



УДК 541.144+547.963.4.04

АРОМАТИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ БАКТЕРИОРОДОПСИНА

Шкроб А. М., Родионов А. В., Овчинников Ю. А.

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

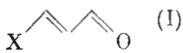
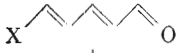
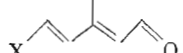
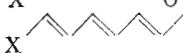
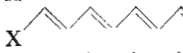
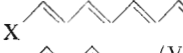

Взаимодействие бактериородопсина с арилполленалями, содержащими от одной до пяти двойных связей в цепи, приводит к образованию нековалентных комплексов, далее превращающихся в хромопротеиды, в которых альдегиды связаны с лизиновыми ϵ -аминогруппами белка в виде протонированных альдиминов. Полученные хромопротеиды подобно бактериородопсину претерпевают циклические фотохимические превращения, однако альдиминные группы в них обладают меньшей, чем в бактериородопсине, основностью и могут быть локализованы не только на остатке Lys⁴¹, но и на Lys²¹⁶. Ни один из этих хромопротеидов не обнаружил четко выраженной способности функционировать как протонный насос. Нековалентные комплексы арилполленалей с бактериородопсином сопоставлены по своим свойствам с комплексами их аналогов, в молекулах которых альдегидные группы заменены на алкилкетонные или сложноэфирные. Длительное освещение таких комплексов приводит к разрушению хромофора и к утрате бактериородопсином способности рекомбинировать с ретиналем в бактериородопсин. Обсуждаются структурные предпосылки эффективного комплексообразования аналогов ретиналя с бактериородопсином, вероятный механизм фотонактивации, а также возможное использование хромопротеидов как моделей бактериородопсина и продуктов его фотоиндуцированных превращений.

Спектральные, фотохимические и функциональные характеристики ретинальсодержащих хромопротеидов, таких, как родопсин, ретинохром, бактериородопсин и т. п., по всей вероятности, определяются специфическим взаимодействием полиеновой цепи с белковым окружением. У всех таких хромопротеидов поглощение кванта света протетической группой — протонированным альдиминном одного из стереоизомеров ретиналя — индуцирует последовательность превращений, в ходе которых изменяются не только конфигурация и свойства протетической группой, но и конформация белка. Исследование полиен-белковых взаимодействий в ходе этих превращений составляет главную проблему при выяснении механизмов трансформации световой энергии. Одним из возможных подходов к данной проблеме может быть определение минимальных требований к структуре полиеновой молекулы, выполнение которых необходимо и достаточно для того, чтобы включающий ее белок обладал теми или иными общими свойствами с соответствующим нативным хромопротеидом.

В настоящей работе подобный подход использован на примере бактериородопсина, который продуцируется галофильным микроорганизмом *Halobacterium halobium* и выполняет в клеточной мембране функцию светозависимого протонного насоса [1—3]. В этой мембране бактериородопсин

Принятые сокращения: полностью-*E*-6-метил-8-(2', 2', 6'-триметил-6'-циклогексенил)-3, 5, 7-октадиен-2-он — C₁₈-кетон, полностью-*E*-3-метил-5-(2', 2', 6'-триметил-6'-циклогексенил)-2,4-пентадиеналь — C₁₅-альдегид.

Спектральные характеристики арилполиеновых альдегидов и некоторые данные об их взаимодействии с бактериоопсином в апомембранах

Альдегид (X = <i>n</i> -C _n H _{2n+1} OC ₆ H ₄ ; Y = <i>n</i> -(CH ₂) _n NC ₆ H ₄)	Спектр поглощения (EtOH)		Образование хромопротеида K _m /K _m ^{рет*}	Ингибирование образования бактериородопсина K ₁ /K _m ^{рет*}
	λ _{макс} , нм	ε · 10 ³ , M ⁻¹ см ⁻¹		
 (I)	319	30,8		16
 (II)	349	40,4	1,5	1
 (IIa)	355	34,2	11,9	
 (III)	377	49,4	7,7	
 (IV)	398	58,7	0,7	
 (V)	417	68,0 **		
 (VI)	389	37,5		6,1

* Измерения выполняли при pH 6 (20° C) с экстрагированными апомембранами; для полностью-*E*-ретинала величина K_m^{рет} = 6 · 10⁻³ M.

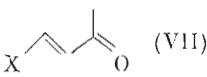
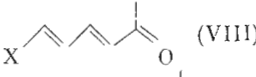

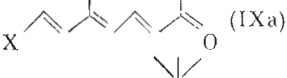
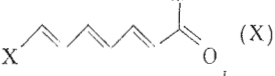
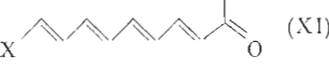
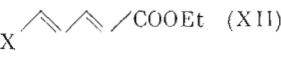
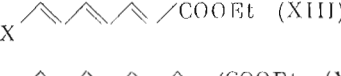
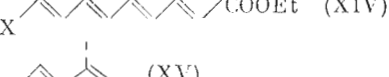
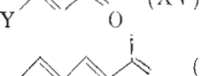
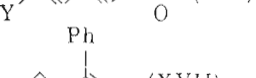
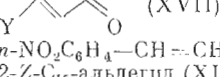
** Вычислено с помощью корреляционного уравнения (см. подпись к рис. 20).

находится в виде двумерных белково-липидных кристаллических образований размером около 0,5 мкм, которые получили название пурпурных мембран [1, 4, 5]. Фотоиндуцированный гидроксиламинолиз альдимида ретинала в пурпурных мембранах приводит к так называемым апомембранам, содержащим бактериоопсин и оксим ретинала [6], причем последний может быть удален промывкой лioфилизированных препаратов петролейным эфиром [7, 8].

При инкубации апомембран с 13-*Z*- или полностью-*E*-ретиналом бактериоопсин мгновенно образует с этими альдегидами нековалентные комплексы, далее относительно медленно превращающиеся в бактериородопсин [9]. Известно, что некоторые полиеновые альдегиды, близкие по строению к ретиналу, могут замещать последний в этом процессе, причем образующиеся хромопротеиды в ряде случаев оказываются функционально активными [3, 10–13]. С другой стороны, многие структурные аналоги ретинала, лишённые альдегидной группы и потому неспособные образовывать альдимин, тем не менее связываются бактериоопсином в нековалентные комплексы [14–16]. Эти данные указывают на перспективность структурно-функциональных исследований на разных этапах взаимодействия полиенов с бактериоопсином. С этой целью в данной работе был использован набор ненасыщенных соединений, отличающихся от ретинала строением терминальной функциональной группы, числом двойных связей и метильных заместителей в цепи, а также природой циклической части молекулы (табл. 1, 2).

Ключевое положение в этом наборе занимают арилполиеновые альдегиды (I)–(VI), имеющие от одной до пяти двойных связей в цепи и бензольное кольцо вместо триметилциклогексенового. Эти альдегиды как аналоги ретинала имеют два достоинства: во-первых, их полоса поглощения расположена в удобной для наблюдения области и не перекрывается с поглощением белка и, во-вторых, вводя различные заместители в бензольное кольцо, можно управлять распределением электронной плотности в полиеновой цепи. Проведенные исследования показали, что взаимодействие бактериоопсина с арилполиеновыми альдегидами, как и с ретиналом,

Свойства некоторых аналогов ретиналя и их нековалентных комплексов с бактериопсином*

Аналог (X = n - $\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_4$; Y = n - $(\text{CH}_2)_2\text{NC}_6\text{H}_4$)	Спектр поглощения (EtOH)		Нековалентный комплекс			Ингибирование образования бактериородоп- сина K1/A рет** K1/A III
	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	Спектр КД		Спектр поглощения	
			$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$		
 (VII)	320	26,3	328	325	26	21
 (VIII)	348	41,7	360	360	33,5	2,1
 (IX)	375	48,3	395			
 (IXa)	378	50,4	390	398	39,3	0,54
 (X)	378	50	395***			
 (XI)	397	47,3	385			
 (XII)	333	38,3	340	342	28,7	
 (XIII)	358	50,2	370	370	34	
 (XIV)	382	55,9	380			
 (XV)	384	33,8	390	390	29,5	18
 (XVI)	408	35,3	413	420	30,5	5,2
 (XVII)	419	37,4	430			
n - $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$ -CH=CH-COCH ₃ (XVIII)	305	24,3	313			
2-Z-C ₁₅ -альдегид (XIX)	323	11	360	362	20,3	53
полностью-E-C ₁₅ -альдегид (XX)	326	12	360	364	24,5	2,5

* Точно определить положение и амплитуду полос поглощения комплексов соединений (IX) — (XI), (XIV), (XVI) — (XVIII) не удалось из-за их малой устойчивости. Эти же соединения, кроме того, не ингибируют в заметной степени и рекомбинацию бактериопсина с полностью-E-ретиналем, приводящую к бактериородопсину. О действии на этот процесс соединений (X) и (XVII) см. в тексте.

** См. примечание I в табл. I.

*** Полоса имеет отрицательный знак.

проходит в два этапа: оно начинается с мгновенного образования нековалентных комплексов и завершается их превращением в фотохимически активные хромопротенды, в которых альдегиды ковалентно связаны с белком в виде альдиминов.

Первичное связывание альдегидов бактериопсином можно обнаружить по bathохромному сдвигу и некоторому уменьшению амплитуды их полосы поглощения (см. табл. 1, 3 и 5), появлению в области этой полосы индуцированного кругового дихроизма положительного знака (рис. 1), а также

Спектры поглощения и КД ($\lambda_{\text{макс}}$, нм; в скобках – знак полосы) нековалентных комплексов и хромопротеидов, образованных арилполиеновыми альдегидами и бактериоопсином в апомембранах

Альдегид	Нековалентный комплекс		Хромопротеид	
	Спектр поглощения	Спектр КД	Спектр поглощения	Спектр КД
(I)	329	340(+)	412	429(-)
(II)	364	360(+)	453	460(-)
(IIa)	370	375(+)	450	485(-)
(III)	393	390(+)	489	535(-)
(IV)	380, 408, 434		531	510(+)
(V)	385, 414, 433		567	555(+)
(VI)	405	395(+)	508	524(-)

по изменению формы и амплитуды полосы поглощения ароматических аминокислотных остатков белка. Сходные явления наблюдаются и в случае соединений, имеющих вместо альдегидной метилкетонную или сложноэфирную группу (см. рис. 1 и табл. 2). Поэтому можно думать, что на данном этапе взаимодействия арилполиеновых альдегидов с белком не включает в себя образования ковалентных связей. Если последующее превращение в хромопротеид протекает настолько быстро, что псевдостационарная концентрация комплекса мала, ее удастся увеличить, охлаждая препарат. В этих условиях у комплексов альдегидов (IV) и (V) наблюдается тонкая структура полос поглощения (рис. 2).

Соединения, к которым бактериоопсин имеет высокое сродство, например *полностью-E*-ретиаль или C_{18} -кетон [14], мгновенно вытесняют арилполиеновые альдегиды из нековалентных комплексов, действуя тем эффективнее, чем короче полиеновая цепь альдегида. С другой стороны, используя альдегиды с короткой цепью, у которых время жизни нековалентных комплексов достаточно велико, удастся показать, что эти альдегиды конкурентно ингибируют рекомбинацию бактериоопсина как с *полностью-E*-, так и с *13-Z*-ретиалем (рис. 3). Это означает, что в нековалентных комплексах с бактериоопсином исследованные арилполиеновые альдегиды и ретиаль связываются тождественными или перекрывающимися участками молекулы белка.

Нековалентные комплексы арилполиеновых альдегидов интересно сравнить с комплексами таких соединений, которые вместо альдегидной имеют другую терминальную функциональную группу (ср. табл. 2 и 3). Триенон (IXa), который можно рассматривать как структурный аналог C_{18} -кетона, подобно последнему является эффективным конкурентным ингибитором рекомбинации бактериоопсина с *полностью-E*- и *13-Z*-ретиалем (рис. 4). Этот результат наилучшим образом показывает, что замена триметилциклогексенового кольца на бензольное существенно не сказывается на стабильности нековалентных комплексов. Ингибиторная активность, однако, практически полностью исчезает при переходе к триенону (IX), лишенному метильной группы в цепи. Можно предположить, что данная метильная группа облегчает отбор той конформации полиена, в которой он связывается с белком.

Введение в цепь объемистых заместителей искажает комплексы полиенов с бактериоопсином. Так, триенон (X), содержащий *трет*-бутильную группу, образует комплекс, который в отличие от комплексов всех остальных изученных соединений обладает отрицательным круговым дихроизмом. Этот триенон конкурентно ингибирует рекомбинацию бактериоопсина с *13-Z*-ретиалем ($K_i/K_m=1,2$), тогда как с *полностью-E*-ретиалем наблюдается некоторое ускорение рекомбинации при низких концентрациях

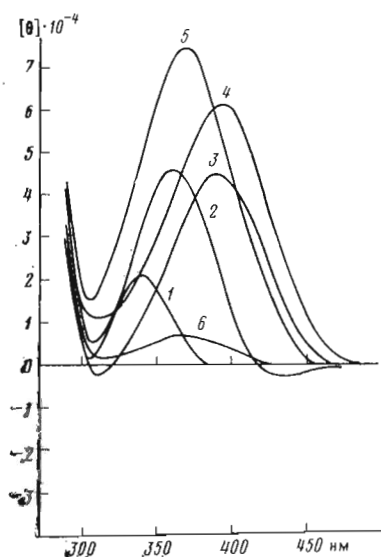


Рис. 1

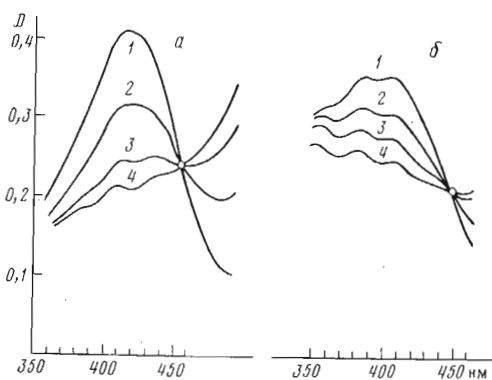


Рис. 2

Рис. 1. Спектры КД нековалентных комплексов бактериоопсина с аналогами ретиналя: (I) — 1, (II) — 2, (III) — 3, (IX) — 4, (XIII) — 5; 6 — контроль (апомембраны, содержащие незначительное количество оксима ретиналя). Структуру аналогов см. в табл. 1, 2. Спектры получены при 20° С сразу после введения аналога (2 моль/моль белка) в суспензию апомембран, содержащую $1,8 \cdot 10^{-5}$ М белок

Рис. 2. Коротковолновая область спектра поглощения при взаимодействии бактериоопсина и альдегидов (IV) (а) и (V) (б) (8,5° С; бактериоопсин в апомембранах $1,4 \cdot 10^{-5}$ М; альдегид/белок=0,9). Время начала съемки спектра после введения альдегида: 1 — 10 с, 2 — 5 мин, 3 — 15, 4 — 30 мин

триенона и слабое торможение при более высоких. Качественно сходный результат был получен с 4-диметиламинохалконом (XVII) (рис. 5). Подобные необычные эффекты, возможно, вызваны существованием в мембране двух типов участков связывания полиена, на одном из которых он перекрывается с ретиналем, а на другом нет. При связывании полиена на участках второго типа он существенно не влияет на взаимодействие белка с 13-Z-ретиналем, но облегчает его в случае полностью-E-ретиналя. Некоторые аргументы в пользу такой гипотезы были получены для 4-диметиламинохалкона (XVII). Это соединение, будучи связанным апомембранами, интенсивно флуоресцирует и обладает индуцированными круговым дихроизмом. При рекомбинации с ретиналем оба эти эффекта совершенно исчезают, что свидетельствует о вытеснении халкона из мембран [17]. Если, однако, вместо ретиналя добавить эквимольное к бактериоопсину количество C_{18} -кетона, то КД-полоса халкона подавляется полностью, хотя его флуоресценция ослабляется менее чем наполовину. Этот результат согласуется с представлением о двух типах участков связывания, один из которых локализован в бактериоопсине и перекрывается с участком связывания C_{18} -кетона.

Дополнительные сведения о свойствах нековалентных комплексов были получены при изучении второго этапа взаимодействия арилполлиеновых альдегидов с бактериоопсином. За этим процессом можно наблюдать по появлению и росту полосы поглощения хромопротенда, расположенной в области значительно больших длин волн, и по протекающему симбатно уменьшению амплитуды полосы нековалентного комплекса (рис. 6). Скорость спектральных изменений, как и в случае ретиналя, связана с концентрацией альдегида уравнением Михаэлиса — Ментен (см. рис. 7 и табл. 1; ср. [14]). Для изученных соединений она возрастает с увеличением числа сопряженных двойных связей в цепи и при введении метиль-

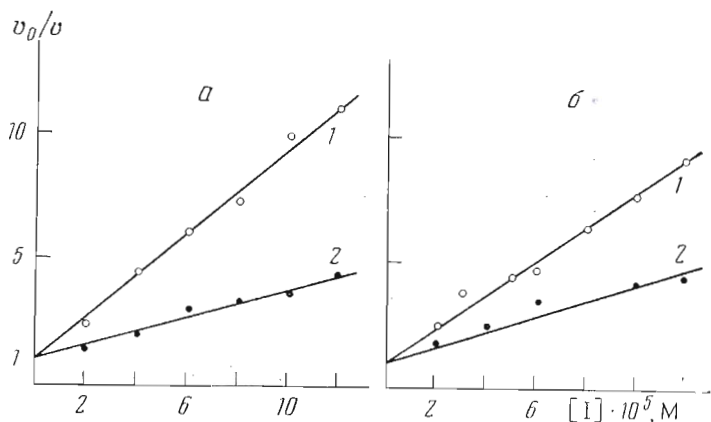


Рис. 3. Конкуренентное ингибирование альдегидом (II) рекомбинации бактериоопсина с 13-Z (а, K_m $5,3 \cdot 10^{-6}$ М) и полностью-Е-ретиналом (б, K_m $6,2 \cdot 10^{-6}$ М) (бактериоопсин в апомембранах $8 \cdot 10^{-6}$ М, 20° С). Концентрация ретиналя (М) и вычисленное значение K_1 (М) — а: 1 — $1,4 \cdot 10^{-5}$, $3,4 \cdot 10^{-6}$; 2 — $4 \cdot 10^{-5}$, $4,2 \cdot 10^{-6}$; б: 1 — $1,4 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-6}$; 2 — $2,3 \cdot 10^{-5}$, $5,7 \cdot 10^{-6}$.

ной группы в «нужном» месте. Найденная величина K_m для тетраенала (IV) довольно близка к полученной в аналогичных условиях для ретиналя. Это позволяет предположить, что скорость лимитирующие стадии в обоих случаях сходны по своей природе. C_{18} -Кетон, триенон (IXa) и другие аналоги ретиналя, в том числе и 4-диметиламинохалкон (XVII), конкурентно ингибируют образование хромопротеида с тетраеналем (IV) (рис. 8).

Сопоставляя конечные спектры на рис. 6, можно предположить, что превращение комплексов в хромопротеиды обратимо, причем равновесие сдвигается в сторону последних как при удлинении полиеновой цепи, так и при введении в нее метильной группы. С увеличением соотношения альдегид — белок конечная амплитуда длинноволновой полосы поглощения достигает предельной величины. Если равновесие комплекс \rightleftharpoons хромопротеид сильно сдвинуто вправо, такое насыщение может быть обусловлено либо тем, что все молекулы белка в мембране превратились в хромопротеид, либо тем, что белок был (или стал) гетерогенным по своим свойствам и только часть его способна аккомодировать данный альдегид. Описанный ниже эксперимент позволил сделать выбор между этими гипотезами для альдегидов (IIa) и (IV).

Когда при концентрации арилполиенового альдегида ниже насыщающей к препарату мембран после достижения равновесия прибавляют ретиналь, в ходе бифазной реакции образуется бактериородопсин. На первой фазе он возникает примерно с такой же скоростью, как с исходными апомембранами. Вторая фаза сопровождается уменьшением полосы поглощения хромопротеида, скорость ее относительно мала и зависит от строения арилполиенового альдегида (рис. 9). Для данного препарата мембран суммарное количество бактериородопсина и хромопротеида в пределе достигает постоянного значения независимо от исходного содержания хромопротеида. Ясно, что быстрая фаза отвечает взаимодействию ретиналя с апобелком, который не превратился в хромопротеид, тогда как на медленной фазе ретиналь вытесняет арилполиеновый альдегид из хромопротеида. Если концентрация арилполиенового альдегида отвечает условиям насыщения, быстрая фаза образования бактериородопсина не наблюдается. Из этих данных следует, что все молекулы белка в мембране, способные превратиться в бактериородопсин, могут одновременно находиться в виде хромопротендов, содержащих остатки альдегидов (IIa) и (IV).

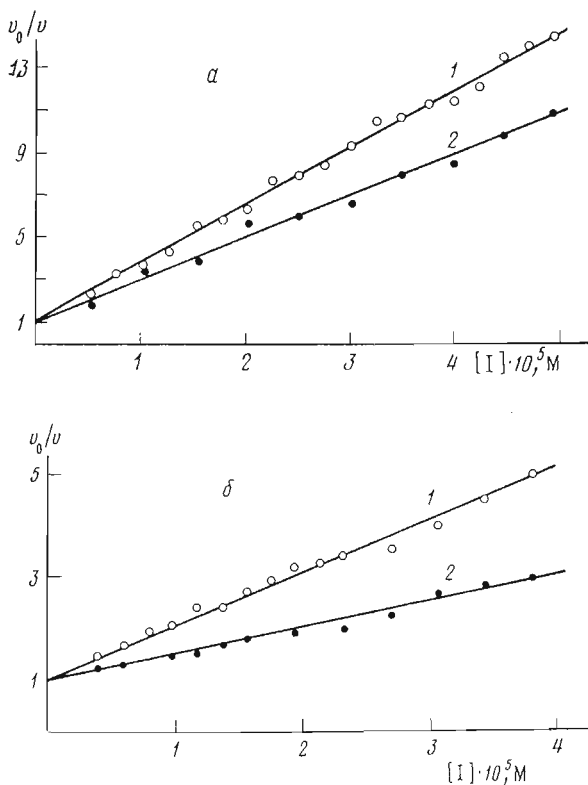


Рис. 4. Конкурентное ингибирование триеноном (IXa) рекомбинации бактериоопсина с 13-Z- (а) и полностью-Е-ретиналом (б) (условия опыта и значения K_m для ретиналей см. в подписи к рис. 3). Концентрация ретинала (M) и вычисленные значения K_i (M) — а: 1 — $1,3 \cdot 10^{-5}$, $1,1 \cdot 10^{-6}$, 2 — $2,5 \cdot 10^{-5}$, $0,9 \cdot 10^{-6}$; б: 1 — $1,3 \cdot 10^{-5}$, $1,8 \cdot 10^{-6}$, 2 — $2,6 \cdot 10^{-5}$, $2,3 \cdot 10^{-6}$

Иная картина наблюдается при взаимодействии бактериоопсина в апомембранах с 4-диметиламинокоричным альдегидом (VI). Здесь с ростом отношения альдегид — белок амплитуда полосы поглощения хромопротеида также достигает предельного значения, однако при этом около $1/3$ молекул белка в мембране, судя по спектру КД, остаются в виде комплекса и способны быстро реагировать с ретиналом, диеналом (IIa) или с тетраеналем (IV), образуя бактериородопсин или соответствующие хромопротеиды. В то же время эти остаточные молекулы бактериоопсина неспособны образовать хромопротеид с 4-метоксикоричным альдегидом (I) даже при очень большом его избытке и после удаления из мембран нековалентно связанного 4-диметиламинокоричного альдегида (VI). Эти данные позволяют прийти к выводу, что предельная степень превращения в данном случае обусловлена не просто положением равновесия $\text{комплекс} \rightleftharpoons \text{хромопротеид}$, а накоплением в мембране невыгодных межбелковых контактов, специфически исключающих полное превращение бактериоопсина в хромопротеид именно с замещенными коричными альдегидами.

Примечательно, что связывание ретинала остаточным бактериоопсином в этих опытах сказывается на свойствах хромопротеидных молекул, способствуя, в частности, росту их коэффициента поглощения (рис. 10). Этот эффект наблюдается сразу после введения ретинала, прежде чем образуется заметное количество бактериородопсина. Отсюда следует, что соответствующие межбелковые взаимодействия проявляются уже на стадии образования нековалентного комплекса ретинала. Подобный вывод подтверждается тем, что аналогичное, хотя и более слабое, увеличение коэффициента поглощения хромопротеида наблюдается при дополнитель-

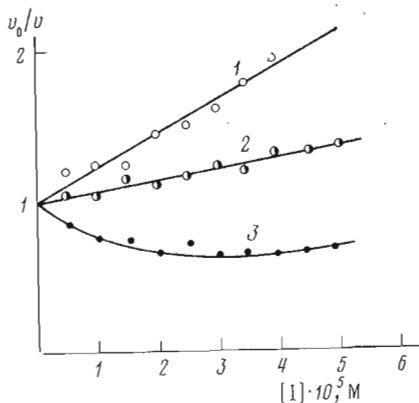


Рис. 5. Влияние 4-диметиламинохалкона (XVII) на рекомбинацию бактериоопсина с тетраеналем (IV) (1), 13-Z-ретиналем (2) и полностью-E-ретиналем (3) (условия опыта см. в подписи к рис. 3)

ном прибавлении к мембранам не ретиналя, а C_{18} -кетона. При связывании остаточным бактериоопсином диеналя (IIa) и тетраеналя (IV) полоса поглощения хромопротеида, исходно присутствующего в мембране, остается неизменной. Эти данные свидетельствуют о существовании различий в конформации белка при связывании ретиналя и арилполиеновых альдегидов.

Описанные явления представляют собой пример взаимодействий в двумерной решетке, образованной плотно упакованными молекулами белка. В пурпурных мембранах повторяющимся элементом решетки являются тримеры бактериородопсина [18]. Этим тримерам свойственна характерная биполярная полоса в спектре КД, форма которой определяется экситонным взаимодействием ретиналевых хромофоров [19]. В спектрах КД мембран, содержащих хромопротеиды с остатками арилполиеналяей, наблюдается нормальная полоса, как у мономеров бактериородопсина или, возможно, у таких тримеров, в которых только одна из молекул содержит связанный ретиналь [19–21]*. Поскольку расположение хромофоров в хромопротеидах неизвестно, эти данные не позволяют судить о том, организованы ли молекулы хромопротеидов в тримеры. Можно, однако, установить, организованы ли в тримеры те молекулы бактериородопсина, которые образуются при добавлении ретиналя к мембранам, содержащим максимальное количество хромопротеида из 4-диметиламинокоричного альдегида. Поскольку в спектрах КД этому бактериородопсину отвечает в основном не биполярная, а нормальная полоса, естественно предположить, что большая часть бактериородопсина либо произвольно распределена среди молекул хромопротеида, либо образует с этими молекулами общие тримеры.

В хромопротеидах, образующихся на втором, медленном этапе взаимодействия арилполиеновых альдегидов с апомембранами, связь альдегида с белком значительно прочнее, чем в нековалентных комплексах. Хотя из таких хромопротеидов альдегиды также вытесняются ретиналем, этот процесс, однако, как уже отмечалось выше, требует большого времени. Заметно возрастает также устойчивость к гидроксиламину и другим нуклеофильным реагентам. После обработки боргидридом натрия (рН 8,5–10) или цианоборгидридом натрия (рН 2) препараты хромопротеидов начинают флуоресцировать, причем по спектрам возбуждения и испускания они становятся практически идентичными арилалкениламинам, полученным восстановлением соответствующих модельных альдиминов (табл. 4). Связь между флуорофором и белком в таких восстановленных препаратах устойчива к органическим растворителям и детергентам. Эти данные

* Исключением является хромопротеид, содержащий остаток, триеналя $n-(CH_3)_2NC_6H_4(CH=CH)_3CHO$, свойства которого будут описаны отдельно. В спектре КД мембран, содержащих этот хромопротеид, как и в спектре пурпурных мембран, присутствует биполярная полоса с нулевой точкой вблизи максимума полосы поглощения (~650 нм).

приводят к выводу, что арилполиеновые альдегиды в хромопротеидах связаны в виде альдиминов, которые при рН 6—7, судя по положению полосы поглощения, несомненно протонированы.

Полоса поглощения хромопротеидов по сравнению с соответствующими протонированными модельными альдимидами характеризуется заметным батохромным сдвигом (см. табл. 3 и 5 и рис. 11), который свидетельствует о специфическом белок-полиеновом взаимодействии. В ряду винилогичных 4-метоксизамещенных альдегидов положение максимума полосы поглощения хромопротеидов линейно зависит от числа сопряженных двойных связей в цепи. Хотя, как будет показано далее, эта зависимость имеет не вполне четкий смысл из-за вероятного различающихся у хромопротеидов равновесного набора спектрально различающихся форм, она все же достаточно убедительно показывает, что с удлинением цепи не происходит никаких качественных изменений в характере полиен-белковых взаимодействий, определяющих положение полосы поглощения. Наиболее вероятное объяснение такого несколько неожиданного результата заключается в том, что эти взаимодействия локализованы вблизи альдиминной группы и потому практически инвариантны к длине цепи.

Как уже отмечалось выше, и ретиналь, и практически все его альдегидные и неальдегидные структурные аналоги образуют с бактериоопсином нековалентные комплексы, которые независимо от длины полиеновой цепи обладают *положительным* круговым дихроизмом в полосе поглощения протетической группы. Иная ситуация имеет место с хромопротеидами, содержащими альдиминны арилполиеновых альдегидов. Те из них, у которых цепь включает четыре или пять двойных связей, характеризуются *положительным* дихроизмом, между тем как обладатели цепи, содержащей одну, две или три двойные связи, проявляют *отрицательный* дихроизм (см. табл. 3 и рис. 12).

Такого рода зависимость может быть следствием многих причин, в частности разной хиральности конформаций протетической группы или различного расположения полиеновой цепи в белковой глобуле. Известно, что по меньшей мере в одной из форм бактериородопсина, возникающих после поглощения светового кванта, ретиналь образует альдимин не с остатком Lys⁴¹, а с другим лизиновым остатком [22]. Поэтому было необходимо проверить, не может ли указанное различие в знаках кругового дихроизма быть обусловлено тем, что «короткие» и «длинные» арилполиеновые альдегиды образуют альдимины с ϵ -аминогруппами разных лизиновых остатков. С этой целью мембраны, в которых с помощью химотрипсина хромопротеиды предварительно были расщеплены на два крупных фрагмента (меньший — остатки 1—71 и больший — остатки 72—248), далее обрабатывали в темноте боргидридом или цианоборгидридом натрия, после чего флуориметрически определяли относительное содержание восстановленных альдиминных остатков в каждом из фрагментов, разделенных электрофорезом в градиентном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ср. [22]).

В ряду винилогов 4-метоксикоричного альдегида доля остатков, связанных с меньшим фрагментом, уменьшается с ростом длины цепи независимо от рН и природы восстановителя (табл. 6). Таким образом, именно в тех хромопротеидах, которые образованы «длинными» альдегидами и подобно бактериородопсину обладают *положительным* дихроизмом, арилалкенильные радикалы после восстановления оказываются расположенными в молекуле белка аномально по сравнению с остатком ретиналя, если принять, что последний в темноте локализован на Lys⁴¹. В отдельных опытах показано, что этот вывод не зависит от предварительной обработки мембран химотрипсином. Дальнейшие эксперименты покажут, отражают ли эти данные реальное соотношение изомерных хромопротеидов, различающихся локализацией альдиминов, или же они в основном определяются разной реакционной способностью равновесных изомеров по отношению

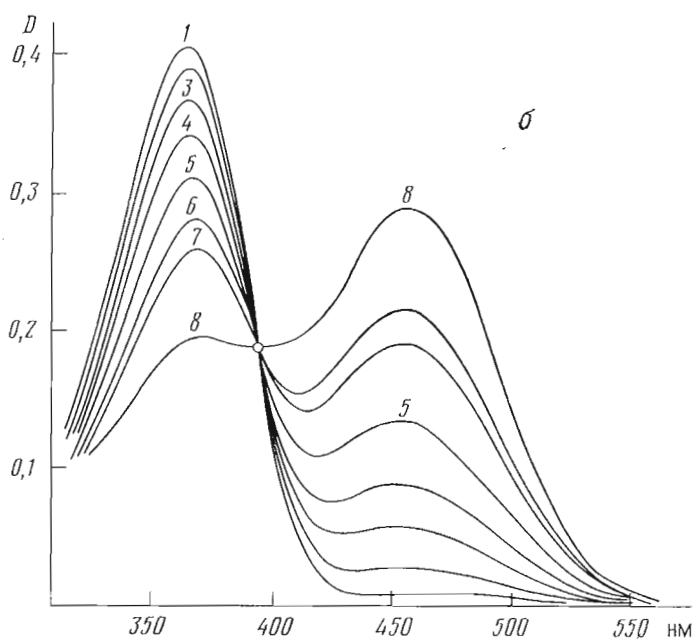
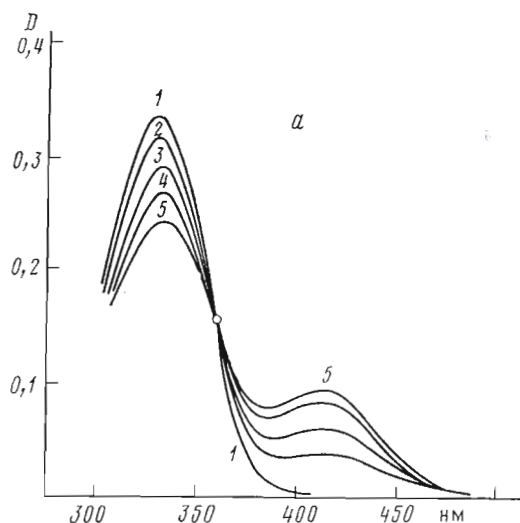


Рис. 6а, б

к гидридным восстановителям. Полученные результаты, однако, с определенностью указывают на присутствие в препаратах разных форм хромопротеидов. Вероятно, именно наличием таких форм, различающихся по поглощению и хиральности, объясняется обычно наблюдаемое расхождение в положении полос в спектрах поглощения и КД (табл. 3), а также большая полуширина этих полос сравнительно с полосами бактериородопсина.

В какой мере хромопротеиды, которые бактериоопсин образует с арилполиеновыми альдегидами, могут рассматриваться как модели бактериородопсина? Ясно, что, упрощая до предела альдегидный остаток, нельзя рассчитывать не только на полное его соответствие белковому окружению, но и на сохранение всех функционально важных контактов, которые обеспечивают протекание отдельных стадий работы белка. Поэтому у таких хромопротеидов можно ожидать заведомо меньшей эффективности исполь-

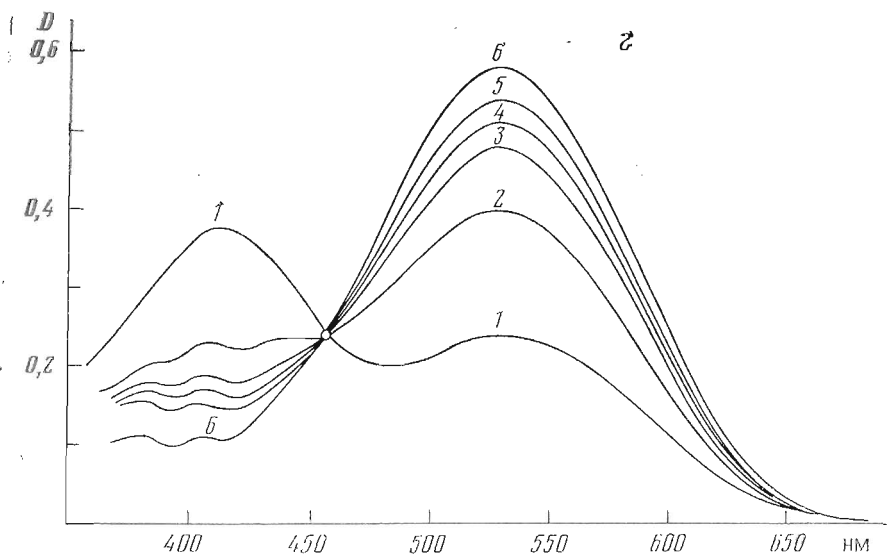
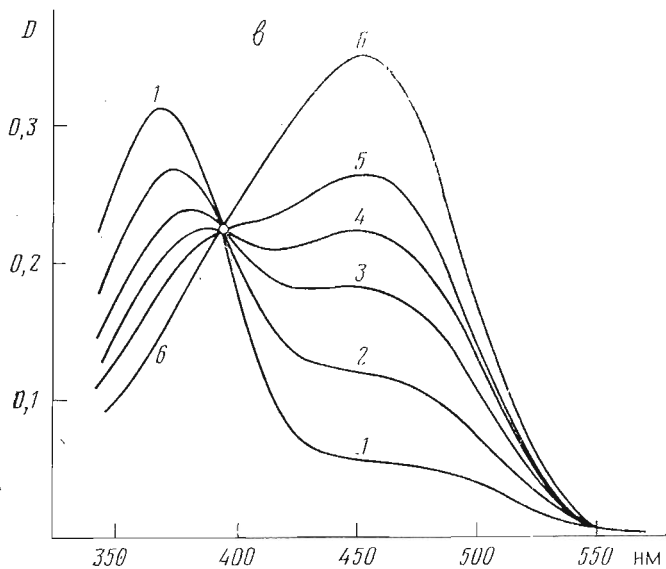


Рис. 6 а, б

Рис. 6. Спектральные изменения при образовании хромопротеидов из бактериоопсина и альдегидов (I) (а), (II) (б), (IIa) (в) и (IV) (г) (условия опыта см. в подписи к рис. 2; 20° С). Кривые 1 получены через 10 с после введения альдегида, кривые 2-5 для б-г соответственно через 5, 15, 30 и 60 мин, а другие кривые через - а: 2 - 30 мин; 3 - 1,5 ч, 4 - 7, 5 - 10 ч; б: 6 - 2 ч, 7 - 3, 8 - 18 ч; в: 6 - 6 ч; г: 6 - 12 ч

зования световой энергии, а какая-то часть свойственных бактериородопсину функций может вообще выпасть. Так, ни у одного из полученных хромопротеидов не удалось наблюдать адаптации к темноте и к свету, проявляющейся у бактериородопсина в 13Z-13E-изомеризации ретиналевого остатка [23-25].

Особенно важно оценить правомерность сопоставления с бактериородопсином тех хромопротеидов, у которых альдегидный остаток локализован иначе, чем остаток ретиналя в нативном белке. Известно, что после

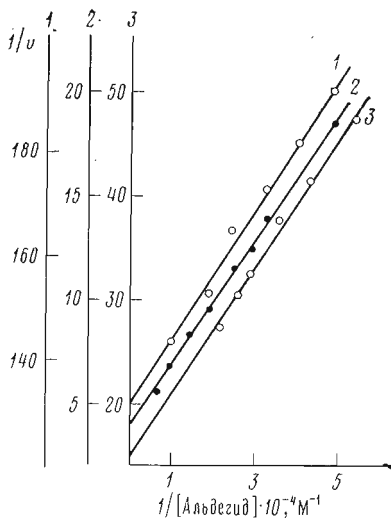


Рис. 7. Применимость уравнения Михаэлиса — Ментен для описания кинетики образования хромопротеидов из бактериоопсина и альдегидов (II) (а), (IIa) (б) и (III) (в) (бактериоопсин в апомембранах $1 \cdot 10^{-5}$ М, 20° С; начальную скорость оценивали спектротометрически в единицах поглощения в минуту при длине волны, отвечающей максимуму полосы поглощения хромопротеида; линейность зависимостей на графиках характеризуется величиной $r^2 \geq 0,99$). Вычисленные значения K_m (М): а — $9,4 \cdot 10^{-6}$, б — $7,7 \cdot 10^{-5}$, в — $4,3 \cdot 10^{-5}$

поглощения светового кванта бактериородопсин проходит через серию метастабильных форм, возвращаясь в конце концов в исходное состояние [26]. Нельзя исключить, что при изменении строения протетической группы одна из этих форм окажется термодинамически наиболее устойчивой, так что соответствующий хромопротеид будет подобен не столько самому бактериородопсину, сколько данной форме его фотохимического цикла. В этой связи было интересно проверить, может ли в полученных хромопротеидах альдегид быть связан с теми же остатками лизина, что и ретиналь в метастабильных формах бактериородопсина. Недавно было показано, что при освещении бактериородопсина ретиналь мигрирует между Lys^{61} и другим лизиновым остатком [22]. В опытах, выполненных совместно с А. Б. Куделивым, Д. И. Баирамашвили и М. Ю. Фейгиной, которые подробно будут описаны отдельно, было предпринято разделение пептидов, полученных расщеплением с помощью бромидана двух белков: бактериородопсина, восстановленного на свету боргидридом натрия, и хромопротеида с остатком тетраенала (IV), восстановленного в темноте цианоборгидридом натрия. В обоих случаях восстановленный альдимин был обнаружен в С-концевом пептиде 240—248. Следовательно, соответствующие альдегиды связаны с Lys^{216} . Эти результаты согласуются с высказанной выше гипотезой и, по-видимому, открывают возможность моделирования метастабильных форм бактериородопсина.

Способность бактериородопсина к фотоиндуцированным превращениям и особенно циклические последних отражают специфику строения активного центра этого белка, и трудно предположить, чтобы появление этих свойств у хромопротеидов, полученных из бактериоопсина, было случайностью, а не результатом деятельности групп, входящих в этот центр. Существенно, что промежуточные формы фотохимического цикла бактериородопсина сами фотоактивны и, поглотив квант света, претерпевают ряд превращений, заканчивающийся образованием исходной, наиболее стабильной формы бактериородопсина [27]. Поэтому можно ожидать, что в случае, когда термодинамически наиболее устойчивой окажется не исходная, а некая промежуточная форма, именно она будет открывать и замыкать фотохимический цикл.

Хромопротеиды, которые образуются из бактериоопсина и арилполиеновых альдегидов, подобно бактериородопсину способны к фотоиндуцированным циклическим превращениям. Наиболее долгоживущие формы, участвующие в этих превращениях, обнаруживаются при освещении препаратов непрерывным светом с длиной волны, отвечающей полосе поглощения хромопротеида. На рис. 13 представлены дифференциальные спек-

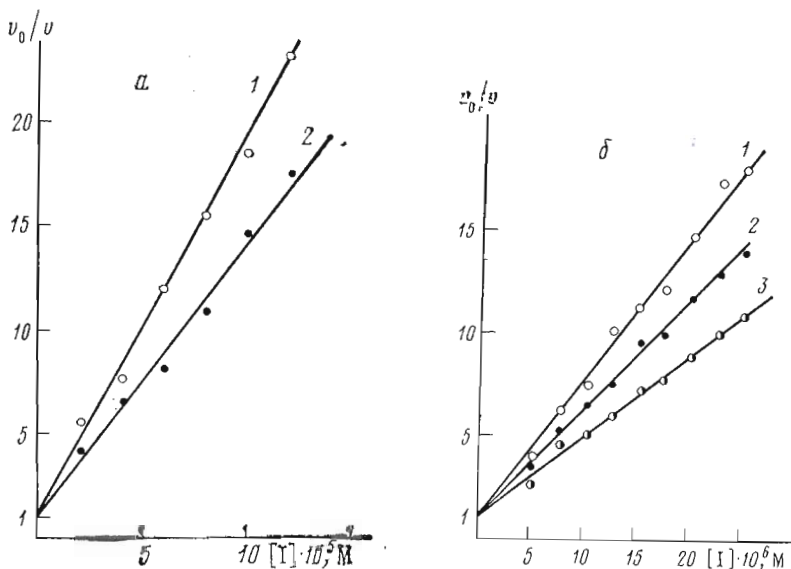


Рис. 8. Конкурентное ингибирование образования хромопротеида из тетраеналя (IV) и бактериоопсина альдегидом (II) (а) и триеноном (IXa) (б) (условия см. в подписи к рис. 3). Концентрация тетраеналя (M) и вычисленные значения K_i (M) — а: 1 — $1,3 \cdot 10^{-5}$, $5,3 \cdot 10^{-7}$, 2 — $3,8 \cdot 10^{-5}$, $3,6 \cdot 10^{-7}$; б: 1 — $1,3 \cdot 10^{-5}$, $3,1 \cdot 10^{-7}$, 2 — $2,6 \cdot 10^{-5}$, $2,4 \cdot 10^{-7}$, 3 — $5 \cdot 10^{-5}$, $1,7 \cdot 10^{-7}$.

тры, отражающие накопление и распад таких форм, которые имеют полюсу поглощения в коротковолновой области спектра. Судя по положению этих полос, коротковолновые формы содержат в качестве хромофора депротонированные альдимины соответствующих альдегидов. Как альтернативу можно было допустить, что гипсохромный сдвиг объясняется фотоиндуцированным гидролизом альдиминной группы [28], однако распад коротковолновых форм с регенерацией исходных хромопротеидов нечувствителен к присутствию C_{18} -кетона (ср. [14, 21, 29]). Кроме того, все эти формы подобно коротковолновым формам самого бактериородопсина [27] сами фотоактивны. Например, если осветить вспышкой синего света коротковолновый фотопродукт, который был предварительно получен из хромопротеида, содержащего остаток тетраеналя (IV), то этот фотопродукт мгновенно превращается в исходный хромопротеид (рис. 13б). Остаточный дифференциальный спектр при этом, как будет показано далее, отвечает фотопревращению так называемой щелочной формы хромопротеида, и его амплитуда практически не зависит от предварительного накопления коротковолнового фотопродукта. Времена жизни коротковолновых фотопродуктов, наблюдавшихся в этих опытах, исчисляются минутами; поэтому при интенсивном освещении их стационарная концентрация достаточно велика, несмотря на малый квантовый выход.

Наряду со столь медленными превращениями хромопротеиды участвуют и в значительно более быстрых фотохимических циклах, также имеющих малые квантовые выходы. Кривые изменения поглощения хромопротеидов в коротковолновой области (рис. 14) свидетельствуют о существовании по меньшей мере двух промежуточных форм с сильно различающимися временами жизни. Соотношение вкладов этих форм заметно зависит от метода приготовления апомембран. Так, если при получении хромопротеидов использовать апомембраны, предварительно экстрагированные петролевым эфиром, возрастает вклад наиболее короткоживущих форм.

Как и у бактериородопсина, фотохимические циклы хромопротеидов включают в себя не только коротковолновые, но и длинноволновые про-

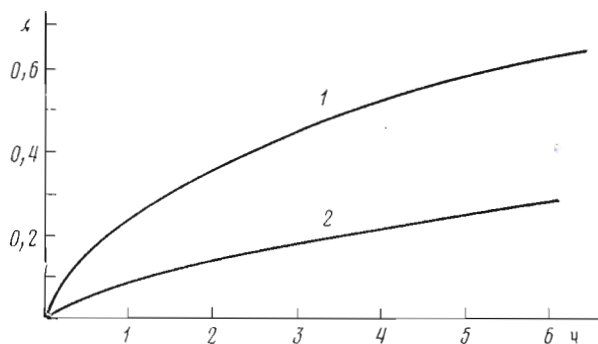


Рис. 9. Вытеснение ретиналом арилполиеновых альдегидов (IIa) (1) и (IV) (2) из хромопротеидов с образованием бактериородопсина (хромопротеиды предварительно получены прибавлением к суспензии апомембран, содержащей $1 \cdot 10^{-5}$ М бактериоопсин, эквимольных количеств альдегидов; после установления равновесия вводили 2 моль ретиналя на 1 моль белка). Изменение поглощения измеряли при 20°C при длинах волн, отвечающих наибольшей разности коэффициентов поглощения хромопротеидов и бактериородопсина (1 — 560 нм, 2 — 576 нм). Величина α представляет собой отношение данного изменения поглощения к предельному

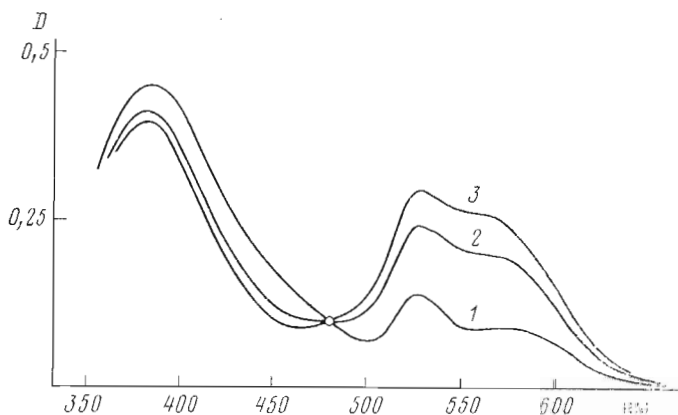


Рис. 10. Дифференциальные спектры, полученные через 1 (1), 10 (2) и 30 мин (3) после прибавления ретиналя (3 моль на 1 моль белка, 20°C) к суспензии мембран, содержащих предельное количество хромопротеида с диметиламинокоричным альдегидом (VI) (к суспензии апомембран, содержащей $1 \cdot 10^{-5}$ М бактериоопсин, трехкратно с пятервалом 5 сут прибавляли по 2 моль альдегида (VI) на 1 моль белка; избыток альдегида затем удаляли на колонке с Bio Beads SM-2 (Bio Rad, США))

межучточные формы (рис. 15). Эти формы в основном возникают в результате вторичных темновых превращений, а не поглощения второго кванта, поскольку их удается наблюдать и при освещении лазерной вспышкой, продолжительность которой значительно меньше времени накопления коротковолновых фотопродуктов. Быстропротекающий фотохимический цикл присущ и хромопротеиду, содержащему остаток диметиламиноричного альдегида (VI), в котором всего одна двойная связь (рис. 16). Таким образом, даже в этом хромопротеиде с предельно простым альдегидным остатком реализуется специфическая для бактериородопсина система полиен-белковых взаимодействий, которая ответственна за фотоиндуцированные циклические превращения.

Естественно предположить, что в хромопротеидах с короткими арилполиеновыми остатками бензольное кольцо не находится в контакте с тем участком белка, который в бактериородопсине связывает триметилциклогексеновый радикал. Если это так, то специфические взаимодействия в этой области не являются необходимым условием фотоактивности хро-

Спектры возбуждения и испускания флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}}$, нм) продуктов восстановления NaBH_4 (рН 10) хромопротеидов* и модельных альдиминнов из арилполиенацев и октадециламина в мицеллах цетилтриметиламмония

Альдегид	Модельный альдимин		Хромопротеид	
	Спектр возбуждения	Спектр испускания	Спектр возбуждения	Спектр испускания
(IIa)	300, 310 (пл.)	350	— **	348
(III)	330, 340	390	335, 350	395
(IV)	335 (пл.), 352, 368	415 (пл.), 445 (пл.), 468	350, 370	445, 470
(V)	355 (пл.), 370, 390	470, 500, 530, 570 (пл.)	365 (пл.), 380, 400	470, 500, 535
(VI)	305	370	— **	370

* Мембраны после восстановления обессоливали на сефадексе G-50 и солибилизировали в растворе 1% додецилсульфата натрия (рН 6).

** Область поглощения остатков триптофана.

Таблица 5

Спектр поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$, нм) арилполиеновых альдегидов и их альдиминнов с октадециламином в мицеллах цетилтриметиламмония

Соединение	Альдегид	Альдимин	Протонированный альдимин
(I)	324	303, 312 (пл.)	366
(II)	356	339	403
(IIa)	359	337	406
(III)	383	358, 370 (пл.)	431
(IV)	408	369 (пл.), 379, 396 (пл.)	462
(V)	428	380 (пл.), 400, 421	481
(VI)	390	364	464

Таблица 6

Относительная флуоресценция зоны, содержащей малый пептид, при электрофорезе хромопротеидов, предварительно расщепленных химотрипсином, а затем восстановленных в темноте

Альдегид в хромопротеиде	$\lambda_{\text{возб}}$, нм	$\lambda_{\text{регистр}}$, нм	Флуоресценция, % от суммарной для обеих зон	
			NaBH_3CN , рН 2,5	NaBH_4 , рН 10
(II)	310	> 360	87	72
(IIa)	310	> 360	~100	81
(III)	330	> 390	54	24
(IV)	370	> 460	22	17
(V)	380	> 460	5	12
(VI)	310	> 360	30	56

мопротеида. Интересно, что при взаимодействии с бактериоопсином такого укороченного аналога ретиналя, как C_{15} -альдегид, процесс останавливается на стадии образования нековалентного комплекса. Это происходит, по-видимому, из-за того, что прочное связывание циклической части молекулы не позволяет альдегидной группе «дотянуться» до соответствующей аминогруппы.

Одно из наиболее примечательных свойств бактериородопсина — исключительно высокое значение pK_a альдиминной группы [30]. Функциональный смысл этого точно не известен, однако вполне естественно допустить, что именно значительные изменения pK альдимина ретиналя служат движущей силой индуцированного светом транспорта протонов.

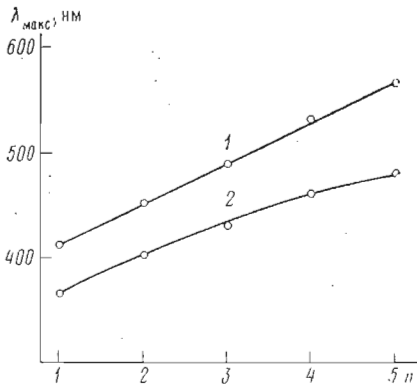


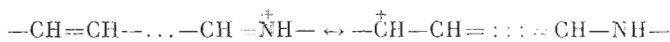
Рис. 11. Зависимость положения максимума полосы поглощения от числа двойных связей в цепи (n) для хромопротеидов из бактериородопсина и альдегидов (I)–(V) (l , $\lambda_{\text{макс}} = 374 + 38,8n$ нм, $\sigma = 1,48$, $r^2 = 0,9994$) и для протонированных альдиминов, образованных этими альдегидами в модельной мицеллярной системе (2, $\lambda_{\text{макс}} = 325,4 + 43,04n - 2,36n^2$ нм, $\sigma = 1,68$). Аппроксимирующие уравнения получены методом наименьших квадратов

Спектрофотометрические данные показывают, что pK_a альдиминных групп в хромопротеидах с арилполиеновыми остатками существенно ниже, чем в бактериородопсине. Дифференциальные спектры рис. 17а отражают результаты щелочного титрования хромопротеида, содержащего остаток триеналя (III). Положительная полоса на этих спектрах, судя по ее положению, может принадлежать либо депротонированному альдимину, либо альдегиду, связанному с белком в нековалентный комплекс. Первое из этих предположений подтверждается тем, что спектры исчезают сразу после нейтрализации предварительно подщелоченных препаратов и этот эффект не блокируется S_{18} -кетонем. Кроме того, «щелочная» форма хромопротеида фотохимически активна. Если вспышкой синего света осветить препарат хромопротеида при pH 6, когда содержание «щелочной» формы уже достаточно велико, она превращается в фотопродукт, полоса поглощения которого расположена в длинноволновой области спектра. Этот фотопродукт далее трансформируется в исходный хромопротеид с образованием по меньшей мере одного промежуточного продукта (см. рис. 13а).

Хромопротеид, содержащий остаток триеналя (III), удастся превратить в «щелочную» форму практически полностью. Иначе обстоит дело с хромопротеидами, включающими в себя остатки татрасналя (IV) и пентаеналя (V). Степень их превращения (α) в «щелочную» форму оценивалась по отношению амплитуды отрицательной полосы в дифференциальном спектре к начальному поглощению хромопротеида при длине волны, отвечающей максимуму этой полосы. Из кривых титрования (рис. 18) следует, что в равновесии протонирования здесь участвует лишь около половины всех молекул хромопротеидов (ср. [21]). Причина такого рода гетерогенности пока неизвестна.

Таким образом, расположение арилполиеновых остатков в хромопротеидах (или, учитывая их гетерогенность, по меньшей мере в некоторых формах этих хромопротеидов) исключает эффективное взаимодействие этих остатков с теми функциональными группами белка, которые ответственны за высокую основность альдиминной группы в бактериородопсине. Здесь существенно, что высокое значение pK_a альдимина, по-видимому, не является необходимым условием возникновения у хромопротеида способности вступать в фотохимический цикл.

Наиболее вероятным типом полнеи-белкового взаимодействия, приводящего к росту pK_a , является смещение электронной плотности в цепи сопряжения протонированного альдимина, которое обусловлено близкой расположенной отрицательно заряженной группой и в пределе приводит к возникновению карбониевого центра (ср. [11, 23]):



Можно ожидать, что аналогичное смещение должно иметь место в альдимидах 4-диметиламинокоричного альдегида благодаря возможности пере-

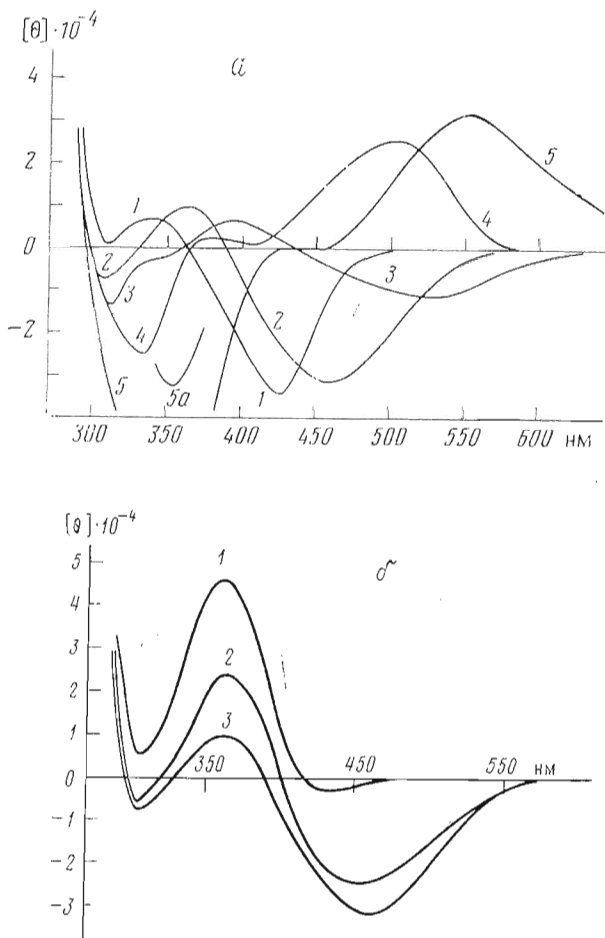
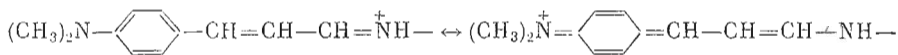


Рис. 12. Спектры КД хромопротеидов, образуемых бактериоопсином с арилполиеновыми альдегидами (I) (1), (II) (2), (III) (3), (IV) (4), (V) (5): а — спектры, полученные по достижении равновесия (кривая 5а отвечает $[\theta]/2$); б — изменения спектра при образовании хромопротеида с альдегидом (III) через 1 мин (1), 2 ч (2), 24 ч (3) (условия см. в подписи к рис. 1)

менения заряда на диметиламиногруппу:



Действительно, по сравнению с хромопротеидами, содержащими в альдегидном остатке 4-метоксизамещенное бензольное кольцо, хромопротеид из 4-диметиламинокоричного альдегида имеет значительно более основную альдиминную группу. С ростом pH у этого хромопротеида наблюдается относительно небольшой гипсохромный сдвиг полосы поглощения, которая остается в диапазоне длин волн, характерном для протонированных альдиминов 4-диметиламинокоричного альдегида (рис. 19). Этот спектральный переход напоминает свойственное бактериородопсину pH-зависимое равновесное превращение в форму, имеющую полосу поглощения вблизи 500 нм (см., например, [21]).

К сожалению, пока не удалось однозначно показать, способны ли полученные хромопротеиды подобно бактериородопсину функционировать в мембране в качестве протонного насоса. Основная трудность здесь состоит в том, что, с одной стороны, очень мал квантовый выход фотоиндуциро-

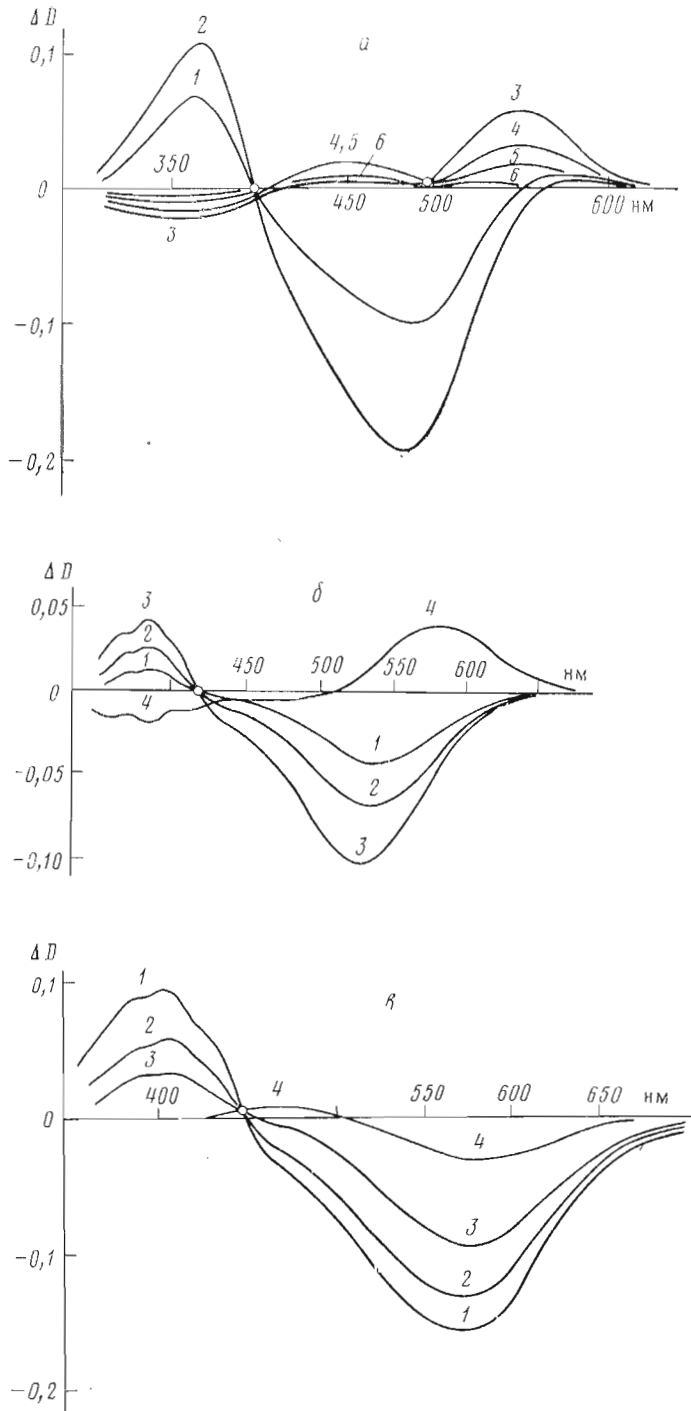


Рис. 13. Дифференциальные спектры, отражающие превращения, хромопротеидов при непрерывном освещении (светофильтры ЖС-12+ЖС-17; первые спектры снимали через 15–20 с после окончания освещения). Указаны альдегид, образующий хромопротеид с бактериоопсином; исходное поглощение суспензии мембран и продолжительность освещения: *а* [(III), 0,87 при 490 нм] – 1 – 1 с, 2 – 30 с, 3 – после 30 с освещения дополнительная вспышка импульсной лампы (светофильтр ФС-7) 4, 5 и 6 – спустя соответственно 2, 5 и 15 мин после вспышки; [(IV), 0,55 при 530 нм] – 1 – 1 с, 2 – 3 с, 3 – 25 с, 4 – вспышка (см *а*) без предварительного непрерывного освещения; *в* [(V), 0,58 при 567 нм] – 1 – 20 с, 2, 3 и 4 – спустя соответственно 10, 40 и 180 мин после освещения

ванных превращений, а с другой — крайне сложно получить мембраны, полностью лишенные активных молекул бактериородопсина, деятельность которых создает мешающий фон.

В данной работе в качестве теста на транспортную активность использовались измерения фотопотенциала, генерируемого при импульсном освещении мембран, связанных на поверхности пропитанных раствором фосфолипидов пористых пленок [31, 32]. Этот метод был избран потому, что он позволял надеяться различить хромопротенды и остаточный бактериородопсин по временным характеристикам отдельных стадий переноса заряда. Проведенные опыты не привели к обнаружению каких-либо фотоэлектрических ответов с хромопротендами, содержащими остатки 4-диметиламинокоричного альдегида (VI), триеналя (III) и пентаеналя (V). В случае тетраеналя (IV) в отдельных экспериментах удавалось регистрировать крайне слабые ответы, несколько отличные по кинетике от ответов бактериородопсина.

Ясно, что, меняя структуру простетической группы, можно значительно уменьшить и даже исключить вероятность того, что белок после поглощения светового кванта претерпит цикл превращений. Возникает вопрос: какова в этом случае судьба энергии, поглощенной хромофором, и не может ли существовать какая-либо иная форма ее переноса на белок, кроме тепловых колебаний? Некоторые данные об этом были получены при изучении нековалентных комплексов. При длительном освещении синим светом (стеклянные светофильтры СС-4 и СС-5 толщиной по 5 мм) комплекса бактериоопсина с C_{18} -кетонам независимо от присутствия кислорода в системе происходит, с одной стороны, исчезновение полосы поглощения в видимой области, а с другой — частичная потеря бактериоопсином его способности рекомбинировать с ретиналом в бактериородопсин. Повторяя с одним препаратом мембран эту процедуру несколько раз, можно инактивировать в нем бактериоопсин полностью. Эта инактивация не связана с прямым действием света на белок, поскольку в отсутствие C_{18} -кетона она в аналогичных условиях не имеет места. Сходные результаты были получены и с другими структурными аналогами ретиналя, образующими с бактериоопсином прочные нековалентные комплексы, в частности с триеноном (IXa). Напротив, эфир (XIV), практически не взаимодействующий с бактериоопсином, не вызывает фотонинактивацию этого белка. Нам не удалось выявить изменений в спектрах поглощения и КД бактериоопсина, которые бы указывали на повреждение белка. Однако по мере фотонинактивации в препарате уменьшается по сравнению с исходным бактериоопсином флуоресценция триптофановых остатков, достигая в пределе значений, характерных для комплекса бактериоопсина с C_{18} -кетонам. Можно поэтому предположить, что фотонинактивация обусловлена сшивкой продукта фотоллиза C_{18} -кетона с какой-то точкой его белкового окружения. Это предположение проверяется в настоящее время.

В заключение следует отметить, что хромопротенды из бактериоопсина и арилполиеновых альдегидов отличаются от бактериородопсина по ряду свойств: расположению простетической группы в молекуле и взаимному положению хромофоров в мембране, основности альдиминной группы и т. п. Вместе с тем в них сохраняется важнейшая особенность бактериородопсина — его способность к фотониндуцированным циклическим превращениям. Это позволяет считать полученные хромопротенды перспективными моделями бактериородопсина, которые можно использовать для изучения наиболее общих черт строения и функционирования его активного центра.

Авторы искренне благодарны Л. А. Драчеву, А. Д. Каулену, Л. В. Хитриной (МГУ) и Е. И. Мельнику (ИБХ АН СССР, Москва) за помощь при изучении быстропотекающих фотопревращений и фотоэлектрических ответов хромопротендов.

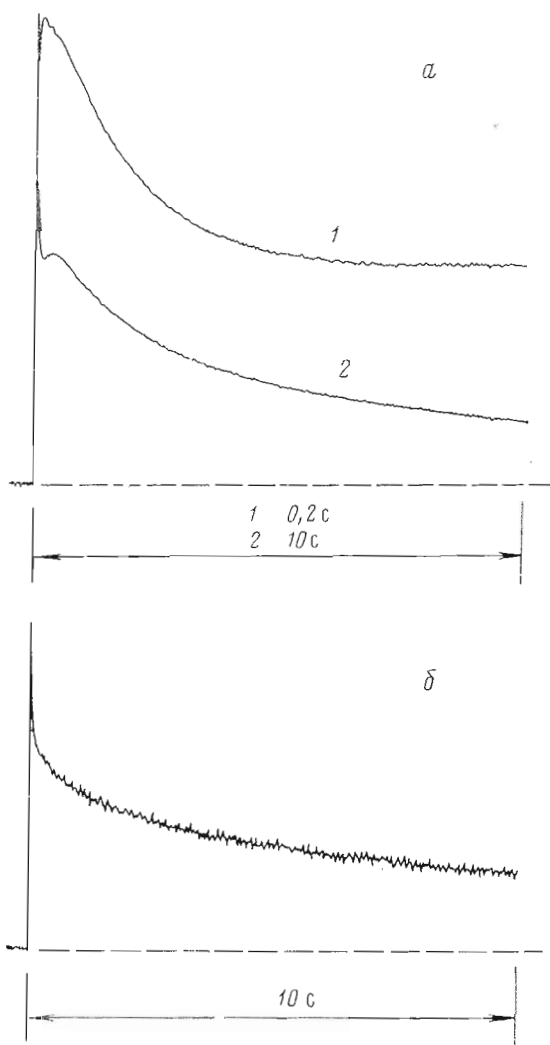


Рис. 14. Быстрые изменения поглощения хромопротеидов из бактериоопсина и альдегидов (IV) (а) и (V) (б) в коротковолновой области спектра после освещения импульсной лампой (светофильтр ЖС-17). Амплитуда изменений составляет 0,5–2% исходного поглощения суспензии мембран при длине волны, отвечающей максимуму полосы поглощения. Длина волны зондирующего луча: а – 410 нм, б – 420 нм

Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны выделяли из клеток *Halobacterium halobium* R1 по методике, описанной в работе [1], и превращали в апомембраны фотоиндуцированным гидроксиламинолизом (0,5 М NH_2OH , pH $9,0 \pm 0,2$; 20–25° С; ср. [6]). Апомембраны, обессоленные гель-фильтрацией на сефадексе С-50 (крупный), лиофильно высушивали, а затем многократно промывали петролейным эфиром до полного удаления оксима ретиналя [7]. Препарат освобождали от петролейного эфира высушиванием при 0,03 мм рт.ст., а затем суспендировали в воде и диспергировали 1–2 мин ультразвуком при 4–5° С (генератор с погружным облучателем MSE (Англия)). Содержание бактериоопсина в препаратах апомембран определяли спектрофотометрически после его превращения в бактериородопсин, как в работе [14]. В отдельных опытах для уменьшения содержания бактериородопсина суспензию экстрагированных апомембран, содержащую 0,1 М

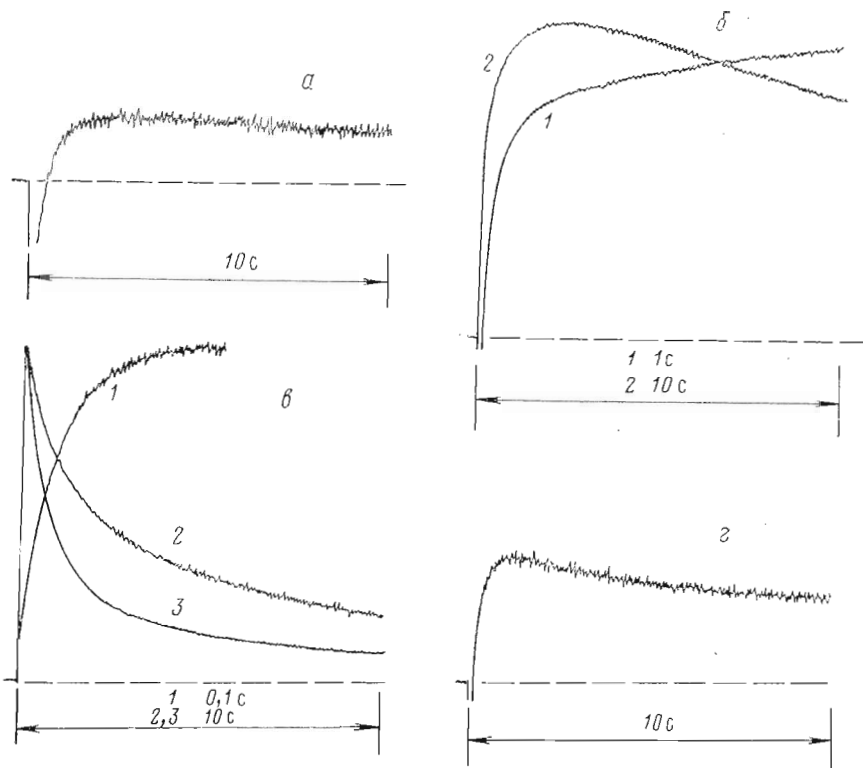


Рис. 15. Быстрые изменения поглощения хромопротеидов из бактериоопсины и альдегидов (II) (а), (III) (б), (IV) (в) и (V) (г) в длинноволновой области спектра после освещения импульсной лампой (ИФК) или лазером (Nd). Указан способ освещения и длина волны зондирующего луча: а - ИФК (светофильтр СС-4), 525 нм; б - ИФК (светофильтр ЖС-16), 550 нм; в - ИФК (светофильтр ЖС-18), 600 нм; г - ИФК (светофильтр ЖС-18), 590 нм

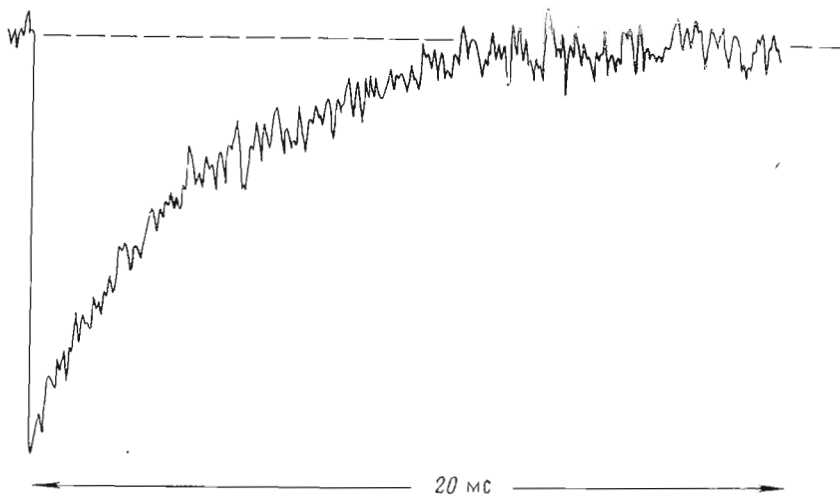


Рис. 16. Изменения поглощения при 490 нм после освещения лазером хромопротеида из бактериоопсины и альдегида (VI) (амплитуда изменений составляет около 0,1% от исходного поглощения)

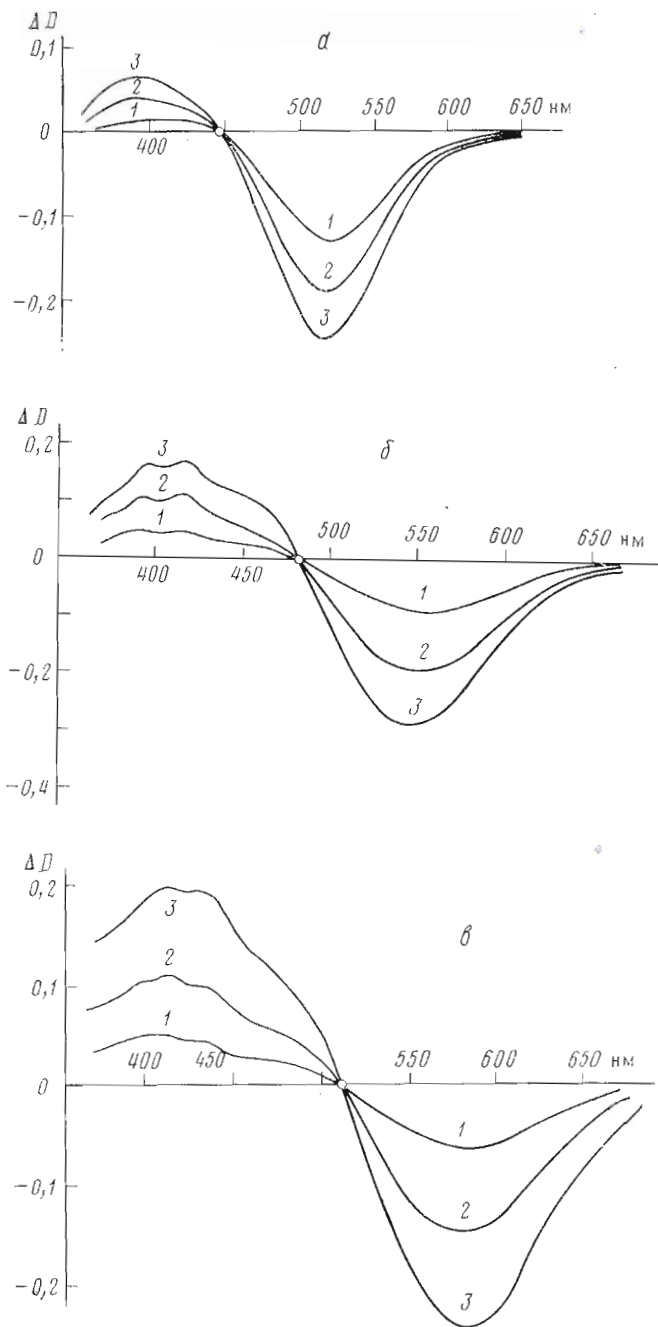


Рис. 17. Дифференциальные спектры, отражающие превращения в щелочной среде (0,01 М фосфат-цитратный буфер, 20° С) хромопротеинов из бактериоопсина и альдегидов (III) (а), (IV) (б) и (V) (в); приведены значения pH препарата в основном луче и (в скобках) поглощение и pH препарата в луче сравнения: а - 1 - 6,5, 2 - 7,0, 3 - 7,5 (0,6 при 495 нм, 5,5); б - 1 - 7,5, 2 - 9,0, 3 - 11,5 (0,46 при 520 нм, 6,0); в - 1 - 6,5, 2 - 7,5, 3 - 11,5 (0,48 при 567 нм, 5,5)

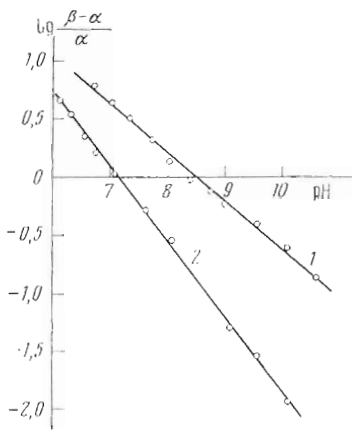


Рис. 18

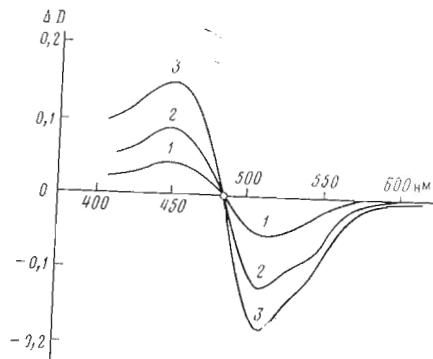


Рис. 19

Рис. 18. Кривые спектрофотометрического титрования хромопротенидов из бактериоопсина и альдегидов (IV) (1, 550 нм) и (V) (2, 585 нм) в условиях, описанных в подпункте к рис. 17; предельные степени превращения β и наклоны прямых ($r^2 \geq 0,99$) составляли: 1 — 0,57 и $-0,42$; 2 — 0,54 и $-0,34$

Рис. 19. Дифференциальные спектры, отражающие превращения хромопротенида из бактериоопсина и альдегида (VI) в щелочной среде ($3 \cdot 10^{-2}$ M фосфат-боратный буфер, исходное поглощение суспензии мембран 0,7 при 506 нм, pH образца в луче сравнения 7,0): 1 — pH 8,0, 2 — pH 9,0, 3 — pH 10,5

фосфатный буфер (pH 8,5), освещали 4–5 ч, периодически добавляя небольшие количества боргидрида натрия, а затем подвергали гель-фильтрации для удаления солей.

Препараты октадециламина (Chemapol, ЧССР), бромиды цетиатриметиламмония (Serva, ФРГ) и морфолиноэтансульфокислоты (Serva, ФРГ) использовали без дополнительной очистки. Для приготовления растворов применяли дважды дистиллированную воду и соли марки ч.д.а. или х.ч. Во всех опытах, если нет других указаний, суспензии мембран содержали 0,01 M морфолиноэтансульфонат натрия (pH 6,0).

Препараты C_{15} -альдегида, C_{18} -кетона, 13-Z- и полностью-E-ретинала получены от Б. И. Мицнера (МИТХТ им. М. В. Ломоносова). С. М. Маккин и Г. А. Ермакова (МИТХТ им. М. В. Ломоносова) любезно предоставили синтезированные ими *n*-метоксизамещенные фенилполиеновые альдегиды и сложные эфиры. Все эти соединения дополнительно очищали на силикагеле ТСХ (пластинки «Eastman 6060», США; размер частиц 5 мкм, элюент — смесь эфира и гексана) или высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) (колонка Zorbax Sil, $4,6 \times 250$ мм, элюент — смесь эфира и гексана). Пентаеналь (V), который образуется как побочный продукт при синтезе триенала (III), выделили из препарата последнего в количестве $\sim 0,4$ мг (1,5%). Этот пентаеналь и полученный из него O-метил-оксим ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{EtOH}}$ 375 (пл.), 392, 414 нм) охарактеризовали высокоразрешающей масс-спектрометрией (альдегид: найдено M^{+} 266,1294, вычислено для $C_{18}H_{18}O_2$ M^{+} 266,1307; оксим: найдено M^{+} 295,1554, вычислено для $C_{19}H_{24}O_2N$ M^{+} 295,1572; точность определения 10 м.д.). Положение максимума полосы поглощения пентаенала (V) совпадает со значением, которое предсказывается корреляционным уравнением, полученным для низших винилогов (см. кривую 1 на рис. 20). Аналогичную корреляционную зависимость, имеющую линейный характер (см. кривую 2 на рис. 20), использовали для вычисления молекулярного коэффициента поглощения пентаенала ($6,8 \cdot 10^4$ M $^{-1}$ см $^{-1}$).

Ненасыщенные кетоны, приведенные в табл. 2, получали конденсацией альдегидов с ацетоном или другими метилкетонами в присутствии следов щелочи. Полученные соединения очищали двукратной перекристаллизацией

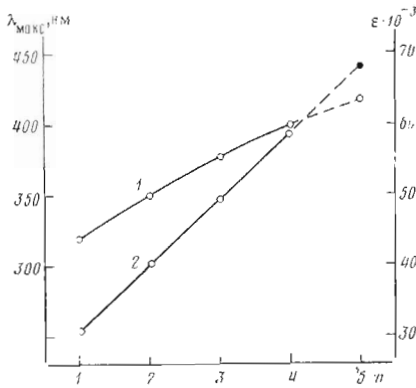


Рис. 20. Зависимости положения максимума полосы поглощения и отвечающего ей молярного коэффициента поглощения от числа двойных связей (n) в полиеновой цепи альдегидов (I)–(V). Кривые построены методом наименьших квадратов для этанольных растворов при $1 \leq n \leq 4$. 1 – $\lambda_{\text{макс}} = 283,25 + 37,75n - 2,25n^2$ нм ($\sigma = 2$ нм; для $n=5$ получено экстраполяцией 416 нм, найдено 418 нм), 2 – $\epsilon = (21,65 + 9,27n) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($\sigma = 0,7$; для $n=5$ получено экстраполяцией $\epsilon = 68,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

цией из метанола, а в некоторых случаях дополнительно с помощью ТСХ или ВЭЖХ. Их строение подтверждено масс-спектрометрически, а чистота проверена ВЭЖХ. Как ретиналь, так и его аналоги использовались в виде растворов в диоксане, свежеперегнанном над LiAlH_4 , причем после их введения в суспензии мембран концентрация диоксана не превышала 1,5%.

В работе использовались спектрофотометр «Gilford 2400» (Франция), дихрограф «Mark-3» (Jobin Ivon, Франция), микрофлуориметр для сканирования фореграмм (Opton, ФРГ), автотитратор ТТТ-2/ABU-13/ТТА-31 (Radiometer, Дания) и масс-спектрометр «Varian CH-5» (ФРГ). Измерения фотопотенциалов и изменений поглощения, возникающих после импульсного освещения (лазер ЛТИПЧ-7, 20 нс, 530 нм; лампа ИФК-120, ~0,5 мс в комбинации со стеклянными фильтрами), выполнены на установках, созданных в межфакультетской лаборатории им. А. Н. Белозерского (МГУ им. М. В. Ломоносова) и описанных в работах [31, 32].

Для освещения препаратов использовали ртутную лампу высокого давления ДРШ-500М, снабженную фокусирующей системой и тепловым фильтром (10 см 5% раствора CuSO_4). При получении апомембран использовали стеклянный фильтр ЖС-16 (5 мм); для других опытов тип использованного фильтра указан в подписях к рисункам. Импульсное освещение, применявшееся в некоторых опытах, осуществляли лампой ИФК-120 (2–3 мс) в комбинации с соответствующими стеклянными фильтрами (5 мм).

Определение значений K_m при рекомбинации с бактериоопсином ретиналя и арилполиеновых альдегидов, а также значений K_i для различных аналогов ретиналя выполняли методами, описанными в работе [14]. Ошибка значений K_m и K_i в пределах 10–50%.

Спектры альдиминов, образуемых арилполиеновыми альдегидами и октадециламином, измеряли в условиях, когда последний был включен в мицеллы цетилтриметиламмония согласно методике, описанной в работе [30]. Раствор, содержащий 1% бромид цетилтриметиламмония, 10^{-3} М октадециламин и $2 \cdot 10^{-5}$ М альдегид, подщелачивали до pH 11 (20°С) и выдерживали до завершения образования альдимина. После съемки спектра последнего раствор быстро подкисляли до pH 3 и сразу после этого снимали спектр протонированного альдимина.

При определении локализации альдиминов мембраны, содержащие хромопротеиды, обрабатывали химотрипсином (1 моль на 10 моль белка, 37°С, 24 ч, 20 мМ трис-НСl-буфер, pH 8,3). После протеолиза и восстановления альдимина мембраны солюбилизировали в растворе 1% додецилсульфата натрия и пептиды разделяли электрофорезом на градиентных полиакриламидных пластинках РАА 4/30 (Pharmacia, Швеция) в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*.—Nature New Biol., 1974, v. 233, № 39, p. 149–152.
2. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview.—FEBS Lett., 1979, v. 100, № 2, p. 219–224.
3. 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.
4. Blaurock A., Stoeckenius W. Structure of the purple membrane.—Nature New Biol., 1974, v. 233, № 39, p. 152–155.
5. Henderson R. The structure of the purple membrane from *Halobacterium halobium*: analysis of the X-ray diffraction pattern.—J. Mol. Biol., 1975, v. 93, № 2, p. 123–138.
6. Oesterhelt D., Schuhmann L., Gruber H. Light-dependent reaction of bacteriorhodopsin with hydroxylamine in cell suspensions of *Halobacterium halobium*: demonstration of an apo-membrane.—FEBS Lett., 1974, v. 44, № 3, p. 257–261.
7. Tokunaga F., Ebrey Th. The blue membrane: the 3-dehydroretinal based artificial pigment of the purple membrane.—Biochemistry, 1978, v. 17, № 10, p. 1915–1922.
8. 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.
9. Oesterhelt D., Schuhmann L. Reconstitution of bacteriorhodopsin.—FEBS Lett., 1974, v. 44, № 3, p. 262–265.
10. Mareus M. A., Lewis A., Racker E., Crespi H. Physiological and structural investigations of bacteriorhodopsin analogs.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 78, № 2, p. 669–675.
11. Nakanishi K., Balogh-Nair V., Arnaboldi M., Tsujimoto K., Honig B. An external point-charge model for bacteriorhodopsin to account for its purple color.—J. Amer. Chem. Soc., 1980, v. 102, № 27, p. 7945–7947.
12. Motto M. G., Sheves M., Tsujimoto K., Balogh-Nair V., Nakanishi K. Opsin shifts in bovine rhodopsin and bacteriorhodopsin. Comparison of two external point-charge models.—J. Amer. Chem. Soc., 1980, v. 102, № 27, p. 4947–4949.
13. Balogh-Nair V., Carriker J. D., Honig B., Kamat V., Motto M. G., Nakanishi K., Sen R., Sheves M., Tanis M. A., Tsujimoto K. The «opsin shift» in bacteriorhodopsin: studies with artificial bacteriorhodopsins.—Photochem. and Photobiol., 1980, in press.
14. Ovchinnikov Yu. A., Shkrob A. M., Rodionov A. V., Mitzner B. I. An effective competitive inhibitor of bacteriorhodopsin — retinal recombination.—FEBS Lett., 1979, v. 97, № 1, p. 15–19.
15. Schreckenbach T., Walckhoff B., Oesterhelt D. Studies on the retinal-protein interaction in bacteriorhodopsin.—Eur. J. Biochem., 1977, v. 76, № 2, p. 499–511.
16. Schreckenbach T., Walckhoff B., Oesterhelt D. Properties of the retinal binding site in bacteriorhodopsin: use of retinyl and retinyl moieties as fluorescent probes.—Photochem. and Photobiol., 1978, v. 28, № 2, p. 205–211.
17. Алдашев А. А., Родионов А. В., Ефремов Е. С., Шкроб А. М. Изучение комплекса бактериородопсин — Ag⁺ — ДМХ в апомембранах *Halobacterium halobium*.—Тез. докл. на III СССР — ФРГ симпозиуме по химии пептидов и белков, Махачкала, 2 – 6 окт. 1980 г. М.: Наука, 1980, с. 34.
18. Henderson R., Unwin P. N. T. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy.—Nature, 1975, v. 257, № 5521, p. 28–32.
19. Heyn M. P., Bauer P.-J., Dencher N. A. A natural CD label to probe the structure of the purple membrane from *Halobacterium halobium* by means of exciton coupling effects.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1975, v. 67, № 3, p. 897–903.
20. Rehorek M., Heyn M. P. Binding of all-trans-retinal to the purple membrane. Evidence for cooperativity and determination of the extinction coefficient.—Biochemistry, 1979, v. 18, № 22, p. 4977–4983.
21. Овчинников Ю. А., Шкроб А. М., Родионов А. В. Спектральный переход бактериородопсина как индикатор его состояния в пурпурных мембранах.—Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1483–1504.
22. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Цетлин В. П., Киселев А. В., Закис В. И. Миграция альдиминной связи в процессе фотохимического цикла бактериородопсина.—Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1427–1429.
23. Oesterhelt D., Meentzen M., Schuhmann L. Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophores.—Eur. J. Biochem., 1973, v. 40, № 2, p. 453–463.
24. Pettei M. J., Yudd A. P., Nakanishi K., Henselman R., Stoeckenius W. Identification of retinal isomers isolated from bacteriorhodopsin.—Biochemistry, 1977, v. 16, № 9, p. 1955–1959.
25. Ohno K., Takeuchi Y., Yoshida M. Effect of light-adaptation on the photoreaction of bacteriorhodopsin from *Halobacterium halobium*.—Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 462, № 3, p. 575–582.

26. *Lozier R. H., Bogomolni R. A., Stoerkenius W.* Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*.—*Biophys. J.*, 1975, v. 15, № 9, p. 955–962.
27. *Литвин Ф. Ф., Балашов С. П.* Новые интермедиаты в фотохимических превращениях бактериородопсина.—*Биофизика*, 1977, т. 22, № 6, с. 1114–1114.
28. *Шкроб А. М., Родионов А. В., Овчинников Ю. А.* Обратимый фотоиндуцированный гидролиз альдимида ретиналя в солюбилизованном бактериородопсине.—*Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 3, с. 354–359.
29. *Родионов А. В., Шкроб А. М.* Гидролиз альдимида ретиналя в бактериородопсине, индуцированный ионами серебра.—*Биоорган. химия*, 1979, т. 5, № 3, с. 376–394.
30. *Шкроб А. М., Родионов А. В.* Щелочная денатурация бактериородопсина в пурпурных мембранах.—*Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 3, с. 360–368.
31. *Барский Е. Л., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Кондрашин А. А., Либерман Е. А., Осроулов С. А., Сахуилов В. Д., Семенов А. Ю., Скулачев В. П., Ясайтис А. А.* Прямые измерения генерации электрического тока липопротеидными комплексами.—*Биоорган. химия*, 1975, т. 1, № 1, с. 113–126.
32. *Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П.* Временные характеристики бактериородопсина как молекулярного биологического генератора тока.—*Молекулярн. биология*, 1977, т. 11, № 6, с. 1377–1387.

Поступила в редакцию
20.III.1981

AROMATIC ANALOGS OF BACTERIORHODOPSIN

SHKROB A. M., RODIONOV A. V., OVCHINNIKOV Yu. A.

*M. M. Shemya'vin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Bacterioopsin forms with the arylpolyene aldehydes of the type $X-C_6H_4-(CH=CH)_n-CHO$ ($n=1-5$; $X=Me$ or Me_2N) non-covalent complexes which convert spontaneously into chromoproteins, wherein aldehydes give protonated Schiff bases with the lysine ϵ -amino groups. These chromoproteins undergo cyclic phototransformations, similarly to bacteriorhodopsin, but have no observable proton-pumping activity. The aldimine groupings in the chromoproteins are less basic than that of bacteriorhodopsin and can be located not only at Lys⁴¹ but also at another lysine residue. pH-Dependent transitions of the bacteriorhodopsin analogs were studied in the dark conditions. Non-covalent complexes of bacterioopsin with arylpolyene aldehydes or non-aldehydes were compared and prolonged irradiation of the latter was found to degrade the chromophore and abolish the bacterioopsin capacity to bind retinal and regenerate bacteriorhodopsin. Structural requirements for the efficient bacterioopsin complexation of retinal analogs, a possible mechanism for the photoinactivation, and the perspectives for the chromoprotein usage as models for bacteriorhodopsin or its photointermediates are discussed.