



УДК 547.952'672.2.057 : 577.352.2 : 577.336

СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ГЛИКОСФИНГОЛИПИДОВ

Имбе А. Б., Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д.

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

Синтезированы два флуоресцентномеченых лактозилцерамида с различным расстоянием между флуорофором и полярной головкой: N-[*транс*-12-(9-антрил)-11-додецеиноил]- и N-[5-(9-антрил)-4-пентеноил]-1-O-β-лактозилсфингозин. Получен также флуоресцентномеченый галактозилцерамид: N-[5-(9-антрил)-4-пентеноил]-1-O-β-галактозилсфингозин.

Гликосфинголипиды, являясь носителями антигенных свойств клеточной поверхности, участвуют в рецепции вирусов, токсинов, липопротеинов крови и других веществ. Гликолипиды участвуют также в процессах межклеточного взаимодействия, при этом галактозилные и лактозилные производные ведут себя различным образом [1]. Один из перспективных путей изучения молекулярной организации гликосфинголипидов в плазматических мембранах заключается в применении флуоресцентных аналогов природных гликосфинголипидов.

Ранее мы сообщали о синтезе флуоресцентномеченых галактозилцерамидов с остатками *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценовой и 9-(3-перилеиноил)нонановой кислот [2]. Чтобы иметь набор липидспецифических флуоресцентных зондов, мы в настоящей работе использовали этот подход для получения лактозилцерамидов. В качестве флуоресцентномеченой кислоты, остаток которой вводится в молекулу гликолипидного зонда, мы применили не только *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценовую кислоту [3], общая длина которой примерно соответствует алифатической кислоте C₁₆*, но и более короткую кислоту — 5-(9-антрил)-4-пентеновую [4], примерно соответствующую по длине цепи нонановой кислоте. Исследование мембран с помощью зондов, отличающихся друг от друга только расстоянием между меткой и полярной головкой, предполагает различную глубину погружения флуорофора в бислой, что позволяет получать более полную информацию о поведении липидов данного класса и о характере их взаимодействия с мембранными белками.

Целью настоящей работы явился синтез лактозилцерамидов (VIa) и (VIб), содержащих соответственно остаток *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценовой и 5-(9-антрил)-4-пентеновой кислот (схема 1). Кроме того, остаток последней кислоты был введен в галактозилцерамид (VIII) (схема 2), который, таким образом, дополняет набор синтезированных нами ранее [1] флуоресцентных галактозилцерамидов. Полученная нами 5-(9-антрил)-4-пентеновая кислота представляла собой смесь *цис*- и *транс*-изомеров в соотношении 3 : 1; ее флуоресцентные параметры близки к параметрам чистого *транс*-изомера [4].

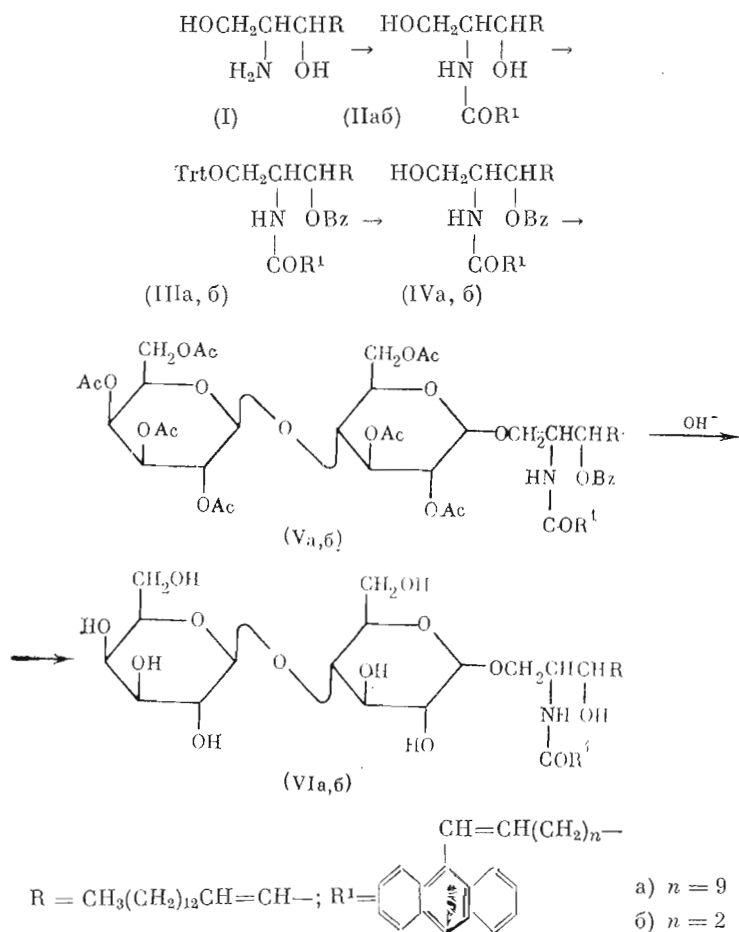
Первоначально предполагалось синтезировать лактозилцерамиды (VIa, б) N-ацилированием флуоресцентномеченой кислотой, 1-O-лактозилсфингозина по методу [5], однако выделить целевые соединения нам не удалось. При попытках одновременного удаления защитных групп от соответствующего нонаацетильного или N-дихлорацетил-О-октаацетильного производного щелочным гидролизом происходило отщепление остатка галактозы.

* Имеется в виду пальмитиновая кислота, длина цепи которой условно принимается равной длине флуоресцентномеченой кислоты, т. е. ее алифатической цепи вместе с флуорофором (сравнение проведено на моделях).

Другие N-защитные группы, устойчивые в условиях проведения реакции Кенигса—Кнорра, например бензилоксикарбонильная, требуют для своего удаления более жестких условий [6], поэтому мы их не применяли.

Синтез лактозилцерамидов (VIa, б) мы провели по модифицированной схеме, предложенной Шапиро [6] (схема 1).

Схема 1



Сфингозин (I), полученный кислотным метанолизом галактозилцерамида из бычьего мозга, ацилированием флуоресцентномечеными жирными кислотами переводили в соответствующие церамиды (IIa, б). Церамид с остатком *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценовой кислоты (IIa) получали методом активированных эфиров [7] с использованием ее *n*-нитрофенилового эфира с выходом 77%. Более удачным представляется способ конденсации кислоты и сфингозина в присутствии дициклогексилкарбодиимида (DCC) и 1-гидроксибензотриазола. В данном случае при ацилировании сфингозина (I) 5-(9-антрил)-4-пентеновой кислотой выход церамида (IIб) составил 90%. Предлагаемый вариант позволяет проводить N-ацилирование в одну стадию и с большим выходом, чем в случае использования активированных эфиров или хлорангидридов кислот.

Строение церамидов (IIa, б) было подтверждено данными масс-спектрометрии (здесь и далее метод химической ионизации, NH_3). В масс-спектре церамида (IIa) присутствовали интенсивные пики ионов с m/z 657 ($[M + 2]^+$) и 639 ($[M + 2 - 18]^+$); увеличение массы молекулярного иона на две единицы в результате присоединения двух протонов — нередкое явление для масс-спектров гликосфинголипидов [8]. В спектре церамида (IIб) присутствует в основном интенсивная группа пиков ионов $[M + H]^+$ и $[M + H - \text{H}_2\text{O}]^+$.

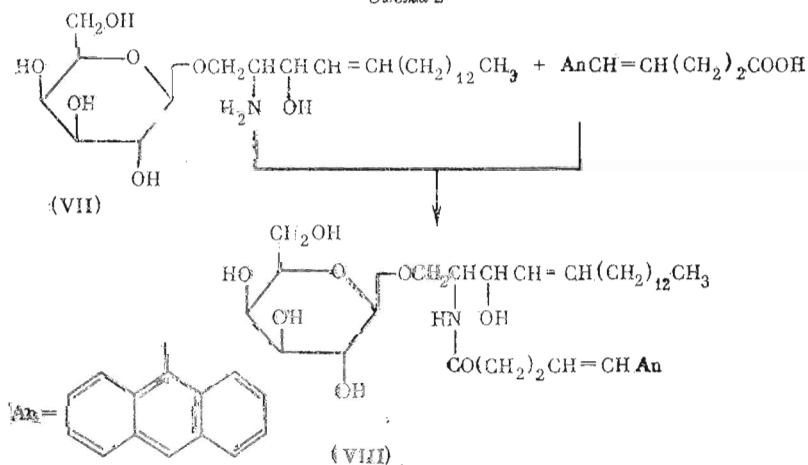
Для получения 3-О-бензоилцерамидов (IVa, б) церамиды (IIa, б) тритилировали по первичной HO-группе и затем соответствующие тритильные производные бензоилировали. Снятие тритильной защиты мы осуществляли действием трехфтористого бора в метаноле [9]. Основное преимущество этого способа заключается в образовании меньшего числа побочных продуктов по сравнению с традиционным использованием 90% уксусной кислоты [5, 6]. Указанные стадии — тритилирования, бензоилирования и детритилирования — проведены нами без выделения промежуточных соединений, что позволило получить 3-О-бензоилцерамиды (IVa, б) с выходом 33%. Вместо бензоатов (IVa, б) мы пытались использовать соответствующие ацетильные производные, которые легко получают ацетилированием церамидов (IIa, б) уксусным ангидридом с последующим избирательным удалением ацетильной группы у C1 по методу [10]. Однако такая попытка не дала желаемого результата: в условиях реакции Кенигса—Кнорра происходила частичная C3 → C1-миграция CH_3CO -группы, что привело к смеси изомерных ацетилированных 1-О- и 3-О-лактозилцерамидов. Гликозилирование церамидов (IIa, б) ацетобромлактозой по методу [11] без защиты вторичного гидроксила сфингозина протекало неселективно с образованием смеси 1-О- и 3-О-изомеров.

Гликозилирование 3-О-бензоилцерамидов (IVa, б) проводили по реакции Кенигса—Кнорра в модификации Гельфериха с помощью ацетобромлактозы в присутствии цианида ртути. Для удаления защитных групп бензоилцерамиды (IVa, б) обрабатывали водной щелочью, поскольку при использовании метилата натрия в метаноле, как рекомендовано в работе [5], 3-О-бензоильная защита удаляется не полностью.

Индивидуальность полученных лактозилцерамидов подтверждали методами высокоэффективной ТСХ и ВЭЖХ. Мы не исследовали конфигурацию образовавшейся гликозидной связи, однако Шапиро и другие установили, что в аналогичных условиях образуется в основном β -аномер (примесь α -аномера составляет менее 10%) [5, 6]. Поэтому мы полагаем, что полученные нами гликолипиды (VIa, б) являются в основном β -аномерами.

Церебозид (VIII) был получен по методу, аналогичному применявшемуся ранее [1] (схема 2): психозин (VII) ацилировали 5-(9-антрил)-4-пентеновой кислотой в присутствии DCC и 1-гидроксibenзотриазола:

Схема 2



Масс-спектры незащищенных лактозилцерамидов (VIa, б) показали наличие фрагментов концевой галактозы (m/z 180), лактозы (m/z 325), церамидной части молекулы (m/z 566 и 654), а также глюкозилцерамидного остатка (m/z 702 и 800) для лактозилцерамидов (VIб) и (VIa) соответственно. Интересно, что масс-спектры веществ, полученных исчерпывающим метилированием с помощью диметилнатрия и иодистого метила [12] соединений (VIa, б), (VIII), содержат группу минорных пиков, соответст-

вующих ионам с величинами m/z , большими, чем молекулярный (для сполна метилированного лактозилцерамида): $[M + 14]^+$, $[M + 28]^+$, $[M + 42]^+$, $[M + 56]^+$, что, по-видимому, объясняется метилированием антрильного остатка (ср. [13]).

В масс-спектре галактозилцерамида (VIII) присутствовала группа ионов $[M - H_2O + H]^+$, $[M + H]^+$, $[M + 17]^+$ (m/z 702, 720, 737), а также характеристические ионы $[M - 179]^+$, $[M - 539]^+$, соответствующие церамидной и углеводной частям молекулы.

По своим флуоресцентным свойствам гликолипид (VIa) близок к *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценовой кислоте; спектр возбуждения имеет максимумы при 350, 368 и 386 нм ($\lambda_{исп}$ 430 нм), а спектр испускания — 412 и 430 нм ($\lambda_{возб}$ 370 нм) (в этаноле). В свою очередь гликолипиды (VIb) и (VIII) близки к 5-(9-антрил)-4-пентеновой кислоте [4]: для спектра возбуждения характерны максимумы при 350, 367 и 386 нм ($\lambda_{исп}$ 420 нм), для спектра испускания — 400 и 420 нм ($\lambda_{возб}$ 370 нм) (в этаноле).

В связи с этим можно надеяться, что предлагаемые нами новые флуоресцентные зонды гликолипидной природы вместе с синтезированными ранее [1] представляют дополнительные возможности для изучения поведения гликолипидов в составе биологических мембран.

Экспериментальная часть

Все работы с флуоресцентными веществами выполняли при рассеянном свете ламп накаливания. В синтезе использовали *n*-нитрофенол (Apolde, ГДР), *N,N'*-дициклогексилкарбодимид (Reanal, ВНР), 1-гидроксibenзотриазол и *D*-(+)-лактозу (Fluka, Швейцария). 1- β -О-Галактозилсфингозин из цереброзида бычьего мозга получали по методу [14]. Сфингозин получали кислотным метанолизом цереброзидов бычьего мозга [14] по методу [15]; содержит 98% сфингенина. Состав сфингозиновых оснований анализировали методом ГЖХ в виде триметилсилиловых эфиров (колонка 2500×3 мм с 3% OV-1 на хромосорбе WHP 100—120; температура 224° С, скорость гелия 40 мл/мин; детектор пламенно-ионизационный). *n*-Нитрофениловый эфир *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценовой кислоты синтезировали как описано ранее [6]. Гептаацетобромлактозу получали ацетилированием лактозы с последующей обработкой октаацетата НВг в CH_3COOH [16]. Для колоночной хроматографии применяли силикагель 5/40 мкм (Chemapol, ЧССР), отмытый от мелких фракций и активированный в течение 24 ч при 120° С, и окись алюминия III степени активности по Брокману, для ТСХ — силикагель Н (Merck, ФРГ) с 5% гипса. Хроматограммы проявляли в следующих системах растворителей: хлороформ—ацетон, 3 : 2 (А); толуол — этилацетат, 1 : 1 (Б); хлороформ — метанол — вода, 80 : 19 : 1 (В); хлороформ — метанол, 5 : 1 (Г). Вещества обнаруживали в УФ-свете и опрыскиванием хроматограмм фосфорномолибденовой кислотой. Диметилсульфоксид высушивали перегонкой над диметилнатрием, бензол — над металлическим натрием. Остальные растворители очищали обычными способами. ГЖХ осуществляли на приборе Chrom-5 (ЧССР), масс-спектры снимали на приборе Varian MAT 44S (США). Образцы для масс-спектрометрии перметилировали по методу [12]. ВЭЖХ проводили на приборе Altex 334 (США), детектирование — по УФ-поглощению при 254 нм.

N-[*транс*-12-(9-Антрил)-11-додеценоил]сфингозин (IIa). К раствору 20 мг сфингозина (I) в 0,5 мл сухого тетрагидрофурана добавляли 45 мг *n*-нитрофенилового эфира *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценовой кислоты, после растворения выдерживали 5 ч при 60° С. Реакционную смесь охлаждали, упаривали досуха, остаток хроматографировали на колонке с 30 г силикагеля, элюируя градиентной системой хлороформ — ацетон, выделяли 33 мг соединения (IIa) в виде желтых кристаллов. Разделение, как и ход реакции, контролировали ТСХ в системе А, в которой церамид (IIa) имеет R_f 0,62. Масс-спектрометрические данные приведены в теоретической части.

N-[5-(9-Антрил)-4-пентеноил]сфингозин (IIб). При перемешивании растворяли 16,4 мг сфингозина (I), 16 мг антрилпентеновой кислоты и 16 мг 1-гидроксibenзотриазола в 0,5 мл сухого тетрагидрофурана, добавляли 10 мкл триэтиламина, охлаждали до 0° С, добавляли 0,11 мл 10% раствора DCC в тетрагидрофуране, выдерживали смесь 1 ч при той же температуре и через 2 ч добавляли при 20° С еще 50 мкл раствора DCC. Через 15 ч смесь упаривали досуха, остаток суспендировали в эфире, фильтровали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в смеси хлороформ—метанол, 80 : 20, и фильтровали через колонку с двумя слоями адсорбента (2 г силикагеля поверх 2 г окиси алюминия), промывали 30 мл той же системы. Элюат упаривали и хроматографировали на колонке (8 × 130 мм) с 3,5 г силикагеля, элюируя системой хлороформ — метанол, 95 : 5. Качество разделения контролировали по УФ-поглощению при 365 нм и ТСХ на силуфол в системе А. Получали 29 мг церамида (IIб) в виде желтого аморфного вещества с R_f 0,6 (А). Масс-спектрометрические данные приведены в теоретической части.

N-[транс-12-(9-Антрил)-11-додэценоил]-3-О-бензоилсфингозин (IVа). Растворяли 20 мг церамида (IIа) и 21 мг трифенилхлорметана в 0,2 мл сухого пиридина в токе аргона и оставляли при 20° С на 48 ч в темноте. Затем смесь охлаждали до 0° С, добавляли 25 мкл 25% раствора бензоилхлорида в пиридине (по объему) и оставляли при 20° С на 24 ч в темноте. Темно-желтую реакционную смесь разбавляли 6 мл эфира и промывали порциями по 6 мл водой, 0,5 М HCl, водой, 1% KHSO₃, дважды водой и упаривали досуха в вакууме. Маслообразный остаток растворяли в 1 мл сухого хлористого метилена и при 0° С добавляли 1 мл разбавленного в 10 раз хлористым метиленом 14% раствор трехфтористого бора в метаноле. Через 30 мин смесь разбавляли 5 мл хлористого метилена и промывали холодной водой (3 × 5 мл). Органический слой упаривали, остаток растворяли в смеси толуол—этилацетат, 9 : 1, и наносили на колонку (5 × 150 мм) с 2 г силикагеля, элюируя вещество в градиенте толуол — этилацетат, 9 : 1—3 : 2 (82 мл/ч, 1,5 ч). Получали 8 мг 3-О-бензоилцерамида (IVа) в виде желтого масла, R_f 0,43 (В). Масс-спектр, m/z : 761 ($[M + 2]^+$), 743 ($[M - 16]^+$), 639 ($[M + H - PhCOO]^+$).

N-[5-(9-Антрил)-4-пентеноил]-3-О-бензоилсфингозин (IVб). Из 53 мг *N*-[5-(9-антрил)-4-пентеноил]сфингозина (IIб) получали в условиях синтеза соединения (IVа) 8,5 мг бензоилцерамида (IVб) в виде желтого масла с R_f 0,43 при ТСХ (В). Масс-спектр, m/z : 662 ($[M + H]^+$), 644 ($[M + H - H_2O]^+$), 541 ($[M + H - PhCOO]^+$).

О-[β-D-Галактозил-(1 → 4)-β-D-глюкозил(1 → 1)]-2-*N*-[транс-12-(9-антрил)-11-додэценоил]сфингозин (VIа). К 8,5 мг бензоилцерамида (IVа) добавляли в токе аргона 23 мг ацетобромлактозы в 0,4 мл сухого нитрометана и 8,4 мг цианида ртути, смесь перемешивали 2 ч при 70° С. Затем смесь охлаждали, разбавляли 10 мл эфира, осадок отфильтровывали, промывали 10 мл эфира. Эфирный раствор промывали равным объемом 10% Na₂S, 3% KHSO₃, холодной водой (3 × 15 мл), упаривали досуха в вакууме. Остаток растворяли в 4 мл хлороформа, добавляли 4 мл 0,2 М КОН в 90% водном метаноле. Через 2 ч раствор нейтрализовали до pH 7 1 М HClO₄ и упаривали в вакууме (1 мм рт. ст.) без нагрева, остаток суспендировали в хлороформе, осадок отделяли и фильтрат наносили на колонку (8 × 100 мм) с 2 г силикагеля. Элюировали градиентной системой хлороформ — 95% водный метанол, 9 : 1—8 : 2 (40 мл/ч), разделение контролировали по оптическому поглощению при 365 нм, а также ТСХ (В). Получали 4 мг гликолипида (VIа) в виде слабо-желтого воска с R_f 0,3 (В). Масс-спектрометрические данные приведены в теоретической части.

О-[β-D-Галактозил-(1 → 4)-β-D-глюкозил(1 → 1)]-2-*N*-[5-(9-антрил)-4-пентеноил]сфингозин (VIб) получали в условиях синтеза лактозида (VIа) из 18 мг бензоилцерамида (IVб), 78 мг ацетобромлактозы и 28 мг цианида ртути. Выделено 5 мг вещества (VIб) в виде слабо-желтого масла с R_f 0,3 (В). Данные масс-спектра приведены в теоретической части.

1-О-β-D-Галактозил-2-*N*-[5-(9-антрил)-4-пентеноил]сфингозин (VII)

К раствору 50 мг 1-О-β-D-галактозилсфингозина (VII), 28 мг 5-(9-антрил)-4-пентеновой кислоты и 29 мг 1-гидроксибензотриазола в 0,7 мл сухого тетрагидрофурана при 0° С добавляли 50 мкл 50% раствора ДСС в тетрагидрофуране и 10 мкл триэтиламина. Смесь при перемешивании выдерживали 1 ч при 0° С и 2 ч при 20° С, разбавляли 5 мл тетрагидрофурана, отфильтровывали осадок и фильтрат упаривали в вакууме. Остаток фильтровали через двухслойную колонку с 4 г окиси алюминия и 4 г силикагеля, промывая 40 мл смеси хлороформ—метанол (6:1), элюат упаривали и остаток хроматографировали на колонке (20 × 300 мм) с 35 г силикагеля, элюируя градиентной системой хлороформ—метанол от 9:1 до 8:2 (158 мл/ч), состав фракций контролировали по УФ-поглощению и ТСХ (Г). Получали 27 мг цереброзида (VIII) в виде желтого аморфного вещества, R_f 0,4 (Г). Данные масс-спектра приведены в теоретической части.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blackburn C. C., Schaad R. L. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 2, p. 1180—1188.
2. Молотковский Ю. Г., Имбс А. Б., Бергельсон Л. Д. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 1, с. 112—114.
3. Молотковский Ю. Г., Дмитриев П. Н., Никулина Л. Ф., Бергельсон Л. Д. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 588—594.
4. Имбс А. Б., Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д. Биоорг. химия, 1986, т. 12, № 2, с. 272—278.
5. Pascher I. Chem. and Phys. Lipids, 1974, v. 12, № 3, p. 303—315.
6. Shapiro D., Rachman E. S., Sheradsky T. J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, № 20, p. 4472—4476.
7. Bodanszky M., Meinhofer J., du Vigneud V. J. Amer. Chem. Soc., 1960, v. 82, № 12, p. 3195—3198.
8. Ledeen R. W., Kundu S. K., Price H. C., Fong J. W. Chem. and Phys. Lipids, 1974, v. 13, № 4, p. 429—446.
9. Hermetter A., Paltauf F. Chem. and Phys. Lipids, 1981, v. 29, № 2, p. 191—195.
10. Schneider Gy., Weisz-Vincze I., Vass A., Kovacs K. Tetrahedron Lett., 1972, № 32, p. 3349—3352.
11. Skarjune R., Oldfield E. Biochemistry, 1982, v. 21, № 13, p. 3154—3160.
12. Rose K., Simona M. G., Offord R. E. Biochem. J., 1983, v. 215, № 2, p. 216—272.
13. Фишер Л., Фишер М. Реагенты для органического синтеза. Т. 1. М.: Мир, 1970, с. 339.
14. Бергельсон Л. Д. Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981, с. 198—202.
15. Vaver V. A., Ushakov A. N. In: Methods of Biochemical Analysis, V. 26/Ed. Glick D. N. Y.: J. Wiley, 1980, p. 327—406.
16. Reithel F. J., Young R. G. J. Amer. Chem. Soc., 1952, v. 74, № 16, p. 4210—4211.

Поступила в редакцию
8.VII.1985

После доработки
3.IX.1985

SYNTHESIS OF FLUORESCENT GLYCOSPHINGOLIPIDS

IMBS A. B., MOLOTKOVSKY Ju. G., BERGELSON L. D.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Two fluorescent lactosylceramides differing in the distance between the fluorophore and polar head group, N-[trans-12-(9-anthryl)-11-dodecenoyl]- and N-[5-(9-anthryl)-4-pentenoyl]-1-O-β-lactosylsphingosine, were synthesized. A fluorescent galactosylceramide, N-[5-(9-anthryl)-4-pentenoyl]-1-O-β-galactosylsphingosine was also obtained.