

Фемтосекундная время-разрешенная рамановская микроспектроскопия и фемтосекундная абсорбционная pump-probe спектроскопия корегентного волнового пакета для исследования спектроскопии элементарного акта фотохимических превращений в Na⁺ родопсинах.

А. Айбуш, Ф. Гостев, А. Титов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

(в коллаборации с А. Богачевым, М. Мамедовым, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва)

В настоящий момент у живых организмов известны два принципиально разных способа запастись энергией квантов света в виде химической энергии: различные типы хлорофилл-содержащих реакционных центров и разные ретиналь-содержащие белки. Недавно было установлено, что один из протеородопсинов морской флавобактерии *Krokinobacter eikastus* способен к светозависимому переносу ионов Na⁺ (sodium ion pump rhodopsins, далее NaR) из цитоплазмы во внешнюю среду. Была определена трехмерная атомная структура NaR в основном состоянии, найдено структурное сходство бактериородопсина и NaR, в связи с чем проводят параллели между ними. Перенос протона играет ключевую роль в фотоцикле NaR, поскольку позволяет уменьшить электростатическое отталкивание между хромофором и транспортируемым ионом. Исследование Na⁺-помпирующих протеородопсинов важно не только для детализации натриевого цикла, но также способно привести и к существенному прогрессу в понимании механизма функционирования ретиналь-содержащих энерго-преобразующих ферментов, что является актуальным с связи с разнообразными приложениями оптогенетики. Исследование первичных фотопроцессов NaR было проведено к настоящему времени лишь в нескольких работах.

В рамках данного этапа проекта, согласно плану, исследованы спектрально-кинетические характеристики NaR полученного из клеток *Escherichia coli* по специально разработанной методике, с помощью фемтосекундной абсорбционной pump-probe спектроскопии. Впервые в таких исследованиях использовался ультракороткий импульс pump 25 фс с центральной длиной волны 540 нм, что дало возможность изучить спектральные характеристики NaR спустя десятки фемтосекунд (Рис.1) после импульса pump. Во многом спектры дифференциального поглощения (dOD) NaR проявили сходство со спектрами dOD фемтосекундной абсорбционной спектроскопии бактериородопсина (BR), для которого, в частности, выделяют спектральные области: поглощения возбужденного состояния (ESA) на ~

460 нм; стимулированного высвечивания (SE) на ~ 750 нм. Помимо этого, схожесть спектров дифференциального поглощения между NaR и BR может означать подобие процессов, происходящих в фемто и пикосекундной шкале времен. В этой связи аналогично были названы и соответствующие интермедиаты реакции, ассоциированные с временными спектральными особенностями NaR: интермедиаты I, J, K. На Рис.1 несложно видеть, что пики интермедиатов I и J NaR испытывают значительные сдвиги в субпикосекундной шкале времен ($\sim < 600$ фс). Аналогично BR, для NaR также наблюдается монотонный сдвиг в полосе ESA величина которого близка к 100 мЭв.

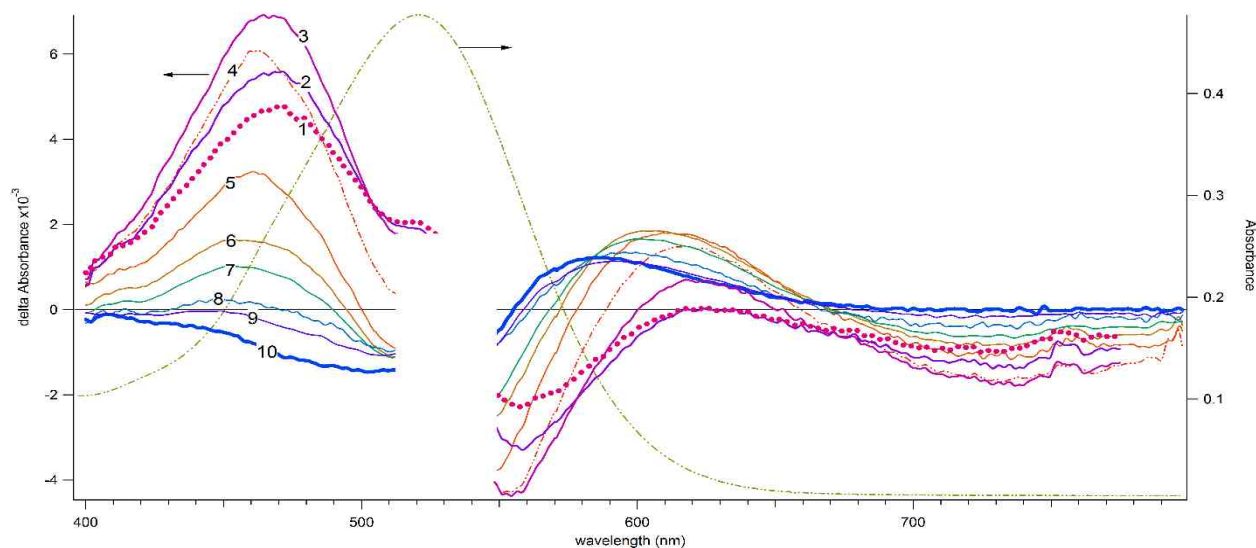


Рис.1 Спектры дифференциального поглощения (слева) для временных задержек: 43 фс (1); 57 фс (2); 100 фс (3); 213 фс (4); 413 фс (5); 647 фс (6); 1.07 пс (7); 3.47 пс (8); 11 пс (9); 500 пс (10). Спектр поглощения NaR (справа). Дифференциальные спектры поглощения для 43 и 57 фс показаны после вычитания когерентного артефакта, связанного с буфером. Энергия рипр импульса составляла 60 нДж.

Данная схема последовательных трансформаций подразумевает существование трех интермедиатов I, J и K с соответствующими временными константами $\tau_I = 1/k_I$ и $\tau_J = 1/k_J$. Данные константы могут быть найдены с помощью глобального фитинга экспериментальной матрицы данных для времен задержек от 100 фс до 500 пс: $\tau_I = 430 \pm 50$ fs, $\tau_J = 12 \pm 4$ ps. Спектры и кинетики соответствующих интермедиатов I, J, K показаны на Рис.2. Из Рис.2 видно, что интермедиаты I, J и K имеют максимумы на 470, 605 и 585 нм, соответственно. Эти пики довольно близки к аналогичным пикам I460, J625 и K590 BR.

Ранее для BR было показано, что изменение интенсивности возбуждающего импульса может оказывать существенное влияние кинетические параметры наблюдаемых спектральных преобразований. В этой связи этот вопрос изучался для двух энергий импульса рипр: 20 и 60

нДж. Было показано, что отношение амплитуд когерентных артефактов для 20 и 60 нДж составило 2.95, что равно отношению энергий импульсов pump. С другой стороны, было найдено что увеличение максимальной амплитуды dOD интермедиата I составило 2.17, при трехкратном увеличении энергии импульсов. Это означает что возбуждение NaR носит нелинейный характер для световых потоков $\sim 3 \text{ ГВт/см}^2$ и плотности энергии большей чем 80 мкДж/см^2 .

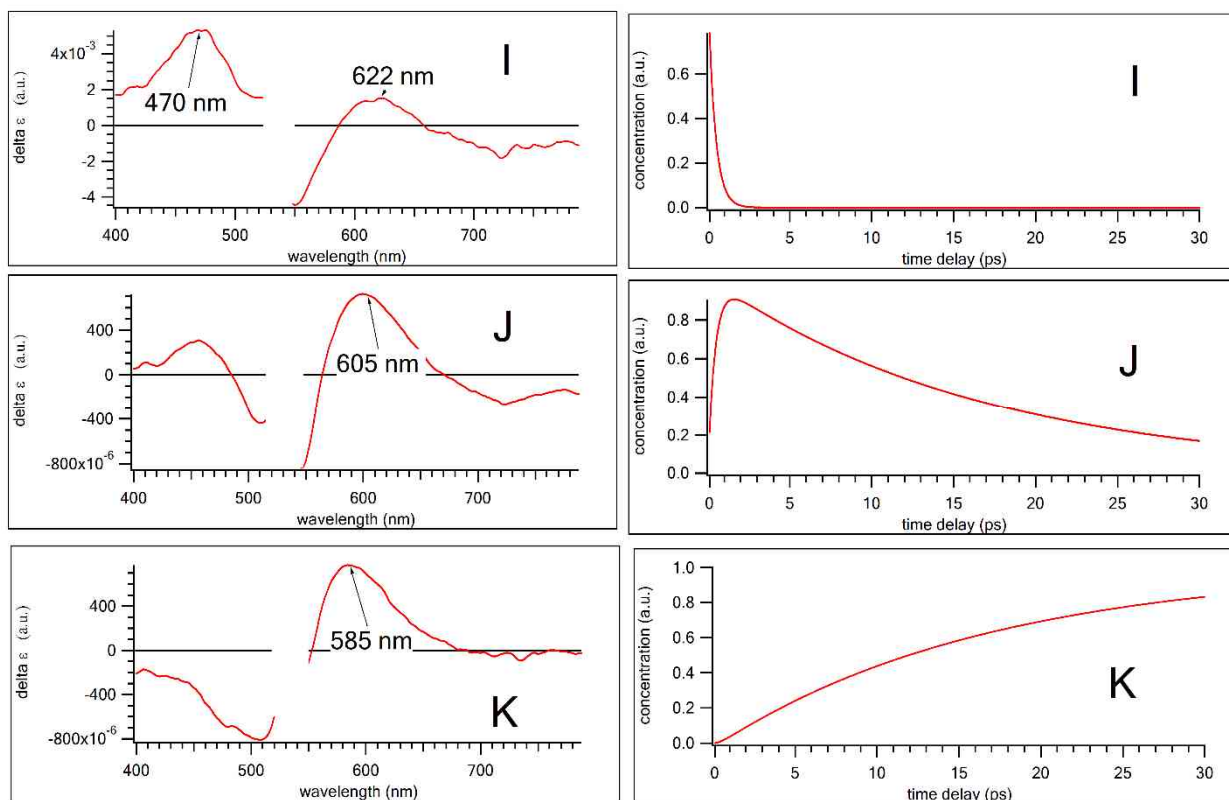


Рис.2 Спектры и кинетики интермедиатов I, J, K полученных из SVD разложения и последующего фитинга модели с двумя временными константами.

Имея в виду значительное сходство спектрально-кинетических характеристик BR и NaR можно заключить, что подобно BR, NaR демонстрирует плоский характер поверхности потенциальной энергии возбужденного состояния и присутствие малого барьера. Аналогично BR, для NaR тоже может быть использована модель, основанная на эволюции трех состояний для объяснения быстрой изомеризации.