



УДК 547.672.2'953.2:577.152.314\*4

## СИНТЕЗ АНТРИЛВИНИЛМЕЧЕННЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ ЗОНДОВ

Молотковский Ю. Г., Смирнова М. М., Карюжина М. О.,  
Бергельсон Л. Д.

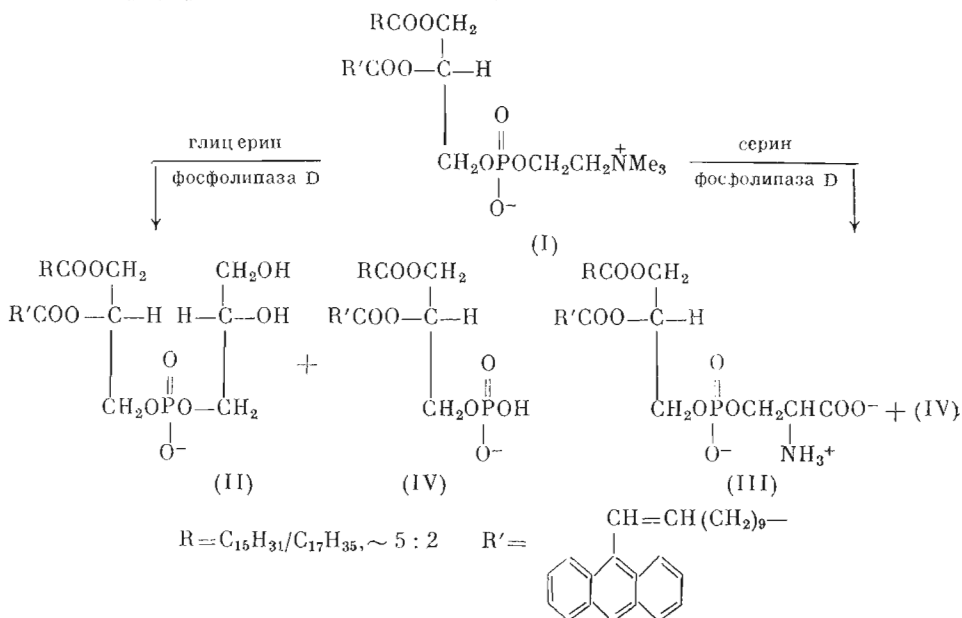
Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина  
Академии наук СССР, Москва

Новые флуоресцентные фосфолипидные зонды, фосфатидилглицерин, фосфатидилсерин и фосфатидовая кислота, несущие остаток 12-(9-антрил)-11-*транс*-додеценовой кислоты, получены из соответствующего фосфатидилхолина реакцией трансфосфатидилирования или ферментолиза с участием фосфолипазы D.

Ранее нами были описаны синтезы флуоресцентных фосфолипидных зондов: фосфатидилхолина (I) [1], фосфатидилэтанолamina [2] и сфингомиелина [3], содержащих остаток 12-(9-антрил)-11-*транс*-додеценовой кислоты. Антрилвинилмеченные фосфолипиды оказались весьма удобными флуоресцентными зондами, с помощью которых была получена новая существенная информация о строении липопротеинов крови, мембраны вируса гриппа, о лиганд-рецепторных взаимодействиях [4, 5].

Как показали наши исследования, указанные зонды являются липид-специфическими, т. е. в мембранах ведут себя подобно природным прототипам, и поэтому могут применяться при сравнительном изучении поведения липидов различных классов в мембранах [5].

Дальнейшие исследования потребовали расширения номенклатуры применяемых флуоресцентных липидов. Исходя из этого, мы в дополнение к указанным выше антрилвинилмеченым фосфолипидам осуществили синтез флуоресцентных фосфатидилглицерина (II) и фосфатидилсерина (III) из фосфатидилхолина (I) с помощью трансфосфатидилирования действием фосфолипазы D (КФ 3.1.4.4) в присутствии глицерина и серина соответственно; в обоих случаях одновременно образуется антрилвинилмеченная фосфатидовая кислота (IV), которая представляет самостоятельный интерес как флуоресцентный зонд (схема).



Антривиниловый фосфатидилглицерин (II) был получен трансфосфатидилированием на глицерин при катализе бактериальной фосфолипазой D из *Streptovorticillum cinnamoneum*, одновременно образуется небольшое количество фосфатидовой кислоты (IV). Масс-спектр фосфатидилглицерина (II) (ионизация аммиаком) соответствует приписываемому строению: в нем присутствуют пики ионов с  $m/z$  841, 869 ( $[M+2H]^+$ ), 705, 733 ([диглицерид+2H+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>); каждый из этих ионов представлен двумя пиками, различающимися на 28 ед. массы, поскольку фосфолипид, как и яичный фосфатидилхолин — исходное вещество для синтеза зонда (I), в положении 1 глицеринового остатка несет остатки пальмитиновой и стеариновой кислот в соотношении 5:2 (других жирных кислот около 2%). В масс-спектре фосфатидовой кислоты (IV) пики молекулярных ионов имеют низкую интенсивность, однако есть пики с  $m/z$  722, 750 ([диглицерид-PO+H]<sup>+</sup>) и 704, 732 ([диглицерид-PO+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), подтверждающие приписанную структуру.

Следует отметить, что фосфатидилглицерин (II) из фосфатидилхолина (I) был получен с помощью фосфолипазы D с хорошим выходом (более 50%), хотя, по имеющимся в литературе данным, приемлемым субстратом для этого фермента является не фосфатидилхолин, а фосфатидилэтаноламин [6].

Интересен вопрос о конфигурации неацилированного остатка глицерина в зонде (II). Янг и др. [7] нашли, что после превращения фосфатидилхолин → фосфатидилглицерин в присутствии фосфолипазы D из капусты введенный остаток глицерина рацемический (по результатам ферментативного окисления глицерофосфата, полученного гидролизом фосфолипида фосфолипазой C). Однако Батраков и др. [8], основываясь на данных кругового дихроизма синтезированного с помощью капустной фосфолипазы D фосфатидилглицерина, а также его производного, пришли к выводу, что этот фосфатид является 1-(3-фосфатидил)-*sn*-глицерином, т. е. имеет природное строение.

Мы попытались разрешить этот вопрос для нашего случая, получив из яичного фосфатидилхолина ( $[\alpha]_D +6,2^\circ$  в хлороформе) с помощью бактериальной фосфолипазы D фосфатидилглицерин; он в виде патриевой соли имел  $[\alpha]_D +9,8^\circ$ . Поскольку фосфатидилглицерин, выделенный из листьев шпината, имеет  $[\alpha]_D +6,2^\circ$  (форма не указана; в смеси хлороформ — метанол, 2:1) [9], а у синтетического *rac*-1-(3-*sn*-фосфатидил)-глицерина  $[\alpha]_D +2,0^\circ$  (в хлороформе; свободная кислота) [10], более вероятно, что синтезированный нами антривинилмеченый фосфатидилглицерин имеет природную конфигурацию.

Получить фосфатидилсерин (III) трансфосфатидилированием на серин с помощью бактериальной фосфолипазы D нам не удалось. Указанный зонд был, однако, получен из фосфатидилхолина (I) действием капустной фосфолипазы D по известному методу [11], при этом образуется значительное количество фосфатидовой кислоты (IV). Строение фосфатидилсерина (III) подтверждено его хроматографическим поведением, а также масс-спектрометрически с ионизацией ускоренными атомами ксенона: в масс-спектре присутствуют интенсивные пики с  $m/z$  853 и 881 ( $[M-H]^-$ ; соотношение интенсивностей ~5:2).

Все три антривинилмеченых фосфолипида (II) — (IV) имеют спектры флуоресценции, практически совпадающие со спектрами других антривиниловых фосфолипидов [3]:  $\lambda_{возб}$  257, 350, 369, 388 нм;  $\lambda_{исп}$  413, 432 нм (в этаноле).

Предварительные опыты показали, что зонды (II) — (IV) легко встраиваются в искусственные мембраны (фосфолипидные липосомы); их применение в качестве мембранных зондов будет описано в дальнейших публикациях.

### Экспериментальная часть

Все работы с флуоресцентными веществами выполняли при рассеянном свете ламп накаливания.

Применяли бактериальную фосфолипазу D (~200 ед. акт./мг белка;

НПО «Фермент», Вильнюс), фосфолипазу D из капусты (~100 ед. акт./мг белка; Sigma, США), остальные реактивы отечественного производства. Для колоночной хроматографии использовали силикагель L 5/40 мкм (Сhemapol, СССР), отмытый от мелких фракций и активированный в течение 12 ч при 120°С, для ТСХ — готовые пластинки Kieselgel 60 (Merck, ФРГ). Растворители очищали по обычным методикам.

Углы вращения измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 241 при 18–22°С с точностью ±0,5°; масс-спектры с позизацией NH<sub>3</sub> снимали на спектрометре Varian MAT 44S (США); с бомбардировкой ускоренными атомами и регистрацией отрицательных ионов — на приборе Kratos MS-50 TC (Великобритания) (энергия атомов ксенона 8 эВ, матрица — триолиглицерин — триэтаноламин, 1 : 1).

Антрилвишиловый фосфатидилхолин (I) синтезировали по методу [1].

*1-Ацил-2-[12-(9-антрил)-11-транс-додеценил]-sn-глицеро-3-фосфо-1'-глицерин (II)*. К раствору 30 мг фосфатидилхолина (I) в 10 мл эфира прибавляли раствор 6 ед. акт. препарата бактериальной фосфолипазы D в 4 мл 0,1 М трис-НСl, рН 8,5, и 1 мл глицерина, смесь встряхивали 1 ч при 37°С, подкисляли 1 н. НСl до рН 3, экстрагировали хлороформом (3×10 мл), остаток, по данным ТСХ (сравнение со стандартами фирмы Sigma, США), содержит фосфатидилглицерин, фосфатидовую кислоту (IV) и следы фосфатидилхолина: в системе хлороформ — метанол — 7 н. NH<sub>4</sub>OH, 65 : 35 : 8, R<sub>f</sub> соответственно 0,7; 0,3 и 0,5; в системе хлороформ — метанол — СН<sub>3</sub>COOH — вода, 70 : 20 : 1 : 1, соответственно 0,25; 0,4 и 0,1 (обнаружение фосфорномолибденовой кислотой, молибденовым синим, а также в УФ-свете). Смесь хроматографировали на колонке с 1,5 г силикагеля в градиентной системе хлороформ против метапола с 5% 7 н. NH<sub>4</sub>OH, вымывали последовательно 17 мг (56%) аммониевой соли фосфатидилглицерина (II) в виде слабо-желтой аморфной массы, 3 мг фосфатидилхолина (I) и 2 мг аммониевой соли фосфатидовой кислоты (IV) (желтоватое аморфное вещество). Данные по масс-спектрам фосфолипидов (II), (IV) приведены в теоретической части.

*1,2-Диацил-sn-глицеро-3-фосфо-1-глицерин* из яичного фосфатидилхолина получали согласно предыдущей методике; для перевода в натриевую соль 0,5% раствор фосфатидилглицерина в хлороформе дважды промывали половиным объемом 15% NaCl (разделение фаз на центрифуге), высушивали минимальным количеством Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпаривали в вакууме. Полученный фосфолипид, по данным ТСХ, идентичен стандартному веществу (см. выше).

*1-Ацил-2-[12-(9-антрил)-11-транс-додеценил]-sn-глицеро-3-фосфо-О'-серин (III)*. К раствору 3,4 мг фосфатидилхолина (I) в 0,5 мл свежеперегнанного эфира добавляли 40 мкл 40% раствора L-серина в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, рН 5,6, содержащем 0,1 М CaCl<sub>2</sub>, добавляли около 5 ед. акт. капустной фосфолипазы D и встряхивали 90 мин при 45°С в плотно закрытой пробирке, с интервалами в 30 мин добавляя по 2 ед. акт. фермента и 0,2 мл эфира. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 0,1 М EDTA, добавляли 1 г безводного Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, суспензию тщательно экстрагировали смесью хлороформ — метанол, 2 : 1 (4×5 мл). Экстракт упаривали, остаток разделяли препаративной ТСХ в системе хлороформ — метанол — СН<sub>3</sub>COOH — 0,9% NaCl, 50 : 25 : 8 : 2,5. Получали в виде аморфных желтоватых веществ 1,0 мг фосфатидилсерина (III) и 1,8 мг фосфатидовой кислоты (IV). Вещества хроматографически индивидуальны и имели одинаковую подвижность со стандартами фирмы Sigma (США). В указанной выше системе значения R<sub>f</sub> для фосфатидилсерина (III), фосфатидовой кислоты (IV) и фосфатидилхолина (I) составляли 0,85; 0,7 и 0,4; в системе хлороформ — метанол — 7 н. NH<sub>4</sub>OH, 65 : 35 : 8, соответственно 0,5; 0,3 и 0,5 (обнаружение фосфорномолибденовой кислотой, молибденовым синим и в УФ-свете, фосфатидилсерин обнаруживается также пингидрином). Данные по масс-спектрам приведены в теоретической части.

Авторы выражают благодарность В. В. Кулене (НПО «Фермент», Вильнюс), предоставившей бактериальную фосфолипазу D.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Молотковский Ю. Г., Дмитриев П. И., Никулина Л. Ф., Бергельсон Л. Д. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 4. С. 588–594.
2. Молотковский Ю. Г., Унковский В. И., Бергельсон Л. Д. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 1. С. 144–145.
3. Молотковский Ю. Г., Дмитриев П. И., Молотковская И. М., Бергельсон Л. Д., Маневич Е. М. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 4. С. 586–600.
4. Molotkovsky Jul. G., Manevich Y. M., Babak V. I., Bergelson L. D. // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 778. № 2. P. 281–288.
5. Bergelson L. D., Molotkovsky Jul. G., Manevich Y. M. // Chem. and Phys. Lipids. 1985. V. 37. № 2. P. 165–195.
6. Страйкувене И. К., Пекрашайте Г. П., Кулене В. В., Глемжа А. А., Песлякас И. И. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 1. С. 39–44.
7. Yang S. F., Freer S., Benson A. A. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. № 3. P. 477–484.
8. Batrakov S. G., Panosyan A. G., Kogan G. A., Bergelson L. D. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1975. V. 66. № 2. P. 755–762.
9. Dawson R. M. C. // Biochem. J. 1967. V. 102. № 1. P. 205–210.
10. Macfarlane M. G. // Adv. Lipid Res. 1964. V. 2. P. 91–125.
11. Comfarius P., Zwaal R. F. A. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 488. № 1. P. 36–42.

Поступила в редакцию  
7.XII.1988

## SYNTHESIS OF ANTHRYLVINYL PHOSPHOLIPID PROBES

MOLOTKOVSKY Jul. G., SMIRNOVA M. M., KARYUKHINA M. O., BERGELSON L. D.

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

New fluorescent phospholipid probes, phosphatidylglycerol, phosphatidylserine and phosphatidic acid, bearing the residue of 12-(9-anthryl)-11-*trans*-dodecenoic acid, were obtained from corresponding phosphatidylcholine by transphosphatidylation or enzymatic hydrolysis with phospholipase D.