



УДК 547.953'681.057 + 577.336

СИНТЕЗ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ПИРЕНМЕЧЕННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ

*Ахрем А. А., Романов С. Л., Скорнякова Т. Г.,
Кисель М. А., Киселев П. А.*

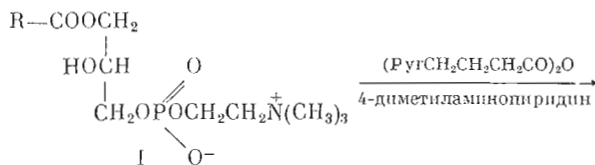
Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

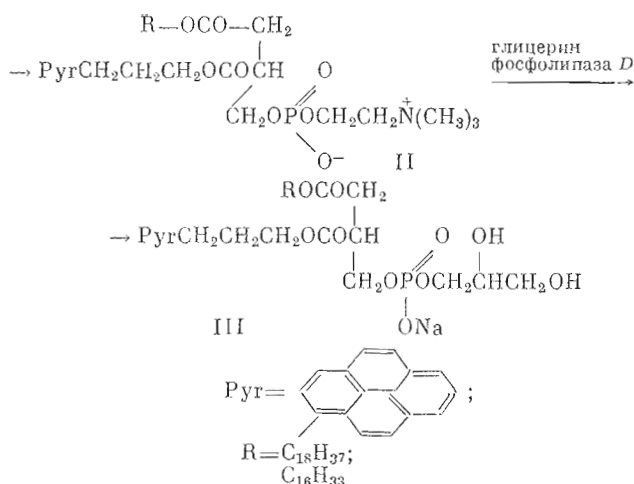
Синтезированы флуоресцентные липиды с укороченным расстоянием между флуорофором и полярной головкой: фосфатидилхолин и фосфатидилглицерин с остатком 4-(1-пиренил)масляной кислоты. Показана возможность использования аналогов фосфолипидов в качестве флуоресцентных зондов при исследовании липидных мембран.

Для детального изучения структурно-функциональных отношений в природных и искусственных липидных мембранах широкое применение находят флуоресцентные зонды. Однако введение в мембрану достаточно больших «чужеродных» молекул может приводить к изменению структуры бислоя. Устранение подобных нежелательных эффектов достигается путем синтеза флуоресцентных аналогов фосфолипидов [4—6]. Кроме того, фосфолипиды, несущие флуорофор в строго определенном положении в жирнокислотной цепи, позволяют получить информацию о поведении различных областей бислоя [7]. Наиболее часто для характеристики мембран используют такие параметры, как интенсивность и форма спектра, время жизни флуорофора в возбужденном состоянии, поляризация [8]. В последние годы получила развитие теория переноса энергии от донора к акцептору в приложении к биологическим мембранам, что еще более расширило возможности использования флуоресценции для биохимических исследований [9—11].

В настоящей работе описан синтез и флуоресцентные свойства двух фосфолипидов — фосфатидилхолина и фосфатидилглицерина, несущих остаток пиренмасляной кислоты (количество углеродных атомов соответствует природной жирной кислоте). Кроме того, приведены параметры, необходимые для характеристики безызлучательного переноса энергии в донорно-акцепторных парах, включающих эти фосфолипиды и гемовую группу LM₂-формы цитохрома Р-450. Выбор акцептора обусловлен важной ролью цитохрома Р-450 в детоксикации большого числа экзогенных химических соединений в клетках печени млекопитающих. А приближение флуорофорной группы к поверхности бислоя в молекуле донора может иметь принципиальное значение в плане эффективности переноса энергии, так как, по данным, основанным на анализе первичной структуры, гемовая группа LM₂-формы цитохрома Р-450 локализована в гидрофильном домене, находящемся вне бислоя [12, 13]. Вместе с тем пространственное разделение флуорофора и полярной группы синтезированных фосфолипидов, по-видимому, достаточно для того, чтобы не происходило заметных изменений свойств последней.

Пиренмеченные фосфолипиды синтезированы по следующей схеме:





В качестве исходного вещества использовали 1-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (I), полученный ферментативным гидролизом лецитина с помощью фосфолипазы A₂. Такой лизолецитин, согласно литературным данным [7], преимущественно содержит остатки стеариновой и пальмитиновой кислот. 1-Ацил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин ацилировали ангидридом пиренмасляной кислоты, используя в качестве катализатора 4-диметиламинопиридин по методу, предложенному в работе [14]. Выход после очистки препаративной тонкослойной хроматографией составил 60%. Продукт при проявлении хроматограммы дает положительную реакцию с реагентом на фосфолипиды и голубую флуоресценцию при освещении пластинки ультрафиолетовым светом. Хроматографическая подвижность полученного вещества совпадает с подвижностью яичного фосфатидилхолина в системе растворителей хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4. В спектре ¹H-ЯМР наблюдаются сигналы, характерные для протонов в структуре (II), а соотношение интегральных интенсивностей ароматических протонов, ядер атомов водорода, соседних с карбоксильной функцией метиленовых групп и жирнокислотной метильной группы, равное 9 : 4 : 3, указывает на эквивалентное содержание в молекуле алкильного и пиренпропильного радикалов. Анализ фосфолипида с помощью фосфолипазы A₂ показал, что образующееся при ферментативном гидролизе лизопроизводное не обладает флуоресцентными свойствами. Приведенные данные свидетельствуют о том, что в результате реакции ацилирования нами получен 1-ацил-2-[4-(1-пиренил)]бутироил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (II).

Превращение флуоресцентномеченного фосфатидилхолина в фосфатидилглицерин (III) осуществляли реакцией трансфосфатидилирования, катализируемой фосфолипазой D из белокочанной капусты [15]. Реакция трансфосфатидилирования глицерина может в качестве побочного продукта давать фосфатидную кислоту, степень образования которой зависит от концентрации акцептора, фермента и времени инкубации. В наших условиях (20% глицерина, 2 ч), согласно данным ТСХ, доля фосфатидной кислоты не превышала 10%. Чтобы получить фосфатидилглицерин в Na-форме, элюирование фосфолипида с силикагеля после препаративной хроматографии проводили в системе растворителей, содержащих Na₂-EDTA.

В хлороформе спектр флуоресценции пиренмеченного фосфатидилхолина содержит широкую неструктурированную полосу при 470 нм, которая относится к флуоресценции эксимеров пирена (рис. 1, 1, 2) [16]. В липосомах из яичного фосфатидилхолина при мольных соотношениях зонд — липид от 1/500 до 1/50 флуоресценция эксимеров не наблюдается, что может быть связано с увеличением вязкости исследованной системы в сравнении с раствором в хлороформе. Отметим, что спектры испускания пиренмеченного фосфатидилхолина и соответствующего фосфатидилглицерина практически не различаются (данные для фосфатидилглицерина не показаны).

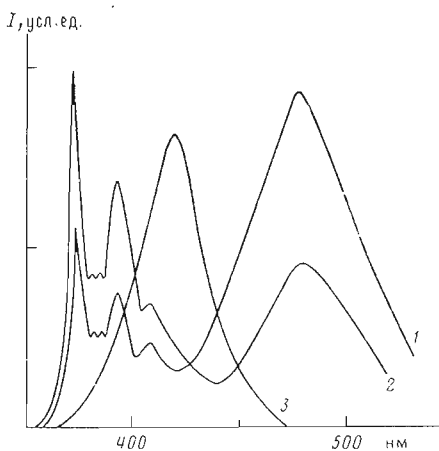


Рис. 1. Спектры флуоресценции пиренмеченого фосфатидилхолина в хлороформе (1, 2) и спектр поглощения цитохрома Р-450 (3). Концентрация пиренмеченого фосфатидилхолина $3 \cdot 10^{-5}$ М (1) и 10^{-6} М (2). Длина волны возбуждения для спектров 1 и 2 — 347 нм, ширина щели возбуждения — 2 нм

Параметрами, дающими информацию о взаимодействии флуорофора с его окружением, являются время жизни и кинетика затухания флуоресценции. На рис. 2 представлены кривые затухания флуоресценции фосфатидилхолинового зонда в хлороформе и липосомах из димиристоилфосфатидилхолина после импульсного возбуждения флуорофора. Анализ этих зависимостей показывает, что кинетическая кривая затухания флуоресценции аппроксимируется суммой двух экспоненциальных функций. Соответствующие значения времени жизни флуорофора и их относительный вклад в кинетику затухания флуоресценции приведены в таблице. В серии дальнейших экспериментов с липосомами и протеолипосомами, содержащими цитохром Р-450, время жизни рассчитывалось по фазово-модуляционной методике с использованием пакета прикладных программ для флуориметра SLM-2000 (США).

Включение в липосомы из яичного фосфатидилхолина цитохрома Р-450 в мольном соотношении $1/_{200}$ приводит к уменьшению времени жизни флуоресценции пиренмеченого фосфатидилхолина с 116 до 90 нс, что свидетельствует в пользу тушения флуоресценции зонда добавкой гемопротеида. Действительно, спектр испускания флуоресценции пиренмеченых липидов достаточно сильно перекрывается спектром поглощения цитохрома Р-450 в области полосы Соре (рис. 1). Это указывает на возможность переноса энергии возбуждения донора на гемовую группу цитохрома Р-450 [17]. Оценка радиуса переноса в паре пиренмеченый липид — гем цитохрома Р-450 проведена согласно следующей формуле [17]:

$$R_0 = 9,79 \cdot 10^3 (k^2 n^{-4} \gamma \varphi_0)^{1/6},$$

где n — показатель преломления среды между донором и акцептором; φ_0 — квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие акцептора; k^2 — дипольный ориентационный фактор; γ — интеграл перекрытия.

Спектральные параметры пиренмеченых фосфолипидов*

| Фосфолипид | Квантовый выход | Время жизни, нс | | Относительный вклад в кривую затухания компоненты с временем затухания τ_1 , % |
|--|-----------------|-----------------|-------------------|---|
| | | τ_1 | τ_2 | |
| PtdCho* в хлороформе | $0,70 \pm 0,05$ | $5,74 \pm 0,35$ | $17,86 \pm 0,20$ | 19,3 |
| PtdGro* в хлороформе | $0,72 \pm 0,02$ | $4,49 \pm 0,21$ | $16,88 \pm 0,025$ | 36,6 |
| PtdCho* в липосомах из димиристоилфосфатидилхолина | — | 41,7 | 120,0 | 21,0 |
| PtdGro* в липосомах из димиристоилфосфатидилхолина | — | 40,0 | 120,0 | — |

* PtdCho* и PtdGro* — пиренмеченые фосфатидилхолин и фосфатидилглицерин.

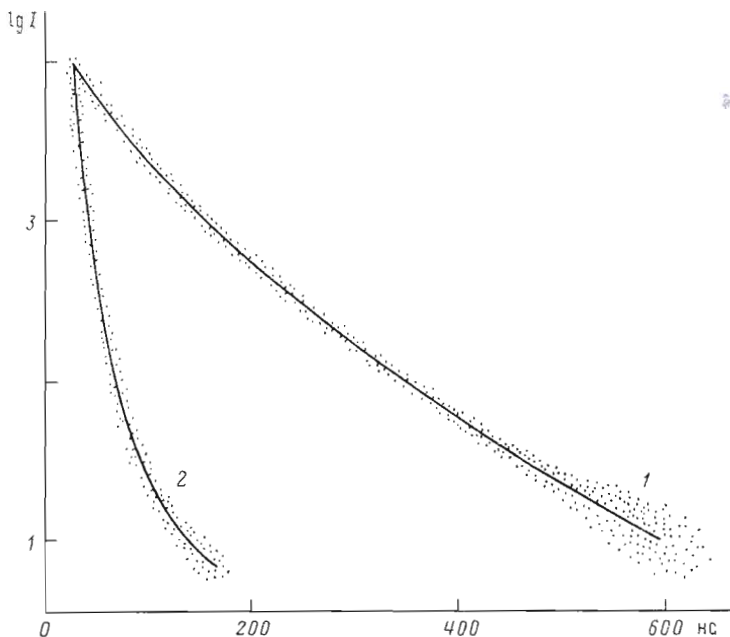


Рис. 2. Кинетика затухания флуоресценции пиренмеченого фосфатидилхолина в липосомах из димиристоилфосфатидилхолина, соотношение липид — зонд 100 : 1; 18° С (1) и в хлороформе (2)

В наших расчетах использовано значение $n = 1,4$ и $k^2 = 2/3$, что соответствует хаотичной ориентации донора и акцептора за счет вращательной диффузии. Значения квантового выхода флуоресценции для пиренмеченых фосфатидилхолина и фосфатидилглицерина определены экспериментально и приведены в таблице. Интеграл перекрытия (γ), отражающий степень спектрального перекрытия между испусканием донора и поглощением акцептора, рассчитан в соответствии с выражением [17]:

$$\gamma = \int_0^{\infty} F_0(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda,$$

где $F_0(\lambda)$ — нормированная интенсивность флуоресценции донора в отсутствие акцептора; $\varepsilon_a(\lambda)$ — молярный коэффициент поглощения акцептора при длине волны λ . В результате численного интегрирования по формуле Симпсона с шагом 1 нм вычислено значение $\gamma = 8,06 \cdot 10^{-14} \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^3$. С учетом вышесказанного для пары пиренмеченый фосфолипид — гем цитохрома P-450 получено значение R_0 , равное $45,8 \pm 2 \text{ нм}$. Эта величина сравнима с толщиной биологических мембран и размерами молекулы цитохрома P-450, радиус которой, по данным работы [18], составляет 22 Å. Кроме того, можно ожидать, что относительно неглубокое проникновение пиренового флуорофора в бислой будет способствовать эффективному переносу энергии с донора на гемовую группу цитохрома P-450, даже если последняя локализована в большом гидрофильном домене вне мембраны, что соответствует модели организации этого гемопротенда, предложенной авторами в работах [12, 13].

Таким образом, спектральные характеристики синтезированных пиренмеченых фосфолипидов показывают, что липиды данного типа в паре с цитохромом P-450 могут быть использованы в качестве донора энергии для исследования топологии мембран, содержащих этот цитохром.

Экспериментальная часть

В работе использованы лизофосфатидилхолин, полученный из яичного фосфатидилхолина по методу [15], коммерческие 1-пиренилмасляная кислота (Serva), дициклогексилкарбодимид и 4-диметиламинопиридин ((Fluka).

ПМР-спектры снимали на приборе Bruker WM-360 (ФРГ), спектры флуоресценции — на флуориметре Hitachi 640-60 (Япония).

Ангидрид 4-(1-пиренил)масляной кислоты. 500 мг кислоты (1,74 ммоль) растворяли в 6 мл хлороформа, перегнанного над пятиокисью фосфора, затем приливали раствор 179,2 мг (0,87 ммоль) дициклогексилкарбодиямида в 3 мл сухого хлороформа. Смесь выдерживали 2 сут при 20° С. Образовавшийся осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали. Полученный раствор ангидрида использовали для ацилирования без дальнейшей очистки.

Пиренмеченый фосфатидилхолин (I). К 200 мг (0,39 ммоль) яичного лизофосфатидилхолина, растворенного в 2 мл абс. хлороформа, добавляли полученный раствор ангидрида 4-(1-пиренил)масляной кислоты (484 мг, 0,87 ммоль) и 199 мг (0,87 ммоль) 4-диметиламинопипридина. Перемешивали на магнитной мешалке в течение 2 сут при 20° С в темноте. Ход реакции контролировали при помощи ТСХ. Реакционную смесь упаривали и разделяли с помощью препаративной ТСХ на пластинках Kieselgel 60, 20 × 20 см (Merck) в системе растворителей хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4. Флуоресцирующие при облучении УФ-светом полосы, соответствующие фосфатидилхолину, выскребали и экстрагировали смесью хлороформ — метанол — вода, 1 : 2 : 0,8. Центрифугировали, супернатант расслаивали, добавляя хлороформ. Хлороформный слой упаривали. Получили 180 мг пиренмеченого фосфатидилхолина (I). Выход 60%. ИК (ν , см⁻¹): 2930, 1730, 1465, 1240, 1090, 885. ¹H-ЯМР (δ , м. д.): 0,87 (т, 3H, CH₂CH₃), 1,13—1,21 (м, ~28H, CH₂), 2,10—2,18 (т перекр., 4H, CH₂COO), 2,44 (т, 2H, Pуг—CH₂), 3,1 (с, 9H, N⁺(CH₃)₃), 5,25 (м, 1H, СНО), 7,78—8,25 (м, 9H, пиренил).

Пиренмеченый фосфатидилглицерин (II). В круглодонную колбу поместили раствор 50 мг фосфатидилхолина (I) в хлороформе, упаривали досуха под вакуумом, затем добавляли 4,5 мл 0,1 М ацетатного буфера, содержащего 0,04 М CaCl₂, рН 5,6. Интенсивно встряхивали. К полученной дисперсной смеси добавляли 3 мл препарата фосфолипазы D [15], 1,5 г глицерина и 4 мл перегнанного диэтилового эфира. Перемешивали при 20° С в течение 2 ч. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 0,2 М Na₂-EDTA. Эфир удаляли упариванием. Трижды экстрагировали смесью хлороформа, метанола и 1,0 М водного раствора NaCl (10 : 5 : 3). Хлороформные вытяжки упарили. Выделяли полученный фосфатидилглицерин с помощью препаративной ТСХ, как описано для липида (I). Элюировали фосфатидилглицерин с силикагеля смесью хлороформ — метанол — 0,1 М Na₂-EDTA, 1 : 2 : 0,8. Получили 28 мг пиренмеченого фосфатидилглицерина.

LM₂-форму цитохрома P-450 выделяли из микросом печени кроликов, получавших фенобарбитал в течение 5 дней [19]. Очищенные препараты имели удельное содержание цитохрома P-450 17,5 нмоль/мг белка и характеризовались одной полосой при электрофорезе в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

Для получения липосом хлороформ из раствора липида упаривали на ротормном испарителе и остаток выдерживали под высоким вакуумом 2 ч. К полученной пленке фосфолипида добавляли 0,05 М фосфатный буфер (рН 7,6) и интенсивно встряхивали. Затем озвучивали на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Т в течение 3 мин.

Для получения протеолипосом холат-диализным способом была использована методика, подробно описанная в работе [20]. Белок в ультразвуковые липосомы встраивали в течение 1 сут при 20° С. Стехиометрию белок — липид в протеолипосомах контролировали с помощью ¹⁴C-меченого фосфолипида. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения 110 000 М⁻¹·см⁻¹ при 417 нм. Для определения концентрации флуоресцентномеченых фосфолипидов было использовано значение ϵ , равное 20 250 М⁻¹·см⁻¹ при 347 нм.

Встраивание цитохрома P-450 контролировали по профилям элюции на сефа-розе 4В.

Измерение кинетики затухания было выполнено на приборе PRA-600 (США). Измерение квантового выхода проведено по стандартной методике [21]. В качестве стандарта использован хиинивбисульфат (Serva). Расчет квантового выхода проводили по формуле согласно [21]:

$$\Phi_{PL} = \Phi_{QBS} \cdot \frac{\int F_{PL}(\lambda) d\lambda}{\int F_{QBS}(\lambda) d\lambda} \cdot \frac{A_{QBS}}{A_{PL}},$$

где Φ — квантовый выход; $F(\lambda)$ — интенсивность флуоресценции при длине волны λ ; A — оптическое поглощение; PL — флуоресцентномеченый фосфолипид; QBS — хиинивбисульфат. Квантовый выход QBS равен 0,7.

Измерение времени жизни методом фазовой модуляции проводили на флуориметре SLM-2000. Запись кинетики затухания флуоресценции и времени жизни выполнена при возбуждении на 347 нм, регистрация проводилась при 377 нм.

ЛИТЕРАТУРА

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., Бергельсон Л. Д. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1256—1262.

3. *Молотковский Ю. Г., Маневич Е. М., Бабак В. И., Бергельсон Л. Д.* // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. № 1. С. 33—42.
4. *Morgan C. G., Thomas E. W., Moras T. S., Yianni Y. R.* // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 692. № 2. P. 196—201.
5. *Somerharju P. J., Virtanen J. A., Eklund K. K., Vainio P., Kinnunen P. K.* // Biochemistry. 1985. V. 24. № 11. P. 2773—2781.
6. *Galla H. J., Hartmann W.* // Methods Enzymol. 1981. V. 72 (Lipids, Part D). P. 471—479.
7. *Ильбс А. Б., Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д.* // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 272—278.
8. *Dale R. E., Eisinger J.* // Biochemical fluorescence concepts/Eds Chen R. F., Edelhoch H. N. Y.: Marcel Dekker Inc., 1975. P. 115—284.
9. *Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. С. 320.
10. *Koppel D. E., Fleming P., Strittmatter P.* // Biochemistry. 1979. V. 18. № 24. P. 5458—5464.
11. *Wolberg P. K., Hudson B. S.* // Biophys J. 1979. V. 28. № 2. P. 197—210.
12. *Tarr G. E., Black S. D., Fujita V. S., Coon M. J.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 21. P. 6525—6556.
13. *Heinemann F. S., Ozols J.* // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 7. P. 4195—4201.
14. *Gupta C. M., Radhacrishnan R., Khorana H. G.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 10. P. 4315—4319.
15. *Бергельсон Л. Д.* Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981. С. 167—168, 117—118.
16. *Jones M. E., Lentz B. R.* // Biochemistry. 1986. V. 26. № 3. P. 567—574.
17. *Лакович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. С. 308—309.
18. *Wu En-Shinn, Yang C. S.* // Biochemistry. 1984. V. 23. № 1. P. 28—33.
19. *Haugen D. A., Coon M. J.* // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. № 24. P. 7929—7939.
20. *Bösterling B., Stier A., Hildebrandt A. G., Dawson J.-H., Trudell J. R.* // Mol. Pharmacol. 1979. V. 1. № 3. P. 332—340.
21. *Паркер С.* Фотолуминесценция растворов. М.: Мир, 1972. С. 127.

Поступила в редакцию
21.VIII.1987
После доработки
23.XI.1987

SYNTHESIS AND FLUORESCENT PROPERTIES OF PYRENE-LABELED PHOSPHOLIPIDS

AKHREM A. A., ROMANOV S. L., SKORNYAKOVA T. G.,
KISEL' M. A., KISELEV P. A.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the Byelorussian SSR, Minsk*

Fluorescent lipid analogues with a shortened spacer between the fluorophore and the polar head, phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol bearing a residue of 4-(1-pyrenyl)butyric acid, were synthesized and used as fluorescent probes for studying lipid membranes.