

Л. В. Хитрина

4-КЕТОБАКТЕРИОРОДОПСИН И ОСОБЕННОСТИ ЕГО ФОТОЦИКЛА

Бактериородопсин (БР)¹ — протонная помпа, использующая энергию света [1, 2]. Структурно — это липохромопроteid, образующий специфические жидкокристаллические участки цитоплазматической мембраны бактерии *Halobacterium salinarum* (*halobium*) — ПМ [1, 2]. В углах такой решетки находятся белковые тримеры, молекулярная масса мономера — 26 кД. Хромофор образован взаимодействием ϵ -аминогруппы Lys216 и ретиналя, подобные структуры называют основаниями Шиффа или альдимидами [1–4]. Один из подходов к исследованию механизма данного молекулярного переносчика состоит в модификации хромофора, т. е. замене остатка ретиналя аналогами (см. [4–7]). 4-Кеторетиналь образует с апобелком пигмент, интересный крайне замедленными компонентами фотоцикла при большом квантовом выходе [5, 6, 8]. Поэтому с исследованием 4-кетобр связывают научные задачи и поиски вариантов создания фотохромных материалов для практического использования. Однако в конце XX в. группой исследователей была опубликована схема функционирования 4-кетобр, основанная на косвенных данных [9], которую до сих пор противопоставляют современным работам. Назрела необходимость обсуждения выводов этих работ. Цель данного обзора — сконцентрировать внимание на действительно важных особенностях 4-кетобраналога БР и показать, что мнение об исчерпывающей изученности главных особенностей фотоцикла аналога неверно и что потенциал исследований этого пигмента далеко не исчерпан и является ценным инструментом в дальнейшем изучении БР.

Краткая история исследования фотоцикла БР

Схема функционирования БР с главными интермедиатами появилась в 1975 г. [10]. Предполагали, что переходу одного интермедиата в другой соответствует одна экспонента, как реакции первого порядка. Однако при попытке сделать кинетическое описание цикла оказалось, что констант нужно значительно больше, чем переходов [11–13], поэтому требовался дополнительный путь: обратная реакция или разветвление. Эти результаты положили начало многочисленным гипотезам как о разветвлениях цикла, так и о неоднородности исходного пула молекул в невозбужденном состоянии, вступающих в параллельные циклы (см., например, [2, 12–20]). Последнему предположению способствовала легкость превращения почти однофазной релаксации М-интермедиата в заметно двух-трехфазную под действием самых разнообразных факторов (детергентов, повышения рН, высушивания, повышения давления [14, 21–23]). Когда показали, что все (или почти все) интермедиаты находятся в равновесии друг с другом [24], потребовались константы прямой и обратной реакций, мест экспериментальным параметрам хватило с избытком, а поиски параллельных превращений прекратились, и схема

¹ Условные сокращения: БР — бактериородопсин, ПМ — пурпурные мембраны, 13Z- — 13-цис-, all-E- — полностью-транс-.

© Л. В. Хитрина, 2012

с последовательным расположением интермедиатов стала общепринятой (одну из современных схем см. на рис. 1).

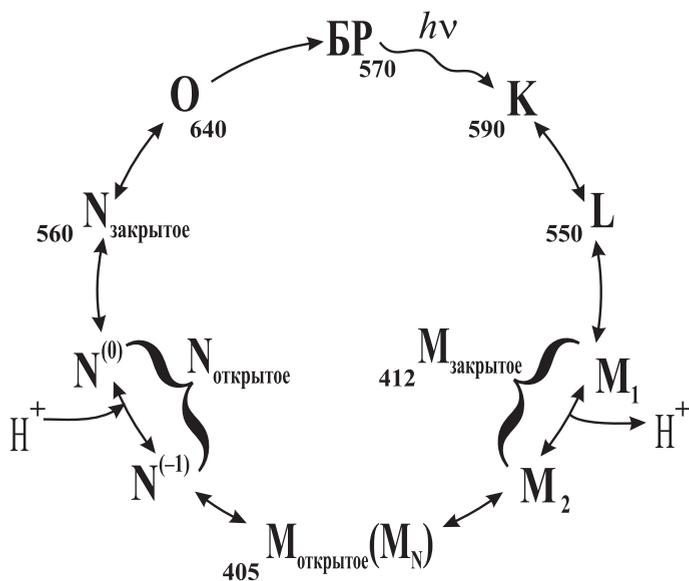


Рис. 1. Схема фотоцикла *all-E*-БР [25]

Изложенное относилось к пигменту с *all-E*-конфигурацией хромофора. В эту форму с максимумом поглощения 568–570 нм нативный БР переходит полностью при освещении ПМ [2]. В темноте устанавливается равновесие и около половины пигмента возвращается в 13*Z*-состояние (форма с максимумом поглощения 558–560 нм) [2, 26]. Получить БР с максимумом поглощения 548 нм, у которого весь хромофор находится в 13*Z*-конфигурации, можно только добавлением 13*Z*-ретинала к апоБР [2, 26, 27].

Впервые прямо изучили фотоцикл индивидуального 13*Z*-БР (БР548) немецкие ученые [26, 27]. В таком цикле нет коротковолновых интермедиатов (L и M), а лишь K-подобные. В отсутствие M нет протонного транспорта [2], а в быстрой кинетике электрического ответа отсутствуют характерные фазы [28]. 13*Z*-Цикл оказался частично разомкнутым, так как часть молекул переходила в *all-E*-конфигурацию [26, 27].

Однако изучение рН-зависимости быстрой кинетики оптических ответов тритоновых препаратов БР выявило странное несоответствие соотношения M-подобных и длинноволновых интермедиатов. Единственный непротиворечивый вывод: по мере роста рН происходит переход сольбилизованных молекул с 13*Z*-хромофором в состояние, генерирующее в фотоцикле M-интермедиат [29]. Сравнение быстрых кинетик электрогенеза светоадаптированных и темноадаптированных БР протеолипосом и ПМ подтвердило как это предположение, так и участие интермедиата M из 13*Z*-цикла в протонном транспорте [29–34]. Чем сильнее было изменено микроокружение молекулы БР, тем ниже оказывалось значение *pK* интермедиата M в 13*Z*-цикле. Для нативных ПМ *pK* в зависимости от ионной силы находится в интервале 8,5–9,5, для липосом *pK* = 7,6, для мономерного БР, сольбилизованного в тритоне X–100, *pK* < 5 [31, 34].

4-Кетоаналог БР

4-Кеторетиналь — один из первых аналогов ретиналя, восстановивший в апоБР основную полосу поглощения хромофора и функциональную активность [35, 36]. Этот полиеналь также образует окрашенный пигмент с обесцвеченным мономерным препаратом белка, солюбилизированным в тритоне X-100 [37]. Позже был определен максимум поглощения 4-кето-аналога БР — 506 нм [38, 39]. А в спектре его кругового дихроизма в области 400–600 нм выявлены характерные отрицательная и положительная полосы [38]. Считают, что сходство с характером аналогичных полос в спектре нативных ПМ свидетельствует об экситонном взаимодействии хромофоров в тримере 4-кетоаналога [40]. При регенерации 4-кеторетиналем белых² мембран штамма JW5 получили пигмент без «бабочки» в хромофорной полосе спектра кругового дихроизма с единственным положительным максимумом без отрицательного [41].

Впоследствии оказалось, что максимумы поглощения индивидуальных 13Z- и *all-E*-4-кетоБР достигаются, соответственно, при 504 и 527 нм [42]. Как тепловой, так и светоиндуцированный переход между этими конфигурациями хромофора затруднены и изменены в сравнении с нативным БР. Обычного для БР перевода всего хромофора в *all-E*-форму при освещении у 4-кетоаналога не происходит. Свет способствует частичным переходам в обе стороны: 13Z-4-кетоБР ↔ *all-E*-4-кетоБР [42]. Направление термоизомеризации совпадает с фотоизомеризацией. Эти переходы, даже в «правильном» направлении сильно замедлены, хотя и не до такой степени, как у 11,12-дидегидроБР или у фенильного и фторфенильного аналогов [42–44]. Подобное нарушение скорости и направления изомеризации не является редкостью для аналогов БР.

Тепловое равновесие форм 4-кетоБР сильно сдвинуто в сторону 13Z-конфигурации (506 нм в равновесном варианте в сравнении с 504 нм у 13Z-пигмента и 527 нм для *all-E*-формы) [38, 39, 42]. Однако в присутствии 50 мМ азида в водной суспензии мембран освещение позволяет перевести 4-кетоБР в форму с максимумом 522 нм (влияние азида на сдвиг максимума поглощения исчезает с $pK \sim 8$) [45].

В водной суспензии аналогов ПМ при pH 6 у 13Z-4-кетоБР наблюдают батоинтермедиаты, обычные для 13Z-цикла аналогов, при полном отсутствии M-подобных [42]. Цикл *all-E*-4-кетоБР в этих условиях сильно замедлен, полный его оборот при комнатной температуре занимает несколько минут [5, 8, 9, 42]. По данным быстрой кинетики максимум M-интермедиата в водной суспензии мембран, pH 6, при 21–25 °C — 410 нм [46]. Скорость образования M обычная, а релаксация резко двухфазна: начальная скорость распада близка к контролю, а «хвост» содержит сильно замедленные компоненты [5, 8]. Кинетика релаксации фотоиндуцированных изменений вблизи максимума основной полосы поглощения также сильно замедлена, но без резкого деления на быструю и медленную компоненты [42]. Это указывает на особенности второй половины фотоцикла: возврата из позднего (или открытого) M в исходное состояние — БР₅₂₇ [8, 47, 48]. Отмечены изменения соотношения компонент M с разной скоростью релаксации в зависимости от длины волны измерения [9].

Фотоцикл *all-E*-4-кетоБР протонпереносающий, и в быстрой кинетике генерации разности электрических потенциалов на плоской искусственной мембране тестируются сильно замедленные компоненты. При этом микросекундная часть нарастания

² Штамм JW5 не синтезирует ретиналь; если не добавлять последний в процессе роста культуры, то вместо ПМ формируются так называемые белые мембраны, содержащие бактериоопсин.

фотопотенциала, соответствующая образованию М-интермедиата в фотоцикле, и часть миллисекундной электрической фазы близки к контролю [5].

Эффективность выцветания основной полосы поглощения *all-E*-4-кетобР в ходе фотоцикла $\sim 0,7 \pm 0,1$ от контроля (в сравнении со светоадаптированными ПМ, полученными из ретиналя и апомембран в аналогичных условиях) [5, 49]; эффективность определяли как $(\Delta A_{4\text{-кетобР}}/A_{4\text{-кетобР}})/(\Delta A_{\text{контроля}}/A_{\text{контроля}})$, где A и ΔA — оптическая плотность в хромофорном максимуме поглощения пигмента и ее дифференциальное изменение в ходе фотоцикла после короткой насыщающей вспышки света.

Важным параметром взаимодействия аналогов полиеналя с белковой частью молекулы считают белковый или опсиновый сдвиг (OS), определяемый (согласно К. Наканиши) разностью обратных величин максимума поглощения протонированного основания Шиффа соответствующего полиеналя (SB^+) и пигмента на основе этого же полиеналя: $OS = 1/\lambda_{\max(SB^+)} - 1/\lambda_{\max(\text{пигмента})}$ [6]. Для *all-E*-4-кетобР $SB^+ = 445$ нм [5, 6, 49], максимум пигмента — 527 нм [42], соответственно $OS = 1/445 - 1/527 = 0,000350$. Для контроля (также с остатком ретиналя в *all-E*-конфигурации [6]) $OS = 1/440 - 1/568 = 0,000512$. Таким образом, белковый сдвиг 4-кетобР составляет 0,68% от контроля, что прекрасно согласуется со снижением эффективности фотоцикла. Следует отметить, что в наших ранних работах [5] изомерное состояние 4-кетобР не отслеживали достаточно строго. Однако апомембраны регенерировали *all-E*-4-кеторетиналем, хранили препарат в темноте при 5–8 °С, а для лучшей воспроизводимости оптических результатов в количественных измерениях использовали свежеполученные препараты, причем каждая аликвота препарата участвовала в ограниченном количестве измерений. Однако в таблицах из публикаций [5, 49] оказался максимум поглощения, ранее опубликованный участниками этой серии работ [38, 39]. При электрических измерениях быстрой кинетики [5, 49] имелись значительные различия в подготовительной засветке образцов. Вероятно, поэтому амплитуды генерации разности потенциалов, индуцированных короткой лазерной вспышкой света, у 4-кетобР варьировали в широких пределах и составили $\sim 0,25 - 0,7$ от контроля (принятого за единицу) [49]. В эти данные попали как препараты 4-кетобР с большой долей *all-E*-формы, так и сильно изомеризованные светом в 13Z- (статистику набирали по большому количеству образцов, ассоциированных с плоской искусственной мембраной, так как сам процесс ассоциации трудно стандартизовать количественно). Однако и в случае с электрическими измерениями верхняя оценка эффективности совпадает с эффективностью фотоцикла, полученной по оптическим измерениям.

БР давно является объектом нанотехнологических исследований [50–52], причем аналоги БР с разными максимумами основной полосы поглощения вызывают интерес с точки зрения получения фотохромных материалов [53]. Значительное замедление фотоцикла 4-кетобР при достаточно большой его эффективности привлекло внимание разработчиков подходов к практическому применению в рамках биотехнологических исследований [8, 46, 54–59]. Использование полимерной матрицы позволило дополнительно замедлить фотоцикл 4-кетобР в несколько раз [54]. Исследовали замену хромофора 4-кетобР аналогом у ряда других точечных мутантов БР [8, 58–62]. Наиболее сильным оказалось совместное замедление фотоцикла в результате мутации D96N и замены остатка ретиналя на его 4-кетобР аналог [8, 59–61].

Критический анализ схемы функционирования 4-кетобр с тремя параллельными циклами

В серии работ Л. С. Броуна, А. В. Дружко, Е. П. Лукашева, С. К. Чаморовского и др. предложена схема фотоцикла 4-кетобр (рис. 2) [9, 45, 63].

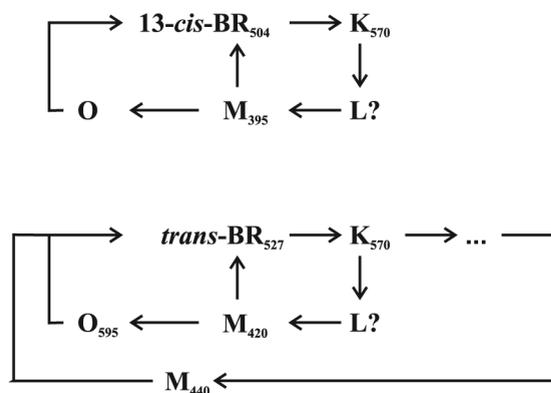


Рис. 2. Схема фотоцикла 4-кетобр согласно публикации [9] (времена авторов при перерисовке схемы опущены, а максимумы поглощения показаны в индексах как более общепринятый вариант)

[64–66] М-интермедиат природного светоадаптированного БР (т. е. пигмента в *all-E*-конфигурации) при низких температурах обладает выраженной вибронной структурой: максимум поглощения M_{412} при снижении температуры до -180°C сдвинут к 419 нм и интермедиат имеет отчетливые пики при $375, 398, 419$ и 442 нм . Учитывая весьма небольшую разницу основных максимумов М при комнатной температуре у БР (412 нм), и у 4-кетобр (410 нм) по данным исследования быстрой кинетики фотоцикла [46], различия низкотемпературных спектров интермедиатов БР и 4-кетобр также не должны быть велики, что и наблюдается при сравнении данных двух разных авторских групп. Три пика низкотемпературного спектра М-интермедиата 4-кетобр из работы [9] весьма похожи на выявленные в аналогичном спектре контрольного *all-E*-БР [64–66], значит, ни о каких «особенностях» 4-кетобр подобный трехгорбый спектр М не свидетельствует (ни о параллельных циклах с различными М, ни о наличии М в $13Z$ -цикле в экспериментальных условиях).

Следующий аргумент — появление максимумов коротковолновых форм 4-кетобр после длительного освещения препарата постоянным светом. Однако в контроле все интермедиаты цикла БР фоточувствительны: освещая М, можно получить как «синее ингибирование», т. е. быстрое закорачивание цикла с возвратом в исходное состояние [67, 68], так и появление многочисленных М-подобных форм [64, 69]. Под действием постоянного света будут избирательно накапливаться долгоживущие интермедиаты типа М, которых могло и не быть при однократном обороте цикла. Другой источник замедления — кооперативность в триаде [70]. С появлением импульсной спектrophотометрии серьезным указанием на интермедиат цикла можно считать форму, найденную при контролируемых переходах, а не накопленную в фотостационаре. Например, при освещении БР или одного из аналогов можно получить

Главное здесь — наличие трех циклов (один для пигмента с $13Z$ -хромомформом и два для формы с *all-E*-конфигурацией), причем во всех циклах фигурирует как батоинтермедиат К с максимумом поглощения 570 нм , так и М-интермедиаты. Основным аргументом авторов [9] — обнаруженные при низкотемпературной спектрофотометрии три четко выраженных максимума в спектре поглощения М-интермедиата ($395, 420$ и 440 нм). Однако практически те же максимумы (и даже большее количество) есть в аналогичном спектре немодифицированного БР. По данным С. П. Балашова, Ф. Ф. Литвина и Н. В. Карнеевой

розовую форму с 9Z-хромофором, которая явно к нормальному циклу отношения не имеет [71, 72].

Образование в 13Z-цикле М-интермедиата — не правило, а скорее, исключение, он появляется только при весьма высоких значениях рН (см. публикации группы Каулена [30–34, 73] и их обсуждение в разд. «Краткая история...»), в циклах ПМ и их аналогов его нет при рН 5–7. Даже в мономерном тритоновом препарате БР доля М-генерирующих молекул рН-зависима (в области от 5 и выше). Однако в публикации [45] отмечено про М-интермедиат: «...в Z-цикле, по нашим данным, он [М] фактически не зависит от рН в диапазоне 5–9». В работе [9] в методике приготовления препарата для низкотемпературных измерений авторы вовсе не указали рН среды, смешиваемой с глицерином. А в работе [63] появляется уточнение, что M_{395} появляется только, когда фотоцикл замедлен добавлением глицерина, высоким рН ($> 9,5$) или низкой температурой. При этом в работах [9] и [63] схема цикла дана для комнатной температуры и рН 7,5, т. е. для условий, где, по мнению самих же авторов, M_{395} они не видели [63]. А информация о наблюдениях M_{395} (М-интермедиата в 13Z-цикле 4-кетобр, см. рис. 2) в публикациях [45] и [63] взаимоисключающая. По нашим данным, прямых измерений на индивидуальном 13Z-4-кетобр при рН 6 в водной суспензии мембран как при комнатной, так и при более низкой температуре М отсутствовал (условия работы [42]). Если авторы [9, 45, 63] видят в 13Z-цикле при рН 7,5 (и даже при рН 5) М-интермедиат, то это и есть самый интересный и неожиданный результат. Только его необходимо не постулировать, а прямо проверять с индивидуальным 13Z-4-кетобром (аналогично БР, 4-кетобр, требуемой структуры, получают взаимодействием хроматографически чистых изомеров 13Z- и *all-E*-4-кеторетиналя с апомембранами в темноте или при слабом неактивном свете [42] и работают непродолжительное время до изомеризации). При этом нужны четкие указания условий эксперимента и схема цикла будет относиться только к этим условиям.

К тому же, как видно из исследования других аналогов БР [73], по мере перехода 13Z-препарата в состояние, генерирующее М-интермедиат, кинетика К-подобного батоинтермедиата сильно изменяется, так что в любом случае необходимо рассматривать 2 отдельных цикла для этих форм, как, например, в работе [31]. Долгоживущие К-подобные батоинтермедиаты в 13Z-циклах существуют именно в условиях, препятствующих образованию М, а появление М при движении вверх по шкале рН их убирает [31, 73], это альтернативные пути.

У БР с немодифицированным остатком ретиналя различаются максимумы поглощения К-интермедиатов (первых устойчивых при -180°C [64, 69]) в циклах пигментов с 13Z- и *all-E*-конфигурациями. Это соответственно ^{610}C и ^{630}T (по [26, 27] при низкотемпературной спектрофотометрии) или P580 и P590 (по [65, 66, 69]), последний в более общепринятом обозначении — K_{590} . Поэтому постулирование авторами [9] K_{570} во всех трех циклах настораживает. При однократном обороте фотоцикла индивидуального *all-E*-4-кетобр в длинноволновой области нами не обнаружено прироста оптической плотности во временной шкале 0,001–200с [42]. При этом в миллисекундной шкале у 13Z-4-кетобр наблюдаются обычные для 13Z-цикла батоинтермедиаты. Это неудивительно, так как в цикле немодифицированного *all-E*-БР (см. рис. 1) К-интермедиат весьма быстро переходит в коротковолновые интермедиаты (в отличие от цикла 13Z-пигментов, где после К регистрируют другие К-подобные батоинтермедиаты [2, 26, 27]). Поэтому логичнее относить K_{570} только к 13Z-циклу, тем более, что

прецеденты наблюдений долгоживущего К в *all-E*-циклах отсутствуют. К тому же обычный короткоживущий К-интермедиат *all-E*-цикла в смешанном препарате трудно различить на фоне более высокоамплитудного К из 13*Z*-цикла, поэтому наличие К₅₇₀ во всех циклах необходимо доказывать экспериментами с индивидуальным *all-E*-4-кетобР.

То же самое касается и предположения авторов [9] об отсутствии L-подобного интермедиата при фотореакциях 4-кетобР. Согласно быстрой кинетике в фотоцикле именно 13*Z*-4-кетобР имеются долгоживущие батоинтермедиаты [42], вполне способные экранировать L. А у индивидуального *all-E*-4-кетобР отсутствует медленная релаксация К-интермедиата, соизмеримая по времени с переходом в М-форму [42]. Однако именно так (медленной К→М релаксацией в *all-E*-цикле, исключаяющей L) интерпретируют наблюдаемую кинетику в работе [9] на препарате со смесью изомеров. Аналогичную ситуацию с интермедиатами можно было наблюдать в 13*Z*- и *all-E*-циклах похожих аналогов (фенил-, фторфенил- и 11, 12-дидегидробР [43, 44, 73]). Для фенилбР тоже выдвигалось предположение об отсутствии L-интермедиата [74], которое автор данной статьи специально проверял на *all-E*-пигменте и показал идентичность кинетик L-интермедиата в контроле и у аналога [43].

Таким образом, в обсуждаемой серии работ [9, 45, 63] не доказано ни наличия трех постулируемых циклов, ни присутствия К₅₇₀, релаксирующего в М, в каждом из них при рассматриваемых рН. А сам факт поисков гипотез работы аналога в области множественности параллельных циклов — дань времени, когда это делалось по историческим причинам весьма широко (см. разд.: «Краткая история...»).

Литература

1. Oesterhelt D., Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* // Nature New Biol. 1971. Vol. 233, N 39. P. 149–152.
2. Stoeckenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A. Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria // Biochim. Biophys. Acta. 1979. Vol. 505, iss. 3–4. P. 215–278.
3. Lanyi J. K. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle // Biochim. Biophys. Acta. 2006. Vol. 1757, iss. 8. P. 1012–1018.
4. Crouch R. K. Studies of rhodopsin and bacteriorhodopsin using modified retinals // Photochem. Photobiol. 1986. Vol. 44, iss. 6. P. 803–807.
5. Электрогенные стадии фотоцикла аналогов бактериородопсина, содержащих остатки производных ретиналя / Драчев А. Л., Драчев Л. А., Евстигнеева Р. П., Каулен А. Д., Лазарова Ц. Р., Лайхтер А. Л., Мицнер Б. И., Скулачев В. П., Хитрина Л. В., Чекулаева Л. Н. // Биол. мембраны. 1984. Т. 1, № 11. С. 1125–1142.
6. Аналоги ретиналя и их роль в исследовании бактериородопсина / Ходонов А. А., Еремин С. В., Локшин Дж. Л., Швец В. И., Демина О. В., Хитрина Л. В., Каулен А. Д. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22, № 10–11. С. 745–776.
7. Ring oxidized retinals form unusual bacteriorhodopsin analogue pigments / Beischel C. J., Mani V., Govindjee R., Ebrey T. G., Knapp D. R., Crouch R. K. // Photochem. Photobiol. 1991. Vol. 54, iss. 6. P. 977–983.
8. Хитрина Л. В., Миронова Е. В., Ходонов А. А. Исследование бактериородопсинов *Halobacterium salinarum* дикого типа и мутанта D96N с модифицированными хромофорами // Биол. мембраны. 2009. Т. 26, № 3. С. 194–200.
9. Броун Л. С., Дружко А. Б., Лукашев Е. П., Чаморовский С. К. Изучение фотохимического цикла аналога бактериородопсина, содержащего остаток 4-кето-ретиналя // Биол. мембраны. 1991. Т. 8, № 5. С. 460–467.

10. Lozier R. H., Bogomolni R. A., Stoerkenius W. Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium Halobium* // *Biophys. J.* 1975. Vol. 15, iss. 9. P. 955–962.
11. Stoerkenius W., Lozier R. H., Niederberger W. Photoreactions of Bacteriorhodopsin // *Biophys. Struct. Mechanism.* 1977. Vol. 3, N 1. P. 65–68.
12. Lozier R. H., Niederberger W. The photochemical cycle of bacteriorhodopsin // *Fed. Proc.* 1977. Vol. 36, iss. 6. P. 1805–1809.
13. Nagle J. F., Parodi L. A., Lozier R. H. Procedure for testing kinetic models of the photocycle of bacteriorhodopsin // *Biophys. J.* 1982. Vol. 38, iss. 2. P. 161–174.
14. Шкроб А. М., Родионов А. В. Множественность релаксирующих молекул бактериородопсина // *Биоорг. химия.* 1978. Т. 4, № 4. С. 500–513.
15. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Комраков А. Ю. Природа многокомпонентности образования интермедиата М при фотоцикле бактериородопсина. I. Анализ образования интермедиатов М у бактериородопсина дикого типа // *Биохимия.* 1994. Т. 59, вып. 1. С. 126–136.
16. Korenstein R., Hess B., Kuschnitz D. Branching reactions in the photocycle of bacteriorhodopsin // *FEBS Lett.* 1978. Vol. 93, iss. 2. P. 266–270.
17. Sherman W. V., Eicke R. R., Stafford S. R., Wasacz F. M. Branching in the bacteriorhodopsin photochemical cycle // *Photochem. Photobiol.* 1979. Vol. 30, iss. 6. P. 727–729.
18. Kalisky O., Ottolenghi M., Honig B., Korenstein R. Environmental effects on formation and photoreaction of the M412 photoproduct of bacteriorhodopsin: implications for the mechanism of proton pumping // *Biochemistry.* 1981. Vol. 20, iss. 3. P. 649–655.
19. Lanyi J. K. Proton translocation mechanism and energetics in the light-driven pump bacteriorhodopsin // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. Vol. 1183, iss. 2. P. 241–261.
20. Drachev L. A., Kaulen A. D., Komrakov A. Yu. On the two pathways of the M-intermediate formation in the photocycle of bacteriorhodopsin // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993. Vol. 30, N 3. P. 461–469.
21. Korenstein R., Hess B. Hydration effects on the photocycle of bacteriorhodopsin in thin layers of purple membrane // *Nature.* 1977. Vol. 270, N 5633. P. 184–186.
22. Váró G. Dried oriented purple membrane samples // *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 1982. Vol. 32, N 3–4. P. 301–310.
23. Crespi H. L., Ferraro J. R. Active site structure of bacteriorhodopsin and mechanism of action // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979. Vol. 91, iss. 2. P. 575–582.
24. Kinetic model of bacteriorhodopsin photocycle: pathway from M state to bR / Chernavskii D. S., Chizhov I. V., Lozier R. H., Murina T. M., Prokhorov A. M., Zubov B. V. // *Photochem. Photobiol.* 1989. Vol. 49, iss. 5. P. 649–653.
25. Калайdzидис И. В., Каулен А. Д., Радионов А. Н., Хитрина Л. В. Электрофотохимический цикл бактериородопсина // *Биохимия.* 2001. Т. 66, вып. 11. С. 1511–1526.
26. Dencher N. A., Rafferty Ch. N., Sperling W. Ber. Kernforsch. Jülich. 1976. N 1374. P. 1–42.
27. Sperling W., Carl P., Rafferty Ch. N., Dencher N. A. Photochemistry and dark equilibrium of retinal isomers and bacteriorhodopsin isomers // *Biophys. Struct. Mech.* 1977. Vol. 3, N 2. P. 79–94.
28. Фазы фотоэлектрического ответа 13-*цис*-бактериородопсина / Драчев А. Л., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П., Хитрина Л. В. // *Биохимия.* 1988. Т. 53, вып. 5. С. 707–713.
29. Зорина В. В., Каулен А. Д. Образование интермедиата М в фотоцикле адаптированного к темноте 13-*цис*-бактериородопсина. I. Солюбилизованный бактериородопсин // *Биол. мембраны.* 1988. Т. 5, № 9. С. 910–919.
30. Зорина В. В., Каулен А. Д. Образование интермедиата типа М в фотоцикле адаптированного к темноте 13-*цис*-бактериородопсина. II. Бактериородопсиновые протеолипосомы и пурпурные мембраны // *Биол. мембраны.* 1988. Т. 5, № 11. С. 1135–1144.
31. Kaulen A. D., Drachev L. A., Zorina V. V. Proton transport and M-type intermediate formation by 13-*cis*-bacteriorhodopsin // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. Vol. 1018, iss. 1. P. 103–113.
32. Kaulen A. D. Light-dark adaptation of bacteriorhodopsin and pH-dependence of 13-*cis*-bR photocycle // *EBEC Short Reports. Helsinki, Finland,* 1992. Vol. 7. P. 3.

33. Drachev L. A., Dracheva S. V., Kaulen A. D. pH dependence of the formation of an M-type intermediate in the photocycle of 13-*cis*-bacteriorhodopsin // FEBS Lett. 1993. Vol. 332, iss. 1–2. P. 67–70.
34. Kaulen A. D., Drachev L. A., Dracheva S. V. M-type intermediate formation during 13-*cis*-bacteriorhodopsin photocycle and light-dark adaptation // Proc. Vth Intern. Conf.: Structures and Functions of Retinal Proteins / ed by J. L. Rigaud. Dourdan, France: Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 1992. Vol. 221. P. 163–166.
35. Oesterhelt D., Christoffel V. Reconstitution of a proton pump // Biochem. Soc. Trans. 1976. Vol. 4, iss. 4. P. 556–559.
36. Sumper M., Herrmann G. Biogenesis of purple membrane: regulation of bacterio-opsin synthesis // FEBS Lett. 1976. Vol. 69, iss. 1. P. 149–152.
37. Шкроб А. М., Родионов А. В., Овчинников Ю. А. Обратимый фотоиндуцированный гидролиз альдимида ретиналя в солюбилизованном бактериородопсине // Биоорг. химия. 1978. Т. 4, № 3. С. 354–359.
38. Соколова Н. А., Мицнер Б. И., Закис В. И. Синтез 4-кето- и 4-оксипроизводных *all-E*- и 13Z-ретиналя и их взаимодействие с бактериоопсином // Биоорг. химия. 1979. Т. 5, № 7. С. 1053–1058.
39. Серебряный В. А., Мицнер Б. И., Закис В. И., Цетлин В. И. Аналоги бактериородопсина на основе 4-замещенных ретиналей // Биоорг. химия. 1981. Т. 7, № 11. С. 1731–1733.
40. Exciton interactions and chromophore orientation in the purple membrane / Ebrey T. G., Becher B., Mao B., Kilbride P., Honig B. // J. Mol. Biol. 1977. Vol. 112, iss. 3. P. 377–397.
41. Спектральные свойства аналога бактериородопсина, полученного встраиванием 4-кеторетиналя в бактериоопсин *in vivo* / Броун Л. С., Дружко А. Б., Кононенко С. К., Чаморовский С. К., Шахбазян В. Ю. // Биол. мембраны. 1993. Т. 10, № 2. С. 140–144.
42. Хитрина Л. В., Лазарова Ц. Р. Исследование 13-*цис*- и полностью-*транс*-изомеров 4-кето-бактериородопсина // Биохимия. 1989. Т. 54, вып. 1. С. 136–139.
43. Фотоцикл и электрогенез 13-*цис*- и полностью-*транс*-ароматических аналогов бактериородопсина / Драчев А. Л., Зорина В. В., Мицнер Б. И., Хитрина Л. В., Ходонов А. А., Чекулаева Л. Н. // Биохимия. 1987. Т. 52, вып. 9. С. 1559–1569.
44. 13-*Цис*- и полностью-*транс*-изомеры 11,12-дидегидробактериородопсина / Даншина С. В., Драчев А. Л., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Мицнер В. И., Хитрина Л. В., Ходонов А. А. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15, № 3. С. 307–312.
45. Броун Л. С., Дружко А. Б., Лукашев Е. П., Чаморовский С. К. Световая адаптация аналога бактериородопсина с 4-кеторетиналем // Биофизика. 1992. Т. 37, вып. 1. С. 79–85.
46. Modified bacteriorhodopsins as a basis for new optical devices / Khodonov A. A., Demina O. V., Khitrina L. V., Kaulen A. D., Silfsten P., Parkkinen S., Parkkinen J., Jaaskelainen T. // Sensors and Actuators B: Chemical. 1997. Vol. 39, iss. 1–3. P. 218–221.
47. Proton transport and electrogenous phases in the bacteriorhodopsin photocycle / Skulachev V. P., Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Zorina V. V., Danshina S. V. // Intern. Conf.: Retinal Proteins / ed. by Yu. A. Ovchinnikov. Utrecht, The Netherlands: VNU Science Press, 1987. P. 531–552.
48. Kaulen A. D. Electrogenic processes and protein conformational changes accompanying the bacteriorhodopsin photocycle // Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1460, iss. 1. P. 204–219.
49. An investigation of the electrochemical cycle of bacteriorhodopsin analogs with the modified ring / Drachev L. A., Drachev A. L., Chekulaeva L. N., Evstigneeva R. P., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Khodonov A. A., Lazarova Z. R., Mitsner B. I. // Arch. Biochem. Biophys. 1989. Vol. 270, iss. 1. P. 184–197.
50. Singh A. K., Hota P. K. Development of bacteriorhodopsin analogues and studies of charge separated excited states in the photoprocesses of linear polyenes // Photochem. Photobiol. 2007. Vol. 83, iss. 1. P. 50–62.
51. Bacteriorhodopsin as an electronic conduction medium for biomolecular electronics / Jin Y., Honig T., Ron I., Friedman N., Sheves M., Cahen D. // Chem. Soc. Rev. 2008. Vol. 37, iss. 11. P. 2422–2432.

52. *Hauptert L. M., Simpson G. J.* Chirality in nonlinear optics // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2009. Vol. 60. P. 345–365.

53. *Druzshko A. B.* Optical Characteristics of Polymer Films Based on Bacteriorhodopsin for Irreversible Recording of Optical Information // *Photochem. Photobiol.* 2009. Vol. 85, iss. 2. P. 614–616.

54. *Друшко А. Б., Жармухамедов С. К., Всеволодов Н. Н.* Фотоиндуцированные превращения 4-кето-бактериородопсина в полимерных матрицах // *Биофизика.* 1986. Т. 31, вып. 2. С. 227–230.

55. 4-Keto-bacteriorhodopsin films as a promising photochromic and electrochromic biological material / *Druzshko A. B., Chamorovsky S. K., Lukashev E. P., Kononenko A. A., Vsevolodov N. N.* // *Biosystems.* 1995. Vol. 35, iss. 2–3. P. 129–132.

56. The photochromic properties of 4-keto bacteriorhodopsin / *Jaaskelainen T., Leppanen V. P., Parkkinen S., Parkkinen J. P. S., Khodonov A.* // *Optical Materials.* 1996. Vol. 6, iss. 4. P. 339–345.

57. Nonlinear transmittance of the 4-keto bacteriorhodopsin / *Vanhanen J., Leppanen V. P., Jaaskelainen T., Parkkinen J. P. S., Parkkinen S.* // *Optical Materials.* 1999. Vol. 12, iss. 4. P. 473–480.

58. Photoelectric properties of bacteriorhodopsin analogs for color-sensitive optoelectronic devices / *Lensu L., Frydrych M., Parkkinen J., Parkkinen S., Jaaskelainen T.* // *Optical Materials.* 2004. Vol. 27, iss. 1. P. 57–62.

59. Measurement of proton release and uptake by analogs of bacteriorhodopsin / *Weetall H. H., Druzshko A. B., de Lera A. R., Alvarez R., Robertson B.* // *Bioelectrochemistry.* 2000. Vol. 51, iss. 1. P. 27–33.

60. *Druzshko A. B.* Photoinduced transformation of wild-type and D96N-mutant 4-keto-bacteriorhodopsin gelatin films // *Thin Solid Films.* 1997. Vol. 293, iss. 1–2. P. 281–284.

61. Optical and electrical properties of bacteriorhodopsin Langmuir-Blodgett films: II. D96N mutant and its 4-keto and 9-demethyl retinal analogs / *Weetall H. H., Druzshko A. B., Samuelson L. A., de Lera A. R., Alvarez R.* // *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* 1997. Vol. 44, iss. 1. P. 37–43.

62. *Kolodner P., Lukashev E. P., Ching Y.-C., Druzshko A. B.* Electric-field and photochemical effects in D85N mutant bacteriorhodopsin substituted with 4-keto-retinal // *Thin Solid Films.* 1997. Vol. 302, iss. 1–2. P. 231–234.

63. *Druzshko A. B., Chamorovsky S. K.* The cycle of photochromic reactions of a bacteriorhodopsin analog with 4-keto-retinal // *Biosystems.* 1995. Vol. 35, iss. 2–3. P. 133–136.

64. *Балашов С. П., Литвин Ф. Ф.* Фотохимические превращения бактериородопсина. М.: Изд-во МГУ, 1985. 163 с.

65. *Балашов С. П., Литвин Ф. Ф.* Фотохимические превращения бактериородопсина // *Биофизика.* 1981. Т. 26, вып. 3. С. 557–570.

66. *Карнеева Н. В., Балашов С. П., Литвин Ф. Ф.* Обнаружение сложной структуры спектра поглощения бактериородопсина // *ДАН СССР.* 1982. Т. 263, № 3. С. 725–729.

67. *Karvaly B., Dancsházy Z.* Bacteriorhodopsin: a molecular photoelectric regulator. Quenching of photovoltaic effect of bimolecular lipid membranes containing bacteriorhodopsin by blue light // *FEBS Lett.* 1977. Vol. 76, iss. 1. P. 36–40.

68. Kinetics of the blue light-induced inhibition of photoelectric activity of bacteriorhodopsin / *Dancsházy Z., Drachev L. A., Ormos P., Nagy K., Skulachev V. P.* // *FEBS Lett.* 1978. Vol. 96, iss. 1. P. 59–63.

69. *Балашов С. П.* Фотохромные превращения бактериородопсина при низких температурах // Светочувствительные биологические комплексы и оптическая регистрация информации / под ред. Г. П. Иваницкого. Пуццино: Научный центр биологических исследований в Пуццино, 1985. С. 49–67.

70. *Komrakov A. Y., Kaulen A. D.* M-decay in the bacteriorhodopsin photocycle: effect of cooperativity and pH // *Biophys. Chem.* 1995. Vol. 56, iss. 1–2. P. 113–119.

71. *Fischer U. Ch., Towner P., Oesterheld D.* Light induced isomerisation, at acidic pH, initiates hydrolysis of bacteriorhodopsin to bacterio-opsin and 9-cis-retinal // *Photochem. Photobiol.* 1981. Vol. 33, iss. 4. P. 529–537.

72. Characterization and photochemistry of 13-desmethyl bacteriorhodopsin / *Gillespie N. B., Ren L., Ramos L., Daniell H., Dewes D., Utzat K. A., Stuart J. A., Buck C. H., Birge R. R.* // *J. Phys. Chem. B.* 2005. Vol. 109, iss. 33. P. 16142–16152.

73. Образование М-подобного интермедиата в фотоцикле 13-*цис*-аналогов бактериородопсина / Драчев Л. А., Каулен А. Д., Хитрина Л. В., Еремин С. В., Ходонов А. А., Швец В. И., Чекулаева Л. Н. // Биохимия. 1993. Т. 58, вып. 6. С. 819–826.

74. *Umadevi P., Sheves M., Rosenbach V., Ottolenghi M.* Photochemical studies of artificial bacteriorhodopsins // *Photochem. Photobiol.* 1983. Vol. 38, iss. 2. P. 197–203.

Статья поступила в редакцию 7 июня 2012 г.