



ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФТОРФЕНИЛЬНОГО АНАЛОГА РЕТИНАЛЯ С ПРОТЕОРОДОПСИНОМ ИЗ *Exiguobacterium sibiricum*

© 2022 г. Н. Е. Беликов*, Л. Е. Петровская**, Е. А. Крюкова**,
Д. А. Долгих**, ***, Е. П. Лукашев***, А. Ю. Лукин****, О. В. Демина*,
С. Д. Варфоломеев*, В. В. Чупин*****, А. А. Ходонов*.*

*ФГБУН “Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля” РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4

**ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

***ФГБОУ ВО “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”, биологический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

****ФГБОУ ВО МИРЕА – Российский технологический университет, Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 78

*****ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт, Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 07.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Разработан альтернативный вариант метода синтеза аналога природного ретиналя, у которого триметилциклогексеновое кольцо молекулы замещено на *n*-фторфенильный фрагмент. Показано, что предложенная нами схема синтеза целевого соединения с использованием C_5 -фосфоната с терминальной нитрильной группой в условиях реакции Хорнера–Эммонса более эффективна и дает более высокий суммарный выход целевого продукта, чем вариант синтеза, описанный нами ранее. Разработана процедура получения аналога микробного протеородопсина ESRh из *Exiguobacterium sibiricum* с модифицированным хромофором. Установлено, что, как и в случае бактериородопсина из *Halobacterium salinarum*, замена триметилциклогексенового кольца в природном хромофоре на *n*-фторфенильный фрагмент не блокирует возможность образования из протеородопсина ESRh искусственного пигмента F-Phe-ESRh, сохраняющего цикл фотохимических реакций. Обнаружены определенные различия в свойствах нативного рекомбинантного ESRh и его аналога F-Phe-ESRh, включающие сдвиг максимума поглощения в коротковолновую область, образование интермедиата М при более низких значениях pH, наличие “долгоживущего М” и общее замедление фотоцикла. Также была продемонстрирована пониженная стабильность полученного аналога протеородопсина F-Phe-ESRh к продолжительному воздействию видимого света.

Ключевые слова: ESRh микробный протеородопсин из *Exiguobacterium sibiricum*, аналоги ретиналя, олефинирование по Хорнеру–Эммонсу

DOI: 10.31857/S0132342322060070

ВВЕДЕНИЕ

Ретиналь-содержащие белки играют ключевую роль в ряде важнейших биологических процессов: зрении, светозависимом транспорте протонов и других ионов (хлора, натрия), фототаксисе. Ретиналь-содержащие белки подразделяются на несколько семейств, основные из которых – зрительные пигменты палочек и колбочек высших животных и микробные родопсины. Более

1000 представителей этих хромопротеинов были найдены во всех биологических царствах – от высших животных до архей, грибов, водорослей, эубактерий и вирусов [1–3].

Молекулы ретиналь-содержащих белков имеют следующие общие особенности: 1) они представляют собой мембранные белки, состоящие из семи α -спиральных трансмембранных тяжей (7TM), соединенных между собой петлями; 2) в качестве хромофорной группы они содержат определенный изомер альдегида витамина А – ретиналя (*all-E*- в пигментах микроорганизмов и *11Z*- в зрительных пигментах), который соединен с белком через протонированную альдиминную связь с ϵ -аминогруппой остатка Lys; 3) их общая функция связана с преобразованием энергии све-

Сокращения: BRh – бактериородопсин; ESRh – микробный родопсин ESRh из *Exiguobacterium sibiricum*; F-Phe-ESRh – искусственный родопсин ESRh, у которого природный ретиналь заменен на фторфенильный аналог; DIBAH – диизобутилалюмогидрид; DDM – *n*-додецил- β -D-мальтопиранозид.
* Автор для связи (тел.: +7 (495) 939-71-48; эл. почта: khodonov@gmail.com).

тового кванта в различные химические или физиологические ответы [1–6].

В 2022 г. исполнилось 17 лет с начала “эры оптогенетики” (нейробиофотоники), цель которой состоит в использовании генетически кодируемых фоточувствительных белков для регуляции активности клеток человека и животных. Для реализации этого перспективного направления исследований необходимо создание технологий получения фотопереключаемых компонентов для оптогенетики с заданными и/или прогнозируемыми спектрально-кинетическими параметрами на основе новых модифицированных микробных родопсинов и других фоточувствительных белков [5, 6].

Направленные изменения фотохимических свойств ретиналь-содержащих белков могут быть достигнуты путем использования следующих подходов: 1) замещением одного или нескольких аминокислотных остатков в определенных положениях молекулы белка методами сайт-специфичного мутагенеза; 2) замещением остатка природного ретиналя на его различные аналоги; 3) сочетанием вышеперечисленных методов.

Один из возможных вариантов исследования взаимосвязи структура–функция в ретиналь-содержащих белках заключается в замене природного хромофора на его аналоги и всестороннее изучение свойств новых гибридных продуктов [7–14]. Аналоги нативного хромофора уже дали ценную структурную, спектроскопическую и функциональную информацию о структуре основного состояния хромофора в микробных родопсинах до того, как стали доступны 3D-структуры этих молекул с высоким разрешением, и продолжают широко использоваться для определения структуры промежуточных продуктов их фотоциклов. Процедура направленной модификации хромофора позволяет варьировать в широких пределах как положение максимума поглощения основного состояния пигмента, так и другие важные фотохимические параметры.

Таким образом, замена природного ретиналя на его аналоги – один из наиболее перспективных подходов к изучению особенностей участка связывания хромофора у различных семейств микробных родопсинов. Успешное применение данного метода было продемонстрировано для хорошо изученного светозависимого протонного насоса бактериородопсина (BRh) из экстремально галофильного микроорганизма *Halobacterium salinarum*, на котором в течение последних 40 лет был апробирован широкий арсенал современных методов исследования для определения взаимосвязи структура–функция. Искусственные аналоги BRh были получены с целым рядом модификаций молекулы его хромофора [7, 8].

Объект настоящего исследования – протеородопсин (ESRh) – это новый представитель рети-

наль-содержащих белков из психротрофного микроорганизма *Exiguobacterium sibiricum*, ген которого был выделен из образцов почвы вечной мерзлоты возрастом 3 млн лет [15]. Протеородопсин (ESRh) по своей структуре представляет собой мембранный белок, функционирующий как светозависимый протонный насос. Пространственная 3D-структура ESRh с разрешением 2.3 Å (PDB: 4HYJ) была впервые исследована группой ученых под руководством В. Горделия (Институт структурной биологии, Гренобль, МФТИ). Установлено, что ESRh обладает структурой, типичной для семейства ретиналь-содержащих белков, включая наличие семи α -спиральных сегментов и молекулы ретиналя в *all-E*-конфигурации, ковалентно связанной с остатком K225 посредством протонированной альдиминной связи [16].

К особенностям строения протеородопсина ESRh относятся: 1) наличие нестандартного донора протонов для основания Шиффа – остатка K96 – и его расположение в гидрофобной полости ближе к поверхности белка; 2) нарушение α -спиральной структуры в средней части спирали F; 3) наличие водородной связи между остатками H57 и D85; 4) наличие ряда специфических особенностей фотоцикла ESRh, включая освобождение протона на поздних стадиях фотоцикла, ускоренное образование M-подобного интермедиата и сдвиг его рК в щелочную область pH; 5) отсутствие спектральных различий в формах ESRh, адаптированных к свету и темноте.

Большое число работ было посвящено изучению механизма функционирования ESRh и его мутантных вариантов [15–22], однако исследования, связанные с заменой хромофорной группы, ранее не проводились и являются пионерскими.

Существование ряда отличий в механизмах фотоцикла и протонного транспорта ESRh от других ретиналь-содержащих белков делает интересным и актуальным сравнительное изучение влияния типа модификации их хромофорных групп на спектральные параметры этих белков и на их функционирование [8, 22].

Для исследования влияния природы хромофорной группы ESRh на его функционирование и структуру в настоящей статье нами представлены: 1) альтернативный метод синтеза фторфенильного аналога ретиналя (II); 2) результаты изучения процесса взаимодействия аналога ретиналя (II) с апо-белком ESR-опсином из *E. sibiricum*; 3) фотохимические характеристики полученного искусственно-го пигмента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез фторфенильного аналога ретиналя (II). В данной работе для модификации ESRh нами был выбран фторфенильный аналог ретиналя

(II), поскольку ранее он был успешно использован для получения фторфенильного аналога BRh из *H. salinarum* [23]. Кроме того, присутствие атома фтора в *p*-фторфенильном фрагменте открывает возможность использования метода ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{19}F для изучения структуры этого белка. Проведенное в работе Драчева с соавт. [24] исследование цикла фотореакций фторфенильного аналога BRh показало, что хотя этот искусственный пигмент и сохранил эффективность фотоцикла на уровне $\sim 50\%$ от эффективности цикла природного BRh, но у него

была на несколько порядков замедлена обратная реакция свето-темновой адаптации.

В указанных работах [22, 23] *all-E*- и *13Z*-изомеры фторфенильного аналога ретиналя (II) были синтезированы при помощи 4-стадийной процедуры наращивания полиеновой цепи ретинаоида с использованием в качестве ключевой стадии реакции олефинирования по Виттигу карбонильного C_{10} -предшественника (IV) с илидом, генерированным из 4-фторбензилтрифенилфосфоний-бромидом (III), с суммарным выходом 41% (схема 1).

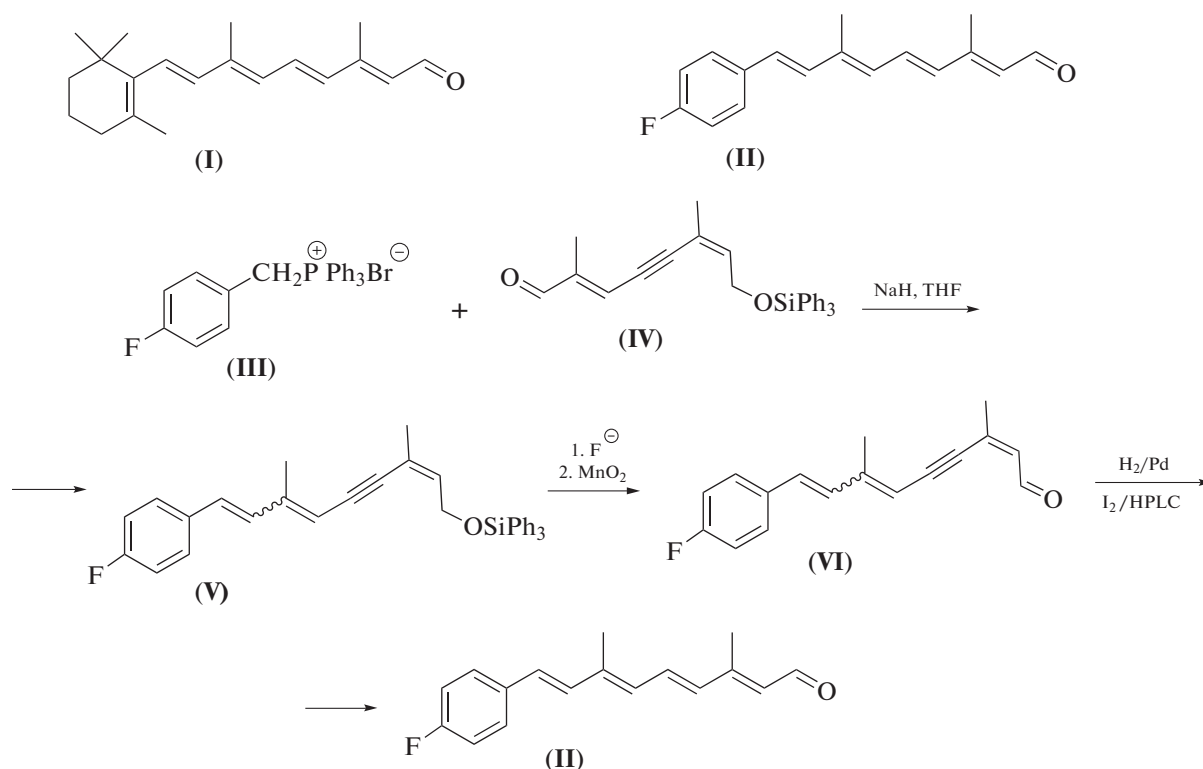


Схема 1. Синтез целевого ретинаоида (II) при помощи реакции олефинирования карбонильных соединений по Виттигу.

В настоящей работе нами был предложен и исследован альтернативный классический вариант наращивания полиеновой цепи ретинаоида оле-

финированием исходного альдегида (XIV) анионом C_5 -фосфоната (XIIa, b) в условиях реакции Хорнера–Эммонса (схемы 2, 3) [7, 25–29].

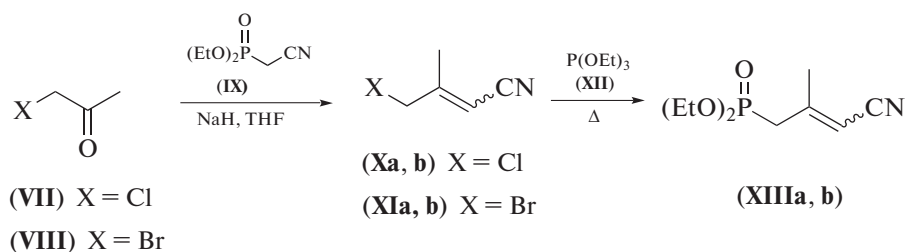


Схема 2. Синтез C_5 -фосфоната (XIIIa, b) с терминальной нитрильной группой.

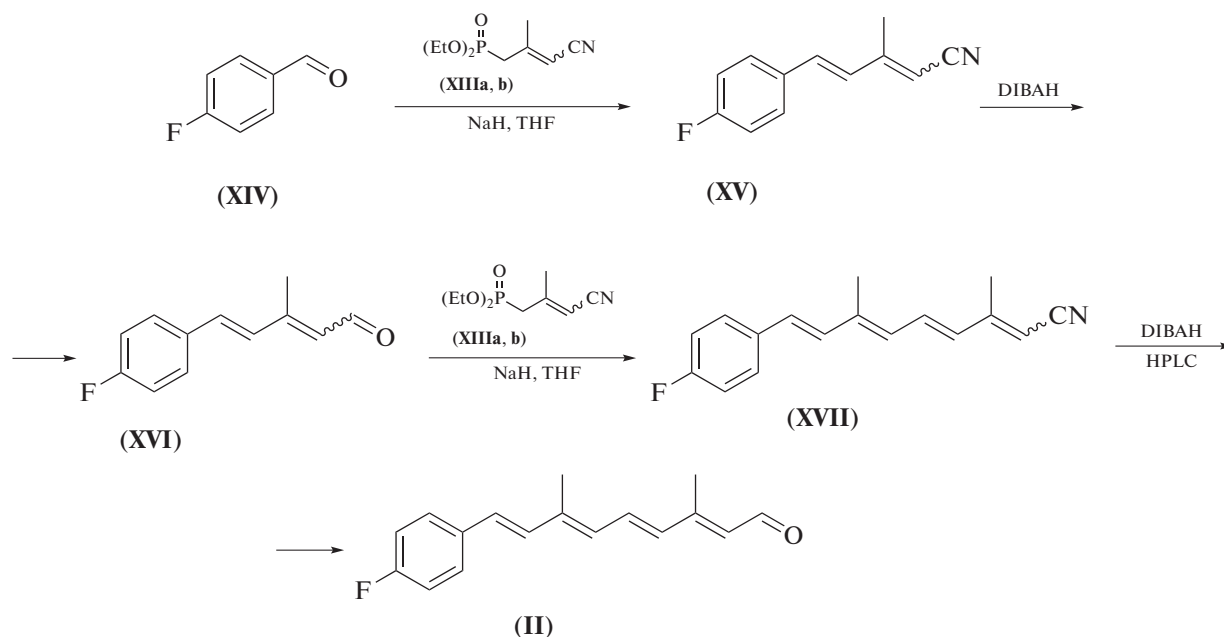


Схема 3. Синтез целевого ретиноида (II) при помощи реакции олефинирования карбонильных соединений по Хорнеру–Эммонсу.

Сравнение двух синтетических подходов к получению целевого ретиноида (II). Для решения задачи создания системы сопряженных двойных связи в полиеновой цепи молекулы ретиноида (II) ранее [22, 23] и в рамках настоящего исследования в качестве ключевых реакций были использованы два варианта реакции олефинирования карбонильных соединений: 1) реакция олефинирования по Виттигу (схема 1); 2) реакция олефинирования по Хорнеру–Эммонсу (схема 3).

Ниже представлена критическая оценка преимуществ и недостатков двух синтетических подходов к получению целевого ретиноида (II), изображенных на схемах 1 и 3.

Схема 1 (ключевая стадия – реакция олефинирования по Виттигу):

- 1) выход – высокий;
- 2) стереоселективность вновь образованной двойной связи – низкая, образуется смесь *E*- и *Z*-изомеров (1 : 1);
- 3) трудноотделяемый побочный продукт – трифенилфосфиноксид;
- 4) необходимость применения препаративной ВЭЖХ – да;
- 5) проблема потери регио- и стереоселективности процедуры полувосстановления тройной связи потребовала дополнительных исследований;
- 6) требуется дополнительная стадия – изомеризация 13*Z*-изомера под действием иода.

Схема 3 (ключевая стадия – реакция олефинирования по Хорнеру–Эммонсу):

- 1) выход – высокий;

- 2) стереоселективность вновь образованной двойной связи – высокая (98% *E*-изомера);

- 3) необходимость применения препаративной ВЭЖХ – да;

- 4) необходимость разработки и поиска оптимальной процедуры синтеза C_5 -фосфоната (XIIIa, b).

Таким образом, для схем синтеза 1 и 3 характерно наличие высокого выхода желаемого продукта, а также использование препаративной ВЭЖХ для получения индивидуальных соединений. Преимуществами схемы 3 являются высокая стереоселективность вновь образованной двойной связи (98%), а также разработка и оптимизация только одной синтетической процедуры, тогда как для схемы 1 существенными недостатками являются низкая стереоселективность вновь образованной двойной связи (*E*-/*Z*- 1 : 1), наличие трудноотделимого побочного продукта – трифенилфосфиноксида и разработка с последующей оптимизацией двух синтетических процедур.

Синтез C_5 -фосфоната (XIIIa, b) с терминальной нитрильной группой. Синтез исходного C_2 -фосфоната (IX) проводили конденсацией коммерчески доступного хлорацетонитрила с триэтилфосфитом (XII) по Арбузову. Выход соединения (IX) после перегонки составил 87%.

Для осуществления синтеза C_5 -фосфоната (XIIIa, b) были исследованы два пути, показанные на схеме 2. В качестве галогенкетона использовали коммерчески доступный хлорацетон (VII)

или бромацетон (VIII), синтезированный в одну стадию бромированием ацетона (выход 50%).

Конденсация кетона (VII) с C₂-фосфонатом (IX) в условиях реакции Хорнера–Эммонса дает изомерную смесь галогенонитрила (Xa, b) с общим выходом 52%. Конденсация кетона (VIII) с C₂-фосфонатом (IX) в тех же условиях приводит к образованию изомерной смеси галогенопроизводного (XIa, b) с общим выходом 30%. Низкий выход реакции по второму варианту, через бромкетон (VIII), объясняется его низкой стабильностью, поэтому выгоднее использовать хлорацетон (VII). Кроме того, бромосодержащий нитрил (XIa, b) обладает меньшей термостабильностью, чем соответствующий хлорзамещенный нитрил (Xa, b). Полученные галогенонитрилы (Xa, b) и (XIa, b) вводили в дальнейшие превращения без дополнительной очистки. Конденсация соединения (Xa, b) с триэтилфосфитом (XII) по Арбузову дает после перегонки изомерную смесь C₅-фосфоната (XIIIa, b) с выходом 81%. Соотношение изомеров (XIIIa, b) (*E*-/*Z*- 60 : 40) было получено из данных ¹H-ЯМР-спектра путем сравнения интегральной интенсивности сигналов метильных групп при δ 1.94 и 2.04 м.д. для *Z*- (XIIIb) и *E*- (XIIIa) изомеров соответственно. Однородность изомерной смеси (XIIIa, b) оценивали по данным ³¹P-ЯМР-спектроскопии. ³¹P-ЯМР-спектр содержит два сигнала, относящиеся к ядрам пентакоординированного фосфора при δ 23.8 и 23.0 м.д. в слабом поле (относительно внешнего стандарта – 85% H₃PO₄) для *E*- (XIIIa) и *Z*- (XIIIb) изомеров соответственно.

К сожалению, C₅-синтон (XIIIa, b) не удалось получить, исходя из бромонитрила (XIa, b), из-за склонности последнего к полимеризации в условиях проведения реакции Арбузова.

Таким образом, нами было показано, что наиболее эффективный вариант синтеза C₅-фосфоната (XIIIa, b) – путь в две стадии из коммерчески доступного хлорацетона (III). Параметры ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектров для *E*- и *Z*-изомеров фосфоната (XIIIa, b) приведены в разделе “Эксперим. часть”.

Ключевые стадии синтеза фторфенильного аналога ретиналя (II) представлены на схеме 3. На первой стадии нами было осуществлено олефинирование по Хорнеру–Эммонсу исходного 4-фторбензальдегида (XIV) анионом C₅-фосфонатного синтона с нитрильной терминальной полярной группой (XIIIa, b). В качестве основания при генерировании аниона C₅-фосфоната использовали NaH в THF, при этом было показано, что в результате реакции Хорнера–Эммонса вновь образующаяся связь C=C в продукте (XV) имела *E*-конфигурацию, что подтверждалось значениями констант спин-спинового взаимодействия (16.2 Гц). Затем следовала стадия восста-

новления нитрильной функции ДИВАН при температуре от –70 до –80°C.

Повторение указанной последовательности операций – олефинирования альдегида (XVI) по Хорнеру–Эммонсу и последующего восстановления нитрильной функции у соединения (XVII) – приводила к получению целевого ретинаида (II) с общим выходом 47% на исходный альдегид (XIV). Индивидуальный *all-E*-изомер ретинаида (II) был выделен с чистотой 98–99% при помощи препаративной ВЭЖХ. Структура *all-E*-изомера соединения (II) была подтверждена набором физико-химических методов анализа (УФ-, ¹H-ЯМР-спектроскопией и масс-спектрометрией). В ¹H-ЯМР-спектре при наличии сигналов протонов, отвечающих *n*-замещенному ароматическому фрагменту (δ 7.03 и 7.42 м.д.), также были зарегистрированы полный набор дублетов протонов полиеновой цепи (δ 6.05–7.15 м.д.), сигнал протона альдегидной группы (дублет при δ 10.1 м.д. (*J* 8.2 Гц)) и два сигнала протонов двух метильных групп (при δ 2.10 и 2.35 м.д.), что строго подтверждало структуру целевого альдегида (II).

Масс-спектр содержал молекулярный ион ([M⁺] 256.1), соответствующий рассчитанному значению.

Таким образом, было показано, что схема синтеза *all-E*-изомера ретинаида (II) (схема 3) с использованием C₅-фосфоната (XIIIa, b) с терминальной нитрильной группой более эффективна, чем вариант синтеза, использованный нами ранее [22, 23] (схема 1).

Протеородопсин (ESRh) и его аналог F-Phe-ESRh. Для получения препаратов рекомбинантного ESRh была использована сконструированная ранее система экспрессии в клетках *Escherichia coli*, обеспечивающая встраивание белка во внутреннюю мембрану бактерий [15]. Выделение целевого белка ESRh или его производного F-Phe-ESRh осуществляли после добавления природного хромофора *all-E*-ретинола (I) или его фторфенильного аналога (II) к мембранной фракции клеток бактерий в мицеллах неионного детергента *n*-додецилмальтозида (DDM), обеспечивающего сохранение нативной конформации и функциональных свойств препаратов. Для очистки белка, содержащего C-концевую гексагистициновую последовательность, был использован метод металл-аффинной хроматографии на никель-содержащей смоле (Ni-Sepharose FastFlow).

Электронные спектры поглощения препаратов (ESRh и его аналога F-Phe-ESRh). Образцы рекомбинантного ESRh и его аналога F-Phe-ESRh были получены двумя альтернативными путями: 1) добавлением к препарату апобелка ESRh, солиобилизованного в буфере А (0.2% DDM, 50 мМ NaH₂PO₄, 200 мМ NaCl), pH 8.0, 20°C, 1.5 кратного молярного избытка *all-E*-ретинола (I)

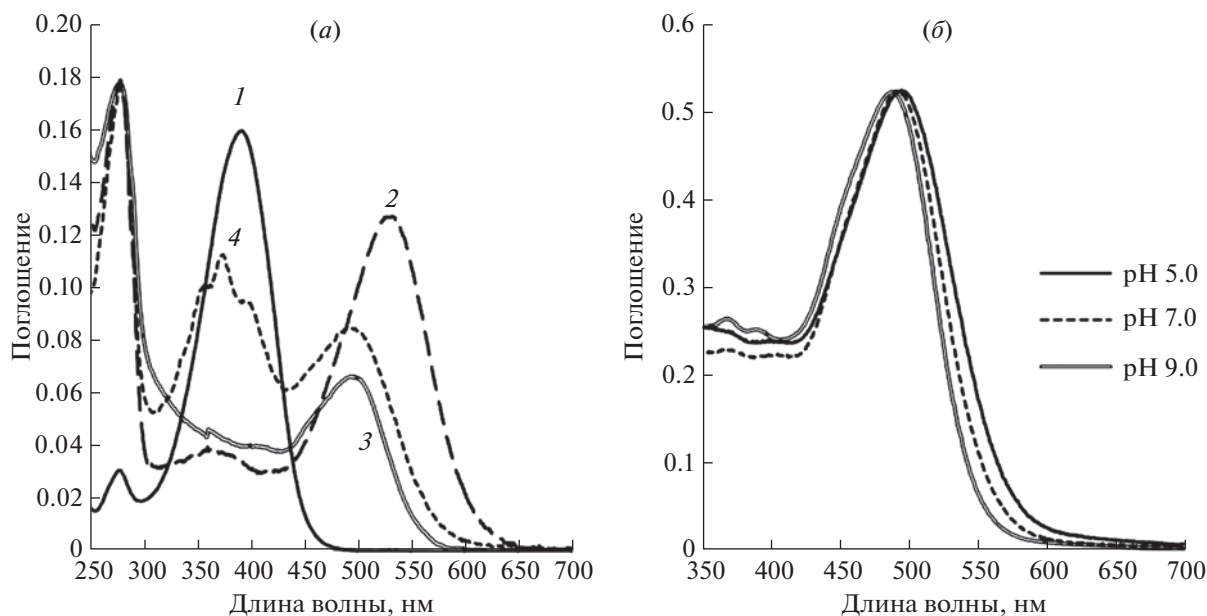


Рис. 1. (а) – Электронные спектры поглощения образцов: 1 – фторфенильного аналога ретиналя (II) в этаноле; 2 – препарата рекомбинантного ESRh в мицеллах DDM (буфер А, pH 8.0); 3 – препарата F-Phe-ESRh, полученного в условиях 0.8 экв. фторфенильного аналога ретиналя (II) в мицеллах DDM (буфер А, pH 8.0); 4 – препарата F-Phe-ESRh, полученного в условиях 1.5 экв. избытка фторфенильного аналога ретиналя (II) в мицеллах DDM (буфер А, pH 8.0); (б) – электронные спектры поглощения образца препарата F-Phe-ESRh, полученного в условиях 0.8 экв. фторфенильного аналога ретиналя (II) в мицеллах DDM (буфер А) при различных значениях pH (pH 5.0–9.0).

или его аналога (II) в виде раствора в этаноле (не более 0.01% по объему, чтобы минимизировать побочные процессы: денатурацию и агрегацию) или 2) добавлением 1.5-кратного молярного избытка *all-E*-ретиналя (I) или его аналога (II) в виде раствора в этаноле в среду культивирования *E. coli* BL21(DE3)pLysS, с последующим выделением препаратов (ESRh) и его аналога с помощью солиubilизации в буфере А, pH 8.0, и металл-хелатной хроматографии. В дальнейшем при проведении спектральных исследований нами при получении препаратов (ESRh и его аналога) было изменено соотношение белка и производного ретинаоида до 1 : 0.8 (рис. 1а, кривые 3 и 4).

Спектры поглощения полученных препаратов ESRh и его аналога F-Phe-ESRh были исследованы при помощи стационарной и импульсной спектроскопии в диапазоне 250–700 нм. Анализ процесса образования искусственных пигментов на основе ESRh и F-Phe-ESRh показал, что различия в кинетике встраивания *all-E*-изомера ретиналя и его фторфенильного аналога в ESRh-опсин, солиubilизированный в мицеллах DDM, практически отсутствуют ($\tau \leq 2$ мин). В то же время при встраивании *all-E*-изомера ретиналя и его фторфенильного аналога в препарат апомембран, содержащих бактериоопсин *H. salinarum*, кинетика этих процессов существенно различается ($\tau \sim 30$ мин и ~ 6 ч соответственно) [8, 22].

Эти различия, вероятно, можно объяснить структурными отличиями ближайшего окружения участка связывания хромофора ESRh и BRh [3]. На небольшом расстоянии от основания Шиффа в молекуле ESRh находится остаток H57, определяющий свойства первичного акцептора [3, 17] и отсутствующий в молекуле BRh. Кроме того, боковая цепь остатка R82, в отличие от BRh, ориентирована противоположным образом и не оказывает существенного влияния на свойства белка. Для установления точных причин наблюдаемых эффектов необходимо проведение дальнейших исследований, в том числе с мутантными формами ESRh.

При pH 7.0 спектр поглощения полученного препарата F-Phe-ESRh демонстрирует максимум при 496 нм, что на 36 нм короче, чем у рекомбинантного ESRh (532 нм) [15–20]. При изменении до pH 9.0 он сдвигается в коротковолновую область до 490 нм (рис. 1б). Сравнение спектров поглощения F-Phe-ESRh ($\lambda_{\max} = 496$ нм) со спектрами F-Phe-BRh ($\lambda_{\max}^{\text{DA}} = 524$ нм и $\lambda_{\max}^{\text{LA}} = 510$ нм) показало, что для белковой матрицы ESRh максимум спектра поглощения сдвинут в коротковолновую область на 28 нм [8, 24]. Аналогичные сдвиги максимума поглощения в коротковолновую область были обнаружены у большинства ароматических производных BRh и ряда BRh с модифицированным триметилциклогексеновым кольцом хромофора [8, 30].

“Опсиновый сдвиг” рассчитывали по формуле:

$$\text{Опсиновый сдвиг} = 1/\lambda(\text{SBH}^+) - 1/\lambda(\text{pigment}).$$

“Опсиновый сдвиг” для образцов F-Phe-ESRh и F-Phe-BRh составил 1963 и 3040 cm^{-1} соответственно [8].

λ_{max} модельного хлоргидрата альдимида аналога ретиналя (II) с *n*-бутиламином (SBH^+) в метаноле равна 452 нм.

У препаратов F-Phe-ESRh и ESRh также наблюдается отсутствие различий в спектрах образцов, адаптированных к свету и темноте – явление свето-темновой адаптации, которое характерно для природного BRh из *H. salinarum* и большинства его аналогов [8, 30].

Срок хранения препаратов F-Phe-ESRh при 4°C был не менее 6 месяцев без заметного изменения своих характеристик.

Особенности фотоцикла аналога протеородопсина F-Phe-ESRh. Фотоцикл аналога F-Phe-ESRh исследовали методом импульсной лазерной спектроскопии (флэш-фотолиза). Были получены кинетические кривые изменений поглощения F-Phe-ESRh на четырех характерных длинах волн в суспензии мицелл DDM при pH 7.0 и 9.0 (рис. 2а, 2б).

В ответ на вспышку света при pH 7.0 детектируется быстрое ($\tau = 50\text{--}70$ мкс) образование “короткоживущей” формы М-интермедиата, соответствующей депротонированному основанию Шиффа, с максимумом поглощения 390 нм (рис. 2а). Это

отличает фотоцикл F-Phe-ESRh от дикого типа ESRh, содержащего *all-E*-ретиаль, в котором при pH 7.0 в мицеллах DDM образование М-интермедиата практически не детектируется [15–21]. Таким образом, можно утверждать, что pK_a образования М-интермедиата в производном F-Phe-ESRh сдвинут в кислую область pH по сравнению с ESRh дикого типа. Кроме того, наблюдается формирование более “долгоживущей” М-формы ($\tau = 34 \pm 7$ мс) во второй фракции пигмента (~40%).

В результате распада “короткоживущей” М-формы интермедиата с $\tau = 7.7$ мс происходит репротонирование основания Шиффа, часть пигмента образует состояние, аналогичное N/O-интермедиату фотоцикла BRh, с максимумом поглощения 550 нм. Другая часть, предположительно, не образует длинноволновую форму, а принимает участие в обратимой реакции репротонирования основания Шиффа со стороны акцептора протонов D85. Как следствие, присутствие существенной доли “долгоживущей” формы М-интермедиата наблюдается в F-Phe-ESRh вплоть до конца фотоцикла, общая продолжительность которого значительно замедлена и составляет ~27 с. При pH 9.0 наблюдается еще более значительное замедление фотоцикла (до ~100 с), без заметного накопления N/O-интермедиата (рис. 2б).

Стабильность и доступность альдиминной связи у F-Phe-ESRh к действию различных условий и реагентов. Для определения строения продуктов взаимодействия серии арилполиеновых альдегидов с апомембранами, содержащими бактериооп-

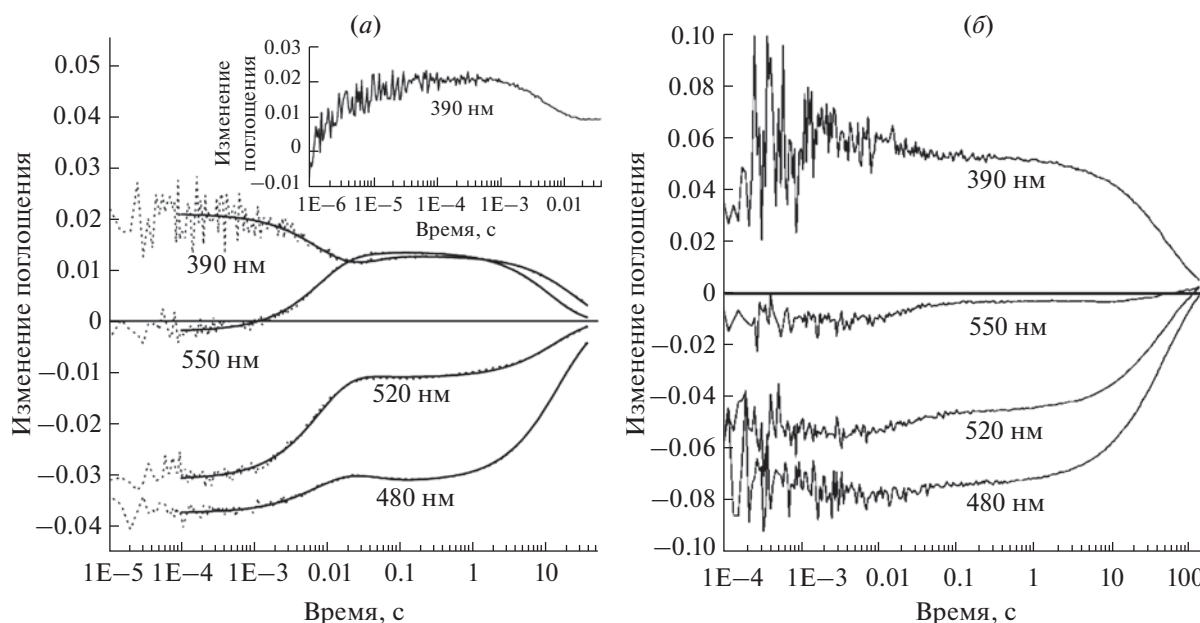


Рис. 2. Особенности фотоцикла рекомбинантного F-Phe-ESRh. Представлена кинетика светоиндуцированных изменений поглощения белка в мицеллах DDM при pH 7.0 (а) и 9.0 (б) на характерных длинах волн. Врезка на панели (а) – изменения поглощения при 390 нм, вызванные образованием М-интермедиата.

син из *H. salinarum*, А.М. Шкробом с соавт. был разработан целый набор химических тестов в комбинации со спектроскопическими методами в ставшей классикой работе [31].

Для оценки доступности протонированной альдиминной связи к действию различных стимулов и систем реагентов был проведен следующий ряд экспериментов: 1) засветка образцов F-Phe-ESRh видимым светом галогеновой лампы ThorLabs OSL1-EC, светофильтр ЖС-12 ($\lambda \geq 400$ нм) в течение 2–10 мин; 2) воздействие на образец F-Phe-ESRh раствора 50 мкМ NaBH_4 , рН 9.0, в темноте и на свету; 3) реакция замещения образца F-Phe-ESRh раствором *all-E*-ретиная в этаноле (5 мМ) в темноте и на свету; 4) воздействие на образец F-Phe-ESRh раствора NH_2OH (50 мМ) в темноте и на свету.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что при продолжительном освещении образца F-Phe-ESRh видимым светом галогеновой лампы его протонированная альдиминная связь подвергалась частичному гидролизу с появлением продукта распада, спектрально идентичного образцу фторфенилретиная (II) в водном буфере А. При выдерживании “засвеченного” образца F-Phe-ESRh в темноте более 2–3 ч наблюдалась частичная реконструкция пигмента с увеличением оптической плотности полосы поглощения F-Phe-ESRh (496 нм).

Спектр поглощения продукта распада демонстрировал тонкую структуру: основная полоса 374 нм, и два плеча 355 нм (пл.) и 398 нм (пл.) (рис. 3а, кривые 2, 3). Дополнительным доказательством строения продукта распада была его трансформация в соответствующий спирт действием раствора 50 мкМ NaBH_4 , рН 9.0, в темноте. Спектр поглощения восстановленного продукта распада в буфере А был весьма близок к спектру реперного образца фторфенилретинола (основная полоса 343 нм, два плеча 328 и 361 нм), который был получен обработкой NaBH_4 фторфенилретиная (II) в водном этаноле. Было проведено контрольное восстановление образца F-Phe-ESRh NaBH_4 в темноте, которое показало, что протонированная альдиминная связь в образце F-Phe-ESRh достаточно стабильна к действию раствора NaBH_4 в темноте ($\tau_{1/2} \approx 10$ мин). После освещения “образца после NaBH_4 ” в течение 2 мин полоса пигмента почти полностью исчезала.

В то же время препарат рекомбинантного ESRh в мицеллах DDM (буфер А, рН 8.0) оказался устойчивым к воздействию освещения видимым светом [15–21].

Реакция замещения аналога хромофора F-Phe-ESRh раствором *all-E*-ретиная в темноте протекала очень медленно ($\tau_{1/2} > 18$ ч). Этот факт говорит о том, что в белке отсутствуют свободные сайты посадки хромофора на ϵ -аминогруппу остатка лизина

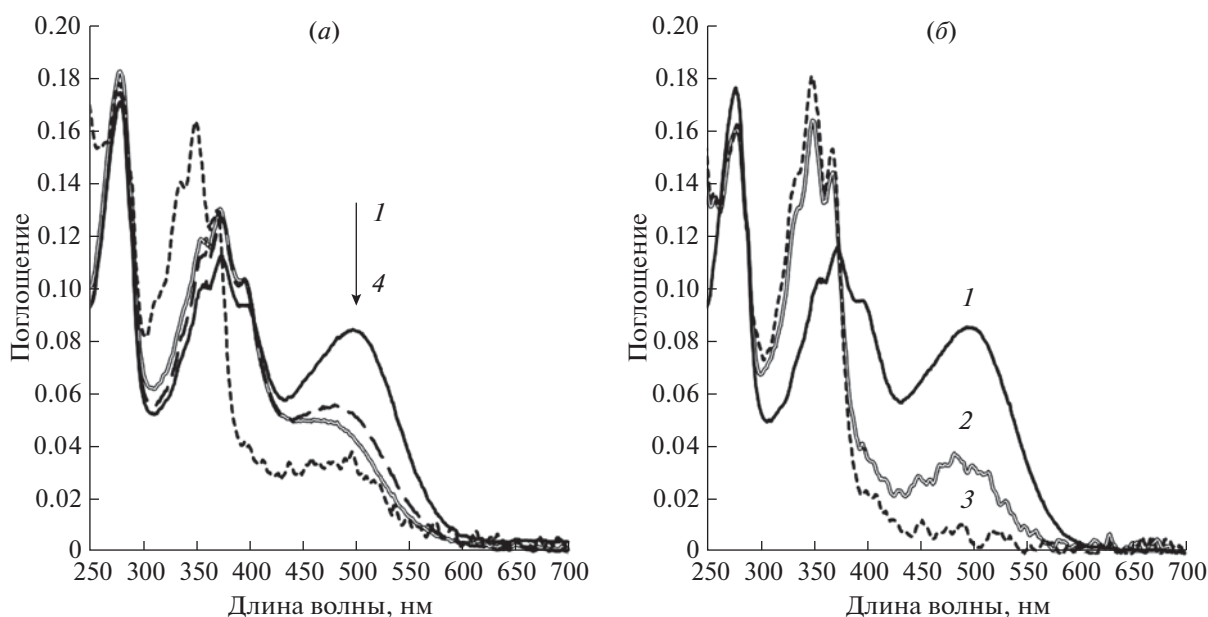


Рис. 3. Спектры поглощения F-Phe-ESRh. (а): 1 – Исходный образец, полученный в условиях 1.5 экв. избытка фторфенильного аналога ретиная (II); 2 – он же после 2 мин освещения видимым светом с длиной волны >450 нм (фильтр ЖС-12); 3 – он же после 12 мин освещения видимым светом с длиной волны >450 нм (фильтр ЖС-12); 4 – засвеченный в течение 15 мин образец после добавления раствора NaBH_4 (50 мкМ NaBH_4 , рН 9.0); (б): 1 – исходный образец, полученный в условиях 1.5 экв. избытка фторфенильного аналога ретиная (II); 2 – “темновой” исходный образец через 15 мин после добавления раствора NaBH_4 (50 мкМ NaBH_4 , рН 9.0); 3 – образец через 15 мин после добавления раствора NaBH_4 , после 2 мин освещения видимым светом с длиной волны >450 нм (фильтр ЖС-12).

K225 или другие возможные остатки лизина, способные к формированию протонированной альдиминной связи.

Также образец F-Phe-ESRh был достаточно стабилен в темноте в реакции замещения гидроксиламином ($\tau_{1/2} > 3$ ч).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Тонкослойную хроматографию осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) в системе растворителей: (А) гексан/эфир (1 : 1). Пятна веществ детектировали выдерживанием пластинки в парах иода. Препаративную флэш-хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (Merck, Германия). Растворители очищали и высушивали: диэтиловый эфир и тетрагидрофуран – перегонкой над алюмогидридом лития; метанол абсолютизировали с использованием магниевой стружки.

Препаративную ВЭЖХ-хроматографию проводили на ВЭЖХ-хроматографе SmartLine 1000 (Knauer, Германия) в изократическом режиме, колонка Knauer Eurospher 100-10 Si, 20 × 250 мм, элюент гексан/диэтиловый эфир 7 : 1 по объему, УФ-детектор К-2500 с детекцией при 370 нм, скорость потока 5 мл/мин.

В работе использовали хлороацетонитрил (Fluka, Швейцария), триэтилфосфит (Fluka, Швейцария), хлороацетон, 4-фторбензальдегид (Merck, Германия), а также реагенты и растворители марок “х.ч.” и “ч.д.а.” отечественного производства.

Все операции с реагентами, чувствительными к влаге и кислороду, проводили в тщательно высушенной аппаратуре в атмосфере сухого аргона. Упаривание растворов осуществляли на роторном испарителе при температуре не выше 35°C и давлении 12 мм рт. ст.

Все спектральные исследования проводили при 20°C. ЯМР-спектры растворов в дейтерохлороформе регистрировали на спектрометре Avance III 500 (Bruker, Германия) со следующими рабочими частотами: ¹H-ЯМР-спектры – 500 МГц, ¹³C-ЯМР-спектры – 126 МГц, ³¹P-ЯМР-спектры – 203 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) относительно внутреннего стандарта: тетраметилсилана (δ 0.00) или дейтерохлороформа (δ (¹H-ЯМР) – 7.25 м.д. и (¹³C-ЯМР) – 77.2 м.д.), для ³¹P-ЯМР-спектров – относительно внешнего стандарта (85%-ного раствора ортофосфорной кислоты в D₂O). Величины констант спин-спинового взаимодействия измерены в герцах (Гц).

При описании ЯМР-спектров полиенового альдегида (II) принята нумерация атомов, соответствующая нумерации атомов полиеновой цепи природного ретиналя (I).

При описании спектров приняты следующие сокращения: с – синглет, д – дублет, т – триплет, кв – кватрет, м – мультиплет.

Масс-спектры получали на спектрометре Finnigan 4021 (США) при прямом вводе образца и ионизации электронным ударом (ЭИ 70 эВ).

Измерения спектральных и фотохимических характеристик растворов соединений и пигментов проводили в кварцевых кюветах толщиной 10 мм на спектрофотометре UV-2140PC (Shimadzu, Япония) и на специальном стенде, созданном на основе комплекта модульного оптоволоконного спектрофотометрического оборудования (Ocean Optics, США). Для облучения растворов образцов видимым светом ($\lambda \geq 400$ нм) использовали галогеновую лампу OSL1-EC (Thorlabs, США, 25 Вт) в комбинации со светофильтром ЖС-12.

Фотореакции образцов ESRh и F-Phe-ESRh исследовали методом флэш-фотолиза на импульсном однолучевом дифференциальном спектрофотометре с двойной монохроматизацией измеряющего света [17, 19, 20]. В качестве источника светового возбуждения использовали Nd-YAG-лазер LS 2131M (LOTIS ТП, Беларусь, 532 нм, 8 нс, 5 мДж). С целью улучшения соотношения сигнал/шум проводили накопление и усреднение 100 одиночных сигналов с помощью аналогоцифрового преобразователя Octopus CS 8327 (GaGe Applied Technologies, США).

Для получения полной кинетической картины фотоцикла F-Phe-ESRh проводили измерения при четырех длинах волн, характерных для превращений различных интермедиатов: 390, 480, 520 и 550 нм. Набор кинетических кривых в логарифмической шкале времени анализировали с помощью программы Mathematica (Wolfram Research, США) методом глобального фитирования с подбором 4–5 характерных экспоненциальных составляющих.

Смесь E- и Z-изомеров 3-метил-4-хлоро-2-бутенонитрила (Ха, б). В четырехгорлый реактор объемом 250 мл, снабженный капельной воронкой, помещали в атмосфере аргона 3.8 г (0.13 моль) 80%-ной суспензии NaN в минеральном масле и промывали абсолютным гексаном (2 раза по 5 мл). Затем добавляли при перемешивании в токе аргона 30 мл свежеперегнанного THF. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и при интенсивном перемешивании постепенно добавляли по каплям 15 мл (9.9 ммоль) C₂-фосфоната (IX), перемешивали при той же температуре в течение 30 мин до полного растворения NaN. К полученному раствору при перемешивании добавляли по каплям 8.6 мл (0.11 моль) хлороацетона (VII) и выдерживали реакционную смесь при 20°C в течение 1.5 ч. По окончании реакции добавляли 30 мл H₂O, 20 мл диэтилового эфира и доводили 0.1 н. раствором HCl до pH 6.0. Экстрагировали Et₂O

(3 раза по 100 мл). Эфирные фракции объединяли, промывали водой до pH 7.0 и сушили над Na_2SO_4 . Сушитель отфильтровывали, растворитель удаляли, а оставшуюся реакционную массу перегоняли в вакууме (0.1 мм рт. ст.). Получили 5.94 г (52%) галогенонитрила (**Xa**, **b**) в виде желтокоричневой маслянистой жидкости, смесь изомеров (*E*-/*Z*- 75 : 25), т. кип. 45–60°C (0.1 мм рт. ст.). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): *E*-изомер (**Xa**): 2.12 (3H, д, J 0.5, 3- CH_3), 4.05 (2H, с, $-\text{CH}_2\text{Cl}$), 5.49 (1H, дд, J 3.0/1.5, 2- CH); *Z*-изомер (**Xb**): 2.03 (3H, д, J 1.5, 3- CH_3), 4.24 (2H, с, $-\text{CH}_2\text{Cl}$), 5.27 (1H, дд, J 3.0/1.5, 2- CH).

Смесь *E*- и *Z*-изомеров диэтил(2-метил-3-циано-2-пропенил)фосфоната (XIIIa, b). В трехгорлый реактор объемом 250 мл, снабженный высокоэффективным обратным холодильником и насадкой для перегонки с термометром и холодильником Либиха, помещали в атмосфере аргона 11.55 г (0.1 моль) изомерной смеси хлоронитрила (**Xa**, **b**) и 16.84 г (0.1 моль) свежеперегнанного $(\text{EtO})_3\text{P}$ (**XII**). Далее при интенсивном перемешивании реакционную смесь постепенно нагревали до 150°C, следя за тем, чтобы не было бурного вспенивания. Окончание реакции контролировали по окончанию выделения этилхлорида. Остаток перегоняли в вакууме (0.1 мм рт. ст.). Получили 17.58 г (81%) целевого C_5 -фосфоната (**XIIIa**, **b**) в виде изомерной смеси (*E*-/*Z*- 60 : 40), т. кип. 78–98°C (0.1 мм рт. ст.). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): *E*-изомер (**XIIIa**): 1.14 (6H, т, J 7.0, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.04 (3H, дд, J 3.4/1.3, $-\text{CH}_3$), 2.55 (2H, д, J 23.5, $-\text{CH}_2$), 3.95 (4H, кв, J 7.0, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 5.12 (1H, м, $=\text{CH}$); *Z*-изомер (**XIIIb**): 1.15 (6H, т, J 7.0, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.94 (3H, дд, J 3.8/1.7, $-\text{CH}_3$), 2.81 (2H, д, J 24.0, $-\text{CH}_2$), 3.96 (4H, кв, J 7.0, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 5.12 (1H, м, $=\text{CH}$). ^{13}C -ЯМР-спектр (δ , м.д.): *E*-изомер (**XIIIa**): 16.2 (с, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 22.0 (с, $-\text{CCH}_3$), 36.8 (д, J 81.4, $-\text{CH}_2$), 62.3 (с, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 116.1 (с, $-\text{CCH}_3$), 155.6 (д, J 11.1, $-\text{CN}$); *Z*-изомер (**XIIIb**): 16.1 (с, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 23.9 (с, $-\text{CCH}_3$), 34.1 (д, J 81.4, $-\text{CH}_2$), 62.2 (с, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 115.9 (с, $-\text{CCH}_3$), 155.2 (д, J 11.1, $-\text{CN}$). ^{31}P -ЯМР-спектр (δ , м.д.): *E*-изомер: 23.84; *Z*-изомер: 23.01.

Стандартные методики олефинирования по Хорнеру–Эммонсу карбонильных предшественников (XIV) и (XVI) с C_5 -фосфонатом (XIIIa, b) и последующего восстановления нитрильной группы ДИВАН в промежуточных нитрилах (XV) и (XVII). В трехгорлый реактор объемом 100 мл помещали в атмосфере аргона 0.06 г 80%-ной суспензии NaN в минеральном масле и промывали абсолютным гексаном (3 раза по 3 мл). Затем при интенсивном перемешивании и 0°C прибавляли 10 мл абсолютного THF и 0.30 мл (1.56 ммоль) C_5 -фосфоната (**XIIIa**, **b**). Смесь перемешивали в течение 1 ч до полного растворения NaN и постепенно, при по-

мощи шприца, прибавляли раствор 1.3 ммоль альдегида ((XIV) или (XVI)) в 10 мл абсолютного THF. По окончании реакции прибавляли по каплям 5 мл H_2O , 10 мл Et_2O и нейтрализовали 0.1 н. раствором HCl до pH 6.0. Органический слой отделяли, остаток экстрагировали Et_2O (3 раза по 50 мл). Эфирные экстракты объединяли с органическим слоем, промывали водой до pH 7.0 и сушили над безводным Na_2SO_4 . Растворитель удаляли, остаток хроматографировали на колонке с 10 г силикагеля, элюируя гексаном и увеличивая полярность элюента добавлением Et_2O от 0 до 15%. Фракции, содержащие нитрил ((XV) или (XVII)), объединяли, растворитель удаляли, остаток сушили в вакууме 1 ч при 0.1 мм рт. ст., растворяли в 10 мл абсолютного толуола и помещали в трехгорлый реактор объемом 100 мл в атмосфере аргона. Реакционную смесь охлаждали до температуры в диапазоне от -70 до -80°C , затем постепенно, при помощи шприца прибавляли 1.5 экв. 20%-ного раствора ДИВАН в толуоле и оставляли до тех пор, пока температура реакции не достигала 20°C. Далее реакционную массу обрабатывали влажным силикагелем, перемешивали 30 мин, фильтровали через слой целита (1 см), промывая слой сорбента Et_2O (50 мл). Фильтрат упаривали досуха, остаток хроматографировали на колонке с 10 г силикагеля, элюируя вещество гексаном и увеличивая полярность элюента добавлением Et_2O от 0 до 10%. Фракции, содержащие смесь изомеров промежуточного или целевого альдегида ((XVI) или (II)), объединяли, растворитель удаляли, остаток сушили в вакууме 1 ч при давлении 0.1 мм рт. ст.

all-E-Изомер целевого альдегида (II) выделяли препаративной ВЭЖХ на хроматографе Smart-Line 1000 (Knauer, Германия) в изократическом режиме, колонка Knauer Eurospher 100-10 Si, 20 × 250 мм, элюент гексан/диэтиловый эфир 7 : 1 по объему, УФ-детектор К-2500 с детекцией при 370 нм, скорость потока 5 мл/мин.

Выход *all-E*-изомера целевого альдегида (II): (47% в расчете на исходный альдегид (XIV)). R_f 0.44 (A). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 2.10 (3H, с, 9- CH_3), 2.35 (3H, д, J 1.5, 13- CH_3), 6.05 (1H, д, J 8.2, 14-Н), 6.36 (1H, д, J 11.5, 10-Н), 6.43 (1H, д, J 15.5, 12-Н), 6.68 (1H, д, J 16.2, 8-Н), 6.82 (1H, д, J 16.2, 7-Н), 7.03 (2H, дд, $J_{2(4)\text{H,F}}$ 8.5, $J_{8,5}$ 2,4-Н), 7.15 (1H, дд, J 15.5, J 11.5, 11-Н), 7.42 (2H, $J_{1(5)\text{H,F}}$ 5.5, $J_{8,5}$ 1,5-Н), 10.12 (1H, д, J 8.2, 15-Н). УФ-спектр (метанол, λ_{max} , нм, $[\epsilon, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$): 387.5 [47700]. Масс-спектр (m/z) ($[M^+]$ 256.1).

Получение альдимида аналога ретиналя (II) с *n*-бутиламином. К раствору 3 мг альдегида (II) в 0.1 мл абсолютного метанола добавляли 0.1 мл *n*-бутиламина и 10 мг молекулярных сит 3 Å. Реакционную смесь выдерживали 24 ч при 0°C в

темноте и в атмосфере аргона. Сита отделяли, растворитель и избыток *n*-бутиламина удаляли при 20°C и давлении 0.1 мм рт. ст., остаток растворяли в 0.2 мл метанола и хранили при –10°C.

Спектральные характеристики: альдимин аналога ретиналя (II) с *n*-бутиламином (метанол, λ_{\max} , нм, [ε, М⁻¹ см⁻¹]: 369 [43500]; хлоргидрат альдимиана аналога ретиналя (II) с *n*-бутиламином (метанол, λ_{\max} , нм, [ε, М⁻¹ см⁻¹]: 452 [56000]).

Получение препаратов рекомбинантного протеодопсина ESRh и его аналога F-Phe-ESRh. Для получения рекомбинантного ESRh с природным или модифицированным хромофором в препаративном количестве использовали штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen Merck, Германия), трансформированный плазмидой pET-ESRh [15]. В среду LB с ампициллином (100 мкг/мл) объемом 200 мл засеивали ночную культуру штамма до $OD_{560} = 0.15$. Культуру инкубировали при 37°C в качалке Innova (New Brunswick Scientific, США) при 250 об/мин до $OD_{560} = 0.8$, после чего добавляли раствор изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид до 0.2 мМ и одно из производных ретиналя до 6–7 мкМ, продолжали культивирование при 30°C в течение 24 ч. Для солиubilизации в препарат мембранной фракции добавляли раствор 10%-ного *n*-додецил-β-D-мальтопиранозид (DDM) до 1%, коктейль ингибитора протеаз (Sigma, США) до 0.3%. Суспензию инкубировали при комнатной температуре на качалке в течение 3 ч, после чего центрифугировали в течение 15 мин при 30000 g. Для выделения белка после солиubilизации проводили металл-аффинную хроматографию на Ni-Sepharose FastFlow (GE Healthcare, США), как описано в работе Petrovskaya et al. [15]. Рекомбинантный ESRh был получен с высокой степенью чистоты (не менее 90%) и выходом 10–15 мг/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен альтернативный вариант наращивания полиеновой цепи целевого ретиноида с двумя ключевыми стадиями: 1) реакция олефинирования по Хорнеру–Эммонсу исходного 4-фторбензальдегида анионом C₅-фосфоната; 2) последующее восстановление нитрильной функции в промежуточных нитрилах DIBAH до формильной группы при температуре от –70 до –80°C. Показано, что схема синтеза *all-E*-изомера ретиноида (II) с использованием C₅-фосфоната с терминальной нитрильной группой более эффективна и дает более высокий суммарный выход целевого ретиноида (II), чем вариант синтеза, описанный нами ранее [22, 23].

Установлено, что вариант модификации триметилциклогексенового кольца природного хромофора рекомбинантного протеородопсина ESRh путем замены его на *n*-фторфенильный фрагмент

приводит, как и в случае бактериоопсина из *H. salinarum*, к образованию искусственного пигмента F-Phe-ESRh, сохраняющего цикл фотохимических реакций. Обнаружены определенные различия в свойствах нативного рекомбинантного ESRh и его аналога F-Phe-ESRh, включающие сдвиг максимума поглощения в коротковолновую область, образование интермедиата M при более низких значениях pH, наличие “долгоживущего M” и общее замедление фотоцикла. Также продемонстрирована пониженная стабильность полученного аналога F-Phe-ESRh к продолжительному воздействию видимого света.

Полученные результаты подтверждают ранее описанные требования к структуре хромофора микробных родопсинов, включая наличие терминальной формильной группы, определенную длину полиеновой цепи и ее конфигурацию, а также отсутствие жестких пространственных ограничений района триметилциклогексенового кольца и наличие определенных препятствий в районе двойной связи C₁₃=C₁₄ [8–13, 23, 29, 30].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-03-00139а).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kandori H. // *Biophys. Rev.* 2020. V. 12. P. 355–361. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00645-0>
2. Ernst O.P., Lodowski D.T., Elstner M., Hegemann P., Brown L.S., Kandori H. // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. P. 126–163. <https://doi.org/10.1021/cr4003769>
3. Gushchin I., Gordeliv V. // *In Subcellular Biochemistry / Eds. Harris J.R., Boekema E.J.* 2018. V. 87. Ch. 2. P. 19–56. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_2
4. Oesterhelt D., Stoekenius W. // *Nature (New Biologist)*. 1971. V. 233. P. 149–151. <https://doi.org/10.1038/newbio233149a0>
5. Deisseroth K. // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 18. P. 1213–1225. <https://doi.org/10.1038/nn.4091>

6. *Говорунова Е.Г., Коппель Л.А.* // Биохимия. 2016. Т. 1. С. 1172–1186. [Govorunova E.G., Koppel L.A. // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 928–940.] <https://doi.org/10.1134/S0006297916090029>
7. *Dawson M.I., Okamura W.H.* // Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids. Boca Raton: CRC Press Inc., 1990. <https://doi.org/10.1201/9781351070638>
8. *Khodonov A.A., Belikov N.E., Demina O.V.* // Properties of Artificial Bacteriorhodopsin Analogs. Version 2, 2020. From 1975 to 2019. Moscow: ИВСР/МИРТ, Russia. http://biochemphysics.ru/assets/upload/documents/docs/BRDT_v2.pdf
9. *Мицнер Б.И., Ходонов А.А.* // В кн. Светочувствительные биологические комплексы и оптическая регистрация информации / Ред. Иваницкий Г.Р. Пушкино: АН СССР, 1985. С. 38–49.
10. *Мицнер Б.И., Ходонов А.А., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П.* // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. С. 5–53.
11. *Mitsner B.I., Khodonov A.A., Zvonkova E.N., Karpauchova E.N.* // In Retinal Proteins / Ed. Ovchinnikov Yu.A. Utrecht: VNU Press, 1989. P. 561–569.
12. *Ходонов А.А., Еремин С.В., Локшин Дж.Л., Швеиц В.И., Демина О.В., Хитрина Л.В., Каулен А.Д.* // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 745–776.
13. *Barachevsky V.A., Khodonov A.A., Belikov N.E., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Demina O.V., Luuksaar S.I., Krayushkin M.M.* // Dyes and Pigments. 2012. V. 92. P. 831–837. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2011.05.009>
14. *Ходонов А.А., Лантев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Фомин М.А., Демина О.В., Складнев Д.А., Тюрин С.А., Швеиц В.И.* // Вестник МИТХТ. 2011. Т. 6. С. 15–36.
15. *Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A.* // FEBS Lett. 2010. V. 584. P. 4193–4196. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.005>
16. *Gushchin I., Chervakov P., Kuzmichev P., Popov A.N., Round E., Borshchevskiy V., Ishchenko A., Petrovskaya L., Chupin V., Dolgikh D.A., Arseniev A.S., Kirpichnikov M., Gordeliy V.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 12631–12636. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221629110>
17. *Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K.* // Biochemistry. 2012. V. 51. P. 5748–5762. <https://doi.org/10.1021/bi300409m>
18. *Dioumaev A.K., Petrovskaya L.E., Wang J.M., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K.* // J. Phys. Chem. B. 2013. V. 117. P. 7235–7253. <https://doi.org/10.1021/jp402430w>
19. *Петровская Л.Е., Балашов С.П., Лукашев Е.П., Имашева Е.С., Гушин И.Ю., Дюмаев А.К., Рубин А.Б., Долгих Д.А., Горделий В.И., Лани Я.К., Кирпичников М.П.* // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 814–828. [Petrovskaya L.E., Balashov S.P., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Gushchin I., Dioumaev A.K., Rubin A.B., Dolgikh D.A., Gordeliy V.I., Lanyi J.K., Kirpichnikov M.P.] // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 688–700.] <https://doi.org/10.1134/S000629791506005X>
20. *Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E.* // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1857. P. 1741–1750. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.08.004>
21. *Smitienko O.A., Feldman T.B., Petrovskaya L.E., Nekrasova O.V., Yakovleva M.A., Shelaev I.V., Gostev F.E., Cherepanov D.A., Kolchugina I.B., Dolgikh D.A., Nadtochenko V.A., Kirpichnikov M.P., Ostrovsky M.A.* // J. Phys. Chem. B. 2021. V. 125. P. 995–1008. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07763>
22. *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.* // Mendeleev Commun. 2018. V. 28. P. 406–408. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2018.07.022>
23. *Мицнер Б.И., Ходонов А.А., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П.* // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. С. 238–251.
24. *Драчев Л.А., Зорина В.В., Мицнер Б.И., Хитрина Л.В., Ходонов А.А., Чекулаева Л.Н.* // Биохимия. 1987. Т. 52. С. 1559–1569.
25. *Walker B.J.* // In Organophosphorus Reagents in Organic Synthesis / Ed. Cadogan J.I.G. London: Academic Press, 1979. Chapter 3. P. 155–206.
26. *Courtin J.M.L., Verhagen L., Biesheuvel P.L., Lugtenburg J., van der Bend R.L., van Dam K.* // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 1987. V. 106. P. 112–119.
27. *Ernst L., Hopf H., Krause N.* // J. Org. Chem. 1987. V. 52. P. 398–405.
28. *Groesbeek M., de Vries E.F.J., Berden J.A., Lugtenburg J.* // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 1993. V. 112. P. 303–308.
29. *Миронова Е.В., Лукин А.Ю., Швьяков С.В., Алексеева С.Г., Швеиц В.И., Демина О.В., Ходонов А.А., Хитрина Л.В.* // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 1638–1648. [Mironova E.V., Lukin A.Y., Shevaykov S.V., Alexeeva S.G., Shvets V.I., Demina O.V., Khodonov A.A., Khitrina L.V.] // Biochemistry (Moscow). 2001. V. 66. P. 1323–1333.] <https://doi.org/10.1023/A:1013147722255>
30. *Ходонов А.А., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Петровская Л.Е., Чупин В.В., Демина О.В.* // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2020. Т. 5. С. 91–100.
31. *Шкроб А.М., Родионов А.В., Овчинников Ю.А.* // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. С. 1169–1194.

Interaction of the Fluorophenyl Analogue of Retinal with Proteorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum*

N. E. Belikov*, L. E. Petrovskaya**, E. A. Kryukova**, D. A. Dolgikh**, ***, E. P. Lukashev***,
A. Yu. Lukin****, O. V. Demina*, S. D. Varfolomeev*, V. V. Chupin*****, and A. A. Khodonov*,#

#Phone: +7 (495) 939-7148; e-mail: khodonov@gmail.com

*Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

**Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

***Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, ul. Leninskiye gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

****MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 78, Moscow, 119571 Russia

*****Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskii per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

An alternative variant of the method for the synthesis of an analogue of natural retinal, in which the trimethylcyclohexene ring of the molecule is replaced by a *p*-fluorophenyl fragment, has been developed. It has been shown that the proposed scheme for the synthesis of the target *all-E*-isomer of the target retinoid using C₅-phosphonate with a terminal nitrile group under Horner–Emmons reaction conditions is more efficient and gives a higher total yield of the target product than the variant synthesis described earlier. A procedure has been developed for preparation an analogue of microbial proteorhodopsin ESRh from *Exiguobacterium sibiricum* with a modified chromophore. It was found that, as in the case of bacteriorhodopsin from *Halobacterium salinarum*, the replacement of the trimethylcyclohexene ring in the natural chromophore by the *p*-fluorophenyl fragment does not block the possibility of the formation of the artificial pigment F-Phe-ESRh from proteorhodopsin ESRh, which preserves the cycle of photochemical reactions. Certain differences were found in the properties of native recombinant ESRh and its analogue F-Phe-ESRh, including a shift in the absorption maximum to the short-wavelength region, the formation of intermediate M at lower pH values, the presence of “long-lived M”, and a general slowdown in the photocycle. The reduced stability of the resulting proteorhodopsin analog F-Phe-ESRh to prolonged exposure to visible light was also demonstrated.

Keywords: ESRh microbial proteorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum*, retinal analogs, Horner–Emmons olefination