



plc

nt.

УДК 547.381:577.161.1:591.484.6

СИНТЕЗ 4-КЕТО- И 4-ОКСИПРОИЗВОДНЫХ *all-E*- И 13Z-РЕТИНАЛЯ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С БАКТЕРИООПСИНОМ

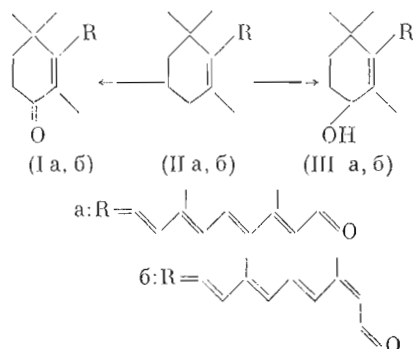
Соколова Н. А., Мицнер В. И.

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова
Закис В. И.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Направленным окислением *all-E*- и 13Z-ретиналей синтезированы их 4-кето- и 4-оксипроизводные. Полученные соединения включаются в обесцвеченную пурпурную мембрану *Halobacterium halobium* R₁ с образованием светочувствительных пигментов, спектры КД которых указывают на наличие экситонного взаимодействия между хромофорами, аналогичного наблюдаемому в тримерах бактериородопсина.

Одним из подходов к изучению топографии хромофорного центра бактериородопсина является реконструирование светочувствительных пигментов из его апобелка и различных аналогов ретинала. Подобные исследования позволили установить, что для образования бактериородопсина ретипаль должен обладать *all-E*- или 13Z-конфигурацией (IIa, б), а 9Z-, 9,13Z- и 11Z-изомеры с бактериоопсином связываться не способны [1]. В зависимости от длины полиеновой цепи и структурных изменений в циклогексеновом кольце аналогов ретинала у образующихся из них пигментов может изменяться способность к 13Z⇌13E-изомеризации и к светозависимому транспорту протона [2-6]. Настоящая работа посвящена синтезу 4-кето- и 4-оксипроизводных *all-E*- и 13Z-ретинала (Ia, б; IIIa, б) и исследованию их способности образовывать пигментные комплексы с бактериоопсином.



Для введения выбранных функциональных групп нами были разработаны два направленных пути окисления ретиналей. Как известно, для

**Максимумы поглощения аналогов ретиналя и их комплексов
с бактериопептином**

Аналог ретиналя	$\lambda_{\text{макс}}$, нм		Аналог ретиналя	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	
	аналог ретиналя	пигмента		аналог ретиналя	пигмента
(Ia)	380	506	(IIIa)	375	538
(Iб)	373	506	(IIIб)	375	530

получения 4-кетопроизводного *all-E*-ретиналя (Ia) стандартным окислителем является «кислая форма» двуокиси марганца [7, 8]. Однако этот реагент не может быть использован в реакции окисления других геометрических изомеров ретиналя, в частности 13Z-ретиналя (IIб), из-за их склонности к Z→E-изомеризации в кислой среде. В то же время применение для этой цели других реагентов аллильного окисления: реактива Саретта [9], успешно использовавшегося нами ранее для окисления ацетата ретинола, и N-бромсукцинимид [10] — не привели к желаемым результатам. Поэтому было целесообразно исследовать окисление ретиналей (IIa, б) до их 4-кетопроизводных (Ia, б) другими формами двуокиси марганца. Оказалось, что двуокись марганца, приготовленная из сульфата марганца и перманганата калия в щелочной среде [7], после промывки водой до pH 7 по эффективности окисления ретиналя (IIa) приблизительно эквивалентна «кислой форме» и с успехом может быть применена для окисления 13Z-ретиналя (IIб). Синтезированные таким образом 4-кетопроизводные (Ia, б) давали характерное красное окрашивание при детекции на тонкослойных хроматограммах с помощью серной кислоты. Отсутствие изомеризации 13Z-двойной связи в полученном 13Z-4-кеторетинале (Iб) было подтверждено данными его спектра ¹H-ЯМР: у этого соединения 12-H оказался более, а 13-Me — менее дезэкранированным, чем у *all-E*-изомера (Ia).

4-Кеторетинали (Ia, б) в принципе могли бы служить исходными соединениями для получения 4-оксипроизводных (IIIa, б). Но такой путь синтеза, включающий восстановление кетогруппы боргидридом натрия после предварительной защиты альдегидной группы [7, 8], малоэффективен из-за его многостадийности, а также относительно низкой доступности исходных кеторетиналей (I). В связи с этим для одностадийного введения оксигруппы в циклогексеновое кольцо ретиналей мы применили N-бромсукцинимид. Ранее последний с успехом использовался для введения ацетоксигруппы в положение 4 молекулы каротиноидов [11], но использование кислой среды при проведении этой реакции делало ее неприемлемой для получения соединений с Z-конфигурацией двойных связей в полиеновой цепи. В химии стероидов фотовозбужденный бромсукцинимид в присутствии карбоната кальция был применен для окисления аллильной метиленовой группы до кетогруппы [10]. Оказалось, что при проведении такого окисления без дополнительного освещения, что исключало риск 13Z→13E-изомеризации, ретинали (IIa, б) образовывали только 4-оксипроизводные (III), имевшие в отличие от кетосоединений (I) меньшую подвижность при ТСХ и дававшие характерную синюю окраску при детекции пятен серной кислотой. В ИК-спектрах окисосоединений (IIIa, б) присутствовали полосы валентных колебаний гидроксильных групп при 3400 см⁻¹ и C—O-связей при 1030–1040 см⁻¹, а различия в области 600–1000 см⁻¹ указывали на изомерный характер этих веществ. Электронные спектры синтезированных нами 4-окси-(III) и 4-кетосоединений (I) были сходны и имели основной максимум поглощения в области 380 нм. Они отличались положением более слабого коротковолнового максимума поглощения: у 4-кеторетиналей (Ia, б) он находился при 294 нм

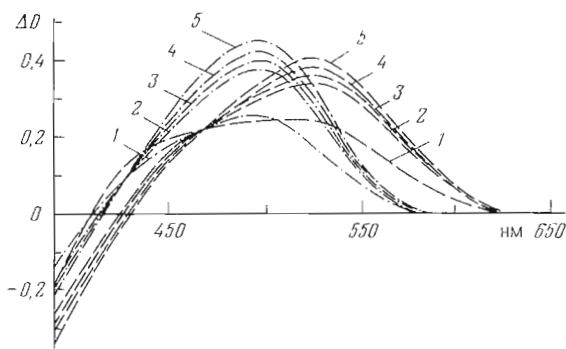


Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения, измеренные при образовании пигментов из бактериоопсина с *all-E*-4-оксиретиналем (IIIa) (---) и 13Z-4-ретиналем (IIб) (-.-). 1 - 2 мин; 2 - 4 мин; 3 - 6 мин; 4 - 2 ч; 5 - 24 ч регенерации

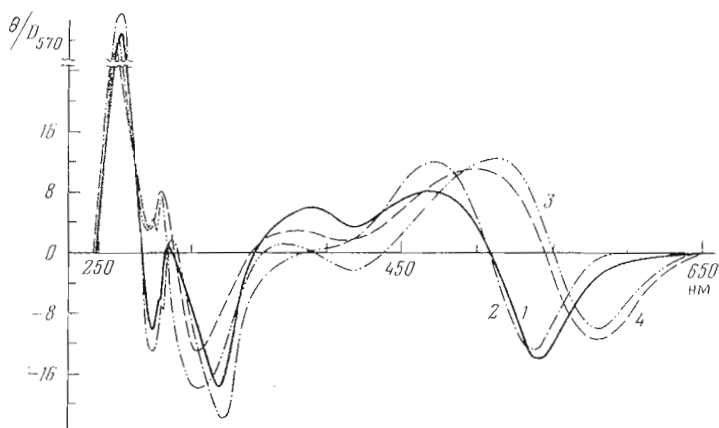


Рис. 2. Спектры КД хромопротеидов, полученных взаимодействием бактериоопсина с аналогами ретиналя (Ia) - 1, (IIб) - 2, (IIIa) - 3 и (IIIб) - 4

и отвечал наличию дополнительной сопряженной C=O-группы, а у 4-оксиретиналей (IIIa, б) проявлялся (в виде плеча) при 254 нм.

Способность синтезированных аналогов ретиналя (I и III) к образованию пигментов исследовалась на препаратах пурпурных мембран *Halo-bacterium halobium* R₁, обесцвеченных по методу [1]. Все аналоги давали окрашенные комплексы. Образование хромопротеидов с участием *all-E*-4-кеторетиналя наблюдалось ранее при выращивании *H. halobium* на среде, содержащей это вещество [5], а также при регенерации обесцвеченного бактериородопсина, солюбилизированного в тритоне X-100 [12]. Пигменты на основе ретиналей (IIб), (IIIa) и (IIIб) были получены нами впервые*.

Образование бактериородопсина из бактериоопсина и ретиналя является сложным процессом, протекающим через ряд промежуточных стадий [1, 13, 14]. Взаимодействие с бактериоопсином полученных нами аналогов ретиналя происходит, по-видимому, аналогичным образом, так как в ходе регенерации также наблюдается батохромный сдвиг максимума поглощения (рис. 1). У полученных пигментов максимумы поглощения

* Авторы работы [2] упоминают получение пигментного аналога из бактериоопсина и 4-оксиретиналя, однако ни конфигурация полиена, ни спектральные характеристики полученного комплекса не приведены.

расположены в более коротковолновой области спектра, чем у световой и темновой форм бактериородопсина ($\lambda_{\text{макс}}$ 570 и 558 нм соответственно), причем у кетоаналогов этот сдвиг более значителен (см. таблицу). Поскольку максимумы поглощения аналогов ретиналя (I) и (III) практически одинаковы (около 380 нм), можно полагать, что наблюдаемые различия в УФ-спектрах бактериородопсина и синтезированных пигментов отражают различия в белковом окружении хромофорных групп. В этой связи можно отметить, что конфигурация Δ^{13} -связи влияет на спектральные характеристики пигментов, полученных только при использовании аналогов (IIIа и IIIб), более близких к бактериородопсину по положению $\lambda_{\text{макс}}$.

На рис. 2 приведены спектры КД полученных пигментов. На основании предложенных ранее отнесений в области спектра 250–350 нм [15, 16] и сравнения со спектром КД пурпурной мембраны [17–21] можно сделать вывод о том, что по состоянию ароматических остатков и окружению хромофора полученные 4-оксипроизводные более близки к бактериородопсину, чем 4-кетоаналог. В области 400–600 нм у каждого из четырех пигментов имеется характерная отрицательная и положительные полосы. Поскольку аналогичные полосы присутствуют в спектре тримера бактериородопсина и свидетельствуют об экситонном взаимодействии его хромофоров [20], можно заключить, что подобное взаимодействие характерно также и для хромофоров в полученных нами пигментах.

По ряду свойств полученные пигменты отличаются от бактериородопсина. Так, световую адаптацию удалось наблюдать только для пигмента из аналога (IIIб) (сдвиг максимума поглощения 533→543 нм и возрастание интенсивности на 10%, ср. [15]). При освещении ($\lambda > 480$ нм) 4-кетоаналогов положение максимума поглощения не изменялось, но происходило заметное снижение его интенсивности вследствие частичного необратимого разрушения этих фотолabile пигментов.

Таким образом, при введении окси- и кетогрупп в положение 4 молекулы ретиналя полученные аналоги не теряют способности взаимодействовать с бактериородопсином. При этом пигментные комплексы, образуемые 4-оксипроизводными ретиналя (IIIа, б), по рассмотренным выше характеристикам оказались ближе к бактериородопсину, чем комплексы с 4-кетоаналогам (Iа, б).

Экспериментальная часть

Электронные спектры производных ретиналя (в метаноле) и суспензий пигментов в воде регистрировали соответственно на приборах Hitachi EPS-3T (Япония) и Beckman АСТА М-VI (Англия). Дифференциальные спектры поглощения снимали при 20° в четырехкюветной системе (толщина кюветы 1 см): в канале образца одна кювета содержала суспензию апомембраны и аналога ретиналя, другая — дистиллированную воду; в канале сравнения соответственно — суспензию апомембраны и раствор аналога ретиналя. ИК-спектры измеряли на спектрофотометре Perkin-Elmer 257 (Англия). Спектры ¹H-ЯМР снимали в дейтерохлороформе при 20° на приборе Bruker WR-60 (ФРГ) при рабочей частоте 60 МГц (внутренний стандарт — тетраметилсилан, д — дублет, т — триплет, кв — квартет, м — мультиплет). Спектры КД пигментов получали на приборе Dichrographe III CNRS Roussel-Joan (Франция) в 80% растворе сахарозы при 20° и толщине кюветы 0,1 см. Аналитическую ТСХ проводили на пластинках Silufol (ЧССР) в системе гексан — эфир, 1 : 2. Обнаружение пятен проводили опрыскиванием пластинок серной кислотой.

Обесцвечивание пурпурной мембраны проводили в присутствии 0,5 М гидроксилamina при pH 7,0 в 0,07 М фосфатном буфере [22, 23], при этом исходная концентрация бактериородопсина в мембранной суспензии соответствовала значению оптической плотности адаптированной к свету фор-

мы, равной 1,0 (при 568 нм). Обесцвечивание 10 мл мембранной суспензии проводили при 37°, освещая фокусированным светом лампы КГМ-150/24 и используя в качестве фильтров 1-см слой 5% раствора CuSO_4 и светофильтр ЖС-18. Через 4 ч (полное обесцвечивание) суспензию центрифугировали 30 мин при 50 000g, осадок суспендировали в 2 мл воды, наносили на колонку с сефадексом G-50 (2×40 см), элюировали водой и мембранную фракцию концентрировали центрифугированием 20 мин при 50 000g. Осадок суспендировали в 10 мл дистиллированной воды. Рекомбинацию пигментов проводили в темноте действием на суспензию обесцвеченных образцов бактериородопсина ($1,5 \cdot 10^{-5}$ М) 1,2–1,3 экв. 3 мМ этанольного раствора соответствующего аналога ретиналя. Время инкубации 24 ч.

all-E-4-кеторетиналь (Ia). Раствор 150 мг *all-E*-ретиналя (IIa) в 2 мл гексана наносили на колонку с 2,4 г MnO_2 [6]. Колонку элюировали 30 мл эфира и элюат очищали с помощью препаративной ТСХ на окиси алюминия (акт. IV) в системе гексан – эфир, 1:2. Выход 40 мг (26%), т.пл. 113–114,5° (из эфира), R_f 0,62; ИК (вазелиновое масло, ν см⁻¹): 2740 сл., 1660 с., 1610 сл., 1590 ср., 1290 сл., 1280 сл., 1260 сл., 1220 ср., 1210 ср., 1170 ср., 1110 ср., 1050 сл., 990 сл., 980 ср., 920 сл., 900 сл., 840 сл., 780 сл., 730 сл.; УФ, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ): 294 (11400), 380 (43700); ¹H-ЯМР (δ , м.д.): 1,06 [1-(CH_3)₂], 1,73 (5- CH_3), 1,83 (2-Н, т, $J_{2,3}$ 7 Гц), 1,95 (9- CH_3), 2,2 (13- CH_3), 2,4 (3-Н, т, $J_{3,2}$ 7 Гц), 5,86 (14-Н, д, $J_{14,15}$ 8 Гц), 6,23 (7-Н, 8-Н, м), 6,3 (12-Н, д, $J_{12,11}$ 16 Гц), 6,33 (10-Н, д, $J_{10,11}$ 12 Гц), 7,03 (11-Н, кв, $J_{11,12}$ 16 Гц, $J_{11,10}$ 12 Гц), 10,0 (15Н, д, $J_{15,14}$ 8 Гц).

13Z-4-кеторетиналь (Iб) получали аналогично соединению (Ia) окислением 100 мг 13Z-ретиналя (IIб) 1,6 г MnO_2 . Выход 30 мг (29%), т.пл. 90–92° (из смеси эфир – пентан, 1:10), R_f 0,67; ИК (вазелиновое масло, ν см⁻¹): 2740 сл., 1660 с., 1610 ср., 1590 ср., 1290 сл., 1260 сл., 1220 сл., 1200 сл., 1170 сл., 1120 ср., 1100 ср., 1040 сл., 980 ср., 890 сл., 840 сл., 770 сл., 760 сл.; УФ, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ): 294 (15250), 373 (35300); ¹H-ЯМР (δ , м.д.): 1,2 [1-(CH_3)₂], 1,83 (5- CH_3 , 2-Н), 2,03 (9- CH_3), 2,13 (13- CH_3), 2,4 (3-Н, т, $J_{3,2}$ 7 Гц), 5,83 (14-Н, д, $J_{14,15}$ 8 Гц), 6,29 (7-Н, 8-Н, 10-Н, м), 7,16 (11-Н, кв, $J_{11,12}$ 16 Гц, $J_{11,10}$ 12 Гц), 7,26 (12-Н, д, $J_{12,11}$ 16 Гц), 10,06 (15-Н, д, $J_{15,14}$ 8 Гц).

all-E-4-оксиретиналь (IIIa). К раствору 200 мг *all-E*-ретиналя (IIa) в 10 мл водного тетрагидрофурана добавляли по каплям при перемешивании и температуре 0–2° в присутствии 50 мг CaCO_3 раствор 90 мг N-бромсукцинимид в 5 мл водного тетрагидрофурана. Через 10 мин реакционную смесь выливали в 0,1 н. раствор едкого натра, вещество экстрагировали хлороформом и очищали хроматографически на колонке с 15 г окиси алюминия (акт. IV), элюируя вещество смесью гексан – эфир, 2:1. Выход 140 мг (66 или 80% с учетом конверсии исходного ретиналя), т.пл. 64–65° (из пентана), R_f 0,47; ИК (вазелиновое масло, ν см⁻¹): 3400 с.ш., 2780 сл., 2740 сл., 1670 с., 1660 с., 1620 ср., 1590 с., 1340 ср., 1280 сл., 1220 ср., 1200 сл., 1170 с., 1150 ср., 1120 ср., 1080 сл., 1030 ср., 1000 сл., 970 ср., 890 сл., 830 сл., 760 ср.; УФ, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ): 254 п, 375 (40100).

13Z-4-оксиретиналь (IIIб) получали аналогично соединению (IIIa) из 100 мг 13Z-ретиналя (IIб) действием 50 мг бромсукцинимид в присутствии 30 мг CaCO_3 . Выход 64 г (61 или 79% с учетом конверсии исходного ретиналя), масло, R_f 0,49. ИК (пленка, ν см⁻¹): 3400 с.ш., 2780 сл., 2740 сл., 1670 с., 1660 с., 1620 ср., 1590 с., 1340 ср., 1290 сл., 1270 сл., 1220 сл., 1210 сл., 1170 с., 1150 ср., 1120 ср., 1080 сл., 1040 ср., 1010 сл., 980 ср., 940 сл., 910 сл., 900 сл., 880 сл., 860 сл., 840 сл., 830 сл., 810 сл., 780 сл.; УФ, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ): 254 п (4170), 375 (30800).

Авторы выражают благодарность В. И. Цетлину за постоянный интерес к данной работе и участие в ее обсуждении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Schuhmann L. (1974) FEBS Lett., 44, 262-265.
2. Oesterhelt D., Christoffel V. (1976) Biochem. Soc. Trans., 4, 556-559.
3. Marcus M. A., Lewis A., Racker E., Crespi H. (1977) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 78, 669-675.
4. Tokunaga F., Govidjee R., Ebrey T. G., Crouch R. (1977) Biophys. J., 19, 191-198.
5. Sumper M., Herrmann G. (1976) FEBS Lett., 71, 333-336.
6. Tokunaga F., Ebrey T. G. (1978) Biochemistry, 17, 1915-1922.
7. Henbest H. B., Jones E. R. H., Owen T. G. (1957) J. Chem. Soc., 4909-4912.
8. Дмитриовский А. А., Соловьева Н. В., Ермилова Л. К. (1974) Прикл. биохимия и микробиол., 10, 350-357.
9. Dauben W. G., Lorber M., Fullerton D. S. (1969) J. Org. Chem., 34, 3587-3592.
10. Finucane B. W., Thomsen J. B. (1969) Chem. Commun., 1220-1222.
11. Entschel R., Karrer P. (1960) Helv. chim. acta, 43, 94-101.
12. Шкроб А. М., Родионов А. В., Овчинников Ю. А. (1978) Биоорган. химия, 4, 354-359.
13. Schreckenbach T., Walckhoff B., Oesterhelt D. (1977) Eur. J. Biochem., 76, 499-511.
14. Schreckenbach T., Oesterhelt D. (1977) Fed. Proc., 36, 1810-1814.
15. Becher B., Cassim J. Y. (1976) Biophys. J., 16, 1183-1200.
16. Becher B., Cassim J. Y. (1977) Biophys. J., 19, 285-297.
17. Bauer P. J., Deucher N. A., Heyn M. P. (1976) Biophys. Str. Mech., 2, 79-82.
18. Korenstein R., Sherman W. V., Caplan S. R. (1976) Biophys. Str. Mech., 2, 267-276.
19. Buth-Linder M., Rosenheck K. (1976) FEBS Lett., 76, 41-44.
20. Ebrey T. G., Becher B., Mao B., Kilbride P., Honig B. (1977) J. Mol. Biol., 112, 377-397.
21. Becher B., Ebrey T. G. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 69, 1-6.
22. Kanner B., Racker E. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 64, 1054-1061.
23. Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1971) Nature New Biol., 233, 149-152.

Поступила в редакцию
30.XI.1978

THE SYNTHESIS OF 4-KETO- AND 4-HYDROXY-*all-E*- AND 13Z-RETINAL DERIVATIVES AND THEIR INTERACTION WITH BACTERIORHOPSIN

SOKOLOVA N. A., MITSNER B. I., ZAKIS V. I.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;
M. M. Schemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The synthesis of 4-keto- and 4-hydroxy-*all-E*- and 13Z-retinal derivatives was achieved via direct oxidation of appropriate retinals with MnO₂ and N-bromosuccinimide. The compounds were found capable of interacting with bleached purple membrane of *Halobacterium halobium* R₁ to give the photosensitive pigments. The CD-spectra of the latter showed the existence of exciton interaction between the chromophores, analogous to that for bacteriorhodopsin trimers.