



УДК 547.953.2:583.7

СИНТЕЗ ФОТОРЕАКТИВНЫХ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА
И ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛАМИНАМолотковский Ю. Г., Лазуркина Т. Ю., Фаерман В. Н.,
Смоляков В. С., Бергельсон Л. Д.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Синтезированы фотореактивная N-(2-нитро-4-азидофенил)-11-аминоундекановая кислота и на ее основе 1-ацил-2-[N-(2-нитро-4-азидофенил)-11-аминоундеканонил]-sn-глицеро-3-фосфохолин; оба вещества получены также меченными тритием. Из фотореактивного фосфатидилхолина трансфосфатидилированием на этаноламин в присутствии фосфолипазы D получен соответствующий фосфатидилэтанолламин. Показано, что ацилирование лизофосфатидилхолина карбоновой кислотой и дидицлогексилкарбодимидом в присутствии 4-диметиламинопиридина сопровождается частичной ацильной миграцией и рацемизацией.

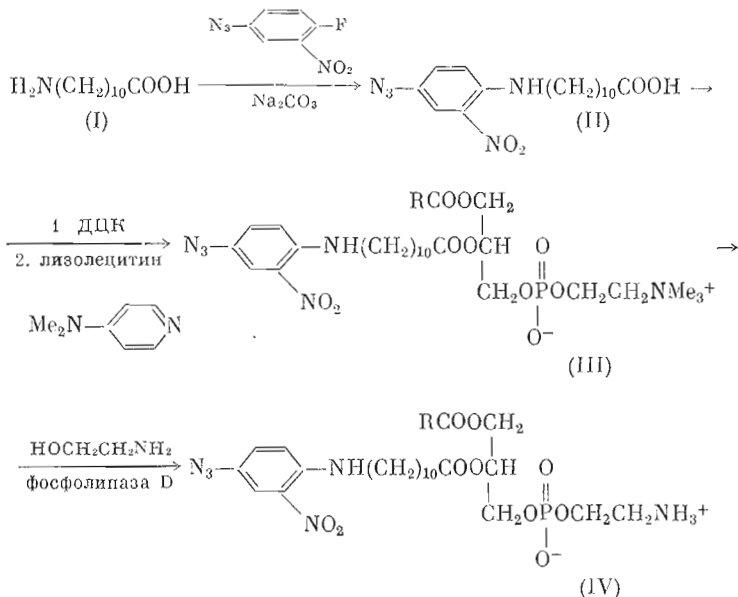
Несмотря на несомненные успехи, достигнутые при исследовании мембран с помощью флуоресцентно- и спин-меченных по жирнокислотным остаткам фосфолипидов, с их помощью получают лишь усредненные данные о липид-белковых взаимодействиях. В частности, они не позволяют определить специфические участки белковых молекул, взаимодействующие с липидами. Эта задача может быть решена с помощью фосфолипидов, несущих фотореактивные группы, которые при фотоактивации способны ковалентно связываться с соседними молекулами, находящимися на достаточно близком расстоянии от этих групп.

В литературе описано несколько способов получения такого рода фосфолипидов. Корана и сотр. [1, 2] синтезировали ряд фосфатидилхолинов с остатками фотореактивных кислот, несущих α , β -ненасыщенную кетогруппу, азидную, этилдиазомалонилокси-, трифтордиазопропионилокси-, 2-нитро-4-азидофенокси-, m-азидофенокси- и m-диазиринифеноксигруппы, а также N-(2-нитро-4-азидофенил)фосфатидилэтанолламин [1]. Они также описали биосинтез фотореактивных фосфолипидов ауксотрофным штаммом *Escherichia coli*, в питательную среду которого была добавлена 12-азидоолеиновая кислота [3].

Штоффель и сотр. [4, 5] осуществили аналогичный биосинтез путем включения меченных тритием насыщенных и ненасыщенных азидокислот в фосфолипиды культуры почечных клеток хомяка. В этой же лаборатории были получены химическим синтезом фосфатидилхолин и сфингомиелин с остатком 18-азидо [^3H]линолевой кислоты [6].

Таким образом, до сих пор химическим путем получены лишь производные фосфатидилхолина. Синтез другого важного представителя фосфолипидов — фосфатидилэтанолламина, содержащего фотореактивную груп-

пировку в алифатической цепи, до сих пор не осуществлен. Описано лишь N-замещенное фотореактивное производное фосфатидилэтаноламина [1], которое, однако, по геометрическим параметрам и заряду полярной группировки сильно отличается от исходного фосфолипида.



Для обеспечения исследований липид-липидных и липид-белковых взаимодействий в искусственных и биологических мембранах мы осуществили синтез фотореактивной N-(2-нитро-4-азидофенил)-11-аминоундекановой кислоты (II), а из нее — фотореактивного фосфатидилхолина (III), который трансфосфатидилированием с помощью фосфолипазы D был превращен в соответствующий фотореактивный фосфатидилэтаноламин (IV).

Нитрофенилазидный остаток в качестве фотореактивной метки имеет несомненное преимущество по сравнению с другими азидопроизводными, поскольку эта группа подвергается фотолизу в более мягких условиях (при 300—450 нм) и при сравнительно непродолжительном облучении, в которых не происходит нарушений белковых структур. Хотя фенилнитрены, генерируемые из фенилазидов при УФ-облучении, с трудом внедряются в неактивированные связи C—H, такое внедрение в аллильные C—H-связи происходит легче [7]. Кроме того, фенилнитрены эффективно присоединяются к белкам [8—10].

11-Аминоундекановая кислота (I) в качестве носителя фотоаффинной метки была выбрана нами ввиду легкости ее синтеза и близости длины остатка N-(2-нитро-4-азидофенил)-11-аминоундекановой кислоты (II), полученной из кислоты (I), к длине цепи обычных природных жирных кислот (например, пальмитиновой).

11-Аминоундекановую кислоту (I) реакцией с 4-фтор-3-нитрофенилазидом превращали в фотореактивную кислоту (II), ангидридом которой ацилировали лизофосфатидилхолин, выделенный из желтка яиц, в присутствии 4-диметиламинопиридина по известному методу [2]. Фотореактивный фосфатидилхолин (III) был выделен хроматографией на силикагеле с выходом 67%. Нами осуществлен также синтез фосфатидилхолина (IIIa) с остатком, меченой N-(2-нитро-4-азидофенил)-11-амино[³H]ундекановой кислоты (IIa); последнюю получали из 11-аминоундекановой кислоты после введения в нее трития термояонным способом.

Для синтеза меченого фосфолипида (IIIa) мы воспользовались недавно описанным методом [11], согласно которому реакция спиртового компонента, кислоты и карбодиимида, взятых в молярном соотношении 1 : 1 : 1,

катализируется 4-диалкилпроизводным пиридина. При этом кислота используется более полно, чем при ацилировании ангидридом. С целью проверки применимости этого метода для получения фосфолипидов природной конфигурации мы синтезировали по этому методу фосфатидилхолин из [^{14}C]олеиновой кислоты и лизолецитина. Последний приготовлен непосредственно перед ацилированием из фосфатидилхолина, а при его выделении применяли только переосаждение (но не хроматографию), чтобы свести к минимуму ацильную миграцию (ср. [9]). Полученный таким образом меченый фосфатидилхолин в смеси с избытком исходного фосфатидилхолина был подвергнут действию фосфолипазы A_2 яда кобры в стандартных условиях [4]. При ферментализе в течение 30 мин фосфатидилхолин, добавленный к меченому, расщепился практически полностью. После разделения продуктов реакции с помощью ТСХ на силикагеле фосфатидилхолин в соответствующей зоне пластинки реактивом Драгендорфа и фосфорномолибденовой кислотой не обнаружили. Однако в этой же зоне присутствовало около 17% суммарной радиоактивности; 60% радиоактивности находилось в зоне жирных кислот и около 23% — в зоне лизофосфатидилхолина. Аналогичную картину наблюдали и после ферментативного расщепления в течение 1 ч.

По-видимому, при ацилировании лизофосфатидилхолина кислотой и карбодимидом в присутствии 4-диметиламинопиридина происходит частичная ацильная миграция жирнокислотного остатка из положения 1, а также частичная рацемизация. В результате последней образуется *D*-изомер фосфатидилхолина, не способный гидролизироваться фосфолипазой A_2 . Возможно, что в данном случае имеет также место миграция фосфохолинового остатка (ср. [12]). Особенности настоящего метода ацилирования требуют, несомненно, дальнейшего изучения.

Синтезированный фотореактивный фосфатидилхолин (III) был превращен в соответствующий фосфатидилэтаноламин — 1-ацил-2-[N-(2-нитро-4-азидофенил)-11-аминоундеканойл] - *sn* - глицеро-3-фосфоэтаноламин (IV) — трансфосфатидилированием на этаноламин при катализе фосфолипазой D из капусты в условиях, примененных нами при синтезе флуоресцентного фосфатидилэтанолamina [13].

Нами проведены предварительные эксперименты по фотолитическому присоединению фотореактивного фосфатидилхолина. Смешанные липосомы из [^{14}C]фосфатидилхолина и фотореактивного фосфатидилхолина (III) подвергли фотолизу* и показали, что фотореактивный фосфолипид присоединяется к фосфолипиду, имеющему одну двойную связь на молекулу, с невысоким выходом (около 1%), что подтверждает данные Бейли и Ноулса [7], полученные при генерировании фенилнитрена в фосфатидилхолиновых липосомах.

Экспериментальная часть

Электронные спектры (в спирте) снимали на спектрофотометре Beckman Acta MVI (Англия), оптическое вращение — на поляриметре Perkin Elmer 241 (Англия), ИК-спектры — на приборе Zeiss UR 11 (ГДР), масс-спектры — на спектрометре LKB 9000 (Швеция). Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике Mark II (Nuclear Chicago, США). Анализы на фосфор проводили по методике [14]. Для колоночной хроматографии применяли силикагель 60 (Merck, ФРГ), для ТСХ — силикагель КСК (фракция менее 150 меш) с 5% гипса или готовые пластинки Silufol UV 254 (Kavalier, СССР).

11-Аминоундекановую кислоту синтезировали по методу [15], 4-фтор-3-нитрофенилазид (Koch-Light, Англия) использовали без дополнитель-

* Фотолиз проводили в атмосфере аргона светом ртутной лампы среднего давления в сосуде из пирекса (отсекаются длины волны до 300 нм) до исчезновения исходного фотореактивного вещества (контроль ТСХ). Все вещества, содержащие N-2-нитро-4-азидофенильную группу и продукты ее фотолиза, интенсивно окрашены.

ной очистки. Лизофосфатидилхолин получали ферментализом лецитина, выделенного из желтка куриных яиц [16]. По данным ГЖХ, более 98% жирных кислот в нем составляли пальмитиновая и стеариновая в соотношении 5:2. С учетом этого средний молекулярный вес лизофосфатидилхолина принят 492. Фосфолипазу D из кочерыжек белокочанной капусты получали по методу [17], очистку доводили до стадии ацетонового порошка, которым пользовались в качестве ферментного препарата.

Все операции с веществами, содержащими 2-нитро-4-азидофенильную группу, проводили при красном свете.

N-(2-Нитро-4-азидофенил)-11-аминоундекановая кислота (II). К раствору 1,5 г 11-аминоундекановой кислоты (I) в 120 мл 0,2 М Na₂CO₃ при перемешивании добавляли раствор 2 г 4-фтор-3-нитрофенилазида в 40 мл диоксана, смесь перемешивали 15 ч при 65°С, охлаждали, промывали петролейным эфиром (3×20 мл), подкисляли 1 н. H₂SO₄ до pH 3,0 и выдерживали 2 ч при 0°С. Осадок отделяли, промывали холодной водой, сушили и кристаллизовали из смеси спирт — эфир. Выход 1,9 г (72%). Темнокрасные кристаллы, т. пл. выше 96°С (разл.). УФ, λ_{max}, нм (ε): 260 (10200), 465 (1720). ИК (вазелиновое масло, ν, см⁻¹): 3380 ср. (NH), 2500—3300 с шир. (COOH), 2135с (N₃), 1710с (C=O), 1525с (NO₂). Найдено, %: С 56,00; Н 7,10; N 18,70. С₁₇H₂₅N₃O₄. Вычислено, %: С 56,18; Н 6,93; N 19,27.

Метилловый эфир кислоты (II) имеет в масс-спектре характерные пики, *m/e*: 377 (M⁺), 349 (M⁺-N₂) (максимальный), 321 (M⁺-NO₂), 318 (M⁺-N₂-OMe), 319 (M⁺-N₂-NO), 303 (M⁺-N₂-NO₂); указанная фрагментация подтверждается присутствием соответствующих метастабильных ионов.

N-(2-Нитро-4-азидофенил)-11-амино[³H]ундекановая кислота (IIa). Порциями по 1 мг тритировали 4 мг 11-аминоундекановой кислоты по описанному методу [18] (сосуд диаметром 75 мм, длиной 100 мм, давление трития 5·10⁻³ мм рт. ст., температура вольфрамовой нити 2000 К; вещество наносили на стенки сосуда в виде 0,05% метанольного раствора и отгоняли растворитель в вакууме), после проведения реакции вещество смывали метанолом. Для удаления лабильного трития вещество упаривали с метанолом (2×10 мл) на ротаторном испарителе при 50—15 мм рт. ст. и 50°С, затем со смесью метанол — вода — уксусная кислота, 80:20:5 (2×10 мл). К остатку добавляли 2 мл 0,05 н. КОН и 2 мл диоксана, перемешивали 3 ч и упаривали. К остатку добавляли 2 мл воды, пропускали через раствор избыток CO₂ и снова упаривали. Остаток обрабатывали 4-фтор-3-нитрофенилазидом (5 мг, через 5 ч еще 3 мг) в 1 мл 0,2 М K₂CO₃ и 0,3 мл диоксана при перемешивании 12 ч при 65°С. Реакционную смесь промывали петролейным эфиром (3×0,5 мл), подкисляли уксусной кислотой до pH 5, добавляли 1 мл насыщ. NaCl и экстрагировали этилацетатом (2×4 мл). Экстракт сушили Na₂SO₄, фильтровали и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке, заполненной 1 г силикагеля в хлороформе с 0,1% уксусной кислоты, контроль фракций осуществляли с помощью ТСХ в системе хлороформ — этилацетат — уксусная кислота, 90:10:1. Вещество элюировали смесью хлороформ — этилацетат — уксусная кислота, 20:1:0,1, получили 4 мг хроматографически однородной кислоты (IIa) с активностью 3,5 мКи. Вещество идентично помеченной кислоте (II) по данным ТСХ в указанной выше системе (R_f 0,50) и в системе бензол — ацетон, 9:1 (R_f 0,60).

1-Ацил-2-[*N*-(2-нитро-4-азидофенил)-11-аминоундеканол]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин [III]. К раствору 163 мг кислоты (II) в 2 мл сухого хлористого метилена при перемешивании добавляли 50 мг дициклоксилкарбодимид, смесь выдерживали 12 ч при 20°С, из фильтрата удаляли растворитель. Остаток растворяли в 1 мл сухого хлороформа и прибавляли при перемешивании 78 мг лизофосфатидилхолина (предварительно высушен над P₂O₅), 37 мг 4-диметиламинопиридина в 1 мл того же растворителя. Через 30 ч разбавляли реакционную смесь 8 мл хлороформа, промывали

вали 1% HCl с 1% NaCl (2×3 мл), 1% NaCl (2×3 мл) и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с 15 г силикагеля в градиентной системе хлороформ — метанол; контроль фракций осуществляли с помощью ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4, детекцию пятен — фосфорномолибденовой кислотой и реактивом Драгендорфа; фото-реактивные вещества видны без обнаружения. Хлороформом с 10% метанола вымывали 100 мг непрореагировавшей кислоты (II). Вещество вымывали смесями хлороформа с 70—90% метанола. Выход 91 мг (67%), темно-красная аморфная масса, гомогенная при ТСХ и имеющая близкую к природному лецитину хроматографическую подвижность в системах: хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (R_f 0,35), хлороформ — метанол — 7 н. NH₄OH, 65 : 35 : 5 (R_f 0,40), и хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 25 : 15 : 4 : 2 (R_f 0,45). $[\alpha]_D^{22} +5,8^\circ \pm 10\%$ (с 2,8; хлороформ); определение удельного вращения было неточным из-за значительного оптического поглощения при 589 нм. Найдено, % : P 3,60. Вычислено (для мол. веса 838), % : P 3,69.

1-Ацил-2-[N-(2-нитро-4-азидофенил)-11-амино[³H]ундеcanoил]-sn-глицеро-3-фосфохолин (IIIa). К 4 мг меченной тритием кислоты (IIa) добавляли 6,5 мг немеченой кислоты (II); 10 мг полученной смеси, 14 мг лизофосфатидилхолина и 2 мг 4-диметиламинопиридина растворяли при перемешивании в 1 мл сухого хлороформа, прибавляли 60 мкл 10% дициклогексилкарбодимида в CCl₄, смесь выдерживали 25 ч при 20° С, а затем обрабатывали и хроматографировали (на 1 г силикагеля), как описано для немеченого производного (III). Выделяли 14 мг (61%) хроматографически однородного вещества с активностью 0,9 мКи, идентичного немеченому фосфатидилхолину (III) при ТСХ в трех системах растворителей (см. выше). Удельное вращение определить не удалось из-за сильного оптического поглощения.

1-Ацил-2-(1-[¹⁴C]олеоил)-sn-глицеро-3-фосфохолин. Соединение получено согласно предыдущей методике из 3 мг [¹⁴C]олеиновой кислоты (активность 70 мКи), 5 мг лизолецитина, 0,6 мг 4-диметиламинопиридина и 20 мкл 10% раствора дициклогексилкарбодимида в CCl₄, вещество выделяли препаративной ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 5. Выход 2,2 мг (29%), воскообразное вещество, имеющее одинаковую подвижность при ТСХ с природным фосфатидилхолином в трех указанных выше системах. Активность препарата около 20 мКи.

1-Ацил-2-[N-(2-нитро-4-азидофенил)-11-аминоундеcanoил]-sn-глицеро-3-фосфогланоламин (IV). К раствору фосфатидилхолина (III) в 1,5 мл свободного от перекисей эфира добавляли 1 мл ацетатного буфера (рН 5,6), 0,05 мл 0,1 М CaCl₂ и 0,3 мл свежеперегнавшего этаноламина, оттитрованного 5% HCl до рН 6,0. Смесь перемешивали 5 мин, добавляли 5 мг фосфолипазы D и встряхивали 4 ч при 20° С в атмосфере аргона, подкисляли 5% HCl до рН 2, эфир отгоняли, вещество экстрагировали хлороформом (5×2 мл). Остаток из экстракта хроматографировали на 1,5 г силикагеля в градиенте хлороформ — метанол; контроль фракций проводили с помощью ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (R_f 0,55). Выход 7 мг (63%), темно-красная аморфная масса, идентичная природному фосфатидилэтаноламину при ТСХ в указанной выше системе и системе хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 25 : 15 : 4 : 2 (R_f 0,70). УФ, λ_{max} , нм (ϵ): 249 (11 200), 254 (13 900), 260 (13 000), плечо 280 (6000), 464 (1720). Удельное вращение определить не удалось из-за сильного поглощения вещества при 589 нм. Найдено, % : P 4,00. Вычислено (для мол. веса 777), % : P 3,98.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chakrabarti P., Khorana H. G. (1975) *Biochemistry*, 14, 5021—5033.
2. Gupta C. M., Radhakrishnan R., Khorana H. G. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 4315—4319.

3. Greenberg G. R., Chakrabarti P., Khorana H. G. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 86-90.
4. Stoffel W., Schreiber C., Scheefers H. (1978) Z. Physiol. Chem., 359, 923-931.
5. Stoffel W., Salm K.-P., Körkeimer U. (1976) Z. Physiol. Chem., 357, 917-924.
6. Stoffel W., Metz P. (1979) Z. Physiol. Chem., 360, 197-206.
7. Bayley H., Knowles J. R. (1978) Biochemistry, 17, 2414-2419.
8. Lau E. P., Haley B. E., Barden R. E. (1977) Biochemistry, 16, 2581-2585.
9. Klip A., Gitler C. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 60, 1155-1162.
10. Staros J. V., Richards F. M. (1975) J. Biol. Chem., 250, 8174-8178.
11. Hassner A., Alexanian V. (1978) Tetrahedron Lett., 4475-4478.
12. Lammers J. G., Liefkens T. J., Bus J., van der Meer J. (1978) Chem. and Phys. Lipids, 22, 293-305.
13. Молотковский Юл. Г., Унковский В. И., Бергельсон Л. Д. (1979) Биоорг. химия, 5, 144-145.
14. Gerlach E., Deutike B. (1963) Biochem. Z., 337, 477-481.
15. Несмеянов А. Н., Фрейдлина Р. Х., Захаркин Л. И., Васильева Е. И., Кост В. Н., Васильева Т. Т. (1957) Ж. общ. химия, 27, 2418-2422.
16. Napahan D. J., Rodell M., Turner L. D. (1954) J. Biol. Chem., 206, 431-441.
17. Yang C. F. (1969) in: Methods in Enzymology, vol. XIV, p. 208, Acad. Press, N. Y.
18. Шишков А. В., Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Унукович М. С., Гольданский В. И., Несмеянов А. Н. (1976) Докл. АН СССР, 228, 1237-1239.

Поступила в редакцию
16.VII.1979

После доработки
14.IX.1979

SYNTHESIS OF PHOTOREACTIVE PHOSPHATIDYLCHOLINE AND PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE

MOLOTKOVSKY Jul. G., LAZURKINA T. Yu., FAIERMAN V. N.,
SMOLYAKOV V. S., BERGELSON L. D.

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

The synthesis of photoreactive lipids, N-(2-nitro-4-azidophenyl)-11-aminoundecanoic acid and 1-acyl-2-[N-(2-nitro-4-azidophenyl)-11-aminoundecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine, was accomplished; these substances were obtained also in tritiated state. Photoreactive phosphatidylethanolamine was synthesized from corresponding phosphatidylcholine by trans-phosphatidylation in the presence of cabbage phospholipase D. It was found that acylation of lysophosphatidylcholine by the newly developed method, i. e. using carboxylic acid and carbodiimide in the presence of 4-dimethylaminopyridine, is accompanied by partial acyl migration and racemization.