



УДК 547.392.52.057:541.124:546.11.2

АРАХИДОНОИЛАМИНОКИСЛОТЫ И АРАХИДОНОИЛПЕПТИДЫ: СИНТЕЗ И СВОЙСТВА

© 2006 г. В. В. Безуглов*, Н. М. Грецкая*, А. В. Блаженова*, Е. Л. Андрианова*,
М. Г. Акимов*, М. Ю. Бобров*, И. В. Назимов*, М. А. Кисель**, О. Л. Шарко**,
А. В. Новиков***, Н. В. Краснов***, В. П. Шевченко****, К. В. Шевченко****,
Т. В. Вьюнова****, Н. Ф. Мясоедов****

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск;

***Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург;

****Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Поступила в редакцию 16.08.2005 г. Принята к печати 19.09.2005 г.

Для изучения биологических свойств ациламино кислот синтезированы *N*-арахидоноильные (АА) производные аминокислот: Gly, Phe, Pro, Val, γ -аминомасляной кислоты (GABA), диоксифенилаланина, Tug, Tgr и Ala, а также пептидов МЕНFPGP и PGP. В масс-спектрах ионизации при атмосферном давлении распылением в электрическом поле все соединения дают протонированный молекулярный ион максимальной интенсивности, предел детектирования составлял 10 фмоль вещества на образец. Из всех изученных ациламино кислот наибольшую ингибиторную активность по отношению к гидролазе амидов жирных кислот из мозга крысы показал АА-Gly (IC_{50} 6.5 мкМ). Слабое, но регистрируемое ингибирование проявляли АА-Phe, АА-Tug и АА-GABA (IC_{50} 55, 60 и 50 мкМ соответственно). Сами ацилированные аминокислоты, за исключением АА-Gly, были устойчивы к гидролизу этим ферментом. Все арахидоноиламинокислоты в той или иной степени ингибировали фосфолипазу D из капусты, наиболее активными оказались АА-GABA и АА-Phe (IC_{50} 20 и 27 мкМ соответственно). Попыты по выяснению возможности биосинтеза АА-Tug в гомогенатах печени и нервных тканях крысы не показали образования этой ациламино кислоты *in vitro*, однако были обнаружены продукты ее метаболизма: АА-дофамин и АА-(3-*O*-метилдофамин); наибольшее количество первого метаболита наблюдали в гомогенате печени, а второго – в гомогенате головного мозга. Ациламино кислоты не оказывали цитотоксического действия на клетки глиомы С6. Показано, что *N*-ацилирование гептапептида МЕНFPGP (семакс) арахидононовой кислотой приводит к повышению его гидролитической стабильности и увеличению сродства к местам специфического связывания на мембранах мозжечка крысы.

Ключевые слова: арахидононовая кислота; *N*-ациламино кислоты; *N*-ацилпептиды; гидролаза амидов жирных кислот; фосфолипаза D; *N*-арахидоноилдофамин; глиома С6; нейротоксичность, масс-спектрометрия с электрораспылением.

ВВЕДЕНИЕ

Аминокислоты, ацилированные жирными кислотами, были обнаружены у бактерий [1–3], в том числе и у морских микроорганизмов [4]. *N*-Ациламино кислоты, содержащиеся в секрете личинок некоторых видов насекомых [5], обладают способностью вызывать защитную реакцию у расте-

ний, поедаемых этими насекомыми [6]. Недавно у млекопитающих были найдены амиды арахидононовой кислоты с глицином (АА-Gly), γ -аминомасляной кислотой (АА-GABA) и аланином [7], обладающие высокой биологической активностью. Так, АА-Gly и АА-GABA проявляют анальгетическое действие и уменьшают отек, вызванный локальной инъекцией арахидононовой кислоты [7–10]. АА-Gly регулирует концентрацию анандамида – эндогенного лиганда каннабиноидных рецепторов [11] – в тканях, ингибируя гидролиз этого липида, блокируя его транспорт и, возможно, снижая экспрессию гена гидролазы амидов жирных кислот, инактивирующей анандамид [9, 12]. Оказалось, что АА-Gly является первым известным на сегодня эндогенным селективным субстратом

Сокращения: АА – арахидононовая кислота или ее остаток; DA – дофамин; 3MeDA – 3-*O*-метилдофамин; GABA – γ -аминомасляная кислота; DOPA – дигидроксифенилаланин; NBD – *N*-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил)аминоундеканол; FAAH – гидролаза амидов жирных кислот; PMSF – фенилметилсульфонилфторид; PC – фосфатидилхолин.

*Автор для связи (факс: (495) 3357103; эл. почта: wbez@oxylin.ibch.ru).

циклооксигеназы-2, под действием которой он превращается в глициновые амиды простагландинов H_2 и E_2 и 11-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты [13]. Было высказано предположение о наличии в организме млекопитающих других ацилированных аминокислот, например *N*-ацилвалина, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина и серина [9, 14].

Приведенные данные позволяют выделить аминокислоты, ацилированные жирными кислотами, в отдельный класс липидов, заслуживающий более детального изучения. Не исключено, что *N*-ацилирование не только аминокислот, а, возможно, и некоторых пептидов и белков ненасыщенными жирными кислотами является еще одним способом повышения разнообразия природных биорегуляторов. В данной статье мы описываем синтез и некоторые биологические свойства ряда *N*-арахидоноиламинокислот*, а также арахидоноильного производного гептапептида МЕНFPGP (семакс).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аминокислоты, ацилированные арахидоновой кислотой по α -аминогруппе, были синтезированы обработкой *N,O*-силилированного производного соответствующей аминокислоты арахидоноил-изобутилкарбонатом, приготовленным *in situ*. Такой вариант метода смешанных ангидридов позволил достичь приемлемого выхода (50% и более) для ароматических аминокислот, которые в варианте без силилирования давали лишь незначительное количество искомого амида. Последний вариант, однако, был наилучшим при синтезе AA-GABA, которая была выделена после хроматографии с выходом 90%. *N*-Арахидоноилпептиды (AA-PGP и AA-МЕНFPGP) получили обработкой растворов исходных пептидов в DMF избытком арахидоноил-изобутилкарбоната, очищенного экстракцией гексаном из реакционной смеси синтеза смешанного ангидрида арахидоновой кислоты и изобутилкарбоната, с последующей хроматографической очисткой (AA-PGP) или осаждением эфиром (AA-МЕНFPGP).

Структуры синтезированных соединений подтверждали методами ЯМР-спектроскопии (табл. 1) и масс-спектрометрии (табл. 2), а также ИК-спектроскопии. ИК-спектры всех ациламинокислот содержали полосы поглощения при $1000\text{--}800\text{ см}^{-1}$ (колебания *цис*-связей $\text{C}=\text{C}$), $1300\text{--}1250\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания связи $\text{C}-\text{N}$ в амидах, полоса амид III), $1650\text{--}1450\text{ см}^{-1}$ (деформационные ко-

лебания связи $\text{C}-\text{N}$ в амидах, полоса амид II), $1700\text{--}1500\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания связей $\text{C}=\text{C}$ в ароматическом кольце – только для AA-DOPA, AA-Tyr, AA-Phe, AA-Trp), $1780\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания карбонильной группы, полоса амид I).

Для определения молекулярной массы синтезированных соединений использовали режим времяпролетной масс-спектрометрии с распылением в электрическом поле. Основными сигналами в масс-спектрах всех соединений были пики ионов типа $[M + H]^+$, для которых получено хорошее соотношение между измеренной и вычисленной массами. Во всех спектрах присутствовали также менее интенсивные (10–15%) пики ионов типа $[M + Na]^+$, которые позволили дополнительно подтвердить сделанное отнесение молекулярных ионов (табл. 2). Кроме того, данный вариант масс-спектрометрии дает информацию и о чистоте синтезированных веществ, особенно в случае модифицированных пептидов.

Чтобы оценить предел чувствительности прибора (измерения выполнены на времяпролетном масс-спектрометре МХ-5303, разработка Института аналитического приборостроения РАН), были проведены специальные эксперименты по анализу стандартных растворов AA-производных DOPA и дофамина, отличающегося от первого отсутствием карбоксильной группы. Надежная идентификация была достигнута при содержании 10 фмоль каждого из стандартов во вводимой пробе (табл. 3), при этом соотношение сигнал/шум было не менее 5 : 1. Подобная высокая чувствительность позволила определить наличие примеси сульфоксида в образце AA-МЕНFPGP (менее 5%), образовавшегося за счет окисления остатка метионина, и отсутствие соответствующего сульфона (рис. 1). Синтезированные арахидоноильные производные были использованы далее в экспериментах по изучению их биологических свойств.

Как и у других трансммиттеров, концентрация липидных мессенджеров регулируется специфическими ферментами. В случае арахидоноилэтаноламина (анандамида), других этаноламидов и простых амидов жирных кислот (например, олеамида) ферментом, инактивирующим эти соединения, является гидролаза амидов жирных кислот (Fatty Acid Amide Hydrolase – FAAH) [15]. Недавно было показано, что AA-Gly способен ингибировать этот фермент [7, 9]. Другие арахидоноиламинокислоты были менее активны, только арахидоноилаланин обладал заметной активностью (IC_{50} 38 мкМ на мембранах мозга крысы) [12]. В экспериментах на мембранных препаратах мозга крысы по гидролизу анандамида FAAH в присутствии ингибиторов изученные соединения по убыванию ингибирующей активности можно расположить в

* О синтезе некоторых арахидоноиламинокислот, упоминаемых в данной статье, ранее было сообщено [12], однако авторы не привели физико-химические характеристики этих соединений, что побудило нас описать синтез и привести аналитические данные всех синтезированных веществ.

Таблица 1. Данные ^1H -ЯМР-спектров и удельное вращение синтезированных соединений

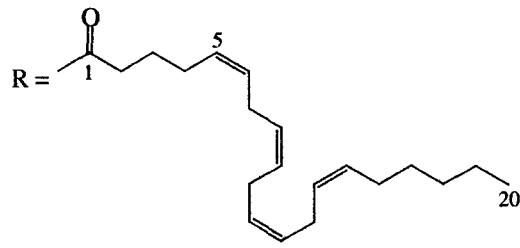

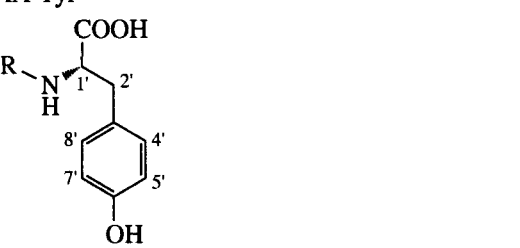
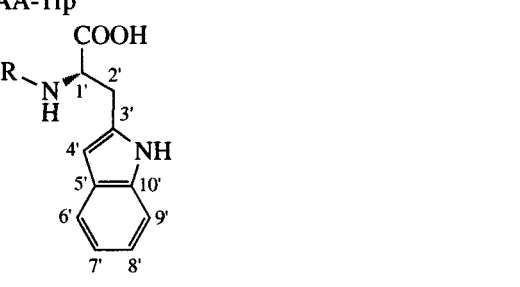

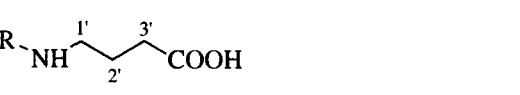
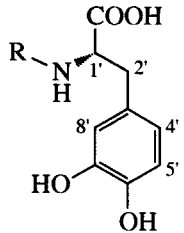
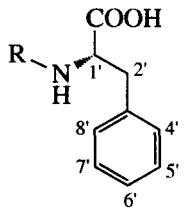
Соединение, выход	Данные ^1H -ЯМР (CDCl_3 , 500 МГц), δ , м.д.	$[\alpha]_D^{20}$ (с 1, хлороформ), град
 <p>Арахидоноил* (AA)</p>	<p>0.88–0.89 (3 H, т, J 7.13, H₂₀); 1.36–1.23 (6 H, м, H₁₇, H₁₈, H₁₉); 1.75–1.54 (2 H, квинт, J 7.2, H₃); 1.97–2.04 (2 H, квинт, J 7.2, H₁₆); 1.97–2.17 (2 H, кв, J 7.0, H₄); 2.04–2.34 (2 H, м, H₂); 2.73–2.81 (6 H, м, H₇, H₁₀, H₁₃); 5.35–5.22 (8 H, м, H₅, H₆, H₈, H₉, H₁₁, H₁₂, H₁₄, H₁₅)</p>	
<p>AA-Val</p>  <p>38%</p>	<p>AA см. выше Val: 0.96 (3 H, д, J 6.9, H_{3'}); 0.99 (3 H, д, J 6.8, H_{4'}); 2.25 (4 H, м, H₂, H_{2'}); 4.56 (1 H, кв, J 4.4, H_{1'}); 5.99 (1 H, д, J 8.4, NH)</p>	+9.4
<p>AA-Tyr</p>  <p>53%</p>	<p>AA (см. выше) Tyr: 2.99 (2 H, м, H_{2'}); 4.79 (1 H, кв, J 7.2, H_{1'}); 6.33 (1 H, д, J 7.4, NH); 6.61 (2 H, д, J 7.9, H_{5'}, H_{7'}); 6.87 (2 H, д, J 8.1, H_{4'}, H_{8'})</p>	+51.6
<p>AA-Trp</p>  <p>65%</p>	<p>AA (см. выше) Trp: 3.27 (2 H, м, J 6.9, H_{2'}); 4.87 (1 H, кв, J 6.59, H_{1'}); 6.1 (1 H, д, J 5.9, NH); 6.86 (1 H, с, H_{4'}); 7.03 (1 H, т, J 7.3, H_{8'}); 7.1 (1 H, т, J 7.3, H_{7'}); 7.23 (1 H, д, J 8, H_{6'}); 7.5 (1 H, д, J 7.9, H_{9'}); 8.4 (1 H, с, NH)</p>	+5.4
<p>AA-Pro</p>  <p>65%</p>	<p>AA (см. выше) Pro: 2.38–2.26 (6 H, м, H₂, H_{2'}, H_{3'}); 3.40–3.46 (1 H, м, H_{4'a}); 3.56–3.61 (1 H, м, H_{4'b}); 4.49–4.52 (1 H, м, H_{1'})</p>	–102
<p>AA-GABA</p>  <p>90%</p>	<p>AA (см. выше) GABA: 1.87–1.8 (2 H, м, H_{2'}); 2.41–2.36 (4 H, м, H₃, H_{3'}); 3.34–3.28 (2 H, кв, H_{1'}); 5.98–5.92 (1 H, т, NH)</p>	–

Таблица 1. Окончание

Соединение, выход	Данные ¹ H-ЯМР (CDCl ₃ , 500 МГц), δ, м.д.	[α] _D ²⁰ (с 1, хлороформ), град
AA-DOPA  55%	AA (см. выше) DOPA: 2.9 (2 H, м, H2'); 4.69 (1 H, м, H1'); 6.40 (1 H, д, NH); 6.43 (1 H, д, H4'); 6.59 (1 H, с, H8'); 6.66 (1 H, д, H5')	+20.5
AA-Phe  55%	AA (см. выше) Phe: 3.2–3.1 (2 H, 2 дд, J 6.2, 5.5, H2'); 4.83 (1 H, кв, H1'); 5.9 (1 H, д, J 7.1, NH); 7.1–7.26 (5 H, м, H4'–H8')	+21.8

* Приведены интервалы сигналов протонов, встречающиеся в спектрах изученных арахидоноиламинокислот.

Таблица 2. Основные ионы в масс-спектрах ациламино кислот

Вещество	Брутто-формула, мол. масса	[M + H] ⁺		[M + Na] ⁺	
		вычислено	измерено	вычислено	измерено
AA-Phe	C ₂₉ H ₄₁ NO ₃ 451.3086	452.3120	452.2848	474.2974	474.2633
AA-DLТур	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄ 467.3036	468.3114	468.3155	490.2933	490.2995
AA-LТур	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄ 467.3036	468.3114	468.3814	490.2933	490.2930
AA-DOPA	C ₂₉ H ₄₁ NO ₅ 483.2985	484.3063	484.3065	506.2882	506.2896
AA-Тур	C ₃₁ H ₄₂ N ₂ O ₃ 490.3195	491.3270	491.3265	513.3093	513.3105
AA-Pro	C ₂₅ H ₃₉ NO ₃ 401.2930	402.3008	402.3008	424.2828	424.2835
AA-Val	C ₂₅ H ₄₁ NO ₃ 403.3086	404.3165	404.3168	426.2984	426.2986
AA-PGP	C ₃₂ H ₄₉ N ₃ O ₅ 555.3672	556.37505	556.3789	578.3570	578.3586
AA-МЕНFPGP	C ₅₇ H ₈₁ N ₉ O ₁₁ S 1099.5776	1100.58545	1100.4041	1122.5674	1122.381

следующий ряд: AA-Gly > AA-Phe > AA-GABA > > AA-Тур > AA-Pro > AA-Тур ≫ AA-Val. Из всех изученных ациламино кислот наибольшую ингибиторную активность показал AA-Gly (IC₅₀ 6.5 мкМ). Слабое, но регистрируемое ингибирование про-

являли AA-Phe, AA-Тур и AA-GABA (IC₅₀ 55, 60 и 50 мкМ соответственно). Остальные вещества (AA-Pro, AA-Val, AA-Тур) были практически неактивны. Интересно, что замена арахидоновой кислоты на докозагексаеновую в N-ацил-GABA

Таблица 3. Сравнение предела детектирования AA-DA и AA-DOPA при ионизации распылением в электрическом поле

Вещество	$[M + H]^+$ вычислено	$[M + H]^+$ измерено при содержании вещества в пробе, пмоль			
		10	1	0.1	0.01
AA-DA	440.3165	440.3165	440.3165		440.3338*
AA-DOPA	484.3063	484.3065		484.3017	484.3085**

* Соотношение сигнал/шум 5 : 1.

** Соотношение сигнал/шум 7 : 1.

приводила к полной потере даже умеренной ингибиторной активности (табл. 4). Все изученные ациламиноокислоты, за исключением AA-Gly, оказались устойчивы к действию FAAH. А AA-Gly, как и анандамид, является ее субстратом [7].

Фосфолипазы D (семейство фосфодиэстераз, катализирующих гидролиз фосфолипидов с образованием фосфатидовой кислоты и биоактивных спиртов) являются важными ферментами биосинтеза *N*-ацилэтанолламинов – липидных сигнальных молекул, образующихся как в организме жи-

вотных [16], так и в растениях [17]. Ранее было показано, что этаноламины C_{12} – C_{18} -насыщенных жирных кислот, а также кислые фосфолипиды являются активными ингибиторами фосфолипазы D из капусты [17], поэтому мы решили оценить влияние ациламиноокислот на активность этого фермента. Наибольший ингибирующий эффект на гидролиз фосфатидилхолина проявляла AA-GABA (IC_{50} 20 мкМ). Неплохим ингибитором оказался также AA-Phe (IC_{50} 27 мкМ), тогда как арахидоноильные производные других ароматических ами-

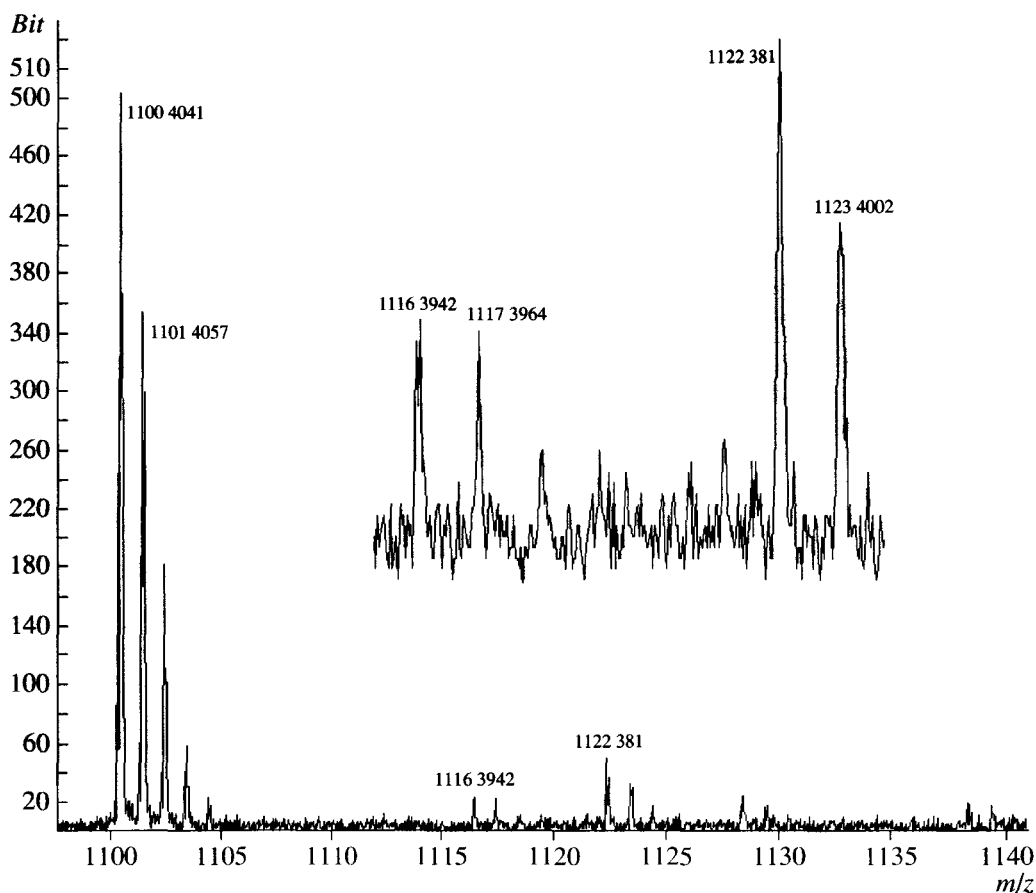


Рис. 1. Масс-спектр AA-MENFPGP, полученный в режиме времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией распылением в электрическом поле, прямой ввод образца. Максимальный пик соответствует иону $[M + H]^+$, m/z 1100.4041 (вычислено: 1100.58545). Интенсивность выражена в единицах информации. На врезке показан участок спектра, соответствующий пику иона сульфоксида (m/z 1116.3942, вычислено: 1116.58036) в увеличенном масштабе.

Таблица 4. Влияние *N*-ациламино кислот на активность гидролазы амидов жирных кислот (ФААН) и фосфолипазы D

Соединение	ФААН, IC ₅₀ , мкМ	Фосфолипаза D, IC ₅₀ , мкМ
AA-Pro	>100	40
AA-Gly	6.2	33
AA-Phe	55	27
AA-Tyr	60	46
AA-Trp	>100	45
AA-Val	>100	37
AA-GABA	50	20

нокислот были менее активны (табл. 4). Хотя фосфолипазы D, гидролизующие *N*-ацилфосфатидилэтанолламины с образованием этаноламидов жирных кислот (в том числе и AA) у животных и растений, отличаются по структуре [17], способность всех изученных нами арахидоноиламинокислот в той или иной мере ингибировать растительную фосфолипазу D указывает на большой регуляторный потенциал этих соединений. В настоящее время нами проводятся эксперименты по изучению модулирующего действия ациламино кислот на фосфолипазу D млекопитающих.

Вопрос о механизме биосинтеза ациламино кислот все еще остается открытым. Наиболее изучены пути образования *N*-ацилглицина. Предполагают, что он может образовываться, с одной стороны, путем конденсации ацилкоэнзима A и глицина под действием фермента ацил-CoA : глицин-*N*-ацилтрансферазы в головном мозге [7] или печени [18]. С другой стороны, было показано образование AA-Gly при инкубации анандамида с культурой клеток печени [18]. Несомненно, что второй путь биосинтеза окислением первичной гидроксильной группы анандамида касается только арахидоноилглицина и не может быть реализован для других *N*-ациламино кислот. Логично предположить, что в биосинтезе *N*-ациламино кислот принимают участие ферменты, родственные ацил-CoA : глицин-*N*-ацилтрансферазе. В этом случае должна происходить прямая конденсация арахидононой кислоты и выбранного аминокислотного субстрата.

Мы изучили возможность образования AA-Tyr в печени и в нервной ткани крысы. Ввиду того, что субклеточная локализация ферментов синтеза ациламино кислот неизвестна, мы использовали в этих экспериментах полные гомогенаты тканей. Следует отметить, что биосинтетическая способность гомогенатов невысока, поэтому только применение высокоочищенной тритием арахидононой кислоты позволило обнаружить продукты ее метаболических превращений. Анализ метода-

Таблица 5. Распределение радиоактивных продуктов биосинтеза (в процентах относительно суммарной радиоактивности) при инкубации [³H]AA и тирозина с полными гомогенатами печени и нервных тканей крысы

Продукт	Орган		
	печень	спинной мозг	головной мозг
AA-Tyr	0.0	0.0	0.0
AA-DA	57.2	8.2	15.4
AA-3MeDA	4.3	0.0	84.6
AA	38.4	91.8	0.0

ми радио-ВЭЖХ и радио-ТСХ продуктов инкубации [³H]AA и тирозина с гомогенатами печени спинного или головного мозга крысы не выявил присутствия искомого [³H]AA-Tyr в реакционной смеси. Однако были обнаружены радиоактивные соединения, совпадающие по подвижности с AA-DA и продуктом его 3-*O*-метилирования (AA-3MeDA), причем наибольшее количество первого вещества наблюдали в гомогенате печени (около 60% суммарной радиоактивности), а второго – в гомогенате головного мозга (более 80% суммарной радиоактивности). В гомогенате спинного мозга отмечено лишь незначительное образование [³H]AA-DA, а основное количество радиоактивности было сосредоточено в зоне арахидононой кислоты (табл. 5). В контрольных образцах (с гомогенатами, инактивированными нагреванием) [³H]AA-DA и [³H]AA-3MeDA отсутствовали. Образование этих метаболитов ферментативным путем было подтверждено также экспериментами с использованием кофакторов тирозингидроксилазы, DOPA-декарбоксилазы и катехол-*O*-метилтрансферазы, добавление которых изменяло соотношение продуктов реакции (подробные результаты исследований биосинтеза AA-Tyr и его метаболических превращений будут опубликованы отдельно).

Можно предположить, что образующийся из арахидононой кислоты и тирозина AA-Tyr быстро подвергается превращениям в высокоактивный метаболит AA-DA, являющийся эндогенным лигандом ванилоидного (TRPV1) [19] и центрального каннабиноидного рецептора [20]. Ранее возможность такого пути биосинтеза AA-DA обсуждалась в литературе [19, 20], однако углубленные биохимические исследования пока не проведены. Кроме того, нельзя исключить и расщепление образовавшегося AA-Tyr различными гидролазами. Так, при инкубации [³H]AA-Tyr с гомогенатом спинного мозга гидролиз проходил в незначительной степени. В гомогенате головного мозга наблюдалось более значительное накопление арахидононой кислоты, которое полностью блокировалось добавлением фенолметилсульфонил-

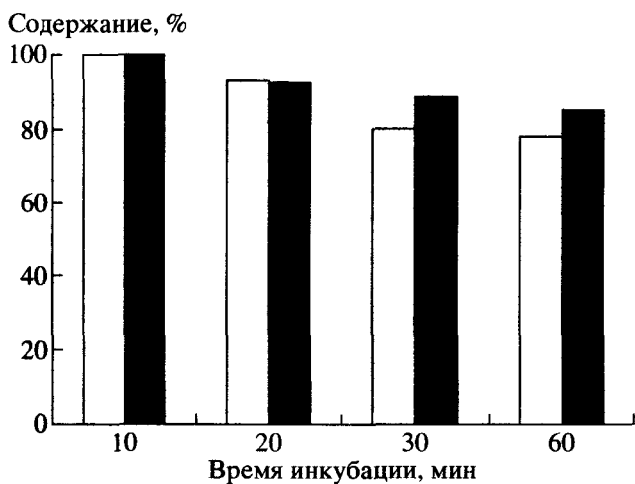


Рис. 2. Динамика изменения содержания АА-МЕНFPGP в смеси при инкубации с мембранами мозга крысы при 37°C без добавления ингибиторов гидролаз (светлые столбики) и в присутствии смеси бацитрацин–PMSF–пепстатин А (10, 100, 1 мкМ соответственно) (черные столбики). Анализ проводили с помощью ВЭЖХ. За 100% принято содержание ацилированного пептида в образце через 10 мин инкубации.

фторида – эффективного ингибитора FAAH. В то же время в гомогенате печени, где гидролиз АА-Тур был максимальным (реакционная смесь содержала 93.1% АА и 6.9% АА-3MeDA), добавление этого ингибитора не давало эффекта. Таким образом, приведенные данные косвенно свидетельствуют в пользу образования АА-Тур из арахидоновой кислоты и тирозина ферментативными системами млекопитающих, хотя эндогенное происхождение этой ациламино кислоты еще предстоит доказать.

Биоактивные липиды из семейства эндоканнабиноидов, так же как и экзогенные каннабиноиды, оказывают токсическое действие на пролиферирующие опухолевые клетки и, в частности, на глиому С6. Клетки глиомы С6 являются очень удобной моделью для изучения эффектов и механизмов действия нейроактивных липидов, поскольку они содержат функционально активные каннабиноидные и ванилоидные рецепторы, а также систему транспорта и деградации эндоканнабиноидов [21]. Учитывая отмеченное выше метаболическое сопряжение ациламино кислот (по крайней мере АА-глицина и АА-тирозина), а также эндоканнабиноидов (анандамид) и эндованилоидов (АА-DA), мы проверили цитотоксическое действие синтетических АА-аминокислот (АА-Тур, АА-Тр, АА-Phe, АА-Pro, АА-Gly, АА-GABA) на культуре клеток глиомы С6. Было установлено, что до концентрации 100 мкМ эти соединения не оказывали угнетающего влияния на пролиферацию (данные не проиллюстрированы), тогда как АА-DA, являющийся продуктом метаболизма

АА-Тур, уже в концентрации 10 мкМ вызывал гибель 90% клеток. Такое различие в эффектах АА-Тур и АА-DA, по-видимому, объясняется неспособностью глиомы С6 превращать первое вещество во второе.

Эндогенное происхождение некоторых *N*-ациламино кислот позволяет предположить существование общего метаболического пути модификации аминокислот, пептидов и белков путем *N*-ацилирования длинноцепочечными насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами. Если посттрансляционное ацилирование белков насыщенными кислотами для обеспечения ассоциации с мембранами и регуляции функциональной активности является хорошо известным фактом (см., например, [22]), то *N*-ацилирование белков и пептидов ненасыщенными жирными кислотами остается пока в области гипотез.

Мы определили гидролитическую стабильность и способность специфически связываться с мембранами мозга крысы гептапептида МЕНFPGP (семакс), *N*-ацилированного арахидоновой кислотой. Известно, что пептиды быстро подвергаются расщеплению многочисленными пептидазами. Не является исключением и семакс, который быстро гидролизует с образованием фрагментов как в плазме крови, так и при инкубации с мембранами мозга [23]. Арахидоилсемакс оказался более устойчивым к гидролизу. Так, за 50 мин инкубации с мембранами мозга крысы потеря арахидоилсемакса составила 20%, причем это гидролитическое расщепление лишь незначительно снижалось в присутствии набора ингибиторов протеиназ (рис. 2). В этих же условиях немодифицированный семакс расщеплялся на 47% за 30 мин. По сравнению с семаксом АА-МЕНFPGP в 2 раза лучше связывался с пока не идентифицированными местами специфического связывания этого пептида на мембранах мозжечка крысы (K_D 104 и 51 нМ соответственно). Связанный с мембранами меченный тритием по арахидоновой кислоте АА-МЕНFPGP специфически вытеснялся холодным семаксом, а связанный меченый семакс – холодным АА-МЕНFPGP, причем в последнем случае вытеснение было на 20% более эффективным. Не исключено, что повышение средства к местам связывания семакса после его *N*-ацилирования арахидоновой кислотой объясняется не только увеличением гидролитической стабильности модифицированного пептида, но и способностью АА-МЕНFPGP достигать участка связывания путем латеральной диффузии в липидном бислое.

Таким образом, можно утверждать, что ацилирование жирными кислотами концевой аминокислотной группы в аминокислотах и пептидах не только приводит к образованию новых биологически активных веществ, влияющих на активность ключе-

вых ферментов биосинтеза и метаболизма биоэффекторных липидов, но и способно изменить метаболическую судьбу как аминокислот, так и пептидов. Вследствие повышенной гидролитической стабильности такие ацилированные аминокислоты и ацилпептиды могут, по-видимому, более широко распространяться в организме, чем немодифицированные вещества. Это особенно важно для пептидов, имеющих медицинское применение, таких, как семакс, поскольку открывает возможность пролонгирования их фармакологической активности с помощью природных полиеновых жирных кислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали изобутилхлорформат (Fluka, Швейцария); бис-триметилсилилтрифторацетамид (BSTFA), аминокислоты, 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонилфторид (AEBSF) фирмы "Acros" (Германия), Трис – трис(гидроксиметил)аминометан (BioRad Laboratories, США); бычий сывороточный альбумин (BSA), EDTA, тетрагидробиптерин, NADPH, бензамидин, пепстатин А, фенилметилсульфонилфторид (PMSF) фирмы "Sigma" (США); фосфатно-солевой буфер (PBS), МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид фирмы "ПанЭко" (Россия). Хроматографически чистый 1-ацил-2-[N-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил)аминоундеканойл]-sn-глицеро-3-фосфохолин (NBD-PC) получен ацилированием лизофосфатидилхолина ангидридом флуоресцентно меченой кислоты по методу, описанному ранее [24].

Буферы: 10 мМ Трис-HCl, pH 7.4, 0.32 М сахароза, 1 мМ EDTA (А); 1 мМ CaCl₂, 50 мМ Трис-HCl, pH 7.4 (Б).

Растворители очищали по стандартным методикам. Для аналитической ТСХ использовали пластинки DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck, Art 5554, Германия). Меченные тритием вещества: [³H₈]арахидоновая кислота (210 Ки/ммоль), [³H]анандамид (10.1 Ки/ммоль), [³H₈]арахидоноил-МЕНFPGP (210 Ки/ммоль), [³H]МЕНFPGP (56 Ки/ммоль) получены в Институте молекулярной генетики РАН В.П. Шевченко и имели радиохимическую чистоту не менее 95% по данным радио-ВЭЖХ. Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Лоури. Цитотоксическое действие веществ на клетки глиомы С6 крысы определяли с использованием МТТ-теста как описано ранее [25]. Масс-спектры получены на времяпролетном масс-спектрометре МХ-5303 (разработка Института аналитического приборостроения РАН) в режиме ионизации распылением в электрическом поле.

Общая методика получения ациламино кислот. Раствор аминокислоты в свежеперегнанном

ацетонитриле (50 мг/мл) продували аргоном, закрывали резиновой пробкой и при перемешивании прибавляли 1.5–3.0 экв. BSTFA шприцом через пробку. Смесь перемешивали при комнатной температуре (21°C) до полного растворения аминокислоты. Затем через пробку прибавляли 0.8–0.9 экв. раствора арахидоноил-изобутилкарбоната, полученного как описано ранее [26], в абс. ацетонитриле (200 мг/мл) и перемешивали при комнатной температуре. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ в системе хлороформ–метанол, 9 : 1. После завершения реакции реакционную массу разбавляли этилацетатом. Органический слой промывали 2 М NaHSO₄, затем водой до достижения нейтрального значения pH и насыщенным раствором NaCl, сушили сульфатом натрия, фильтровали и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с Kieselgel 60. Элюировали хлороформом и смесью хлороформ–метанол–уксусная кислота, 25 : 1 : 0.1. Фракции, содержащие искомый продукт, объединяли и упаривали. Выход реакции и физико-химические характеристики синтезированных соединений см. в табл. 1 и 2.

Синтез N-арахидоноилпептидов. Семакс (100 мг, 0.12 ммоль) суспендировали в 1 мл DMF, прибавляли триэтиламин и перемешивали 8 мин при 26°C в атмосфере аргона. За это время пептид полностью растворяется. К полученному раствору при перемешивании прибавляли раствор арахидоноил-изобутилкарбоната (59 мг, 0.15 ммоль) в DMF (200 мг/мл). Реакционную смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре и выдерживали 48 ч при 4°C. Растворитель упаривали в вакууме масляного насоса. Остаток растворяли в метаноле и обрабатывали уксусной кислотой (2 × 150 мкл). Полученный раствор разбавляли эфиром до появления осадка. Осадок отделяли центрифугированием, промывали 3 раза эфиром, высушивали в вакууме водоструйного, затем – масляного насоса. Получено 77 мг (58%) порошка слабо желтого цвета. Данные масс-спектрометрии см. в табл. 2. Арахидоноил-трипептид AA-PGP синтезировали аналогично, но очистку проводили с помощью колоночной хроматографии, как для AA-аминокислот. Выход 65%.

Влияние арахидоноиламинокислот на энзиматический гидролиз [³H]анандамида. Мозг крысы гомогенизировали в десятикратном объеме 50 мМ буфера Трис-HCl, pH 7.4 при 4°C. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g, отбирали супернатант. Супернатант центрифугировали 25 мин при 12000 g, надосадочную жидкость удаляли, осадок растворяли в 5–8 мл 50 мМ буфера Трис-HCl. К суспензии мембранного препарата в буфере (40 мкг белка/мл) последовательно прибавляли раствор AA-аминокислот в этаноле, разбавленный буфером до концентрации 25, 50, 100 мкМ (содержание этанола не более 2.5% по объему),

раствор в буфере меченого анандамида, разбавленного "холодным" в соотношении 1 : 10 (конечная концентрация анандамида 2 мкМ). Образцы инкубировали при 37°C. Через 1, 5, 7.5, 10, 15 мин от начала реакции отбирали аликвоты и останавливали реакцию на льду добавлением смеси хлороформ-метанол, 3 : 1, и подкисляли 1 М лимонной кислотой (5 мкл/100 мкл реакционной смеси). Образец центрифугировали 5 мин при 2000 g. Из водно-метанольной фазы отбирали 100 мкл в сцинтилляционный флакон на счет. Для определения константы Михаэлиса и максимальной скорости гидролиза использовали линеаризацию Корниш-Боудена.

Влияние N-ациламино кислот на активность фосфолипазы D. Фосфолипазу D выделяли из чернышек капусты по методу [27]. Ферментативную активность определяли с помощью флуоресцентного субстрата – NBD-PC как описано [27]. К мицеллам, полученным из 0.2 мкмоль фосфолипидного субстрата и ациламино кислоты в ацетатном буфере (120 мМ ацетат натрия, pH 5.6), содержащем 0.1 мкмоль додецилсульфата натрия и 4% этанола, добавляли раствор 10 мкг фосфолипазы D и ацетат кальция до концентрации 40 мМ. Смесь инкубировали при 30°C в течение 15 мин, затем реакцию смесь экстрагировали смесью хлороформ-метанол, 2 : 1. Продукты реакции и исходный субстрат разделяли с помощью ТСХ на силикагеле в системе хлороформ-метанол-7 н. NH₄OH, 13 : 5 : 1. Количество продуктов реакции (NBD-фосфатидилэтанола и NBD-фосфатидной кислоты), а также исходного липида определяли по интенсивности флуоресценции при $\lambda_{\text{возб}}$ 534 нм ($\lambda_{\text{изб}}$ 464 нм).

Биосинтез арахидоноилтирозина. Гомогенаты тканей крысы готовили при температуре +4°C. Печень, спинной и головной мозг гомогенизировали в 10-кратном объеме PBS-буфера, содержащего 1 мМ EDTA, 100 мкМ AEBSF и 1 мМ бензамидин. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g, супернатант отделяли и в нем определяли концентрацию белка. Аликвоту супернатанта (200 или 1000 мкл) инкубировали с [³H₂]AA и Туг без добавления или в присутствии кофакторов тирозингидроксилазы (тетрагидробиоптерина) и дигидроптеридинредуктазы (NADPH) при температуре 37°C в течение 35 или 60 мин. Концентрация белка в пробах составляла 1 мг/мл. Арахидоновую кислоту вносили в виде раствора в этаноле в объеме 10 мкл. Реакцию останавливали добавлением трифторуксусной кислоты и экстрагировали смесью хлороформ-метанол (2 : 1). Экстракты упаривали и анализировали с помощью ТСХ (определяли радиоактивность в зонах, соответствующих стандартным соединениям) или ВЭЖХ с детектированием по радиоактивности. В контрольных образцах гомогенат инактивировали нагреванием в течение 10 мин при температуре 80–100°C.

Определение связывания и стабильности арахидоноилсемакса. Все операции выделения мембран проводили при температуре 4°C. Мозжечок взрослых крыс линии Вистар гомогенизировали в 10 объемах буфера А, содержащем 1 мМ бензамидин и 0.1 мМ PMSF. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 1000 g, осадок отбрасывали, а супернатант подвергали повторному центрифугированию при 40000 g в течение 30 мин. Плотный коричневый осадок на дне пробирки, обогащенный митохондриями, отбрасывали, а менее плотный светлый осадок мембран суспендировали в буфере А и дважды промывали этим же буфером, осажда мембраны центрифугированием, аналогичным предыдущему. По окончании промывок осадок суспендировали в 10 мМ Трис-НСl, pH 7.4, содержащем 0.22 М сахарозу.

К раствору [³H₂]AA-МЕНFPGP в буфере Б (конечный объем 200 мкл) прибавляли суспензию мембран (0.2 мг белка/мл) в буфере с добавлением 1 мМ бензамидина и 0.1 мМ PMSF. Инкубировали при 30°C 30 мин при перемешивании. По окончании инкубации пробы фильтровали через планшетные фильтры, предварительно вымоченные в буфере Б в течение 2 ч. Третье промывали буфером Б по 200 мкл. Планшет сушили на воздухе, фильтры отделяли и переносили в сцинтилляционные флаконы, содержащие 4 мл сцинтилляционной смеси. За неспецифическое связывание принимали количество метки, остающееся в мембранах в присутствии 0.1 мМ немеченого пептида.

Для определения стабильности арахидоноилсемакса 10 нмоль пептида инкубировали с мембранами, как описано выше, без добавления ингибиторов или в присутствии смеси бацитрацин-PMSF-пепстатин А (10, 100, 1 мкМ соответственно). Мембраны отделяли центрифугированием, супернатанты анализировали с помощью ВЭЖХ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа частично поддержана грантами РФФИ (№ 04-04-81028-Бел2004_a, 05-04-08132-офи_a и 05-04-48293-a), грантом Научные школы № НШ-2150.2003.4 под руководством акад. Н.Ф. Мясова и грантом БРФФИ № Б04Р-135.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kawazoe R., Okuyama H., Reichardt W., Sasaki S. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 5470–5475.
2. Lerouge P., Lebas M.H., Agapakis-Causse C., Prome J.C. // Chem. Phys. Lipids. 1988. V. 49. P. 161–166.
3. Kawai Y., Yano I., Kaneda K. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 171. P. 73–80.
4. Yagi H., Corzo G., Nakahara T. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1336. P. 28–32.
5. Pohnert G., Jung V., Haukiojo E., Lempta K., Boland W. // Tetrahedron. 1999. V. 55. P. 11275–11280.

6. Alborn H.T., Turlings T.C.J., Jones T.H., Stenhagen G., Loughrin J.H., Tumlinson J.H. // *Science*. 1997. V. 276. P. 945–949.
7. Huang S.M., Bisogno T., Petros T.J., Chang S.Y., Zavitianos P.A., Zipkin R.E., Sivakumar R., Coop A., Maeda D.Y., De Petrocellis L., Burstein S., Di Marzo V., Walker J.M. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 42639–42644.
8. Pertwee R.G. // *AAPS J.* 2005. V. 7. P. E652–E654.
9. Walker J.M., Krey J.F., Chu C.J., Huang S.M. // *Chem. Phys. Lipids*. 2002. V. 121. P. 159–172.
10. Burstein S.H., Huang S.M., Petros T.J., Rossetti R.G., Walker J.M., Zurier R.B. // *Biochem. Pharmacol.* 2002. V. 64. P. 1147–1150.
11. Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. // *Science*. 1992. V. 258. P. 1946–1949.
12. Cascio M.G., Minassi A., Ligresti A., Appendino G., Burstein S., Di Marzo V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 314. P. 192–196.
13. Prusakiewicz J.J., Kingsley P.J., Kozak K.R., Marnett L.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 296. P. 612–617.
14. Bradshaw H.B., Walker J.M. // *British J. Pharmacol.* 2005. V. 144. P. 459–465.
15. Giang D.K., Cravatt B.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 2238–2242.
16. Schmid H.H.O. // *Chem. Phys. Lipids*. 2000. V. 108. P. 71–87.
17. Austin-Brown S.L., Chapman K.D. // *Plant Physiology*. 2002. V. 129. P. 1892–1898.
18. Burstein S.H., Rossetti R.G., Yagen B., Zurier R.B. // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2000. V. 61. P. 29–41.
19. Stelt M., Di Marzo V. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 1827–1834.
20. Huang S.M., Bisogno T., Trevisani M., Al-Hayani A., De Petrocellis L., Fezza F., Tognetto M., Petros T.J., Krey J.F., Chu C.J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 8400–8405.
21. Jacobsson S.O.P., Wallin T., Fowler C.J. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001. V. 299. P. 951–959.
22. Bijlmakers M.-J., Marsh M. // *Trends Cell Bio.* 2003. V. 13. P. 32–41.
23. Долотов О.В., Золотарев Ю.А., Дрохова Е.М., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. // *Биоорган. химия*. 2004. Т. 30. С. 241–246.
24. Gupta C.M., Radhakrishnan R., Khorana H.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 7. P. 4315–4319.
25. Massi P., Vaccani A., Ceruti S., Colombon A., Abbraccio M., Parolaro D. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004. V. 308. P. 838–845.
26. Bezuglov V., Bobrov M., Gretskaya N., Gonchar A., Zinchenko G., Melck D., Bisogno T., Di Marzo V., Kuklev D., Rossi J.-C., Vidal J.-P., Durand T. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001. V. 11. P. 447–449.
27. Шнигир В.М., Кисель М.А. // *Прикл. биохим. и микробиол.* 2004. Т. 40. С. 270–275.

Arachidonoyl Amino Acids and Arachidonoyl Peptides: Synthesis and Properties

V. V. Bezuglov[#], N. M. Gretskaya^a, A. V. Blazhenova^a, E. L. Andrianova^a, M. G. Akimov^a, M. Yu. Bobrov^a, I. V. Nazimov^a, M. A. Kisel^b, O. L. Sharko^b, A. V. Novikov^c, N. V. Krasnov^c, V. P. Shevchenko^d, K. V. Shevchenko^d, T. V. V'yunova^d, and N. V. Myasoedov^d

[#]Fax: +7(495) 335-71-03; e-mail: wbez@oxylipin.ibch.ru

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^b Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Zhodinskaya 5/2, Minsk, 220141 Belarus

^c Institute of Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences, Rizhskii pr. 26, St. Petersburg, 198103 Russia

^d Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. akademika Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

N-Arachidonoyl (AA) derivatives of amino acids (glycine, phenylalanine, proline, valine, γ -amino butyric acid (GABA), dihydroxyphenylalanine, tyrosine, tryptophan, and alanine) and peptides (Semax, МЕНФРРРР, and РРР) were synthesized in order to study the biological properties of acylamino acids. The mass spectra of all the compounds at atmospheric pressure electrospray ionization display the most intense peaks of protonated molecular ions; the detection limits for these compounds are 10 fmol per sample. AA-Gly showed the highest inhibitory activity toward fatty acid amide hydrolase from rat brain (IC₅₀ 6.5 μ M) among all the acylamino acids studied. AA-Phe, AA-Tyr, and AA-GABA exhibited a weak but detectable inhibitory effect (IC₅₀ 55, 60, and 50 μ M, respectively). The acylated amino acids themselves, except for AA-Gly, were stable to the hydrolysis by this enzyme. All the arachidonoylamino acids inhibited cabbage phospholipase D to various degrees; AA-GABA and AA-Phe proved to be the most active (IC₅₀ 20 and 27 μ M, respectively). Attempts to detect the biosynthesis of AA-Tyr in homogenates of rat liver and nerve tissue showed no formation in vitro of either this acylamino acid or AA-dopamine and AA-Phe, the products of its metabolism. The highest contents of these metabolites were detected in liver homogenate and in the brain homogenate, respectively. Acylamino acids exert no cytotoxic effect toward the glioma C6 cells. It was shown that *N*-acylation of Semax with arachidonic acid results in enhancement of its hydrolytic stability and increases its affinity for the sites of specific binding in rat cerebellum membranes. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2006, vol. 32, no. 3; see also <http://www.maik.ru>

Key words: *N*-acylamino acids, *N*-acylpeptides, arachidonic acid, *N*-arachidonoyldopamine, electrospray mass spectrometry, fatty acid amide hydrolase, glioma C6, neurotoxicity, phospholipase D