



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.4.04+577.161.1.07

АНАЛОГИ БАКТЕРИОРОДОПСИНА НА ОСНОВЕ
4-ЗАМЕЩЕННЫХ РЕТИНАЛЕЙ

Серебряный В. А., Мицнер В. И.

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

Закис В. И., Цетлин В. И.

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

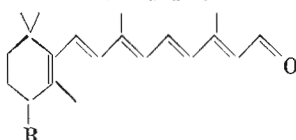
Хромофорные группы бактериородопсина из галофильных бактерий *Halobacterium halobium* (*all-E*- и *13-Z*-ретинали) могут быть удалены действием гидроксилamina при освещении [1]. Получающийся при этом апобелок — бактериоопсин — при добавлении этих изомеров ретиналя регенерирует исходный бактериородопсин, а с различными аналогами ретиналя способен образовывать пигменты, в большей или меньшей степени приближающиеся по свойствам к бактериородопсину (см. обзор [1]). Модифицированные ретинали, несущие репортерные группировки (ядра ^{13}C или ^{19}F , иминоксильные радикалы и др.) или реакционноспособные группы, могут найти применение для исследования хромофорного центра бактериородопсина методами ЯМР и ЭПР, а также с помощью индуцированных сшивок. В настоящем сообщении описано получение серии замещенных ретиналей и исследование их пигментообразующих и спектральных свойств.

Нами разработан способ направленного введения заместителей в положение *S4* ретиналя, который включает в себя стадию аллильного бромирования с помощью *N*-бромсукцинимида и последующее замещение брома на алкокси-, ацилокси- или азидную группу. Индивидуальность синтезированных соединений (Ia) — (VIIa) подтверждена данными высокоэффективной жидкостной хроматографии, а их структура — методами ИК-, УФ-, масс- и ^1H -ЯМР-спектроскопии.

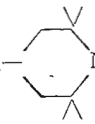
Способность аналогов ретиналя к образованию пигментов исследовали на препаратах бактериоопсина, полученных обесвечиванием пурпурных мембран *H. halobium* R_1 ; в отдельных случаях проводили экстракцию ретинальоксима, как описано в работе [2].

Соединения (Ia) — (VIIa) связываются с бактериоопсином, при этом наблюдается образование промежуточных форм (изобестическая точка в спектрах поглощения при ~ 450 нм), как и при встраивании природных хромофоров — *all-E*- или *13-Z*-ретиналя [3]. Взаимодействие не останавливается на стадии нековалентных комплексов, а образуется альдиминная связь с остатком лизина, что следует из результатов восстановления с помощью NaBH_4 . Когда восстановление проводится при освещении (в усло-

Максимумы поглощения 4-замещенных ретиналей (Ia)–(Xa)
общей формулы



и их комплексов с бактериородопсином (Iб)–(Xб)

Соединение	R	$\lambda_{\text{макс. нм}}$ ($\epsilon \pm 5\%$)	
		производное ^{1*} ретинала (а)	пигмента (б) ^{2*}
(I)	O ¹³ CH ₃	370 (42 000)	470
(II)	OCH ₂ CH ₃	375 (43 000)	500
(III)	OCH(CH ₃) ₂	375 (40 000)	500–530
(IV)	OC(CH ₃) ₃	375 (40 500)	500–530
(V)	OCOCH ₃	375 (41 000) ^{3*}	470
(VI)	OCOCH ₂ CH ₂ Br	375 (40 500)	455
(VII)	 OCOCH ₂ —	250 (4100) 370 (41 500)	465
(VIII)	N ₃	272 (1300)	475
(IX) ^{4*}	OH	375 (39 500)	538
(X) ^{4*}	O	294 (11 400) 380 (43 700)	506

^{1*} В метаноле.

^{2*} В 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,0).

^{3*} См. [5].

^{4*} См. [6].

виях, указанных в работе [4]), 4-замещенные ретинильные остатки связаны предпочтительно с остатком лизина фрагмента 72–248 полипептидной цепи, как и при восстановлении нативного бактериородопсина [4].

Альдиминная связь в пигментах, образованных 4-замещенными ретиналями, менее стабильна, чем в бактериородопсине: в отличие от последнего она доступна для NH₂OH и NaBH₄ в темновых условиях.

В таблице приведены значения максимумов в спектрах поглощения соединений (Ia)–(VIIIa) и полученных из них пигментов (Iб)–(VIIIб); для сравнения приведены также полученные ранее [6] данные для 4-окси- и 4-кето-аналогов (IXа, б) и (Xа, б). Все синтезированные пигменты имеют более коротковолновое положение максимума, чем бактериородопсин. Наибольший bathochromный сдвиг наблюдается для соединений (IXб), (IIб), (Xб) и (IIIб), тогда как для остальных положение максимума не сильно отличается от величин, характерных для протонированной альдиминной связи в модельных ретинилиденаминах или ретинилиденпептидах.

В спектрах КД пигментов (Iб)–(VIIIб) в области 550–630 нм отсутствует отрицательный экстремум, который имеется у нативного бактериородопсина или пигментов (IXб) и (Xб) и свидетельствует об экситонном взаимодействии хромофоров в тримере [1]. В области 450–550 нм наблюдается положительная полоса, как у ретинальоксима в составе апомембран или ретинильного остатка, ковалентно связанного в хромофорном центре молекулы. В области спектров КД (250–320 нм), характерной для остатков ароматических аминокислот, наиболее близка к кривой бактериородопсина кривая его аналога (VIIб). На сходство пространственного строения полученных пигментов и бактериородопсина указывает характер их собственной белковой флуоресценции ($\lambda_{\text{эмис}} 313$ нм).

Спектры ЭПР пигмента (VIIб) свидетельствуют, что спиновая метка является иммобилизованной (время корреляции $\tau \geq 10^{-7}$ с) и экранированной от внешней среды, что следует из ее ограниченной доступности к воздействию парамагнитных зондов $K_3Fe(CN)_6$ или $Ni(CH_3COO)_2$. Для этого аналога бактериородопсина обнаружено расщепление сложноэфирной связи в хромофорной группе молекулы, что зафиксировано по появлению в растворе свободного иминоксильного радикала с одновременным переходом пигмента (VIIб) в пигмент (IXб). Однако гидролиз идет значительно медленнее, чем для аналогичного пигмента, содержащего радикал пирролинового ряда [7], и не препятствует спектральным исследованиям. Подобный гидролиз наблюдался и для пигмента (Vб). Поскольку исходные производные ретиналя (Va) и (VIIa) гидролитически достаточно устойчивы, расщепление сложноэфирной связи в пигментах обусловлено, очевидно, влиянием пространственно сближенной нуклеофильной группировки белка.

Полученные данные показывают, что при наличии при C4 ретиналя заместителей, различающихся размерами, полярностью или гидрофобностью, такие аналоги сохраняют способность связываться с бактериородопсином и могут быть использованы для исследования структурной организации бактериородопсина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Stoeckenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A.* Bacteriorhodopsin and the purple membrane of Halobacteria.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 505, № 3—4, p. 215—278.
2. *King G. I., Mowery P. C., Stoeckenius W., Crespi H. L., Schoenborn B. P.* Location of the chromophore in bacteriorhodopsin.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 8, p. 4726—4730.
3. *Schreckenbach T., Walckhoff B., Oesterhelt D.* Studies on the retinal-protein interaction in bacteriorhodopsin.— *Eur. J. Biochem.*, 1977, v. 76, № 2, p. 499—511.
4. *Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Цетлин В. И., Киселев А. В., Закис В. И.* Миграция альдиминной связи в процессе фотохимического цикла бактериородопсина.— *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 9, с. 1427—1429.
5. *Surmatiz J. D., Walser A., Gibas J., Schweiter V., Thommew R.* New method of the synthesis of oxygenated carotenoids.— *Helv. chim. acta*, 1979, v. 53, № 10, p. 974.
6. *Соколова Н. А., Мицнер Б. И., Закис В. И.* Синтез 4-кето-, 4-оксипроизводных *all-E*- и 13Z-ретиналей и их взаимодействие с бактериородопсином.— *Биоорган. химия*, 1979, т. 5, № 7, с. 1053—1059.
7. *Crouch R., Renk G., Scott R., Mao B., Ebrey T. G.* Spin labeled, halogenated, and 5,6-dihydro pigment analogues of the purple membrane.— *Biophys. J.*, 1979, v. 25, № 2, p. 313a.

Поступило в редакцию
9.VI.1981

BACTERIORHODOPSIN ANALOGS OBTAINED FROM 4-SUBSTITUTED RETINALS

SEREBRYANY V. A., MITSNER B. I., ZAKIS V. I., TSETLIN V. I.

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

A series of *all-trans* retinal derivatives were synthesized using reaction with N-bromosuccinimide and subsequent substitution of bromine at C(4) atom for alkoxy, acyloxy, and azido groupings, or a spin label. Bacteriorhodopsin analogs were reconstituted from these compounds and bacteriorhodopsin, and their absorption and CD spectra studied. EPR spectroscopy revealed a buried dislocation of the spin labeled retinal in the bacteriorhodopsin analog.