



УДК 547.388'963.4.057

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА РЕТИНИЛИДЕНПЕПТИДОВ,  
СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТОК АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ*Карнаухова Е. Н., Мицгер Б. И., Звонкова Е. Н.,  
Евстигнева Р. П.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Синтезированы ретинилиденпептиды с длиной цепи до 10 аминокислотных остатков, в состав которых входят один или два остатка аспарагиновой кислоты. Исследованы физико-химические свойства синтезированных соединений и сделан вывод о возможном влиянии остатков аспарагиновой кислоты на формирование хромофорного центра и процесс протонирования альдиминной связи в молекуле бактериородопсина.

Для понимания механизма функционирования таких ретинилиденпротеидов, как родопсин и бактериородопсин, в первую очередь необходимо ответить на вопрос: какие аминокислотные остатки формируют хромофорный центр этих белков? Эти исследования опираются на знание первичной структуры бактериородопсина и родопсина и расположения их полипептидных цепей в мембране [1, 2]. Представляется целесообразным оценить роль тех аминокислотных остатков, которые находятся в непосредственной близости к остатку лизина, соединенному альдиминной связью с соответствующими изомерами ретиналя. Одним из подходов при этом может быть получение ретинилиденпептидов, содержащих определенные функциональные группы, для установления их возможного влияния на свойства ретинилиденового хромофора.

Ранее при сравнении тирозинсодержащего ретинилиденпептида (Ia, табл. 1) с его фенилаланиновым аналогом (IIa) было показано образование внутримолекулярной водородной связи между фенольным гидроксильным тирозина и азотом альдимина [3]. В настоящей работе мы попытались определить влияние близлежащего по цепи остатка аспарагиновой кислоты на протонирование альдиминной связи ретиналя. Анализ молекулярных моделей позволил предположить, что  $\beta$ -карбоксыльная группа остатка аспарагиновой кислоты, отстоящего от остатка ретинилиденлизина по крайней мере на одно аминокислотное звено, способна внутримолекулярно протонировать эту связь [4].

Для проверки этого предположения мы синтезировали набор аспартилсодержащих ретинилиденпептидов, соответствующих или моделирующих фрагмент бактериородопсина, включающий в себя остатки Lys<sup>40</sup> и Lys<sup>41</sup> (табл. 1). Было интересно оценить «привлекательность» этого фрагмента для мигрирующей хромофорной группы [5, 6], а также сравнить свойства ретинилиденпептидов, аналогов этого фрагмента, со свойствами хромофорного центра в молекуле бактериородопсина, в котором остаток ретиналя связан с Lys<sup>216</sup> [7–9]. При рассмотрении этих двух остатков обращает на себя внимание наличие общей последовательности Ala-Lys. Такое сочетание, не характерное для других остатков лизина в бактериородопсине, повторяется в хромофорном центре родопсина [2], а также в  $\gamma$ -кристаллине — единственном белке хрусталика глаза, который способен ковалентно связывать ретиналь [10]. В настоящем сообщении представлены результаты первой части проведенного исследования.

Синтез пептидов был осуществлен традиционными методами пептидной химии, главным образом с использованием N-оксисукцинимидных эфиров [3, 11] (табл. 2). Боковые функциональные группы всех амино-

Спектральные характеристики \* ренинлидепептидов и значения рK<sub>D</sub> их альдиминной связи

Номер соединения	Пептид	рK <sub>D</sub> <sup>2*</sup>	Метанол		CCl <sub>4</sub>	
			A	B <sup>3*</sup>	A	B <sup>4*</sup>
(Ia)	ВосLys (Ret) PheTyrOCH <sub>3</sub>	6,72	365 (63,0)	446 (57,2)	375 (53,0)	472 (50,0)
(IIa)	ВосLys (Ret) PhePheOCH <sub>3</sub>	6,80	367 (59,4)	445 (55,0)	360 (50,0)	470 (48,5)
(IIIa)	ВосAspLys (Ret) OCH <sub>3</sub>	6,90	360 (48,0)	450 (42,6)	363 (50,0)	470 (48,2)
(IVa)	ВосAspAlaLys (Ret) OCH <sub>3</sub>	7,57	360 (53,2)	448 (50,2)	375 (50,2)	475 (48,0)
(Va)	ВосAspLys (COCF <sub>3</sub> ) Lys (Ret) OCH <sub>3</sub>	7,38	362 (50,0)	440 (47,5)	375 (48,0)	472 (46,5)
(VIa)	ВосAspAlaLys (COCF <sub>3</sub> ) Lys (Ret) OCH <sub>3</sub>	7,52	360 (49,0)	442 (44,6)	370 (47,5)	470 (46,0)
(VIIa)	ВосAspLys (COCF <sub>3</sub> ) Lys (Ret) PheTyrOCH <sub>3</sub>	—	360 (49,2)	452 (46,0)	—	476 (45,6)
(VIIIa)	ВосAspAlaLys (COCF <sub>3</sub> ) Lys (Ret) PheTyrOCH <sub>3</sub>	—	360 (50,0)	445 (47,2)	—	475 (47,0)
(IXa)	ВосValSerAspProAspLys (COCF <sub>3</sub> ) Lys (Ret) PheTyrOCH <sub>3</sub>	—	365 (52,7)	448 (50,0)	—	478 (48,2)
(Xa)	ВосValSerAspProAspAlaLys (COCF <sub>3</sub> ) Lys (Ret) PheTyrOCH <sub>3</sub>	—	360 (52,0)	448 (49,8)	—	478 (48,6)
(Vб)	ВосAspLysLys (Ret) OCH <sub>3</sub>	7,28	360 (48,4)	440 (46,0)	360 (43,0)	475 (45,2)
(VIб)	ВосAspAlaLysLys (Ret) OCH <sub>3</sub>	7,37	360 (46,0)	446 (42,5)	360 (43,0)	470 (42,0)
(VIIб)	ВосAspLysLys (Ret) PheTyrOCH <sub>3</sub>	7,87	360 (46,8)	450 (43,4)	—	475 (42,0)
(VIIIб)	ВосAspAlaLysLys (Ret) PheTyrOCH <sub>3</sub>	7,34	362 (48,2)	445 (46,2)	—	478 (43,4)
(IXб)	ВосValSerAspProAspLysLys (Ret) PheTyrOCH <sub>3</sub>	7,07	365 (48,8)	448 (45,0)	—	476 (43,2)
(Xб)	ВосValSerAspProAspAlaLysLys (Ret) PheTyrOCH <sub>3</sub>	7,36	365 (48,6)	448 (45,0)	—	478 (43,4)

\* Приведены значения  $\lambda_{\text{макс}}$  и  $\epsilon_{10^{-3}}$  (в скобках) для оснований (A) и сопряженных кислот (B).

2\* Определены спектрофотометрическим методом в 20 М метаноле.

3\* Спектры сняты в 0,1 Н. HCl в метаноле.

4\* Спектры сняты в 2·10<sup>-4</sup> М CF<sub>3</sub>COOH в CCl<sub>4</sub>.

Физико-химические характеристики защищенных пептидов

Номер соединения	Пептид	Т. пл., °С	$R_f$ (A)	$[\alpha]_D^{20}$	Данные аминокислотного анализа
(I)	ВосLys (Z) PheTyrOCH <sub>3</sub>	142-144	0,45	+1,6	Lys 1,10; Phe 1,05; Tyr 0,95
(II)	ВосLys (Z) PhePheOCH <sub>3</sub>	102-103	0,40	+2,0	Lys 1,05; Phe 2,00
(III)	ВосAsp (OBzl) Lys (Z) OCH <sub>3</sub>	92-93	0,50	-15,0	Asp 1,03; Lys 0,95
(IV)	ВосAsp (OBzl) AlaLys (Z) OCH <sub>3</sub>	89-90	0,35	-12,5	Asp 1,03; Ala 1,00; Lys 0,98
(V)	ВосAsp (OBzl) Lys (COCF <sub>3</sub> ) Lys (Z) OCH <sub>3</sub>	114-115	0,46	-20,0	Asp 1,00; Lys 1,90
(VI)	ВосAsp (OBzl) AlaLys (COCF <sub>3</sub> ) Lys (Z) OCH <sub>3</sub>	92-93	0,40	-24,5	Asp 1,02; Lys 1,98; Ala 1,00
(VII)	ВосAsp (OBzl) Lys (COCF <sub>3</sub> ) Lys (Z) PheTyrOCH <sub>3</sub>	139-140	0,44	-9,0	Asp 1,03; Lys 2,00; Phe 1,05; Tyr 0,95
(VIII)	ВосAsp (OBzl) AlaLys (COCF <sub>3</sub> ) Lys (Z) PheTyrOCH <sub>3</sub>	198-199	0,40	-40,0	Asp 1,05; Ala 1,00; Lys 1,98; Phe 1,05; Tyr 0,95
(IX)	ВосValSer (Bzl) Asp (OBzl) ProAsp (OBzl) Lys (COCF <sub>3</sub> ) Lys (Z) PheTyrOCH <sub>3</sub>	203-204	0,45	-27,0	Val 1,00; Ser 0,95; Asp 1,89; Pro 1,05; Lys 2,07; Phe 1,07; Tyr 0,96
(X)	ВосValSer (Bzl) Asp (OBzl) ProAsp (OBzl) AlaLys (COCF <sub>3</sub> ) Lys (Z) PheTyrOCH <sub>3</sub>	190-191	0,43	-24,0	Val 1,09; Ser 0,98; Asp 1,95; Pro 0,98; Ala 1,00; Lys 2,03; Phe 0,96; Tyr 0,88

кислот (кроме  $\epsilon$ -аминогруппы остатка лизина, не участвующего в образовании альдиминной связи) в соответствии с ранее сформулированной стратегией синтеза лизинсодержащих ретинилиденпептидов [12] были блокированы защитными группами на основе бензилового спирта. В качестве защитной группы для  $\epsilon$ -аминофункции остатка лизина, не участвующего в формировании альдиминной связи, была использована трифторацетильная ( $\text{CF}_3\text{CO-}$ ) защита [12].

Пептиды (I)–(X) были получены в хроматографически однородном кристаллическом виде с выходами 80–95%, их характеристики представлены в табл. 2.

Учитывая пептидную природу аминокомпонента, мы модифицировали как метод синтеза, так и способ выделения альдиминнов ретиналя. В конденсацию с ретиналем пептиды вводили после деблокирования защитных групп каталитическим гидрогеполизом. Использование этого метода позволило избежать стадии дополнительной очистки соответствующих пептидов, которые сразу обрабатывали избытком ретиналя в присутствии метилата натрия в метаноле при мольном соотношении ретиналь – пептид – метилат натрия 3 : 1 : 1. Для образования соответствующих солей по кислотным группировкам аминокомпонента использовали дополнительные количества метилата натрия. Для предотвращения побочных реакций – окисления, изомеризации, фотодимеризации – процесс проводили в темноте в атмосфере аргона. Контроль за протеканием реакции вели спектрофотометрически по изменению соотношения поглощения протонированной формы альдимина (440–445 нм) и диметилацетата ретиналя (325 нм). Образование этих веществ происходит при помещении аликвоты реакционной смеси в спектрофотометрическую кювету с 0,1 н. HCl в метаноле (рис. 1). Реакцию считали завершенной при достижении постоянного значения этого соотношения, а также при исчезновении в реакционной смеси исходного пептида (контроль ТСХ). После добавления рассчитанного количества 1 н. HCl в метаноле ретинилиденпептиды выделяли в виде хлоридратов. Их дальнейшая очистка базировалась на различной растворимости в метаноле и эфире.

В ряде случаев при получении ретинилиденпептидов в качестве побочного продукта (менее 10%) нами отмечено образование вещества с  $\lambda_{\text{max}}$  330–335 нм. В литературе дискутируется вопрос о принадлежности этой полосы спектрам ретинилиденпептидов, в частности при обсуждении внутримолекулярных водородных связей при протонировании альдиминнов ретиналя, в состав которых входят дикарбоновые аминокислоты (см., например, [13]). Однако, как нам удалось установить, образование этого соединения является артефактом и наблюдается не только для аспартилсодержащих ретинилиденпептидов, но и для соединений, в состав которых не входят протонодонорные группы, например (IIa). В индивидуальных образцах ретинилиденпептидов полоса поглощения 330–335 нм отсутствует. Нам не удалось выявить условия, способствующие образованию этого соединения. Выделенное гелем-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле, это вещество не проявляло характерных реакций на альдиминную связь, а его образование при повторном проведении реакции не всегда воспроизводилось. Полученные данные позволяют считать образование вещества с полосой поглощения 330–335 нм случайным, а данную полосу – не присущей спектрам индивидуальных ретинилиденпептидов.

Разработанная схема выделения ретинилиденпептидов позволила получать альдимины ретиналя с пептидами в хроматографически однородном кристаллическом виде и с количественными выходами. Индивидуальность полученных соединений устанавливали с помощью ТСХ, об их чистоте свидетельствуют также высокие значения молярного коэффициента погашения. Строение ретинилиденпептидов подтверждали специфическими превращениями альдиминной связи: реакцией с гидроксиламином, восстановлением боргидридом натрия, гидролизом, а также спектральными методами.

Имея набор аспартилсодержащих альдиминнов ретиналя, мы исследо-

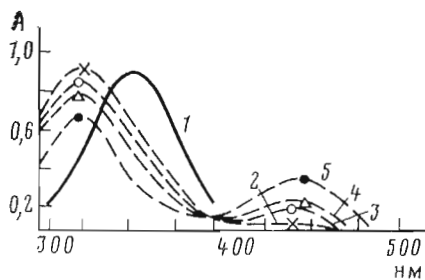


Рис. 1

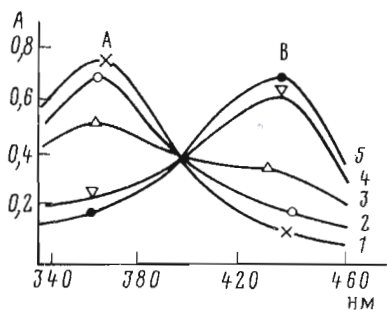
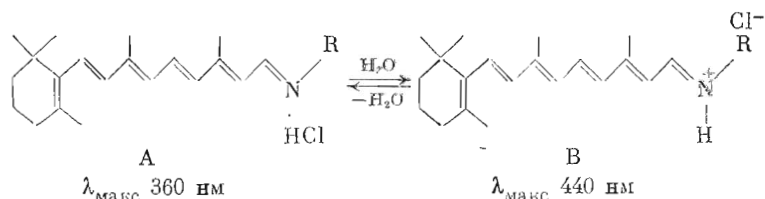


Рис. 2

Рис. 1. Контроль за ходом реакции образования альдимида ретиналя: 1 — ретиналь; 2 — диметилацеталь ретиналя; 3, 4 — реакционная смесь соответственно через 5 и 10 мин после начала реакции; 5 — альдимин ретиналя

Рис. 2. Спектр хлоргидрата ретинилиденпептида (Ia) в метаноле (1), в 20 (2), 17,5 (3), 12,5 М водном метаноле (4) и в 0,1 н. HCl в метаноле (5)

вали их поведение в водно-метанольных средах. Растворы хлоргидратов всех ретинилиденпептидов в метаноле (табл. 1) имеют типичный электронный спектр, абсорбционная полоса которого совпадает с полосой поглощения непротонированных форм ретинилиденпептидов. При добавлении в метанол воды, которая увеличивает степень диссоциации сильной (соляной) кислоты, в спектрах хлоргидратов ретинилиденпептидов появляется полоса поглощения, характерная для протонированной формы, доля которой растет с увеличением количества воды.



Этот процесс можно рассматривать как равновесный типа  $A \xrightleftharpoons{K} B$ , где A — доля непротонированной формы с  $\lambda_{\text{макс}} \text{ 360 нм}$  и B — доля протонированной формы с  $\lambda_{\text{макс}} \text{ 440 нм}$  (рис. 2).

При сравнении электронных спектров хлоргидратов и соответствующих оснований ретинилиденпептидов (Ia) — (Xa) было обнаружено существенное различие между ретинилиденпептидами, имеющими в своем составе свободную  $\beta$ -карбоксыльную группу, и альдимидами, в состав которых не входят протонодонорные группировки. Все синтезированные нами хлоргидраты ретинилиденпептидов имеют характерные спектры, вид которых сильно зависит от соотношения метанол — вода в системе (рис. 2). Для оснований ретинилиденпептидов, не содержащих в своем составе способных к ионизации групп (например, (IIa)), или содержащих группы, в малой степени склонные к диссоциации (например, фенольный гидроксил альдимида (Ia)), а также для альдимида (IIIa) характерен иной вид спектральных кривых. В электронных спектрах этих соединений независимо от соотношения вода — метанол практически отсутствует полоса протонированной формы (рис. 3a). Это и следовало ожидать, учитывая меньшую степень диссоциации  $\beta$ -карбоксыльной группы аспарагиновой кислоты в альдимида (IIIa) или фенольного гидроксила в альдимида (Ia) по сравнению с соляной кислотой в составе хлоргидратов ретинилиденпептидов. Для всех остальных аспартилсодержащих ретинилиденпептидов (IVa — Xb) мы не обнаружили существенной разницы в спектрах хлоргидратов и соответствующих оснований (рис. 3б).

Полученные спектральные данные представлены нами в виде графической зависимости  $\lg K$  от молярного содержания метанола (рис. 4), где кажущаяся константа равновесия  $K$  определена как отношение доли протонированной формы к непротонированной:  $K = [B]/[A]$ . Как видно из

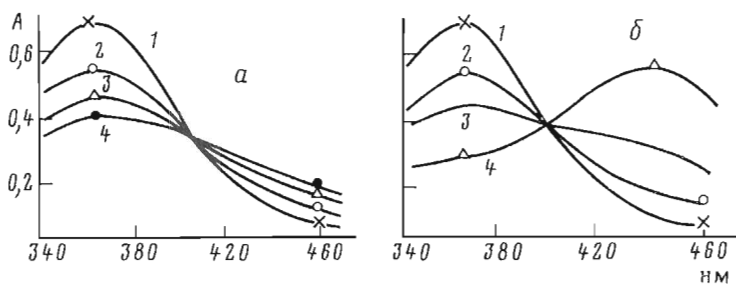


Рис. 3. Спектры оснований ретинилиденпептидов (Ia) и (IVa) (б) в метаноле (1) и в 20 (2), 17,5 (3) и 12,5 М водном метаноле (4)

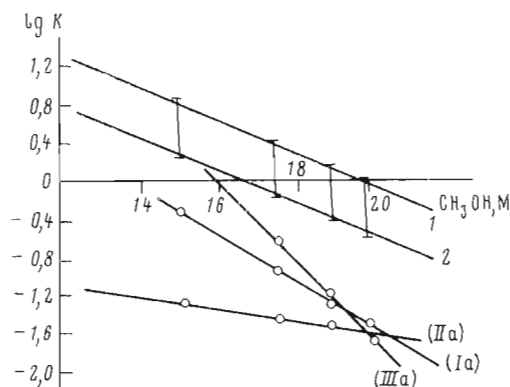


Рис. 4. Зависимость  $\lg K$  от состава смеси метанол — вода для хлоридратов ретинилиденпептидов (Ia)–(Xa) и оснований ретинилиденпептидов (IVa)–(Xa) (область значений между кривыми 1 и 2) и для оснований ретинилиденпептидов (Ia)–(IIIa)

рис. 4, эта зависимость представляет собой ряд прямых, которые в случае хлоридратов ретинилиденпептидов укладываются в определенную область. Для оснований ретинилиденпептидов (Ia)–(IIIa) (в том числе аспартилсодержащего (IIIa)) характерны существенно меньшие значения констант равновесия, в то время как для оснований всех других аспартилсодержащих ретинилиденпептидов они практически не отличаются от значений, найденных для хлоридратов (табл. 3). Полученные данные можно объяснить с точки зрения близженности в пространстве  $\beta$ -карбоксовой группы аспарагиновой кислоты с альдиминной связью ретинилиденпептидов, у которых остатки аспарагиновой кислоты и лизина, несущего ретинилиденную группировку, разделены одним или двумя аминокислотными звеньями.

Нами было получено и дополнительное подтверждение этого вывода: в апротонном растворителе (четырёххлористый углерод) полосы поглощения ретинилиденди- и трипептидов (IIIa), (IVa) разнятся на величину до 10 нм. Аналогичный эффект наблюдался нами ранее для альдиминов (Ia) и (IIa), что позволило сделать вывод относительно возможности образования «Н-комплекса» в случае тирозинсодержащего альдиминов (см. [3]). Спектральный сдвиг для данной пары аспартилсодержащих ретинилиденпептидов (IIIa), (IVa), имеющей единственное различие — остаток аланина, свидетельствует о том, что внутримолекулярное протонирование за счет  $\beta$ -карбоксовой группы возможно только в случае, когда остатки аспарагиновой кислоты и ретинилиденлизина в составе альдиминов разделены по крайней мере одним аминокислотным звеном. Это подтверждают и значения  $pK_a$  альдиминной связи для контрольной пары ретинилиденпептидов: 6,90 для (IIIa) и 7,57 для (IVa) \*.

\* Ввиду плохой растворимости ретинилиденпептидов в воде относительные значения  $pK_a$  альдиминной связи определяли в 20 М водном метаноле спектрофотометрическим методом (см. «Экспериментальную часть»).

Значения логарифма кажущейся константы равновесия оснований и хлоридратов ретинилиденпептидов в смесях метанол — вода

Номер соединения	lg K *				Номер соединения	lg K *			
	Концентрация метанола в смеси, моль/л					Концентрация метанола в смеси, моль/л			
	20	19	17,5	15		20	19	17,5	15
(Ia)	-1,50	-1,27	-0,91	-0,35	(VIa)	-0,33	-0,16	0,24	0,65
	-0,51	-0,26	0,085	0,67		-0,17	0,0	0,35	0,70
(IIa)	-1,35	-1,35	-1,22	-1,22	(VIIa)	-0,48	-0,22	0,13	— **
	-0,35	-0,11	0,31	0,91		-0,18	-0,04	0,22	—
(IIIa)	-1,44	-1,12	-0,56	0,36	(VIIIa)	-0,49	-0,24	0,06	—
	-0,11	0,14	0,51	1,10		-0,27	-0,11	0,15	—
(IVa)	-0,28	0,03	0,26	0,85	(IXa)	-0,42	-0,22	0,09	—
	0,0	0,18	0,50	1,04		-0,27	-0,14	0,10	—
(Va)	-0,41	-0,18	0,18	0,72	(Xa)	-0,48	-0,22	0,18	—
	-0,11	0,08	0,37	0,85		-0,27	0,06	0,23	—

\* Верхний ряд значений lg K приведен для оснований, нижний — для хлоридратов ретинилиденпептидов.

\*\* Ретинилиденпептиды (VIIa)—(Xa) в 15 М метаноле не растворимы.

Таким образом, на основании полученных нами данных можно сделать вывод, что β-карбоксыльная группа остатка аспарагиновой кислоты, отстоящего от остатка лизина, участвующего в образовании альдиминной связи, на один или два аминокислотных звена, способна к внутримолекулярному протонированию этой связи в исследованном ряду соединений.

### Экспериментальная часть

УФ-спектры снимали на приборе Hitachi EPS-3T (Япония). Удельное вращение измеряли на приборе Perkin—Elmer 241 MC (Англия) при 20° С в метаноле при концентрации 0,01 %, точность измерений ±5 %. Хроматографический контроль за протеканием реакций осуществляли на пластинках Silufol Kavalier (Kavalier, СССР); индивидуальность полученных соединений контролировали ТСХ на пластинках с силикагелем фирмы Eastman (США) и Merck (ФРГ) в системах: хлороформ — метанол — ацетон, 10:1:1 (А); хлороформ — метанол — трифторуксусная кислота, 10:1:0,1 (Б). Для гель-фильтрации использовали сефадекс LH-20 (Pharmacia, Швеция). Для перевода хлоридратов альдиминов в соответствующие основания использовали ионообменные смолы Amberlit IRC-50 и IRA-400 (Rohm and Haas Co, Австрия), а также 0,05 М раствор метилата натрия в метаноле.

Все использованные для синтеза производные аминокислот — L-ряда, полностью-транс-Ретиналь (*all-E-*) получали разложением его гидрохинонового комплекса с последующей кристаллизацией из гексана; содержание 13-цис-изомера, по данным ВЭЖХ, менее 3 %.

*Одновременное отщепление бензилоксикарбонильной и бензильной групп.* Раствор 0,04 ммоль пептида в 10 мл метанола, содержащего 0,01 мл уксусной кислоты, гидрировали над 50 мг палладиевой черни. После прекращения поглощения водорода катализатор отделяли, фильтрат упаривали в вакууме досуха, остаток обрабатывали эфиром (3×10 мл), сушили в вакууме при остаточном давлении 0,1 мм рт. ст.

*Удаление трифторацетильной защиты.* 1 ммоль соответствующего ретинилиденпептида растворяли в 1 мл 2 н. раствора NaOH в 85 % водном метаноле при 0° С. Через 3 мин раствор охлаждали до -5° С и добавляли 2 мл 1 н. HCl в метаноле. Растворители удаляли в вакууме, остаток обрабатывали эфиром (3×5 мл), сушили и хранили при 0° С.

*Синтез альдиминов ретиналя (IIIa)—(Xa) \*.* К раствору 0,17 ммоль

\* Синтез соединений (Ia) и (IIa) приведен в сообщении [3].

ацетата деблокированного пептида в 5 мл метанола при охлаждении до  $-5^{\circ}\text{C}$  и перемешивании добавляли от 2 до 4 экв. (в зависимости от количества кислотных групп в молекуле пептида) 1 н. раствора метилата натрия в метаноле. Затем после насыщения системы аргоном в темноте (или при красном свете) добавляли по каплям в течение 3 мин раствор 0,51 ммоль ретиналя в 10 мл метанола. Реакционную смесь выдерживали при  $-5^{\circ}\text{C}$  и перемешивании 30 мин, затем охлаждали до  $-30^{\circ}\text{C}$  и для получения хлоргидрата ретинилиденпептида прибавляли соответствующее количество 1 н. HCl в метаноле. Растворитель удаляли в вакууме при  $0^{\circ}\text{C}$ , остаток растирали с 10 мл сухого эфира, после образования кристаллов осадок промывали эфиром на фильтре до полного удаления избытка ретиналя, контролируя процесс очистки ТСХ. Для отделения вещества от NaCl к осадку добавляли 2 мл метанола, фильтрат концентрировали в вакууме до объема 0,2 мл и приливали 2 мл эфира, выпавший осадок отделяли. Чистоту полученного соединения контролировали ТСХ в системе Б. Если в продукте имелась примесь с полосой поглощения 330–335 нм и меньшей хроматографической подвижностью, чем ретинилиденпептид, смесь наносили на колонку (2×70 см) с сефадексом LH-20. Элюировали метанолом, скорость элюции 5 мл/мин. Контроль за процессом разделения проводили визуально и с помощью ТСХ в системе Б. Фракции, содержащие вещество, объединяли, удаляли растворитель при остаточном давлении 0,1 мм рт. ст., остаток кристаллизовали из смеси метанол – эфир, 1 : 10.

Свойства хлоргидратов (IIIa) – (Xa) приведены в табл. 4, их структура – в табл. 1.

*Проведение спектральных исследований.* Для спектральных измерений использовали кварцевые кюветы (l 10 мм). Съемку спектров производили при  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Для приготовления образца ретинилиденпептида перед снятием спектра навеску вещества ( $\sim 2$  мг) растворяли в 0,5–0,6 мл растворителя, отбирали точные объемы (0,03–0,05 мл), всегда одинаковые для измерения спектров одной серии, и вносили в кювету, содержащую 2 мл растворителя, так, чтобы оптическая плотность раствора была в пределах 0,4–0,8. В кювету сравнения помещали тот же растворитель или систему растворителей, что и в измерительную кювету.

Для перевода хлоргидратов ретинилиденпептидов в основания к раствору 4 мг вещества в 2–3 мл метанола добавляли не менее 1 мл смеси ионообменных смол (1 : 3 по объему), IRA-400 (ОН<sup>-</sup>-форма) и IRC-50 (H<sup>+</sup>-форма) в метаноле. После отделения смол раствор концентрировали при 0,1 мм рт. ст. до объема 1 мл и отбирали из него аликвоты для снятия спектров в метаноле или смесях метанол – вода. Для получения растворов ретинилиденпептидов в CCl<sub>4</sub> метанольный раствор альдимида после обработки упаривали в вакууме досуха, а остаток растворяли в CCl<sub>4</sub>. Если измерить спектры оснований в CCl<sub>4</sub> не удавалось из-за низкой растворимости в этом растворителе, вещество сразу переводили в протопированную форму, растворяя ретинилиденпептиды в  $2 \cdot 10^{-4}$  М растворе CF<sub>3</sub>COOH в CCl<sub>4</sub>. При использовании систем метанол – вода для предотвращения гидролиза альдиминной связи ретиналя каждый раствор ретинилиденпептида готовили непосредственно перед измерением спектра. Вся операция, включая снятие спектральной кривой, занимала не более 5 мин.

*Определение зависимости кажущейся константы равновесия ретини-*

Таблица 4

Характеристика хлоргидратов ретинилиденпептидов (IIIa) – (Xa)

Соединение	Выход, %	Т. пл., °C	$R_f$ (Б)	Соединение	Выход, %	Т. пл., °C	$R_f$ (Б)
(IIIa)	95,6	140–142	0,46	(VIIa)	96,7	159–160	0,48
(IVa)	95,4	130–132	0,50	(VIIIa)	95,8	173–174	0,49
(Va)	81,3	128–129	0,46	(IXa)	90,9	160–161	0,47
(VIa)	98,0	124–125	0,48	(Xa)	97,2	158–159	0,48



лиденпептидов в смесях метанол — вода от концентрации метанола. Аликвоту концентрированного метанольного раствора ретинилиденпептида вносили в кювету, содержащую 2 мл водно-метанольной смеси (содержание метанола 20; 19; 17,5 и 15 М соответственно). В качестве аналитической использовали полосу поглощения протонированной формы ретинилиденпептида (440—445 нм). Кажущуюся константу равновесия рассчитывали по формуле

$$K = \frac{A - A_A}{A_B - A},$$

где  $A$  — наблюдаемое значение поглощения исследуемого раствора ретинилиденпептида;  $A_A$  — поглощение раствора ретинилиденпептида в безводном метаноле;  $A_B$  — поглощение раствора ретинилиденпептида (сопряженная кислота) в 0,1 н. HCl в метаноле.

Для получения линейного вида зависимости  $K$  от молярного содержания смеси метанол — вода значения ординаты приводили в форме  $\lg K$  (табл. 3).

*Определение  $pK_a$  альдиминной связи ретинилиденпептидов.* Для спектрофотометрического определения  $pK_a$  использовали водно-метанольные (20 М метанола) фосфатные буферные растворы со следующими значениями pH: 6,22; 6,80; 7,48; 8,00; 8,30. Аликвоту метанольного раствора ретинилиденпептида с помощью мерной пипетки вносили в спектрофотометрическую кювету, содержащую 2 мл буферного раствора, и измеряли поглощение на аналитической полосе, соответствующей поглощению протонированной формы альдимина (440—445 нм). На основании полученных спектральных данных для каждого буферного раствора определяли значение степени превращения:

$$\alpha = \frac{A - A_{\text{pH}}}{A}.$$

где  $A$  — поглощение раствора ретинилиденпептида (сопряженная кислота) в 0,1 н. HCl в 20 М метаноле,  $A_{\text{pH}}$  — наблюдаемое поглощение раствора ретинилиденпептида той же концентрации в соответствующем буферном растворе.

Для определения  $pK_a$  по полученным значениям (см. табл. 5) строили график в координатах  $\lg \frac{1-\alpha}{\alpha}$  — pH буферного раствора, в которых эта зависимость должна быть прямолинейной, согласно уравнению

$$pK_a = \text{pH} + \lg \frac{1-\alpha}{\alpha}.$$

Значению  $pK_a$  соответствует отрезок, отсекаемый каждой конкретной для данного ретинилиденпептида прямой от оси абсцисс. Полученные значения  $pK_a$  приведены в табл. 1. В качестве примера в табл. 5 представлены данные, использованные при определении  $pK_a$  альдимина (Xб).

Таблица 5

Определение  $pK_a$  ретинилиденпептида (Xб) ( $A$  0,78)

pH	$A - A_{\text{pH}}$	$\alpha$	$\frac{1-\alpha}{\alpha}$	$\lg \frac{1-\alpha}{\alpha}$
6,22	0,14	0,82	0,22	-0,66
6,80	0,25	0,68	0,47	-0,33
7,48	0,42	0,46	1,17	0,07
8,00	0,55	0,29	2,39	0,38
8,30	0,65	0,17	5,00	0,70

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Ovchinnikov Yu. A.* FEBS Lett., 1982, v. 148, № 2, p. 178–191.
2. *Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Артамонов И. Д., Золотарев А. С., Костина М. Б., Богачук А. С., Мирошников А. И., Мартынов В. И., Куделин А. Б.* Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 10, с. 1421–1427.
3. *Карнаухова Е. Н., Мицнер Б. И., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П.* Журн. орган. химии, 1979, т. 15, № 4, с. 718–724.
4. *Herz J. M., Packer L.* FEBS Lett., 1981, v. 131, № 1, p. 158–164.
5. *Bridgen J., Walker I. D.* Biochemistry, 1976, v. 15, p. 792–798.
6. *Bayley H., Huang K. S., Radhakrishnan R., Ross A. H., Takagaki Y. Y., Khorana H. G.* Biochemistry, 1981, v. 20, № 10, p. 2225–2229.
7. *Katre N. V., Wolber P. K., Stoeckenius W., Stroud R. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 4068–4072.
8. *Родионов А. В., Байрамышвили Д. И., Куделин А. Б., Фейгина М. Ю., Шкроб А. М., Овчинников Ю. А.* Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1328–1334.
9. *Huang K. S., Liao M. J., Gupta S. M., Royal N., Vicmain K., Khorana H. G.* J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 15, p. 8596–8599.
10. *Wistow G., Alligood J., Shinohara T., Somers R.* FEBS Lett., 1983, v. 161(2), p. 221–224.
11. *Карнаухова Е. Н., Барсукова Л. А., Мицнер Б. И., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П.* Химия и технология органических производств, 1979, т. 7, № 2, с. 47–54.
12. *Мицнер Б. И., Карнаухова Е. Н., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П.* Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 12, с. 1684–1686.
13. *Engelhard M., Hess B.* Peptides: Synthesis – Structure – Function. Amer. Pept. Chem. 7th. Symp., 1981, p. 185–188.

Поступила в редакцию  
18.VI.1984

### SYNTHESIS AND PROPERTIES OF RETINYLIDENE-PEPTIDES CONTAINING ASPARTIC ACID RESIDUES

KARNAUKHOVA E. N., MITSNER B. I., ZVONKOVA E. N., EVSTIGNEEVA R. P.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

The retinylidene-peptides were synthesized. Their chain-length consists of 2–10 amino acid residues, one or two of them being aspartic acid residues. The spectral and chemical properties of the synthesized compounds indicate that aspartic acid residues can affect the active center formation and protonation of the aldimine bond in the bacteriorhodopsin molecule.