

## ГИБРИДНЫЕ АНАЛОГИ РЕТИНОИДОВ КАК ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ НАНОБИОФОТОНИКИ

А.А. Ходонов, профессор, А.В. Лаптев, научный сотрудник, А.Ю. Лукин, ассистент, Н.Е. Беликов, аспирант, М.А. Фомин, студент, \*О.В. Демина, старший научный сотрудник, \*\*Д.А. Складнев, ведущий научный сотрудник, \*\*\*С.А. Тюрин, генеральный директор, В.И. Шве́ц, заведующий кафедрой  
кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

\* Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

\*\* Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

\*\*\* ООО «БИОС»

e-mail: ovd@sky.chph.ras.ru

**В** настоящем мини-обзоре представлены собственные экспериментальные данные, полученные авторами в рамках цикла структурно-функциональных исследований бионанофотохрома бактериородопсина в течение последних 10 лет. Рассмотрены методы получения, свойства и взаимосвязь структура–спектральные параметры в нескольких сериях гибридных аналогов ретиноидов и аналогов бактериородопсина на их основе.

*This mini-review presents experimental data obtained by the authors in the context of a cycle of structural-functional research on bionanophotochrome bacteriorhodopsin carried out during the past 10 years. We reviewed the synthetic routes and structure-spectral parameters-properties relationship for a number of series of hybrid retinoid analogs and bacteriorhodopsin analogs based on them.*

**Ключевые слова:** нанобиофотоника, ретиноиды, ретиналь, бактериородопсин и его аналоги, фотоцикл, фотохромы, спиропираны, дитиенилэтены, краун-эфиры.

**Key words:** nanobiophotonics, retinoids, retinal, bacteriorhodopsin and its analogs, photocycle, photochromes, spiropyrans, dithienylethenes, crown-ethers.

### Введение

В течение последних 20 лет сформировалась новая междисциплинарная область науки, объединяющая ряд направлений фотохимии, биоорганической химии и физико-химической биологии и получившая название нанобиофотоники. Одной из ее основных задач является изучение молекулярных механизмов преобразования световой энергии и связанных с этим фотохимических процессов и реакций в различных природных или модельных системах на молекулярном и субмолекулярном уровнях.

Фундамент данного научного направления исследований в МИТХТ им. М.В. Ломоносова был заложен проф. Н.А. Преображенским в 50-70-х годах, затем оно получило свое дальнейшее развитие в 80-90-х годах прошлого века на кафедре биотехнологии МИТХТ в трудах его учеников профессора В.И. Швеца, профессора Е.Н. Звонковой, доцента Б.И. Мицнера и др. [1–8]. Окончательно это направление науки было сформировано и оформлено в течение последних 20 лет на кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ в работах группы проф. А.А. Ходонова [9–71] в сотрудничестве с рядом научных организаций (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Центр фотохимии РАН, Государственный НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов и др.).

Объектами исследования в этом цикле работ служили уникальные биологические молекулярные преобразователи и конверторы энергии светового кванта в разнообразные виды химического или физиологического ответа. Они представляют собой сложнейшие супрамолекулярные системы, созданные природой в процессе эволюции, и подразделяются на ковалентные (хромопротеины – ретиналь-содержащие белки) и нековалентные (RAR и RXR – ядерные рецепторы ретиноевой кислоты, ретиноид-транспортные белки) комплексы ретиноидов с макромолекулярными белковыми рецепторами, в которых молекула ретиноида представляет собой уникальную природную фототрансформирующую антенну с большим разнообразием функций. Геометрия полиеновой цепи молекулы ретиноида служит определяющим фактором, детерминирующим вид физиологического ответа в организме хозяина.

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.

Центральное место по своей биологической значимости среди производных витамина А занимает ретиналь (3), который в виде определенных стереоизомеров (*all-E*-, *11Z*-, *13Z*-) формирует хромофорные группы большого

семейства ретиналь-содержащих белков, ответственных за ряд важнейших фотобиологических функций. Хромопротеины, относящиеся к этому семейству, осуществляют светозависимый транспорт ионов-протонов (бактериородопсин и галородопсин), процесс зрительной рецепции

(родопсин), т.е. преобразуют энергию светового кванта в зрительный импульс в зрительных пигментах фоторецепторных клеток, ответственные за фототаксис (сенсорные фобо- и протородопсины, представленные в различных группах организмов) [2, 12, 61, 71, 73].

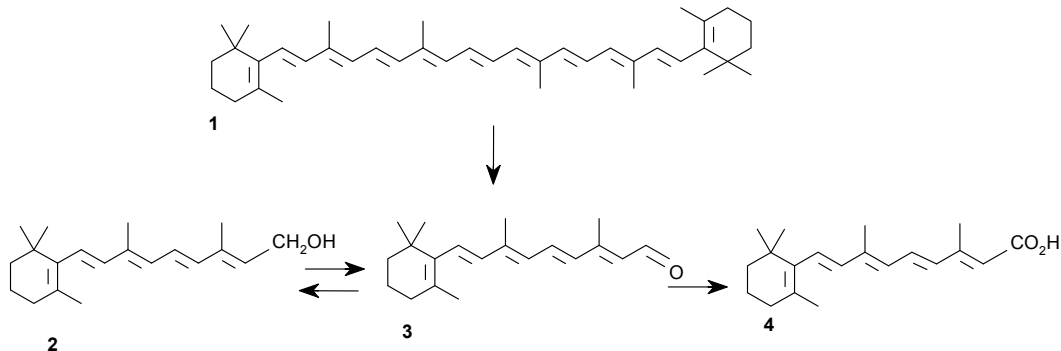


Рис. 1. Основные представители природных ретиноидов: 2 – ретинол (витамин А); 3 – ретиналь; 4 – ретиновая кислота. 1 –  $\beta$ -каротин (предшественник витамина А).

#### Ретиналь-содержащие белки. Основные представители, особенности структуры и функции

Ретиналь-содержащие белки имеют следующие общие особенности:

1) по своей структуре они представляют собой мембранные белки, состоящие из 7 трансмембранных тяжей;

2) в состав хромофорной группы входит определенный изомер ретиналя (*all-E*- в пигментах микроорганизмов и *11Z*- в зрительных

пигментах), который соединен с  $\epsilon$ -аминогруппой остатка лизина белка через протонированную альдиминную связь;

3) обладают общностью функциональной активности, связанной с преобразованием энергии светового кванта в различные химические или физиологические ответы (светозависимый транспорт ионов, инициирование каскада зрительной трансдукции или фототаксис) (табл. 1).

Таблица 1. Основные представители ретиналь-содержащих белков и их функции [2, 12].

| Белок                                                | Хромофор                                                    | Объект                            | $\lambda_{\text{макс}}$ , нм | Функция                                                               |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Зрительные пигменты палочек родопсины                | <i>11Z</i> -изомер ретиналя                                 | Бык                               | 498                          | Фоторецепция                                                          |
|                                                      |                                                             | Лягушка                           | 502                          |                                                                       |
|                                                      |                                                             | Осьминог                          | 475                          |                                                                       |
|                                                      |                                                             | Карась                            | 522                          |                                                                       |
|                                                      |                                                             | Насекомые                         | 345-610                      |                                                                       |
| Зрительные пигменты колбочек порфиросины и иодопсины | <i>11Z</i> -изомер ретиналя и его 3,4-дидегидропроизводного | Цыпленок                          | 562                          | Фоторецепция                                                          |
| Бактериородопсин (БР)                                | <i>all-E</i> - и <i>13Z</i> -изомеры ретиналя               | <i>Halobacterium salinarum</i>    | 558<br>568                   | Светозависимый транспорт $\text{H}^+$ -ионов                          |
|                                                      |                                                             | <i>H. salinarum</i>               | 578                          |                                                                       |
| Галородопсин                                         | <i>all-E</i> - и <i>13Z</i> -изомеры ретиналя               | <i>H. salinarum</i>               | 587<br>373                   | Светозависимый транспорт $\text{Cl}^-$ -ионов                         |
| Сенсорные родопсины                                  | <i>all-E</i> -изомеры ретиналя                              | <i>H. salinarum</i>               | 587<br>373                   | Фототаксис                                                            |
| Ретинохром                                           | <i>all-E</i> - и <i>13Z</i> -изомеры ретиналя               | Кальмар <i>Todares pacificus</i>  | 496                          | Фотоизомеризация <i>all-E</i> -ретиналя в <i>11Z</i> -изомер ретиналя |
| Фараонисродопсин<br>Галородопсин                     | <i>all-E</i> - и <i>13Z</i> -изомеры ретиналя               | <i>Natronobacterium pharaonis</i> | 590<br>577                   | Светозависимый транспорт $\text{Cl}^-$ -ионов                         |
|                                                      |                                                             | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>  | 501-505                      |                                                                       |
| Хламиродопсин                                        | <i>all-E</i> - и <i>13Z</i> -изомеры ретиналя               | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>  | 501-505                      | Фототаксис                                                            |

### Бактериородопсин

Бактериородопсин (БР) – наиболее хорошо изученный объект-бионамишень среди других ретиналь-содержащих белков. БР был выделен в 1971 году Остерхельтом и Стокениусом из экстремально галофильной бактерии *Halo-bacterium salinarum* (*halobium*) в виде пурпурных мембран [2, 12, 72]. Он функционирует как светозависимый протонный насос; хромофором БР является протонированный альдимин *all-E*-ретиналя с  $\epsilon$ -аминогруппой остатка Lys216 апобелка бактериородопсина (БО). Поглощая квант света, БР претерпевает цикл спектральных переходов, сопровождающихся изомеризацией и реизомеризацией полиеновой цепи хромофора с депротонированием и репротонированием его альдимины, причем в ходе фотоцикла происходят значительные конформационные изменения белковой части молекулы БР, особенно на стадиях образования и релаксации ключевого интермедиата М ( $\lambda_{\text{макс}}$  412 нм,  $\epsilon$  45.000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) и последующих интермедиатов его фотоцикла (рис. 2).

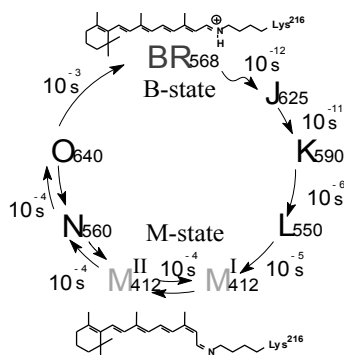


Рис. 2. Фотоцикл бактериородопсина.

На свету исходное основное состояние (B-state) характеризуется *all-E*-конфигурацией хромофора ( $\lambda_{\text{макс}}$  570 нм,  $\epsilon$  63.000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>). В начале этого цикла наблюдается депротонирование альдимины и выброс протона с внешней стороны пурпурной мембраны в окружающую среду. Возврат молекулы в исходное состояние сопровождается репротонированием альдимины, поглощением H<sup>+</sup> с цитоплазматической стороны мембраны и изомеризацией полиеновой цепи. В результате, при каждом обороте фотохимического цикла через мембрану переносится один протон. Таким образом, БР и его аналоги относятся к семейству бионанофотохромов, трансформирующих энергию кванта света в трансмембранный электрохимический градиент протонов на пурпурной мембране клеток галобактерий. Первые работы по практическому применению препаратов БР и его аналогов (АБР) в различных областях техники и нанобиофотоники были развернуты сразу после установления его функции в клетках галобактерий.

Первые пионерские работы по возможности технического применения пленок БР и АБР как

элементов оптической памяти были проведены в России совместными усилиями коллективов ученых Института биофизики РАН Пущино, Центра фотохимии РАН, кафедры биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ. В 1980-х годах была продемонстрирована эффективность и перспективность применения таких материалов, названных «Биохром», в качестве фотохромных материалов и среды для голографической записи. В последующие годы различными группами исследователей была показана реальная возможность применения получаемых препаратов БР, его аналогов и мутантов для создания опытных образцов, а в перспективе – промышленных образцов и прототипов оптических устройств и материалов для обработки и защиты информации.

Уникальность данного белка – природной фотоуправляемой фотосинтетической системы – для нужд молекулярной нанобиофотоники определяется его следующими свойствами:

- 1) БР – наиболее просто устроенный и необычайно стабильный протонный насос;
- 2) доступен в больших количествах (простая, легко масштабируемая процедура выращивания биомассы культуры *H. salinarum* и выделения мембранных препаратов БР при достаточно низкой ее 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 (10<sup>-12</sup> с);
- 5) высокое значение квантового выхода реакции фотоизомеризации C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-связи хромофора;
- 6) наличие технологической возможности встраивания в полимерную матрицу различного состава для получения «сухих» пленок;
- 7) наличие технологической возможности использования изменяющихся оптической или электрической компонент сигнала как в оптических, так и в электронных устройствах для практического применения.

Хотя исследованием БР занимаются десятки лабораторий во всем мире, детальный молекулярный механизм светозависимого транспорта протонов до сих пор еще не известен.

Общий план проведения исследований в данной области на кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова представлен ниже.

#### Основные этапы исследований взаимосвязи структура–функция в ретиналь-содержащих белках [1–72]

1. Моделирование пространственных ограничений хромофорной полости БР с использованием программ HyperChem v. 8.0; опреде-

ление критериев, позволяющих с высокой степенью вероятности прогнозировать результат взаимодействия аналога ретиналя с апобелком и свойства образующихся АБР. Создание двух баз данных, суммирующих свойства аналогов БР, содержащих или аналог ретиналя в качестве хромофора и/или несущих точечную замену аминокислотной последовательности в белковой части. Проведение критического анализа и экспертной оценки взаимосвязи влияния строения хромофора и конкретных точечных мутаций на фотохимические свойства АБР.

2. Оптимизация лабораторной технологии культивирования и выделения мембранных препаратов бактериородопсина (БР) из различных штаммов *H. salinarum* (ET1001, D96N, JW-5). Нарботка препаративных количеств образцов биомассы *H. salinarum* для получения препаратов пурпурных мембран.

3. Разработка универсальных и эффективных синтетических приемов, методик и стратегии создания молекулы ретиноида с заданной структурой. Синтез и наработка препаратов избранных серий уже известных аналогов ретиналя и дизайн молекул и разработка методов синтеза новых серий ретиноидов.

4. Исследование процесса взаимодействия серий синтезированных аналогов ретиналя с БР из апомембран разных штаммов с образованием АБР с разнообразными спектральными свойствами.

5. Комплексное исследование спектральных и кинетических фотохимических характеристик аналогов ретиноидов и АБР в водных суспензиях. Исследование кинетики образования и релаксации основных интермедиатов (М-типа) фотоцикла АБР в водной суспензии.

#### **Создание баз данных фотохимических свойств аналогов бактериородопсина (АБР)**

На основе результатов собственных исследований и литературных данных нами создана база данных 1 («Свойства АБР с модифицированным хромофором»), суммирующая сведения о способности апобелка бактериородопсина (БО) к образованию ковалентных и нековалентных комплексов с различными полиеновыми соединениями и об их фотохимических свойствах. Она включает перечисленные ниже структурные, спектральные и фотохимические параметры, а также другие сведения о продуктах взаимодействия более 350 полиеновых соединений с апобелком БО. Основными дескрипторами являются: структура конкретного тестируемого изомера полиенового соединения; максимум поглощения ( $\lambda_{\text{макс}}$ ): исходного соединения, моделей (оснований Шиффа с *n*-бутиламином в определенном органическом растворителе, в непротонированной и протонированной формах), нековалентного комплекса с апобелком, пигмента (адаптированных к свету и

темноте форм); наличие и тип фотоцикла; эффективность протонного транспорта; изомерный состав хромофора (соотношение *all-E*- и *13Z*-изомеров); «опсиновый» сдвиг; устойчивость продуктов взаимодействия к гидроксил-амину и *all-E*-ретиналю и прочие дополнительные данные.

Замена природного ретиналя его аналогами – один из основных и наиболее перспективных подходов к изучению хромофорного центра БР. Эта процедура позволяет варьировать как максимум поглощения основного состояния пигмента в широких пределах (412-830 нм, причем для пигментов с  $\lambda_{\text{макс}}$  в интервале 460-625 нм показано наличие фотоцикла), так и другие важные фотохимические параметры (квантовый выход, скорость распада М-интермедиата, эффективность протонного транспорта и др.). Проведенные нами критический анализ и экспертная оценка позволят в будущем в рамках определенных серий модификаций хромофора осуществлять прогнозирование фотохимических параметров (особенно  $\lambda_{\text{макс}}$  для новых пигментов на основе  $\lambda_{\text{макс}}$  исходных полиеналяей) и их структурных особенностей.

Дополнительные изменения фотохимических свойств БР могут быть достигнуты путем использования ряда подходов:

- 1) замещением одного или нескольких аминокислотных остатков в определенных положениях молекулы БР методами сайт-специфического мутагенеза или генетической инженерии;
- 2) замещением остатка природного ретиналя на его различные аналоги;
- 3) использованием физических воздействий различного рода (низких температур, электрических полей, изменение уровня влажности, pH и др.);
- 4) сочетанием нескольких перечисленных выше методов.

За прошедшее время был накоплен большой массив информации о свойствах около 150 мутантов БР с единичными и множественными заменами аминокислот. Однако полученные результаты до сих пор не были систематизированы. По этой причине было необходимо провести сравнительный анализ опубликованных в литературе сведений по влиянию точечных замен аминокислотных остатков в молекуле БР на его свойства. Такой анализ позволил выделить области структуры белка, в которых замена аминокислотных остатков вызывает значительные изменения важнейших характеристик БР.

В базе данных 2 («Свойства мутантов БР») нами собраны опубликованные в литературе данные по влиянию точечных мутаций на следующие свойства и параметры мутантов БР:  $\lambda_{\text{макс}}$  пигмента, наличие и тип световой адаптации, наличие и тип фотоцикла и эффективность протонного транспорта. Анализ этих

данных позволил выявить мутации, которые значительно изменяют свойства БР:

а) были выявлены те мутации, которые изменяют  $\lambda_{\text{макс}}$  пигмента более чем на 10 нм. При выборе этого значения было учтено то, что в области 570 нм БР имеет достаточно широкую полосу поглощения (с полушириной около 70 нм), в связи с этим точность определения положения максимума поглощения составляет ~1-2 нм. Кроме того, следует отметить, что  $\lambda_{\text{макс}}$  пигмента изменяется почти при всех заменах аминокислот в результате небольших изменений, вносимых ими в третичную структуру белка. В связи с этим, для отбора достаточно узкого ряда аминокислотных остатков, оказывающих наиболее сильное влияние на положение максимума поглощения БР, и принято значение 10 нм.

б) учитывая, что при световой адаптации дикого штамма БР сдвиг максимума поглощения составляет 10 нм, для анализа было принято считать, что световая адаптация не нарушена, если сдвиг максимума поглощения происходит более чем на 7 нм;

в) выявлены аминокислотные остатки, снижающие эффективность транспорта протонов как минимум на один порядок;

г) представлена выборка тех аминокислотных остатков, замена которых изменяет кинетику образования и распада М-интермедиата более чем в 5 раз (т. е. если среднее время соответствующего процесса изменяется по крайней мере в 5 раз).

#### **Моделирование пространственных ограничений хромофорной полости бактериородопсина (БР)**

В последние годы были достигнуты впечатляющие успехи в кристаллографических исследованиях молекулы БР (файл 1C3W.pdb с разрешением 1.55 Å из Brookhaven Protein Data bank), и на основании полученных данных была предложена модель части канала светозависимого переноса протона через пурпурную мембрану [73]. Хромофорная группа расположена в полости, формируемой боковыми радикалами аминокислотных остатков ряда трансмембранных  $\alpha$ -спиральных тяжей, и разделяет канал передачи протона на две части: цитоплазматическую и внеклеточную. Донором и акцептором протона служат карбоксильные остатки Asp96 и Asp85. С цитоплазматической стороны клеточной мембраны канал формируется двумя молекулами воды ( $\text{H}_2\text{O}^{501}$ ,  $\text{H}_2\text{O}^{502}$ ) и следующими аминокислотными остатками: (Asp96-COOH --- OH-Thr46); (Thr46-C=O ---  $\text{H}_2\text{O}^{502}$  --- O=C-Lys 216); (Ala215-C=O ---  $\text{H}_2\text{O}^{501}$  --- HN(индол)-Trp 182). С внешней стороны протонного канала в трехмерной цепи межмолекулярных водородных связей участвуют семь молекул воды ( $\text{H}_2\text{O}^{401-407}$ ),

Asp85, Asp212, Thr89, Tyr185, Tyr57, Arg82, Glu194, Glu204 и Ser193.

Нами было проведено исследование топографии хромофорной полости БР с помощью пакета HyperChem v. 8.0 (HyperCub, США). Оценка производилась по пяти реперным точкам: C<sub>1</sub>- и C<sub>4</sub>-атомы триметилциклогексенового кольца, C<sub>19</sub>- и C<sub>20</sub>-атомы метильных групп полиеновой цепи и N<sup>ε</sup>-атом основания Шиффа Lys216 хромофорной группы БР. Анализ данных показывает, что близлежащие к триметилциклогексеновому кольцу аминокислотные остатки расположены на  $\alpha$ -спиральных тяжях С, D и Е. В районе триметилциклогексенового кольца хромофорную полость формируют следующие остатки аминокислот: Pro186, Ser141, Trp189, Trp138, Tyr185, Trp86, Tyr83, Thr142, Met118. Минимальное расстояние от атомов кислорода гидроксильных групп остатков Ser141, Thr142 до C<sub>4</sub>-атома хромофора R составляет 3.14-3.50 Å. Результаты, полученные ранее в нашей лаборатории, позволяют утверждать, что различные типы модификации триметилциклогексенового кольца хромофорной группы БР (замена его циклами различной природы и размера или его удаление) не препятствуют образованию искусственных пигментов из БО и аналогов ретиналя такого рода. Этот факт подтверждают проведенные нами компьютерные оценки размеров хромофорной полости БР в районе триметилциклогексенового кольца (7.5-10 Å).

С другой стороны, в области полиеновой цепи и альдиминной связи белковое микроокружение накладывает жесткие стерические ограничения на структуру хромофора. Ранее нами было показано, что даже небольшое различие между двумя группами структур аналогов (1.5-2 Å) является критическим для образования искусственных пигментов из БО с 10,12-этан- и 10,12-пропаноретиналем, а также БО с 20,14-этан- и 20,14-пропаноретиналем, соответственно [12].

С помощью программы HyperChem, v. 8.0 проведены моделирование и компьютерные расчеты целевых структур молекул ряда полиенов и их предшественников, поиск конформации с минимальной энергией. Оценка относительных размеров производилась путем суперпозиции нескольких структур с учетом максимального перекрытия по нескольким реперным точкам.

#### **Оптимизация лабораторной технологии культивирования и выделения мембранных препаратов БР из различных штаммов *H. salinarum* (ET1001, D96N, JW-5)**

Нами были проведены исследования по оптимизации методов культивирования и выделения биомассы культуры галофильного микроорганизма

*H. salinarum* (штаммы ET1001, JW5, D96N).

Отбор штаммов *H. salinarum*, использованных для получения АБР, проводился на основании следующих требований, обусловленных технологической направленностью исследования: 1) простота выделения препаратов БР, не содержащих каротиноидов, поскольку их примеси мешают определению спектральных характеристик препаратов БР; 2) возможность уменьшения числа стадий процесса получения аналогов БР, поскольку необходимо было получить препаративные количества аналогов БР (~100 мг и более); 3) значительно замедленная кинетика релаксации М-интермедиата фотоцикла. В результате, с учетом приведенных выше ограничений, из набора доступных штам-

мов было выбрано три: ET1001, JW5 и D96N. Краткие характеристики этих штаммов, а также штамма 353П, использовавшегося ранее, приведены в табл. 2.

Для выбранных штаммов *H. salinarum* (ET1001, JW5, D96N) были подобраны условия культивирования (температура, освещенность, аэрация, время культивирования), позволяющие получать БР с высоким выходом. Выход БР с 1 л культуры составил около 45 мг для штаммов ET1001 и D96N и 13-15 мг для штамма JW5, тогда как по литературным данным наилучший выход составляет 40-50 мг с 1 л культуры. Нарботаны партии мембранных препаратов БР в препаративных количествах (до 10 г).

Таблица 2. Характеристика штаммов *H. salinarum*.

| Штамм  | Бактериоопсин | Ретиналь | Каротиноиды | Скорость релаксации М-интермедиата фотоцикла БР |
|--------|---------------|----------|-------------|-------------------------------------------------|
| 353П   | ++            | +        | ++          | Быстрая                                         |
| ET1001 | ++            | +        | ±           | Быстрая                                         |
| JW5    | +             | —        | —           | БР не синтезируется                             |
| D96N   | ++            | +        | ±           | Медленная                                       |

«++» – повышенное содержание; «+» – стандартный уровень штаммов дикого типа;

«±» – пониженное содержание; «—» – не синтезируется.

Нами был проведен поиск условий для наиболее эффективного получения препаратов пурпурных мембран (ПМ), используемых для дальнейшего исследования. Хотя методы культивирования *H. salinarum* и получения ПМ достаточно подробно описаны в литературе, нам пришлось «адаптировать» их к реальным

экспериментальным условиям. В результате этой части экспериментов было сделано несколько промежуточных наблюдений и выводов, позволивших в итоге получить препараты ПМ с достаточно высоким выходом (до 50 мг/л культуры) (рис. 3, табл. 3).

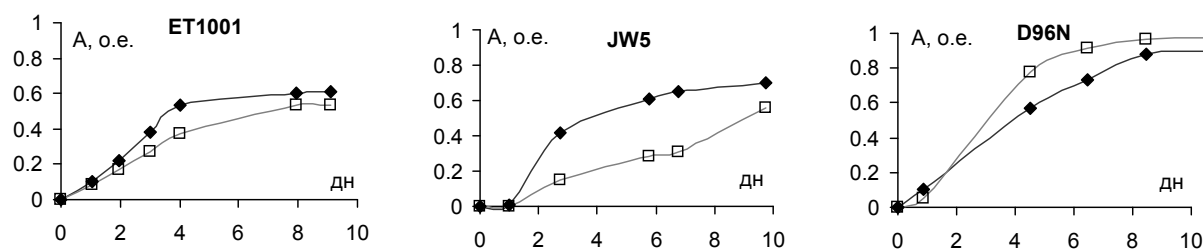


Рис. 3. Сравнение кривых роста *H. salinarum* штаммов ET1001 (37°C), JW5 (37°C), D96N (34°C).

Обозначения: ♦ – оптическая плотность культуры при 650 нм, □ – накопление БР по оптической плотности супернатанта лизированных клеток при 570 нм.

Таблица 3. Условия культивирования *H. salinarum* (скорость аэрации 0.45 (л воздуха)/(л среды)/мин).

| Штамм  | t, °C | Время, сут | Выход с 1 л культуры |          |
|--------|-------|------------|----------------------|----------|
|        |       |            | биомасса, г          | БР, мг   |
| ET1001 | 37    | 8          | 5                    | 45       |
| JW5    | 37    | 10         | 3.2                  | 13 (15*) |
| D96N   | 34    | 10         | 5.5                  | 47       |

\*При культивировании добавляли 3,4-дидегидроретиналь.

Обесцвечивание пурпурных мембран осуществляли в соответствии со стандартной методикой: суспензию мембран с концентрацией белка около 0.5 мг/мл в 1 М растворе гидроксилamina, pH 7.0, при температуре 7-12°C освещали светом 2-х галогеновых ламп мощностью по 500 Вт, пропущенным через тепловой фильтр (0.2% водный раствор сульфата меди, в круглодонной колбе объемом 1 л), который одновременно обеспечивает фокусировку луча света на ячейке, содержащей суспензию мембран. Прохождение процесса контролировали

по уменьшению оптической плотности при 563 нм. В зависимости от концентрации белка время обесцвечивания составляло от 17 до 26 ч. Несмотря на то, что у БР<sub>D96N</sub> фотоцикл значительно замедлен, время его обесцвечивания практически не отличается от БР с природной аминокислотной последовательностью.

Концентрацию «активного» БО в составе апомембран определяли по поглощению при 568 нм после регенерации действием 1.5-го

избытка *all-E*-ретинаяля.

Показано, что приготовленные в данных условиях препараты апомембран обладали достаточно воспроизводимыми характеристиками. Так, степень встраивания ретинаяля была практически одинакова для апомембран в независимых экспериментах, однако сам процесс происходил медленнее, если увеличивалось время обесцвечивания ПМ (рис. 4).

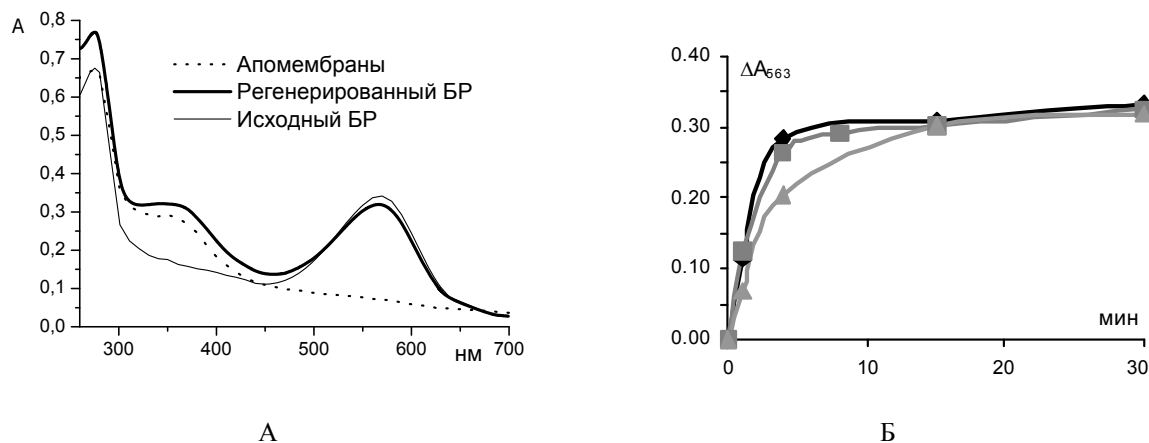


Рис. 4. Реконструкция бактериородопсина. Спектры нормализованы по белковой полосе поглощения препаратов мембран до добавления ретинаяля. А) Спектры препаратов. Б) Кривые встраивания *all-E*-ретинаяля в апомембраны D96N, время обесцвечивания при получении апомембран составляет: ◆ – 17 ч, ■ – 21 ч, ▲ – 26 ч.

#### Дизайн целевых структур молекул и разработка методов синтеза аналогов ретинаяля

В течение последних 25 лет на кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова развернуты систематические исследования в области нанобиофотоники, объектом которых являются новые гибридные материалы (ГАБР), получаемые на основе функционализированных молекул ретиноидов, содержащих определенного типа репортерные группы (изотопные, электроно-плотные [18, 19], флуоресцентные, ионофорные [17, 18, 24–37, 45, 48, 61] и фотохромные метки [30, 36, 38–41, 43, 47, 49–58, 61, 62–68]), и их комплексов с бионамишенью – апобелком бактериородопсином (БО) (схема 1).

В ходе цикла проделанных работ были разработаны новые эффективные методы получения ретиноидов различного строения, а также изучено влияние элементов их структуры на функционирование некоторых ретиноид-белковых комплексов (БР и ядерных рецепторов ретиноевой кислоты). Основные направления модификации структуры молекулы ретинаяля представлены на рис. 5. Изменения структуры молекулы ретиноида затрагивали: 1) конфигурацию двойных связей; 2) триметилциклогексеновое кольцо, включая его замену на аромати-

ческое; 3) введение заместителей при C(13)-атоме; 4) удлинение полиеновой цепи на два и пять атомов углерода; 5) закрепление *E*- или *Z*-конфигурации путем введения в полиеновую цепь циклов различной природы и размеров; 6) введение тройной связи в C(11)-C(12) положение; 7) введение в различные положения молекулы репортерных групп различной природы (спиновые, флуоресцентные, изотопные, электроно-плотные метки).

Все известные синтетические методы могут быть условно разделены на две группы:

а) стереоселективный синтез определенных изомеров ретиноидов;

б) синтез наиболее доступного из изомеров или их смеси с последующей фото- или термо-изомеризацией и выделением требуемого изомера из реакционной смеси при помощи препаративной ВЭЖХ.

Основные методологические подходы и приемы дизайна и синтеза различных аналогов ретинаяля ранее были достаточно подробно освещены в обзорах [2, 12] и ряде последующих публикаций [18, 22, 34, 43, 45, 54–56, 74]. Поэтому в рамках настоящего обзора мы ограничимся лишь кратким описанием и критическим анализом использованных методов и схем получения аналогов ретинаяля, разработанных впервые на кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ, а также анализом

полученных результатов по изучению свойств ГАБР. Таким образом, в настоящем обзоре мы представляем наши результаты цикла работ по изучению спектральных, ионофорных или фотохромных свойств нескольких серий гибридных ретиноидных молекул, у которых триметилцик-

логексеновое кольцо природного ретиноида заменено на сенсорное (краун-эфир) или фотохромное звено и находится в сопряжении с формильной группой через линкер – систему C=C-двойных связей (полиеновую цепь) различной длины.

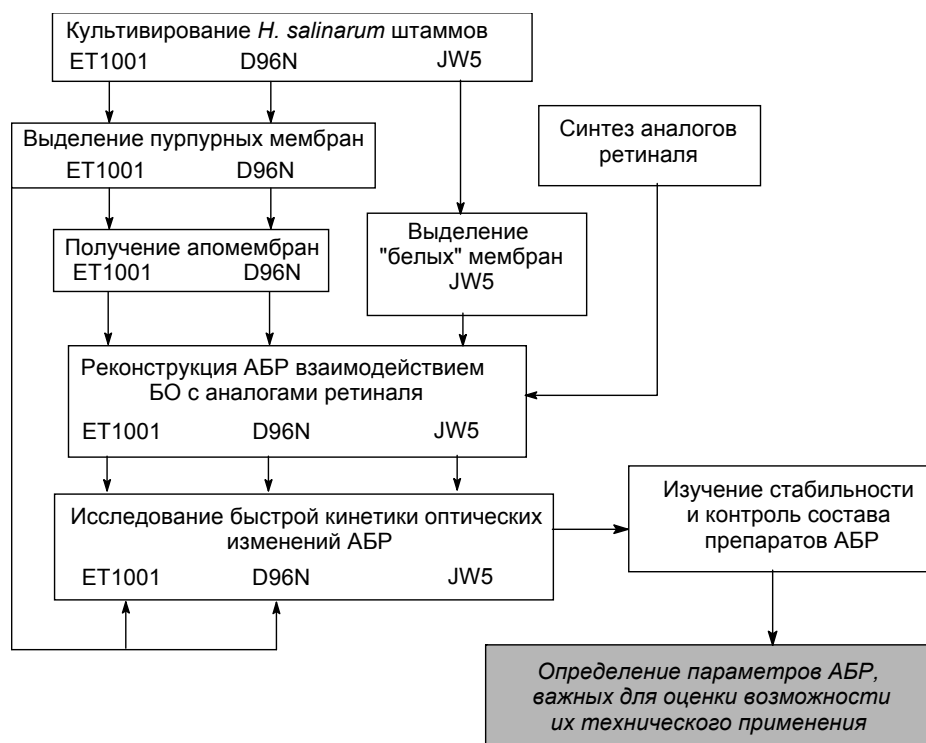


Схема 1. Технологическая платформа создания новых материалов (ГАБР) для нанобиофотоники.

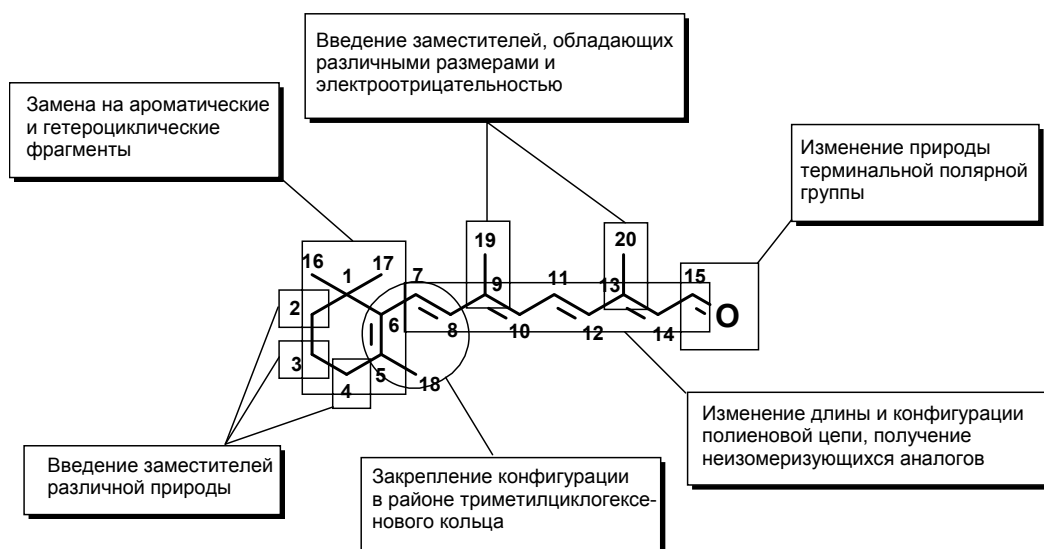


Рис. 5. Основные направления модификации структуры ретиналя.

В качестве соответствующих ионофорных фрагментов мы использовали 4 серии монобензопроизводных краун-эфиров и их дитиа-аналогов, различающихся размерами макрогетероцикла – серии **CR I-Va-d** [17, 18, 24–37, 45, 48, 61]. Для определения влияния структуры макрогетероцикла на спектральные свойства полиеналей нами был также осуществлен синтез модельных репер-

ных соединений **CR I-Ve**, содержащих 3,4-диметоксифенильное кольцо вместо макрогетероцикла.

Были синтезированы две серии фотохромных соединений в ряду спиропиранов **SPR I-V** и **SPRN I-V**, различающихся местом введения полиенового фрагмента в фотохромное звено. Нами был разработан и осуществлен синтез соответствующих производных, име-



ющих полиеновую цепь различной длины либо в 6'-положении пиранового кольца (**SPR I-V**) [30, 39, 40, 43, 47, 49, 51–54, 57, 58, 62, 68, 71], либо по C<sub>5</sub>-атому индолинового фрагмента молекулы (**SPRN I-V**) [49, 51–53, 55, 57, 58, 61,

62, 68, 71]. Также нами был разработан метод получения еще одной серии фотохромных ретиноидов на основе производных дитиенил-этинов (**DTE I-V**) [38–40, 50–53, 56–58, 61, 62, 68, 71]. (Схема 2).

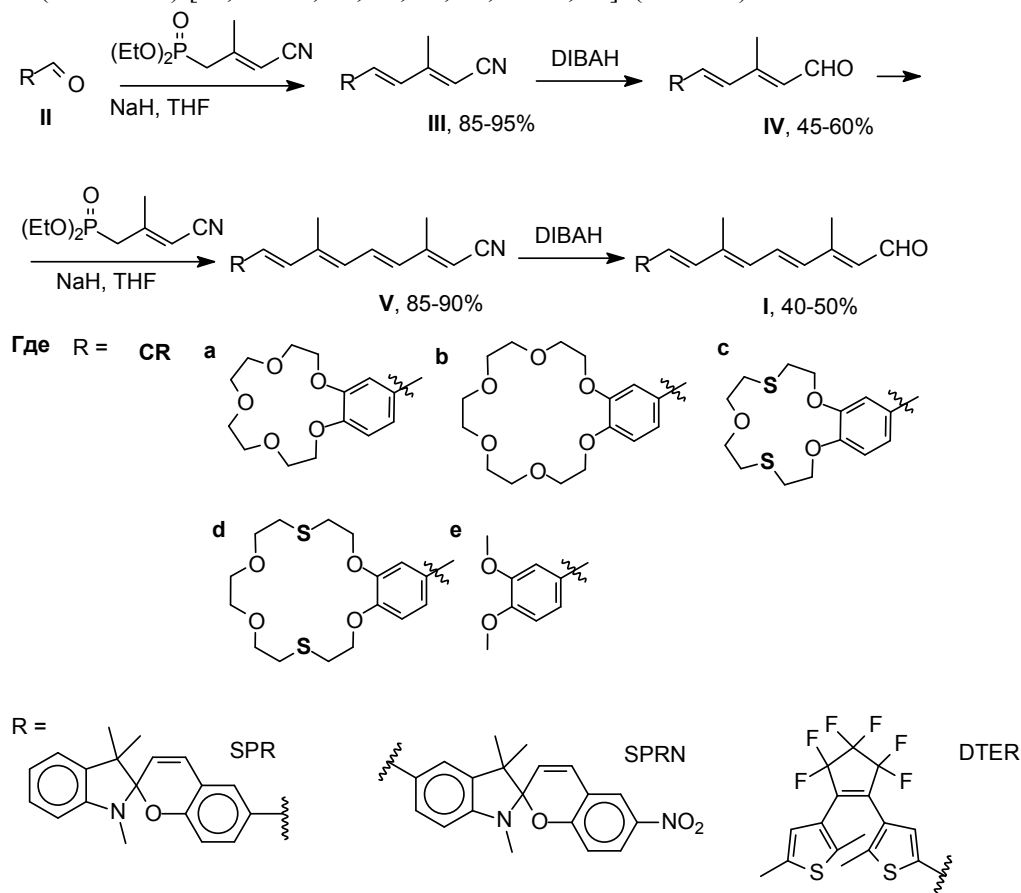


Схема 2.

Для получения вышеупомянутых серий ионофорных и фотохромных производных ретиноидов нами было с успехом использована универсальная синтетическая последовательность, изображенная на схеме 2, ключевой стадией которой является реакция олефинирования по Хорнеру–Эммонсу соответствующих карбонильных предшественников анионом C<sub>5</sub>-фосфонатного реагента, содержащего терминальную нитрильную группу. Последующая стадия восстановления полиеновых нитрилов при помощи диизобутилалюмогидрида при –100°C давала нам промежуточные или целевые гибридные полиенали, содержащие разное количество кратных связей в цепи сопряжения.

Основным направлением последующих исследований было изучение спектральных свойств и комплексообразования ионофоров, а также фотохромного поведения и спектрально-кинетических характеристик фотохромных гибридов ретиноидов.

#### Спектральные свойства аналогов ретинала Комплексообразование краун-содержащих гибридов ретиноидов CR I-Va-d с катионами металлов

Процесс комплексообразования соединений **CR I-Va-d** в растворе ацетонитрила с катионами различных металлов (схема 3) изучался спектрофотометрическим методом.

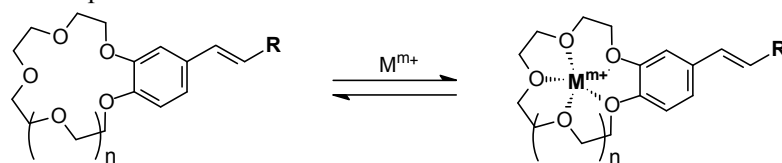


Схема 3.

В электронных спектрах всех исследуемых соединений присутствуют две группы полос поглощения – одна в области 290-450 нм

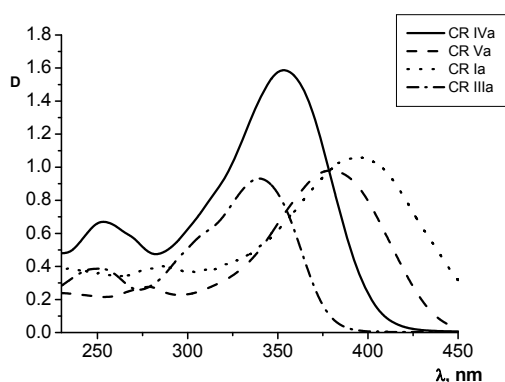
(длинноволновая полоса поглощения), обусловленная поглощением всего хромофора, вторая в коротковолновой области спектра (<240 нм), за

которую ответственны изолированные бензо-краун-эфирный или 3,4-диметоксифенильный фрагменты. Спектры поглощения исследуемых краун-соединений с одинаковыми типами терминальных групп, но с различным размером краун-цикла практически совпадают со спектрами соединений сравнения с диметоксифенильным фрагментом.

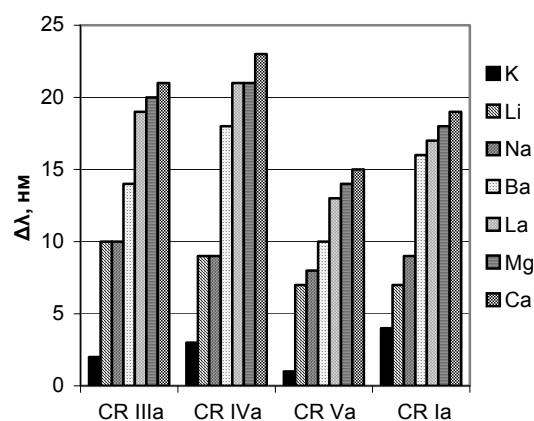
Природа терминальной группы оказывает влияние на положение  $\lambda_{\text{макс}}$  длинноволновой полосы поглощения винилогов краун-эфиров в соответствии с ее акцепторными свойствами. Так, положение  $\lambda_{\text{макс}}$  в спектрах поглощения альдегидов оказываются сдвинутыми bathochromно, примерно на 9 и 17 нм по мере увеличения цепи, по сравнению со спектрами поглощения соединений с CN- и COOEt-концевыми группами с одинаковой длиной цепи сопряжения (рис. 6, 7). По мере удлинения цепи сопряжения в ряду соединений с CN- и COOEt-

группами в среднем наблюдается увеличение  $\lambda_{\text{макс}}$  на 19 и 40 нм соответственно.

Добавление к растворам краун-эфиров **CR I,III-Va,b** перхлоратов различных металлов приводит, в отличие от модельных соединений **CR I,III-Ve**, к изменениям электронных спектров поглощения. Например, на рис. 6, 7, 8А и в табл. 4 представлены параметры спектров поглощения соединений в присутствии различных катионов металлов. Видно, что при взаимодействии краун-эфира с ионами металлов перераспределяются интенсивности и сдвигаются максимумы длинноволновых полос поглощения. Очевидно, что наблюдаемые изменения обусловлены взаимодействием между краун-эфирным фрагментом молекулы и ионом металла (см. схему 3). Ионы металлов оказывают качественно одинаковое влияние на исследуемые краун-соединения, приводя к гипсохромному сдвигу длинноволновых полос поглощения.

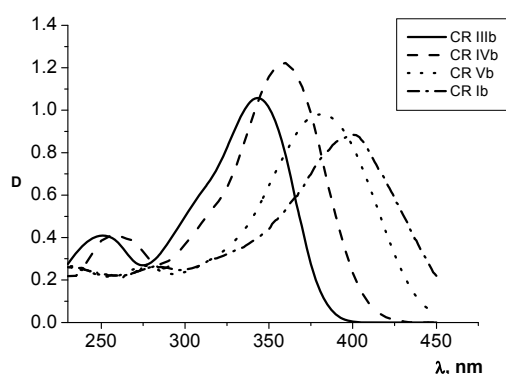


А

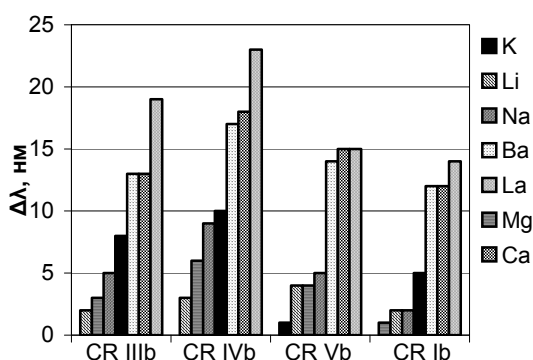


Б

Рис. 6. Спектры поглощения соединений **CR I,III-Va** в MeCN (А) и относительное изменение положения максимумов длинноволновых полос  $\Delta\lambda_{\text{макс}}$  ( $\Delta\lambda_{\text{макс}} = \lambda_{\text{ML}} - \lambda_{\text{L}}$ ) (Б) при введении в растворы солей металлов ( $c_{\text{M}}/c_{\text{L}} = 1000$ ).



А



Б

Рис. 7. Спектры поглощения соединений **CR I,III-Vb** в MeCN (А) и относительное изменение положения максимумов длинноволновых полос  $\Delta\lambda_{\text{макс}}$  ( $\Delta\lambda_{\text{макс}} = \lambda_{\text{ML}} - \lambda_{\text{L}}$ ) (Б) при введении в растворы солей металлов ( $c_{\text{M}}/c_{\text{L}} = 1000$ ).

Величина сдвига максимумов полос поглощения соединений **CR I,III-Va,b** при комплексообразовании зависит как от размера макроцикла, так и от размера и заряда катиона

металла. Значение  $\Delta\lambda_{\text{макс}}$  для производных 15-краун-5-эфиров **CR I,III-Va** уменьшалось в ряду  $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{La}^{3+} > \text{Na}^{+} > \text{Li}^{+} > \text{K}^{+}$ , а для аналогов 18-краун-6 **CR I,III-Vb** – в ряду

$\text{La}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Li}^+$  (рис. 6, 7, 8А и табл. 4). Наблюдаемый при комплексообразовании гипсохромный сдвиг полос поглощения обусловлен влиянием катиона металла на распределение  $\pi$ -электронной плотности в цепи сопряжения молекул ионофоров **CR I,III-Va,b**. В отличие от кислородсодержащих краун-соединений, лиганды **CR I,III-Vc,d**, содержащие в составе макроцикла атомы серы, не свя-

зывали катионы щелочных и щелочноземельных металлов, поскольку дитиакраун-эфирные фрагменты практически не способны связывать ионы, обладающие низким сродством к серусодержащим лигандам. В то же время, при добавлении нитратов или перхлоратов серебра(I), ртути и свинца(II) наблюдаются гипсохромные сдвиги длинноволновых полос поглощения, обусловленные образованием комплексов (рис. 8, табл. 5).

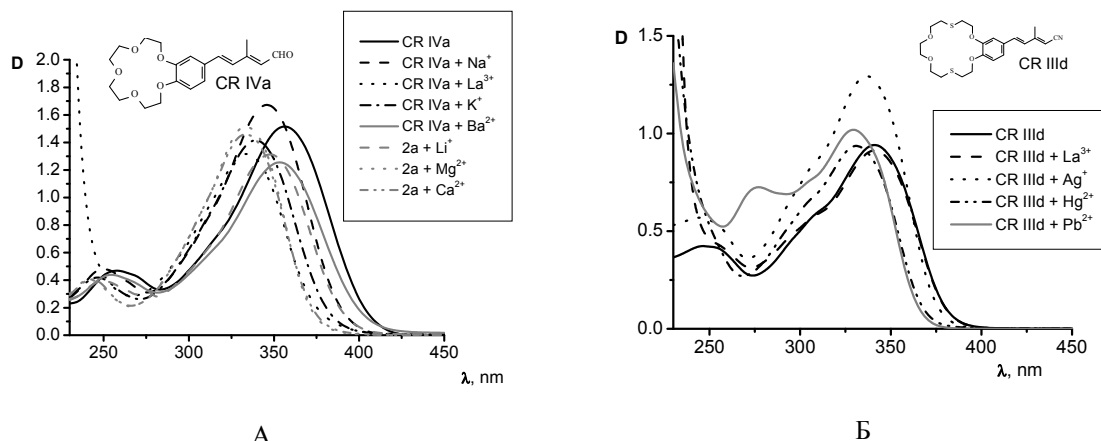


Рис. 8. Спектры поглощения соединений **CR IVa** (А) и **CR IIIId** (Б) в MeCN без и в присутствии в растворах перхлоратов металлов ( $c_M/c_L = 1000$ ).

Таблица 4. Относительное изменение положения максимумов длинноволновых полос поглощения соединений **CR I,III-Va,b**  $\Delta\lambda_{\text{макс}}$  ( $\Delta\lambda_{\text{макс}} = \lambda_{\text{ML}} - \lambda_L$ ) в MeCN при введении в растворы солей металлов ( $c_M/c_L = 1000$ ).

| Соединение     | $\lambda_{\text{макс, нм}} (\Delta\lambda_{\text{макс}} = \lambda_{\text{ML}} - \lambda_L)$ |               |              |               |                  |                  |                  |                  |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                | Без металла                                                                                 | $\text{Li}^+$ | $\text{K}^+$ | $\text{Na}^+$ | $\text{Mg}^{2+}$ | $\text{Ba}^{2+}$ | $\text{Ca}^{2+}$ | $\text{La}^{3+}$ |
| <b>CR IIIa</b> | 340                                                                                         | 330<br>(-10)  | 338<br>(-2)  | 330<br>(-10)  | 320<br>(-20)     | 326<br>(-14)     | 319<br>(-21)     | 321<br>(-19)     |
| <b>CR IVa</b>  | 356                                                                                         | 347<br>(-9)   | 353<br>(-3)  | 346<br>(-9)   | 335<br>(-21)     | 338<br>(-18)     | 333<br>(-23)     | 335<br>(-21)     |
| <b>CR Va</b>   | 383                                                                                         | 376<br>(-7)   | 382<br>(-1)  | 375<br>(-8)   | 369<br>(-14)     | 370<br>(-13)     | 368<br>(-15)     | 373<br>(-10)     |
| <b>CR Ia</b>   | 400                                                                                         | 393<br>(-7)   | 396<br>(-4)  | 391<br>(-9)   | 381<br>(-19)     | 383<br>(-17)     | 382<br>(-18)     | 384<br>(-16)     |
| <b>CR IIIb</b> | 342                                                                                         | 340<br>(-2)   | 335<br>(-8)  | 337<br>(-5)   | 339<br>(-3)      | 329<br>(-13)     | 329<br>(-13)     | 323<br>(-19)     |
| <b>CR IVb</b>  | 359                                                                                         | 356<br>(-3)   | 349<br>(-10) | 350<br>(-9)   | 353<br>(-6)      | 342<br>(-17)     | 341<br>(-18)     | 336<br>(-23)     |
| <b>CR Vb</b>   | 387                                                                                         | 383<br>(-4)   | 386<br>(-1)  | 382<br>(-5)   | 383<br>(-4)      | 373<br>(-14)     | 372<br>(-15)     | 372<br>(-15)     |
| <b>CR Ib</b>   | 400                                                                                         | 398<br>(-2)   | 395<br>(-5)  | 398<br>(-2)   | 399<br>(-1)      | 388<br>(-12)     | 388<br>(-12)     | 386<br>(-14)     |

Таким образом, было установлено, что образование комплексов с катионами металлов наблюдается только для краунсодержащих соединений и сопровождается изменениями в электронных спектрах поглощения. Это открывает

хорошую перспективу для применения синтезированного набора краун-соединений в качестве аналитических компонентов оптических сенсоров, ион-селективных электродов и фотоуправляемых супрамолекулярных ансамблей.

Таблица 5. Относительное изменение положения максимумов длинноволновых полос поглощения соединений **CR I,III-Vc,d**  $\Delta\lambda_{\text{макс}}$  ( $\Delta\lambda_{\text{макс}} = \lambda_{\text{ML}} - \lambda_{\text{L}}$ ) в MeCN при введении в растворы солей металлов ( $c_{\text{M}}/c_{\text{L}} = 1000$ ).

| Соединение      | $\lambda_{\text{макс, нм}}$ ( $\Delta\lambda_{\text{макс}} = \lambda_{\text{ML}} - \lambda_{\text{L}}$ ) |               |                  |                  |                  |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------|------------------|------------------|
|                 | Без металла                                                                                              | $\text{Ag}^+$ | $\text{Hg}^{2+}$ | $\text{Pb}^{2+}$ | $\text{La}^{3+}$ |
| <b>CR IIIc</b>  | 339                                                                                                      | 336<br>(-3)   | 329<br>(-10)     | 325<br>(-14)     | 340<br>(-1)      |
| <b>CR IVc</b>   | 354                                                                                                      | 349<br>(-5)   | 341<br>(-13)     | 338<br>(-16)     | 353<br>(-1)      |
| <b>CR Vc</b>    | 379                                                                                                      | 375<br>(-4)   | 372<br>(-7)      | 370<br>(-9)      | 379<br>(0)       |
| <b>CR Ic</b>    | 396                                                                                                      | 389<br>(-7)   | 388<br>(-8)      | 384<br>(-12)     | 396<br>(0)       |
| <b>CR IIIId</b> | 341                                                                                                      | 336<br>(-5)   | 331<br>(-10)     | 330<br>(-11)     | 341<br>(0)       |
| <b>CR IVId</b>  | 359                                                                                                      | 352<br>(-7)   | 346<br>(-13)     | 342<br>(-17)     | 357<br>(-2)      |
| <b>CR VId</b>   | 379                                                                                                      | 375<br>(-4)   | 373<br>(-6)      | 371<br>(-8)      | 379<br>(-1)      |
| <b>CR Id</b>    | 396                                                                                                      | 393<br>(-3)   | 388<br>(-8)      | 386<br>(-10)     | 396<br>(0)       |

#### Спектральные свойства и кинетические характеристики фотохромных аналогов ретиналя

Одним из актуальных направлений исследований в современной нанобиофотонике является изучение механизмов зрительной рецепции и структурно-функциональных взаимоотношений в молекулах ретиналь-содержащих белков путем создания модельных систем, имитирующих одну из особенностей строения центра связывания хромофора, и детальное комплексное изучение и анализ их свойств [2, 12, 61, 71]. Нами впервые были получены новые модельные фоточувствительные системы – 3 серии соединений на основе гибридов молекул ретиноидов и фотохромов из классов спиропиранов и дитиенилэтанов. Окончательный дизайн молекул целевых аналогов ретиналя был сделан на основе анализа результатов компьютерного моделирования топографии хромо-

форной полости БР (файл PDB – 1C3W) в программах HyperChem 8.03 и Ligand-Protein Contacts (LPC) [75] и сопоставления с ними размеров выбранных структур полиеналя (**SPR I-V**, **SPRN I-V**, **DTE I-V**). В связи с чем нами были отработаны методы получения (см. схему 2) и проведено изучение спектрального поведения новых моделей фоточувствительных систем, различающихся местом введения полиенового фрагмента в фотохромное звено.

Фотохромные реакции в ряду спиропиранов и диарилэтанов представлены на схемах 4, 5. Надо отметить, что у последних отсутствует самопроизвольная термохимическая реакция обесцвечивания фотоиндуцированной формы, что делает фотохромы этого класса наиболее перспективными кандидатами для создания на их основе прототипов различных технических устройств, в частности, оптической памяти большой емкости.

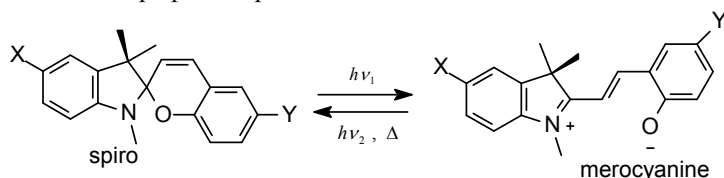


Схема 4.

Проведенные эксперименты показали, что у серии соединений **SPR I-V**, содержащих полиеновую цепь в 6'-положении пиранового кольца, с увеличением длины полиеновой цепи наблюдается процесс очень быстрой темновой терморелаксации, и времена жизни мероцианиновых фотоиндуцированных форм очень малы и могут быть зафиксированы только с помощью импульсной спектроскопии в микро-

секундном диапазоне.

В то же время для соединений серии **SPRN I-V**, имеющих сильный акцепторный заместитель – нитрогруппу в 6'-положении пиранового кольца, наблюдается стабилизация времени жизни фотоиндуцированных форм, и поэтому регистрацию спектров поглощения и спектрально-кинетические исследования процессов фотоокрашивания и спонтанного обесцвечива-

ния проводили при помощи спектрофотометра Ocean Optics, модель HR-2000+, в кварцевых кюветах толщиной 10 мм, путем облучения растворов светом лампы LC4 (Hamamatsu, Япония) через светофильтр УФС-2 при перемешивании содержимого образца на магнитной мешалке. Результаты спектрально-кинетического исследования синтезированных моделей фоточувствительных систем на основе спиропиранов серий **SPR I-V** в метаноле и **SPRN I-V** в толуоле и в этаноле представлены на рис. 9–11 и в табл. 6.

В результате спектрально-кинетического исследования фотопревращений ряда новых полиеновых 6'-нитрозамещенных индолиновых спиропиранов **SPRN I,III-V** выявлен ряд особенностей их спектральных свойств и фотохромизма по сравнению с исходным формиль-

ным производным спиропирана **SPRN II**. Показана возможность регулирования спектральных характеристик спиропирановой формы путем изменения природы и длины полиеновых заместителей.

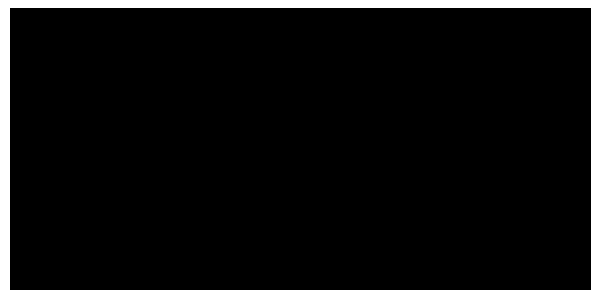


Рис. 9. Спектры поглощения спироформ соединений серии **SPR I-V** в MeOH, 25°C.

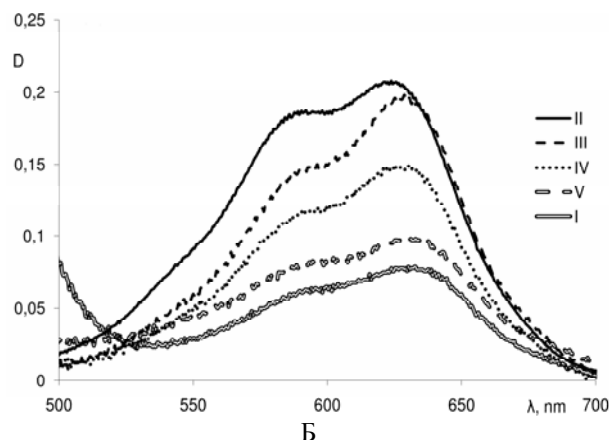
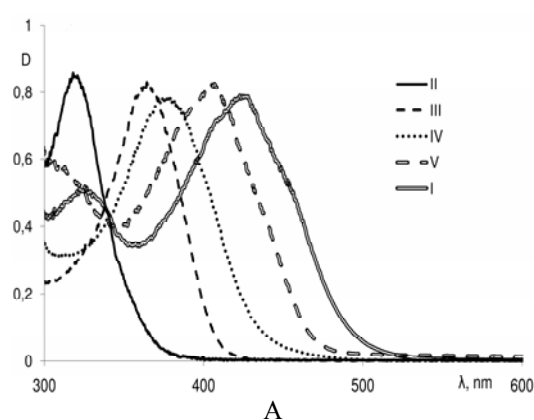


Рис. 10. Спектры поглощения спиропиранов серии **SPRN I-V** ( $C 10^{-5} \div 5 \times 10^{-5}$  М) в толуоле до (А) и после освещения УФ-светом (Б).

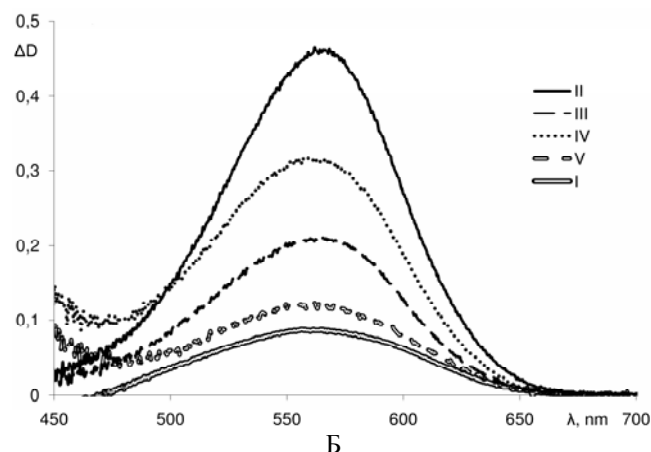
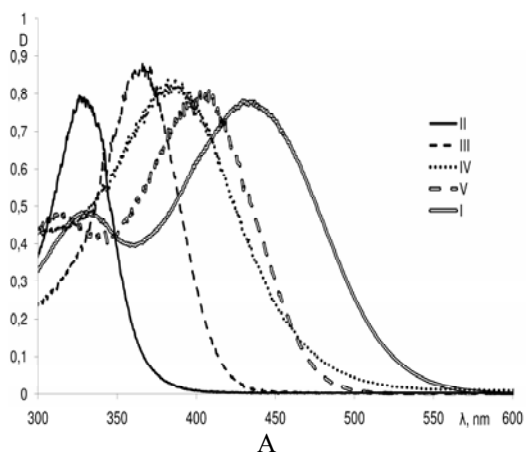


Рис. 11. Спектры поглощения спиропиранов серии **SPRN I-V** ( $C 10^{-5} \div 5 \times 10^{-5}$  М) в этаноле до (А) и после освещения УФ-светом (Б).

Исходя из наблюдаемых спектральных различий предполагается, что в слабо полярном толуоле, в отличие от полярного этанола, возможно фотоиндуцированное образование агрегатов мероцианиновой формы. Обнаружено снижение эффективности фотохромных превращений и скорости темновой циклизации фото-

индуцированной мероцианиновой формы с увеличением длины полиенового заместителя при одновременном повышении устойчивости фотохромных спиропиранов к фотодеградации в полярном растворителе по сравнению с растворами в толуоле.

Таблица 6. Спектрально-кинетические характеристики производных спиропиранов **SPRN I-V** в растворах в толуоле (А) и в этаноле (Б).

| Соединение | Растворитель | $\lambda_{\text{макс}}^A$ , нм | $\lambda_{\text{макс}}^B$ , нм | $\Delta D_B^{\text{фот}}$ | $k_{BA}^{\text{то}}$ , с <sup>-1</sup> | $t_{1/2}$ , с |
|------------|--------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|---------------|
| SPRN II    | A            | 320                            | 590 пл., 625                   | 1.19                      | 0.139                                  | 31            |
|            | B            | 328                            | 567                            | 0.77                      | 0.069                                  | 44            |
| SPRN III   | A            | 365                            | 590 пл., 630                   | 0.55                      | 0.035                                  | 38            |
|            | B            | 365                            | 567                            | 0.27                      | 0.0065                                 | **            |
| SPRN IV    | A            | 377                            | 590 пл., 630                   | 0.45                      | 0.039                                  | 35            |
|            | B            | 385                            | 563                            | 0.30                      | 0.0036                                 | **            |
| SPRN V     | A            | 407                            | 590 пл., 630                   | 0.16                      | 0.033                                  | 70            |
|            | B            | 405                            | 567                            | 0.099                     | 0.0021                                 | **            |
| SPRN I     | A            | 425                            | 590 пл., 630                   | 0.08                      | 0.031                                  | 90            |
|            | B            | 330, 433                       | 563                            | 0.104                     | 0.0016                                 | **            |

Обозначения:  $\lambda_{\text{макс}}^A$  и  $\lambda_{\text{макс}}^B$  – максимумы полос поглощения исходной и фотоиндуцированной форм, соответственно;  $\Delta D_B^{\text{фот}}$  – максимальное фотоиндуцированное изменение оптической плотности в максимуме полосы поглощения фотоиндуцированной формы в состоянии фоторавновесия при одинаковой величине оптической плотности ( $D = 0.8$ ) в максимуме полосы поглощения исходной формы;  $k_{BA}^{\text{то}}$  – константа скорости реакции темнового обесцвечивания;  $t_{1/2}$  – время, за которое максимальная величина фотоиндуцированной оптической плотности в максимуме полосы поглощения фотоиндуцированной формы снижается в 2 раза при непрерывном облучении нефилтрованным светом лампы Hamamatsu LC4. (\*\*) – не наблюдалось за стандартное время опыта 10 мин.

Из литературных данных известно, что дитиенилэтены в отличие от спиропиранов являются термически необратимыми фотохромными соединениями, испытывающими только фотоиндуцированные взаимные превращения открытой (бесцветной) и циклизованной (окрашенной) форм (схема 5).

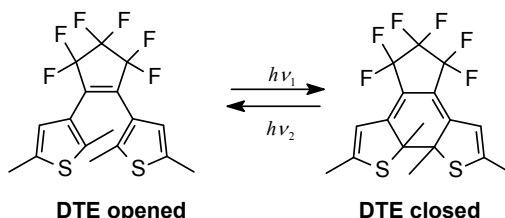


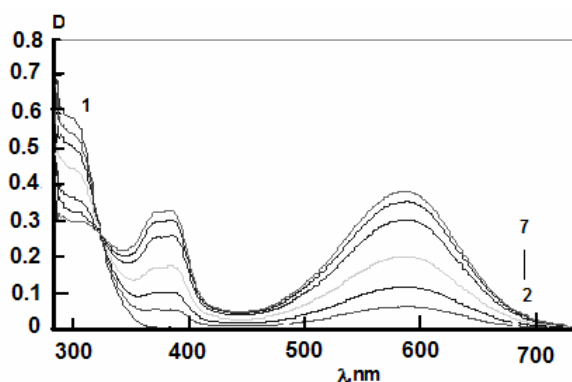
Схема 5.

Процесс фотоокрашивания этих соединений осуществляется под действием УФ-излучения, поглощаемого открытой формой. Для фотообесцвечивания используется видимое излучение, спектральный состав которого определяется полосой поглощения циклической формы.

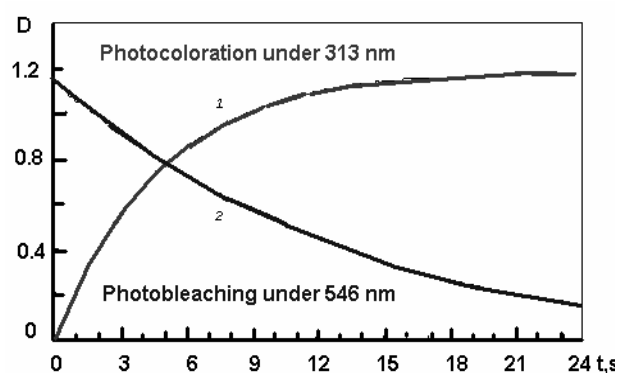
Результаты спектрально-кинетического исследования синтезированных моделей хромофорных центров на основе дитиенилэтенов **DTE I-V** представлены на рис. 12–14 и в табл. 7. Для сравнения использовались спектрально-кинетические данные, полученные для соединения моноформильного производного **DTE II**, использованного в качестве исходного реагента в синтезе. На рис. 12 представлены спектры поглощения открытой (рис. 12, *кр. 1*) и циклической (*кр. 2–7*) форм этого соединения в процессе непрерывного облучения УФ-светом

(313 нм). Видно, что в процессе УФ-облучения коротковолновая полоса исчезает. Одновременно появляется две новые полосы поглощения при 380 и 580 нм, обусловленные образованием циклизованной формы.

Анализ соотношения констант фотоокрашивания и фотообесцвечивания показывает, что, в отличие от **DTE II**, соединения, содержащие полиеновый фрагмент, характеризуются более эффективной скоростью фотоокрашивания. Однако она снижается с увеличением длины полиеновой цепочки. Из сравнения данных о

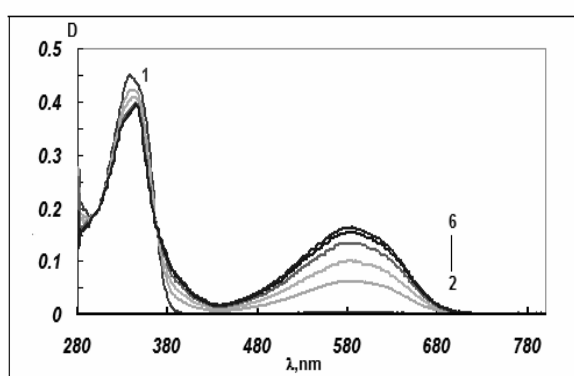


А

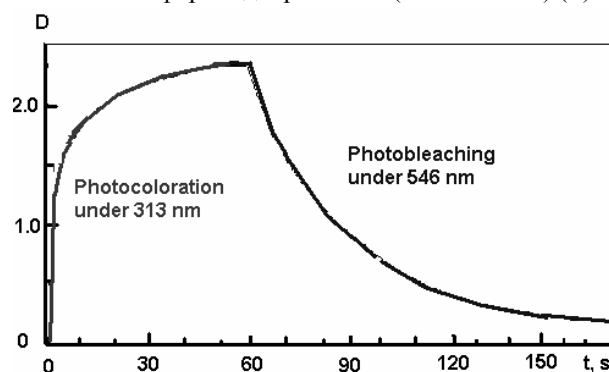


Б

Рис. 12. Спектры поглощения соединения **DTER II** в толуоле до (1) и в процессе (2–7) облучения УФ-светом (313 нм) (А) и кинетика процессов фотоокрашивания и фотообесцвечивания, измеренные на длине волны максимума полосы поглощения фотоиндуцированной циклизованной формы диарилэтена ( $C\ 1.5 \times 10^{-5}$  М) (Б).

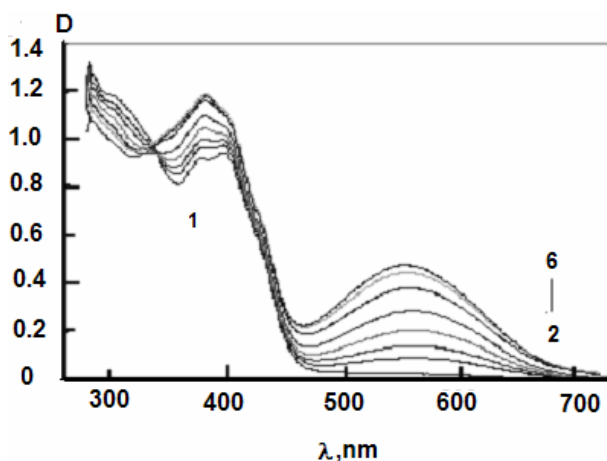


А

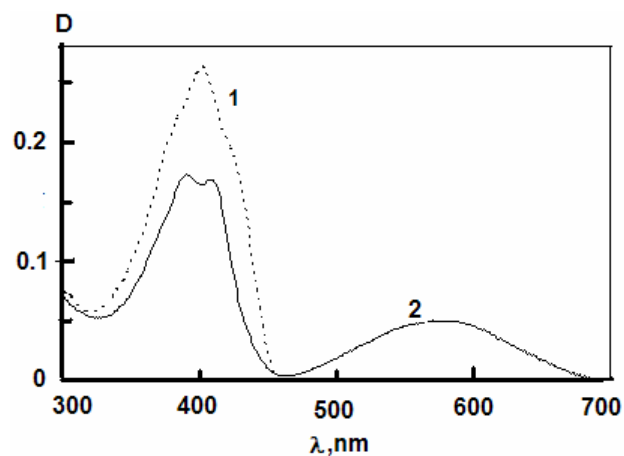


Б

Рис. 13. Спектры поглощения соединения **DTER III** в толуоле до (1) и в процессе (2–6) облучения УФ-светом (313 нм) (А) и кинетика процессов фотоокрашивания и фотообесцвечивания, измеренные на длине волны максимума полосы поглощения фотоиндуцированной циклизованной формы диарилэтена ( $C\ 1.5 \times 10^{-5}$  М) (Б).



А



Б

Рис. 14. Спектры поглощения соединения **DTE I** в толуоле (А) до (1) и в процессе (2-6) облучения УФ-светом (313 нм) и в этаноле (Б) до (1) и после (2) облучения УФ-светом (313 нм).

фотодеградации (табл. 7) видно, что соединение с электронно-акцепторной CN-группой (**DTE III**) обладает наибольшей устойчивостью к необратимым фотопревращениям. Увеличение длины полиеновой цепочки приводит к повышению эффективности фотодеградации.

Таким образом, в результате сравнительного спектрально-кинетического исследования

синтезированных моделей хромофорных центров на основе гибридов молекул ретиноида и фотохромов из класса дитиенилэтенов установлена взаимосвязь между структурой соединений и их спектральными и кинетическими параметрами. Показано, что все соединения класса дитиенилэтенов проявляют выраженные фотохромные свойства и являются термически

необратимыми. Было установлено, что введение в молекулу полиеновой цепи, сопряженной с диарилэтиновым фрагментом, приводит к bathochromному сдвигу спектра поглощения открытой формы по сравнению с исходным альдегидом **DTE II**. Для циклических изомеров положение

максимума поглощения незначительно зависит от длины цепи сопряжения. Наилучшие кинетические характеристики процесса фотоциклизации, а также низкая степень фотодеградации характерны для нитрила **DTE III**.

Таблица 7. Спектрально-кинетические характеристики синтезированных дигетарилэтинов **DTE I-IV**.

| Соединение     | $\lambda_{\text{макс}}^A$ , нм |          | $\lambda_{\text{макс}}^B$ , нм |               | $\Delta D_B^a$   | $k_{AB}/k_{BA}^a$ | $t_{1/2}, c^a$ |
|----------------|--------------------------------|----------|--------------------------------|---------------|------------------|-------------------|----------------|
|                | толуол                         | этанол   | толуол                         | этанол        |                  |                   |                |
| <b>DTE II</b>  | 295                            | -        | 380, 580                       | -             | 0.4 <sup>b</sup> | 1.4               | 340            |
| <b>DTE III</b> | 340                            | 276, 338 | 585                            | 576           | 0.2              | 7.8               | 660            |
| <b>DTE IV</b>  | 353                            | 355      | 585                            | 580           | 0.2              | 5.9               | 275            |
| <b>DTE I</b>   | 390, 400                       | 390, 402 | 380, 553                       | 392, 409, 579 | 0.5              | 2.6               | 240            |

<sup>a</sup> в толуоле; <sup>b</sup> при 580 нм.

Обозначения:  $\lambda_{\text{макс}}^A$  и  $\lambda_{\text{макс}}^B$  – максимумы полос поглощения открытой и циклической форм, соответственно;  $\Delta D_B$  – фотоиндуцированное изменение оптической плотности в максимуме полос поглощения циклической формы в видимой области спектра;  $k_{AB}$  и  $k_{BA}$  – константы скоростей фотоокрашивания и фотообесцвечивания;  $t_{1/2}$  – время необратимого снижения оптической плотности фотоиндуцированного поглощения в максимуме полосы поглощения циклической формы в 2 раза при непрерывном облучении нефильтрованным светом лампы ДРШ-250.

#### Исследование взаимодействия аналогов ретиналя с апобелком в составе апомембран

Было показано, что использованная процедура обесцвечивания–реконструкции слабо влияет на кинетику образования и распада М-интермедиата. При хранении образцов препаратов БР в виде концентрированной водной суспензии в течение 1 года практически не изменяются и кинетические параметры его фотоцикла, что было исследовано на примере штаммов ET1001 и D96N (рис. 15). Контрольные измерения исходных препаратов БР (до обесцвечивания) штаммов ET1001, JW5 и D96N выявили присущую им разницу кинетик М-подобного интермедиата (рис. 16). По своим кинетическим параметрам препараты БР<sub>ET1001</sub> и

БР<sub>JW5</sub> достаточно близки. У БР<sub>JW5</sub> отмечено несколько более быстрое образование и немного замедленный распад М-интермедиата по сравнению с БР<sub>ET1001</sub>. У БР<sub>D96N</sub> значительно замедлены кинетики как образования, так и распада М-подобного интермедиата [18, 23, 64].

АБР и контрольные образцы БР получали добавлением к суспензии апомембран в стандартном буфере (100 мМ NaCl, 5 мМ MES, pH 6.0) стехиометрических количеств *all-E*-ретиналя (3) и его аналогов. Скорости встраивания ретиналя в БО с природной последовательностью и мутантный D96N очень близки, как и максимумы поглощения полученных пигментов. Спектральные свойства препаратов АБР приведены в табл. 8.

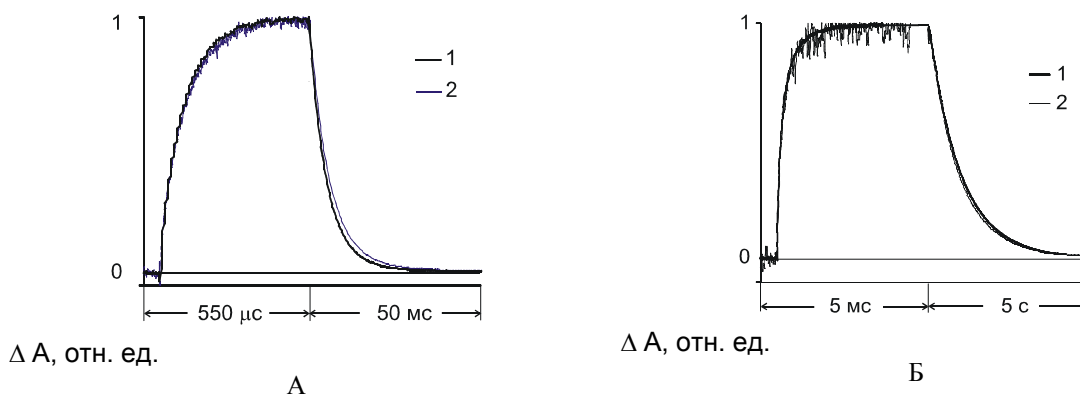


Рис. 15. Воспроизводимость кинетики М-интермедиата при хранении пурпурных мембран.

А – штамм ET1001; Б – штамм D96N. Хранение: 1 – 1 мес.; 2 – 10 мес.



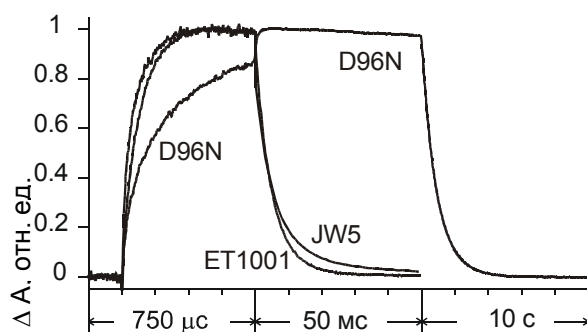


Рис. 16. Сравнение кинетики М-интермедиата БР штаммов ET1001, JW5 и D96N.

Встраивание всех групп исследованных аналогов ретиналя в БО происходит по-разному. При взаимодействии аналогов **CR Ia-e**, содержащих краун-эфирный фрагмент, с апомембранами появлялся пигмент с максимумом поглощения в районе 495-500 нм, характерным для серии аналогов бактериородопсина, у которых триметилциклогексеновое кольцо в природном хромофоре заменено ароматическими циклами различной природы [1–5, 12]. Скорость образования пигмента АБР оказалась на порядок ниже скорости формирования пурпурного комплекса БР из *all-E*-ретиналя и БО. В течение 1 дня образование пигмента заканчивалось. В каче-

стве примера на рис. 17 показан процесс образования ГАБР из полиеналяей **CR Id** (А) и **CR IVb** (Б) и БО. По спектральным параметрам пигменты, реконструированные из полиеналяей с различной природой краун-эфирного цикла, практически идентичны. Исследование фотохимических свойств краунированных АБР с помощью флэш-фотолиза показало наличие у них выраженного фотоцикла, сравнимого по эффективности с ароматическими АБР [17, 18, 24–37, 45, 48]. Также было показано, что для полиеналяей с укороченной полиеновой цепью, например **CR IVb**, возможно образование ковалентного комплекса с максимумом поглощения в районе 440-460 нм (рис. 17Б), в отличие от аналогов со сложноэфирной и нитрильными терминальными группами, не способных к образованию альдиминной связи. Подобное явление ранее наблюдалось также и для других ароматических аналогов ретиналя с укороченной полиеновой цепью. Для серий фотохромных аналогов ретиналя **SPR I,IV**, **SPRN I,IV**, **DTE I,IV** процесс образования пигментов ГАБР протекал еще более замедленно: для производных спиропиранов **SPR I,IV**, **SPRN I,IV** время завершения образования ГАБР занимало от 3 до 7 дней и около 10 дней для дитиенилэтенов **DTE I,IV**.

Таблица 8. Спектральные характеристики целевых полиеналяей и АБР на их основе.

| Соединение          | $\lambda_{\text{макс}}$ альдегида, нм | $\lambda_{\text{макс}}$ АБР, нм              | Эффективность фотоцикла, % |
|---------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------|
| (3)                 | 381                                   | 558                                          | 100                        |
| <b>CR Ia</b>        | 400                                   | 495                                          | 23                         |
| <b>CR Ib</b>        | 400                                   | 495                                          | 23                         |
| <b>CR Ic</b>        | 396                                   | 497                                          | н.и.                       |
| <b>CR Id</b>        | 396                                   | 497                                          | н.и.                       |
| <b>CR Ie</b>        | 402                                   | 500                                          | 32                         |
| <b>SPR IV</b>       | 365                                   | 440                                          | -                          |
| <b>SPR I</b>        | 411                                   | 495                                          | +                          |
| <b>SPRN IV</b>      | 385                                   | 605                                          | н.и.                       |
| <b>SPRN I</b>       | 400                                   | 500                                          | +                          |
| <b>DTE IV</b>       | 355                                   | 430                                          | -                          |
| <b>DTE-I open</b>   | 402                                   | 510                                          | н.и.                       |
| <b>DTE-I closed</b> | 392, 409, 579                         | после 2 мес. инкубации пигмент не образуется | -                          |

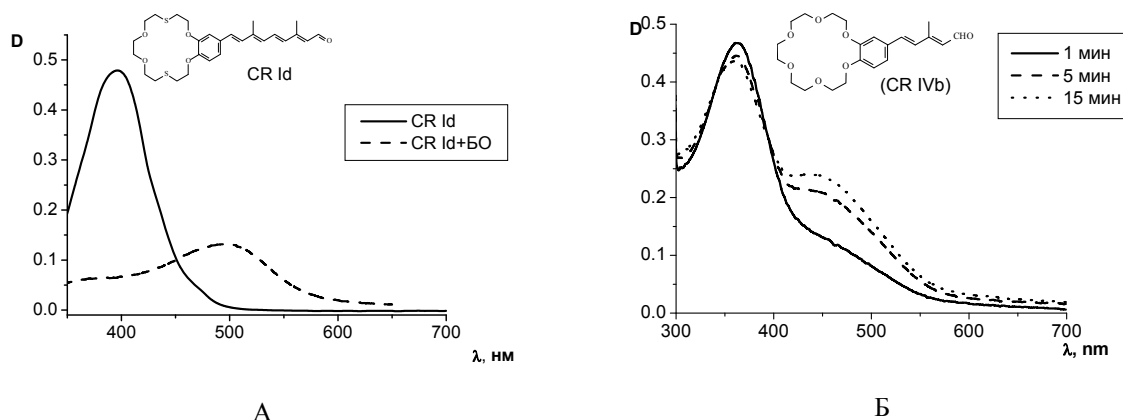


Рис. 17. Спектрофотометрический контроль образования АБР из полиеналяей **CR Id** (А) и **CR IVb** (Б) и апомембран из *H. salinarum*. Концентрация белка 2.03 мг/мл, 5 мМ MES, pH 6.0, 25°C.

При анализе полученных результатов необходимо отметить два особо интересных факта: 1) впервые за более чем 25-летнее время изучения факторов и условий, накладываемых белковой матрицей на структуру аналогов ретиналя (для всего массива из более 350 соединений), обнаружен и доказан факт реализации возможности светуправляемого распознавания белковой матрицей пространственных ограничений для одной и той же структуры аналога хромофорной группы (ср. данные табл. 8 для открытой и циклизованной форм полиеналя **DTE I**); 2) наблюдается аномальный батохромный сдвиг (более 150 нм) в спектре поглощения пигмента из спиропирана с укороченной полиеновой цепью **SPRN IV**.

Были получены первые предварительные данные фотоответов новых пигментов АБР на вспышку лазерного импульса ( $\lambda$  530 нм) на установке флеш-фотолиза, позволяющей осуществлять исследования в микросекундном диапазоне времени. Было отмечено, что АБР, приготовленные из аналогов ретиналя серии **SPRN I**, способны в ответ на лазерный импульс в видимой области спектра обратимо генерировать новые интермедиаты, отличные по своим спектральным и кинетическим параметрам от интермедиатов фотореакций природного БР.

Таким образом, была показана принципиальная возможность получения ГАБР, содержащих ионофорный или фотохромные фрагменты в составе хромофорной группы и сохраняющих способность к циклическим фотохимическим превращениям.

#### Заключение

В результате сравнительного спектрально-кинетического исследования синтезированных моделей фоточувствительных систем – четырех серий соединений на основе гибридов молекул ретиноидов с ионофорными или фотохромными фрагментами – установлена взаимосвязь между структурой соединений и их спектральными и кинетическими параметрами, а также комплексно изучены процесс их взаимодействия с апобелком бактериоопсином и свойства образующихся продуктов реакции.

*Данный цикл работ был выполнен при частичной поддержке грантов РФФИ 01-03-32078, 04-03-32746-а, 09-03-00565а, гранта ИНТАС-2001-0267 и госконтрактов №№ 02.512.11.2250 и 16.740.11.0177, грантов Президента РФ по поддержке исследований молодых кандидатов наук №№ МК-2516.2005.4, МК-5333.2007.4 и МК-2598.2010.4.*

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Мицнер Б.И., Ходонов А.А. Хромофорные группы ретинилиденпротеидов // В сб.: Светочувствительные биологические комплексы и оптическая регистрация информации / Под ред. Г.Р. Иваницкого. – Пушино, 1985. С. 38–49.
2. Мицнер Б.И., Ходонов А.А., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П. Аналоги ретиналя: синтез и взаимодействие с бактериоопсином // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 5–53.
3. Mitsner B.I., Khodonov A.A., Karnauchova E.N. Retinal analogs and N-retinylidenepeptides as tools for investigation of bacteriorhodopsin and rhodopsin chromophoric sites // In: Retinal Proteins / Ed. Yu.A. Ovchinnikov. – Utrecht, Netherlands: VNU Science Press, 1987. P. 561–569.
4. Драчев Л.А., Зорина В.В., Мицнер Б.И., Хитрина Л.В., Ходонов А.А., Чекулаева Л.Н. Фотоцикл и электрогенезис *all-E*- и *13Z*-ароматических аналогов ретиналя // Биохимия. 1987. Т. 52. № 9. С. 1559–1569.

5. Мицнер Б.И., Ходонов А.А., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П. *all-E-* и *13Z*-ароматические аналоги ретиналя // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 238–251.
6. Drachev L.A., Drachev A.L., Chekulaeva L.N., Evstigneeva R.P., Kaulen A.D., Khitrina L.V., Khodonov A.A., Lazarova Z.R., Mitsner B.I. An investigation of the electrochemical cycle of bacteriorhodopsin analogs with modified ring // Arch. Biochem. Biophys. 1989. V. 270. № 1. P. 184–197.
7. Khitrina L.V., Drachev L.A., Eremin S.V., Kaulen A.D., Khodonov A.A. M-Intermediates in the 13-*cis*-cycle of bacteriorhodopsin // In: Structure and Functions of Retinal Proteins / Ed. J.L. Rigaud. – Colloque INSERM–John Libbey Eurotex Ltd., 1992. V. 221. P. 167–170.
8. Драчев Л.А., Каулен А.Д., Еремин С.В., Ходонов А.А., Хитрина Л.В., Швеи В.И., Чекулаева Л.Н. Образование интермедиатов М-типа в фотоцикле 13-*цис*-аналогов бактериородопсина // Биохимия. 1993. Т. 58. № 6. С. 819–826.
9. Хитрина Л.В., Каулен А.Д., Еремин С.В., Ходонов А.А. Бактериородопсин. Белковые ограничения изомеризации хромофора // Молекулярн. биология. 1995. Т. 29. № 6. С. 1398–1407.
10. Khodonov A.A., Demina O.V., Eremin S.V., Khitrina L.V. Modified bacteriorhodopsins as a basis for new optical devices // Abstracts of the 3<sup>rd</sup> EUROPT(R)ODE Conf. on Optical Chemical Sensors and Biosensors. – Zurich, Switzerland, 1996. P. 113.
11. Silfsten P., Parkkinen S., Luostarinen J., Khodonov A., Jaaskelainen T., Parkkinen J. Color sensitive biosensors for imaging // Proceed. of the 13<sup>th</sup> Int. Conf. on Pattern Recognition, ICPR'96. – Vienna, Austria, 1996. V. 3. P. 331–335.
12. Ходонов А.А., Еремин С.В., Локшин Дж.Л., Швеи В.И., Демина О.В., Хитрина Л.В., Каулен А.Д. Аналоги ретиналя и их применение для исследования бактериородопсина // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. № 10-11. С. 747–778.
13. Silfsten P., Parkkinen S., Luostarinen J., Khodonov A.A., Demina O.V., Jaaskelainen T., Parkkinen J. Opto-electrical properties of bacteriorhodopsin and its analogs in polyvinylalcohol films // Abstracts of the 7<sup>th</sup> Int. Conf. on Retinal Proteins. – Zichron-Yaacov, Israel, 1996. P. 61.
14. Jaaskelainen T., Leppanen V.P., Parkkinen S., Parkkinen J., Khodonov A. The photochromic properties of 4-keto bacteriorhodopsin // Optical Materials. 1996. V. 6. № 4. P. 339–345.
15. Khodonov A.A., Demina O.V., Khitrina L.V., Kaulen A.D., Silfsten P., Parkkinen S., Jaaskelainen T., Parkkinen J. Modified bacteriorhodopsins as a basis for new optical devices // Sensors & Actuators, part B. 1997. V. B39. № 1-3. P. 218–221.
16. Khodonov A.A., Shevyakov S.V., Mironova E.V., Shvets V.I., Demina O.V., Khitrina L.V., Kaulen A.D. Bacteriorhodopsin analogs, bearing modified chromophore as a basis for the photochromic materials // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 2000. V. 345. P. 317–322.
17. Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Shevyakov S.V., Mironova E.V., Shvets V.I., Alexeeva S.G., Demina O.V., Terpugov E.L., Degtyareva O.V., Khitrina L.V., Kaulen A.D. Synthesis and properties of a new crown ether-containing dyes // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 2000. V. 345. P. 15–20.
18. Миронова Е.В., Лукин А.Ю., Шевяков С.В., Алексеева С.Г., Швеи В.И., Демина О.В., Ходонов А.А., Хитрина Л.В. Синтез и свойства аналогов бактериородопсина, содержащих электроно-плотные метки в хромофоре // Биохимия. 2001. Т. 56. № 11. С. 1638–1648.
19. Khodonov A.A., Mironova E.V., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Demina O.V., Khitrina L.V. Relationship between chromophore structure and photochemical properties in bacteriorhodopsin analogs series // Abstracts of the XX Int. Conf. on Photochemistry. – Moscow, 2001. P. 199–200.
20. Lukin A.Yu., Khodonov A.A., Stepanenko V.N., Mironova E.V., Shevyakov S.V., Alexeeva S.G., Shvets V.I., Demina O.V., Khitrina L.V. Synthesis and photochemical properties of the heavy-atom labeled bacteriorhodopsin analogs // Abstracts of the XX Int. Conf. on Photochemistry. – Moscow, 2001. P. 356–357.
21. Terpugov E.L., Degtyareva O.V., Khodonov A.A., Savransky V.V. Vibrational excited-state structure of the chromophore in pigment studied by FTIR emission spectroscopy // Abstracts of the XX Int. Conf. on Photochemistry. – Moscow, 2001. P. 541.
22. Миронова Е.В., Леонтьева С.В., Шевяков С.В., Алексеева С.Г., Швеи В.И., Демина О.В., Краснокутская И.С., Финкельштейн Е.И., Ходонов А.А. Удобный способ получения производных ретиналя, модифицированных по триметилциклоксеновому кольцу // Биоорган. химия. 2002. Т. 28. № 6. С. 535–542.
23. Миронова Е.В., Лукин А.Ю., Шевяков С.В., Швеи В.И., Демина О.В., Складнев Д.А., Хитрина Л.В., Гребенников Е.П., Адамов Г.Е., Ходонов А.А. Биосинтетическое получение аналогов бактериородопсина // Материалы I Московского междунар. конгресса «Биотехнология – состояние и перспективы развития». – М., 2002. С. 422–423.
24. Shevyakov S.V., Lukin A.Yu., Mironova E.V., Shvets V.I., Demina O.V., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Alfimov M.V., Khodonov A.A. New crown ether-containing derivatives of vitamin A // Abstracts of the 13<sup>th</sup> Int. Carotenoid Symp. – Honolulu, USA, 2002. P. 185.

25. Lukin A.Yu., Mironova E.V., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Demina O.V., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Alfimov M.V., Khodonov A.A. Study of spectral properties and cation-binding of a new crown ether receptors // Abstracts of the Int. Conf. «Biocatalysis-2002: Fundamentals & Applications». – Russia, 2002. P. 110.
26. Khodonov A.A., Shevyakov S.V., Lukin A.Yu., Mironova E.V., Shvets V.I., Demina O.V., Khitrina L.V., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Alfimov M.V., Lugtenburg J. Investigation a spectral properties of the crown-ether containing retinal and bacteriorhodopsin analogs // Abstracts of the 10<sup>th</sup> Int. Conf. on Retinal Proteins. – Seattle, USA, 2002. P. 95.
27. Строкач Ю.П., Валова Т.М., Барачевский В.А., Алфимов М.В., Громов С.П., Ведерников А.И., Демина О.В., Лукин А.Ю., Шевяков С.В., Швец В.И., Ходонов А.А., Люгтенбург Й. Влияние катионов металлов на спектральные свойства винилогов краун-эфиров с различной природой терминальной полярной группы // Известия АН. Сер. хим. 2003. № 12. С. 2514–2517.
28. Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Alfimov M.V., Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Demina O.V., Lugtenburg J. Spectral, photochemical and ion-binding properties of the crown-ether vinylogs // Abstracts of the XXI Int. Conf. on Photochemistry. – Nara, Japan, 2003. P107. P. 649.
29. Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Alfimov M.V., Demina O.V., Lugtenburg J. Spectral, photochemical and ion-binding properties of the crown-ether vinylogs // Abstracts of the XXVIII Int. Symp. on Macrocyclic Chemistry. – Gdansk, Poland, 2003. P69. P. 159.
30. Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Venidiktova O.V., Vedernikov A.I., Gromov S.P., Alfimov M.V., Demina O.V. Synthesis and study of a cation-binding of a new crowned spiropyran // Abstracts of the 4<sup>th</sup> Int. Symp. on Photochromism «Photoswitchable Molecular System and Devices». – Arcachon, France, 2004. P. 94.
31. Demina O.V., Shevyakov S.V., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shvets V.I., Khitrina L.V., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Alfimov M.V., Lugtenburg J., Khodonov A.A. Investigation of the spectral properties of the crowned retinals and bacteriorhodopsin analogs // Abstracts of the 4<sup>th</sup> Int. Symp. on Photochromism «Photoswitchable Molecular System and Devices». – Arcachon, France, 2004. P. 133.
32. Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Vedernikov A.I., Gromov S.P., Alfimov M.V., Demina O.V., Khodonov A.A. Synthesis and study of a cation-binding of a new crowned retinoids // Abstracts of the Third Int. Symp. on Supramolecular Chemistry «Molecular Design and Synthesis of Supramolecular Architectures». – Kazan, Russia, 2004. P. 115.
33. Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Vedernikov A.I., Gromov S.P., Alfimov M.V., Demina O.V., Khodonov A.A. Synthesis and study of a cation-binding of a new crowned spiropyran // Abstracts of the Third Int. Symp. on Supramolecular Chemistry «Molecular Design and Synthesis of Supramolecular Architectures». – Kazan, Russia, 2004. P. 116.
34. Lukin A.Yu., Shevyakov S.V., Laptev A.V., Davydova O.I., Shvets V.I., Demina O.V., Strokach Yu.P., Barachevsky V.A., Alfimov M.V., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Lugtenburg J., Khodonov A.A. Application of Horner-Emmons olefination to the crown-ether derivatives // J. Inclus. Phenomena Macrocyclic Chem. 2004. V. 49. P.153–161.
35. Demina O.V., Varfolomeev S.D., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shvets V.I., Khitrina L.V., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Alfimov M.V., Lugtenburg J., Khodonov A.A. Investigation of the spectral properties of the crowned retinals and bacteriorhodopsin analogs // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 2005. V. 431. P. 209–214.
36. Khodonov A.A., Demina O.V., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shvets V.I., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Strokach Yu.P., Venidiktova O.V., Valova T.M., Alfimov M.V., Barachevsky V.A. Photochromic and cation-binding properties of new crowned spiropyran // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 2005. V. 431. P. 215–222.
37. Demina O.V., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Khodonov A.A. Crowned retinals and bacteriorhodopsin analogs, synthesis and study of their spectral properties // Abstracts of the XXII Int. Conf. on Photochemistry. – Cairns, Australia, 2005. P. 91.
38. Khodonov A.A., Krayushkin M.M., Strokach Yu.P., Barachevsky V.A., Demina O.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Laptev A.V. Retinoid derivatives as thermal irreversible photochromes // Abstracts of the XXII Int. Conf. on Photochemistry. – Cairns, Australia, 2005. P. 91–92.
39. Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Laptev A.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Krayushkin M.M., Shorunov S.V., Demina O.V. Photochromic retinal analogs: Synthesis and study of their spectral properties // Abstracts of the XXI IUPAC Symp. on Photochemistry. – Kyoto, Japan, 2006. P. 230.
40. Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Laptev A.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Krayushkin M.M., Demina O.V. Photochromic retinal analogs: Synthesis and study of

their spectral properties // Abstracts of the Int. Symp. on Molecular Photonics devoted to the memory of academician A.N. Terenin. – St.-Petersburg, 2006. P. 77.

41. Demina O.V., Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Laptev A.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P. Design and synthesis of photochromic labels for covalent modification of different targets // Abstracts of the Int. Symp. on Molecular Photonics devoted to the memory of academician A.N. Terenin. – St.-Petersburg, 2006. P. 76–77.

42. Terpugov E.L., Degtyareva O.V., Demina O.V., Gagarinov A.G., Khodonov A.A. Nonlinear spectroscopic investigations of the retinylidene chromophore in a wild strain bacteriorhodopsin by FT-IR emission spectroscopy // Abstracts of the Int. Symp. on Molecular Photonics devoted to the memory of academician A.N. Terenin. – St.-Petersburg, 2006. P. 165–166.

43. Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Ходонов А.А. Синтез аналогов ряда спиропиранов, изучение их взаимодействия с бактериоопсином из *H. salinarum* // Вестник МИТХТ. 2006. Т. 1. № 1. С. 27–32.

44. Terpugov E.L., Gagarinov A.G., Degtyareva O.V., Khodonov A.A. Vibrational motions in photoactive biomolecules such as *all-trans*-retinal and in a wild type bacteriorhodopsin: An infrared emission spectroscopic study // Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics). 2006. V. 1757. P. 239–240.

45. Khodonov A.A., Khitrina L.V., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shvets V.I., Gromov S.P., Strokach Yu.P., Barachevsky V.A., Alfimov M.V., Demina O.V. Study of the spectral behavior of the crowned retinal and bacteriorhodopsin analogs // Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics). 2006. V. 1757. P. 278–279.

46. Gagarinov A.G., Degtyareva O.V., Khodonov A.A., Terpugov E.L. Stimulated infrared emission in *all-trans* retinal and wild type bacteriorhodopsin under CW optical pumping: Studies by FT-IR spectroscopy // Vibrational Spectroscopy. 2006. V. 42. № 2. P. 231–238.

47. Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Barachevsky V.A., Demina O.V., Varfolomeev S.D., Shvets V.I., Khodonov A.A. Synthesis of photochromic retinal analogs // Abstracts of the XVIII Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry. – Moscow, 2007. № 4. P. 546.

48. Lukin A.Yu., Laptev A.V., Belikov N.E., Barachevsky V.A., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Demina O.V., Varfolomeev S.D., Shvets V.I., Khodonov A.A. Ionophoric retinal analogs: Synthesis and properties // Abstracts of the XVIII Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry. – Moscow, 2007. № 5. P. 99.

49. Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Barachevsky V.A., Demina O.V., Shvets V.I., Khodonov A.A. Investigation of spectral properties of photochromic retinoid analogs // Abstracts of the Int. Conf. «Molecular and nanoscale system for energy conversion». – Moscow, 2007. P. 85.

50. Belikov N.E., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Barachevsky V.A., Demina O.V., Shvets V.I., Khodonov A.A., Krayushkin M.M. Vinylogs of the bis-dihetarylethenes as new thermoirreversible photochromic materials // Abstracts of the Int. Conf. «Molecular and nanoscale system for energy conversion». – Moscow, 2007. P. 89.

51. Ходонов А.А., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Барачевский В.А., Демина О.В., Варфоломеев С.Д., Шве́ц В.И., Краюшкин М.М. Фотохромные аналоги ретиналя: синтез и свойства // Материалы междунар. конф. «Нанофотоника». – Черногловка, Россия, 2007. С. 164.

52. Belikov N., Lukin A., Laptev A., Shvets V., Barachevsky V., Strokach Yu., Valova T., Krayushkin M., Demina O., Varfolomeev S., Khodonov A. Photochromic behavior of retinal analogs // Abstracts of the Int. Symp. on Photochromism. – Vancouver, Canada, 2007. P. 28.

53. Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Kobeleva O.I., Valova T.M., Krayushkin M.M., Demina O.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Laptev A.V., Shvets V.I., Khodonov A.A. Photochromic retinal analogs: Synthesis and properties // Abstracts of the XXIII Int. Conf. on Photochemistry. – Cologne, Germany, 2007. P. 472.

54. Лаптев А.В., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Строкач Ю.П., Барачевский В.А., Алфимов М.В., Демина О.В., Шве́ц В.И., Складнев Д.А., Ходонов А.А. Синтез спиропирановых аналогов ретиналя и изучение их взаимодействия с бактериоопсином из *H. salinarum* // Биоорган. химия. 2008. Т. 34. № 2. С. 276–284.

55. Лаптев А.В., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Барачевский В.А., Алфимов М.В., Демина О.В., Варфоломеев С.Д., Шве́ц В.И., Ходонов А.А. Спиропирановые аналоги ретиналя: синтез и изучение их фотохромных свойств // Химия высоких энергий. 2008. Т. 42. № 4 (прил.). С. 102–104.

56. Belikov N., Lukin A., Laptev A., Shvets V., Barachevsky V., Strokach Yu., Valova T., Krayushkin M., Demina O., Varfolomeev S., Khodonov A. Photochromic behavior of retinal analogs // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 2008. V. 196. № 2-3. P. 262–267.

57. Barachevsky V.A., Belikov N.E., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shvets V.I., Valova T.M., Krayushkin M.M., Demina O.V., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. Photochromic behavior of retinal analogs // Abstracts of the XXII IUPAC Int. Symp. on Photochemistry. – Gothenburg, Sweden, 2008. P150. P. 278.

58. Ходонов А.А., Демина О.В., Беликов Н.Е., Звездин К.В., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Варфоломеев С.Д., Шве́ц В.И., Барачевский В.А. Синтез и спектральные свойства фотохромных производных витамина А // Материалы Междунар. симп. «Нанопотоника». – Ужгород, Украина, 2008. С. 2.
59. Демина О.В., Беликов Н.Е., Звездин К.В., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Варфоломеев С.Д., Шве́ц В.И., Ходонов А.А. Исследование процесса фотоизомеризации производных витамина А // Материалы Междунар. симп. «Нанопотоника». – Ужгород, Украина, 2008. С. 13.
60. Demina O.V., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Shvets V.I., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. Investigation of synthetic routes for the 11Z-retinal preparation // Abstracts of the Int. Symp. «Defense Mechanisms of the Retina: New Perspectives». – Erevan, Armenia, 2008. P. 24.
61. Khodonov A.A., Demina O.V., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Shvets V.I., Varfolomeev S.D. Retinoids and retinal proteins – structure and function // Abstracts of the Int. Symp. «Defense Mechanisms of the Retina: New Perspectives». – Erevan, Armenia, 2008. P. 22.
62. Ходонов А.А., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Земцов Р.В., Звездин К.В., Шве́ц В.И., Барачевский В.А., Варфоломеев С.Д., Демина О.В. Исследование фотохромного поведения модельных хромофоров ретиналь-содержащих белков // Материалы Междунар. конф. «Органическая нанопотоника 2009». – С.-Пб., 2009. С. 136.
63. Демина О.В., Лаптев А.В., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Земцов Р.В., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Исследование спектральных свойств производных изоксазолов, содержащих фотохромную метку // Материалы Междунар. конф. «Органическая нанопотоника 2009». – С.-Пб., 2009. С. 131.
64. Тюрин С.А., Грицевич Ю.Г., Складнев Д.А., Ходонов А.А. Бактериородопсин как стимулятор роста и развития растений // Агрохимия. 2009. № 6. С. 32–39.
65. Хитрина Л.В., Миронова Е.В., Ходонов А.А. Исследование бактериородопсинов *Halobacterium salinarum* дикого типа и мутанта D96N с модифицированными хромофорами // Биол. мембраны. 2009. Т. 26. № 3. С. 194–200.
66. Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Земцов Р.В., Шве́ц В.И., Демина О.В., Варфоломеев С.Д., Барачевский В.А., Ходонов А.А. Синтез и изучение фотохромного поведения 3-[6'-нитро-1,3,3-триметилспиро(индолино-2,2'-[2Н]-хромен-5-ил)]пропеновой кислоты и ее этилового эфира // Химия высоких энергий. 2010. Т. 44. № 3. С. 239–243.
67. Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Земцов Р.В., Шве́ц В.И., Демина О.В., Варфоломеев С.Д., Барачевский В.А., Ходонов А.А. Синтез и изучение фотохромного поведения 3-[6'-нитро-1,3,3-триметилспиро(индолино-2,2'-[2Н]-хромен-5-ил)]пропеновой кислоты и ее этилового эфира // Материалы Междунар. конф. «Органическая нанопотоника 2009». – С.-Пб., 2009. С. 228–237.
68. Khodonov A.A., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Zemtsov R.V., Zvezdin K.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Varfolomeev S.D., Demina O.V. Synthesis and properties of photochromic retinal analogs // Abstracts of the 16<sup>th</sup> Europ. Symp. on Organic Chemistry. – Prague, Czech Republic, 2009. P. 1.244. P. 311.
69. Ходонов А.А., Беликов Н.Е., Лаптев А.В., Шве́ц В.И. Создание водорастворимых композиций препаратов ретиноидов для лечения заболеваний зрительной системы человека // Материалы итоговой конф. по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». – М., 2009. С. 59–60.
70. Khodonov A.A., Laptev A.V., Zvezdin K.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Fomin M.A., Shvets V.I., Brichkin S.B., Nikolenko D.Yu., Razumov V.F., Barachevsky V.A., Varfolomeev S.D., Demina O.V. New hybrid photochromic materials for optical switching // Abstracts of the 4<sup>th</sup> Int. Conf. on Optical Optoelectronic and Photonic Materials and Application. – Hungary, Budapest, 2010. A-0098. P. 110–111.
71. Barachevsky V.A., Khodonov A.A., Krayushkin M.M. Properties of photochromic retinals // Abstracts of the 3<sup>rd</sup> Japanese–French Seminar on Organic Photochromism «Innovations in Photochromism». – Japan, Yokohama, 2010. IL-02. P. 13.
72. Oesterhelt D., Stoerkenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* // Nature. 1971. V. 233. P. 149–152.
73. Luecke H., Schobert B., Richter H.T., Cartailler J.P., Lanyi J.K. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution // J. Mol. Biol. 1999. V. 291. P. 899–911.
74. Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Шве́ц В.И., Демина О.В., Барачевский В.А., Ходонов А.А. 5-Формил-замещенные индолиновые спиробензопираны и способ их получения: пат. 2358977 Рос. Федерация. № 2008112485; заявл. 02.04.2008; опубл. 20.06.2009, Бюл. № 17.
75. Ligand-Protein Contacts (LPC). URL: <http://bip.weizmann.ac.il/oca-bin/lpcsu>.