



УДК 547.953:577.336

ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОВ*Шрагин А. С., Кузьмина Ю. В., Борин М. Л.*,
Капун А. П., Швец В. И.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова;
Научно-исследовательский институт физико-химической медицины, Москва

На основе модифицированных фосфатидилхолинов с использованием фосфолипазы D из шпината получены фосфатидилинозиты, содержащие антроильную, антрильную, пирещильную и имоксильную метки в области жирнокислотных остатков. Структура полученных соединений доказана физико-химическими, химическими и ферментативными методами. Показано, что перенос фосфатидильного остатка с холина на инозит происходит стереонаправленно и конфигурация полученных соединений идентична природной.

Исследование роли фосфолипидов в функционировании биологических мембран показало необходимость дифференцированного подхода к изучению поведения не только липидов различных классов, но и их различных молекулярных образцов. Выделение молекулярных образцов фосфолипидов из природных источников может быть осуществлено в основном лишь с использованием ВЭЖХ, которая в настоящее время не может считаться препаративным методом. Единственным путем получения фосфолипидов всех классов с заданным набором жирных кислот остается синтетический. Кроме того, широкое применение липидных зондов требует получения фосфолипидов, содержащих меченые жирные кислоты с флуоресцентными, спиновыми и фотоаффинными группами.

Для получения фосфолипидов с определенным жирнокислотным составом чаще всего используется введение соответствующей кислоты в молекулу лизофосфолипидов либо их дезацелированных производных. Этот метод наиболее прост в случае синтеза фосфатидилхолинов, тогда как для всех остальных классов фосфолипидов, содержащих функциональные группы, требуется введение защитных группировок и их удаление в конце синтеза. На основе фосфатидилхолинов могут быть получены фосфолипиды других классов, например фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилглицерина, реакцией трансфосфатидилирования с использованием фосфолипазы D [1].

Инозитсодержащие глицерофосфолипиды относятся к числу труднодоступных фосфолипидов, что обусловлено их невысоким содержанием в биологических мембранах и лабильностью. Химический синтез фосфоинозитидов отличается значительной трудоемкостью, связанной со сложностью получения асимметрично замещенных производных *мио*-инозита [2]. До последнего времени фосфатидилинозиты не были получены указанным выше полусинтетическим путем, поскольку используемая обычно фосфолипаза D из капусты не обладает способностью перенести фосфатидильный остаток на *мио*-инозит. В то же время потребность в модифицированных фосфоинозитидах возросла в связи с активным изучением роли инозитсодержащих липидов в процессах клеточной регуляции [3].

Цель данной работы — синтез ряда фосфатидилинозитов, содержащих модифицированные жирные кислоты во втором положении глицеринового скелета*.

На основе модифицированных фосфатидилхолинов (I)–(IV) нами были получены фосфатидилинозиты (XI)–(XIV) с остатками 11-(2-ан-

* Предварительное сообщение см. [4].

троил)упдекановой, 9(10)-антрилстеариновой, 9(10)-(4-пиренил)стеариновой, 12-имоксилстеариновой кислот, а также фосфатидилинозит (XV) с жирнокислотным составом, соответствующим яичному фосфатидилхолину (V). Реакция трансфосфатидилирования проводилась с использованием препарата фосфолипазы D из шпината (ИФ 3.1.4.4), обладающей способностью использовать *мио*-инозит в качестве акцептора фосфатидильного остатка [5].

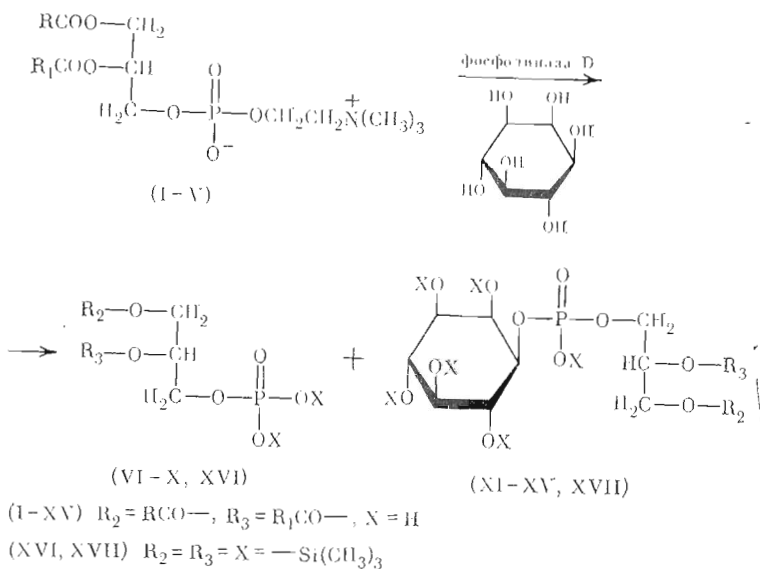
Синтез меченых фосфатидилхолинов осуществляли двумя различными путями: 1) антроил- (I) и имоксил- (IV) меченые фосфатидилхолины были получены ацилированием лизофосфатидилхолина имидазолидами соответствующих кислот; 2) антрил- (II) и пиренил- (III) меченые фосфатидилхолины синтезированы прямым введением метки в молекулу природного фосфолипида по двойной связи ненасыщенных жирных кислот [6].

В литературе описан синтез единственного флуоресцентного аналога фосфатидилинозита с остатком паринаровой кислоты [7]. Он получен на основе природного фосфатидилинозита в четыре стадии с незначительным выходом. Предлагаемый нами метод позволяет в две стадии получать флуоресцентные фосфатидилинозиты на основе яичного фосфатидилхолина. Спектры флуоресценции всех фосфатидилинозитов с флуоресцентными группами аналогичны таковым для предшествующих фосфатидилхолинов.

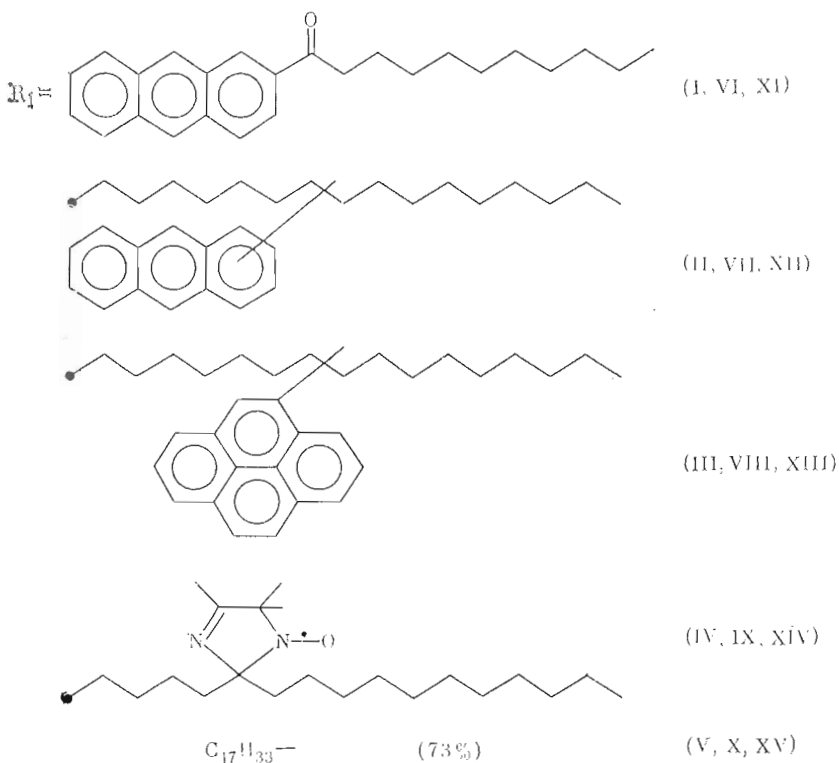
Получение полусинтетическим путем спин-меченых фосфолипидов, отличных от фосфатидилхолина и содержащих наиболее употребительную спиновую метку, докисильную, в гидрофобной области ранее представляло трудности, обусловленные кислотолабильностью этой метки. Использование имоксильной метки [8], устойчивой при низких значениях pH, позволяет провести реакцию перефосфатидилирования с 1-ацил-2-(12-имоксилстеарилоил)-*sn*-глицеро-3-фосфохолином (IV) и получить с хорошим выходом спин-меченый фосфатидилинозит (XIV).

При инкубации фосфатидилхолинов (I)–(V) с препаратом фосфолипазы D в присутствии 80-кратного мольного избытка *мио*-инозита наблюдалось образование двух типов соединений липидной природы: (VI)–(X) и (XI)–(XV) (схема 1). Их хроматографическая подвижность в различных системах соответствовала таковой для фосфатидилинозита, выделенного из дрожжей [9], и фосфатидовой кислоты. Соединения (VI)–(VIII) и (XI)–(XIII) обладали флуоресценцией, соответствующей исходным фосфатидилхолинам (I)–(III). Положительную реакцию на фосфат вещества (VI)–(XV) давали при обработке молибденовым синим; соединения (XI)–(XV) давали положительную реакцию при обработке реагентом периодат натрия – бензидин, что характерно для полиольной системы.

Схема 1



$R = C_{17}H_{35}$ (28%), $C_{15}H_{31}$ (70%)

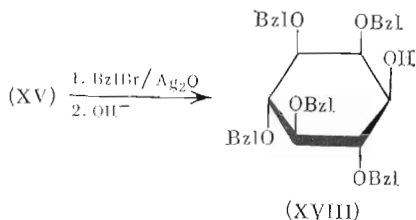


Для доказательства строения соединений (VI)–(X) и (XI)–(XV) после выделения их хроматографией на силикагеле были получены триметилсилильные производные (XVI), (XVII) продуктов их дезацилирования путем мягкого щелочного гидролиза и последующего триметилсилилирования. В масс-спектрах полученных производных наблюдались пики характерных осколочных ионов [10]. Данные масс-спектрометрии подтверждают образование фосфатидилинозита и фосфатидовой кислоты в ходе инкубации.

Строение меченых фосфатидилинозитов (XI)–(XIII) подтверждалось полным их гидролизом специфичной к фосфатидилинозиту фосфолипазой С из двух различных источников: *Bacillus cereus* и микросом головного мозга крысы [11]. В результате гидролиза образовывались флуоресцентно-меченые 1,2-диацил-*sn*-глицерин; в аналогичных условиях соответствующие фосфатидилхолины и фосфатидовые кислоты не расщеплялись.

При переносе фосфатидильного остатка с холина на *мио*-инозит теоретически возможно образование шести изомеров фосфатидилинозита. Для установления конфигурации образующегося при трансфосфатидилирования замещенного *мио*-инозита нами была проведена химическая модификация полученного фосфатидилинозита (XV). Бензилированием гидроксигруппы и последующим щелочным гидролизом из него был получен 2,3,4,5,6-пента-*O*-бензил-*sn*-*мио*-инозит (XVIII) (схема 2), структура которого подтверждалась совпадением угла оптического вращения и температуры плавления этого вещества с константами образца, полученного синтетическим путем [12]. Таким образом, образующийся при трансфосфатидилировании фосфатидил-*мио*-инозит имеет конфигурацию 1-*O*-фосфатидил-*sn*-*мио*-инозита, соответствующую природной [13], что говорит о стереонаправленности ферментативной реакции, катализируемой фосфолипазой D из шпината.

Приведенные данные свидетельствуют о возможности использования препарата фосфолипазы D из шпината для получения модифицированных фосфатидилинозитов. Введение меток в область жирнокислотных остатков



не влияет на способность фермента катализировать перенос фосфатидильного остатка на *мио*-инозит. Реакция протекает стереонаправленно, конфигурация образующихся фосфатидилинозитов идентична природной.

Синтезированные аналоги фосфатидилинозита с флуоресцентными и спиновой метками могут быть использованы в качестве зондов при исследовании изменений структуры мембран, происходящих в процессе фосфоинозитидного ответа [3]. Вероятно, модифицированные фосфатидилинозиты могут не включаться в метаболизирующий пул фосфоинозитидов, отличающийся высоким содержанием образцов с остатками арахидоновой кислоты. В то же время представляется возможной регистрация изменения состояния общего пула фосфоинозитидов и связанных с ним белков.

Экспериментальная часть

Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре Aminco-SPF-500 (США), УФ-спектры — на спектрофотометре Hitachi ESP-3T (Япония), масс-спектры — на приборе Varian MAT-311A (США). Спектры ЭПР регистрировали на радиоспектрометре Varian E-4 (США) при микроволновой мощности 10 мВт, амплитуде высокочастотных колебаний 0,1 мТ, развертке магнитного поля 2,5 мТ/мин, постоянной времени 1 с.

Углы вращения определяли на поляриметре Perkin — Elmer 243 (Швеция) в хлороформе. Температуры плавления измерены на блоке Кофлера и не исправлены.

ТСХ осуществляли на силуфоле Merck (ФРГ) в системах: хлороформ — метанол — 19% аммиак, 13 : 7 : 1 (А), хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 25 : 15 : 4 : 2 (Б), петролейный эфир — эфир, 1 : 1 (В). Обнаружение веществ проводили молибденовым синим, облучением в УФ-свете либо прокаливанием.

Фосфолипаза С, специфическая к фосфатидилинозиту (КФ 3.1.4.10), из *Bacillus cereus* получена в НИО «Фермент» (Вильнюс); из микросом мозга крысы выделена А. А. Селицовой (биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова).

Препарат фосфолипазы D из шината получали по методике [5]. Антроилмеченый (I) [14], антрил- (II) и пиренил- (III) меченые [6], а также иноксилмеченый (IV) [8] фосфатидилхолины получали как описано ранее.

1-О-(1-Ацил-2-[11-(2-антроил)ундеканойл]-sn-глицеро-3-фосфо) - sn-мио-инозит (XI); 1-ацил-2-[11-(2-антроил)ундеканойл] - sn - глицеро - 3-фосфат* (VI). В колбу загружали раствор 13,4 мг фосфатидилхолина (I) в 1 мл эфира, 0,3 мл 20% раствора *мио*-инозита в 0,2 М ацетатном буфере (рН 5,6); раствор 7 мг препарата фосфолипазы D в 1 мл воды и 0,05 мл 0,1 М CaCl₂. Смесь встряхивали 4 ч при 20°С, реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 0,1 М HCl. Эфир упаривали, добавляли 5 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1), водно-метанольную фракцию промывали 2 мл хлороформа. Объединенные хлороформные фракции упаривали, из остатка препаративной ТСХ на силикагеле L40/100 мкм в системе А выделяли 5,2 мг (37%) фосфатидилинозита (XI) (*R_f* 0,27 (А), 0,65 (Б); $[\alpha]_D^{20}$ -5,6° (с 0,1); УФ-спектр, λ, нм: 328, 362, 404; спектр флуоресцен-

* Названия инозитсодержащих соединений даны в соответствии со стереоспецифичной номенклатурой [15].

ции ($\lambda_{\text{возб}}$ 265 нм): 463 нм (метанол)), а также 5,9 мг (41%) фосфатидовой кислоты (VI) (R_f 0,74 (A), 0,95 (B)); $[\alpha]_D^{20} -2,1^\circ$ (с 0,1)). Масс-спектры триметилсилильных производных продуктов дезацилирования: (XVII) m/z 766 ($M-2(\text{CH}_3)_3\text{Si}$); (XVI) m/z 280 ($M-2(\text{CH}_3)_3\text{Si}$), 253 ($\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OSi}(\text{CH}_3)_3)_2$), 225 ($\text{PO}(\text{OSi}(\text{CH}_3)_3)_2$).

1-О-(1-Ацил-2-(9(10)-антрилстеароил) - sn - глицеро-3-фосфо)-sn-мио-инозит (XII); *1-ацил-2-(9(10)-антрилстеароил)-sn-глицеро-3-фосфат* (VII). По методике, аналогичной предыдущей, из 6,4 мг фосфатидилхолина (II) получали 2,1 мг (42%) фосфатидилинозита (XII) (R_f 0,27 (A); 0,65 (B)); $[\alpha]_D^{20} +7,1^\circ$ (с 0,1); УФ-спектр, λ , нм: 258, 335, 350, 366, 385; спектр флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}}$ 360 нм), нм: 389, 408 (этанол)), а также 3,3 мг (58%) фосфолипида (VII) (R_f 0,95 (B)); $[\alpha]_D^{20} +1,5^\circ$ (с 0,1)).

1-О-(1-Ацил-2-[9(10)-(4-пиренил)стеароил]-sn-глицеро-3-фосфо)-sn-мио-инозит (XIII); *1-ацил-2-[9(10)-(4-пиренил)стеароил]-sn-глицеро-3-фосфат* (VIII). По методике, аналогичной предыдущей, из 10 мг фосфолипида (III) получали 1,5 мг (13%) фосфатидилинозита (XIII) (R_f 0,27 (A)); УФ-спектр, λ , нм: 236; 245, 267, 278, 315, 329; спектр флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}}$ 342 нм): 376, 398 нм (этанол)) и 60 мг (70%) фосфатидиловой кислоты (VIII), R_f 0,75 (A).

1-О-(1-Ацил-2(12-имоксилстеароил)-sn-глицеро-3-фосфо)-sn-мио-инозит (XIV); *1-ацил-2-(12-имоксилстеароил) - sn-глицеро-3-фосфат* (IX). По методике, аналогичной предыдущей, из 12 мг соединения (IV) получали 2,9 мг (30%) фосфатидилинозита (XIV), R_f 0,28 (A) (спектр ЭПР 10 мМ раствора в этаноле: триплет a_0 14,5 мТ, $5,1 \cdot 10^{23}$ спин/моль), а также 1,1 мг (14%) фосфолипида (IX), R_f 0,77 (A).

1-О-(1,2-Диацил - sn - глицеро-3-фосфо)-sn-мио-инозит (XV); *1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфат* (X). По методике, аналогичной предыдущей, из 200 мг яичного фосфатидилхолина (V) получали 54 мг (26%) соединения (XV), R_f 0,27 (A), и 32 мг фосфатидовой кислоты (X), R_f 0,74 (A). Продукты реакции выделяли колоночной хроматографией на силикагеле L 40/100 в системе А.

Триметилсилильные производные 1-О-(sn-глицеро-3-фосфо)-sn-мио-инозита (XVII) и *sn-глицеро-3-фосфата* (XVI). 5 мг соединения (XV) или (X) растворяли в 5 мл смеси хлороформ — метанол, 1:4, добавляли 1 мл 1,2 М NaOH в смеси метанол — вода, 1:1. Смесь выдерживали 10 мин при 37°С, охлаждали до 0°С и нейтрализовали 1,5 мл 1 М CH_3COOH , затем добавляли 2 мл воды, 1 мл изобутанола и 2 мл смеси хлороформ — метанол, 9:1, после чего центрифугировали 20 мин при 3000g. Водный слой обрабатывали 10 мин дауэксом 50W×8 (H^+), после удаления смолы фильтрат лиофилизировали. Сухой остаток растворяли в 1 мл смеси N,О-бис(триметилсилил)ацетамид — сухой пиридин — триметилхлорсилан, 198:100:2.

2,3,4,5,6-Пента-О-бензил-sn-мио-инозит (XVIII). 40 мг фосфатидилинозита (XV) растворяли в 2 мл хлороформа, добавляли 100 мг свежеприготовленной окиси серебра, 100 мг драйерпта и перемешивали 1 ч в темноте. Затем добавляли 0,2 мл бромистого бензила. Через 24 ч реакционную смесь отфильтровывали, к фильтрату добавляли 1 мл 1 М метанольного NaOH. Смесь перемешивали 30 мин, добавляли 1 г дауэкса 50W×8 (H^+) и выкубирили 15 мин. Смолу отфильтровывали, фильтрат упаривали. Соединение (XVIII) выделяли препаративной ТСХ на силикагеле в системе В, выход 16 мг (83%), R_f 0,38 (B), $[\alpha]_D^{20} -14,0^\circ$ (с 0,1); т. пл. 59–60°С (гексан). По данным [12]: $[\alpha]_D^{20} -43,8^\circ$; т. пл. 60°С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Препаративная биохимия липидов/Ред. Бергельсон Л. Д. М.: Наука, 1981, с. 167.
2. Stepanov A. E., Shvets V. I. Chem. and Phys. Lipids, 1979, v. 25, № 3, p. 247–263.
3. Nishizuka Y. Science, 1984, v. 225, № 4668, p. 1365–1370.
4. Капалун А. П., Шрагин А. С., Лютик А. И., Швець В. И., Востигнеева Р. П. Докл. АН СССР, 1983, т. 273, № 2, с. 350–351.
5. Manual S. B., Sen P. S., Chaktabarty P. Phytochemistry, 1980, v. 19, № 6, p. 1661–1664.

6. Богомолов О. В., Якунина Н. Б., Каплун А. П., Швец В. И., Евстигнеева Р. П. Докл. АН СССР, 1984, т. 279, № 2, с. 383.
7. Somerharju P., Wirtz K. W. A. Chem. and Phys. Lipids, 1982, v. 30, № 1, p. 81-91.
8. Борин М. Л., Давиденко Н. П., Швец В. И., Кедик С. А., Володарский Л. В. Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 10, с. 1423-1425.
9. Trevelyan W. E. J. Lipid Res., 1966, v. 7, № 3, p. 445-447.
10. Cicero T. J., Sherman W. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1971, v. 42, № 2, p. 428-433.
11. Hirasawa K., Irvin R. F., Dawson R. M. C. Biochem. J., 1982, v. 205, № 2, p. 437-442.
12. Shvets V. I., Klyashchitskii B. A., Stepanov A. E., Evstigneeva R. P. Tetrahedron, 1973, v. 29, № 2, p. 331-340.
13. Евстигнеева Р. П., Звонова Е. П., Серебренникова Г. А., Швец В. И. Химия липидов. М.: Химия, 1983, с. 25.
14. Каплун А. П., Башарули В. А., Швец В. И. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1567-1568.
15. Кляцицкий В. А., Швец В. И. Журн. орган. химии, 1969, т. 5, № 1, с. 192-193.

Поступила в редакцию
25.IV.1985
После доработки
10.VI.1985

SEMI-SYNTHESIS OF MODIFIED PHOSPHATIDYLINOSITOLS

SHRAGIN A. S., KUZMINA Ju. V., BORIN M. L.*, KAPLUN A. P., SHVETS V. I.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;
* Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow*

Modified phosphatidylinositols with anthroyl, anthryl, pyrenyl and imoxyl labels have been synthesized on the basis of phosphatidylcholines using phospholipase D from spinach. Phosphatidyl residue transfer from choline to myoinositol was found to proceed stereospecifically, so that the semisynthetic phosphatidylinositols have the natural configuration.