



УДК 547.953.2.057:577.352.2

**ФОТОРЕАКТИВНЫЕ ФОСФОЛИПИДЫ. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА
ФОСФАТИДИЛХОЛИНА И СФИНГОМИЕЛИНА, МЕЧЕННЫХ
2-ДИАЗОЦИКЛОПЕНТАДИЕНКАРБОНИЛЬНОЙ ГРУППОЙ***Карюхина М. О., Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

Описан синтез новых фотореактивных фосфолипидов — фосфатидилхолина и сфингомиелина — несущих остаток 12-(2-дiazоциклопентадиенкарбониламино)додекановой кислоты, имеющей также радиоактивную метку (^3H или ^{14}C). Показано, что при фотоллизе 2-дiazоциклопентадиенкарбонильная группа образует высокоактивный карбен, способный внедряться в неактивированную связь C—H.

Фотореактивные (фотоактивируемые, фотоаффинные) аналоги липидов — ценные инструменты в мембранологии, позволяющие получать важную информацию о липид-белковых и липид-липидных взаимодействиях (см. обзоры [1, 2]). В частности, меченые аналоги фосфатидилхолина и сфингомиелина [3, 4] недавно с успехом были применены для изучения доменной организации липидов и липид-белковых взаимодействий в мембране вируса гриппа [5] и липопротеинах низкой плотности крови человека [6].

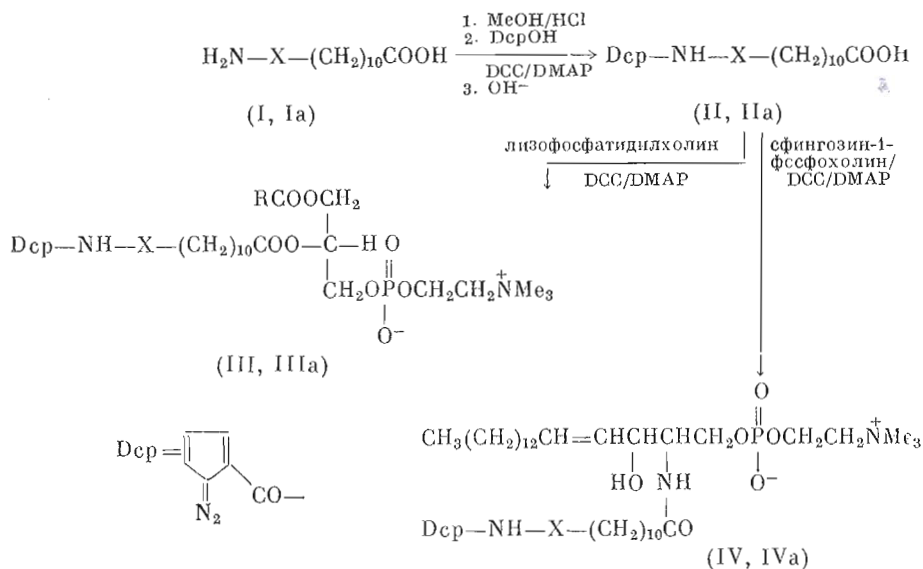
В качестве фотоактивируемых меток, образующих при освещении прочное соединение с высокой реакционной способностью — как правило, карбен или нитрен, — в литературе рекомендован ряд группировок, каждая из которых имеет свои достоинства и недостатки. Чаще других используют ароматические азиды и фенилдиазирины. Ароматические азиды относительно легко синтезировать, и они фотолизируются в довольно мягких условиях [1], однако генерируемые при этом нитрены имеют лишь невысокую реакционную способность [7]. Фенилдиазириновая группа образует при фотоллизе более реакционноспособные карбены, однако синтез соединений, меченных этой группировкой, труден [8].

Поэтому поиск новых фотореактивных группировок и синтез на их основе фотоактивируемых липидов является актуальной задачей мембранологии. В этой связи наше внимание привлекла 2-дiazоциклопентадиенкарбонильная (Dcp) группа. Исходное соединение для ее введения — 2-дiazоциклопентадиенкарбоновая кислота — описано довольно давно [9], однако до сих пор Dcp-группа лишь однажды применялась для создания фотореактивных зондов, причем нелипидной природы [10]. Эта фотореактивная метка, имея значительное поглощение в ближней УФ-области (λ_{max} 313 нм, ϵ 16 000), легко подвергается фотолизу в мягких условиях, образуя карбен, обладающий значительной активностью — он способен эффективно внедряться в простые C—H-связи [10]. Получение 2-дiazоциклопентадиенкарбоновой кислоты из циклопентадиена не представляет большой трудности [9].

Мы применили Dcp-группу для синтеза фотореактивных липидов по схеме, уже оправдавшей себя ранее при получении фосфолипидов, меченных 4-азидо-2-нитрофенильной (Nar) группой [3, 4] — путем присоединения метки к NH_2 -группе 12-амилододекановой кислоты (I); остаток образовавшейся меченой кислоты вводили в состав фосфолипидов (схемы 1, 2).

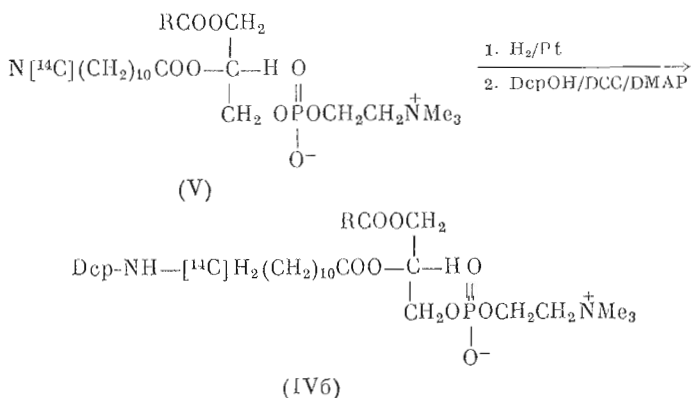
Сокращения: DCC — N,N'-дихлорогексилкарбодимид, Dcp — 2-дiazоциклопентадиенкарбонил, DMAP — 4-диметиламинопиридин; Nar — 4-азидо-2-нитрофенил, ФМК — фосфомолибденовая кислота.

Схема 1



R = C₁₅H₃₁/C₁₇H₃₅ ~ 5 : 2
 (I-IV) X = CH₂; (Ia-IVa) X = C [3H₂]

Схема 2



12-Аминододекановая кислота (I) была синтезирована из доступной 11-подундекановой кислоты конденсацией с KCN и последующим каталитическим гидрированием образовавшейся 11-циануудекановой кислоты [3]; при замене на последней стадии водорода на тритий образуется радиоактивно меченая кислота (Ia). Ацилирование кислот (I, Ia) 2-дiazоциклопентадиенкарбоновой кислотой приводило к фотореактивной кислоте (II) и ее тритиймеченому аналогу (IIa). Путем ацилирования 12-Dcp-аминододекановой кислотой лизофосфатидилхолина и сфингозин-1-фосфохолина были получены Dcp-меченые фосфатидилхолин (III) и сфингомиелин (IV) и их радиоактивные аналоги (IIIa, IVa) (схема 1).

При изучении топографии фосфолипидов в биологических мембранах нередко возникает необходимость введения в изучаемую мембрану сразу обоих фотореактивных фосфолипидов — фосфатидилхолина и сфингомиелина. В таких случаях зонды должны нести различные радиоактивные метки. В связи с этим нами был синтезирован также ¹⁴C-меченый Dcp-фосфатидилхолин (IVб). Исходным веществом для синтеза фосфолипида (IVб) послужил модифицированный фосфатидилхолин (V), несущий на конце *sn*-2-жирнокислотной цепи [¹⁴C] циангруппу. Он был получен ацилированием лизофосфатидилхолина [11-¹⁴C]циануудекановой кислотой [3]. Затем циангруппу каталитическим гидрированием превращали в группу [¹⁴C]H₂NH₂, которую ацилировали 2-дiazоциклопентадиенкарбо-

новой кислотой. Это приводило к Дср-[^{14}C] фосфатидилхолину (IVб) (схема 2). Преимущество такого пути синтеза Дср-фосфатидилхолина по сравнению с синтезом, приведенным на схеме 1, состоит в том, что неустойчивая Дср-группа вводится лишь на последней стадии. Однако этот путь не пригоден для получения Дср-сфингомиелина.

Структура фотореактивной кислоты (II) была подтверждена данными УФ-, ИК-, $^1\text{H-NMR}$ - и масс-спектров ее метилового эфира (МЭ-II); структуры фосфолипидов (III, IV) подтверждены данными УФ-спектроскопии и хроматографическим сравнением с соответствующими мечеными аналогами (см. «Экспериментальную часть»). Оба фотореактивных фосфолипида (III, IV) имеют вполне удовлетворительную устойчивость: их разбавленные (0,05–0,2%) растворы в инертных растворителях (толуол, хлороформ) в отсутствие кислорода воздуха сохраняются без заметных признаков разложения: при -10°C — не менее 2 мес, при -50 – -60°C — не менее года. Радиоактивные аналоги неизбежно подвергаются радиолизу, поэтому их необходимо хранить при возможно более низкой температуре в виде сильно разбавленных растворов (0,01–0,1 мг/мл) в толуоле в присутствии ионора (2,6-ди-*трет*-бутилкрезола, 0,1 мг/мл) в качестве ловушки радикалов; непосредственно перед применением ионол удаляют фильтрацией через микроколонку с окисью алюминия (фосфолипид смывают смесью хлороформ — метанол, 4:1).

Фотолиз метилового эфира Дср-кислоты (МЭ-II) в двух растворителях, циклогексане или изопропаноле, подтвердил, что полная конверсия Дср-группы происходит уже в довольно мягких условиях: по данным ИК-спектроскопии (исчезновение характерной полосы диазосоединения при 2090 см^{-1}), для исчерпывающего фотолиза требуется не более 5 мин УФ-облучения небольшой интенсивности с $\lambda > 300\text{ нм}$ (см. «Экспериментальную часть»). При фотолизе МЭ-II в циклогексане образуется индивидуальное вещество, масс-спектр которого (см. «Экспериментальную часть») говорит о том, что это продукт пришивки генерируемого группой карбена к молекуле циклогексана.

При фотолизе в изопропаноле кроме смолы образуется смесь низкомолекулярных продуктов, которая разрешается на три основных пика при ВЭЖХ на силикагеле. Масс-спектр этой смеси показал наличие пиков, соответствующих присоединению одной или двух молекул изопропанола к карбену (m/z 380 или 440 соответственно). По-видимому, вторая молекула изопропанола присоединяется гидроксигруппой к системе двойных связей циклопентадиенового кольца первичного продукта сшивки. Множественность же продуктов реакции, вероятно, объясняется наличием изомеров, так как карбен может впрямую ввязаться как в связь O—H, так и в связи C—H изопропильного остатка.

Мы проводили также фотолиз Дср-фосфатидилхолина (III) и синтезированного ранее [3] фосфатидилхолина с остатком 12-Nar-амиоундекановой кислоты в везикулах из димиристоилфосфатидилхолина, содержащих ^{14}C -меченый дипальмитоилфосфатидилхолин или [^{14}C] холестерин. Скапирование радиоактивности пластинки, на которой подвергались ТСХ продукты фотолиза, позволяет определить уровень сшивки фотореактивного зонда с радиоактивным субстратом, поскольку пик радиоактивности, имеющий меньшую хроматографическую подвижность, чем исходный субстрат, может быть только продуктом сшивки (контрольные опыты показали, что в отсутствие фотореактивных липидов оба радиоактивных субстрата в условиях фотолиза не образуют более полярных соединений). Для Дср-фосфатидилхолина (III) уровень сшивки с [^{14}C] холестерином оказался примерно в 2 раза выше, чем у Nar-фосфатидилхолина (0,37 и 0,20% от исходной радиоактивности). В случае [^{14}C] дипальмитоилфосфатидилхолина разница оказалась гораздо больше: уровень сшивки для Nar-фосфатидилхолина был около 0,1%, а для Дср-фосфатидилхолина — 1,5%.

Таким образом, опыты, проведенные в модельных системах, показывают, что Дср-группа при фотолизе генерирует карбен, отличающийся значительно большей по сравнению с ароматическими нитрепами актив-

ностью, в частности способный внедряться с заметным выходом в связи С—Н. Поэтому Дср-меченые фосфолипиды, очевидно, можно применять для изучения в мембранах не только липид-белковых, но и липид-липидных взаимодействий. Значительная реакционная способность генерированного Дср-группой карбена обеспечивает также малую избирательность при взаимодействии его с соседними молекулами, что повышает достоверность данных при анализе ближайших соседей липидных зондов.

Экспериментальная часть

ИК-спектры снимали на приборе Zeiss UR 11 (ГДР), масс-спектры — на спектрометре Varian MAT 445 (США), УФ-спектры — на спектрофотометре Beckman Acta MVI (Англия), спектр ПМР — на приборе Varian SC-300 (США) с рабочей частотой 300 МГц. ВЭЖХ проводили на приборе Altex 334 (США). Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике Mark II (Nuclear Clichago, США) со сцинтиллятором Unisolve 1 (Koch-Light, Англия). Для ТСХ применяли силифол UV 254 (Kavalier, СССР). Все значения R_f приведены для пластинок Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ). Для колоночной хроматографии применяли силикагель L 40/100 или L 5/40 мкм (Chemapol, СССР), отмытый от мешких фракций и активированный в течение 24 ч при 100°С.

В синтезе использовали N,N'-дидецилгексилкарбодимид (Serva, ФРГ), 4-диметиламинопиридин (Serva, ФРГ), применяли K[¹⁴C]N (45 Ки/моль) производства объединения «Изотопы».

Лизофосфатидилхолин из яичного фосфатидилхолина [11], сфингозин-1-фосфохолин из сфингомиелина бычьего мозга [12], 2-диазоциклопентадиенкарбоновую кислоту [9], 12-аминододекановую кислоту [3] и ее 12-³H-аналог (55 Ки/моль) [4] получали как описано ранее.

Все операции с веществами, содержащими Дср-группу, проводили при желтом свете. Растворы выпаривали в вакууме при температуре не выше 40°С.

12-(2-Диазоциклопентадиенкарбониламино)додекановая кислота (II). 12-Аминододекановую кислоту (50 мг) обрабатывали 5 мл 5% раствора сухого HCl в метаноле (36 ч при 20°С), смесь выпаривали и фильтровали через колонку с 2 г силикагеля в системе хлороформ — метанол — конц. NH₄OH, 90 : 9 : 1. Получали 43 мг маслообразного метилового эфира, индивидуального по данным ТСХ в системе хлороформ — метанол — конц. NH₄OH, 40 : 10 : 1 (обнаружение ФМК и шингидрином), который применяли без дальнейшей очистки.

К 25 мг метилового эфира 12-аминододекановой кислоты, 15 мг DMAP и 15 мг 2-диазоциклопентадиенкарбоновой кислоты в 2 мл сухого хлороформа добавляли в атмосфере сухого аргона 50 мкл 20% раствора DCC в CCl₄ и оставляли на ночь. На следующий день добавляли еще 2 раза по 50 мкл раствора DCC с интервалом 6 ч и через 12 ч фильтровали. Остаток из фильтрата хроматографировали на силикагеле в градиентной системе гексан — эфир до содержания эфира 25%, контролируя состав фракций ТСХ в системе гексан — эфир — CH₃COOH, 30 : 30 : 1. Получали хроматографически индивидуальный маслообразный метиловый эфир 12-Дср-аминододекановой кислоты, выход 60%. Найдено, %: С 66,0; Н 8,5; N 12,0. C₁₅H₂₅N₃O₃. Вычислено, %: С 65,7; Н 8,4; N 12,1. УФ (этанол), λ_{max}, нм (ε): 215 (12 400), 314 (15 950). ИК (в вазелиновом масле), ν, см⁻¹: 3250 (NH), 2090 (=N₂), 1740 (сл. эфир), 1610 (Амид I). ¹H-ЯМР (C²HCl₃), δ, м.д., сигналы алифатической цепи: 1,22 (шир. м, 14H, 4-Н — 10-Н), 1,54 (м, 4H, 3-Н и 11-Н), 2,24 (м, 2H, 2-Н), 3,61 (с, 3H, OCH₃), 5,67 (с, 1H, NH); сигналы циклопентадиенового кольца (слабо разрешенные квартеты; отнесение — по аналогии с [9]): 5,94 (1H, 4'-H), 6,30 (1H, 5'-H), 6,88 (1H, 3'-H). Масс-спектр, m/z: 347 (M⁺), 319 ([M-N₂]⁺), 288 ([M-N₂-OMe]⁺), 260 ([M-N₂-COOMe]⁺).

Полученный метиловый эфир растворяли в 10 мл изопропанола, добавляли 0,25 мл 5% KOH и выдерживали 1 сут при комнатной температуре. Затем смесь упаривали, остаток растворяли в 2 мл воды, подкисляли до pH 3 и экстрагировали хлороформом (2×5 мл). Экстракт промывали, высушивали Na₂SO₄ и упаривали. Продукты осмоления удаляли фильтрацией через колонку с 0,5 г силикагеля в системе гексан — эфир, 1 : 1. Элюат упаривали, остаток растворяли в 5 мл эфира и для полного удаления катионов промывали 2% H₂SO₄, затем водой, высушивали Na₂SO₄, упаривали и высушивали в вакууме (3 ч при 5–10 Па). Получали светло-желтое аморфное вещество (20 мг), R_f 0,4 в системе гексан — эфир — CH₃COOH, 30 : 30 : 10. УФ-спектр повторяет спектр метилового эфира. После метилирования диазометаном на холоду вещество образует метиловый эфир, хроматографически идентичный описанному выше.

12-(2-Диазоциклопентадиенкарбониламино)-[12-³H₂]додекановая кислота (IIa). Исходную [12-³H₂]додекановую кислоту (уд. акт. 55 Ки/моль) разбавляли немеченым аналогом. Из 12 мг разбавленной [12-³H₂]додекановой кислоты (Ia, уд. акт. 4 Ки/моль) по приведенной выше методике получили 6,5 мг ³H-кислоты (IIa) с уд. акт. 4 Ки/моль, хроматографически идентичный немеченому аналогу (II).

N-[12-(2-Диазоциклопентадиенкарбониламино)додеканол]сфингозин-1-фосфохолин (IV). К раствору 6 мг сфингозин-1-фосфохолина, 3 мг 12-(диазоциклопентадиенкарбониламино)додекановой кислоты и 2 мг DMAP в 0,3 мл смеси хлороформ — изо-

пропанол, 4 : 1, добавляли 5 мкл 20% раствора DCC в CCl_4 , перемешивали 3 ч, добавляли еще 10 мкл DCC и через 12 ч еще 10 мкл, оставляли на 1 сут. Затем смесь разбавляли 5 мл хлороформа, фильтровали, промывали 1 н. HCl ($2 \times 1,5$ мл), водой ($2 \times 1,5$ мл) и насыщенный раствором NaCl (1,5 мл), выпаривали. Остаток хроматографировали на колонке с 0,6 г силикагеля в градиентной системе хлороформ – метанол, 9 : 1 – 1 : 2; контроль – ТСХ в системе хлороформ – метанол – 7 н. NH_4OH , 65 : 35 : 8 (обнаружение ФМК и молибденовым синим [13]). Получали 2,1 мг (30%) сфингомиелина в виде светло-желтого аморфного вещества, имеющего одинаковую со сфингомиелином бычьего мозга хроматографическую подвижность в системах хлороформ – метанол – конц. NH_4OH – вода, 130 : 70 : 1 : 8; хлороформ – метанол – AsOH – вода, 50 : 25 : 8 : 4; хлороформ – метанол – вода, 65 : 25 : 4. УФ-спектр повторяет спектр кислоты (II).

N-[12-(2-диазоциклопентадиенкарбониламино)-[12- $^3\text{H}_2$]додеканоил] - сфингозин-1-фосфохолин (IVa) получен в соответствии с предыдущей методикой с применением меченой кислоты (IIa). Фосфолипид (IVa) имеет уд. акт. 4 Ки/ммоль и хроматографически идентичен немеченому веществу (IV).

1-Ацил-2-[12-(2-диазоциклопентадиенкарбониламино)додеканоил]-sn-глицеро-3-фосфохолин (III). Реакцию проводили в атмосфере сухого аргона при перемешивании. 9,0 мг лизофосфатидилхолина высушивали в вакууме над P_2O_5 и прибавляли к раствору 7,0 мг кислоты (II) и 2,6 мг DMAP в 0,5 мл сухого хлороформа, перемешивали 5 мин и добавляли 20 мкл 20% раствора DCC в CCl_4 . К реакционной смеси с интервалами по 10 ч добавляли еще 3 раза по 20 мкл раствора DCC, выдерживали 8 ч, обрабатывали, как это описано для сфингомиелина (IV), и хроматографировали на колонке с 1,2 г силикагеля, контролируя состав фракций ТСХ в системе хлороформ – метанол – вода, 65 : 25 : 4. Получали 2,8 мг (20%) фотореактивного фосфолипида (IIIa) в виде светло-желтого вещества, индивидуального по ТСХ и имеющего одинаковую с ичичным фосфатидилхолином хроматографическую подвижность в трех системах (см. синтез сфингомиелина (IV)). Вещество имеет одинаковый с метиловым эфиром кислоты (II) УФ-спектр.

1-Ацил-2-[12-(2-диазоциклопентадиенкарбониламино)-[12- $^3\text{H}_2$]додеканоил] - sn-глицеро-3-фосфохолин (IIIa) получен в соответствии с предыдущей методикой с применением меченой кислоты (IIa). Фосфолипид (IIIa) имеет уд. акт. 4 Ки/ммоль и хроматографически идентичен немеченому веществу (III).

1-Ацил-2-[12-(2-диазоциклопентадиенкарбониламино)-[12- ^{14}C]додеканоил]-sn-глицеро-3-фосфохолин (IVb). К раствору 3,5 мг 1-ацил-2-(12-амнио[12- ^{14}C]ундеканоил)-sn-глицеро-3-фосфохолина, полученного гидрированием фосфатидилхолина (V) [3], 1 мг 2-диазоциклопентадиенкарбоновой кислоты и 1 мг DMAP в 0,5 мл сухого хлороформа прибавляли 5 мкл 20% раствора DCC в CCl_4 и выдерживали 24 ч в атмосфере аргона при перемешивании. Далее реакционную смесь обрабатывали как описано выше для сфингомиелина (IV). Фосфатидилхолин (IVb) имеет уд. акт. 45 мКи/ммоль и хроматографически идентичен фосфолипиду (IV). Выход 29%.

Фотолиз в модельных системах. Все подвергаемые фотолизу растворы освобождали от кислорода барботированием аргона в течение 30 мин, фотолиз проводили светом ртутной лампы среднего давления ВИО-1 (максимум испускания 365 нм) мощностью 30 Вт на расстоянии 10 см в пробирке из пирекса (диаметр 10 мм, толщина стенок 2 мм, отсекается свет с $\lambda \leq 300$ нм) в токе аргона.

а. Метиловый эфир 12-(2-диазоциклопентадиенкарбониламино)додекановой кислоты (МЭ-II) в изопропанол. Подвергали фотолизу 0,01% раствор, отбирая пробы через 1, 2, 3, 5 и 20 мин. По данным ТСХ в системе бензол – этилацетат – этанол, 65 : 10 : 0,1 (обнаружение ФМК или на силуфол F_{254} , в УФ-свете – темные пятна; R_f исходного вещества 0,9; смесь продуктов фотолиза дает пять пятен с R_f 0,2–0,7, а также близкую к старту полосу, соответствующую смеси полимеров) и ИК-спектроскопии, через 5 мин облучения исходный эфир (МЭ-II) в растворе не обнаруживается. Продукты 5- и 20-минутного фотолиза (после фильтрации через силикагель в смеси бензол – этилацетат, 1 : 1, для удаления полимера) анализировали методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии (химическая ионизация NH_3). ВЭЖХ проводили на колонке ($4,6 \times 250$ мм) с силикагелем Zorbax Sil в системе гексан – изопропанол, 12 : 1 (1,2 мл/мин, детектирование по УФ-поглощению при 220 нм; для исходного эфира (МЭ-II) в этих условиях $k' = 1,1$). Хроматограмма продуктов 5-минутного фотолиза содержит еще три пика со значениями k' : 1,9; 2,9; 4,75, а хроматограмма продуктов 20-минутного облучения содержит один пик со значением $k' = 2,9$.

Масс-спектры продуктов фотолиза в обоих случаях были близкими и содержали два характеристических молекулярных иона со значениями m/z 380 и 440 в соотношении 1 : 4 (второй пик – максимальный), которые соответствуют присоединению одной или двух молекул изопропанола к карбену (соответственно $[\text{M} - \text{N}_2 + \text{C}_3\text{H}_7\text{OH} + \text{H}]^+$ и $[\text{M} - \text{N}_2 + (\text{C}_3\text{H}_7\text{OH})_2 + \text{H}]^+$, где M – молекула исходного эфира (МЭ-II)).

б. Эфир (МЭ-II) в циклогексане. После фотолиза 0,01% раствора в течение 5 мин полученная смесь, по данным ТСХ (условия см. в пункте «а»), содержит единственный продукт реакции с R_f 0,93, индивидуальный также по данным ВЭЖХ (система гексан – 3% изопропанол, остальные условия см. в пункте «а»), $k' = 2,0$ (у исходного МЭ-II $k' = 3,7$). Масс-спектр (хим. ионизация NH_3) этого соединения содержит пятнадцать пиков с m/z 403 ($[\text{M} - \text{N}_2 + \text{C}_6\text{H}_{12}]^+$), 372 ($[\text{M} - \text{N}_2 + \text{C}_6\text{H}_{12} - \text{OCH}_3 + \text{H}]^+$) и 343 ($[\text{M} - \text{N}_2 + \text{C}_6\text{H}_{12} - \text{COOCH}_3 + \text{H}]^+$), где M – молекула исходного эфира (МЭ-II).

в. Фотореактивные фосфолипиды в везикулах. Липидные везикулы (0,5 мг липидов/мл) готовили ультразвуковой обработкой [12] в 50 мМ К- Na -фосфатном буфере, содержащем 0,5 мМ EDTA, pH 7,4. Состав везикул: димиристоилфосфатидил-

холин — [4-¹⁴C]холестерин (50 мКи/ммоль; «Изотопы») — фотореактивный фосфолипид, 6 : 3 : 1 (А), или дмиристоилфосфатидилхолин — [N-¹⁴CH₃]дипальмитоилфосфатидилхолин (58 мКи/ммоль, Amersham) — холестерин — фотореактивный фосфолипид, 3 : 3 : 3 : 1 (Б). Фотореактивные липиды — Дср-фосфатидилхолин (П) или Нар-фосфатидилхолин [3]. 1-ацил-2-[12-(4-азидо-2-нитрофениламино)додеcanoил]-*n*-глицеро-3-фосфолин [3]. После фотолиза 0,2 мл суспензии везикул в течение 10 мин ее экстрагировали смесью хлороформ — метанол, 2 : 1 (2×0,5 мл), аликвоты экстракта разделяли ТСХ на готовых пластинках Kieselgel 60, 5×20 см (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — вода, 90 : 10 : 1, в случае везикул А или хлороформ — метанол — вода, 65 : 35 : 8, в случае везикул Б. Профиль радиоактивности измеряли на сканирующем деситометре Berthold LB 2832 (ФРГ); радиоактивность продукта сшивки фотореактивного фосфолипида с радиоактивным субстратом (в % от общей радиоактивности) получали, вычитая из радиоактивности зоны, расположенной ниже несшитого субстрата, радиоактивность такой же зоны, по в опыте без фотолиза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brunner J. // Trends in Biochem. Sci. 1981. V. 6. № 2. P. 44—46.
2. Middaugh C. R., Vanin E. F., Ji T. H. // Molec. Cell Biochem. 1983. V. 50. № 2. P. 115—141.
3. Водовозова Е. Л., Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 12. С. 1688—1694.
4. Водовозова Е. Л., Шевченко В. П., Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 12. С. 1698—1699.
5. Bukrinskaya A. G., Molotkovsky J. G., Vodovozova E. L., Manevich Y. M., Bergelson L. D. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 879. № 2. P. 285—292.
6. Мартынова М. А., Маневич Е. М., Водовозова Е. Л., Музя Г. И., Безуглов В. В., Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 5. С. 721—727.
7. Bayley H., Knowles J. R. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 12. P. 2414—2419.
8. Khorana H. G. // Bioorg. Chem. 1980. V. 9. № 3. P. 363—405.
9. Martin J. C., Bloch D. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1971. V. 93. № 2. P. 451—459.
10. Nielsen P. E., Hansen J. B., Thomsen T., Buchardt O. // Experientia. 1983. V. 39. № 10. P. 1063—1072.
11. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г., Баграков С. Г., Барсуков Л. И., Проказова Н. В. // Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981. С. 117—118.
12. Молотковский Ю. Г., Дмитриев П. И., Молотковская И. М., Бергельсон Л. Д., Маневич Е. М. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 4. С. 586—600.
13. Vaskovsky V. E., Kostetsky V. Y., Vasendin I. M. // J. Chromatogr. 1975. V. 114. № 1. P. 129—141.

Поступила в редакцию
15.III.1988

PHOTOREACTIVE PHOSPHOLIPIDS. SYNTHESIS AND PROPERTIES OF PHOSPHATIDYLCHOLINE AND SPHINGOMYELIN LABELED WITH 2-DIAZOCYCLOPENTADIENECARBONYL GROUP

KARYUKHINA M. O., MOLOTKOVSKY Ju. G., BERGELSON L. D.

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

Synthesis of photoactivatable phospholipids, a phosphatidylcholine and a sphingomyelin bearing residue of 12-(2-diazocyclopentadienecarbonylamino)dodecanoic acid, and also radioactive label (³H or ¹⁴C), is described. It is shown that photolysis of 2-diazocyclopentadienecarbonyl group leads to a highly reactive carbene capable of insertion into non-activated C—H bond.