

## ИССЛЕДОВАНИЕ СЕЛЕКТИВНОСТИ ОКРУЖЕНИЯ ХРОМОФОР СВЯЗЫВАЮЩЕГО САЙТА МОЛЕКУЛЫ БАКТЕРИОРОДОПСИНА С ПОМОЩЬЮ АНАЛОГОВ РЕТИНОИДОВ

Ходонов А.А.<sup>1</sup>, Беликов Н.Е.<sup>1</sup>, Лукин А.Ю.<sup>2</sup>, Петровская Л.Е.<sup>3</sup>, Чупин В.В.<sup>4</sup>, Демина О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН  
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: khodonov@gmail.com

<sup>2</sup> МИРЭА – Российский технологический университет  
просп. Вернадского, 78, г. Москва, 119571, РФ

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, РФ; e-mail: lpetr65@yahoo.com

<sup>4</sup> Московский физико-технический институт  
г. Долгопрудный, 141700, РФ

Поступила в редакцию: 22.06.2020

**Аннотация.** На основе результатов собственных исследований и литературных данных была создана база данных “Properties of artificial bacteriorhodopsin analogs. From 1975 to 2019”, версия 2, 2020, суммирующая сведения о способности апобелка (бактериоопсина – ВО) к образованию ковалентных и нековалентных комплексов с различными полиеновыми соединениями и об их фотохимических и функциональных свойствах.

**Ключевые слова:** ретиналь-содержащие белки, бактериородопсин, изомеры и аналоги ретиналя, модификации хромофора, свойства аналогов бактериородопсина.

### Введение.

В течение последних 20-30 лет сформировались новые междисциплинарные области науки, объединившие ряд направлений биофизики, фотохимии, биоорганической химии и физико-химической биологии и получившие названия – нанобиофотоника и оптогенетика. В 2020 г. исполнится 15 лет с начала «эры оптогенетики» – использования генетически кодируемых фоточувствительных белков для регуляции активности клеток (в первую очередь, мембранного потенциала) при помощи света с определенной длиной волны [2-4]. Таким образом, разрабатываемые технологии оптогенетики (нейробиофотоники), которые состоят в использовании фоточувствительных белков микроорганизмов для контроля жизнедеятельности клеток животных, становятся все более и более популярными в лабораториях всего мира.

### Ретиналь-содержащие белки.

Объектами этих исследований служат уникальные биологические молекулярные преобразователи и конверторы энергии светового кванта в разнообразные виды химического или физиологического ответа. Среди них особое место занимают ретиналь-содержащие белки, которые играют ключевую роль в ряде важнейших биологических и физиологических процессов – зрении, росте и дифференцировке тканей, и светозависимом прямом и обратном транспорте протонов и ионов хлора, натрия, в фототаксисе в фотоуправляемых ферментах, в фотоуправляемых ионных каналах у некоторых видов микроорганизмов [1,5-8]. Эти хромопротеины, получившие общее название родопсины (уже числом более 1000), были найдены во всех биологических царствах от высших животных до архей, грибов, водорослей и эубактерий.

Витамин А и его производные – ретиноиды (2-4) (рис. 1) характеризуются широким спектром физиологической и фармакологической активности. Поскольку исходные производные ретиноидов нерастворимы в воде и в водных растворах, то по принятой классификации их относят к группе жирорастворимых витаминов. Участие ретиноидов в различных биологических процессах происходит опосредованно, через образование комплексов с рецепторами различной природы. Они подразделяются на две группы: 1) ковалентно-связанные (ретиналь-содержащие белки, родопсины); 2) нековалентно-связанные (ядерные рецепторы ретиноевой кислоты (4) (RAR, RXR), ретиноид-связывающие и ретиноид-переносящие белки и др.). С середины прошлого века во всем мире были развернуты исследования функциональной роли ретиноидов (производных витамина А) в процессах преобразования энергии светового кванта в этих биологических системах. Было показано, что при поглощении кванта света происходит изомеризация определенной двойной связи в полиеновой цепи молекулы, которая инициирует каскад событий, необходимых для генерации физиологических или химических реакций. В процессе эволюции это свойство молекулы ретиноидов было заложено природой в основу ряда путей трансформации энергии светового кванта в химическую энергию или в определенный физиологический ответ в биологических системах, как у высших животных, так и в микроорганизмах [7,10,11].

Хромофорная группа всех ретиналь-содержащих белков представляет собой протонированный альдимин (протонированное основание Шиффа, PSB, SBH<sup>+</sup>) определенного изомера ретиналя (3) (*all-E*- для микробных родопсинов и *11Z*- для зрительных пигментов), связанный с белком через ε-аминогруппу остатка Lys.

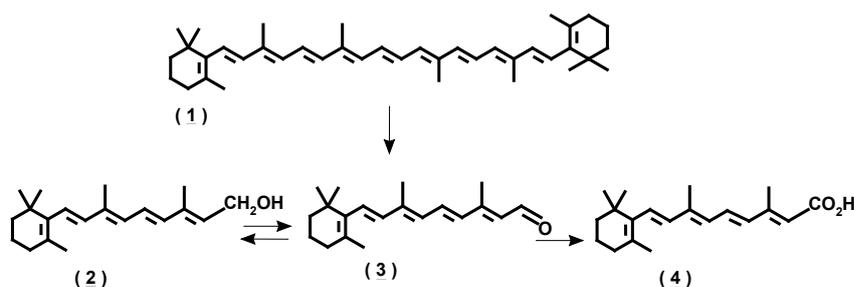


Рисунок 1. Основные представители ретиноидов: ретинол (1), ретиноль (2), ретиналь (3), ретиноевая кислота (4)

### Общие особенности структуры семейств ретиналь-содержащих белков.

Все ретиналь-содержащие белки (родопсины) имеют следующие общие особенности: 1) они представляют собой мембранные белки, структура которых состоит из 7  $\alpha$ -спиральных трансмембранных тяжей (7ТМ), соединенных между собой  $\beta$ -складками; 2) в качестве хромофорной группы они содержат определенный изомер ретиналя (3) (*all-E*- в пигментах микроорганизмов и *11Z*- в зрительных пигментах), который соединен с белком через протонированную альдиминную связь; 3) их общая функция связана с преобразованием энергии Солнца в различные химические или физиологические ответы; 4) для отдельных групп ретиналь-содержащих белков характерны следующие виды функциональной активности: светозависимый транспорт ионов, иницирование каскада зрительной трансдукции или управление фототаксисом [1,5-8,10,11].

### Бактериородопсин.

Бактериородопсин (BRh) – светозависимый протонный насос, представляет собой мембранный ретиналь-содержащий белок с молекулярным весом 26кДа. Его выделяют из экстремально галофильной бактерии *Halobacterium salinarum* (*halobium*) в виде пурпурных мембран. В следующем году исполняется 50 лет с момента открытия Д. Остерхельтом и В. Стокениусом этого уникального биофотохрома [1].

Комплексное изучение строения и функции BRh, благодаря его уникальным свойствам, началось сразу после его открытия. Необходимо отметить значительный вклад российской науки в этой области. В конце 70-х годов под руководством академика Ю.А. Овчинникова была создана программа «Родопсин» и в ходе ее выполнения был получен ряд приоритетных результатов: BRh был первым мембранным белком, для которого была установлена первичная аминокислотная последовательность, и сегодня он, как наиболее хорошо изученный микробный родопсин, служит в качестве образца биологического фотоуправляемого протонного насоса при исследованиях новых представителей родопсинов [18].

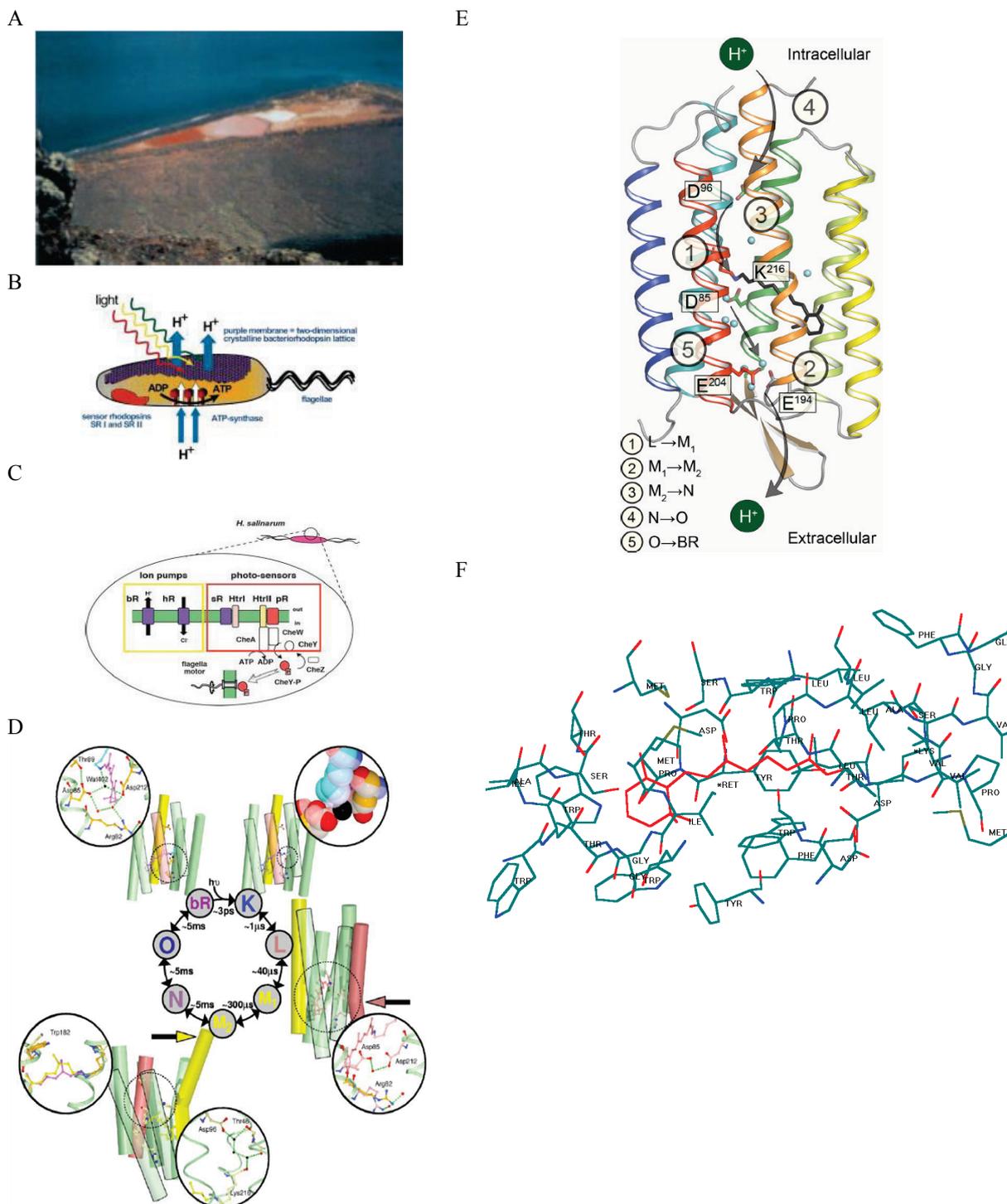
Его хромофорная группа – протонированный альдимин *all-E*-ретиналя (PSB, SBH<sup>+</sup>) с  $\epsilon$ -аминогруппой остатка Lys216, расположена в полости, формируемой боковыми цепями аминокислотных остатков ряда трансмембранных  $\alpha$ -спиральных тяжей, и разделяет канал передачи протона на две части: цитоплазматическую и внеклеточную. Донором и акцептором протона служат карбоксильные группы остатков Asp96 и Asp85. С цитоплазматической стороны клеточной мембраны канал формируется двумя молекулами воды (H<sub>2</sub>O<sup>501</sup>, H<sub>2</sub>O<sup>502</sup>) и следующими аминокислотными остатками: (Asp96-COOH --- OH-Thr46); (Thr46-C=O --- H<sub>2</sub>O<sup>502</sup> --- O=C-Lys216); (Ala215-C=O --- H<sub>2</sub>O<sup>501</sup> --- HN(индол)-Trp182). С внешней стороны протонного канала в трехмерной цепи межмолекулярных водородных связей участвуют семь молекул воды (H<sub>2</sub>O<sup>401-407</sup>), Asp85, Asp212, Thr89, Tyr185, Tyr57, Arg82, Glu194, Glu204 и Ser193 (см. рис. 2Е и 2F).

В результате поглощения кванта света в BRh происходит изомеризация C13=C14 двойной связи полиеновой цепи хромофора и перенос одного протона из цитоплазмы на внеклеточную сторону мембраны в физиологических условиях (pH > 7), затем конфигурация основного состояния хромофора (B-state), содержащая протонированный альдимин *all-E*-ретиналя (PSB, SBH<sup>+</sup>), восстанавливается. Эффективность канала переноса протонов примерно 200 циклов в секунду.

Цель настоящей работы состояла в разработке и осуществлении на практике комплексного подхода к исследованию структурно-функциональных отношений в микробных родопсинах путем химической модификации функционально значимых элементов структуры молекулы хромофорной группы. Для ее реализации необходимо решение следующих задач, заключающихся: 1) в поиске и создании новых синтетических подходов к разнообразным модификациям молекулы ретиноидов; 2) в исследовании физико-химических свойств и спектральных характеристик синтезированных соединений; 3) в изучении влияния разнообразных модификаций хромофорной группы BRh на его фотохимические свойства и протонный транспорт в пурпурных мембранах *H. salinarium* и в моделировании пространственных ограничений центра связывания хромофора этого белка.

### Фотоцикл BRh.

Фотохимия и фотофизика молекулы BRh были предметом интенсивных исследований [5-8,10-16]. Поглощение кванта света адаптированной к свету формой BRh<sup>L-A</sup> (B-state,  $\lambda_{\max}$  568 нм,  $\epsilon$  63.000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>), которая содержит хромофор в виде *all-E*-15-*anti*-PSB, запускает сверхбыстрый фотоцикл (время оборота 15-30 мс), в котором BRh претерпевает цикл спектральных переходов, сопровождающихся изомеризацией и



**Рисунок 2.** **A** – места обитания экстремальных галофилов *Halobacterium salinarum* в морских заливах или соленых озерах с концентрацией NaCl более 25%, **B**, **C** – структурные элементы и компоненты клеток *Halobacterium salinarum* (пурпурные мембраны и бактериородопсин (BRh), галородопсин (HRh) сенсорные родопсины (SRhI, SRhII) и др.); **D** – фотоцикл BRh, основные стадии, **E** – основные стадии в канале переноса протона BRh (файл ID PDB: 1C3W). **F** – топография хромофорной полости БР, симулированная с помощью программы NucleChem Pro v. 8.08.  $\alpha$ -Спирали 7ТМ показаны в следующих цветах: А, синий; В, зеленовато-голубой; С, зеленый; D, салатный; E, желтый; F, оранжевый; G, красный; хромофор – протонированный альдимин *all-E*-изомера ретиналя изображен в виде черных палочек, молекулы связанной воды в виде голубых шариков. Цифрами со стрелками обозначены последовательность стадий переноса протона; соответствующие переходы между фотоинтермедиатами фотоцикла BRh указаны на вставке и на рис. 2D. ① перенос протона от RSBH<sup>+</sup> (PSB) к первичному акцептору протонов Asp85; ② высвобождение протона во внешнюю внеклеточную среду из протон-релизинг комплекса – остатки Glu194 и Glu204; ③ репротонирование SB от первичного донора протонов Asp96; ④ репротонирование Asp96 захватом протона из цитоплазмы; ⑤ перенос протона от Asp85 в протон-высвобождающий комплекс [1,5-8,10,11]

реизомеризацией полиеновой цепи хромофора, сопряженной с депротонированием и репротонированием альдиминной связи, причем в ходе фотоцикла происходят значительные конформационные изменения белковой части молекулы BRh, особенно на стадиях образования и релаксации ключевого интермедиата М ( $\lambda_{\max}$  412 нм,  $\epsilon$  45.000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) и последующих интермедиатов (см. рис. 2D и 2E).

Адаптированное к темноте состояние хромофора BRh<sup>DA</sup> ( $\lambda_{\max}$  558 нм) состоит из смеси *all-E-15-anti*-PSB и *13Z-15-sin*-PSB 1:1. 3D-структура формы BRh<sup>DA</sup> с *13Z-15-sin*-PSB показала, что изомеризация C13=C14 двойной связи полиеновой цепи хромофора влияет на расположение ряда остатков вблизи PSB, но большинство остатков ароматических аминокислот, которые окружают хромофор и полипептидный остов Lys216 подвергаются лишь небольшим конформационным изменениям.

Длина цепи сопряжения полиеновой цепи хромофора, ее конфигурация и протонирование альдиминной связи служат ключевыми факторами, определяющими величину энергетической щели  $\pi - \pi^*$  перехода хромофора, так что поглощение большинства родопсинов находится в видимой области (400–700 нм). При образовании непротонированного альдимиона из полиеналя и н-бутиламина в УФ-спектре наблюдается гипсохромный сдвиг полосы поглощения относительно максимума альдегида на 10–30 нм ( $\lambda_{\max} \sim 360$ –380 нм). Последующее его протонирование сопровождается батохромным сдвигом от 65 до 100 нм, величина которого зависит как от особенностей структуры аналога ретиналя, так и от природы протонирующего агента и растворителя. Мы проводили эксперименты с использованием стандартного варианта – спектры были сняты в абсолютном метаноле, а протонирование осуществляли действием раствора HCl / MeOH.

BRh является одним из первых успешных примеров биологического фотохромного материала, разработанного самой природой [9]. Уникальность данного белка – природной фотоуправляемой фотосинтетической системы – для нужд нанобиофотоники определяется его следующими свойствами: 1) BRh – наиболее просто устроенный и необычайно стабильный фотоуправляемый протонный насос; 2) доступен в больших количествах, легко выделяется при достаточно низкой стоимости; 3) стабилен к интенсивному освещению, действию кислорода, в широком диапазоне температур (–196° – +70°C), значений pH (0–11), концентраций солей, в водно-глицериновых средах; 4) «первичный акт» после поглощения кванта света (B→J) – чрезвычайно быстрый процесс (0,5 псек); 5) высокое значение квантового выхода ( $\Phi$  0.64); 6) возможность получения «сухих» пленок и встраивания BRh в полимерную матрицу различного состава; 7) возможность применения как в оптических, так и в электронных устройствах, используя изменяющиеся либо оптическую, либо электрическую компоненты сигнала [9].

Дополнительные изменения фотохимических свойств BRh могут быть достигнуты путем использования следующих подходов: 1) замещением одного или нескольких аминокислотных остатков в определенных положениях молекулы BRh методами сайт-специфичного мутагенеза или генетической инженерии; 2) замещением остатка природного ретиналя (3) на его различные аналоги; 3) использованием физических воздействий различного рода (низких температур, электрических полей, изменение уровня влажности, pH и др.); 4) использование природного BRh, включенного в полимерную матрицу, ориентированные пленки Ленгмюра-Блоджетт или ориентированные слои, иммобилизованные на твердой подложке; 5) сочетанием нескольких перечисленных выше методов.

Таким образом, модификация молекулы хромофора является перспективным подходом к исследованию взаимосвязи структура-функция в BRh [10–16,18,19]. Аналоги нативного хромофора дали ценную структурную, спектроскопическую и функциональную информацию о структуре основного состояния хромофора в BRh до того, как стали доступны его 3D-структуры с высоким разрешением, и продолжают предоставлять информацию о возможной природе промежуточных продуктов фотоцикла. Аналоги ретиналя были получены с целым рядом модификаций его молекулы (см. рис. 4). Ранее нами была разработана общая процедура исследования взаимосвязи структура-функция в BRh. Получение аналогов BRh (ABR) и схема тестирования показаны на рис. 3. Было разработано несколько подходов к получению ABR, основанных на добавлении полиеналя (аналогов ретиналя):

- 1) к культивируемым клеткам ретиналь-дефицитных штаммов *H. salinarum* (например, JW5);
- 2) к «белым» мембранам или мембранным везикулам, полученным из ретиналь-дефицитных штаммов;
- 3) к так называемым апомембранам, содержащим бактериоопсин (BO), образующийся из пурпурных мембран путем гидроксиламинолиза при интенсивном освещении и при pH 7,0 и 0–5°C.

Хотя для установления самого факта встраивания полиеналя в BO пригоден любой метод, первые два подхода имеют существенные недостатки. Во-первых, пока не удастся добиться встраивания более 30–35% ретиналя в «белые» мембраны. По нашим данным, около 60–65% BO в «белых» мембранах неспособно образовывать пигмент. Кроме того, для этих мембран характерны нарушения трехмерной структуры. В этой связи, кажется естественным добавлять аналоги ретиналя к растущей культуре «белых» штаммов с последующим выделением фракции аналогов пурпурной мембран. Однако, культивирование ретиналь-дефицитных штаммов *H. salinarum* требует много времени, в течение которого реально разрушение, изомеризация или биотрансформация аналогов ретиналя. Следовательно, необходим большой избыток аналога ретиналя, что не всегда представляется возможным. С другой стороны, разные методы даже с использованием вполне стабильных полиеналя иногда приводят к пигментам, различающимся фотохимическими свойствами. При получении индивидуальных препаратов BO и ABR на их основе для фотохимических исследований остаточное количество ретинальоксида или избыток полиеналя необходимо удалять либо экстракцией органическими растворителями, или обработкой водными растворами бычьего сывроточного альбумина, или  $\beta$ -циклодекстрина [19].

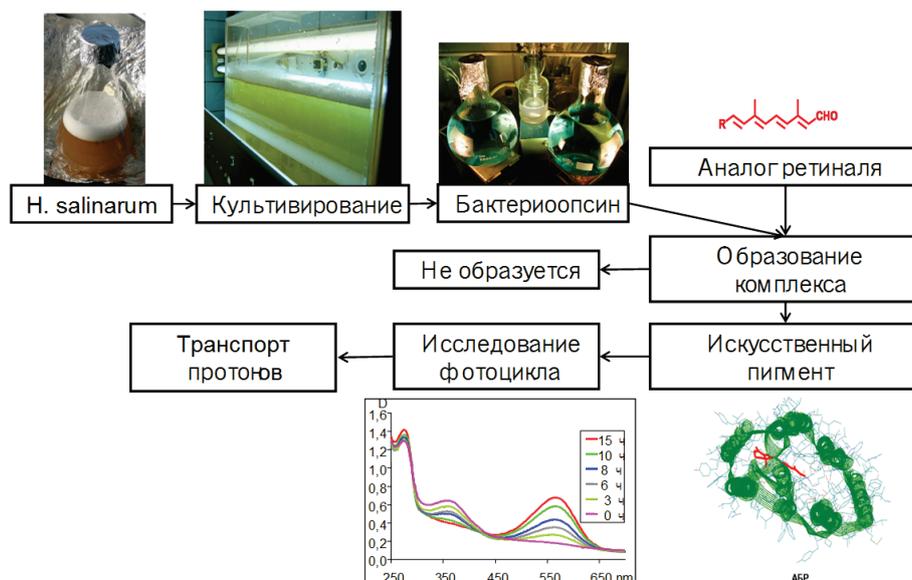
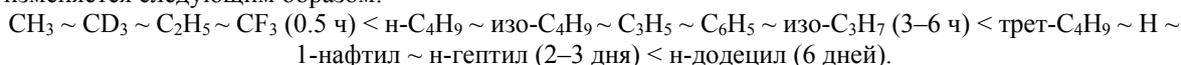


Рисунок 3. Технология производства и исследования свойств аналогов BRh

В наших исследованиях мы использовали третий подход с дополнительной процедурой удаления ретинальоксима, обработкой ВО насыщенным водным раствором β-циклодекстрина. Это вызвано тем, что некоторые полиенали встраиваются в ВО в течение нескольких суток и даже недель, поэтому остаточный ретинальоксим, содержащийся в апомембранах, может частично гидролизиться, приводя к появлению примеси природного BRh в препарате.

Синтезированные аналоги ретиналя были протестированы при рекомбинации с ВО из апомембран *H. salinarum* (штаммы 353P или ET1001). Апомембраны получали из пурпурных мембран гидроксиламинолизом при pH 7,0 и 0-5°C и интенсивном освещении. Ресинтез пигментов проводили добавлением метанольного раствора аналога ретиналя к суспензии апомембран в буфере (концентрация белка – 2 мг/мл, 21°C, pH 6,0, 5 mM MES). Взаимодействие полиеналей с ВО начинается с образования нековалентного комплекса с λ<sub>max</sub> в области 390–460 нм, который затем может, хотя и не всегда, превратиться в пигмент. Такое превращение обычно сопровождается батохромным сдвигом полосы поглощения, отражающим образование протонированного альдимины. Строгое отнесение продукта взаимодействия к комплексам или пигментам иногда сделать достаточно сложно. Кинетику этого процесса определяет множество факторов (вид штамма, температура, pH, удаление ретинальоксима из апомембран), поэтому достаточно сложно провести адекватное сравнение скоростей образования нековалентных комплексов и пигментов, исходя из данных, полученных в разных лабораториях. В связи с этим мы вынуждены ограничиться лишь временем полного завершения процесса реконструкции – t<sup>rec</sup>. Как правило, изменение этого параметра может варьироваться в широких пределах от 0.5 ч для нативного BRh до двух недель и более для метилпентенового аналога (136)<sup>1</sup>, даже в пределах одного типа модификации ФЗЭС ретиналя возможны его резкие скачки. Так, например, было показано, что значение t<sup>rec</sup> в серии С(13)-замещенных BRh изменяется следующим образом:



Обнаружено, что в случае 13-дезметилретиналя (9) существует резкое различие в скоростях образования пигментов из 13Z- и all-E-изомеров. В темноте пигмент из 13Z- образуется уже в течение 0.5 ч, тогда как для all-E-изомера требуется несколько дней. Увеличение параметра t<sup>rec</sup> на несколько порядков наблюдается и для пигментов, приготовленных из неизомеризующихся аналогов 13Z-ретиналя (135, 136). При модификации кольцевой части молекулы мы наблюдали аналогичные тенденции для t<sup>rec</sup>: 0.5–3 ч для С(4)-производных, 10–48 ч – для ароматических аналогов (184–186, 188, 190–195, 197, 203–205, 220, 229, 373, 386, 389–391, 423, 431, 436), и более 2 недель – для азуленового ABR (272). Выяснилось, что образование пигментов происходит от нескольких минут до одного месяца.

На завершающем этапе проводилось комплексное исследование искусственных пигментов (ABR): кинетические особенности образования ABR, спектральные свойства (λ<sub>max</sub>, наличие и тип фотохимического цикла, квантовый выход, наличие адаптация к свету и темноте, стабильность к действию ретиналя и гидроксиламина и эффективность транспорта протонов). Наибольший интерес в изучении фотоцикла ABR представляет М-интермедиат вследствие своего непосредственного участия в протонном транспорте. Следует отметить, что положение λ<sub>max</sub> ABR находится в интервале от 412 до 830 нм, хотя не все эти пигменты способны к циклическим фотохимическим реакциям.

<sup>1</sup> Номера аналогов ретиналя, выделенных жирным шрифтом соответствуют номерам соединений в базе данных [17]

### Определение формы и размера хромофорной полости БР. Оценка эффективности влияния отдельных функционально значимых элементов в структуре (ФЗЭС) хромофора.

Как было показано ранее нами для образования ковалентной связи между аналогом ретиналя и апобелком – бактериоопсином (ВО) необходимо наличие в молекуле аналога ретиналя фрагмента полиеновой цепи, содержащей от двух до четырех сопряженных кратных связей с терминальной формильной группой, в то время как триметилциклогексеновое кольцо может быть легко заменено на более массивный остаток [19]. На основе результатов собственных исследований и литературных данных была создана база данных “Properties of artificial bacteriorhodopsin analogs. From 1975 to 2019”, версия 2.0, 2020, суммирующая сведения о способности апобелка (бактериоопсина – ВО) к образованию ковалентных и нековалентных комплексов с различными полиеновыми соединениями и об их фотохимических и функциональных свойствах. Она включает перечисленные ниже структурные, спектральные и фотохимические параметры и другие сведения о продуктах взаимодействия более 440 полиеновых соединений с бактериоопсином (ВО) [17]. Глубина охвата литературы по базам Reaxys (Elsevier) и SciFinder<sup>n</sup> (CAS on line, ACS) и патентным источникам (USPTO; ЕРО и др.) 49 лет (1971 – середина 2020 г.). Количество ссылок по базе SciFinder<sup>n</sup> – 12960 и 562, по ключевым словам **bacteriorhodopsin** и **bacteriorhodopsin analog**, соответственно. К сожалению, сведения, приведенные в ряде работ, носят фрагментарный характер (часто ограничены только спектральными параметрами пигмента, без изучения особенностей фотоцикла и эффективности протонного транспорта), что существенно затрудняет критический анализ взаимосвязи структура хромофора-фотохимические свойства АBR. Основными дескрипторами являлись: структура конкретного тестируемого изомера полиенового соединения;  $\lambda_{\text{макс}}$  исходного соединения; моделей (оснований Шиффа с *n*-бутиламином в метаноле, в непротонированной и протонированных формах); нековалентного комплекса с бактериоопсином; пигмента в водном буфере (адаптированная к свету и темноте (LA и DA-формы); наличие и тип фотоцикла, его основные интермедиаты; эффективность протонного транспорта; изомерный состав хромофора (соотношение *all-E*- и *13Z*-изомеров); «опсиновый» сдвиг; устойчивость продуктов взаимодействия к гидроксиламину и *all-E*-ретиналю и прочие дополнительные данные. База данных размещена на сайте лаборатории кинетики и механизмов ферментативных и каталитических реакций Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН [17].

Структуры всех найденных полиеновых соединений были классифицированы на основании их отличий от молекулы природного хромофора (*all-E*-ретиналя (3)); были рассмотрены следующие серии аналогов ретиналя (А–К), отличающиеся определенными типами функционально значимых элементов структуры от молекулы природной хромофорной группы (рис. 4).

Рассмотрены следующие серии аналогов ретиналя:

- А – Natural chromophore – retinal and its isomers;
- В – Terminal polar group modification;
- С – Polyenic chain modification;
- Д – Alteration of the bond types and its disposition in the chromophore polyenic chain;
- Е – Alteration of the polyenic chain length and bond disposition and terminal group types;
- F – Alteration or locking of the bond configuration. Non-isomerizable analogs;
- G – Alteration of the trimethylcyclohexenic ring. Ring modification;
- H – Alteration of the trimethylcyclohexenic ring. Replacement ring to aromatic or heterocyclic fragments;
- I – Alteration of the trimethylcyclohexenic ring. Acyclic analogs;
- J – Miscellaneous modifications;
- К – Labelled BR derivatives (radioactive, photo-affinic, fluorophoric, heavy-atom, paramagnetic (SL), ionophoric and photochromic probes).

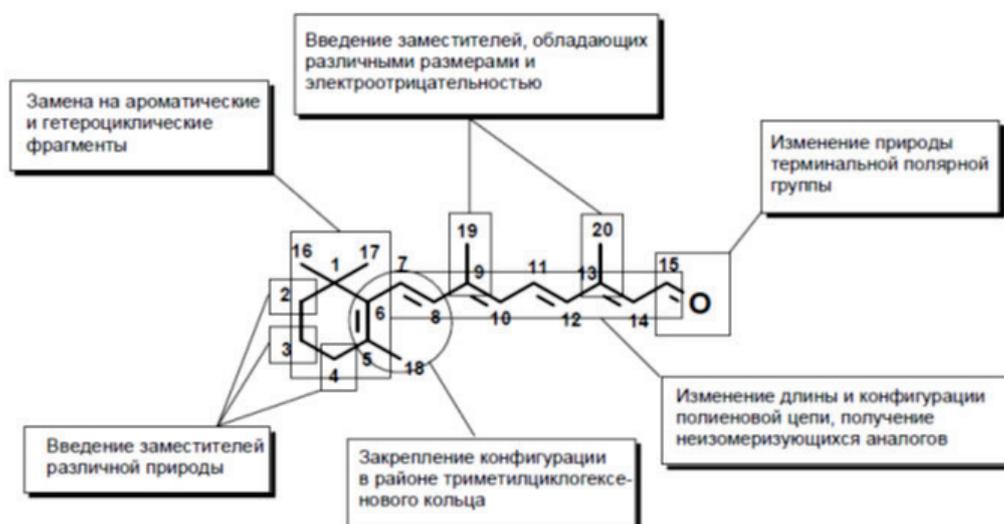


Рисунок 4. Основные направления модификации молекулы хромофора в ретиналь-содержащих белках

Максимумы поглощения каждого ретиналь-содержащего белка и настройка его фотофизических характеристик модулируются различными типами взаимодействий хромофорной группы с белковым микроокружением в хромофор-связующем сайте молекулы.

Для оценки возможности встраивания аналогов ретиналя в ВО и предсказания его результата необходимо определить пространственные ограничения, накладываемые размерами хромофорной полости BRh на структуру хромофора, что можно осуществить с использованием имеющихся к настоящему моменту 3D-структур BRh, полученных методом рентгено-структурного анализа. Исходные файлы координат находятся в Brookhaven Protein Data Bank. На сегодняшний день в базе PDB (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum>) доступны более 170 вариантов 3D-структур BRh как для дикого штамма, интермедиатов его фотоцикла, так и для мутантов. Нами из PDB были выбраны 3D-структуры BRh: файлы с кодом **1MOL** с разрешением 1,45 Å и файл с кодом **1C3W** с разрешением 1,55 Å.

Сравнение данных топографии хромофорной полости BRh, смоделированной с помощью программы HyperChem Pro v. 8.08 (рис. 2F) показало, что они практически очень близки к данным, полученным с помощью on-line ресурса LPC – Ligand-Protein Contacts (LPC) (<http://oca.weizmann.ac.il/oca-bin/lpcsu>). Критически проанализировав суммарные окончательные результаты, можно сделать заключение, что в районе триметилциклогексенового кольца хромофорную полость формируют следующие остатки аминокислот: Tyr83, Trp86, Met118, Gly122, Trp138, Ser141, Thr142, Met145, Tyr185, Pro186, Trp189. В районе полиеновой цепи остатка ретиналя в хромофорной полости расположены Asp85, Trp86, Thr89, Thr90, Ile119, Met145, Trp182, Tyr185, Pro186, Asp212.

Наиболее близкие контакты (менее 4Å) аминокислотных остатков BRh с атомами ретиналя:

- триметилциклогексеновое кольцо – Trp138, Ser141, Thr142, Met145, Pro186 и Trp189, расположенные в тяжах E и F;
- C<sub>9</sub>, 9-CH<sub>3</sub> – Met118, Trp182, Tyr185, расположенные в тяжах D и F;
- C<sub>13</sub>, 13-CH<sub>3</sub> – Thr90, Trp182, Tyr185, расположенные в тяжах C и F;
- N<sup>ε</sup>-(SB) – Asp85, Thr89, Asp212, расположенные в тяжах C и G.

Сравнительный анализ нашей базы данных, показал, что, диверсифицируя природу хромофора, можно напрямую изменять  $\lambda_{\max}$  в спектрах ABR в довольно широком интервале (от 412 до 830 нм), хотя далеко не все эти новые пигменты способны к циклическим фотохимическим реакциям.

Анализ полученных закономерностей в краткой форме представлен ниже, и для большей наглядности результаты сгруппированы по трем основным положениям модификации ФЗЭС хромофора BRh: А) район альдиминной связи с остатком Lys216 – (C(13)-атом ретиналя); Б) полиеновая цепь; В) район триметилциклогексенового кольца.

#### А) район (C(13) ретиналя – альдимин – Lys216):

Как было известно ранее, ВО способен эффективно взаимодействовать с образованием протонированного альдимины только с ретиналем, с остальными производными ретиноидов (ретинол (2), ретиноевая кислота (4) и др.) этот процесс останавливается либо на стадии нековалентного комплекса, либо вообще полностью блокирован [19]. Данная область хромофора BRh подвергалась наиболее интенсивному исследованию, так как изомеризация C(13)=C(14)-связи несомненно является «первичным актом» фотохимического цикла BRh. Впервые это было строго доказано проф. К. Наканиси с помощью аналогов с фиксированной конфигурацией *all-E*- и 13Z-C(13)=C(14)-связи (133,135), а впоследствии был синтезирован дополнительный ряд *all-E*-(123–128,129,132–134,354) и 13Z-(135–141) неизомеризирующихся ABR, чтобы изучить пространственные ограничения хромофора в этой области. Из наших данных следует (ср. серию *all-E*-неизомеризирующихся - ABR (123–128,354,132,134), что у этих полиеналей возможность образования альдиминной связи блокирована: для (132,134) вероятной причиной является отсутствие метильной группы у C(13)-атома ретиналя; в то время как для аналога (129) с фурановым циклом, проф. М. Шивиз показал образование функционально-активного ABR (эффективность протонного транспорта 11%), а для (133) характерно медленное формирование ABR, у которого фотоцикл и протонный транспорт отсутствует). Если в серии неизомеризирующихся 13Z-ABR (135) и (136) показано образование пигментов, то для их высших гомологов (137–141) этот процесс блокирован; расчеты показали, что различия в размерах полиеналей, критичные для формирования пигментов, составляют примерно 1.5 Å. В аналогах (135), (137), (138), кроме различий в размерах цикла, нельзя исключить и иных причин столь различного их поведения. Так, компьютерное моделирование показало, что у полиеналя (135) конформация цикл-полиеновая цепь близка к планарной, а в соединениях (137) и (138) формильная группа повернута на угол около 30° относительно плоскости сопряжения, что блокирует возможность образования альдиминной связи с ε-аминогруппой Lys216.

Сложнее интерпретировать данные о большой серии ABR (9–28), содержащих заместители при C(13)-атоме ретиналя. Мы полагаем, что хромофорная полость в этом районе напоминает плоскую щель, и решающую роль играет не столько размер вводимой группы, сколько ее «объемистость»: так, полиенали с крупными, но плоскими заместителями (нафтил-, фенил-) легче образуют с ВО ABR, чем полиеналь с *трет*-бутильной группой.

Введение дополнительных заместителей при C(14) также сильно влияет на результат взаимодействия аналога ретиналя и ВО: так, если 14-(F или Cl)-ретинали (70,72), хотя и медленно, но реагируют с ВО с образованием пигментов, то 14-метил-ретиналь (62) дает пигмент, у которого альдиминная связь непротонирована, а у 14-(Br)-аналогов (73,74) этот процесс блокирован полностью.

**Б) изменение конфигурации, длины и степени ненасыщенности полиеновой цепи хромофора.**

Несомненно, наиболее сильно на результатах взаимодействия полиенала с ВО сказывается конфигурация полиеновой цепи. В отличие от зрительных пигментов, апобелки которых связываются только с 11Z- или 9Z-изомерами аналогов ретиналя, в BRh альдиминную связь с  $\epsilon$ -аминогруппой Lys216 могут образовать только *all-E*- и 13Z-изомеры ретиналя и его аналогов. Пока обнаружено лишь несколько исключений: 11Z- и 7Z-13-дезметилретинали и 9Z-нафтилретиналь. При продолжительном освещении *all-E*-изомера 11,12-дидегидро-BRh (85) нами был получен новый пигмент, хромофор которого идентифицирован как 9Z-11,12-дидегидроретиналь. Этот пигмент и его 9Z,13Z-изомер далее ресинтезировали из ВО и соответствующих полиеналей.

Нами было установлено, что ВО способен образовывать пигменты с полиеналами, имеющими полиеновую цепь длинее, чем у природного ретиналя. Однако, если у C<sub>22</sub>-BRh (110) сохраняется фотоцикл и слабый протонный транспорт, то у C<sub>25</sub>-BRh (113) фотоцикл почти не выражен. Еще более драматичное влияние оказывает изменение чередования кратных связей. Так, аналог C<sub>21</sub>-BRh (112), хотя и имеет оптимальную длину и обладает  $\lambda_{\max}$ , близким к природному BRh, из-за ретро-структуры расположения двойных связей в полиеновой цепи полностью лишен фотоцикла.

Ранее проф. К. Наканиси продемонстрировал возможность образования пигментов из ВО и ряда частично гидрированных аналогов ретиналя (143,88–92), однако, уже при удалении даже одной двойной связи из цепи сопряжения в 5,6-дигидро-BRh (143) эффективность протонного транспорта заметно снижена. С другой стороны, литературные и наши собственные данные показывают, что при введении тройной связи в положения молекулы хромофора C(7)-C(8)-(84), или в C(11)-C(12)-(85) соответствующие ABR имели фотоцикл и были способны к транспорту протонов, хотя аналогичная модификация C(13)-C(14)-связи полностью блокировала образование хромопротеина (86).

**В) модификации триметилциклогексенового кольца хромофора.**

Проф. Й. Лютенбургом было показано, что у BRh и других микробных родопсинов в молекуле хромофора конформацией триметилциклогексеновое кольцо – полиеновая цепь является *6-s-транс*-конформер, хотя в растворах свободный ретиналь или в его SBH<sup>+</sup> находятся в *6-s-цис*-конформации. Это вносит дополнительный вклад в длину цепи сопряжения и способствует значительному батохромному сдвигу в спектрах BRh и других микробных родопсинов. Современные данные позволяют говорить об отсутствии жестких пространственных ограничений хромофорной полости BRh вокруг кольца ретиналя в отличие от зрительных пигментов. Таким образом, образованию пигмента не препятствуют различные модификации кольца по C(5), C(4), C(3), C(2)-положениям и C(5)=C(6)-связи и даже его удаление (236–239,241–254,368,371) или замена на ароматические и гетероциклы, различающиеся как размером, так и электронной природой заместителей (142–205,206–233,256–259,261–284,311–315,361,365–367,369,373,376–378,386,388–391,402,406,410,414,416,423,427,431,432,436). Дополнительно хотелось бы сделать ряд замечаний:

1. Практически для всех пигментов, содержащих C(4)-заместители различной природы, характерен гипсохромный сдвиг полосы поглощения в голубую область спектра (168–173,175–183,355,360,374,375), исключение составляет 4-гидрокси-BRh (174), спектральные свойства которого близки к природному пигменту.

2. У всех C(4)-ацилксипроизводных BRh (180,181,355,374,375) сложноэфирная связь быстро гидролизуетс с образованием 4-гидрокси-BRh (174). Аналогичное явление было обнаружено Р. Кроуч у C(4)-галогензамещенных BRh (168–170).

3. Асимметрия белковой полости в области кольца проявляется в чувствительности к ориентации заместителей у C(3), C(4) или C(5) и C(6)-атомов кольца, приводящей в ряде случаев к нескольким спектральным формам хромопротеида.

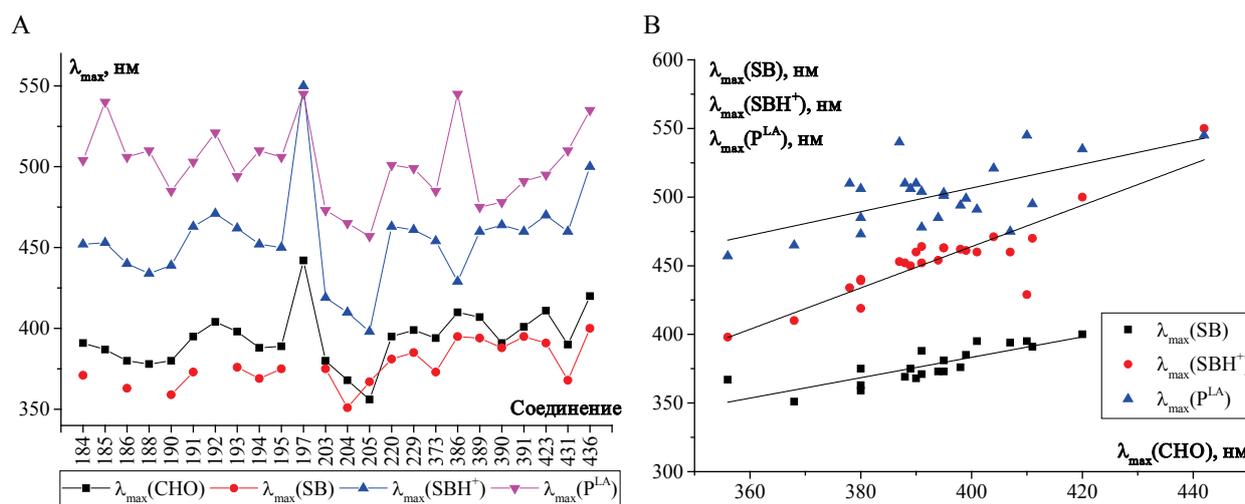
4. Электронная природа заместителей при C(5)-атоме может иметь решающее влияние на светозависимый транспорт протонов: удаление метильной группы в положении C(5) или ее замена на OCH<sub>3</sub>, Br резко снижает эффективность протонного транспорта, а замещение на CF<sub>3</sub> полностью блокирует этот процесс.

5. Большинство длинноволновых аналогов BRh (256–259,261–284,285–290,295–299,301) с полосой поглощения 700–830 нм, содержащих азуленовые или индолные кольца, лишены фотоцикла и неспособны к световой адаптации и протонному транспорту.

Результаты, полученные в нашей лаборатории, показывают, что различные типы модификации триметилциклогексенового кольца хромофорной группы BRh (замена его циклами различной природы и размера, удаление его) не препятствуют образованию искусственных пигментов из ВО и аналогов ретиналя такого рода. Этот факт подтверждают проведенные нами компьютерные оценки размеров хромофорной полости BRh района триметилциклогексенового кольца (7.5–12 Å). С другой стороны, в области полиеновой цепи и альдиминной связи белковое микроокружение накладывает жесткие стерические ограничения на структуру хромофора.

Представленные в нашей базе [17] данные показывают, что в рамках одного типа модификации ФЗЭС хромофора (серии ароматических аналогов ретиналя, 11,12-дидегидропроизводных, C(13)-замещенных и неизомеризующихся ретиналей, аналогов с модифицированным триметилциклогексеновым кольцом) функция изменения положения максимумов поглощения в зависимости от структурных особенностей в координатах (Y)  $\lambda_{\max}$  SB (SBH<sup>+</sup>, P(LA)) / (X)  $\lambda_{\max}$  СНО достаточно хорошо описывается уравнениями линейной регрессии.

Ниже приведен выборочный пример расчетов зависимостей спектральных параметров для типа модификации ФЗЭС хромофора (для серии ароматических аналогов ретиналя (184–186,188,190–195,197,203–205,220,229,373,386,389–391,423,431,436), у которых триметилциклогексеновое кольцо заменено ароматическими или гетероциклическими фрагментами (см. также рис. 5)):



**Рисунок 5.** А – Параметры спектров поглощения ароматических аналогов ретиналя, их альдеминов с *n*-бутиламином и пигментов на основе ВО. В – Влияние строения ароматических аналогов ретиналя на спектральные свойства их альдеминов с *n*-бутиламином и пигментов на основе ВО.

$$\begin{aligned} \lambda_{\max}(\text{SB}): y &= 0.7434x + 85.919; R^2 = 0.69; \\ \lambda_{\max}(\text{SBH}^+): y &= 1.5058x - 138.42; R^2 = 0.79; \\ \lambda_{\max}(\text{P}^{\text{LA}}): y &= 0.8632x + 161.36; R^2 = 0.40; \text{ где } x - (\lambda_{\max} \text{ CHO}). \end{aligned}$$

Эти данные могут быть использованы для прогноза спектральных свойств новых АВР и других ретиналь-содержащих белков [18,19].

Найденные закономерности имеют не только чисто теоретическое значение, но и позволят осуществлять в будущем направленный поиск и прогнозирование спектральных свойств новых АВР в рамках исследованных серий модификаций ФЗЭС молекулы хромофора. Это обстоятельство представляет значительный интерес при направленном получении новых АВР с заданным набором спектральных и фотохимических свойств для нужд нанобиофотоники.

Работа была частично поддержана РФФИ (проекты № 20-03-00139, №17-00-00165 комфу).

#### Список литературы / References:

- Oesterhelt D., Stoekenius W. Rhodopsin-like protein from purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature (New Biologist)*, 1971, vol. 233, pp. 149-151, DOI: 10.1038/newbio233149a0.
- Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nature Neurosci.*, 2015, vol. 18, pp. 1213-1225. DOI: 10.1038/nn.4091.
- Boyden E.S. Optogenetics and the future of neuroscience. *Nature Neurosci.*, 2015, vol. 18, pp. 1200-1201. DOI: 10.1038/nn.4094.
- Говорунова Е.Г., Коппель Л.А. Путь к оптогенетики: родопсиновые белки микроорганизмов. *Биохимия*, 2016, т. 81, № 9, с. 1172-1186. [Govorunova E.G., Koppel L.A. The road to optogenetics. Microbial Rhodopsins. *Biokhimiya*, 2016, vol. 81, no. 9, pp. 1172-1186. (In Russ.)] DOI: 10.1134/S0006297916090029.
- Stoekenius W., Lozier R., Bogomolni R.A. Bacteriorhodopsin and purple membrane of Halobacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, vol. 505, no. 3-4, pp. 215-279. DOI: 10.1016/0304-4173(79)90006-5.
- Kandori H. Biophysics of rhodopsins and optogenetics. *Biophys. Rev.*, 2020, DOI: 10.1007/s12551-020-00645-0.
- 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, no. 1, pp. 126-163, DOI: 10.1021/cr4003769.
- Gushchin I., Gordeliy V. *Membrane Protein Complexes: Structure and Function. Subcellular Biochemistry*, (Harris J.R., Boekema E.J. Eds), 2018, vol. 87, ch. 2, pp. 19-56.
- Li Y.-T., Tian Y., Tian H., Tu T., Gou G.-Y., Wang Q., Qiao Y.-C., Yang Y., Tian-Ling Ren T.-L. A Review on Bacteriorhodopsin-Based Bioelectronic Devices. *Sensors*, 2018, vol. 18, no. 5, pp. E1368. DOI: 10.3390/s18051368.
- Мицнер Б.И., Ходонов А.А. Хромофорные группы ретинилиденпротеидов. «Светочувствительные биологические комплексы и оптическая регистрация информации». Ред. Иваницкий Г.Р., Пушкино: АН СССР, 1985, с. 38-49. [Mitsner B.I., Khodonov A.A. Chromophoric groups of retinylideneproteins. Light-sensitive biocomplexes and optical registration of the information. Ivanitsky G.R. Ed., Puchshino: RAS, 1985, pp. 38-49. (In Russ.)]
- Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids*. Eds. Dawson M.I., Okamura W.H., Boca Raton: CRC Press Inc., 1990, 627 p. DOI: 10.1201/9781351070638.

12. Мицнер Б.И., Ходонов А.А., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П. Аналоги ретиналя: синтез и взаимодействие с бактериоопсином. *Биоорганическая химия*, 1986, т. 12, № 1, с. 5-53. [Mitsner B.I., Khodonov A.A., Zvonkova E.N., Evstigneeva R.P. Analogues of retinal: synthesis and interaction with bacterioopsin. *Bioorgan. Khim. (Rus)*, 1986, vol. 12, no. 1, pp. 5-53 (In Russ.)]
13. Mitsner B.I., Khodonov A.A., Zvonkova E.N., Karnaukhova E.N. Retinal analogs and N-retinylidenepeptides as tools for investigation of bacteriorhodopsin and rhodopsin chromophoric binding sites. *Retinal Proteins*. Ed. Ovchinnikov Yu.A. Utrecht: VNU Press, The Netherlands, 1989, pp. 561-569.
14. Ходонов А.А., Еремин С.В., Локшин Дж.Л., Швеце В.И., Демина О.В., Хитрина Л.В., Каулен А.Д. Аналоги ретиналя и их роль в исследовании бактериородопсина. *Биоорганическая химия*, 1996, т. 22, № 10-11, с. 745-776. [Khodonov A.A., Eremin S.V., Lockshin J. L., Shvets V.I., Demina O.V., Khitrina L.V., Kaulen A.D. Retinal analogs and their application for bacteriorhodopsin investigation. *Bioorgan. Khim. (Rus)*, 1996, vol. 22, no. 10-11, pp. 745-776. (In Russ.)]
15. Barachevsky V.A., Khodonov A.A., Belikov N.E., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Demina O.V., Luyksaar S.I., Krayushkin M.M. Properties of Photochromic Retinals. *Dyes and Pigments*, 2012, vol. 92, no. 2, p. 831-837, DOI: 10.1016/j.dyepig.2011.05.009.
16. Ходонов А.А., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Фомин М.А., Демина О.В., Складнев Д.А., Тюрин С.А., Швеце В.И. Гибридные аналоги ретиноидов: как инструменты для исследований в области нанобиофотоники. *Вестник МИТХТ*, 2011, т. 6, № 2, с. 15-36. [Khodonov A.A., Laptev A.V., Lukin A.Y., Belikov N.E., Fomin M.A., Demina O.V., Skladnev D.A., Tyurin S.A., Shvets V.I. Retinoid hybrids as instruments for nanobiophotonics researches. *Vestnik MITHT*, 2011, vol. 6, no. 2, pp. 15-36. (In Russ.)]
17. Khodonov A.A., Belikov N.E., Demina O.V. *Database Properties of artificial bacteriorhodopsin analogs*. From 1975 to 2019. Eds. Chupin V.V., Varfolomeev S.D. Version 2, 2020, Moscow, IBCP/MIPT, 186 p., URL: [http://biochemphysics.ru/assets/upload/documents/docs/BRDT\\_v2.pdf](http://biochemphysics.ru/assets/upload/documents/docs/BRDT_v2.pdf).
18. Belikov N.E., Melnikova I.A., Demina O.V., Petrovskaya L.E., Kryukova E.A., Dolgikh D.A., Kuzmichev P.K., Chupin V.V., Lukin A.Yu., Shumsky A.N., Chizhov I., Levin P.P., Kirpichnikov M.P., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. The effect of the chromophoric group modification on the optical properties of retinal proteins. *Mendeleev Communications*, 2018, vol. 28, no. 4, pp. 406-408. DOI: 10.1016/j.mencom.2018.07.022.
19. Ходонов А.А. Синтетический подход к исследованию взаимосвязи структура-активность в ретиноид-белковых комплексах: бактериородопсине и ядерных рецепторах ретиноевой кислоты. Диссертация на степень д.х.н. *Биоорганическая химия*, 1997. [Khodonov A.A. Synthetic Approach to Investigation of Structure-Activity Relationships in Retinoid-Protein Complexes: Bacteriorhodopsin and Retinoic Acid Nuclear Receptors. Doctor of Sciences Degree Thesis. *Bioorganic Chemistry*, 1997. (In Russ.)]

## INVESTIGATION OF MICROENVIRONMENT SELECTIVITY IN THE BACTERIORHODOPSIN CHROMOPHORE BINDING SITE BY RETINOID ANALOGS APPLICATION

Khodonov A.A.<sup>1</sup>, Belikov N.E.<sup>1</sup>, Lukin A.Yu.<sup>2</sup>, Petrovskaya L.E.<sup>3</sup>, Chupin V.V.<sup>4</sup>, Demina O.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

*Kosygina str., 4, Moscow, 119334, Russia, e-mail: khodonov@gmail.com;*

<sup>2</sup>MIREA – Russian Technological University

*Vernadsky avenue, 78, Moscow, 119571, Russia*

<sup>3</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS

*Miklukho-Maklay str., 16/10, Moscow, 117997, Russia*

<sup>4</sup>Moscow Institute of Physics and Technology

*Dolgoprudny, 141700, Russia*

**Abstract.** Below we are presenting the database “Properties of artificial bacteriorhodopsin analogs. Version 2, 2020. From 1975 to 2019”, which combined information from our and literature data sources with duration period 1975–2020. The comparative analysis of our database, including the information on spectral characteristics and proton transport efficiency of the interaction products about 440 polyenic compounds with BO has shown, that by diversifying the chromophore nature, it is possible to directly change  $\lambda_{\max}$  in ABR spectra in a rather wide interval (from 412 to 830 nm), though not all these pigments are capable to cyclic photochemical reactions. In the frames of defined type modification relationship between  $\lambda_{\max}$  position in dependence of chromophore nature could be described by linear regression equations in axes  $(Y) - \lambda_{\max} \text{ SB or } (\text{SBH}^+, \text{P}^{\text{LA}}) / (X) - \lambda_{\max}(\text{CHO})$ . These relationships could be used for the prognosis of the spectral properties of ABR from new retinal derivatives and BO.

**Key words:** *retinal-based proteins, bacteriorhodopsin, retinal isomers and analogs, chromophore group modification, bacteriorhodopsin analog properties.*