



УДК 547.382.3

ФОТОЦИКЛ И ЭЛЕКТРОГЕНЕЗ У БАКТЕРИОРОДОПСИНОВ,
СОДЕРЖАЩИХ В ХРОМОФОРНОМ ЦЕНТРЕ
C13-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АНАЛОГИ РЕТИНАЛЕЙ

Еремин С. В., Мицнер Б. И., Данишина С. В.,
Драчев Л. А.**, Каулен А. Д.**, Хитрина Л. В.**

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

* Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино;

** Проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии
и биоорганической химии им. А. И. Белозерского, МГУ

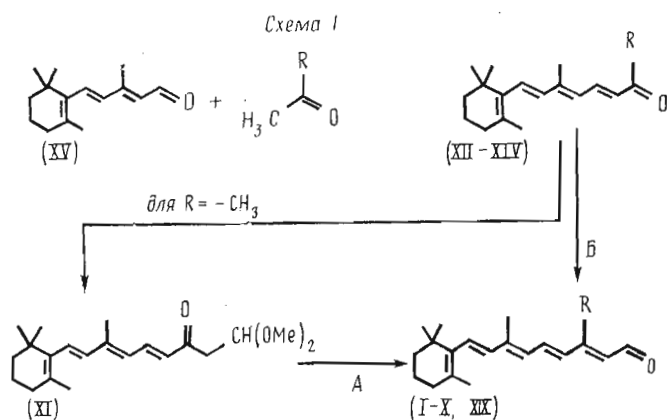
Предложены и реализованы два варианта получения C13-замещенных аналогов ретиналя. Первый основан на взаимодействии кетоацетата C₁₉ с реактивами Гриньяра, а второй — на альдольной конденсации альдегида C₁₅ с метилкетонами с последующим наращиванием полиеновой цепи на фрагмент C₂. Определены границы применимости этих методов. Синтезированы 13-дейтеро-, 13-этил-, 13-изопропил-, 13-циклопропил-, 13-н-бутил-, 13-изобутил-, 13-трет-бутил-, 13-фенил-, 13-нафтил-, 13-дезметилретинали. Из этих альдегидов в апомембранах, полученных из клеток *Halobacterium halobium*, приготовлены соответствующие аналоги бактериородопсина. Исследование этих пигментов показало, что как увеличение объема заместителя при C13-атоме хромофорной группы, так и его отсутствие приводит к замедлению распада M-интермедиата фотоцикла, уменьшению амплитуды фотоэлектрического ответа и нарушениям адаптации к свету и темноте.

При исследовании хромофор-белковых взаимодействий и их функциональной роли в молекуле бактериородопсина часто используют подход, заключающийся в изучении свойств продуктов взаимодействия аналогов 13-цис- и полностью-транс-ретиналя с апобелком — бактериоопсином [1–3]. Так, использование полиеналяей, в которых исключена возможность 13-цис ⇌ 13-транс-изомеризации, позволило наглядно подтвердить ее ключевую роль при функционировании бактериородопсина [1, 4–6]. Результаты исследования аналога бактериородопсина, хромофорный центр которого содержал остаток 13-дезметилретиналя, продемонстрировали существенное значение метильной группы при C13-атоме для работы этого пигмента как светозависимой протонной транслоказы [7].

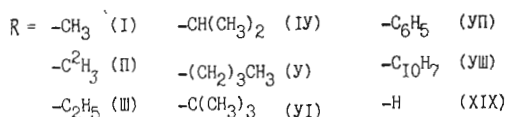
Цель настоящей работы состояла в разработке простых и малостадийных методов синтеза аналогов ретиналя, содержащих при C13-атоме различные углеводородные заместители, а также в использовании этих полиеналяей для изучения хромофорного центра бактериородопсина.

Для получения модифицированных ретиналей (I–X) мы применили два взаимодополняющих синтетических подхода (схема 1). Первый вариант (А) включает введение необходимого заместителя после формирования углеродного скелета ретиналя, тогда как второй (Б) предусматривает постепенное наращивание полиеновой цепи. Логическая связь между этими путями видна из рассмотрения соответствующих превращений.

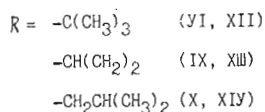
Известная схема синтеза ретиналя заключается в обработке кетоацетата C₁₉ (XI) метилмагнийхлоридом с последующей дегидратацией и удалением ацетальной защиты. При использовании других реактивов Гриньяра этот метод может быть использован для быстрого и удобного получения C13-замещенных ретиналей. Альтернативный путь, представляющийся более перспективным для синтеза стерически затрудненных полиеналяей, включает получение аналога кетона C₁₈ (XII–XIV) конденсацией соответствующих метилкетонов с альдегидом C₁₅ (XV) и последующее удлинение полиеновой цепи на фрагмент C₂.



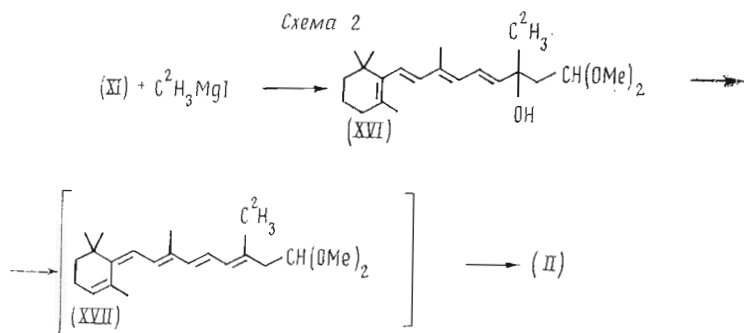
Синтезированы по варианту А:



Синтезированы по варианту Б:



Первоначально синтетический путь, основанный на использовании кетоацетала C₁₉ (XI), был реализован на примере 13-тридейтерометилпентиналя (II) (схема 2). При обработке кетоацетала (XI) тридейтерометилмагнийподидом в эфире при 0°C получен соответствующий гидроксинацеталь (XVI) с практически количественным выходом по данным ТСХ. Как и ожидалось, это соединение весьма лабильно, что затруднило его выделение в чистом виде, поэтому вывод о протекании реакции в нужном направлении был сделан на основании данных ИК-спектроскопии. При сравнении спектров исходного кетоацетала (XI) и обработанной реакционной смеси отчетливо видно исчезновение полосы, отвечающей O=C-группе (1650 см⁻¹), и появление полосы НО-группы (3400 см⁻¹) при сохранении полосы поглощения ацетальной группировки (1060 см⁻¹).



В качестве дегидратирующего агента нами был использован кипящий раствор HBr в ацетоне. В связи с тем что выход целевых соединений варьировался в широких пределах, возникла необходимость тщательно выбрать оптимальные условия. С помощью ВЭЖХ было показано, что в ходе дегидратации образуется вещество с меньшим временем выхода, чем у изомеров целевого альдегида (II) (рис. 1). Содержание этого соедине-

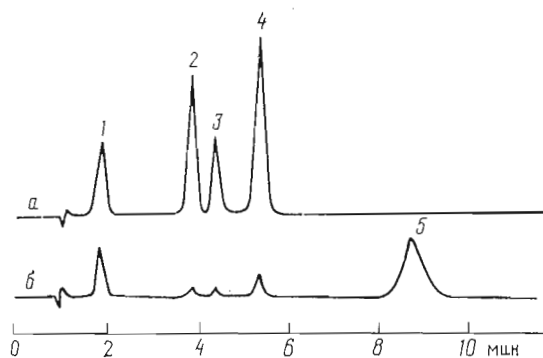


Рис. 1

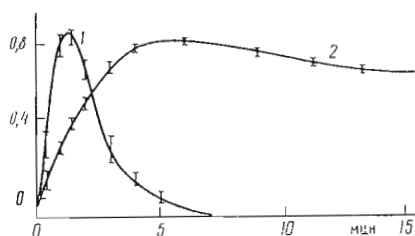


Рис. 2

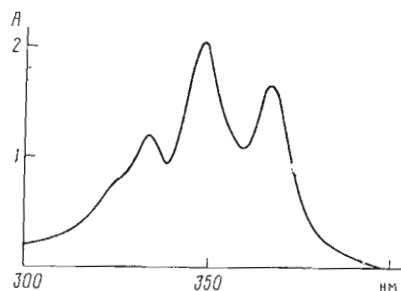


Рис. 3

Рис. 1. ВЭЖХ реакционной смеси после 2 мин обработки соединения (I) 0,04% HBr в кипящем ацетоне; колонка SGX ($3,3 \times 300$ мм), элюент — эфир — гептан (1:9) (а — 365 нм, б — 290 нм). 1 — *ретро*-ацеталь (XVII), 2 — 13-*цис*-, 3 — 9-*цис*-, 4 — полностью-*транс*-изомеры альдегида (II); 5 — гидроксиацеталь (XVI)

Рис. 2. Влияние продолжительности обработки оксиацетала (XVI) HBr (условия см. подпись к рис. 1) на выходы (в усл. ед.) *ретро*-ацетала (XVII) (1) и суммы изомеров альдегида (II) (2)

Рис. 3. Спектр поглощения раствора соединения (XVII) в метаноле

ния сначала быстро возрастало, а затем убывало до полного исчезновения, тогда как суммарная концентрация изомеров дейтероретиналя (II) увеличивалась медленнее, достигала предела и далее практически не менялась (рис. 2). Неизвестное вещество было выделено в индивидуальном состоянии полупрепаративной ВЭЖХ; в его УФ-спектре было несколько близко расположенных полос, характерных для *ретро*-системы сопряженных двойных связей (рис. 3). Данные ИК- и ^1H -ЯМР-спектров указывали на отсутствие HO- и ОНС- групп и наличие ацетальной группировки. Был сделан вывод о том, что это вещество имеет структуру *ретро*-ацетала (XVII) и образуется в результате дегидратации без слиятия ацетальной защиты. Вторая, более медленная стадия реакции — регенерация концевой карбоксильной группы сопровождается изомеризацией *ретро*-структуры в полиеновую цепь нормального строения. При дальнейшем изучении этого превращения мы установили, что выход целевого альдегида (II) сильно зависит от концентрации HBr и времени реакции. Оптимальное время обратно пропорционально концентрации HBr , причем максимальный выход достигается в присутствии 0,04% HBr за 5 мин.

Полученные данные были использованы для получения аналогов ретиналя (III–VIII), содержащих углеводородные радикалы при C13 взаимодействием кетоацетала C_{19} (XI) с реактивами Гриньяра и последующей обработкой оксиацеталей HBr (схема 1, табл. 1).

Выход гидроксиацеталей и соответственно альдегидов (III–VIII) уменьшается с ростом объема заместителя при C13-атоме. Существенный вклад в этот эффект вносит 1–4-присоединение реактива Гриньяра к по-

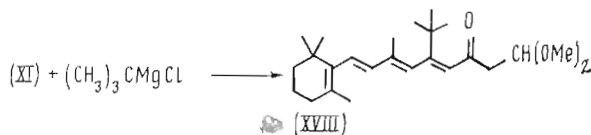
Выходы и изомерный состав аналогов ретиналя, полученных методом А (см. схему 1) с помощью RMgX

Соединение	R	X	Добавка CeCl ₃	Доли продукта 1—4-присоединения, %	Выход * альте- гда, %	Доли изомеров, % *	
						1:3-цис-	полностью- транс-
I	-C ² H ₃	I	—	0	80	25	60
III	-C ₂ H ₅	Br	—	0	78	27	59
IV	-CH(CH ₃) ₂	Cl	—	100	0	—	—
IV	»	»	+	60	10	77	23
V	-C ₄ H ₉	Br	—	0	75	20	65
VI	-C(CH ₃) ₃	Cl	—	100	0	—	—
VI	»	»	+	90	0,2	100	0
VII	-C ₆ H ₅	Br	—	0	40	16	67
VIII	-C ₁₀ H ₇	Br	—	0	30	83	8
XIX	-H	—	—	0	60	18	76

* По данным ВЭЖХ.

лиеновому кетону (XI). Так, взаимодействие *трет*-бутилмагнийхлорида с кетоацеталем C₁₉ (XI) приводило исключительно к продукту 1–4-присоединения (XVIII), структура которого была подтверждена данными ИК-, УФ- и ¹H-ЯМР-спектроскопии (схема 3).

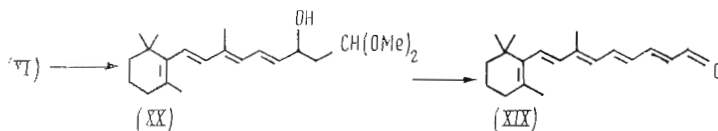
Схема 3



Аналогичное явление наблюдалось и в случае изопропилмагнийхлорида. Использование комплекса CeCl_3 — реактив Гриньяра, который действует более направленно [8], позволило получить как 13-изопропил-, так и 13-*трет*-бутил-13-дезметилретинол (IV, VI) (см. табл. 1).

Необходимый для наших исследований 13-дезметилретиналь (XIX) был приготовлен восстановлением кетоацетали C_{19} (XI) боргидридом патри с последующей обработкой гидроксиацетали (XX) $NaBr$ в ацетоне (схема 4). Спектральные характеристики полученного продукта совпадали с описанными ранее [7].

Схема 4



Все аналоги ретинала (II—X, XIX) были получены в виде смесей геометрических изомеров, которые разделяли ВЭЖХ; структура этих соединений была подтверждена данными УФ-, ИК- масс- и ¹H-ЯМР-спектроскопии (см. табл. 2). Следует отметить, что изомерный состав полученных смесей данных полиналей четко коррелирует с величиной стерических затруднений, вызываемых заместителем при C13-атоме (табл. 1).

Таким образом, необходимо отметить низкую регио- и стереоселективность этого метода, особенно в случае заместителей большого объема. Тем не менее благодаря доступности исходных реагентов и малому числу стадий он представляется удобным для получения аналогов ретинала, не содержащих объемистые заместители при С13-атоме.

Свойства C₁₃-замещенных аналогов ретиная (II-X, XIX)

Номер соеди- нения	Радикал при C13 (изомер)	УФ-спектр, λ _{макс} , нм * (ε·10 ⁻³)	Масс- спектр M ⁺ , (m/z)	1H-ЯМР-спектры в CDCl ₃ при 20° C, δ, м. д. (J, Гц) **							Радикал	
				H7 д	H8 и	H10 и	H11 д	H12 д	H14 д	-CHO д		C9-CH ₃ с
II	-C ² H ₃ (транс)	372 (44,0)	287	6,34 (16)	6,16 (16)	6,18 (11,5)	7,14 (11,5; 15)	6,38 (15)	5,96 (8)	10,1 (8)	2,04	—
III	-C ₂ H ₅ (транс)	383 (38,1)	298	6,35 (16)	6,17 (16)	6,19 (11,5)	7,15 (11,5; 15)	6,26 (15)	5,90 (8)	10,07 (8)	2,05	2,81, кв (7,5), 2H; 4,27, т (7,5), 3H
IV	-CH(CH ₃) ₂ (13-цис)	373 (25,0)	312	6,24 (16)	6,16 (16)	6,22 (8)	7,00 Мультиплет		5,92 (8)	10,12 (8)	2,02	2,90, гептет (6,7), 1H; 1,18, д (6,7), 6H
V	-C ₄ H ₉ (транс)	382 (32,0)	326	6,35 (16)	6,16 (16)	6,19 (11,5)	7,16 (11,5; 15)	6,27 (15)	5,94 (8)	10,05 (8)	2,05	2,80, т (7,5), 6H; 4,04, м, 2H; 0,94, т (7,0), 3H
VI	-C(CH ₃) ₃ (13-цис)	325 (15,0); 360 (13,0)	326	6,31 (16)	6,13 (16)	6,18 (8)	6,70 (14,5; 8)	6,33 (14,5)	6,10 (7,5)	9,68 (7,5)	1,96	1,18, с, 9H
VII	-C ₆ H ₅ (транс)	382 (39,0)	346	6,28 (16)	6,13 (16)	6,19 (11,5)	6,68 (11,5; 15)	6,53 (15)	6,12 (8,5)	9,38 (8,5)	1,76	7,44, м, 3H; 7,28, м, 2H
VIII	-C ₁₀ H ₇ (13-цис)	392 (30)	396	6,23 (16)	6,09 (16)	6,18 (11,7)	6,48 (11,7; 15)	6,76 (15)	6,36 (8,5)	9,17 (8,5)	1,69	7,94, т, 2H (7); 7,44, м, 5H; 7,78, д, 1H (9)
IX	-CH(CH ₃) ₂ (13-цис)	382 (31,7)	310	6,35 (16)	6,14 (16)	6,15 (11,3)	7,41 (11,3; 14,5)	6,11 (14,5)	6,05 (8)	10,36 (8)	2,05	2,06, м, 1H; 1,08, м, 2H; 0,7, м, 2H
X	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂ (13-цис)	378 (39,5)	326	6,33 (16)	6,15 (16)	6,19 (11,3)	7,01 (11,3; 14,5)	7,14 (14,5)	5,8 (8)	10,16 (8)	2,02	2,3, д (6,5), 2H; 4,9, м, 1H; 0,94, 1H; д (6,5), 1H
XIX	-H (транс)	377 (40,0)	270	6,37 (16)	6,15 (16)	6,17 (11,5)	7,07 (11,5; 14,5)	6,45 (11,5; 14,5)	6,13 (8; 15)	9,55 (8)	2,01	7,2, дд (11,5; 15), 1H

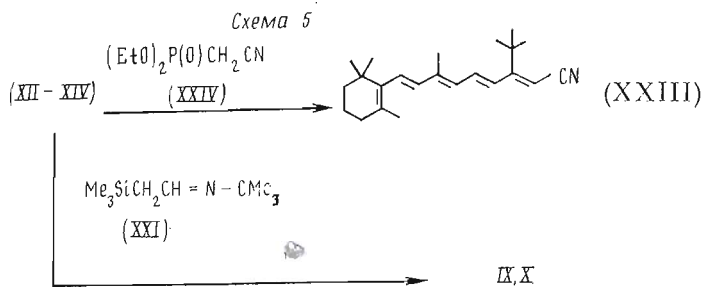
* Спектры поглощения сняты в метаноле.

** с — синглет, д — дублет, кв — квартет, м — мультиплет.

Для синтеза С13-замещенных аналогов ретиналя по способу Б мы использовали в качестве исходных соединений доступные метилкетоны, которые вводили в альдолино-кетоновую конденсацию с альдегидом С₁₅ (XV) (схема 1). Оказалось, что обычный вариант проведения этой реакции с применением в качестве катализатора водно-метанольной щелочи сопровождается образованием заметного количества побочных веществ. Используя *трет*-бутилат калия в пентане при 0° С, нам удалось не только существенно сократить время реакции (с 36 до 1,5 ч в случае пинаколона), но и резко увеличить выходы, которые составили для *трет*-бутильного производного (XII) 65%, а для циклопропильного (XIII) и изобутильного (XIV) — около 90%. В этих условиях практически не образуются побочные продукты, а возникающая двойная связь, по данным ¹H-ЯМР-спектра, имела *транс*-конфигурацию (*J*_{11H, 12H} 14,5–15 Гц).

Для наращивания полиеновой цепи полученных аналогов кетона С₁₈ (XII–XIV) на фрагмент С₂ мы первоначально выбрали реакцию Петерсона [9] (схема 5).

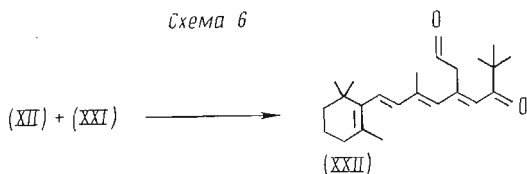
Эта реакция является удобной альтернативой получению алкенов по Виттигу благодаря относительной доступности исходных реагентов, скорости реакции, мягкости условий и легкости отделения побочных продуктов.



Вариант реакции Петерсона с использованием литиевого производного триметилсилацетальдимида (XXI), который широко применяется для получения полиеналей, позволяет реализовать синтез ретиналя по схеме С₁₈+С₂ за одну стадию [10].

Полученные нами аналоги кетона С₁₈ (XIII, XIV) активно реагировали с генерированным *in situ* литиевым производным соединения (XXI) в тетрагидрофуране при –70° С, давая после гидролиза 10% муравьиной кислотой полиенали (IX, X) с выходом ~60%. Эти полиенали были получены в виде смесей изомеров, которые удалось разделить ВЭЖХ. Их структура подтверждена физико-химическими методами (табл. 2).

Мы можем оценить область применимости этого синтетического подхода: в случае стерически затрудненного кетона (XII) образующийся при реакции с бутиллитием карбанион атакует исключительно С11-атом. Поэтому вместо ожидаемого 13-*трет*-бутил-13-дезметилретиналя (VI) (схема 6) с выходом 87% образуется продукт 1–4-присоединения (XXII).



Из-за невозможности получить *трет*-бутильный аналог ретиналя (VI) реакцией Петерсона мы использовали метод удлинения полиеновой цепи, первой стадией которого было превращение кетона (XII) в аналог пнтрила ретиновой кислоты (XXIII) по Виттигу — Хорнеру (схема 5). Предва-

рительно этот вариант с использованием фосфата (XXIV) испытан на кетоне C_{18} и, в полном соответствии с литературными данными [10], показал хорошие результаты.

Аналогичную реакцию со стерически затрудненным кетоном (XII) нам удалось провести лишь в кипящем диоксане. Поскольку по своей хроматографической подвижности продукт был весьма близок к исходному кетону (XII), выделить его в чистом виде не удалось даже с применением полупрепаративной ВЭЖХ. О строении этого соединения можно было судить на основании ИК-спектра обработанной реакционной смеси, в котором присутствует отвечающая $-C=N$ -группе полоса при 2200 см^{-1} . Обработка реакционной смеси диизобутилламингидридом при -60°C в пентане приводила к восстановлению нитрильной группы до альдегидной, а карбонильной — до гидроксильной. Таким образом, хотя конверсия кетона (XII) не превышала $\sim 50\%$, выделить альдегид (VI) не представляло трудности. Пробное восстановление этим реагентом нитрила ретиновой кислоты привело к смеси 13-*цис*- и полностью-*транс*-ретиналей (1 : 4,2 по данным ВЭЖХ). 13-*трет*-Бутил-13-дезметилретинаяль (VI), полученный аналогичным образом, представляет собой исключительно 13-*цис*-изомер [11, 12]. Необходимо отметить, что разработанная нами схема получения аналога ретиналя (VI), несмотря на меньший выход, является более простой, быстрой и содержит меньше стадий, чем синтезы, описанные ранее [11, 12].

Таким образом, используя два взаимодополняющих метода, мы синтезировали ряд аналогов ретиналя, содержащих заместители различного объема при C13-атоме полиеновой цепи.

Все синтезированные нами аналоги ретиналя вводились в рекомбинацию с эквимоллярными количествами бактериоопсина в апомембранах из клеток *Halobacterium halobium* 353П. Рекомбинация бактериоопсина с 13- α -нафтил- (VIII) и 13-*трет*-бутил-13-дезметилретинаялями (VI) в отличие от остальных полиеналей требует предварительного удаления из апомембран ретинальоксида [13]. В случае соединения (VIII) рекомбинация завершалась за несколько суток при 20°C , а для полиеналя (VI) требуется инкубация 48 ч при 40°C . С последними двумя соединениями не удается спектрально обнаружить промежуточное образование нековалентного комплекса, что свидетельствует о низком сродстве этих стерически затрудненных полиеналей к бактериоопсину. Спектральные характеристики полученных аналогов бактериородопсина приведены в табл. 3. С увеличением объема заместителя при C13 уменьшается bathochromic сдвиг полосы поглощения хромопротеида относительно соответствующего протонированного модельного альдимида (табл. 3).

Сравнение времен гибели так называемых интермедиатов *M* — компонентов фотохимического цикла бактериородопсина и многих его искусственных аналогов (рис. 4, 5) — показывает, что оно существенно возрастает как при удалении заместителя при C13, так и при введении туда объемистых остатков: фенильного и нафтильного. В последнем случае распад *M*-интермедиата при 22°C происходит за десятки секунд.

Увеличение объема заместителя при C13-атоме сопровождается также снижением разности электрических потенциалов, генерируемой при импульсном освещении (рис. 6)*. Хромопротеиды, содержащие этильный, фенильный и изопропильный заместители при C13-атоме остатка полиеналя, по кинетике электрического ответа подобны бактериородопсину. У хромопротеида, содержащего остаток 13-нафтил-13-дезметилретинаяля, электрический ответ надежно различить не удалось.

Отсутствие заместителя при C13 не только значительно уменьшает амплитуду фотоэлектрического ответа, но и сильно сказывается на его кинетике (рис. 6 и 7). В этом случае значительно возрастает вклад отри-

* Выявить очень слабые электрические ответы 13-дезметильного и 13-фенильного аналогов бактериородопсина (рис. 6, 1, 6) удалось, используя апомембраны, обработанные боргидридом натрия. Если электрические ответы слабы и по кинетике близки к бактериородопсину, то для измерения электрических ответов использовали протеолипосомы.

Свойства аналогов бактериородопсина **

Заместитель при C13-атоме остатка полицикла	$\lambda_{\text{макс}}$, нм				Наличие фото- цикла	Транспорт протонов
	Альдегид	Основание	Сопряженная кислота *	Хромо- протеид		
-CH ₃	381	360	440	568	+	+
-C ² H ₅	381	360	440	568	+	+
-C ₂ H ₅	383	365	446	567 **	+	+
-CH(CH ₃) ₂	373	347	427	550	+	+
-C ₄ H ₉	382	358	439	540	+	+
-C(CH ₃) ₃	325, 360	—	—	500	+	—
-C ₆ H ₅	382	370	455	572	+	+
-C ₁₀ H ₇	392	372	461	591	+	
-CH(CH ₂) ₂	382	346	426	555	+	
-CH ₂ (CH(CH ₃)) ₂	379	355	435	500		
-H	377	362	439	565	+	+

* Получены взаимодействием соответствующего альдегида с избытком *n*-бутиламина в присутствии молекулярных сит 3 Å. Спектры поглощения сняты в метаноле.

** Наши результаты отличаются от данных, полученных при использовании мембран из штамма, не способного синтезировать ретиналь. В работах [15, 23] для этого хромофора приведен $\lambda_{\text{макс}}$ 559 нм и указано, что он не способен к 13-цис → 13-транс-изомеризации.

цательной фазы, а в миллисекундной фазе обнаруживается не только положительный, но и отрицательный компонент. Аналогичный эффект ранее наблюдался у аналогов бактериородопсина, в которых триметилциклогексеновое кольцо остатка ретиналя было заменено на фенильное или *n*-фторфенильное [14]. Электрический ответ 13-дезметилбактериородопсина является на самом деле суммарным ответом *полностью-транс*- и 13-цис-изомеров. На этих трех примерах было показано, что фотоответ 13-цис-изомеров состоит из двух отрицательных фаз: субмикросекундной ($\tau < 200$ нс) и миллисекундной. Ответ же *транс*-изомеров этих аналогов кроме отрицательной субмикросекундной включает только положительные микро- и миллисекундную фазы.

При анализе влияния объема заместителей на соотношение 13-цис- и *полностью-транс*-изомеров хромопротеидов мы полагали, что: 1) α -полосы в спектрах поглощения 13-цис-изомеров сдвинуты в сторону коротких волн; 2) *M*-интермедиаты образуются только из *полностью-транс*-изомеров; 3) в фотоциклах 13-цис-изомеров бактериородопсина и его аналогов обычно присутствуют интермедиаты с полосой поглощения в области больших длин волн.

У 13-дезметилбактериородопсина равновесие сильно сдвинуто в сторону 13-цис-изомера (~85%) и практически не зависит от освещения [7]. В фотоцикле этого хромопротеида участвуют длинноволновые интермедиаты, которые по амплитуде полосы поглощения превышают *M*-интермедиаты в ~7 раз, а по кинетике образования и гибели близки к интермедиатам 13-цис-цикла аналогов бактериородопсина, в которых циклогексеновое кольцо заменено фенильным [14]. Период существования длинноволновых интермедиатов соответствует у обоих хромопротеидов отрицательным фазам электрического ответа (рис. 6) [14]. Мы полагаем, что эти длинноволновые интермедиаты принадлежат фотоциклу 13-цис-13-дезметилбактериородопсина.

Под действием света в 13-этил- и 13-изопропилбактериородопсине обратно возрастает доля *полностью-транс*-изомера. Устапавливающееся в темноте положение равновесия изомеров не зависит от того, использовался ли при рекомбинации 13-цис- или *полностью-транс*-полненаль. Темновая изомеризация этих хромопротеидов протекает медленнее, чем у бактериородопсина (у изопропильного аналога десятикратно). Длинноволновый интермедиат, возникающий после импульсного освещения адаптированного к свету 13-этилбактериородопсина, по максимальному содержанию, кинетике образования и гибели похож на интермедиат O_{640} , образующийся из *полностью-транс*-изомера бактериородопсина.

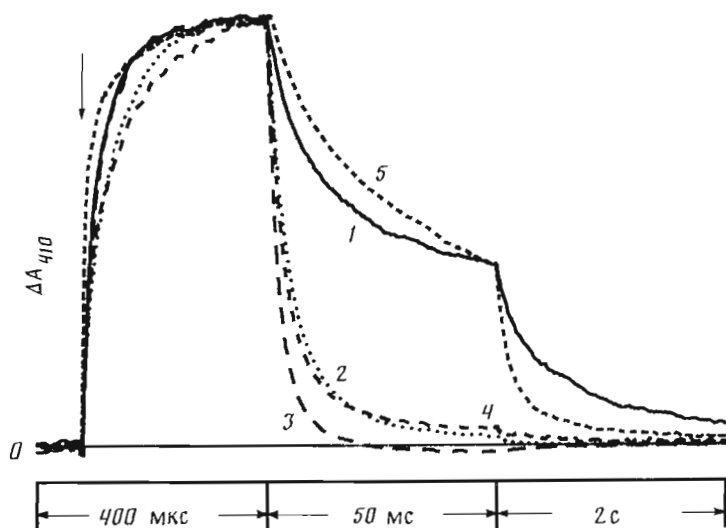


Рис. 4. Кинетика образования и распада *M*-интермедиатов адаптированных к свету препаратов 13-дезметилбактериородопсина (1), бактериородопсина (2), 13-этилбактериородопсина (3), 13-изопропилбактериородопсина (4), 13-фенилбактериородопсина (5), полученных из апомембран, содержащих ретинальоксим. (Температура $24,5 \pm 0,4^\circ \text{C}$, максимальные амплитуды изменений поглощения при 410 нм нормированы)

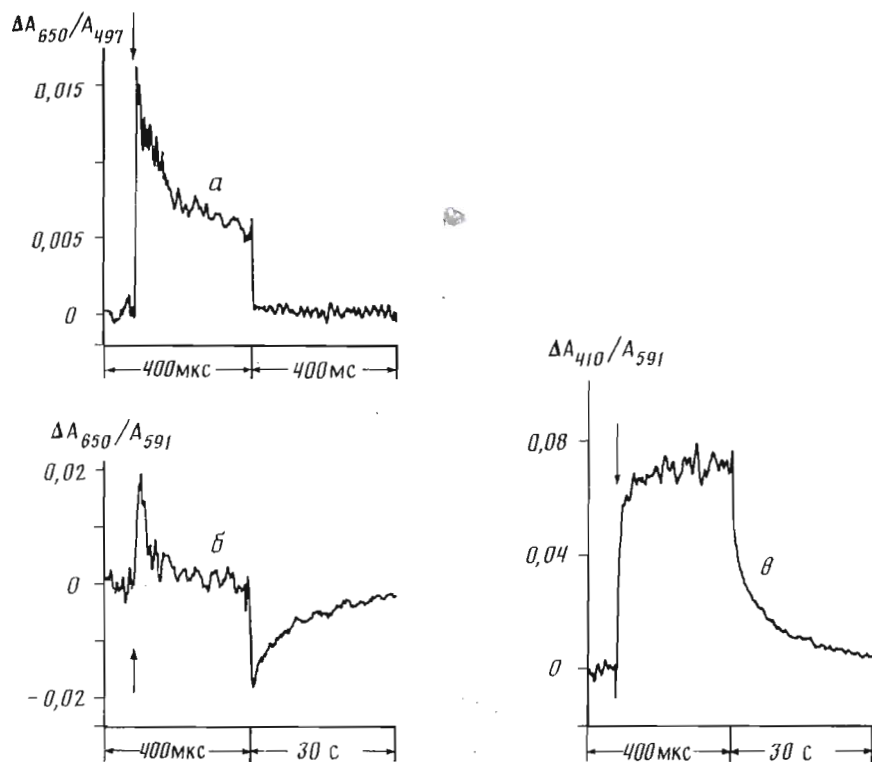


Рис. 5. Изменения оптического поглощения хромопротеидов, полученных рекомбинацией полиеналяей с апомембранами, обработанными β -циклодекстрином: 13-трет-бутилбактериородопсина (а), 13-нафтилбактериородопсина (б, в). (Температура $23 \pm 0,2^\circ \text{C}$)

В дифференциальном спектре, наблюдаемом после импульсного освещения 13-изопропилбактериородопсина, присутствует полоса с максимумом при 630–640 нм, особенно большая у 13-*цис*-изомера. Очевидно, ее можно объяснить образованием длинноволнового интермедиата, характерного для фотоцикла 13-*цис*-пигментов.

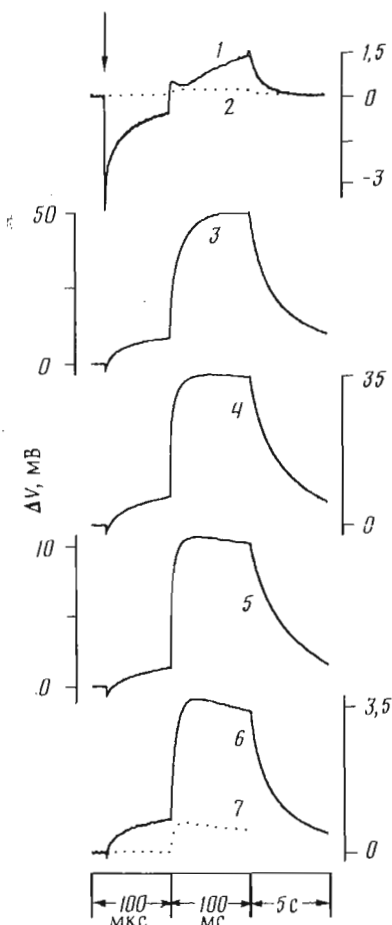


Рис. 6

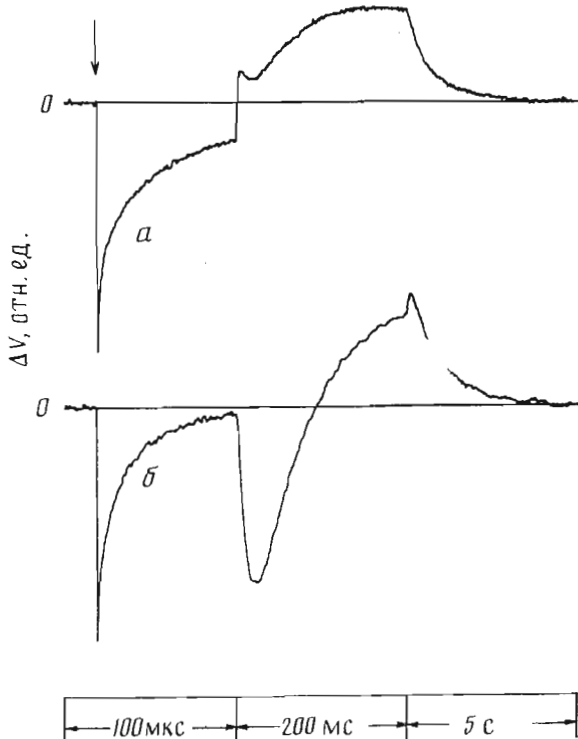


Рис. 7

Рис. 6. Электрические ответы на вспышку света ($\downarrow$) мембранных препаратов 13-дезметилбактериородопсина (1), бактериородопсина (3), 13-этилбактериородопсина (4), 13-изопропилбактериородопсина (5), 13-фенилбактериородопсина (6) и апомембран (2, 7), ассоциированных с коллоидной пленкой, пропитанной декановым раствором липидов (температура $22 \pm 1,4^\circ \text{C}$)

Рис. 7. Электрические ответы на вспышку света ($\downarrow$) пурпурных мембран 13-дезметилбактериородопсина (а) и приготовленных из него протеолипосом (б), которые были ассоциированы с коллоидной пленкой, пропитанной декановым раствором липида

Аналогичный интермедиат возникает при импульсном освещении 13-трет-бутилбактериородопсина (рис. 5). Если 13-изопропилбактериородопсин предварительно был адаптирован к свету, количество этого интермедиата уменьшается втрое параллельно с таким же увеличением количества интермедиата M . Таким образом, при световой адаптации этого хромопротеида происходит *цис*→*транс*-фотоизомеризация остатка полиеналя, протекающая, однако, примерно на порядок медленнее, чем у бактериородопсина.

У 13-фенилбактериородопсина полоса поглощения на свету смещается от 572 к 564 нм. Аналогичный эффект наблюдается с хромопротеидом, который образуется при недельной инкубации в темноте при 20°C бактериородопсина с *полностью-транс*-полненалем (VIII), содержащим нафтильный остаток при C13-атоме. Этот хромопротеид имеет полосу поглощения при 591 нм. При длительном освещении такого препарата полоса поглощения не только смещается на 6–7 нм в коротковолновую сторону, но уменьшается вдвое по амплитуде. Параллельно с этим уменьшается ответ на вспышку света в области поглощения интермедиата M и увеличивается

ответ в длинноволновой области, который по своей кинетике похож на характерные для фотоцикла 13-цис-бактериородопсина и его аналогов. Все это позволяет думать, что и в данном случае имеет место 13-транс-→13-цис-фотоизомеризация, протекающая, однако, на фоне фотодеструкции пигмента. Ранее подобная фотоизомеризация была описана для аналога бактериородопсина, содержащего остаток α -ретиная [16]. Таким образом, увеличение объема заместителя при C13-атоме приводит к сдвигу светозависимого равновесия 13-транс $\rightleftharpoons$ 13-цис- в сторону 13-цис-изомеров.

Экспериментальная часть

ИК-спектры веществ в пленках сняты на приборе Shimadzu IR-435 (Япония), УФ-спектры метанольных растворов низкомолекулярных соединений измерены на спектрофотометрах Shimadzu UV-240 (Япония) или Beckman DU-8B (США), а спектры препаратов хромопротеидов (в кювете сравнения — апомембраны) — на приборе Hitachi-EPS-3T (Япония). Спектры ^1H -ЯМР-растворов в дейтерохлороформе регистрировали на спектрометре WP-250 (Bruker, ФРГ). Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) относительно внутреннего стандарта (гексаметилдисилоксана), а значения констант спин-спинового взаимодействия — в Гц. При описании спектров приняты следующие сокращения: с. — сильная, ср. — средняя, сл. — слабая, ш. — широкая, с — синглет, д — дублет, т — триплет, кв — квартет, м — мультиплет. Масс-спектры получены на приборах Varian MAT CN-6 или Finnigan-4021 (США).

Препаративные разделения проводили на колонках с силикагелем L 100/160 мкм (Chemapol, СССР). Аналитическую ВЭЖХ осуществляли на колонке SGX (300×3,3), используя как элюент смесь эфира с насыщенным водой гептаном (1:9; 2 мл/мин) и следя за поглощением при 290 и 365 нм. Для полупрепаративных целей применяли колонку Lichrosorb Si60 (7 мкм, 250×10 мм); элюентом обычно служила смесь эфира с насыщенным водой гексаном (1:9; 10 мл/мин). Хроматографические разделения выполняли на жидкостных хроматографах Knauer (ФРГ) и Kova (СССР), обрабатывая результаты с помощью интегратора C-R3A (Shimadzu, Япония).

В работе использовали реактивы и препараты марки х.ч. и ч.д.а. производства СССР, а также β -циклодекстрин (Reanal, Венгрия), DIBAL (диизобутилалюминийгидрид), MES (2-N-морфолинэтансульфоновая кислота) и октадециламин (Sigma, США), гидроксиламин (Fluka, Швейцария), диализный шланг (Serva, ФРГ). Все операции с реагентами, чувствительными к влаге и кислороду, проводили в тщательно высушенной аппаратуре в атмосфере сухого аргона. Растворители удаляли на вакуумном ротаторном испарителе при температуре не выше 35°C. С полновесными соединениями работали при красном свете.

Стандартная обработка реакционной смеси, за исключением специально указанных случаев, начиналась ее смешиванием с водой. Далее смесь трижды экстрагировали свободным от перекисей эфиром; объединенный эфирный экстракт промывали насыщенным раствором KHCO_3 (если в реакционной смеси имелаась кислота), насыщенным раствором NaCl , водой до pH 7 и сушили над Na_2SO_4 . Затем растворитель удаляли, а остаток сушили при 2 Па и 20°C.

Выделение пурпурных мембран [17], реконструкцию азолектиновых протеолипосом [14], получение апомембран [14, 18] проводили по ранее описанным методам. В специально указанных случаях дополнительно обрабатывали апомембраны боргидридом натрия ([19, методика 2] и β -циклодекстрином [13]).

Для электрических измерений препараты бактериородопсина и его аналогов в течение ~20 ч инкубировали с коллоидной пленкой, пропитанной декановым раствором липида (азолектина для протеолипосом [19, 20], а для пурпурных мембран — смесь лецитина и октадециламина (140:1) [21]). Установки для электрических измерений и флеш-фотолиза описаны нами ранее [21, 22]. Спектральные и электрические измерения

выполняли на одних и тех же препаратах хромопротеидов в среде, содержащей 100 мМ NaCl и 5 мМ MES (pH 6). Для освещения хромопротеидов использовали неодимовый лазер Quantel (Франция; $t_{\text{н}}=15$ пс, 532 нм, 50 мДж) и осветитель с галогенной лампой мощностью 100 Вт (тепловой фильтр — 2 см 5% водного раствора CuSO_4). Контролем во всех экспериментах служил препарат бактериородопсина, полученный из опсина апо-мембран и ретиналя.

Синтез аналогов ретиналя из кетоацетата C_{19}

Стандартная методика. К суспензии 1,2 г Mg (активированного подом) в 30 мл безводного эфира по капле в 1 с прибавляли раствор 50 ммоль галогенпроизводного в 20 мл эфира. Реакционную смесь далее кипятили 1 ч. При получении *трет*-бутильных и изопропильных производных к смеси при 0°C прибавляли 12,3 г SeCl_3 с последующим выдерживанием 1,5 ч при 0°C . К полученному Се-комплексу или реактиву Гриньяра при 0°C за 2 ч при интенсивном перемешивании прибавляли раствор 5 г кетоацетата C_{19} (XI) в 25 мл эфира и смесь выдерживали 1,5 ч при 20°C . Реакционную массу разлагали насыщенным раствором NH_4Cl и подвергали стандартной обработке, полученный продукт растворяли в 250 мл ацетона, добавляли 0,25 мл воды и нагревали при кипении 10 мин, после чего прибавляли 100 мкл 48% HBr . Через 5 мин прибавляли 2 мл насыщенного раствора NaHCO_3 и растворитель удаляли. Раствор остатка в гексане фильтровали через слой силикагеля, который затем промывали смесью гексан — эфир (1:1). Остаток объединенных фильтратов после упаривания разделяли с помощью полупрепаративной ВЭЖХ. Выходы полученных соединений приведены в табл. 1, а их физико-химические характеристики — в табл. 2.

1,1,3-Триметил-2-(3-метил-7-кето - 9,9 - диоксиметил-5-трет-бутилон-1,3-диенил)циклогекс-2-ен (XVIII). К суспензии 1,2 г Mg (активированного подом) в 30 мл абс. эфира по капле в 1 с прибавляли раствор 5,44 мл *трет*-бутилхлорида в 20 мл эфира; реакционную смесь далее кипятили 1 ч, охлаждали до 0°C и добавляли к ней раствор 5 г кетоацетата C_{19} (XI) в 25 мл эфира. После выдержки 1,5 ч при 20°C реакционную смесь разлагали насыщенным раствором NH_4Cl . Продукт, полученный после стандартной обработки, хроматографировали на колонке (500×30 мм) с силикагелем, элюируя линейным градиентом гексан — эфир (0—40%) (общий объем 840 мл). Выход 11,1 г (57%). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1720 с. ($\text{C}=\text{O}$), 1450 ср., 1364 ср., 1130, 1060 с. $-\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$. ^1H -ЯМР: 5,96 (2 H, с, H7; H8), 5,16 (1 H, д, J 10, H10), 4,75 (1 H, т, J 5,5, H15), 3,31 (6 H, д, $(\text{OCH}_3)_2$), 2,8, (1 H, м, H11), 2,65 (2 H, д, J 5,5, $-\text{CH}_2-$), 2,5 (2H, м, $-\text{CH}_2-$), 1,8 (3 H, д, J 2, C9- CH_3), 1,65 (3 H, с, C5- CH_3), 0,98 (6H, с, C4-(CH_3) $_2$), 0,84 (9 H, с, $(-\text{CCH}_3)_3$). Масс-спектр (m/z): 390 (M^+), $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_3$.

Оптимизация условий дегидратации с одновременным снятием ацетальной защиты. К раствору 2 г оксацетата (XVI) в 100 мл безводного ацетона прибавляли 0,1 мл воды, выдерживали при кипении 10 мин и отбирали первую пробу. Затем к кипящей реакционной смеси добавляли определенное количество 48% HBr (от 10 до 200 мкл), после чего отбирали пробы в течение 15 мин. Пробы (50 мкл) помещали в пробирку, содержащую некоторое количество порошка NaHCO_3 , полученную смесь высушивали в токе аргона и экстрагировали 0,2 мл гексана. Профильтрованный экстракт анализировали методом ВЭЖХ.

1,1,3-Триметил-2-(3-метил-8-формил-окт-1, 3, 5, 7-тетраенил)циклогекс-2-ен(13-дезметилретиналь) (XIX). К раствору 2,3 г (7 ммоль) кетоацетата C_{19} (XI) в смеси 25 мл метанола и 1 мл 0,3 н. водного раствора КОН при интенсивном перемешивании медленно прибавляли тонкодисперсный порошок NaBH_4 до исчезновения исходного вещества (XI) по данным ТСХ. Реакционную смесь подкисляли 10% HCl до pH 2, подщелачивали насыщенным раствором NaHCO_3 до pH 8 и подвергали стандартной обработке. К раствору оксацетата (XX) в 100 мл ацетона прибавляли 100 мкл воды,

выдерживали при кипячении 20 мин и добавляли 150 мкл 48% НВг. Через 10 мин реакционную смесь обрабатывали 3 мл насыщенного раствора NaHCO_3 , после чего растворитель удаляли. Остаток растворяли в эфире и подвергали стандартной обработке. Хроматографическое разделение на колонке (100×15 мм) с силикагелем при элюировании смесью гексан — эфир (1:1) позволило получить 1,42 г (76%) смеси 13-цис- и полностью-транс-изомеров (1:4,2) полиеналя (XIX). Окончательно изомеры разделяли полупрепаративной ВЭЖХ.

[Синтез аналогов ретиналя на основе альдегида C_{15}

1,1,3-Триметил-2-(3-метил-7-циклопропил-7-кетогепт-1, 3, 5-триенил)циклогекс-2-ен(13-циклопропил-13-дезметилкетон C_{18}) (XIII). При 0°С к раствору 1,0 г альдегида C_{15} (XV) и 1,4 мл циклопропилметилкетона в 150 мл пентана при перемешивании прибавляли 10 мл (2,6 ммоль) раствора трет-бутилата калия в пентане. После исчезновения исходного соединения (XV) реакционную смесь разлагали водой и подвергали стандартной обработке, раствор остатка в гексане пропускали через слой силикагеля, элюируя затем вещество смесью гексан — эфир (4:1). Выход 1,1 г (87%), масло. ИК-спектр (ν , см^{-1}): 2900 ср., 1640 ср. ($\text{C}=\text{O}$); 1560 с. ($\text{C}=\text{C}$), 1380 с., 1200 ср., 1080 с., 970 ср. УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ): 350 (30 000). ^1H -ЯМР: 7,66 (1 H, д, J 14,5, H11), 6,42 (1 H, д, J 16,0, H7), 6,32 (1 H, д, J 14,5, H12), 6,20 (1 H, д, J 11,3, H10), 6,18 (1 H, д, J 16, H8), 2,12 (1 H, м, $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 2,05 (3 H, с, C9-CH_3), 1,72 (3 H, с, C5-CH_3), 1,09 (2 H, м, $-\text{CH}_2-$), 1,03 (6 H, с, $\text{C1-(CH}_3)_2$), 0,91 (2 H, м, $-\text{CH}_2-$). Масс-спектр (m/z): 284 (M^+), $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}$.

1,1,3-Триметил-2-(3-метил-7-изобутил-7-кетогепт-2,3,5-триенил)циклогекс-2-ен(13-изобутил-13-дезметилкетон C_{18}) (XIV) получали аналогично циклопропилкетону (XIII) из 1,0 г альдегида C_{15} (XV) и 1,7 мл изобутилметилкетона. Выход 1,06 г (85%). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 2900 с., 1650 ср., ($\text{C}=\text{O}$), 1560 с. ($\text{C}=\text{C}$), 1360 ср., 1045 ср., 970 ср. УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ): 347,5 (32 000). ^1H -ЯМР: 7,68 (1 H, дд, J 14,5; 11,3, H11), 6,73 (1 H, д, J 16, H7), 6,36 (1 H, д, J 16, H8), 6,13 (1 H, д, J 14,5, H12), 6,06 (1 H, д, J 11,3, H10), 2,40 (2 H, д, J 6,5, $-\text{CH}_2-$), 2,16 (1 H, м, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,04 (3 H, с, C9-CH_3), 1,74 (3 H, с, C5-CH_3), 1,06 (6 H, с, $\text{C1-(CH}_3)_2$), 0,94 (6 H, д, J 6,5, $(\text{CH}_3)_2$). Масс-спектр (m/z): 300 (M^+), $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}$.

1,1,3-Триметил-2-(3-метил-7-трет-бутил-7-кетогепт-1, 3, 5-триенил)циклогекс-2-ен(13-трет-бутил-13-дезметилкетон C_{18}) (XII) получали аналогично циклопропилкетону (XIII) из 1,0 г альдегида C_{15} (XV) и 1,7 мл пинаколона. Выход 0,90 г (65%), масло. ИК-спектр (ν , см^{-1}): 2900 с., 1645 ср. ($\text{C}=\text{O}$), 1560 с. ($\text{C}=\text{C}$), 1360 ср., 1045 ср. УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ): 347 (28 500). ^1H -ЯМР: 7,75 (1 H, дд, J 15; 12, H11), 6,54 (1 H, д, J 15, H12), 6,38 (1 H, д, J 16, H8), 6,19 (1 H, д, J 12, H10), 6,16 (1 H, д, J 16, H7), 2,04 (3 H, с, C9-CH_3), 1,70 (3 H, с, C5-CH_3), 1,162 (9 H, с, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,01 (6 H, с, $\text{C1-(CH}_3)_2$). Масс-спектр (m/z): 300 (M^+), $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}$.

Стандартная методика проведения реакции Петерсона. К раствору 0,5 мл диизопропиламина в 10 мл абс. тетрагидрофурана при 0°С прибавляли раствор 3,5 ммоль *n*-бутиллития в пентане. Через 30 мин к реакционной смеси прибавляли раствор 0,6 г реагента Кори (XXI) в 5 мл тетрагидрофурана, выдерживали 15 мин, охлаждали до -70°C и прибавляли 3,4 ммоль соответствующего аналога кетона C_{18} (XII — XIV). Реакционную смесь нагревали до -10°C за 40 мин, добавляли 1 мл воды и 4 мл 10% муравьиной кислоты. Через 2 ч смесь подщелачивали до pH 8 насыщенным раствором NaHCO_3 , после чего реакционную массу обрабатывали по стандартной методике; раствор сырого продукта пропускали через слой силикагеля (4 см), элюируя далее альдегид смесью гексан — эфир (1:1). Выход смеси изомеров составил для 13-циклопропил-13-дезметилретиналя (IX) 0,58 г (60%), а для 13-изобутил-13-дезметилретиналя (X) 0,63 г (58%). В случае 13-трет-бутил-13-дезметилкетона C_{18} (XII) был выделен только продукт 1—4-присоединения (XXII). Выход 0,97 г (87%), масло. ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1730 с. (CHO); 1710 с. ($\text{C}=\text{O}$); 1560 ср. ($\text{C}=\text{C}$);

1360 ср. ¹H-ЯМР: 9,70 (1 H, т, J 2, CHO—), 6,06 (1 H, д, J 16, H8), 5,92 (1 H, д, J 16, H7), 5,18 (1 H, д, J 10, H10), 3,60 (1 H, м, H11), 2,60 (2 H, м, —CH₂—), 2,47 (2 H, м, —CH₂—), 1,85 (3 H, с, C9-CH₃), 1,64 (3 H, с, C5-CH₃), 1,10 (9 H, с, —C(CH₃)₃), 0,98 (6 H, с, C1-(CH₃)₂). Масс-спектр (*m/z*): 328 (*M*⁺), C₂₃H₃₆O₂.

Изомеры альдегидов (IX, X) выделяли полупрепаративной ВЭЖХ.

1,1,3-Триметил-2-(3-метил-7-трет-бутил-8-формил-окт-1, 3, 5, 7 - тетраенил)циклогекс-2-ен (13-трет-бутил-13-дезметилретиналь) (VI). К суспензии 52 мг промытого абс. пентаном NaH в 10 мл абс. диоксана прибавляли раствор 0,44 г диэтилфосфоацетонитрила (XXIV) в 5 мл диоксана. После 15 мин выдержки при 20°С прибавляли раствор 0,5 г 13-трет-бутил-13-дезметилкетона C₁₈ (XII) в 10 мл диоксана. Реакционную смесь кипятили 30 ч, а затем охлаждали до 0°С и добавляли к ней 10 мл насыщенного раствора NH₄Cl. Полученный продукт после стандартной обработки растворяли в 10 мл пентана, раствор охлаждали до -60°С и прибавляли к нему раствор 2,21 моль динзобутилалюминийгидрида в 2 мл толуола. Реакционную массу нагревали до -20°С за 20 мин и прибавляли к ней 10 мл насыщенного раствора NH₄Cl. Полученный после стандартной обработки остаток разделяли полупрепаративной ВЭЖХ. Выход 27 мг (5%), масло.

Авторы выражают глубокую благодарность В. П. Скулачеву за постоянное внимание к работе и ценные советы при обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мицнер Б. И., Ходонов А. А., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 5-53.
2. Balogh-Nair V., Nakanishi K. // Meth. Enzymol. 1982. V. 88. P. 496-506.
3. Crouch R. K. // Photochem. Photobiol. 1986. V. 44. № 6. P. 803-807.
4. Fang J.-M., Carriker J. D., Balogh-Nair V., Nakanishi K. // J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 5162-5164.
5. Chang C. H., Govindjee R., Ebrey T., Bayley K. A., Dollinger G., Eisenstein L., Margue J., Roder H., Villitow J., Fang J., Nakanishi K. // Biophys. J. 1985. V. 47. № 6. P. 502-512.
6. Sheves M., Friedman N., Albeck A., Ottolenghi M. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 7. P. 1260-1265.
7. Gartner W., Towner P., Hopf H., Oesterheld D. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 11. P. 2637-2644.
8. Imamoto T., Takiyama N., Nakamura K. // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. № 39. P. 4763-4766.
9. Peterson D. J. // J. Org. Chem. 1968. V. 33. № 6. P. 780-794.
10. Pardo J. A. Synthesis of ¹³C and ²H labelled retinals spectroscopic investigation in isotopically labelled rhodopsin and bacteriorhodopsin. Leiden: ICG Printing-press, 1986.
11. Ernst L., Hopf H., Krause N. // J. Org. Chem. 1987. V. 52. № 3. P. 398-405.
12. de Lera A. R., Okamura W. H. // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 26. P. 2924-2924.
13. Мицнер Б. И., Варга М., Швеи В. И., Хитрина Л. В., Драчев Л. А., Скулачев В. П., Данишина С. В., Чекулаева Л. Н. // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. № 2. С. 135-137.
14. Драчев Л. А., Зорина В. В., Мицнер Б. И., Хитрина Л. В., Ходонов А. А., Чекулаева Л. Н. // Биохимия. 1987. Т. 52. № 9. С. 1559-1569.
15. Trissl H.-W., Gartner W. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 2. P. 751-758.
16. Towner P., Gartner W., Walckoff B., Oesterheld D., Hopf H. // FEBS Lett. 1980. V. 117. № 3. P. 363-367.
17. Oesterheld D., Stoeckenius W. // Meth. Enzymol. 1982. V. 88. P. 349-355.
18. Dencher N. A., Rafferty C. N., Sperling W. // Ber. Kerhforsch. Jülich. 1976. № 1347. S. 1-42.
19. Драчев Л. А., Драчев Л. А., Евстигнеева Р. П., Каулен А. Д., Лазарова Ц. Р., Лайхтер А. Л., Мицнер Б. И., Скулачев В. П., Хитрина Л. В., Чекулаева Л. Н. // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. № 11. С. 1125-1142.
20. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П. // Молекуляр. биология. 1977. Т. 11. С. 1377-1387.
21. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П., Хитрина Л. В., Чекулаева Л. Н. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 5. С. 897-903.
22. Хитрина Л. В., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Чекулаева Л. Н. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 11. С. 1762-1772.
23. Gartner W., Oesterheld D., Vogel J., Maurer R., Schneider S. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 9. P. 3497-3502.

Поступила в редакцию
24.II.1989

PHOTOCYCLE AND ELECTROGENESIS OF BACTERIORHODOPSIN
ANALOGUES CONTAINING C13-MODIFIED ANALOGUES
OF RETINAL WITHIN THE CHROMOPHORE CENTRE

EREMIN S. V., MITSNER B. I., DANSHINA S. V.*, DRACHEV L. A.**,
KAULEN A. D.**, KHITRINA L. V.**

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

** Biological Physics Institute of the USSR Academy of Sciences, Pushchino;*

*** A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry, Moscow State University*

Two approaches to C13-substituted analogues of retinal, based on the interaction of ketoacetal C₁₉ with Grignard reagents or on the aldol condensation of aldehyde C₁₅ with methylketones followed by elongation of the polyene chain by C₂ fragment, are proposed. 13-Deutero-, 13-ethyl-, 13-isopropyl-, 13-cyclopropyl-, 13-n-butyl-, 13-isobutyl-, 13-tert-butyl-, 13-phenyl-, 13-naphtyl- and 13-desmethylretinals have been synthesised and then transformed by means of apomembranes from *Halobacterium halobium*, into the corresponding analogues of bacteriorhodopsin. Both an increase of the C13-substituent's dimension and its absence proved to result in the deceleration of the photocycle M-intermediate decay, disturbance of 13-*cis*→13-*trans* isomerisation and decrease of the photoelectric response amplitude.