высокочастотная валентная колебательная C=C мода, локализованная на двойной связи C<sub>13</sub> = C<sub>14</sub>, которая упомянута выше и представлена на рисунке 37, А, Б. Активность данной моды в указанных родопсинах отчасти обусловлена скрученностью ретиналя по связи C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>, что аналогично рассмотренному выше примеру, когда скрученность РПШО по определенной двойной связи увеличивала интенсивность валентной колебательной моды по данной связи в родопсине KR2 и зрительном родопсине. HOOP мода, связанная с атомом водорода при атоме углерода C<sub>14</sub>, активна в mKR2, но ее интенсивность ниже по сравнению с интенсивностью этой моды в KR2 (рисунок 32, А). Снижение интенсивности этой HOOP моды в mKR2 связано с тем, что ретиналь в mKR2 скручен в меньшей степени по сравнению с ретиналем в KR2, о чем подробно говорится в пункте 3.4.1 и в статье [178]. Интенсивность HOOP моды с участием атома водорода при атоме углерода C<sub>14</sub> в БР, также как и в mKR2, выражена слабее, чем в KR2, что, как и в случае с mKR2, связано с менее сильным скручиванием РПШО вокруг связи C<sub>13</sub> = C<sub>14</sub> в БР по сравнению с KR2. Низкая интенсивность этой HOOP моды может быть причиной более медленной скорости фотоизомеризации РПШО в БР (~500 фс) по сравнению с KR2 (~200 фс).

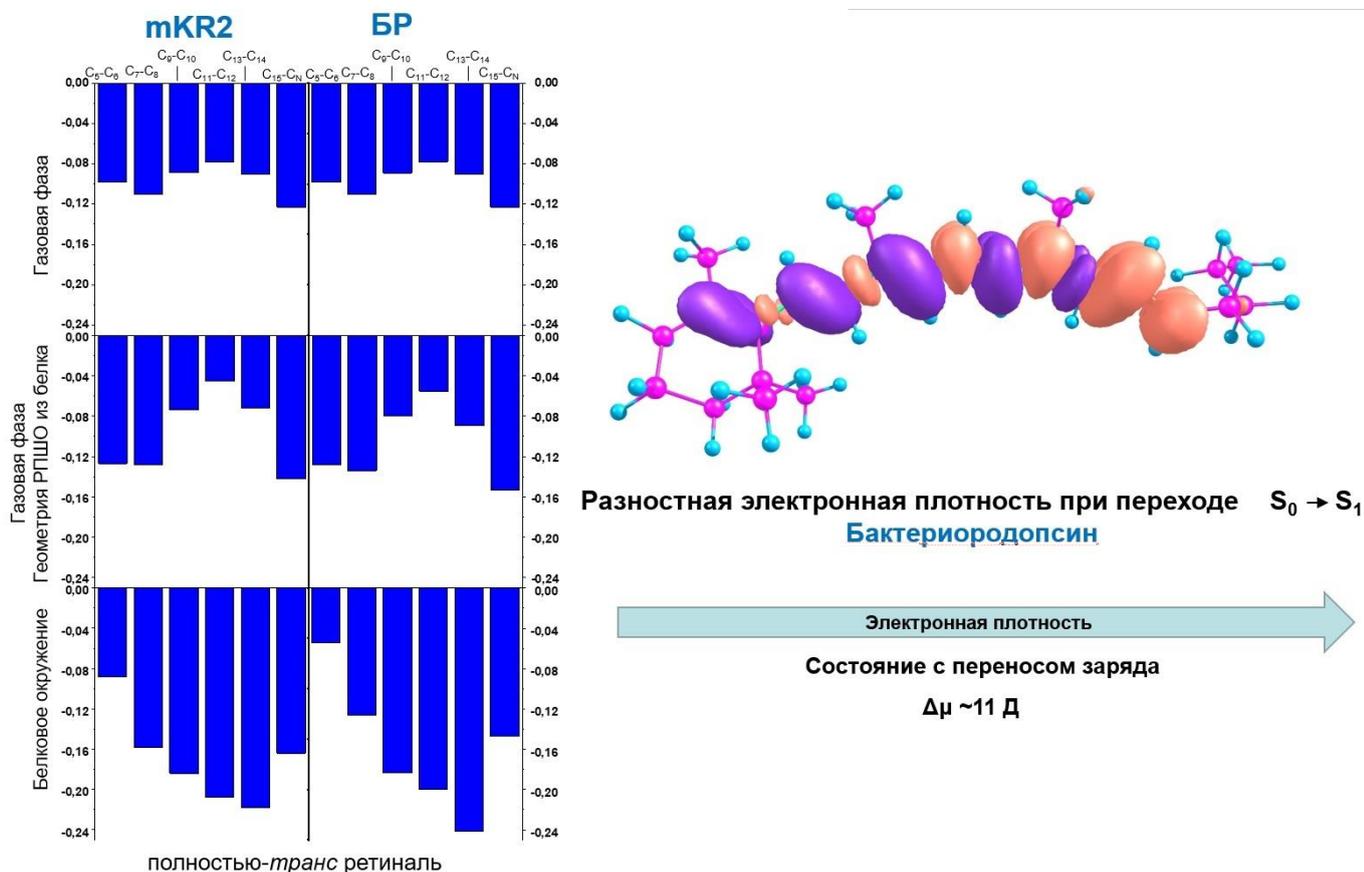


**Рисунок 38.** Активные моды Франка-Кондона РПШО при переходе  $S_0-S_1$  в активных центрах (А)  $mKR2$ , (Б)  $BP$ , (В)  $K_{BR}$ . Красные стрелки обозначают НООР моды и  $C=C$  валентные колебания с соответствующими факторами Хуанга-Рис, указанными в квадратных скобках.

В данной работе был также проведен анализ того, как меняется перераспределение электронной плотности РПШО в газовой фазе,  $mKR2$  и  $BP$ . Изменение порядка двойных связей полностью-*транс* РПШО при фотовозбуждении в  $mKR2$  и  $BP$  (рисунок 39) (приложения 1, 2) аналогично таковому, рассмотренному для  $KR2$  и зрительного родопсина в разделе 3.3.2.

В спектре  $K_{BR}$  есть заметные отличия от спектра реагента бактериородопсина. Из-за большей скрученности ретиналя в интермедиате  $K_{BR}$  по сравнению с  $BP$  НООР колебания в спектре интермедиата становятся более интенсивными, чем в спектре реагента. Пик, соответствующий 0-1 электронно-колебательному переходу НООР моды, связанной с колебаниями атома водорода при атоме  $C_{14}$  в  $K_{BR}$ , обозначен как  $5_0^1$  на рисунке 37 В и соответствует частоте  $791\text{ см}^{-1}$ . Также в РПШО в  $K_{BR}$  возбуждается еще одна колебательная НООР мода, связанная с атомами водорода при атомах углерода  $C_{11}$  и  $C_{12}$  и соответствующая частоте  $998\text{ см}^{-1}$ . Как видно из анализа факторов Хуанга-Рис (рисунок 38, В), интенсивность НООР колебаний атома водорода при атоме углерода  $C_{14}$  почти вдвое превышает интенсивность НООР колебаний атомов водорода при атомах углерода  $C_{11}$  и  $C_{12}$ . Интенсивности НООР мод в интермедиате сравнимы с интенсивностью высокочастотного колебания вдоль двойной связи  $C_{13}=C_{14}$ , что хорошо видно из графика

факторов Хуанга-Риса на рисунке 38, В. Наиболее интенсивной высокочастотной валентной колебательной модой в  $K_{BR}$  является мода, локализованная на связи  $C_{13}=C_{14}$  и имеющая частоту  $1600\text{ см}^{-1}$ . Пики, соответствующие 0-1 и 0-2 электронно-колебательным переходам для этого валентного колебания по связи  $C_{13}=C_{14}$ , отмечены на рисунке 37, В как  $2_0^1$  и  $2_0^2$ , соответственно.



**Рисунок 39.** Изменение порядка двойных связей в полностью-транс РПШО в газовой фазе и в белковом окружении *mKR2* и *БР*.

Таким образом, в  $K_{BR}$ , как и в  $K_{KR2}$ , активна только одна колебательная мода по двойной связи  $C_{13} = C_{14}$ . Активность только одной высокочастотной валентной колебательной моды является отличительной особенностью этих двух интермедиатов микробных родопсинов по сравнению с интермедиатом *Бато*, в котором активны две высокочастотные валентные колебательные моды. Это указывает на то, что обратная реакция фотоизомеризации в  $K_{BR}$  протекает именно по двойной связи  $C_{13} = C_{14}$ . Наиболее активная, доминирующая НООР мода с участием атома водорода при атоме углерода  $C_{14}$  также способствует селективной обратной реакции фотоизомеризации по связи  $C_{13} = C_{14}$  в  $K_{BR}$ , как и в  $K_{KR2}$ .  $K_{BR}$  также имеет активную НООР моду с участием атомов водорода при атомах углерода  $C_{11}$  и  $C_{12}$ , что может снизить эффективность обратной реакции фотоизомеризации по связи  $C_{13} = C_{14}$ . Но в этом случае интенсивность этой моды почти в

два раза меньше, чем интенсивность НООР моды с участием атома водорода при атоме углерода  $C_{14}$ , поэтому последняя вносит больший вклад в динамику обратной реакции фотоизомеризации и способствует реакции фотоизомеризации именно по связи  $C_{13}=C_{14}$ . В *Bato* также наблюдаются две активные НООР моды, одна из которых локализована у атома углерода  $C_{10}$ , а другая — у атома углерода  $C_{11}$ . Но в этом случае, в отличие от  $K_{BR}$ , интенсивности двух НООР мод сравнимы, что снижает эффективность и селективность обратной реакции по конкретной двойной связи. Также в *Bato* присутствуют две высокочастотные интенсивные колебательные моды по двойным связям  $C_{11}=C_{12}$  и  $C_{13}=C_{14}$ , что также снижает эффективность обратной реакции фотоизомеризации по определенной двойной связи, в то время как в  $K_{BR}$  активна только одна колебательная мода по двойной связи  $C_{13} = C_{14}$ . Таким образом, можно утверждать, что обратная реакция фотоизомеризации в  $K_{BR}$  протекает эффективно и селективно по двойной связи  $C_{13} = C_{14}$ , что аналогично селективной обратной реакции фотоизомеризации в  $K_{KR2}$  [176]. Это предположение находится в хорошем согласии с экспериментально измеренными квантовыми выходами обратных реакций фотоизомеризации для бактериородопсина и зрительного родопсина. Так, квантовый выход обратной реакции фотоизомеризации для микробиального бактериородопсина в пять раз больше такового для зрительного родопсина [31].

### 3.4.5 Заключение

Таким образом, в данном разделе было продемонстрировано влияние белкового окружения на фотодинамику прямой и обратной реакции фотоизомеризации РПШО на ранних временах в родопсине  $KR2$ , БР, зрительном родопсине и в их первичных интермедиатах  $K_{KR2}$ , *Bato* и  $K_{BR}$ , соответственно.

Анализ колебательных мод РПШО в микробиальном родопсине  $KR2$  и зрительном родопсине животных позволил изучить характер ранней фотоиндуцированной динамики РПШО в возбужденном состоянии в различных окружениях. Уширенные, колебательно-неразрешенные спектры этих белков похожи, но колебательные моды, которые возбуждаются в первые моменты времени сразу после поглощения фотона, различны. Из теоретических [73,119,190,191] и экспериментальных [191] исследований известно, что в фотодинамике реакции фотоизомеризации, протекающей вне области Франка-Кондона, важную роль играют определенные высокочастотные валентные  $C=C$  колебательные моды и НООР колебательные моды. Наше исследование показывает, что реакции

фотоизомеризации способствует белковое окружение, благодаря которому начальное возбуждение определенных колебательных мод происходит сразу после перехода в состояние  $S_1$  в области Франка-Кондона. Белковое окружение родопсинов I и II типов действует сходным образом и обеспечивает высокую эффективность их фоточувствительных функций. Установлено, что в реагентах данных родопсинов происходит скручивание РПШО по определенной двойной связи, что приводит к возбуждению высокочастотной валентной колебательной моды вдоль этой связи и НООР колебательной моды атомов водорода при данной связи. Высокочастотная валентная колебательная мода вместе с НООР модой способствуют дальнейшей реакции фотоизомеризации по определенной двойной связи, что обеспечивает селективность и эффективность прямой фотореакции. Помимо скрученности РПШО электростатические эффекты белкового окружения, влияющие на перераспределение электронной плотности РПШО, также способствуют реакции фотоизомеризации по определенной двойной связи.

Белковое окружение бактериородопсина также способствует скрученности РПШО по определенной двойной связи, а электростатические эффекты белкового окружения аналогичны тем эффектам, которые наблюдаются в KR2 и зрительном родопсине. Тем не менее, интенсивность НООР моды в бактериородопсине ниже, чем в KR2 и зрительном родопсине, а скорость фотоизомеризации снижается более, чем в два раза по сравнению с KR2 и зрительным родопсином. Такое отличие в эффективности реакции фотоизомеризации можно объяснить тем, что БР обладает другим структурным типом активного центра: между РПШО и противоионом отсутствует водородная связь. Таким образом, показано, что только определенный структурный тип активного центра как микробных родопсинов, так и родопсинов животных, характеризующийся наличием сильной водородной связи между основанием Шиффа и его противоионом, способен обеспечить наивысшую скорость фотоизомеризации РПШО.

Обратные реакции фотоизомеризации в бактериальных родопсинах KR2 и бактериородопсине обладают более высокой специфичностью по сравнению с обратной реакцией в зрительном родопсине, что связано с тем, что в интермедиатах микробных родопсинов селективно возбуждаются валентные колебания по одной связи  $C_{13}=C_{14}$  и НООР колебание атома водорода при данной связи, тогда как в бактериородопсине возбуждаются сразу два валентных колебания по двум связям и НООР колебания при разных двойных связях. Такая разная эффективность обратных реакций может быть

обусловлена фотофизическими свойствами изомеров РРШО в активном центре интермедиатов. Так, первичные интермедиаты микробиальных родопсинов содержат 13-*цис* изомер ретиналя, который в газовой фазе эффективно и безбарьерно фотоизомеризуется в *транс* форму, тогда как в батородопсине находится полностью-*транс* ретиналь, изомеризующийся в газовой фазе на порядок медленнее, чем *цис* изомеры и требующий особого белкового окружения для увеличения скорости и изменения селективности фотоизомеризации. Вывод о специфичности обратных реакций хорошо коррелирует с экспериментальными данными по квантовым выходам обратных реакций.

### **3.4 Исследование гетерогенности основного состояния родопсина KR2 и ее влияния на фотофизические свойства РПШО**

*Результаты, описанные в данном разделе, опубликованы в работе [178]<sup>4</sup>.*

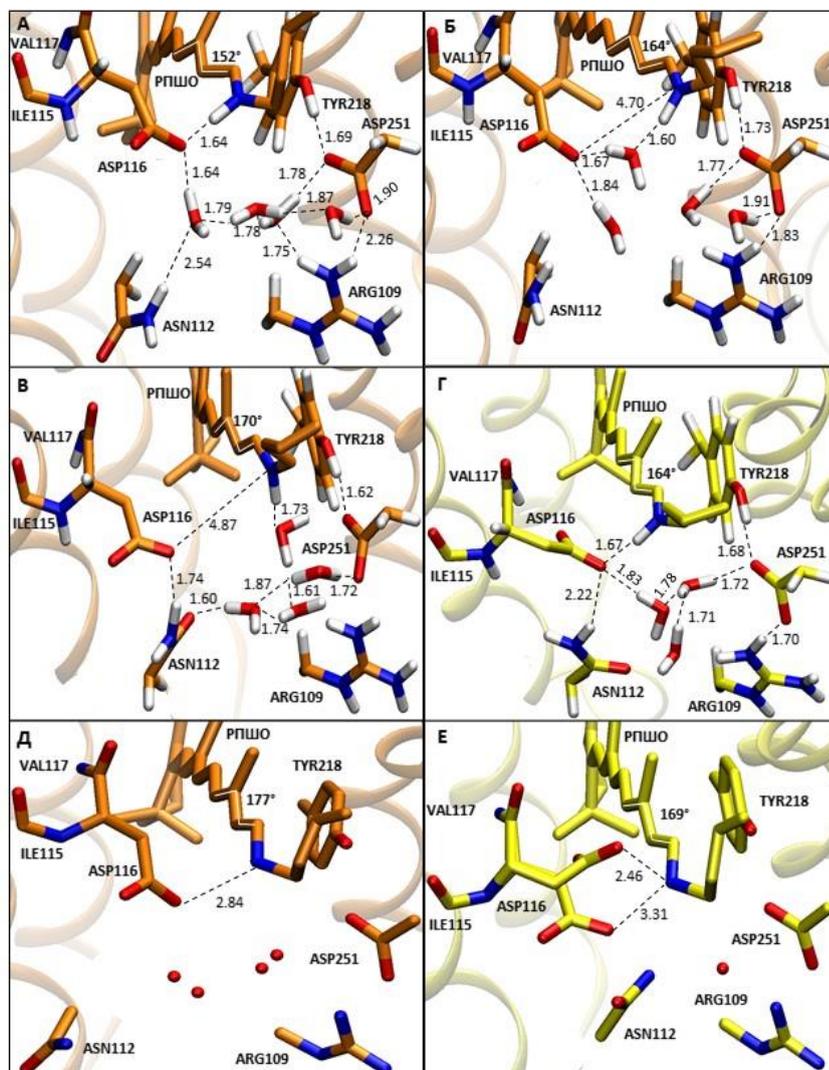
Структура активного центра родопсинов значительно влияет на фотофизические свойства РПШО. Данный раздел посвящен исследованию роли структурной гетерогенности активного центра родопсина KR2 в возникновении нереакционноспособных состояний, не приводящих к фотоизомеризации.

#### ***3.4.1 Исследование гетерогенности активного центра мономера родопсина KR2 в водном растворе методом молекулярного моделирования***

Структура родопсина KR2, имеющая идентификатор PDB ID 6REW [49], была получена при pH 8.0 и находится в пентамерной форме, что отражает физиологически активную [192] форму родопсина KR2, в которой данный белок функционирует при переносе ионов Na<sup>+</sup>. По мнению авторов, получивших данную структуру, именно в пользу неё разрешаются противоречия между кристаллическими формами родопсина KR2, полученными разными научными группами. Ретиналь-связывающий сайт родопсина KR2 в его физиологически активной форме в структуре с PDB ID 6REW (6REW) имеет такую конформацию, что около РПШО находится несколько молекул воды, а также присутствует водородная связь между РПШО и его противоионом, Asp116 (рисунок 40, Д). Структура, имеющая идентификатор PDB ID 3X3C (3X3C) [51], кристалл которой был получен при кислотном pH, а затем выдержан при pH 7.5-8.5, представляет из себя мономерную форму, которая содержит меньше молекул воды около РПШО по сравнению со структурой 6REW, что обусловлено реориентацией Asn112 по направлению к Asp116 (рисунок 40, Е).

---

<sup>4</sup>При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Kusochek P.A., Scherbinin A. V., Bochenkova A. V. Insights into the Early-Time Excited-State Dynamics of Structurally Inhomogeneous Rhodopsin KR2 // The Journal of Physical Chemistry Letters. — 2021. — Vol. 12, № 35. — P. 8664–8671. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причём вклад Кусочка П.А. составляет 80%.



*Рисунок 40. Различные конформации активного центра родопсина KR2 после охлаждения в ходе молекулярно-динамического моделирования и КМ/ММ оптимизации геометрии. Геометрии, основанные на кристаллической структуре в пентамерной форме, полученной при pH 8.0 (PDB ID 6REW [49], оранжевый цвет), относятся к «короткой» (А), «связанной» (Б) и «длинной» (В) формам конформеров, отличающихся положением противоиона Asp116 по отношению к РПШО. Геометрия, основанная на кристаллической структуре в мономерной форме, полученной при кислом значении pH и затем выдержанной при pH 7.5-8.5 (PDB ID 3X3C [51], желтый цвет), показана на панели (Г). Исходные кристаллические структуры (показаны только тяжелые атомы) представлены на панели (Д) - 6REW и на панели (Е) - 3X3C. В последней структуре показаны две ориентации Asp116, отличающиеся наличием и отсутствием водородной связи между РПШО и ASP116 при нейтральных и кислых значениях pH, соответственно. Все расстояния приведены в Å. Белой линией обозначен угол вращения вокруг связи C<sub>13</sub>-C<sub>14</sub>.*

В структуре 3X3C также присутствует водородная связь между РПШО и его противоионом Asp116, но ориентация Asp116 отличается от таковой в структуре с PDB ID 6REW (рисунок 40, E). При анализе кристалла структуры 3X3C также наблюдается альтернативное положение остатка Asp116, когда данный остаток отвернут от основания Шиффа и не образует с ним водородной связи (рисунок 40, E). Такое отвернутое положение Asp116 становится доминирующим и единственным в кристаллах, полученных при более низких pH [51].

Таким образом, существующие кристаллические структуры ясно указывают на конформационную подвижность активного центра родопсина KR2. В данном разделе с целью исследования конформационной подвижности активного центра проведено молекулярно-динамическое моделирование родопсина KR2 с использованием мономерной единицы структуры 6REW в водном растворе и структуры 3X3C в водном растворе. Параметры моделирования описаны в разделе 2.2.1. Для каждой из структур в NPT ансамбле была получена молекулярно-динамическая траектория общей длиной 40 нс. Вдоль молекулярно-динамической траектории для дальнейшего изучения выбирались определенные структуры. Оптимизированные геометрии выбранных структур получены после процедуры охлаждения в ходе молекулярно-динамического моделирования, после которого следовала оптимизация геометрии методом КМ/ММ на уровне теории PBE0/(aug)-сс-pVDZ//AMBER. Похожие КМ/ММ методики уже успешно применялись для изучения фотофизических свойств флюоресцентных белков [169,170,193].

Полученные в ходе молекулярно-динамического моделирования результаты свидетельствуют о высокой конформационной подвижности активного центра рассматриваемых кристаллических структур. Как структура 6REW, так и структура 3X3C в ходе молекулярного моделирования могут отходить от начальной конформации активного центра и принимать такую конформацию, когда в активный центр проникают молекулы воды и водородная связь между РПШО и противоионом пропадает. Тем не менее, общая конформационная подвижность двух данных структур разная.

Результаты молекулярно-динамического моделирования выявили высокую конформационную подвижность активного центра структуры 6REW. Для дальнейшего изучения вдоль молекулярно-динамической траектории было выбрано несколько конформеров активного центра родопсина KR2, наиболее сильно отличающихся друг от

друга ориентацией противоиона Asp116 относительно РПШО. Один из конформеров содержит Asp116 в ориентации, близкой к РПШО, и между РПШО и Asp116 образуется короткая сильная водородная связь (длина 1.64 Å). Такая структура далее в тексте будет называться конформером I (рисунок 40, А). Другой конформер содержит связанную молекулу воды между Asp116 и РПШО, с каждым из которых молекула воды образует водородную связь (рисунок 40, Б). Таким образом, два этих остатка взаимодействуют друг с другом, но опосредованно через молекулу воды (расстояние между кислородом Asp116 и атомом азота РПШО – 4.70 Å). Такая структура далее в тексте будет называться конформером II. И третья структура такова, что в ней Asp116 не имеет водородной связи с РПШО и никак с ним не взаимодействует (рисунок 40, В) (расстояние между кислородом Asp116 и атомом азота РПШО – 4.87 Å). Далее в тексте такая структура будет называться конформером III. Конформер III является флуктуацией вдоль всей молекулярно-динамической траектории, тогда как конформер I и конформер II являются основными структурами в определенные периоды времени и характеризуются средней длиной водородной связи в 1.74 Å для конформера I и средним расстоянием между Asp116 и РПШО в 4,68 Å – для конформера II.

Напротив, для структуры 3X3C результаты молекулярно-динамического моделирования выявили более низкую конформационную подвижность активного центра, поэтому для дальнейшего рассмотрения была выбрана одна структура, которая является основной вдоль молекулярно-динамической траектории и в которой есть водородная связь (длина 1.67 Å) между Asp116 и РПШО, но ориентация Asp116 отличается от той, что наблюдается в конформере I структуры 6REW (рисунок 40, Г). Далее в тексте эта структура будет называться конформером IV. Средняя длина водородной связи для данной конформации вдоль молекулярно-динамической траектории составляет 1.65 Å.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что олигомерная структура может быть важна в создании нужной ориентации противоиона по отношению к РПШО в физиологически активной форме белка, тогда как мономеры характеризуются большими структурными вариациями, в особенности, связанными с положением Asp116. Вместе с этим можно ожидать, что структурная гетерогенность основного состояния, наблюдаемая в молекулярном моделировании мономеров родопсина KR2 в водном растворе, будет частично наблюдаться и в пентамерной форме белка, который заключен

в мембрану при физиологических условиях. Действительно, данное предположение было подтверждено посредством молекулярной метадинамики пентамерной формы KR2, погруженной в липидный бислой. Результаты молекулярной метадинамики описаны далее.

Важно отметить, что существует корреляция между силой водородной связи между РПШО и Asp116 и степенью скрученности полиеновой цепи РПШО вокруг связи C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>. Конформер I имеет самую короткую водородную связь длиной 1,64 Å, и угол вращения вокруг связи C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> в этом случае составляет 152 ° (рисунок 40, А). В то же время в конформере III РПШО не взаимодействует с Asp116, и угол вращения равен 170° (рисунок 40, В) [178]. В экспериментальной работе также было обнаружено, что скручивание полиеновой цепи ретиналя и сильная водородная связь между РПШО и его противопологом важны для транспорта ионов натрия в KR2 [55].

Сила водородной связи ранее оценивалась с помощью низкотемпературной дифференциальной FTIR спектроскопии при исследовании изотопно меченного KR2 [126]. Валентное колебание N-D дейтерированного РПШО с частотой 2095 см<sup>-1</sup> указывает на образование относительно прочной водородной связи. Наш колебательный анализ различных конформаций активного центра KR2 выявил очень высокую чувствительность рассчитанной частоты этой моды к длине водородной связи. Данная частота варьируется от 1969 до 2255 см<sup>-1</sup>, эти значения относятся к длинам водородных связей 1,60 Å и 1,73 Å для конформера II и конформера III, соответственно, и приведены с учетом применения коэффициента масштабирования 0,953 к частотам, полученным в гармоническом приближении [179] (таблица 5). Сравнение экспериментальных и рассчитанных частот подтверждает образование водородной связи между РПШО и противопологом Asp116, которая имеет длину 1,64–1,67 Å и наблюдается в конформере I и конформере IV (рисунок 40 А, Г).

**Таблица 5. Экспериментальные и рассчитанные частоты (см<sup>-1</sup>) выбранных мод РПШО в активных центрах конформеров родопсина KR2. Масштабированные частоты с коэффициентом 0,953 отмечены звездочкой. Валентное колебание обозначено как вк.**

Тип частоты	Эксперимент	Расчет			
		Конформер I	Конформер II	Конформер III	Конформер IV
N-D вк	2095 [126,183]	2084/1986*	2066/1969*	2366/2255*	2206/2102*
C=C вк	1532 [53,55,181,182]	1609/1533*	1603/1528*	1607/1531*	1604/1529*
C <sub>14</sub> H HOOP	877 [55]	905/862*	915/872*	918/875*	906/863*

### ***3.4.2 Исследование гетерогенности активного центра пентамера родопсина KR2 в липидном бислое методом молекулярной метадинамики***

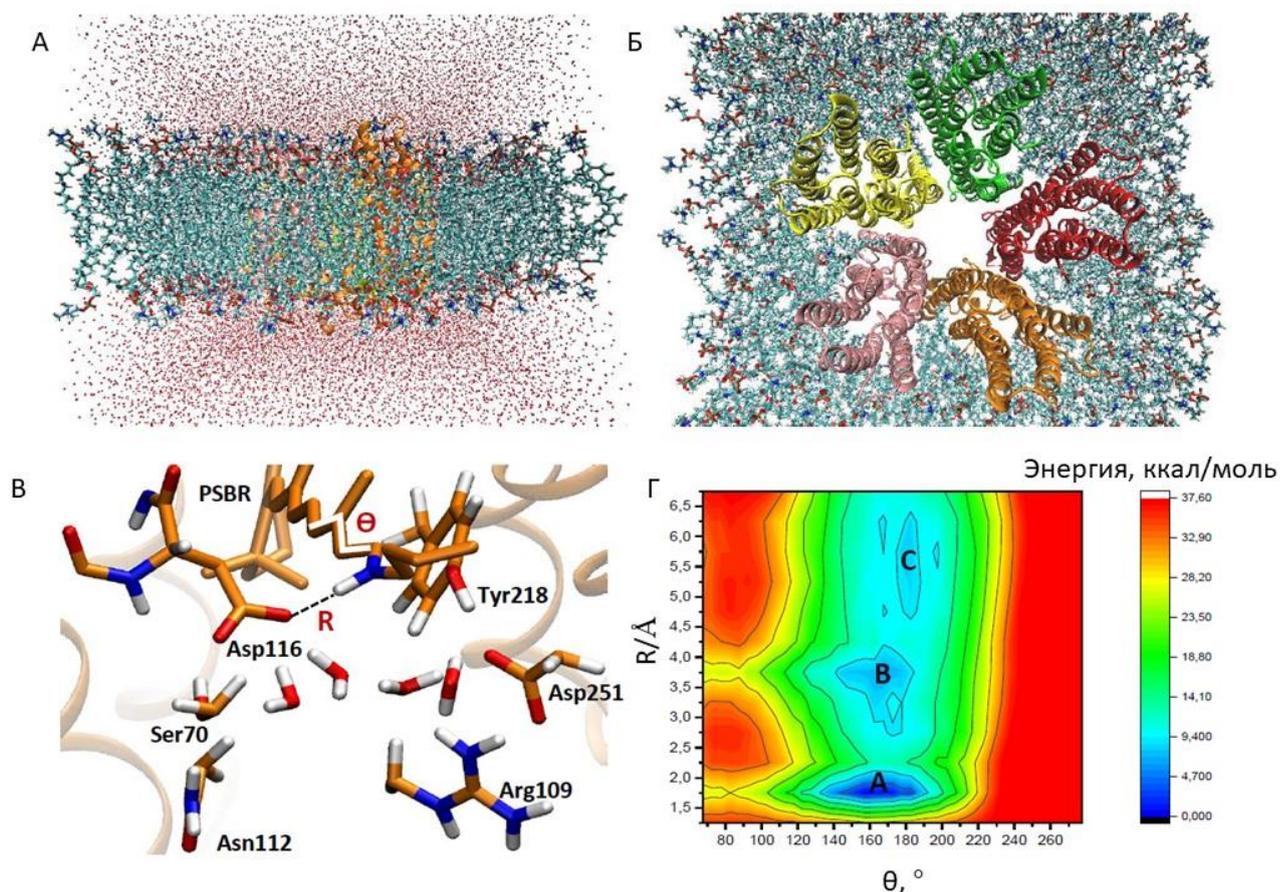
Для более детального исследования структурной гетерогенности активного центра пентамерной формы KR2 в липидном бислое и исследования зависимости энергии Гиббса конформеров активного центра от ключевых структурных параметров, которые определяют положение противоположно Asp116 по отношению к основанию Шиффа ретиналя и конформацию РПШО, нами была выполнена молекулярная метадинамика (metaMD) [163], [194].

Коллективные переменные (CV) были выбраны на основе нашего молекулярного моделирования сольватированного мономера KR2: (I) расстояние между одним из атомов кислорода карбоксильной группы Asp116 и атомом водорода протонированного основания Шиффа ретиналя; (II) угол вращения, включающий атомы C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub>-C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub> РПШО (рисунок 41, В).

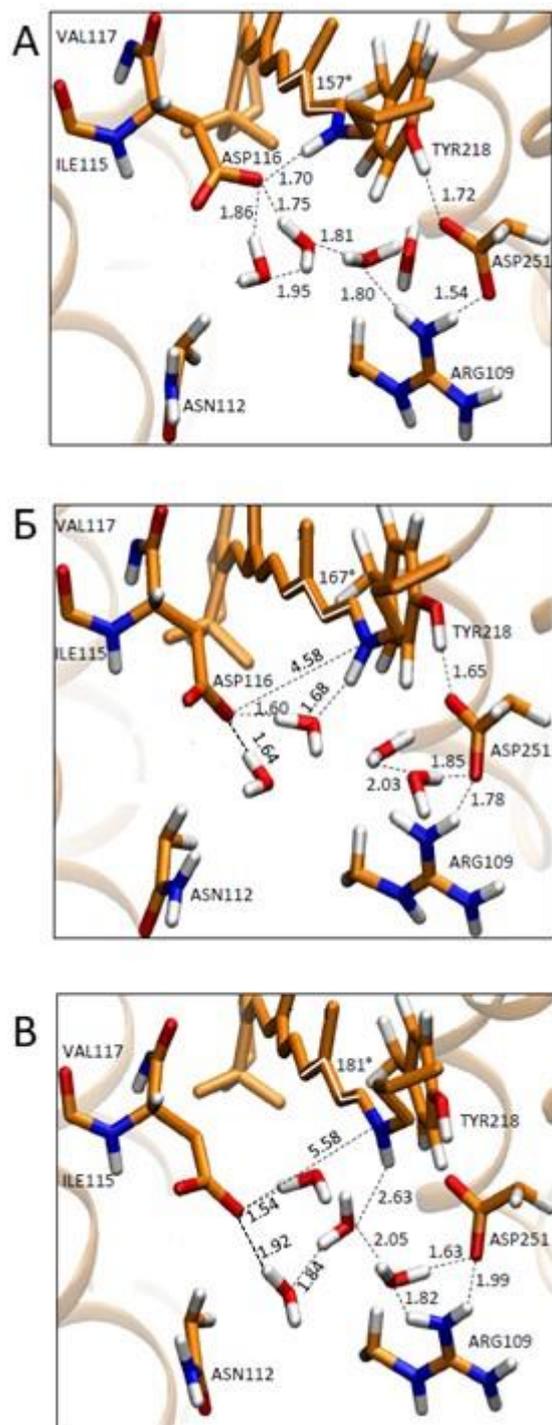
MetaMD позволяет ускорить молекулярное моделирование пентамерной системы родопсина KR2, окруженной липидным бислоем, и исследовать конфигурационное пространство относительно ключевых структурных параметров, обсужденных выше: длины водородной связи между Asp116 и РПШО (R) и угла вращения, описывающего поворот вокруг связи C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> ( $\theta$ ) (рисунок 41, В). При анализе поверхности энергии Гиббса было обнаружено три области минимумов, обозначенные как А, В, С (рисунок 41, Г), соответствующие трем различным конформациям активного центра KR2 в пентамерной форме. Эти конформации очень похожи на те, которые наблюдаются в классической молекулярной динамике мономера KR2 в водном растворе: энергетический бассейн А соответствует преобладающему конформеру I с наименьшей энергией, а бассейны В и С относятся к второстепенным более высокоэнергетическим структурам, соответствующим конформеру II и конформеру III, соответственно (рисунок 42). Конформер I лежит на ~10 ккал/моль ниже двух других конформеров.

Таким образом, несмотря на более жесткую структуру липидно-белкового комплекса пентамера родопсина KR2, его активный центр может принимать несколько конформаций, изображенных на рисунке 42, что подтверждает структурную гетерогенность активного центра KR2 в основном электронном состоянии. При этом наиболее энергетически выгодным конформером является конформер I, в котором

ретиаль скручен сильнее всего за счет наличия сильной водородной связи между РПШО и его противоионом. Именно этот конформер, как показано далее, наиболее эффективно из всех обнаруженных конформеров способствует реакции фотоизомеризации РПШО вокруг связи  $C_{13}=C_{14}$ . Важно отметить, в разделе 3.3 данной работы сравнение фотофизических свойств родопсина KR2 и зрительного родопсина было проведено с использованием конформера I родопсина KR2.



**Рисунок 41.** Пентамерная форма KR2 внутри липидного бислоя и поверхность энергии Гиббса, полученная методом *metaMD*. Показаны вид сбоку (А) и вид сверху (Б) модельной системы, полученной из самой последней рентгеновской структуры KR2 в пентамерной форме при pH 8,0 (PDB ID 6YC3 [52]). Молекулы воды опущены для удобства визуализации в (Б). Конфигурационное пространство исследовалось по двум координатам  $R$  и  $\theta$ , изображенным на (Б). Также показана поверхность энергии Гиббса, полученная методом *metaMD* (Г). На данной поверхности буквами А, В, С обозначены области минимумов энергии Гиббса, которые соотносятся с конформером I, конформером II и конформером III, соответственно.



*Рисунок 42. Различные конформации активного центра KR2 в пентамерной форме в липидно-белковом комплексе, полученные с использованием молекулярной метадинамики. Структуры, которые соответствуют трем бассейнам энергии Гиббса (областям минимума), относятся к аналогам конформера I (А), конформера II (Б) и конформера III (В), отличающихся положением противоиона Asp116 по отношению к РПШО. Все расстояния показаны в Å. Белым выделен угол вращения вокруг связи C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>.*

### 3.4.3 Расчет энергий вертикальных переходов и исследование электронно-колебательных спектров конформеров родопсина KR2

Рассчитанные на уровне теории XMCQDPT2/(aug)-cc-pVDZ//EFP энергии вертикальных переходов (VEE) РПШО в различных конформациях активного центра родопсина KR2 и в газовой фазе составляют ~460 и ~560 нм, соответственно. Несмотря на структурные различия, РПШО в разных конформерах KR2 имеет схожее поглощение, и, следовательно, эти конформеры являются спектроскопически неразличимыми. Расчеты с использованием другого базисного набора на уровне теории XMCQDPT2/(aug)-cc-pVTZ//EFP приводят к тому, что VEE в случае конформера I смещается в красную область спектра и составляет 470 нм. Значение VEE для РПШО в газовой фазе также претерпевает аналогичный красный сдвиг. Такой красный сдвиг значения VEE для РПШО в белке и в газовой фазе при увеличении базисного набора находится в соответствии с экспериментальными значениями максимумов поглощения в белке (528 нм) [48] и в газовой фазе (600 нм) [109]. Стоит отметить, что расчеты с использованием методов MRMP2 [151] и MCQDPT2 [152] также дают схожие VEE, составляющие 500 нм и 530 нм, соответственно, для всех структур. Эти значения близки к экспериментальному максимуму поглощения и аналогичны значениям, полученным ранее на уровне теории CASPT2//SA(3)-CASSCF(12,12) /6-31G \*/AMBER (518 нм) [97] и RVS-ADC(2)/def2-TZVP/CHARMM (526 нм) [58] для структуры KR2 типа конформера I. Однако следует соблюдать осторожность при применении многоэференсных MR-PT2 подходов с одномерным модельным пространством, таких как CASPT2 и MRMP2, а также неинвариантной многоконфигурационной теории возмущений MCQDPT2, поскольку данные методы требуют применений волновых функций нулевого приближения, хорошо описанных на уровне CASSCF. Правильное смешивание нескольких референсных состояний на уровне теории XMCQDPT2 даже за счет несколько больших систематических отклонений абсолютных значений VEE является важным для надежных вычислений градиента возбужденного состояния.

Рассчитанные на уровнях теории MRMP2, MCQDPT2 и XMCQDPT2 энергии вертикальных переходов представлены в таблице 6.

*Таблица 6. Рассчитанные на уровне теории MRMP2, MCQDPT2 и XMCQDPT2 энергии вертикальных переходов (нм) для конформеров I, II, III, полученных на основе структуры с PDB ID 6REW, и для конформера IV, полученного на основе структуры с PDB ID 3X3C. Волновые функции нулевого приближения получены на уровне теории SA-CASSCF с использованием базисного набора (aug)-cc-pVDZ. Модельное пространство метода XMCQDPT2 состояло из 7 состояний SA(3)-CASCI и 15 состояний SA(15)-CASCI, модельное пространство метода MCQDPT2 состояло из 15 состояний SA(3)-CASCI и 15 состояний SA(15)-CASSCF. Силы осцилляторов рассчитаны с использованием возмущенных SA-CASSCF волновых функций и приведены в квадратных скобках (все  $S_0$ - $S_1$  переходы являются оптически яркими).*

	MRMP2		MCQDPT2		XMCQDPT2	
	SA(3)	SA(15)	SA(3)	SA(15)	SA(3)	SA(15)
конформер I	499	<b>390</b>	528 [1,3]	504 [1,4]	456 [1,2]	466 [1,7]
конформер II	492	524	534 [1,4]	<b>596</b> [1,1]	460 [1,2]	469 [1,7]
конформер III	487	<b>420</b>	530 [1,3]	<b>596</b> [1,0]	450 [1,1]	456 [1,7]
конформер IV	502	536	531 [1,2]	<b>634</b> [1,0]	463 [1,4]	464 [1,9]

Как было сказано выше, результаты MRMP2/SA(3)-CASSCF и MCQDPT2[15]/SA(3)-CASSCF дают VEE ~500 и ~530 нм, соответственно, для всех конформеров родопсина KR2. Эти значения близки к максимуму поглощения, наблюдаемому экспериментально при 528 нм [48].

Подобные результаты были получены ранее с использованием уровня теории CASPT2/SA(3)-CASSCF (12,12)/6-31G \* (518 нм) [97]. Результаты XMCQDPT2/SA(3)-CASSCF, как правило, завышают абсолютное значение VEE. Однако результаты, полученные с использованием большего числа состояний в процедуре усреднения (SA), раскрывают внутренние проблемы методов MRMP2 и MCQDPT2. В таблице 6 выделены сильно отклоняющиеся рассчитанные VEE, что указывает на то, что и MRMP2, и MCQDPT2 начинают показывать неустойчивое поведение в некоторых случаях, когда лежащие в основе состояния нулевого приближения CASSCF получены с использованием несколько иной процедуры. Путем включения большего числа состояний в процедуру SA может быть достигнуто более сбалансированное описание всех состояний, которые входят в модельное пространство и которым разрешено взаимодействовать в рамках эффективного гамильтониана, что позволяет улучшить описание недиагональных элементов эффективного гамильтониана. В то же время диагональные элементы могут быть в некоторой степени ухудшены, и общий конечный результат зависит от двух противоположных факторов в случае, когда модельное пространство состоит из SA(15)-CASSCF референсных состояний, по сравнению с результатами, полученными с использованием SA(3)-CASSCF волновых функций нулевого приближения. В любом случае эти изменения в референсных состояниях не

должны приводить к большим отклонениям в результатах, полученных с помощью MR-PT2 подходов, в частности, в случае MS-MR-PT2 подходов с многомерным модельным пространством. Примечательно, что результаты ХМCQDPT2, действительно, в значительной степени нечувствительны к таким вариациям, что дает довольно стабильное решение для всех конформеров KR2. Более того, большее количество состояний, включенных в процедуру SA, приводит к систематическому красному смещению. Систематическое красное смещение также наблюдается при использовании большего базиса: метод ХМCQDPT2[7]/SA(3)-CASSCF(12,12)/(aug)-cc-pVTZ дает VEE 470 нм в случае конформера I. Типичное решение, которое можно получить на уровнях теории SA(3)-CASSCF (референсные состояния CASSCF) и ХМCQDPT2[7]/SA(3)-CASSCF (возмущенные состояния CASSCF, полученные после диагонализации эффективного гамильтониана), показано в таблице 7; а соответствующие собственные векторы эффективного гамильтониана ХМCQDPT2[7]/SA(3)-CASSCF представлены в таблице 8. В таблице 7 выделены ведущие конфигурационные функции состояния (КФС) в основном состоянии (КФС номер 1) и в целевом (оптически ярком) возбужденном состоянии (КФС номер 2). На уровне теории ХМCQDPT2[7]/SA(3)-CASSCF(12,12)/(aug)-cc-pVDZ было установлено, что яркое состояние коррелирует с одноэлектронным (homo-lumo) возбуждением, и его сила осциллятора равна 1,2. Второе возбужденное состояние на уровне теории ХМCQDPT2 ( $S_2$ ), которое было первым возбужденным состоянием ( $S_1$ ) на уровне CASSCF, имеет большой вклад от двухэлектронного возбуждения (таблица 7). Переход в это состояние имеет низкую силу осциллятора 0,2. Нужно обратить внимание, что порядок состояний неверен на уровне CASSCF, и целевое яркое состояние на уровне CASSCF соответствует третьему состоянию  $S_2$ . После возмущения методом ХМCQDPT2 порядок состояний изменяется, и состояние  $S_1$  становится целевым состоянием (таблица 7). Это также можно увидеть, проанализировав собственные векторы эффективного гамильтониана: третье референсное состояние CASSCF имеет наибольший вклад в возмущенное состояние  $S_1$  (таблица 8).

Неправильный порядок состояний на уровне CASSCF задает минимальное количество состояний SA-CASSCF, которые должны быть включены в процедуру SA и затем будут использованы для задания модельного пространства ХМCQDPT2. Затем происходит проверка возможного смешивания целевого состояния с более высоколежащими состояниями с помощью использования эффективного Гамильтониана

большой размерности. Как видно из таблицы 8 на уровне теории XMCQDPT2[7]/SA(3)-CASSCF нет значительных вкладов от более высоколежащих состояний в основное и целевое состояния. В то же время, более сильное взаимодействие низколежащих состояний, а также примесь более высоколежащего состояния к состоянию  $S_1$  наблюдается на уровне теории MCQDPT2[15]/SA(3)-CASSCF (таблица 9). В принципе, большее взаимодействие состояний ожидается на уровне теории MCQDPT2, поскольку она имеет тенденцию переоценивать недиагональные элементы [153].

Когда все 15 состояний включены в процедуру SA, решение CASSCF изменяется в КМ/ММ оптимизированной геометрии для некоторых структур (конформера I и конформера III), так что два корня SA(15)-CASSCF ( $S_2$  и  $S_3$ ) становятся случайно вырожденными (разность энергий меньше 0,05 эВ). Это приводит к сильному смешиванию этих состояний с точки зрения их разложения через КФС (таблица 7). Важно отметить, что целевое состояние распределено по двум состояниям (соответствующая ведущая КФС (№ 2) становится доминирующей в состояниях  $S_2$  и  $S_3$ ). Такие случайные вырождения нельзя адекватно описывать с помощью методов MR-PT2 с одномерным модельным пространством, что существенно объясняет смещенные в коротковолновую область значения VEE, полученные на уровне теории MRMP2 (таблица б). Расчет на уровне теории XMCQDPT2[15]/SA(15)-CASSCF устраняет недостаток MRMP2, давая стабильное решение, как и ожидалось. В то же время, качество описания на уровне теории MCQDPT2[15]/SA(15)-CASSCF сильно ухудшается, поскольку чем сильнее смешивание референсных состояний CASSCF, которые имеют общий набор ведущих КФС, тем больше недиагональные элементы эффективного гамильтониана MCQDPT2 между этими состояниями. Проблема искусственно больших недиагональных элементов, возникающих в инвариантной форме MS-MR-PT2 (относительно унитарных преобразований референсных волновых функций CASSCF, образующих модельное пространство), таких как как MCQDPT2, довольно хорошо описана [153]. В целом, большее количество референсных состояний CASSCF, включенных в процедуру SA, улучшает результаты XMCQDPT2 и ухудшает результаты MCQDPT2, поскольку большее количество состояний смешивается с точки зрения КФС на уровне SA(15)-CASSCF.

**Таблица 7. Разложения низшего по энергии референсного и возмущенных SA-CASSCF состояний по конфигурационным функциям состояния (КФС), полученных в конформере I.**

Состояния	№ КФС	КФС	Коэффициенты	
			SA(3)-CASSCF	SA(15)-CASSCF
Референсные состояния CASSCF				
<b>S0</b>	1	222222000000	0,8279	0,7897
	2	222221100000	0,2071	-0,3004
<b>S1</b>	8	222220200000	0,5179	0,4628
	3	222221010000	0,3276	0,2609
	29	222212100000	0,3162	0,2434
	2	222221100000	0,2226	-0,2159
<b>S2</b>	2	222221100000	-0,7447	0,4531
	1	222222000000	0,2901	0,2593
	29	222212100000	0,2774	0,3396
<b>S3</b>	2	222221100000		-0,4698
	337	222122100000		-0,3031
	1	222222000000		-0,2804
	35	222211200000		-0,2714
XMCQDPT2: возмущенные состояния CASSCF				
<b>S0</b>	1	222222000000	0,8434	0,8394
	2	222221100000	0,161	-0,2014
<b>S1</b>	2	222221100000	0,7656	0,7521
	8	222220200000	0,2473	-0,2948
	1	222222000000	-0,2231	0,2797
<b>S2</b>	8	222220200000	0,4507	0,4155
	29	222212100000	-0,4243	0,504
	3	222221010000	-0,2766	0,3126
<b>S3</b>	29	222212100000		0,4885
	3	222221010000		-0,4638
	35	222211200000		-0,3223
	2	222221100000		-0,1908
MCQDPT2: возмущенные состояния CASSCF				
<b>S0</b>	1	222222000000	0,8783	-0,8607
	2	222221100000	-0,1696	-0,2586
<b>S1</b>	2	222221100000	-0,6411	-0,702
	8	222220200000	-0,3482	0,3324
	1	222222000000	-0,1275	0,2166
<b>S2</b>	8	222220200000	-0,3478	0,4393
	29	222212100000	-0,2981	0,4758
	3	222221010000	-0,4997	0,3685
	2	222221100000	0,4662	0,2973
<b>S3</b>	29	222212100000		0,493
	3	222221010000		-0,5079
	35	222211200000		-0,1483
	2	222221100000		0,1127

**Таблица 8. Собственные векторы  $S_0$  и  $S_1$  эффективного гамильтониана  $XMCQDPT2$ , полученные в КМ/ММ оптимизированном конформере I.**

	XMCQDPT2[7]/SA(3)-CASSCF		XMCQDPT2[15]/SA(15)-CASSCF	
	$S_0$	$S_1$	$S_0$	$S_1$
1	<b>-0,998248</b>	-0,057233	<b>-0,990088</b>	0,12403
2	-0,019218	<b>0,514581</b>	-0,026256	<b>-0,388228</b>
3	-0,054808	<b>0,853374</b>	0,077066	<b>0,644464</b>
4	0,00737	0,000494	0,090354	<b>0,630519</b>
5	0,003873	-0,041574	0,000484	0,017247
6	-0,000591	0,019239	0,009802	0,019874
7	-0,007616	0,039819	-0,000297	0,004568
8	-	-	0,012372	0,03361
9	-	-	-0,017872	-0,11337
10	-	-	0,004306	-0,015577
11	-	-	-0,022925	-0,071689
12	-	-	-0,005915	-0,002448
13	-	-	0,054318	0,02803
14	-	-	-0,001543	-0,009489
15	-	-	-0,028859	-0,006911

**Таблица 9. Собственные векторы  $S_0$  и  $S_1$  эффективного гамильтониана  $MCQDPT2$ , полученные в КМ/ММ оптимизированном конформере I.**

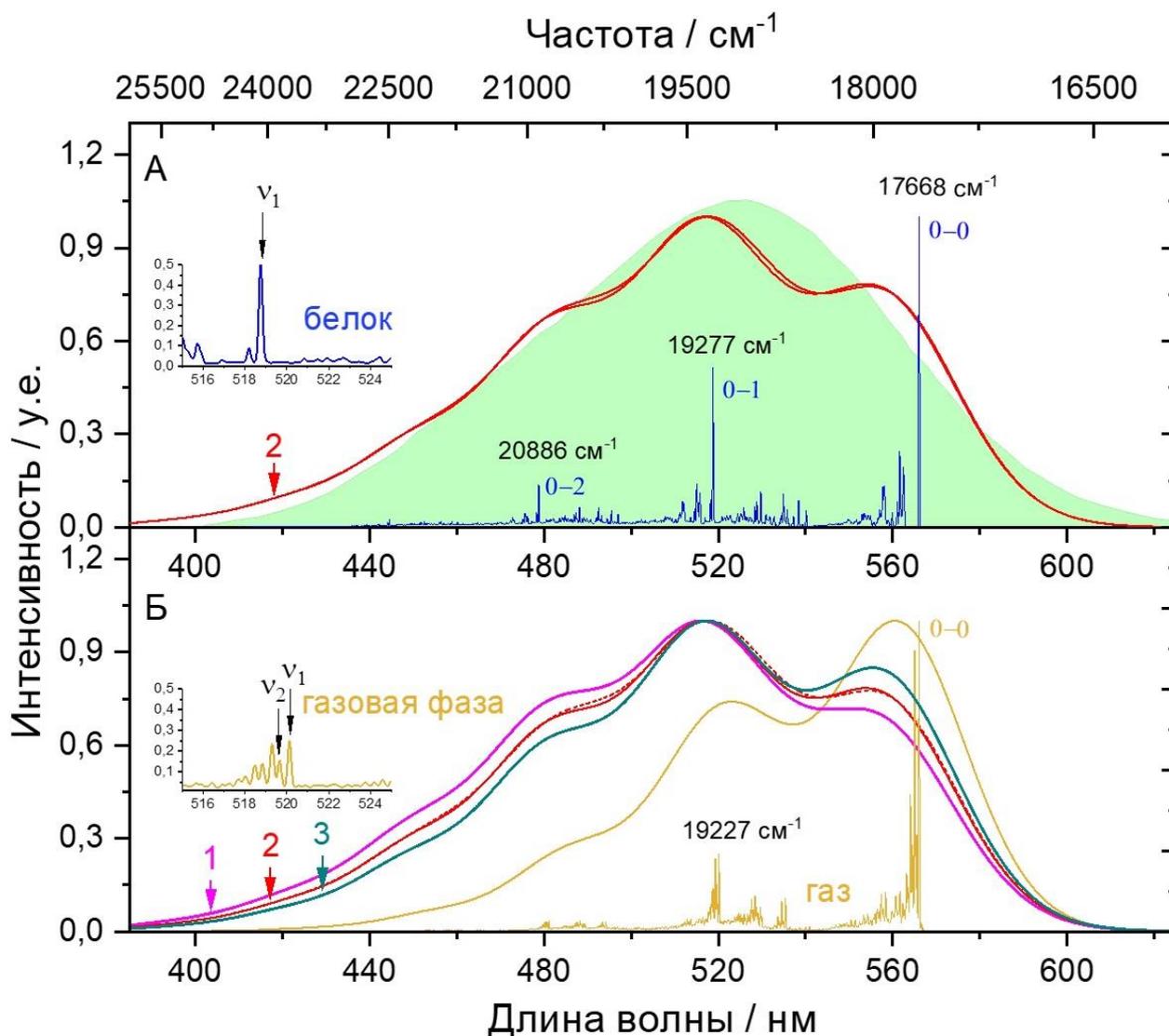
	MCQDPT2[15]/SA(3)-CASSCF		MCQDPT2[15]/SA(15)-CASSCF	
	$S_0$	$S_1$	$S_0$	$S_1$
1	<b>0,892320</b>	<b>-0,356004</b>	<b>-0,750335</b>	<b>0,536101</b>
2	-0,164573	<b>-0,631353</b>	0,175381	<b>0,461048</b>
3	<b>0,399353</b>	<b>0,430014</b>	<b>-0,425626</b>	<b>-0,264725</b>
4	0,021621	0,131754	<b>0,441412</b>	<b>0,362968</b>
5	-0,018792	-0,035426	0,011321	0,012648
6	0,003959	0,101781	-0,024756	0,03114
7	-0,028619	-0,118828	-0,000512	-0,014936
8	-0,087383	<b>-0,422883</b>	-0,0521	<b>-0,224658</b>
9	-0,015723	-0,091681	-0,090988	<b>-0,444241</b>
10	0,008745	-0,02167	0,008125	0,108198
11	-0,035256	-0,188669	0,059841	0,154029
12	0,06782	-0,147289	-0,008479	-0,013609
13	0,013059	0,025671	0,1063	-0,091185
14	0,014347	0,022724	-0,000791	0,040059
15	0,036928	-0,021883	-0,059014	0,059116

Таким образом, предложенная схема расчета методом КМ/ММ может быть подтверждена расчетами VEE на уровнях теории MRMP2 и MCQDPT2, когда состояния нулевого приближения могут быть хорошо описаны на уровне теории CASSCF. Например, значения, рассчитанные на уровнях теории MRMP2 /SA(3)-CASSCF (12,12) и MRMP2/SA(15)-CASSCF (12,12), составляют 502 и 536 нм соответственно для конформера I. Эти значения близки к значениям, полученным ранее на аналогичном

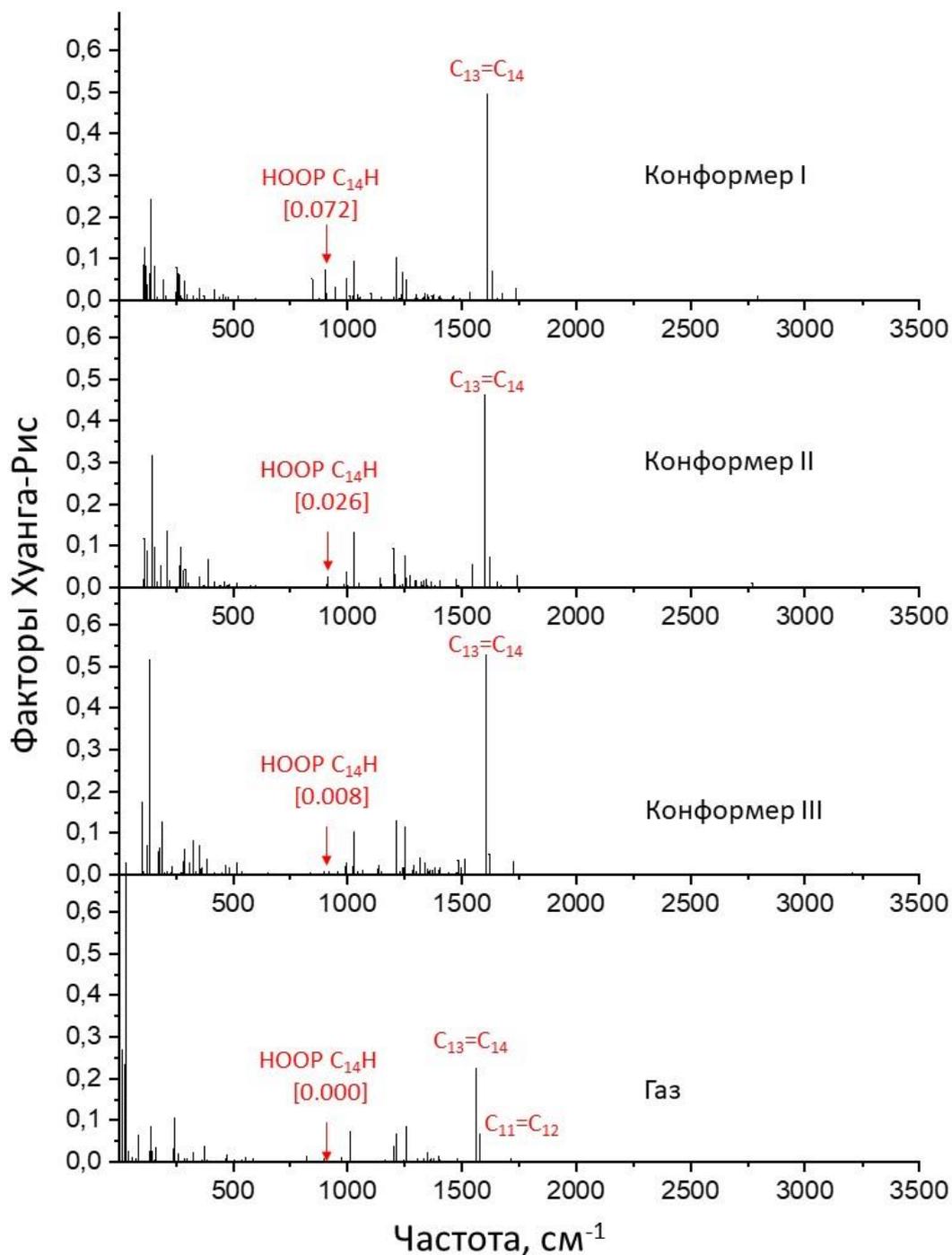
уровне теории (CASPT2 /SA (3)-CASSCF (12,12) / 6-31G \*) для структуры, аналогичной конформеру I (518 нм) [97]. Однако качество расчетов с использованием этих методов, а также всех MR-PT2 методов с одномерным модельным пространством и их неинвариантных модификаций с многомерным модельным пространством, может значительно ухудшиться, когда волновые функции нулевого состояния становятся случайно вырожденными и смешанными через разложение по КФС. Такое случайное вырождение может возникнуть из-за изменений геометрии структуры. Достижение правильного смешивания нескольких референсных состояний при попытке улучшить описание системы методом MS-MR-PT2 на уровне теории XMCQDPT2 даже за счет несколько больших систематических отклонений абсолютных значений VEE является важным для надежных расчетов градиента возбужденного состояния методом КМ/ММ для всех конформаций KR2, рассмотренных в настоящем исследовании.

Рассчитанные спектры фотопоглощения РПШО в белке и в газовой фазе показаны на рисунке 43. Частоты рассматриваются без поправок, расчет происходит без учета ангармонизма мягких мод большой амплитуды, таких как вращение  $\beta$ -иононового кольца РПШО в газовой фазе, поскольку эти мягкие моды неактивны в первичной фотореакции. Рассчитанные формы вибронных полос полностью покрывают полную ширину экспериментального спектра фотопоглощения РПШО в белке (рисунок 43, А). Основной вклад в ширину вносят высокочастотные моды, в частности, активные моды валентного C = C колебания на  $\sim 1600 \text{ см}^{-1}$  (таблица 5), тогда как моды с низкими частотами просто способствуют спектральному размытию.

Важно, что белковое окружение изменяет как интенсивность, так и количество высокочастотных активных мод Франка-Кондона по сравнению с модами, возбуждаемыми в газовой фазе (рисунок 43, Б). В газовой фазе при переходе  $S_0$ - $S_1$  наиболее активны две моды валентного колебания C=C, преимущественно локализованные на связях C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> / C<sub>9</sub>=C<sub>10</sub> и C<sub>11</sub>=C<sub>12</sub> с немасштабированными частотами 1559 и 1577  $\text{см}^{-1}$ , хотя и с низкой общей интенсивностью. В белке первая мода становится доминирующей, и ее интенсивность значительно возрастает (рисунок 43, А). Из анализа факторов Хуанга-Рис (рисунок 44) следует, что наиболее активной модой в конформерах KR2 является высокочастотное валентное C = C колебание, локализованное на двойной связи C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> (таблица 5), которое способствует изомеризации из полностью-*транс* в 13-*цис*-РПШО.



**Рисунок 43.** Спектры фотопоглощения РПШО, рассчитанные при 300 К и свернутые с помощью функции Гаусса с полушириной на полувысоте (НWHM) 471  $\text{см}^{-1}$ , в различных конформациях активного центра KR2: 1- конформер III (пурпурный), 2 – конформер I (красная пунктирная линия) и конформер II (красная сплошная линия), 3 - конформер IV (циановый). Показано сравнение с экспериментальным спектром поглощения KR2 [48] (заштриховано зеленым) (А) и расчетным спектром в газовой фазе при 300 К (оранжевый), сдвинутым на 0,48 эВ в сторону более коротких волн, чтобы соответствовать переходу 0-0 в белке (Б). Также представлены линейчатые спектры конформера I (синий) и изолированного полностью-транс РПШО (оранжевый), рассчитанные при 10 К и свернутые с помощью функции Гаусса с НWHM 4  $\text{см}^{-1}$ . На вставках показана увеличенная область валентных колебаний C = C, рассчитанная при 10 К.  $\nu_1$  и  $\nu_2$  обозначают активные моды валентного колебания C = C, которые преимущественно локализованы на связях  $C_{13}=C_{14}$  /  $C_9=C_{10}$  и  $C_{11}=C_{12}$ , соответственно.



**Рисунок 44.** Активные моды Франка-Кондона, возбуждающиеся при переходе  $S_0$ - $S_1$  в полностью-транс РПШО в различных конформациях активного центра KR2 и в газовой фазе. Показаны факторы Хуанга-Рис. Красные стрелки обозначают HOOP моды с соответствующими факторами Хуанга-Рис, указанными в квадратных скобках.

Валентное колебание C = C при  $\sim 1600$   $\text{см}^{-1}$  (масштабированная частота  $\sim 1530$   $\text{см}^{-1}$ ) активно во всех конформациях активного центра KR2, тем самым определяя схожие профили поглощения для различных конформеров белка KR2. Однако сама мода

отличается в различных окружениях и изменяется при нарушении симметрии от симметричного валентного колебания, делокализованного вдоль полиеновой цепи с наибольшими амплитудами на двойных связях  $C_9=C_{10}$  и  $C_{13}=C_{14}$ , до более локализованного колебания на одной связи. Локализация колебаний данной моды на связи  $C_{13}=C_{14}$  возрастает с увеличением скрученности РПШО вокруг этой связи при переходе от конформера III к конформеру I. Важно отметить, что НООР мода, которая связана с колебаниями атома Н у атома  $C_{14}$ , полностью неактивна в газовой фазе и малоактивна в конформере III белка KR2. Интенсивность данной НООР моды также возрастает при переходе от конформера III к конформеру I (таблица 5 и рисунок 44).

Таким образом, можно заключить, что разные конформации РПШО в активном центре KR2 изменяют колебательные моды, которые активны при переходе  $S_0-S_1$ . Более того, моды Франка-Кондона, которые становятся активными при фотовозбуждении в конформере I белка KR2, являются именно теми модами, которые также активны в первичной фотореакции.

Анализ формы вибронных полос дает представление о ранней фотоиндуцированной динамике РПШО в состоянии  $S_1$ . Локализованные валентные колебания по связи  $C_{13} = C_{14}$  и  $C_{14}H$  НООР колебания возбуждаются, когда между протонированным основанием Шиффа и его первичным противоионом образуется сильная водородная связь. Это обстоятельство может изменить специфичность и временной диапазон реакции фотоизомеризации РПШО, поскольку высота барьера в  $S_1$ , который управляет динамикой реакции, мала. Так, как было показано в разделе 3.1, время жизни возбужденного состояния при барьере всего в 0,037 эВ составляет 4 пс при комнатной температуре и 92 пс при 100 К [77]. Таким образом, белок может легко способствовать фотоизомеризации, изменяя нативную конформацию полностью-*транс* РПШО посредством предварительного скручивая полиеновой цепи в основном состоянии, тем самым уменьшая высоту барьера в  $S_1$  и значительно сокращая время фотоизомеризации. Наши результаты свидетельствуют о том, что такое предварительное скручивание действительно существует в белке KR2, что приводит к возбуждению колебательных мод, особенно важных для специфической изомеризации вокруг двойной связи  $C_{13} = C_{14}$ .

В то же время, медленная компонента с временем жизни 3 пс, обнаруженная в KR2 [54], похожа на составляющую, обнаруженную экспериментально в газовой фазе для изолированного плоского полностью *транс*-РПШО [77]. Рассчитанное время жизни для полностью-*транс* РПШО составляет 4 пс. Это значение согласуется с медленной компонентой с временем жизни 3 пс, наблюдаемой в KR2 [54]. Таким образом, полностью-*транс* хромофор является медленным и, скорее всего, не используется в фотоцикле белка. Конформеры II и III из-за отсутствия сильной водородной связи между РПШО и его противоионом содержат РПШО, который скручен слабее и более близок к планарной конформации, чем РПШО в конформере I. Поэтому данные конформеры могут быть ответственны за возникновение медленных нереакционноспособных компонент в фотодинамике родопсина KR2.

#### 3.4.4 Заключение

В данном разделе проведенные расчеты продемонстрировали высокую конформационную подвижность как мономерной формы белка KR2 в водном растворе, так и пентамерной формы белка в липидном бислое. Анализ формы вибронных полос РПШО в различных конформерах белка KR2, отличающихся структурой активного центра и конформацией РПШО, дал представление о динамике возбужденного состояния РПШО на ранних временах и выявил взаимосвязь между структурой активного центра и активными колебательными модами Франка-Кондона. Показано, что образование сильной водородной связи между РПШО и его противоионом в конформере I приводит к предварительному, еще до фотореакции, скручиванию РПШО в основном состоянии, что способствует возбуждению высокочастотной валентной C=C колебательной моды и НООР колебательной моды при определенной двойной связи. Именно эти колебательные моды особенно важны для специфической фотоизомеризации РПШО в KR2. При этом обнаружено, что НООР колебание выражено тем слабее, чем сильнее РПШО близок к нативному планарному состоянию, что наблюдается в конформерах II и III, когда отсутствует сильная водородная связь между РПШО и противоионом и скрученность ретиналя уменьшается по сравнению с конформером I.

Таким образом, наличие конформеров II и III обуславливает структурную гетерогенность родопсина KR2 в основном состоянии и может объяснить происхождение нереакционноспособных состояний, не ведущих к фотоизомеризации.

Важно отметить, что нереакционноспособные компоненты в фотодинамике

родопсина KR2, зафиксированные в эксперименте по фемтосекундной спектроскопии, являются минорными, неосновными. Основная компонента соответствует реакционноспособному состоянию. Эти наблюдения согласуются с результатами проведенного в данном разделе моделирования родопсина KR2 при помощи метадинамики. Полученные результаты свидетельствуют о том, что конформер I является доминирующим и энергетически наиболее выгодным по сравнению с конформерами II и III.

## Основные результаты и выводы

---

1. Исследованы механизмы безызлучательной релаксации и получены оценки средних времен жизни в возбужденном состоянии изомеров РПШО в газовой фазе. Показано, что динамика релаксации первого электронно-возбужденного состояния 11-*цис* изомера РПШО сопоставима с характеристическими временами фотоизомеризации в белках зрительной рецепции, тогда как специфичность реакции и средние времена жизни в возбужденном состоянии полностью-*транс* изомера РПШО значительно различаются в изолированном состоянии и белковом окружении микробиальных родопсинов.

2. Предложены пути управления сверхбыстрой фотоиндуцированной динамикой изолированных РПШО с помощью химических модификаций структуры хромофора. На основе хромофорной группы ретиналь-содержащих белков с заблокированным внутримолекулярным вращением по центральной двойной связи показано, что среднее время жизни возбужденного состояния может быть на порядок снижено вследствие возникновения стерических взаимодействий и значительного снижения энергетического барьера безызлучательной релаксации.

3. Установлено, что белковое окружение за счет скручивания полиеновой цепи РПШО приводит к селективному возбуждению определенных колебательных мод хромофора уже на ранних этапах фотоиндуцированной динамики, что способствует сверхбыстрому протеканию и обеспечивает специфичность реакции фотоизомеризации в родопсинах первого и второго типов. Показано, что наличие водородной связи между РПШО и его противоионом является определяющим структурным фактором для сверхбыстрого протекания первичной фотохимической реакции в родопсинах обоих типов.

4. Установлена взаимосвязь между структурой активного центра микробиального родопсина KR2 и фотоиндуцированной динамикой его хромофорной группы на ранних временах. Обнаруженная структурная гетерогенность данного белка позволяет объяснить природу его реакционноспособных и нереакционноспособных форм.

## Список сокращений

---

Бато – батородопсин

БР – бактериородопсин

ДМ-РПШО – модифицированное РПШО, содержащее две метильных группы при атоме азота.

ЗР – зрительный родопсин

Л-РПШО - модифицированное РПШО, содержащее алифатическую углеродную группу, которая препятствует вращению вокруг связи  $C_{11}=C_{12}$ .

КМ/ММ – комбинированный метод квантовой механики /молекулярной механики

КФС – конфигурационные функции состояния

ППЭ – поверхность потенциальной энергии

РПШО – протонированное основание Шиффа ретиналя

AIMS – Ab Initio Multiple Spawning (AIMS) Dynamics - метод *ab initio* ядерной динамики

VLA – альтернирование длин связей

DFT – теория функционала электронной плотности

CASSCF – Complete Active Space Self-Consistent Field – многоконфигурационный метод самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей

CASPT2 – Complete Active Space with Second-order Perturbation Theory - многореференсная теория возмущений второго порядка в полном пространстве активных орбиталей

CI – коническое пересечение

CV – коллективная переменная

EFP – метод потенциалов эффективных фрагментов

FC – точка Франка-Кондона

FS - флюоресцентное состояние

FTIR - инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

IR - инфракрасная спектроскопия

KR2 – микробальный родопсин KR2

K<sub>KR2</sub> – первичный K интермедиат родопсина KR2

K<sub>BR</sub> – первичный K интермедиат бактериородопсина

MECI – коническое пересечение с минимальной энергией

MetaMD – молекулярная метадинамика

MP – теория возмущений Меллера-Плессета

MR-PT2 – многоференсные методы теории возмущений

S<sub>0</sub>– основное электронное состояние системы

S<sub>1</sub> – первое возбужденное электронное состояние

S<sub>2</sub> – второе возбужденное электронное состояние

SA – процедура усреднения по состояниям

VEE – энергия вертикального перехода

XMCQDPT2 - extended multiconfiguration quasidegenerate perturbation theory-

расширенная многоконфигурационная квазивырожденная теория возмущений второго порядка

## Список литературы

---

1. *Ernst O.P., Lodowski D.T., Elstner M., Hegemann P., Brown L.S., Kandori H.* Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms // *Chem. Rev.* — 2014. — Vol. 114, № 1. — P. 126–163.
2. *Spudich J.L., Yang C.-S., Jung K.-H., Spudich E.N.* Retinylidene Proteins: Structures and Functions from Archaea to Humans // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* — 2000. — Vol. 16, № 1. — P. 365–392.
3. *Govorunova E.G., Sineshchekov O.A., Li H., Spudich J.L.* Microbial Rhodopsins: Diversity, Mechanisms, and Optogenetic Applications // *Annu. Rev. Biochem.* — 2017. — Vol. 86, № 1. — P. 845–872.
4. *Sharma A.K., Spudich J.L., Doolittle W.F.* Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility // *Trends Microbiol.* — 2006. — Vol. 14, № 11. — P. 463–469.
5. *Rozenberg A., Inoue K., Kandori H., Bèjà O.* Microbial Rhodopsins: The Last Two Decades // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2021. — Vol. 75, № 1. — P. 427–447.
6. *Grote M., Engelhard M., Hegemann P.* Of ion pumps, sensors and channels — Perspectives on microbial rhodopsins between science and history // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* — 2014. — Vol. 1837, № 5. — P. 533–545.
7. *Spudich J.L., Bogomolni R.A.* Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin // *Nature.* — 1984. — Vol. 312, № 5994. — P. 509–513.
8. *Jung K.-H., Trivedi V.D., Spudich J.L.* Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria // *Mol. Microbiol.* — 2003. — Vol. 47, № 6. — P. 1513–1522.
9. *Bèjà O., Lanyi J.K.* Nature's toolkit for microbial rhodopsin ion pumps // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2014. — Vol. 111, № 18. — P. 6538–6539.
10. *Govorunova E.G., Sineshchekov O.A., Janz R., Liu X., Spudich J.L.* Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics // *Science.* — 2015. — Vol. 349, № 6248. — P. 647–650.
11. *Ridge K.D., Palczewski K.* Visual Rhodopsin Sees the Light: Structure and Mechanism of G Protein Signaling // *J. Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 282, № 13. — P. 9297–9301.
12. *Koyanagi M., Terakita A.* Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* — 2014. — Vol. 1837, № 5. — P. 710–716.
13. *Ni J.D., Baik L.S., Holmes T.C., Montell C.* A rhodopsin in the brain functions in circadian

- photoentrainment in *Drosophila* // *Nature*. — 2017. — Vol. 545, № 7654. — P. 340–344.
14. *Senthilan P.R., Grebler R., Reinhard N., Rieger D., Helfrich-Förster C.* Role of Rhodopsins as Circadian Photoreceptors in the *Drosophila melanogaster* // *Biology (Basel)*. — 2019. — Vol. 8, № 1. — P. 6.
  15. *Soppa J.* Two hypotheses - one answer // *FEBS Lett.* — 1994. — Vol. 342, № 1. — P. 7–11.
  16. *Kandori H.* Retinal Binding Proteins // *cis - trans Isomerization in Biochemistry*. — Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. — P. 53–75.
  17. *Kandori H., Shichida Y., Yoshizawa T.* Photoisomerization in Rhodopsin // *Biochem.* — 2001. — Vol. 66, № 11. — P. 1197–1209.
  18. *Kandori H.* Ion-pumping microbial rhodopsins // *Front. Mol. Biosci.* — 2015. — Vol. 2. — P. 52.
  19. *Oesterhelt D., Stoeckenius W.* Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of *Halobacterium halobium* // *Nat. New Biol.* — 1971. — Vol. 233, № 39. — P. 149–152.
  20. *Yamashita H., Inoue K., Shibata M., Uchihashi T., Sasaki J., Kandori H., Ando T.* Role of trimer–trimer interaction of bacteriorhodopsin studied by optical spectroscopy and high-speed atomic force microscopy // *J. Struct. Biol.* — 2013. — Vol. 184, № 1. — P. 2–11.
  21. *Oesterhelt D.* Bacteriorhodopsin as an Example of a Light-Driven Proton Pump // *Angew. Chemie Int. Ed. English*. — 1976. — Vol. 15, № 1. — P. 17–24.
  22. *Khorana H.G., Gerber G.E., Herlihy W.C., Gray C.P., Anderegg R.J., Nihei K., Biemann K.* Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1979. — Vol. 76, № 10. — P. 5046–5050.
  23. *DiBartolo N.D., Booth P.J.* 3.13 The Membrane Factor: Biophysical Studies of Alpha Helical Transmembrane Protein Folding // *Comprehensive Biophysics*. — Elsevier, 2012. — P. 290–316.
  24. *Luecke H., Schobert B., Richter H.-T., Cartailler J.-P., Lanyi J.K.* Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution // *J. Mol. Biol.* — 1999. — Vol. 291, № 4. — P. 899–911.
  25. *Schobert B., Cupp-Vickery J., Hornak V., Smith S.O., Lanyi J.K.* Crystallographic Structure of the K Intermediate of Bacteriorhodopsin: Conservation of Free Energy after Photoisomerization of the Retinal // *J. Mol. Biol.* — 2002. — Vol. 321, № 4. — P. 715–726.

26. *Terentis A.C., Ujj L., Abramczyk H., Atkinson G.H.* Primary events in the bacteriorhodopsin photocycle: Torsional vibrational dephasing in the first excited electronic state // *Chem. Phys.* — 2005. — Vol. 313, № 1–3. — P. 51–62.
27. *Mak-Jurkauskas M.L., Bajaj V.S., Hornstein M.K., Belenky M., Griffin R.G., Herzfeld J.* Energy transformations early in the bacteriorhodopsin photocycle revealed by DNP-enhanced solid-state NMR // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2008. — Vol. 105, № 3. — P. 883–888.
28. *Lanyi J.K.* Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* — 2006. — Vol. 1757, № 8. — P. 1012–1018.
29. *Zimányi L., Lanyi J.K.* Deriving the intermediate spectra and photocycle kinetics from time-resolved difference spectra of bacteriorhodopsin. The simpler case of the recombinant D96N protein // *Biophys. J.* — 1993. — Vol. 64, № 1. — P. 240–251.
30. *Shichida Y., Matuoka S., Hidaka Y., Yoshizawa T.* Absorption spectra of intermediates of bacteriorhodopsin measured by laser photolysis at room temperatures // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* — 1983. — Vol. 723, № 2. — P. 240–246.
31. *Feldman T.B., Smitienko O.A., Shelaev I. V., Gostev F.E., Nekrasova O. V., Dolgikh D.A., Nadtochenko V.A., Kirpichnikov M.P., Ostrovsky M.A.* Femtosecond spectroscopic study of photochromic reactions of bacteriorhodopsin and visual rhodopsin // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* — 2016. — Vol. 164. — P. 296–305.
32. *Lórenz-Fonfría V.A., Kandori H., Padrós E.* Probing Specific Molecular Processes and Intermediates by Time-Resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Application to the Bacteriorhodopsin Photocycle // *J. Phys. Chem. B.* — 2011. — Vol. 115, № 24. — P. 7972–7985.
33. *Efremov R., Gordeliy V.I., Heberle J., Büldt G.* Time-Resolved Microspectroscopy on a Single Crystal of Bacteriorhodopsin Reveals Lattice-Induced Differences in the Photocycle Kinetics // *Biophys. J.* — 2006. — Vol. 91, № 4. — P. 1441–1451.
34. *Chen W.-G., Braiman M.S.* Kinetic analysis of time-resolved infrared difference spectra of the L and M intermediates of bacteriorhodopsin // *Photochem. Photobiol.* — 1991. — Vol. 54, № 6. — P. 905–910.
35. *Doig S.J., Reid P.J., Mathies R.A.* Picosecond time-resolved resonance Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin's J, K, and KL intermediates // *J. Phys. Chem.* — 1991. — Vol. 95, № 16. — P. 6372–6379.

36. *Campion A., Terner J., El-Sayed M.A.* Time-resolved resonance Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin // *Nature*. — 1977. — Vol. 265, № 5595. — P. 659–661.
37. *Terner J., Hsieh C.-L., Burns A.R., El-Sayed M.A.* Time-resolved resonance Raman spectroscopy of intermediates of bacteriorhodopsin: The bK(590) intermediate // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1979. — Vol. 76, № 7. — P. 3046–3050.
38. *Ashwini R., Vijayanand S., Hemapriya J.* Photonic Potential of Haloarchaeal Pigment Bacteriorhodopsin for Future Electronics: A Review // *Curr. Microbiol.* — 2017. — Vol. 74, № 8. — P. 996–1002.
39. *Wand A., Friedman N., Sheves M., Ruhman S.* Ultrafast Photochemistry of Light-Adapted and Dark-Adapted Bacteriorhodopsin: Effects of the Initial Retinal Configuration // *J. Phys. Chem. B*. — 2012. — Vol. 116, № 35. — P. 10444–10452.
40. *Groma G.I., Colonna A., Martin J.-L., Vos M.H.* Vibrational Motions Associated with Primary Processes in Bacteriorhodopsin Studied by Coherent Infrared Emission Spectroscopy // *Biophys. J.* — 2011. — Vol. 100, № 6. — P. 1578–1586.
41. *Kobayashi T., Saito T., Ohtani H.* Real-time spectroscopy of transition states in bacteriorhodopsin during retinal isomerization // *Nature*. — 2001. — Vol. 414, № 6863. — P. 531–534.
42. *Hayashi S., Tajkhorshid E., Schulten K.* Molecular Dynamics Simulation of Bacteriorhodopsin's Photoisomerization Using Ab Initio Forces for the Excited Chromophore // *Biophys. J.* — 2003. — Vol. 85, № 3. — P. 1440–1449.
43. *Schmidt B., Sobotta C., Heinz B., Laimgruber S., Braun M., Gilch P.* Excited-state dynamics of bacteriorhodopsin probed by broadband femtosecond fluorescence spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* — 2005. — Vol. 1706, № 1–2. — P. 165–173.
44. *Dobler J., Zinth W., Kaiser W., Oesterhelt D.* Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy // *Chem. Phys. Lett.* — 1988. — Vol. 144, № 2. — P. 215–220.
45. *Nagata T., Inoue K.* Rhodopsins at a glance // *J. Cell Sci.* — 2021. — Vol. 134, № 22. — P. jcs258989.
46. *Pushkarev A., Inoue K., Larom S., Flores-Uribe J., Singh M., Konno M., Tomida S., Ito S., Nakamura R., Tsunoda S.P., Philosofo A., Sharon I., Yutin N., Koonin E. V., Kandori H., Béjà O.* A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics // *Nature*. — 2018. — Vol. 558, № 7711. — P. 595–599.

47. *Bulzu P.-A., Andrei A.-Ş., Salcher M.M., Mehrshad M., Inoue K., Kandori H., Beja O., Ghai R., Banciu H.L.* Casting light on Asgardarchaeota metabolism in a sunlit microoxic niche // *Nat. Microbiol.* — 2019. — Vol. 4, № 7. — P. 1129–1137.
48. *Inoue K., Ono H., Abe-Yoshizumi R., Yoshizawa S., Ito H., Kogure K., Kandori H.* A light-driven sodium ion pump in marine bacteria // *Nat. Commun.* — 2013. — Vol. 4, № 1. — P. 1678.
49. *Kovalev K., Polovinkin V., Gushchin I., Alekseev A., Shevchenko V., Borshchevskiy V., Astashkin R., Balandin T., Bratanov D., Vaganova S., Popov A., Chupin V., Büldt G., Bamberg E., Gordeliy V.* Structure and mechanisms of sodium-pumping KR2 rhodopsin // *Sci. Adv.* — 2019. — Vol. 5, № 4. — P. eaav2671.
50. *Gushchin I., Shevchenko V., Polovinkin V., Kovalev K., Alekseev A., Round E., Borshchevskiy V., Balandin T., Popov A., Gensch T., Fahlke C., Bamann C., Willbold D., Büldt G., Bamberg E., Gordeliy V.* Crystal structure of a light-driven sodium pump // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2015. — Vol. 22, № 5. — P. 390–395.
51. *Kato H.E., Inoue K., Abe-Yoshizumi R., Kato Y., Ono H., Konno M., Hososhima S., Ishizuka T., Hoque M.R., Kunitomo H., Ito J., Yoshizawa S., Yamashita K., Takemoto M., Nishizawa T., Taniguchi R., Kogure K., Maturana A.D., Iino Y., et al.* Structural basis for Na<sup>+</sup> transport mechanism by a light-driven Na<sup>+</sup> pump // *Nature.* — 2015. — Vol. 521, № 7550. — P. 48–53.
52. *Kovalev K., Astashkin R., Gushchin I., Orekhov P., Volkov D., Zinovev E., Marin E., Rulev M., Alekseev A., Royant A., Carpentier P., Vaganova S., Zabelskii D., Baeken C., Sergeev I., Balandin T., Bourenkov G., Carpena X., Boer R., et al.* Molecular mechanism of light-driven sodium pumping // *Nat. Commun.* — 2020. — Vol. 11, № 1. — P. 2137.
53. *Hontani Y., Inoue K., Kloz M., Kato Y., Kandori H., Kennis J.T.M.* The photochemistry of sodium ion pump rhodopsin observed by watermarked femto- to submillisecond stimulated Raman spectroscopy // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2016. — Vol. 18, № 35. — P. 24729–24736.
54. *Tahara S., Takeuchi S., Abe-Yoshizumi R., Inoue K., Ohtani H., Kandori H., Tahara T.* Ultrafast Photoreaction Dynamics of a Light-Driven Sodium-Ion-Pumping Retinal Protein from *Krokinobacter eikastus* Revealed by Femtosecond Time-Resolved Absorption Spectroscopy // *J. Phys. Chem. Lett.* — 2015. — Vol. 6, № 22. — P. 4481–4486.
55. *Nishimura N., Mizuno M., Kandori H., Mizutani Y.* Distortion and a Strong Hydrogen Bond

- in the Retinal Chromophore Enable Sodium-Ion Transport by the Sodium-Ion Pump KR2 // *J. Phys. Chem. B.* — 2019. — Vol. 123, № 16. — P. 3430–3440.
56. *Kandori H., Inoue K., Tsunoda S.P.* Light-Driven Sodium-Pumping Rhodopsin: A New Concept of Active Transport // *Chem. Rev.* — 2018. — Vol. 118, № 21. — P. 10646–10658.
57. *Gushchin I., Shevchenko V., Polovinkin V., Borshchevskiy V., Buslaev P., Bamberg E., Gordeliy V.* Structure of the light-driven sodium pump KR2 and its implications for optogenetics // *FEBS J.* — 2016. — Vol. 283, № 7. — P. 1232–1238.
58. *Suomivuori C.-M., Gamiz-Hernandez A.P., Sundholm D., Kaila V.R.I.* Energetics and dynamics of a light-driven sodium-pumping rhodopsin // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2017. — Vol. 114, № 27. — P. 7043–7048.
59. *Palczewski K.* G Protein–Coupled Receptor Rhodopsin // *Annu. Rev. Biochem.* — 2006. — Vol. 75, № 1. — P. 743–767.
60. *Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Trong I. Le, Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., Miyano M.* Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor // *Science.* — 2000. — Vol. 289, № 5480. — P. 739–745.
61. *Okada T., Fujiyoshi Y., Silow M., Navarro J., Landau E.M., Shichida Y.* Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by x-ray crystallography // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2002. — Vol. 99, № 9. — P. 5982–5987.
62. *Schoenlein R.W., Peteanu L.A., Mathies R.A., Shank C. V.* The First Step in Vision: Femtosecond Isomerization of Rhodopsin // *Science.* — 1991. — Vol. 254, № 5030. — P. 412–415.
63. *Yan M., Manor D., Weng G., Chao H., Rothberg L., Jedju T.M., Alfano R.R., Callender R.H.* Ultrafast spectroscopy of the visual pigment rhodopsin. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1991. — Vol. 88, № 21. — P. 9809–9812.
64. *Shelaev I. V., Mozgovaya M.N., Smitienko O.A., Gostev F.E., Fel'dman T.B., Nadtochenko V.A., Sarkisov O.M., Ostrovskii M.A.* Femtosecond dynamics of primary processes in visual pigment rhodopsin // *Russ. J. Phys. Chem. B.* — 2014. — Vol. 8, № 4. — P. 510–517.
65. *Randall C.E., Lewis J.W., Hug S.J., Bjorling S.C., Eisner-Shanas I., Ottolenghi M., Sheves M., Friedman N., Kliger D.S.* A new photolysis intermediate in artificial and native visual pigments // *J. Am. Chem. Soc.* — 1991. — Vol. 113, № 9. — P. 3473–3485.

66. *Pan D., Mathies R.A.* Chromophore Structure in Lumirhodopsin and Metarhodopsin I by Time-Resolved Resonance Raman Microchip Spectroscopy // *Biochemistry*. — 2001. — Vol. 40, № 26. — P. 7929–7936.
67. *Ernst O.P., Bartl F.J.* Active States of Rhodopsin // *ChemBioChem*. — 2002. — Vol. 3, № 10. — P. 968–974.
68. *Birge R.R.* Two-photon spectroscopy of protein-bound chromophores // *Acc. Chem. Res.* — 1986. — Vol. 19, № 5. — P. 138–146.
69. *Tavan P., Schulten K.* Electronic excitations in finite and infinite polyenes // *Phys. Rev. B*. — 1987. — Vol. 36, № 8. — P. 4337–4358.
70. *Hasson K.C., Gai F., Anfinrud P.A.* The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin: Experimental evidence for a three-state model // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1996. — Vol. 93, № 26. — P. 15124–15129.
71. *González-Luque R., Garavelli M., Bernardi F., Merchán M., Robb M.A., Olivucci M.* Computational evidence in favor of a two-state, two-mode model of the retinal chromophore photoisomerization // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2000. — Vol. 97, № 17. — P. 9379–9384.
72. *Kraack J.P., Backup T., Motzkus M.* Evidence for the Two-State-Two-Mode model in retinal protonated Schiff-bases from pump degenerate four-wave-mixing experiments // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2012. — Vol. 14, № 40. — P. 13979.
73. *Gozem S., Luk H.L., Schapiro I., Olivucci M.* Theory and Simulation of the Ultrafast Double-Bond Isomerization of Biological Chromophores // *Chem. Rev.* — 2017. — Vol. 117, № 22. — P. 13502–13565.
74. *Cembran A., Bernardi F., Olivucci M., Garavelli M.* The retinal chromophore/chloride ion pair: Structure of the photoisomerization path and interplay of charge transfer and covalent states // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2005. — Vol. 102, № 18. — P. 6255–6260.
75. *Wand A., Gdor I., Zhu J., Sheves M., Ruhman S.* Shedding New Light on Retinal Protein Photochemistry // *Annu. Rev. Phys. Chem.* — 2013. — Vol. 64, № 1. — P. 437–458.
76. *Lutz I., Sieg A., Wegener A.A., Engelhard M., Boche I., Otsuka M., Oesterhelt D., Wachtveitl J., Zinth W.* Primary reactions of sensory rhodopsins // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2001. — Vol. 98, № 3. — P. 962–967.
77. *Kiefer H. V., Gruber E., Langeland J., Kusocek P.A., Bochenkova A. V., Andersen L.H.* Intrinsic photoisomerization dynamics of protonated Schiff-base retinal // *Nat. Commun.* —

2019. — Vol. 10, № 1. — P. 1210.
78. *Kandori H., Katsuta Y., Ito M., Sasabe H.* Femtosecond fluorescence study of the rhodopsin chromophore in solution // *J. Am. Chem. Soc.* — 1995. — Vol. 117, № 9. — P. 2669–2670.
79. *Zgrablić G., Voitchovsky K., Kindermann M., Haacke S., Chergui M.* Ultrafast Excited State Dynamics of the Protonated Schiff Base of All-trans Retinal in Solvents // *Biophys. J.* — 2005. — Vol. 88, № 4. — P. 2779–2788.
80. *Sovdat T., Bassolino G., Liebel M., Schnedermann C., Fletcher S.P., Kukura P.* Backbone Modification of Retinal Induces Protein-like Excited State Dynamics in Solution // *J. Am. Chem. Soc.* — 2012. — Vol. 134, № 20. — P. 8318–8320.
81. *Tan N.G.A., Wu W., Seifalian A.M.* Optogenetics: lights, camera, action! A ray of light, a shadow unmasked // *Applications of Nanoscience in Photomedicine.* — Elsevier, 2015. — P. 185–203.
82. *Yizhar O., Fenno L.E., Davidson T.J., Mogri M., Deisseroth K.* Optogenetics in Neural Systems // *Neuron.* — 2011. — Vol. 71, № 1. — P. 9–34.
83. *Deisseroth K.* Optogenetics // *Nat. Methods.* — 2011. — Vol. 8, № 1. — P. 26–29.
84. *Fenno L., Yizhar O., Deisseroth K.* The Development and Application of Optogenetics // *Annu. Rev. Neurosci.* — 2011. — Vol. 34, № 1. — P. 389–412.
85. *Kandori H.* Retinal Proteins: Photochemistry and Optogenetics // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* — 2020. — Vol. 93, № 1. — P. 76–85.
86. *Maclaurin D., Venkatachalam V., Lee H., Cohen A.E.* Mechanism of voltage-sensitive fluorescence in a microbial rhodopsin // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2013. — Vol. 110, № 15. — P. 5939–5944.
87. *Roke D., Wezenberg S.J., Feringa B.L.* Molecular rotary motors: Unidirectional motion around double bonds // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2018. — Vol. 115, № 38. — P. 9423–9431.
88. *Hontani Y., Broser M., Luck M., Weißenborn J., Kloz M., Hegemann P., Kennis J.T.M.* Dual Photoisomerization on Distinct Potential Energy Surfaces in a UV-Absorbing Rhodopsin // *J. Am. Chem. Soc.* — 2020. — Vol. 142, № 26. — P. 11464–11473.
89. *Kakitani H., Kakitani T., Rodman H., Honig B.* On the mechanism of wavelength regulation in visual pigments // *Photochem. Photobiol.* — 1985. — Vol. 41, № 4. — P. 471–479.
90. *Wang W., Nossoni Z., Berbasova T., Watson C.T., Yapici I., Lee K.S.S., Vasileiou C., Geiger J.H., Borhan B.* Tuning the Electronic Absorption of Protein-Embedded All-trans-Retinal //

- Science. — 2012. — Vol. 338, № 6112. — P. 1340–1343.
91. *Song L., El-Sayed M.A., Lanyi J.K.* Protein Catalysis of the Retinal Subpicosecond Photoisomerization in the Primary Process of Bacteriorhodopsin Photosynthesis // *Science*. — 1993. — Vol. 261, № 5123. — P. 891–894.
  92. *Schenkl S.* Probing the Ultrafast Charge Translocation of Photoexcited Retinal in Bacteriorhodopsin // *Science*. — 2005. — Vol. 309, № 5736. — P. 917–920.
  93. *Andersen L.H., Nielsen I.B., Kristensen M.B., El Ghazaly M.O.A., Haacke S., Nielsen M.B., Petersen M.Å.* Absorption of Schiff-Base Retinal Chromophores in Vacuo // *J. Am. Chem. Soc.* — 2005. — Vol. 127, № 35. — P. 12347–12350.
  94. *Blatz P.E., Mohler J.H., Navangul H. V.* Anion-induced wavelength regulation of absorption maxima of Schiff bases of retinal // *Biochemistry*. — 1972. — Vol. 11, № 5. — P. 848–855.
  95. *Okada T., Sugihara M., Bondar A.-N., Elstner M., Entel P., Buss V.* The Retinal Conformation and its Environment in Rhodopsin in Light of a New 2.2Å Crystal Structure // *J. Mol. Biol.* — 2004. — Vol. 342, № 2. — P. 571–583.
  96. *Ahuja S., Eilers M., Hirshfeld A., Yan E.C.Y., Ziliox M., Sakmar T.P., Sheves M., Smith S.O.* 6- s-cis Conformation and Polar Binding Pocket of the Retinal Chromophore in the Photoactivated State of Rhodopsin // *J. Am. Chem. Soc.* — 2009. — Vol. 131, № 42. — P. 15160–15169.
  97. *Inoue K., del Carmen Marín M., Tomida S., Nakamura R., Nakajima Y., Olivucci M., Kandori H.* Red-shifting mutation of light-driven sodium-pump rhodopsin // *Nat. Commun.* — 2019. — Vol. 10, № 1. — P. 1993.
  98. *Rajamani R., Gao J.* Combined QM/MM study of the opsin shift in bacteriorhodopsin // *J. Comput. Chem.* — 2002. — Vol. 23, № 1. — P. 96–105.
  99. *Baasov T., Sheves M.* Model compounds for the study of spectroscopic properties of visual pigments and bacteriorhodopsin // *J. Am. Chem. Soc.* — 1985. — Vol. 107, № 25. — P. 7524–7533.
  100. *Honig B., Dinur U., Nakanishi K., Balogh-Nair V., Gawinowicz M.A., Arnaboldi M., Motto M.G.* An external point-charge model for wavelength regulation in visual pigments // *J. Am. Chem. Soc.* — 1979. — Vol. 101, № 23. — P. 7084–7086.
  101. *Houjou H., Inoue Y., Sakurai M.* Physical Origin of the Opsin Shift of Bacteriorhodopsin. Comprehensive Analysis Based on Medium Effect Theory of Absorption Spectra // *J. Am.*

- Chem. Soc. — 1998. — Vol. 120, № 18. — P. 4459–4470.
102. *Koyama Y., Kubo K., Komori M., Yasuda H., Mukai Y.* Effect of protonation on the isomerization properties of n-butylamine Schiff base of isomeric retinal as revealed by direct hplc analyses: selection of isomerization pathways by retinal proteins // *Photochem. Photobiol.* — 1991. — Vol. 54, № 3. — P. 433–443.
  103. *Becker R.S., Freedman K.* A comprehensive investigation of the mechanism and photophysics of isomerization of a protonated and unprotonated Schiff base of 11-cis-retinal // *J. Am. Chem. Soc.* — 1985. — Vol. 107, № 6. — P. 1477–1485.
  104. *Freedman K.A., Becker R.S.* Comparative investigation of the photoisomerization of the protonated and unprotonated n-butylamine Schiff bases of 9-cis-, 11-cis-, 13-cis-, and all-trans-retinals // *J. Am. Chem. Soc.* — 1986. — Vol. 108, № 6. — P. 1245–1251.
  105. *Logunov S.L., Song L., El-Sayed M.A.* Excited-State Dynamics of a Protonated Retinal Schiff Base in Solution // *J. Phys. Chem.* — 1996. — Vol. 100, № 47. — P. 18586–18591.
  106. *Hamm P., Zurek M., Röschinger T., Patzelt H., Oesterhelt D., Zinth W.* Femtosecond spectroscopy of the photoisomerisation of the protonated Schiff base of all-trans retinal // *Chem. Phys. Lett.* — 1996. — Vol. 263, № 5. — P. 613–621.
  107. *Zgrablić G., Haacke S., Chergui M.* Heterogeneity and Relaxation Dynamics of the Photoexcited Retinal Schiff Base Cation in Solution // *J. Phys. Chem. B.* — 2009. — Vol. 113, № 13. — P. 4384–4393.
  108. *Bassolino G., Sovdat T., Soares Duarte A., Lim J.M., Schnedermann C., Liebel M., Odell B., Claridge T.D.W., Fletcher S.P., Kukura P.* Barrierless Photoisomerization of 11- cis Retinal Protonated Schiff Base in Solution // *J. Am. Chem. Soc.* — 2015. — Vol. 137, № 39. — P. 12434–12437.
  109. *Knudsen J.L., Kluge A., Bochenkova A. V., Kiefer H. V., Andersen L.H.* The UV-visible action-absorption spectrum of all- trans and 11- cis protonated Schiff base retinal in the gas phase // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2018. — Vol. 20, № 10. — P. 7190–7194.
  110. *Pedersen H.B., Svendsen A., Harbo L.S., Kiefer H. V., Kjeldsen H., Lammich L., Toker Y., Andersen L.H.* Characterization of a new electrostatic storage ring for photofragmentation experiments // *Rev. Sci. Instrum.* — 2015. — Vol. 86, № 6. — P. 063107.
  111. *Andersen L.H., Bluhme H., Boyé S., Jørgensen T.J.D., Krogh H., Nielsen I.B., Brøndsted Nielsen S., Svendsen A.* Experimental studies of the photophysics of gas-phase fluorescent protein chromophores // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2004. — Vol. 6, № 10. — P. 2617–

2627.

112. *Coughlan N.J.A., Adamson B.D., Gamon L., Catani K., Bieske E.J.* Retinal shows its true colours: photoisomerization action spectra of mobility-selected isomers of the retinal protonated Schiff base // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2015. — Vol. 17, № 35. — P. 22623–22631.
113. *Logunov S.L., El-Sayed M.A., Song L., Lanyi J.K.* Photoisomerization Quantum Yield and Apparent Energy Content of the K Intermediate in the Photocycles of Bacteriorhodopsin, Its Mutants D85N, R82Q, and D212N, and Deionized Blue Bacteriorhodopsin // *J. Phys. Chem.* — 1996. — Vol. 100, № 6. — P. 2391–2398.
114. *Punwong C., Hannongbua S., Martínez T.J.* Electrostatic Influence on Photoisomerization in Bacteriorhodopsin and Halorhodopsin // *J. Phys. Chem. B.* — 2019. — Vol. 123, № 23. — P. 4850–4857.
115. *Liang R., Liu F., Martínez T.J.* Nonadiabatic Photodynamics of Retinal Protonated Schiff Base in Channelrhodopsin 2 // *J. Phys. Chem. Lett.* — 2019. — Vol. 10, № 11. — P. 2862–2868.
116. *Frutos L.M., Andruniów T., Santoro F., Ferré N., Olivucci M.* Tracking the excited-state time evolution of the visual pigment with multiconfigurational quantum chemistry // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2007. — Vol. 104, № 19. — P. 7764–7769.
117. *Rivalta I., Nenov A., Weingart O., Cerullo G., Garavelli M., Mukamel S.* Modelling Time-Resolved Two-Dimensional Electronic Spectroscopy of the Primary Photoisomerization Event in Rhodopsin // *J. Phys. Chem. B.* — 2014. — Vol. 118, № 28. — P. 8396–8405.
118. *Wanko M., Hoffmann M., Strodel P., Koslowski A., Thiel W., Neese F., Frauenheim T., Elstner M.* Calculating Absorption Shifts for Retinal Proteins: Computational Challenges // *J. Phys. Chem. B.* — 2005. — Vol. 109, № 8. — P. 3606–3615.
119. *Hayashi S., Tajkhorshid E., Schulten K.* Photochemical Reaction Dynamics of the Primary Event of Vision Studied by Means of a Hybrid Molecular Simulation // *Biophys. J.* — 2009. — Vol. 96, № 2. — P. 403–416.
120. *Sharkov A. V., Pakulev A. V., Chekalin S. V., Matveetz Y.A.* Primary events in bacteriorhodopsin probed by subpicosecond spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* — 1985. — Vol. 808, № 1. — P. 94–102.
121. *McCamant D.W., Kukura P., Mathies R.A.* Femtosecond Stimulated Raman Study of Excited-State Evolution in Bacteriorhodopsin // *J. Phys. Chem. B.* — 2005. — Vol. 109, №

20. — P. 10449–10457.
122. *Liebel M., Schnedermann C., Bassolino G., Taylor G., Watts A., Kukura P.* Direct Observation of the Coherent Nuclear Response after the Absorption of a Photon // *Phys. Rev. Lett.* — 2014. — Vol. 112, № 23. — P. 238301.
123. *Kandori H., Yoshihara K., Tomioka H., Sasabe H.* Primary photochemical events in halorhodopsin studied by subpicosecond time-resolved spectroscopy // *J. Phys. Chem.* — 1992. — Vol. 96, № 14. — P. 6066–6071.
124. *Arlt T., Schmidt S., Zinth W., Haupts U., Oesterhelt D.* The initial reaction dynamics of the light-driven chloride pump halorhodopsin // *Chem. Phys. Lett.* — 1995. — Vol. 241, № 5–6. — P. 559–565.
125. *Tahara S., Takeuchi S., Abe-Yoshizumi R., Inoue K., Ohtani H., Kandori H., Tahara T.* Origin of the Reactive and Nonreactive Excited States in the Primary Reaction of Rhodopsins: pH Dependence of Femtosecond Absorption of Light-Driven Sodium Ion Pump Rhodopsin KR2 // *J. Phys. Chem. B.* — 2018. — Vol. 122, № 18. — P. 4784–4792.
126. *Tomida S., Ito S., Mato T., Furutani Y., Inoue K., Kandori H.* Infrared spectroscopic analysis on structural changes around the protonated Schiff base upon retinal isomerization in light-driven sodium pump KR2 // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* — 2020. — Vol. 1861, № 7. — P. 148190.
127. *Shibata M., Tanimoto T., Kandori H.* Water Molecules in the Schiff Base Region of Bacteriorhodopsin // *J. Am. Chem. Soc.* — 2003. — Vol. 125, № 44. — P. 13312–13313.
128. *Takahashi T., Mochizuki Y., Kamo N., Kobatake Y.* Evidence that the long-lifetime photointermediate of s-rhodopsin is a receptor for negative phototaxis in halobacterium halobium // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1985. — Vol. 127, № 1. — P. 99–105.
129. *Koyanagi M., Terakita A.* Gq-coupled Rhodopsin Subfamily Composed of Invertebrate Visual Pigment and Melanopsin // *Photochem. Photobiol.* — 2008. — Vol. 84, № 4. — P. 1024–1030.
130. *Kawanabe A., Kandori H.* Photoreactions and Structural Changes of Anabaena Sensory Rhodopsin // *Sensors.* — 2009. — Vol. 9, № 12. — P. 9741–9804.
131. *Bruun S., Stoepler D., Keidel A., Kuhlmann U., Luck M., Diehl A., Geiger M.-A., Woodmansee D., Trauner D., Hegemann P., Oschkinat H., Hildebrandt P., Stehfest K.* Light–Dark Adaptation of Channelrhodopsin Involves Photoconversion between the all-trans and 13- cis Retinal Isomers // *Biochemistry.* — 2015. — Vol. 54, № 35. — P. 5389–

5400.

132. *Govindjee R., Balashov S.P., Ebrey T.G.* Quantum efficiency of the photochemical cycle of bacteriorhodopsin // *Biophys. J.* — 1990. — Vol. 58, № 3. — P. 597–608.
133. *Birge R.R., Cooper T.M., Lawrence A.F., Masthay M.B., Vasilakis C., Zhang C.F., Zidovetzki R.* A spectroscopic, photocalorimetric, and theoretical investigation of the quantum efficiency of the primary event in bacteriorhodopsin // *J. Am. Chem. Soc.* — 1989. — Vol. 111, № 11. — P. 4063–4074.
134. *Bazhenov V., Schmidt P., Atkinson G.H.* Nanosecond photolytic interruption of bacteriorhodopsin photocycle // *Biophys. J.* — 1992. — Vol. 61, № 6. — P. 1630–1637.
135. *Yan M., Rothberg L., Callender R.* Femtosecond Dynamics of Rhodopsin Photochemistry Probed by a Double Pump Spectroscopic Approach // *J. Phys. Chem. B.* — 2001. — Vol. 105, № 4. — P. 856–859.
136. *Smitienko O., Nadtochenko V., Feldman T., Balatskaya M., Shelaev I., Gostev F., Sarkisov O., Ostrovsky M.* Femtosecond Laser Spectroscopy of the Rhodopsin Photochromic Reaction: A Concept for Ultrafast Optical Molecular Switch Creation (Ultrafast Reversible Photoreaction of Rhodopsin) // *Molecules.* — 2014. — Vol. 19, № 11. — P. 18351–18366.
137. *Suzuki T., Callender R.H.* Primary photochemistry and photoisomerization of retinal at 77 degrees K in cattle and squid rhodopsins // *Biophys. J.* — 1981. — Vol. 34, № 2. — P. 261–270.
138. *Birge R.R., Hubbard L.M.* Molecular dynamics of trans-cis isomerization in bathorhodopsin // *Biophys. J.* — 1981. — Vol. 34, № 3. — P. 517–534.
139. *Paternolli C., Neebe M., Stura E., Barbieri F., Ghisellini P., Hampp N., Nicolini C.* Photoreversibility and photostability in films of octopus rhodopsin isolated from octopus photoreceptor membranes // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* — 2009. — Vol. 88A, № 4. — P. 947–951.
140. *Ostrovsky M.A., Weetall H.H.* Octopus rhodopsin photoreversibility of a crude extract from whole retina over several weeks' duration // *Biosens. Bioelectron.* — 1998. — Vol. 13, № 1. — P. 61–65.
141. *Ehrenberg D., Varma N., Deupi X., Koyanagi M., Terakita A., Schertler G.F.X., Heberle J., Lesca E.* The Two-Photon Reversible Reaction of the Bistable Jumping Spider Rhodopsin-1 // *Biophys. J.* — 2019. — Vol. 116, № 7. — P. 1248–1258.

142. *Gudesen H.G., Leistad G.I., Nordal P.E.* Optical Logic Element and Methods for Respectively Its Preparation and Optical Addressing, as well as the Use Thereof in an Optical Logic Device // Pat. US6219160B1 USA. — 2001.
143. *Birge R.R.* Branched Photocycle Optical Memory Device // Pat. US5559732A USA. — 1996.
144. *Ormos P., Dér A., Wolff E.K., Ramsden J.J.* Light driven, integrated optical device // Pat. US6956984B2 USA. — 2005.
145. *Hampp N.* Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories // Chem. Rev. — 2000. — Vol. 100, № 5. — P. 1755–1776.
146. *Stone A.J.* Distributed multipole analysis, or how to describe a molecular charge distribution // Chem. Phys. Lett. — 1981. — Vol. 83, № 2. — P. 233–239.
147. *Day P.N., Jensen J.H., Gordon M.S., Webb S.P., Stevens W.J., Krauss M., Garmer D., Basch H., Cohen D.* An effective fragment method for modeling solvent effects in quantum mechanical calculations // J. Chem. Phys. — 1996. — Vol. 105, № 5. — P. 1968–1986.
148. *Slipchenko L. V., Gurunathan P.K.* Effective Fragment Potential Method: Past, Present, and Future // Fragmentation. — John Wiley & Sons, Ltd, 2017. — P. 183–208.
149. *Gordon M.S., Slipchenko L., Li H., Jensen J.H.* Chapter 10 The Effective Fragment Potential: A General Method for Predicting Intermolecular Interactions // Annual Reports in Computational Chemistry. — Elsevier, 2007. — P. 177–193.
150. *Townsend J., Kirkland J.K., Vogiatzis K.D.* Post-Hartree-Fock methods: configuration interaction, many-body perturbation theory, coupled-cluster theory // Mathematical Physics in Theoretical Chemistry. — Elsevier, 2019. — P. 63–117.
151. *Hirao K.* Multireference Møller—Plesset method // Chem. Phys. Lett. — 1992. — Vol. 190, № 3–4. — P. 374–380.
152. *Nakano H.* Quasidegenerate perturbation theory with multiconfigurational self-consistent-field reference functions // J. Chem. Phys. — 1993. — Vol. 99, № 10. — P. 7983–7992.
153. *Granovsky A.A.* Extended multi-configuration quasi-degenerate perturbation theory: The new approach to multi-state multi-reference perturbation theory // J. Chem. Phys. — 2011. — Vol. 134, № 21. — P. 214113.
154. *Granovsky A.A.* Firefly version 8 [Electronic resource]. URL: <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>.

155. *Numerov B.* Note on the numerical integration of  $d^2x/dt^2 = f(x,t)$  // *Astron. Nachrichten.* — 1927. — Vol. 230, № 19. — P. 359–364.
156. *Pillai M., Goglio J., Walker T.G.* Matrix Numerov method for solving Schrödinger's equation // *Am. J. Phys.* — 2012. — Vol. 80, № 11. — P. 1017–1019.
157. *MacKerell A.D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R.L., Evanseck J.D., Field M.J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F.T.K., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D.T., Prodhom B., et al.* All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins // *J. Phys. Chem. B.* — 1998. — Vol. 102, № 18. — P. 3586–3616.
158. *Hayashi S., Ohmine I.* Proton Transfer in Bacteriorhodopsin: Structure, Excitation, IR Spectra, and Potential Energy Surface Analyses by an ab Initio QM/MM Method // *J. Phys. Chem. B.* — 2000. — Vol. 104, № 45. — P. 10678–10691.
159. *Hayashi S., Tajkhorshid E., Pebay-Peyroula E., Royant A., Landau E.M., Navarro J., Schulten K.* Structural Determinants of Spectral Tuning in Retinal Proteins - Bacteriorhodopsin vs Sensory Rhodopsin II // *J. Phys. Chem. B.* — 2001. — Vol. 105, № 41. — P. 10124–10131.
160. *Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.* — 1983. — Vol. 79, № 2. — P. 926–935.
161. *Skopintsev P., Ehrenberg D., Weinert T., James D., Kar R.K., Johnson P.J.M., Ozerov D., Furrer A., Martiel I., Dworkowski F., Nass K., Knopp G., Cirelli C., Arrell C., Gashi D., Mous S., Wranik M., Gruhl T., Kekilli D., et al.* Femtosecond-to-millisecond structural changes in a light-driven sodium pump // *Nature.* — 2020. — Vol. 583, № 7815. — P. 314–318.
162. *Nakamichi H., Okada T.* Crystallographic Analysis of Primary Visual Photochemistry // *Angew. Chemie Int. Ed.* — 2006. — Vol. 45, № 26. — P. 4270–4273.
163. *Wu E.L., Cheng X., Jo S., Rui H., Song K.C., Dávila-Contreras E.M., Qi Y., Lee J., Monje-Galvan V., Venable R.M., Klauda J.B., Im W.* CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations // *J. Comput. Chem.* — 2014. — Vol. 35, № 27. — P. 1997–2004.
164. *Jo S., Kim T., Iyer V.G., Im W.* CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM // *J. Comput. Chem.* — 2008. — Vol. 29, № 11. — P. 1859–1865.

165. *Lee J., Cheng X., Swails J.M., Yeom M.S., Eastman P.K., Lemkul J.A., Wei S., Buckner J., Jeong J.C., Qi Y., Jo S., Pande V.S., Case D.A., Brooks C.L., MacKerell A.D., Klauda J.B., Im W.* CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field // *J. Chem. Theory Comput.* — 2016. — Vol. 12, № 1. — P. 405–413.
166. *Fiorin G., Klein M.L., Hénin J.* Using collective variables to drive molecular dynamics simulations // *Mol. Phys.* — 2013. — Vol. 111, № 22–23. — P. 3345–3362.
167. *Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A.* General atomic and molecular electronic structure system // *J. Comput. Chem.* — 1993. — Vol. 14, № 11. — P. 1347–1363.
168. *Kiefer H. V., Lattouf E., Persen N.W., Bochenkova A. V., Andersen L.H.* How far can a single hydrogen bond tune the spectral properties of the GFP chromophore? // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2015. — Vol. 17, № 31. — P. 20056–20060.
169. *Bochenkova A. V., Andersen L.H.* Ultrafast dual photoresponse of isolated biological chromophores: link to the photoinduced mode-specific non-adiabatic dynamics in proteins // *Faraday Discuss.* — 2013. — Vol. 163. — P. 297.
170. *Bochenkova A. V., Andersen L.H.* Photo-initiated Dynamics and Spectroscopy of the Deprotonated Green Fluorescent Protein Chromophore // *Photophysics of Ionic Biochromophores. Physical Chemistry in Action.* — Springer, 2013. — P. 67–103.
171. *Rivalta I., Nenov A., Garavelli M.* Modelling retinal chromophores photoisomerization: from minimal models in vacuo to ultimate bidimensional spectroscopy in rhodopsins // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2014. — Vol. 16, № 32. — P. 16865–16879.
172. *Cembran A., González-Luque R., Serrano-Andrés L., Merchán M., Garavelli M.* About the intrinsic photochemical properties of the 11-cis retinal chromophore: computational clues for a trap state and a lever effect in Rhodopsin catalysis // *Theor. Chem. Acc.* — 2007. — Vol. 118, № 1. — P. 173–183.
173. *Toker Y., Langeland J., Gruber E., Kjær C., Nielsen S.B., Andersen L.H., Borin V.A., Schapiro I.* Counterion-controlled spectral tuning of the protonated Schiff-base retinal // *Phys. Rev. A.* — 2018. — Vol. 98, № 4. — P. 043428.
174. *Gruber E., Kabylda A.M., Nielsen M.B., Rasmussen A.P., Teiwes R., Kusocek P.A., Bochenkova A. V., Andersen L.H.* Light Driven Ultrafast Bioinspired Molecular Motors:

- Steering and Accelerating Photoisomerization Dynamics of Retinal // *J. Am. Chem. Soc.* — 2022. — Vol. 144, № 1. — P. 69–73.
175. *Kusochek P.A., Logvinov V. V., Bochenkova A. V.* Role of the Protein Environment in Photoisomerization of Type I and Type II Rhodopsins: a Theoretical Perspective // *Moscow Univ. Chem. Bull.* — 2021. — Vol. 76, № 6. — P. 407–416.
176. *Кусочек П.А., Логвинов В.В.* Связь динамики фотохромных реакций на ранних временах со структурой активного центра в различных микробиальных и животных родопсинах // *Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», секция «Химия».* — М.: Издательство «Перо» [Электронное издание], Москва, 2022. — С. 728.
177. *Кусочек П.А., Логвинов В.В., Боченкова А.В.* Роль белкового окружения в механизме реакции фотоизомеризации хромофорных групп родопсинов I и II типов // *Труды 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ. Электроника, фотоника и молекулярная физика.* — Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, 2021. — С. 40-42.
178. *Kusochek P.A., Scherbinin A. V., Bochenkova A. V.* Insights into the Early-Time Excited-State Dynamics of Structurally Inhomogeneous Rhodopsin KR2 // *J. Phys. Chem. Lett.* — 2021. — Vol. 12, № 35. — P. 8664–8671.
179. *Khrenova M.G., Bochenkova A. V., Nemukhin A. V.* Modeling reaction routes from rhodopsin to bathorhodopsin // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* — 2010. — Vol. 78, № 3. — P. 614–622.
180. *Lin S.W., Groesbeek M., van der Hoef I., Verdegem P., Lugtenburg J., Mathies R.A.* Vibrational Assignment of Torsional Normal Modes of Rhodopsin: Probing Excited-State Isomerization Dynamics along the Reactive C 11 C 12 Torsion Coordinate // *J. Phys. Chem. B.* — 1998. — Vol. 102, № 15. — P. 2787–2806.
181. *Chen H.-F., Inoue K., Ono H., Abe-Yoshizumi R., Wada A., Kandori H.* Time-resolved FTIR study of light-driven sodium pump rhodopsins // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2018. — Vol. 20, № 26. — P. 17694–17704.
182. *Asido M., Eberhardt P., Kriebel C.N., Braun M., Glaubitz C., Wachtveitl J.* Time-resolved IR spectroscopy reveals mechanistic details of ion transport in the sodium pump *Krokinobacter eikastus* rhodopsin 2 // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2019. — Vol. 21, № 8. — P. 4461–4471.

183. *Ono H., Inoue K., Abe-Yoshizumi R., Kandori H.* FTIR Spectroscopy of a Light-Driven Compatible Sodium Ion-Proton Pumping Rhodopsin at 77 K // *J. Phys. Chem. B.* — 2014. — Vol. 118, № 18. — P. 4784–4792.
184. *Ujj L., Atkinson G.H.* Vibrational Spectrum of Bathorhodopsin in the Room-Temperature Rhodopsin Photoreaction // *J. Am. Chem. Soc.* — 1997. — Vol. 119, № 51. — P. 12610–12618.
185. *Eberhardt P., Slavov C., Sörmann J., Bamann C., Braun M., Wachtveitl J.* Temperature Dependence of the *Krokinobacter* rhodopsin 2 Kinetics // *Biophys. J.* — 2021. — Vol. 120, № 3. — P. 568–575.
186. *Smith S.O., Braiman M.S., Myers A.B., Pardoen J.A., Courtin J.M.L., Winkel C., Lugtenburg J., Mathies R.A.* Vibrational analysis of the all-trans-retinal chromophore in light-adapted bacteriorhodopsin // *J. Am. Chem. Soc.* — 1987. — Vol. 109, № 10. — P. 3108–3125.
187. *Myers A.B., Harris R.A., Mathies R.A.* Resonance Raman excitation profiles of bacteriorhodopsin // *J. Chem. Phys.* — 1983. — Vol. 79, № 2. — P. 603–613.
188. *Kouyama T., Bogomolni R.A., Stoerkenius W.* Photoconversion from the light-adapted to the dark-adapted state of bacteriorhodopsin // *Biophys. J.* — 1985. — Vol. 48, № 2. — P. 201–208.
189. *Birge R.R., Gillespie N.B., Izaguirre E.W., Kusnetzow A., Lawrence A.F., Singh D., Song Q.W., Schmidt E., Stuart J.A., Seetharaman S., Wise K.J.* Biomolecular Electronics: Protein-Based Associative Processors and Volumetric Memories // *J. Phys. Chem. B.* — 1999. — Vol. 103, № 49. — P. 10746–10766.
190. *Coto P.B., Sinicropi A., De Vico L., Ferré N., Olivucci M.* Characterization of the conical intersection of the visual pigment rhodopsin at the CASPT2//CASSCF/AMBER level of theory // *Mol. Phys.* — 2006. — Vol. 104, № 5–7. — P. 983–991.
191. *Polli D., Altoè P., Weingart O., Spillane K.M., Manzoni C., Brida D., Tomasello G., Orlandi G., Kukura P., Mathies R.A., Garavelli M., Cerullo G.* Conical intersection dynamics of the primary photoisomerization event in vision // *Nature.* — 2010. — Vol. 467, № 7314. — P. 440–443.

192. *Shibata M., Inoue K., Ikeda K., Konno M., Singh M., Kataoka C., Abe-Yoshizumi R., Kandori H., Uchihashi T.* Oligomeric states of microbial rhodopsins determined by high-speed atomic force microscopy and circular dichroic spectroscopy // *Sci. Rep.* — 2018. — Vol. 8, № 1. — P. 8262.
193. *Vegh R.B., Bloch D.A., Bommarius A.S., Verkhovsky M., Pletnev S., Iwai H., Bochenkova A. V., Solntsev K.M.* Hidden photoinduced reactivity of the blue fluorescent protein mKalamal // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2015. — Vol. 17, № 19. — P. 12472–12485.
194. *Bussi G., Laio A.* Using metadynamics to explore complex free-energy landscapes // *Nat. Rev. Phys.* — 2020. — Vol. 2, № 4. — P. 200–212.

## Благодарности

---

Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю, зав. лаб. квантовой фотодинамики, доценту, к.ф.-м.н. Боченковой Анастасии Владимировне за неоценимую помощь, ценные обсуждения и всестороннюю поддержку при выполнении исследования.

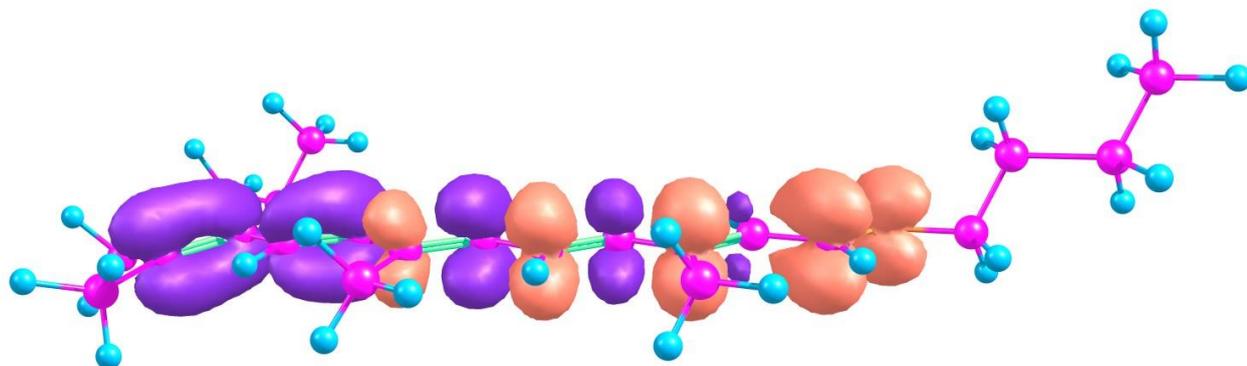
Автор выражает огромную благодарность своим родителям за помощь и всестороннюю поддержку.

Автор выражает благодарность РФФИ за финансовую поддержку работы (грант 19-33-90254, «Аспиранты»).

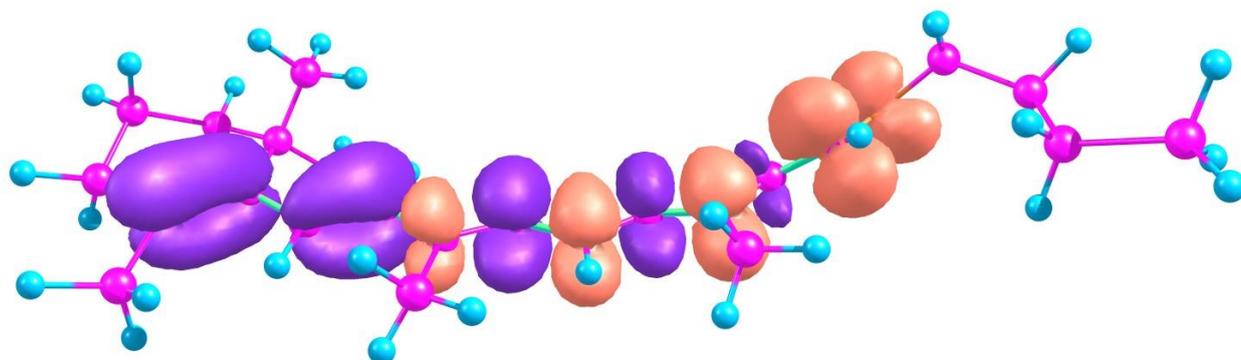
# Приложения

## Приложение 1.

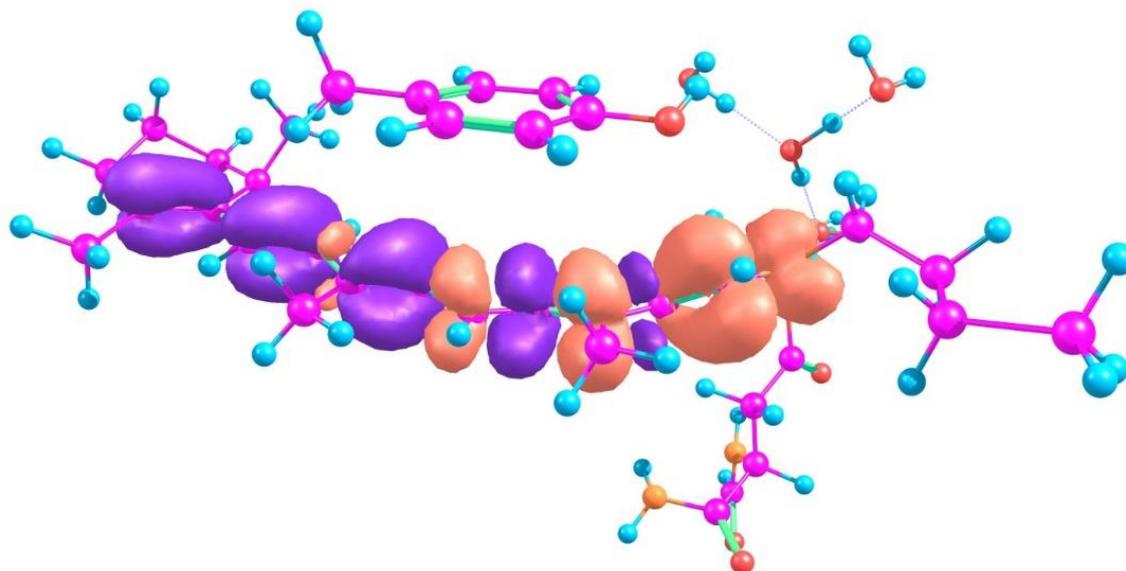
Разностная электронная плотность при переходе  $S_0-S_1$  для изомеров РПШО в газовой фазе и белковом окружении. Расчеты проведены на уровне теории XMCQDPT2/SA-CASSCF (12,12)/(aug)-cc-pVDZ.



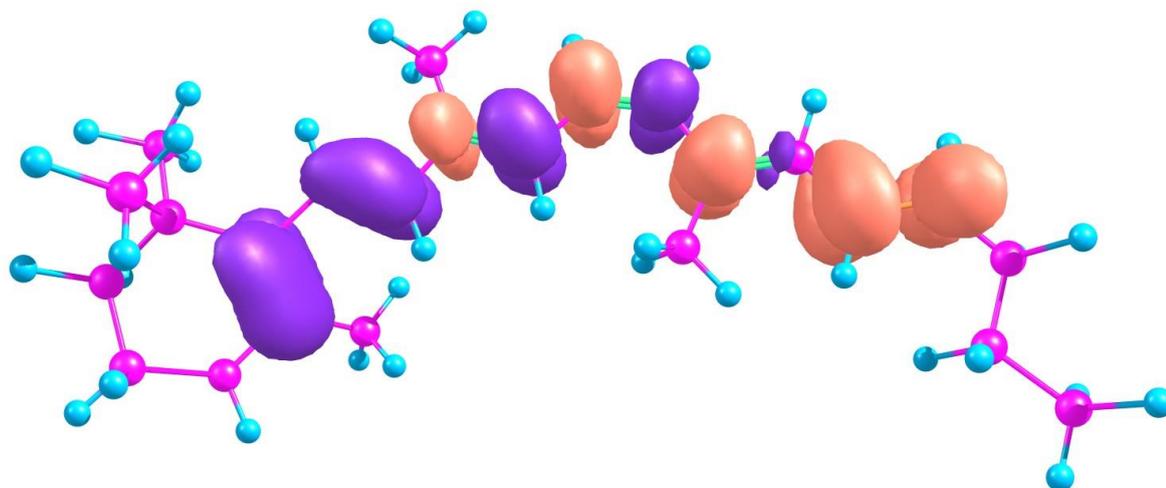
*Рисунок 45. Разностная электронная плотность при переходе  $S_0-S_1$  для полностью-транс РПШО в газовой фазе. Геометрия молекулы отвечает оптимизированной геометрии полностью-транс РПШО на поверхности  $S_0$ .*



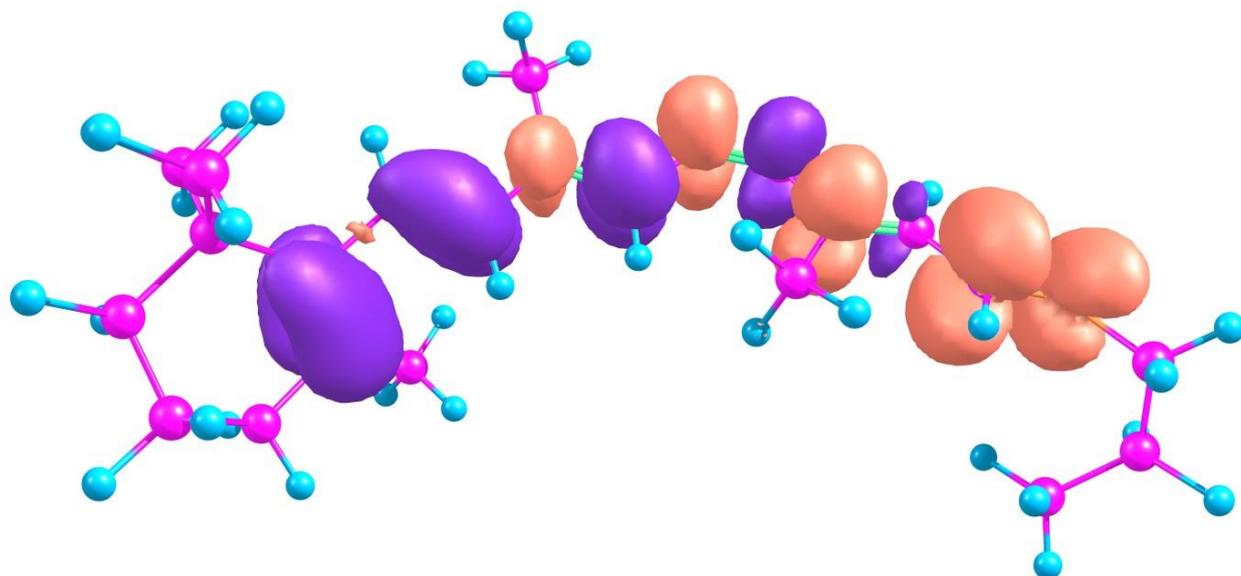
*Рисунок 46. Разностная электронная плотность при переходе  $S_0-S_1$  для полностью-транс РПШО в газовой фазе в геометрии из конформера I родопсина KR2. Геометрия молекулы отвечает геометрии полностью-транс РПШО в КМ/ММ оптимизированном конформере I родопсина KR2.*



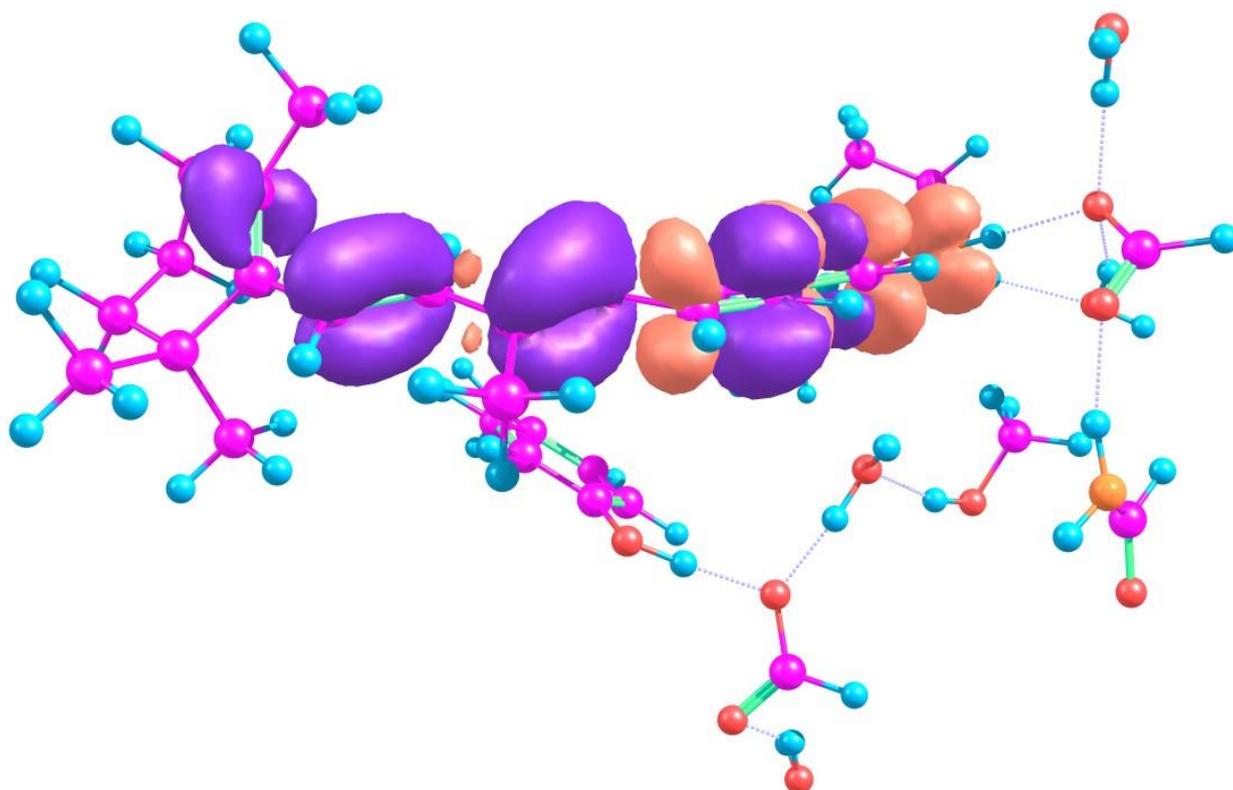
*Рисунок 47. Разностная электронная плотность при переходе  $S_0$ - $S_1$  для полностью-транс РПШО в белковом окружении в конформере I родопсина KR2. Геометрия молекулы отвечает геометрии полностью-транс РПШО в КМ/ММ оптимизированном конформере I родопсина KR2.*



*Рисунок 48. Разностная электронная плотность при переходе  $S_0$ - $S_1$  для 11-цис РПШО в газовой фазе. Геометрия молекулы отвечает оптимизированной геометрии 11-цис РПШО на поверхности  $S_0$ .*



*Рисунок 49. Разностная электронная плотность при переходе  $S_0-S_1$  для 11-цис РПШО в газовой фазе в геометрии из зрительного родопсина. Геометрия молекулы отвечает геометрии 11-цис РПШО в КМ/ММ оптимизированной структуре зрительного родопсина.*



*Рисунок 50. Разностная электронная плотность при переходе  $S_0-S_1$  для 11-цис РПШО в белковом окружении зрительного родопсина. Геометрия молекулы отвечает геометрии 11-цис РПШО в КМ/ММ оптимизированной структуре зрительного родопсина.*

## Приложение 2.

*Таблица 10. Энергии вертикальных  $S_0$ - $S_1$  переходов и силы осциллятора данных переходов для изомеров РПШО в белковом окружении. Разности дипольных моментов в состоянии  $S_1$  и  $S_0$  для изомеров РПШО в белковом окружении. Расчеты проведены на уровне теории ХМҚDPT2/SA-CASSCF (12,12)/(aug)-cc-pVDZ.*

Структура	Энергия, нм	Переход $S_0$ - $S_1$	
		Сила осциллятора	Разница дипольных моментов, Д
полностью- <i>транс</i> РПШО в конформере I родопсина KR2	456	1,17	14,9
полностью- <i>транс</i> РПШО в конформере II родопсина KR2	460	1,24	16,0
полностью- <i>транс</i> РПШО в конформере III родопсина KR2	450	1,13	15,5
полностью- <i>транс</i> РПШО в бактериородопсине	444	1,18	11,3
11-цис РПШО в зрительном родопсине	431	1,06	12,8