



УДК 535.372+547.95.07+577.352.2

© 1990 г.

И. И. Михалев, Ю. Г. Молотковский, Л. Д. Бергельсон

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА АНТРИЛВИНИЛМЕЧЕННЫХ  
ДИСИАЛОГАНГЛИОЗИДОВИнститут биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР,  
Москва

Синтезированы два флуоресцентномеченых ганглиозида ( $G_{D3}$  и  $G_{D1a}$ ), несущие остаток *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценной кислоты. Исследованы флуоресцентные свойства полученных ганглиозидных зондов в различных средах и их поведение в модельных мембранных системах.

Ранее мы сообщали о синтезе нескольких флуоресцентномеченых моносиалоганглиозидов; было показано, что они являются липидспецифическими зондами, т. е. в мембранах ведут себя подобно природным ганглиозидам [1]. Предварительные данные говорят о том, что при изучении процессов, протекающих в биологических мембранах, флуоресцентные ганглиозиды существенно дополняют имеющиеся фосфолипидные флуоресцентные зонды (о последних см. обзор [2]).

Продолжая исследования флуоресцентномеченых ганглиозидов, мы синтезировали два новых соединения этого класса — зонды  $AG_{D3}$  и  $AG_{D1a}$ , представляющие собой ганглиозиды  $G_{D3}$  и  $G_{D1a}$ , несущие остаток *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценной кислоты. В настоящем сообщении описаны синтезы этих веществ, их флуоресцентные характеристики, а также поведение в некоторых модельных системах, что важно для последующего применения зондов при изучении биологических мембран.

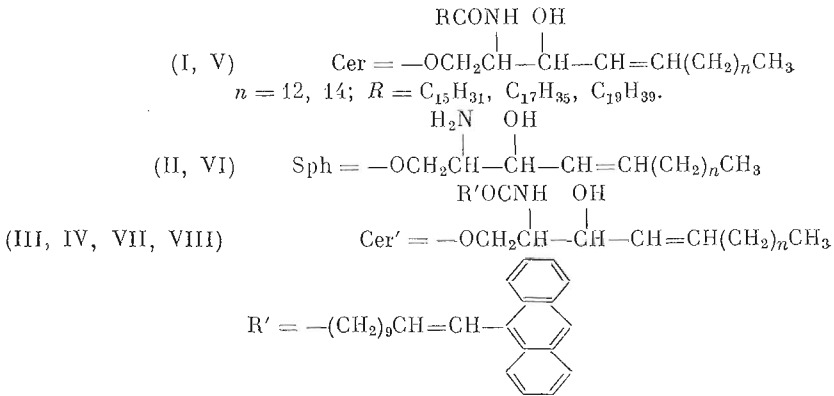
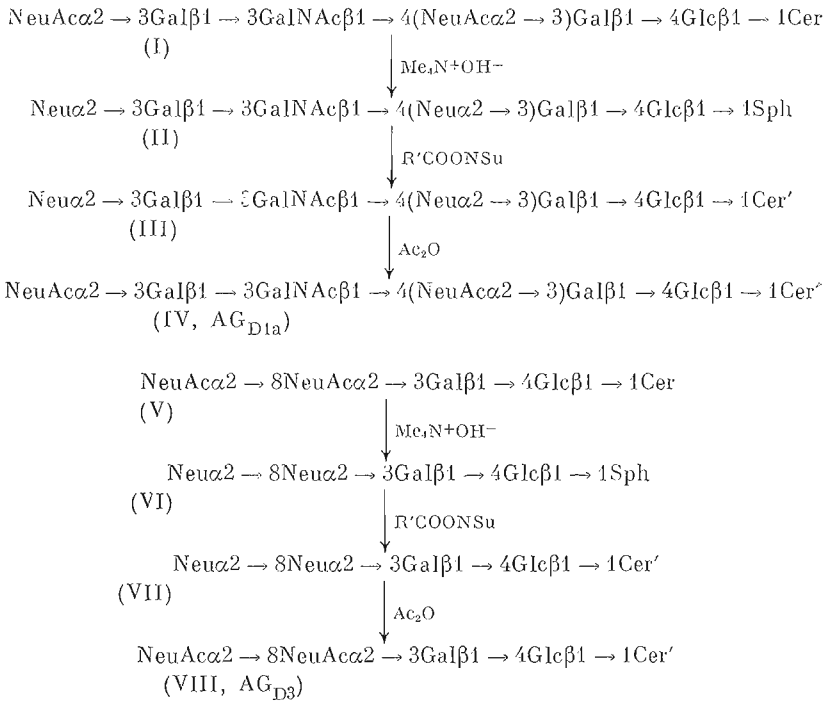
Синтез обоих зондов был проведен по ранее разработанной схеме [1]. Природные ганглиозиды  $G_{D1a}$  (I) и  $G_{D3}$  (V) подвергали щелочному гидролизу гидроокисью тетраметиламмония в водном бутаноле. При этом кроме жирнокислотного остатка отщепляются также *N*-ацетильные группы сиалильных остатков [3]. Дезацилированные производные (II) и (VI) выделяли обращенно-фазовой хроматографией и ацилировали сфингозиновую аминогруппу *N*-гидроксисукцинимидным эфиром флуоресцентной кислоты в двухфазной водно-эфирной системе; после *N*-ацетилирования промежуточных соединений (III) и (VII) уксусным ангидридом в водном метаноле получали антрилвинилмеченые ганглиозиды (IV,  $AG_{D1a}$ ) и (VIII,  $AG_{D3}$ ) (схема 1).

Строение синтезированных зондов было подтверждено их хроматографическим поведением (оба соединения имеют одинаковую подвижность с соответствующими природными ганглиозидами), а также данными масс-спектрометрии (ионизация ускоренными атомами ксенона). Молекулярный ион  $AG_{D1a}$  представлен двумя пиками в соответствии с гетерогенным составом сфингозиновых оснований природного ганглиозида (преобладают молекулярные виды  $C_{18:1}$  и  $C_{20:1}$ ); в случае зонда  $AG_{D3}$  молекулярный ион имеет один пик (см. «Экспериментальную часть»).

Сохранение природной конфигурации полученных соединений было подтверждено их ферментативным расщеплением нейраминидазой из

Сокращения:  $AG_{D1a}$ ,  $AG_{D3}$ ,  $AG_{M1}$ ,  $AG_{M3}$  — ганглиозиды  $G_{D1a}$ ,  $G_{D3}$ ,  $G_{M1}$ ,  $G_{M3}$ , несущие остаток *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценной кислоты, APC и ASM — антрилвинилмеченые фосфатидилхолин и сфингомиелин, DMSO — диметилсульфоксид, DMPC — димристоилфосфатидилхолин, PPC — периленоилмеченый фосфатидилхолин,  $PC_{M1}$ ,  $PC_{M3}$  — периленоилмеченые ганглиозиды  $G_{M1}$ ,  $G_{M3}$ .

Схема 1



*Vibrio cholerae* [4]. AG<sub>D1a</sub> расщеплялся с образованием ганглиозида AG<sub>M1</sub>, идентичного по подвижности при ТСХ с природным ганглиозидом G<sub>M1</sub> и с синтезированным ранее зондом AG<sub>M1</sub> [1]. Ганглиозид AG<sub>D3</sub> при расщеплении нейраминидазой давал соответствующий антривинилмеченый лактозилцерамид, сходный по хроматографической подвижности с природным лактозилцерамидом и антривинилмеченым лактозилцерамидом, полученным ранее химическим синтезом [5], а также образовавшимся в результате расщепления нейраминидазой зонда AG<sub>M3</sub> [1].

Спектры флуоресценции синтезированных ганглиозидов в органических растворителях или модельных мембранах близки к спектрам антривинилмеченых фосфолипидов [6] и моносиалоганглиозидов [1]. На рис. 1 приведены спектры возбуждения и испускания зонда AG<sub>D3</sub> в органическом растворителе; аналогичный вид имеют спектры в фосфолипидных липосомах (рис. 2, б, 1) и в мицеллах с детергентом (рис. 3, 4).

Квантовый выход антривинилмеченых ганглиозидов, а также фосфолипидных зондов APC и ASM составил 0,5 в *n*-бутаноле, что близко к квантовому выходу винилантрацена (0,7) [7].

Благодаря заметной растворимости антривинилмеченых ганглиозидов в воде удается снять их спектры флуоресценции в водной среде. Как

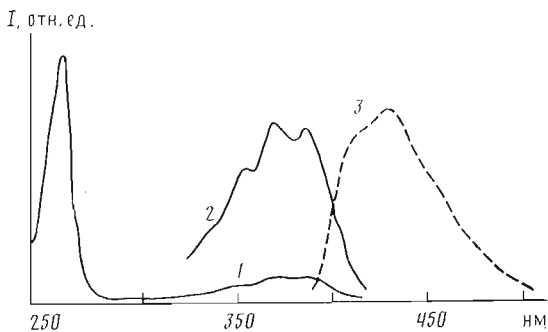


Рис. 1

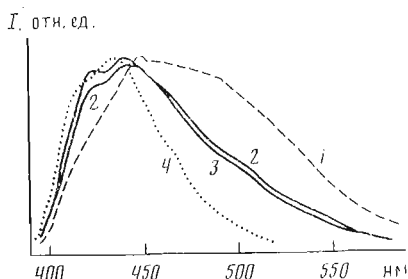


Рис. 3

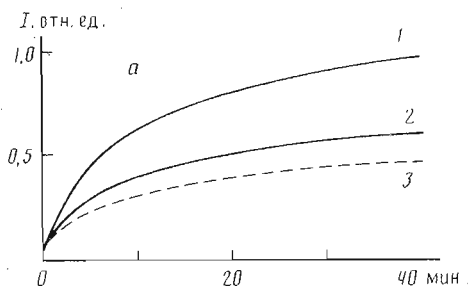


Рис. 2, а

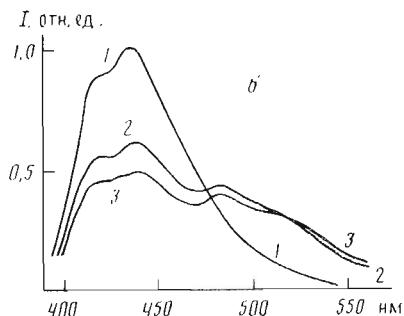


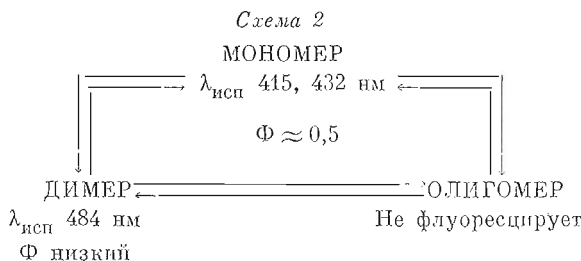
Рис. 2, б

Рис. 1. Спектры зонда  $AG_{D3}$ : 1, 2 — возбуждения (кривая 2 —  $\times 7$ ),  $\lambda_{исп}$  435 нм, изопропанол — вода, 5:1; 3 — испускания,  $\lambda_{возб}$  370 нм, изопропанол. Концентрация зонда  $7 \cdot 10^{-7}$  М, температура  $21^\circ C$

Рис. 2. Зонд  $AG_{D1a}$  в озвученных везикулах из смеси DMPC —  $G_{D1a}$ , 9:1 (моль/моль). Температура  $30^\circ C$ . Концентрация липида 240 мкг/мл, зонда — 2–3 мкг/мл. а — встраивание  $AG_{D1a}$  в липосомы указанного выше состава (1), в те же липосомы с добавлением 0,2 мол.% PPC (2) или 0,2 мол.% PC<sub>MI</sub> (3). На оси ординат — интенсивность флуоресценции при 435 нм; б — спектры испускания после 40-мин инкубации: везикулы без акцептора (1), с добавлением зонда PPC (2) и PC<sub>MI</sub> (3)

Рис. 3. Нормализованные спектры испускания антривиниловых ганглиозидов в 20 мМ трис-НСI, pH 7,4, температура  $20^\circ C$ : 1 —  $AG_{M3}$ , 2 —  $AG_{D3}$ , 3 —  $AG_{D1a}$ , 4 —  $AG_{D3}$  после солюбилизации 1000-кратным количеством додецилсульфата натрия

отмечено нами ранее для моносиалоганглиозидов [4], спектры испускания флуоресцентномеченых ганглиозидов представляют собой результат наложения спектров мономера и димера (эксимера) (см. рис. 3, спектры 2 и 3), причем сравнение со спектром антривинилмеченого моносиалоганглиозида  $AG_{M3}$  (спектр 1) показывает, что в последнем случае эксимер (плечо при 480 нм) преобладает над мономером, тогда как в случае дисиалоганглиозидов  $AG_{D1a}$  и  $AG_{D3}$  (спектры 2 и 3) содержание мономера относительно выше.



Это говорит о том, что равновесие между димером и мономером для  $AG_{M3}$  (схема 2) сдвинуто в сторону димера в большей степени, чем для дисиалоганглиозидов. Причины этого явления пока неясны и требуют дальнейших исследований. К сожалению, количественные соотношения

между мономером и димером вычислить пока не представляется возможным, поскольку неизвестен квантовый выход для антрилвинилового димера (однако ясно, что он намного ниже квантового выхода мономера [1]).

Дисиалоганглиозидные зонды при добавлении их раствора в DMSO к липосомам хорошо встраиваются в мембрану, что видно по нарастанию интенсивности флуоресценции зонда (см. рис. 2). Кривая 1 на рис. 2а демонстрирует временную зависимость интенсивности испускания зонда  $AG_{D1a}$ , добавленного в виде раствора в DMSO к липосомам из смеси DMPC —  $G_{D1a}$ , 9 : 1.

Существен вопрос, насколько близки синтезированные зонды  $AG_{D3}$  и  $AG_{D1a}$  соответствующим природным ганглиозидам, т. е. насколько они являются липидспецифическими. Ранее такая специфичность была установлена для полученных нами фосфолипидных [2] и моносиалоганглиозидных [1] зондов. Для описанных в настоящей работе зондов мы показали, что после их введения в липосомы смешанного состава (DMPC —  $G_{D1a}$ , 9 : 1), содержащие также периленоильный зонд PPC или  $PG_{M1}$  — акцептор энергии испускания антрилвинилового флуорофора, — возникают различные картины переноса энергии в зависимости от природы акцептора (температура опыта 30° С, т. е. выше температуры фазового перехода димиристоилфосфатидилхолина).

На рис. 2б приведены спектры испускания зонда  $AG_{D1a}$ , встроенного в такие липосомы без акцептора и в липосомы, содержащие PPC или  $PG_{M1}$ ; на рис. 2а показано нарастание интенсивности антрилвинилового флуоресценции в ходе встраивания  $AG_{D1a}$ . Если акцептором служит PPC (кривая 2), то перенос энергии меньше, чем в паре  $AG_{D1a}$  —  $PG_{M1}$  (кривая 3), что видно по большей интенсивности периленоильной флуоресценции во втором случае и меньшей интенсивности антрилвинилового флуоресценции; графики временного нарастания интенсивности антрилвинилового флуоресценции (кривая 2 и 3) подтверждают указанную разницу.

Такая картина может наблюдаться лишь в том случае, если в мембране фосфатидилхолин и ганглиозид частично сегрегированы, причем меченый и немеченый липиды локализованы одинаковым или сходным образом. Сегрегация, вероятно, не носит стационарного характера: Петерс и др., используя в качестве связывающегося с гликофинголипидами зонда гематлутинин зародышей пшеницы, показали, что в фосфатидилхолиновой матрице, содержащей при 20° С как гелеобразную, так и жидкокристаллическую фазы (смесь дипальмитоил- и диэлаидилфосфатидилхолинов, 1 : 1), ганглиозид  $G_{D1a}$  не образует обнаруживаемых с помощью криофрактографии доменов (>6 нм) [8]. Мы полагаем, что наблюдаемая нами частичная сегрегация фосфатидилхолина и ганглиозида  $G_{D1a}$  — результат возникновения короткоживущих кластеров из ограниченного числа молекул ганглиозида.

Мы провели также сравнение величин анизотропии флуоресценции вновь синтезированных зондов, полученных ранее антрилвинильно меченых ганглиозидов  $AG_{M1}$  и  $AG_{M3}$  [1], фосфатидилхолина и сфингомиелина [6, 9]. В качестве гомогенной анизотропной среды были использованы липосомы из диолеилфосфатидилхолина. Большая величина анизотропии ( $r$ ) для сфингомиелинового зонда (0,050) в сравнении с фосфатидилхолиновым (0,042), отмечавшаяся нами и ранее [9], отражает меньшую подвижность церамидного остатка, обусловленную, по-видимому, участием амидной связи и гидроксигруппы в «поясе водородных связей» (о последнем см. [10]). Дальнейшее возрастание величины  $r$  в ганглиозидных зондах по сравнению со сфингомиелиновым, вероятно, вызвано большим торможением движений ганглиозидных молекул олигосахаридными остатками, более объемистыми в сравнении с фосфохолиновым остатком сфингомиелина. Так, величина  $r$  составляет для ганглиозида  $AG_{M3}$  0,057, для  $AG_{M1}$  0,062, для  $AG_{D3}$  0,063 и для  $AG_{D1a}$  0,060. Неясным, однако, остается вопрос, почему дисиалоганглиозид  $AG_{D1a}$  имеет меньшее значение  $r$  по сравнению с  $AG_{M1}$ , у которого объем полярной головки меньше.

Приведенные в настоящей статье и в работе [1] данные показывают, что синтезированный нами набор ганглиозидных зондов, охватывающий

наиболее распространенные типы моно- и диспалоганглиозидов, позволяет проводить разнообразные исследования функций природных гликосфинголипидов в природных объектах.

### Экспериментальная часть

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

В синтезе использовали *N*-гидроксисукцинимид, тетраметиламмоний-гидроксид (Fluka, Швейцария), *N,N'*-дициклогексилкарбодимид (Serva, ФРГ), нейраминидазу из *V. cholerae* (Koch-Light, Англия), *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценую кислоту, полученную ранее по методу [6]. *N*-Гидроксисукцинимидный эфир *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценовой кислоты получали как описано ранее [11]. Ганглиозид  $G_{D1a}$  получали по методу [12] из мозга крупного рогатого скота, ганглиозид  $G_{D3}$  — по методу [13] из сухого коровьего молока. Ганглиозид  $G_{D1a}$ , согласно данным ГЖХ, содержит остатки сфингозинов  $C_{18:1}$  и  $C_{20:1}$  в соотношении 3 : 2; ганглиозид  $G_{D3}$  — только остаток сфингозина  $C_{18:1}$ .

Для колоночной хроматографии применялся силикагель 60 (40–63 мкм; Merck, ФРГ), адсорбенты с обращенной фазой, DEAE-сефадек А-25 (Pharmacia, Швеция). Для тонкослойной хроматографии использовали силуфол UV-254 (Kavalier, ЧССР; Merck, ФРГ). Тонкослойную хроматографию проводили в системе растворителей хлороформ — метанол — 2,5 н. водный аммиак, 60 : 40 : 9 (А). Вещества обнаруживали фосфорномолибденовой кислотой (1) — универсальный обнаружитель, резорциновым реагентом (2) — для сиалосодержащих липидов, в УФ-свете (3) и нингидрином (4) — для свободных аминов. Растворители очищали обычными способами.

Спектры флуоресценции (скорректированы) снимали на спектрофлуориметре F4000 (Hitachi, Япония). Квантовый выход измеряли как описано [14], применяя в качестве стандарта раствор перилена в *n*-гептане ( $\Phi=0,95$ ). ГЖХ проводили на приборе «Хром-5» (ЧССР): колонка (2500×3 мм) с 3% OV-1 на хромосорбе WHP (100–120), температура 250° С, скорость гелия 40 мл/мин, детектор пламенно-ионизационный. Масс-спектры снимали на приборе Kratos MS-50TS (Kratos, Англия) с ионизацией ускоренными атомами ксенона с энергией 6–8 кэВ. В качестве матрицы использовали смесь тиоглицерина с этаноламином, 1 : 1.

*Дезацилированный, дезацетилованный ганглиозид*  $G_{D1a}$ ,  $Neu\alpha 2 \rightarrow 3Gal\beta 1 \rightarrow 3GalNAc\beta 1 \rightarrow 4(Neu\alpha 2 \rightarrow 3)Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\beta 1 \rightarrow 1Sph(II)$ . К раствору 100 мг ганглиозид  $G_{D1a}$  (I) в 7,5 мл *n*-бутанола добавляли 0,85 мл 10 М водного тетраметиламмонийгидроксида и выдерживали 13 ч при 100° С. Реакционную смесь упаривали, растворяли в смеси метанол — вода (1 : 1), фильтровали и хроматографировали на колонке (25×310 мм) с обращеннофазовым силикагелем RP-18 (40–63 мкм; Merck, ФРГ) градиентной системой метанол — вода, увеличивая количество метанола, контролируя состав фракций ТСХ (система А, обнаружители 2 и 4). Получали 56 мг дезацилированного и дезацетилованного ганглиозид  $G_{D1a}(II)$ ,  $R_{G_{D1a}} = 0,08$ .

*Диспалозиллактозилсфингозин*,  $Neu\alpha 2 \rightarrow 8Neu\alpha 2 \rightarrow 3Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\beta 1 \rightarrow 1Sph(VI)$ . К раствору 20 мг ганглиозид  $G_{D3}$  (V) в 2 мл *n*-бутанола добавляли 0,22 мл 10 М водного тетраметиламмонийгидроксида. Реакционную смесь оставляли при 100° С на 19 ч, затем упаривали, растворяли в смеси метанол — вода (1 : 1) и хроматографировали на колонке (1,5×3 см) с 5 г силасорба С8 (LC) (Chemapol, ЧССР) в системе метанол — вода, увеличивая количество метанола от 50 до 100% и после этого хроматографировали на колонке (0,5×8 см) с 1 г силикагеля 60 в системе хлороформ — метанол — 2,5 н. водный аммиак, 60 : 35 : 8. Ход хроматографии контролировали ТСХ (система А, обнаружители 2 и 4). Получали 3,3 мг дезацилированного и дезацетилованного ганглиозид  $G_{D3}$ ,  $R_{G_{D3}} = 0,11$ .

*Антрилвинилмеченый ганглиозид*  $G_{D1a}$ ,  $NeuAc\alpha 2 \rightarrow 3Gal\beta 1 \rightarrow 3GalNAc\beta 1 \rightarrow 4(NeuAc\alpha 2 \rightarrow 3)Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\beta 1 \rightarrow 1Cer(IV)$ . К раствору 30 мг дезацили-

7. *Shinitzky M., Dianoux A., Gitler C., Weber G.* // *Biochemistry*. 1971. V. 10. № 11. P. 2106–2113.
8. *Peters M. W., Melhorn I. E., Barber K. R., Grant C. W. M.* // *Biochim. et biophys. acta*. 1984. V. 778. № 3. P. 419–428.
9. *Мологковский Ю. Г., Дмитриев П. И., Мологковская Л. М., Бергельсон Л. Д., Маневич Е. М.* // *Биоорг. химия*. 1981. Т. 7. № 4. С. 586–600.
10. *Boggs J. M.* // *Biochim. et biophys. acta*. 1987. V. 906. № 3. P. 353–404.
11. *Ollmann M., Schwarzmann C., Sandhoff K., Galla H.-J.* // *Biochemistry*. 1987. V. 26. № 18. P. 5943–5951.
12. *Svennerholm L.* // *Methods in Carbohydrate Chem.* 1972. V. 6. № 2. P. 464–474.
13. *Дятловицкая Э. В., Ахмед-Заде А.* // *Прикл. биохим. и микробиол.* 1983. Т. 19. № 3. С. 399–402.
14. *Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* // *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран*. М.: Наука, 1980. С. 63–64.

Поступила в редакцию  
12.V.1989  
После доработки  
18.VII.1989

I. I. MIKHALYOV, JuI. G. MOLOTKOVSKY, L. D. BERGELSON

### SYNTHESIS AND PROPERTIES OF ANTHRILVINYLLABELED GANGLIOSIDES

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

Fluorescently labeled probes, gangliosides G<sub>D3</sub> and G<sub>D1a</sub> bearing a residue of 12-(9-anthryl)-11-*trans*-dodecenoic acid, are synthesized, and their fluorescent properties in different media and behaviour in model membranes studied.