



УДК 535.372+547.95.07+577.352.2

НОВЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ГАНГЛИОЗИДЫ — СИНТЕЗ
И СВОЙСТВАМихалев И. И., Тимофеева Н. Г., Кознев Л. С.,
Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Осуществлен синтез флуоресцентных ганглиозидов G_{M3} и G_{M1} , несущих остатки *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценонной и 9-(3-периленоил)нопановой кислот. Приведены флуоресцентные характеристики полученных ганглиозидных зондов в различных средах. Показано, что в модельных мембранах, находящихся в жидкокристаллическом состоянии, эти зонды ведут себя подобно природным ганглиозидам и могут быть применены в мембранных исследованиях.

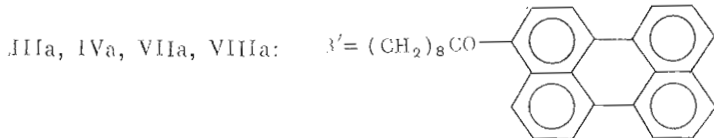
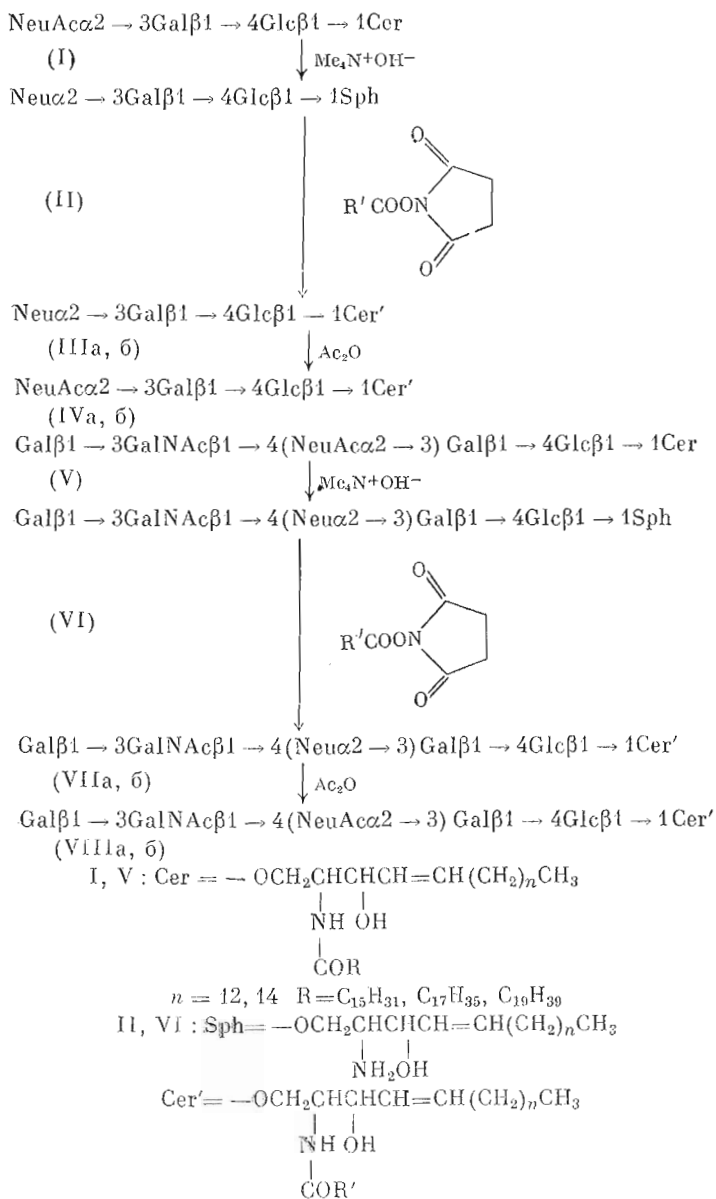
Хотя ганглиозиды являются минорными компонентами плазматических мембран, их роль в функционировании последних, по-видимому, весьма существенна (см. обзор [1]). В частности, ганглиозидам свойственны рецепторные функции: например, они могут служить рецепторами холерного токсина [2] и вируса гриппа [3, 4].

В настоящее время важнейшими инструментами при изучении поведения липидов в мембранах служат модифицированные липиды, содержащие репортерные (флуоресцентные, спиновые) или фотореактивные группы. В то время как флуоресцентные фосфолипидные зонды получают все более широкое применение в мембранных исследованиях, флуоресцентные ганглиозиды до сих пор использовались лишь эпизодически, что, очевидно, связано с трудностью их синтеза. Поскольку полный синтез меченых ганглиозидов нецелесообразен, предпочтительно использовать модифицирование природных ганглиозидов. Легче всего модифицировать ганглиозид путем введения метки по полярным группам олигосахаридного остатка. Примером может служить синтез флуоресцентного ганглиозида, полученного присоединением остатка красителя Люцифер желтый СН к сиалильной группировке ганглиозида G_{M1} [5]. Однако мечение ганглиозида по полярной головке неизбежно должно приводить к изменению его антигенных и рецепторных свойств. Поэтому для получения функционально полноценных ганглиозидных зондов необходимо вводить репортерную группу в неполярную часть молекулы ганглиозида, где метка мало влияет на его биологические свойства. Наиболее целесообразный путь такой модификации — замена жирной кислоты в молекуле природного ганглиозида на флуоресцентномеченую. Такая возможность появилась благодаря разработке методов удаления жирнокислотного остатка из церамидной части ганглиозидной молекулы щелочным гидролизом [6, 7]. При этом происходит также N-деацелирование сиалильного остатка, тогда как галактозаминильная N-ацетильная группа практически не затрагивается [6]. При обработке полученного таким образом дезацели-

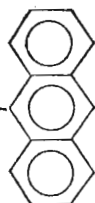
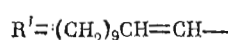
Сокращения: PG_{M3} , AG_{M3} и PG_{M1} , AG_{M1} — ганглиозиды G_{M3} и G_{M1} , несущие остатки 9-(3-периленоил)нопановой (P) и *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценонной кислот (A) (структуры — см. схему); BSM — сфингомиелин бычьего мозга; EPC — фосфатидилхолин яичного желтка; PSM — периленоилмеченый сфингомиелин; DCC — N,N'-дихлоргексилкарбодимид. Остальные сокращения приведены в соответствии с номенклатурой IUPAC — IUB.

рованного ганглиозида кислотой в присутствии карбодимида в контролируемых условиях ацилированию подвергается главным образом NH₂-группа сфингозинового основания; последующее N-ацелирование сиалильного остатка трудностей не представляет [7].

Развивая наши исследования по синтезу и применению липидспецифических флуоресцентных зондов — фосфолипидных [8] и гликолипидных [9], — мы предприняли синтез двух флуоресцентных ганглиозидов G_{M3} с остатками *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценовой (IVa, AG_{M3}) и 9-(3-периленоил)нонановой (IVб, PG_{M3}) кислот, а также двух ганглиозидов G_{M1} с остатками тех же кислот (VIIIa, AG_{M1}, и VIIIб, PG_{M1}, соответственно).



IIIб, IVб, VIIб, VIIIб:



Синтезы всех четырех ганглиозидных зондов были осуществлены по аналогичным схемам: природные ганглиозиды G_{M_3} (I) и G_{M_1} (V) подвергли гидролизу действием тетраметиламмонийгидроксида в водном бутаноле по методу [7]. Ход и состав продуктов реакции контролировали ВЭТСХ, соотнося результаты с данными работы [7], в которой ход гидролиза был подробно исследован и строение всех основных продуктов доказано. Соединения (II) и (VI), полученные соответственно из ганглиозидов G_{M_3} и G_{M_1} и содержащие дезацелированные сиалильный и церамидный остатки, были выделены колоночной хроматографией на силикагеле.

Ацилирование сфингозилгликозидов (II) и (VI) флуоресцентной кислотой представляет собой довольно сложную задачу, поскольку требуется свести к минимуму побочное ацилирование нейраминового остатка. После ряда экспериментов мы нашли, что оптимальные результаты дает ацилирование действием N-гидроксисукцинимидного эфира кислоты в двухфазной водно-эфирной системе. Главным продуктом реакции при этом является N-ацильное производное (IIIа, б, VIIа, б), подвижность которого при ВЭТСХ больше подвижности диаминопроизводного (II, VI), но меньше подвижности исходного ганглиозиды (I, V); вещество содержит аминогруппу (положительная реакция с нингидрином).

Ацелирование соединений (IIIа, б; VIIа, б) проводили действием уксусного ангидрида в водно-метанольной среде в присутствии $NaHCO_3$; такая методика позволяет избежать побочного O-ацелирования [10]. Выделенные хроматографически флуоресцентные ганглиозиды (IVа, б; VIIа, б) были однородными по данным ВЭТСХ, а по хроматографическому поведению не отличались от соответствующих природных ганглиозидов G_{M_3} (I) и G_{M_1} (V). При действии нейраминидазы из *Vibrio cholerae* [11] на антрил- и периленоилмеченый G_{M_3} (IVа, б), по данным ВЭТСХ, единственными флуоресцентными продуктами реакции являются соответствующие лактозилцерамиды, имеющие одинаковую хроматографическую подвижность с флуоресцентным лактозилцерамидом, полученным ранее химическим синтезом [9], и с лактозилцерамидом, полученным при действии нейраминидазы на природный G_{M_3} .

Сохранение природной конфигурации антрилвинилмеченого ганглиозиды G_{M_3} (IVа) было подтверждено также реакцией двойной иммунодиффузии с антисыворотками к природному ганглиозиду G_{M_3} печени человека по методу [12].

Спектры флуоресценции полученных антрил- и периленоилмеченых ганглиозидов в органических растворителях (рис. 1, 2, 3) подобны спектрам других антрилвиниловых [13] и периленоильных [14] зондов. Благодаря существенной растворимости ганглиозидов в воде оказалось возможным снять спектры флуоресценции водных растворов флуоресцентных ганглиозидов (рис. 1, 2 и 4). Из рисунка видно, что для AG_{M_3} переход от этанола к воде сопровождается падением интенсивности испускания, заметным сдвигом максимума в длинноволновую область (хотя положение максимума испускания антрилвиниловой группировки в целом ряде органических растворителей практически не зависит от их полярности [13]) и значительным уширением спектра; наряду с основным максимумом (440 нм) появляется и дополнительный при 484 нм. Вероятно, в воде ганглиозид находится в виде как отдельных молекул, так и олигомерных агрегатов, поэтому наблюдаемый спектр — результат наложения спектров мономера и возбужденного димера (эксимера) ($\lambda_{исп}$ 484 нм). По-видимому, квантовый выход испускания эксимера низок, поэтому наблюдать его флуоресценцию отдельно от флуоресценции мономера не удается. При

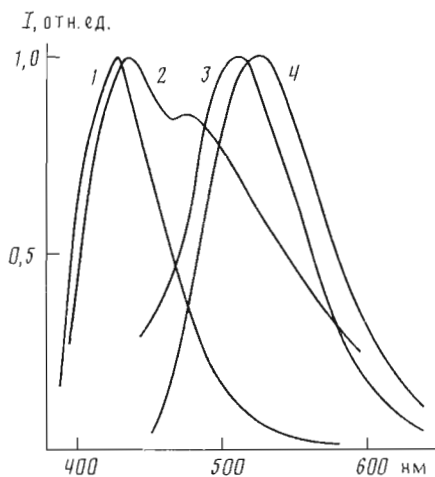


Рис. 1

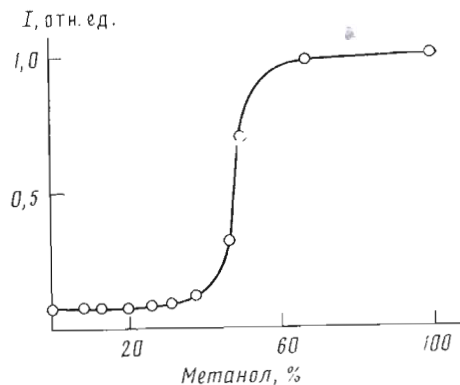


Рис. 2

Рис. 1. Нормализованные спектры испускания зонда AG_{M3} в этаноле (1) и воде (2) при $20^\circ C$ и зонда PG_{M3} в метаноле (3) и воде (4). Концентрация $3 \cdot 10^{-6} M$, соотношение интенсивностей в максимуме спектров 1 и 2 составляет 15 : 1, спектров 3 и 4 — 65 : 1. Спектры 3 и 4 не скорректированы. $\lambda_{возб}$ 370 нм для AG_{M3} и 450 нм для PG_{M3}

Рис. 2. Зависимость интенсивности испускания зонда AG_{M3} в смесях вода — метанол от состава среды. Концентрация зонда 15–5 мкг/мл, температура $20^\circ C$, $\lambda_{возб}$ 370 нм; испускание измеряли в максимуме (433–434 нм)

повышении же концентрации липида растет число крупных агрегатов, которые вообще не флуоресцируют из-за самотушения при миграции энергии возбуждения между значительным числом флуорофоров.

Подобные же изменения характера спектра испускания при переходе от этанола к воде в качестве растворителя наблюдали Де Бони и Токан для (2-антрил)-меченого фосфатидилхолина [15, 16]. Значительный сдвиг максимума (545–579 нм*) при переходе от этанола к воде претерпевает и спектр периленоильного ганглиозида PG_{M3} (рис. 1, 3 и 4). Квантовый выход периленоильного эксимера, видимо, весьма низок, о чем говорит резкое падение (в 65 раз) интенсивности спектра в воде по сравнению со спектром в этаноле (для антрилвинилового зонда — в 15 раз). То, что наблюдаемый эффект — следствие образования эксимеров и наложения их спектра на спектр мономерных молекул, а не результат уменьшения интенсивности спектра испускания мономера при увеличении полярности среды, подтверждают данные рис. 2: график зависимости интенсивности спектра испускания AG_{M3} в смесях метанол — вода имеет не плавный характер (чего следовало бы ожидать, если определяющим фактором является полярность среды), а изменяется скачком при соотношении метанол — вода 1 : 1. Видимо, в области этого соотношения компонентов среды происходит образование мицелл ганглиозида (при увеличении содержания воды) или их диссоциация (при увеличении содержания метанола).

Акуотти с соавт. [17] определили, что ганглиозид G_{M1} с остатком пиренилмеченой кислоты в воде находится преимущественно в мицеллярной форме (была изучена зависимость эксимеризации этого зонда от концентрации). Критическая концентрация мицеллообразования для этого ганглиозида составляет $5 \cdot 10^{-5} M$, что на 3–4 порядка превышает соответствующую величину для природного G_{M1} . Авторы нашли также, что пиренилмеченый G_{M1} в смесях с природным ганглиозидом не образует отдельной фазы, а распределяется равномерно [17], что вполне согласуется с нашими данными (см. ниже).

* Данные с корректировкой, на рис. 1 показаны некорректированные спектры.

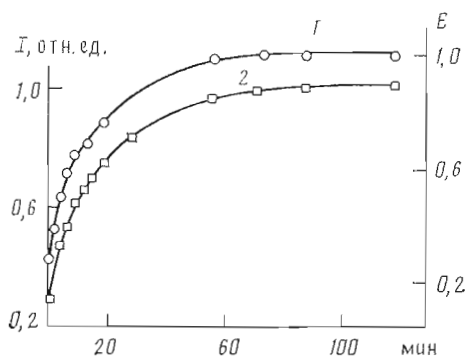


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика встраивания зонда AG_{M3} в озвученные везикулы из смеси ЕРС — BSM — холестерин (3:1:2), содержащих 5 мол. % ганглиозида G_{M3} и 0,2 мол. % периленоильного триглицерида. К 0,5 мл суспензии везикул (концентрация липида 0,5 мг/мл) добавляли 2,5 мкл 0,1% раствора AG_{M3} в диметилсульфоксиде. $\lambda_{возб}$ 370 нм, температура 30° С. 1 — интенсивность антрилвинилового флуоресценции при 435 нм, 2 — относительная интенсивность периленоильной флуоресценции при 500 нм: $E = (I - I_0)/I$ (I_0 — интенсивность испускания перед внесением в систему донора)

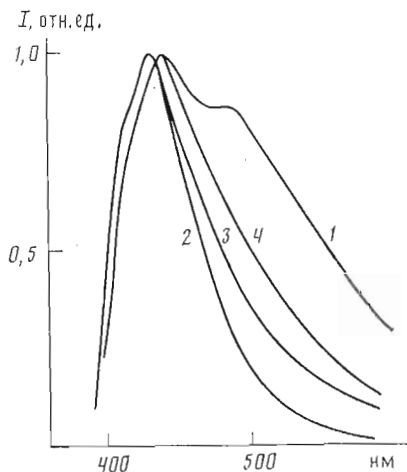


Рис. 4

Рис. 4. Нормированные спектры испускания озвученных водных дисперсий зонда AG_{M3} (1), его смеси с ЕРС (1:100) (2) и после добавления к ней 50-кратного избытка додецилсульфата натрия (2), а также смеси с ганглиозидом G_{M3} при соотношении 1:20 (3) и 1:1 (4)

Полученные нами ганглиозидные флуоресцентные зонды при добавлении их растворов в органическом растворителе (диметилсульфоксиде) к препарату липосом хорошо встраиваются в липосомальную мембрану. При этом положение максимумов флуоресценции (434–436 нм для антрилвинилмеченых ганглиозидов и 512–522 нм для периленоилмеченых) соответствует положению максимумов аналогичных меченых фосфолипидов [18, 19]. На рис. 3 показаны временная зависимость интенсивности флуоресценции зонда AG_{M3} , добавленного к липосомам (кривая 1), а также кинетика переноса энергии возбуждения с антривинилового флуорофора ганглиозидного зонда на флуорофор периленоильного триглицерида, содержащегося в липосомах (триглицерид не способен к миграции через водную фазу [20] (кривая 2)).

Регистрируемым параметром переноса энергии возбуждения служило относительное увеличение интенсивности флуоресценции акцептора. Обе кривые свидетельствуют о том, что процесс встраивания ганглиозидного зонда в липосомальную мембрану при 30° С выходит на стационарный уровень за 80–90 мин.

Весьма важно для применения липидного зонда, насколько он близок по физическим свойствам природному прототипу и не выделяется ли в отдельную фазу. Спектры испускания смесей антривинил- или периленоилмеченых ганглиозидов с соответствующими природными ганглиозидами показывают, что зонды не образуют отдельной фазы в сколько-нибудь заметной степени. Из рис. 4 видно, что при соотношении зонд — немеченый липид 1:20, когда эксимеризация зонда должна быть значительной (ср. [21]), спектр испускания AG_{M3} близок спектру его в фосфолипидных везикулах или в растворе детергента, где мономерное состояние зонда несомненно (спектры 3 и 2). Даже при соотношении зонд — липид 1:1 спектр испускания 4 гораздо ближе к спектру мономера 2, чем к спектру чистого зонда 1. Все это говорит о равномерном распределении зонда среди немеченого аналога.

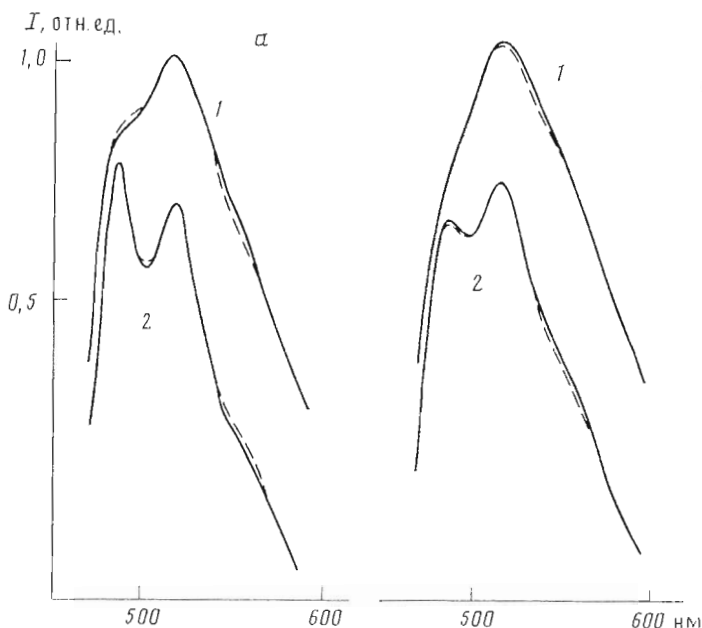


Рис. 5. Спектры испускания зондов PSM (сплошные линии) и PG_{M1} (пунктирные) при 11 (а) и 40° С (б) в озвученных везикулах из EPC (1) и из смеси EPC — BSM — холестерин (3 : 1 : 2), содержащих 5 мол.% ганглиозида G_{M1} (2). Концентрация липида 250, зондов 0,5 мкг/мл. $\lambda_{возб}$ 450 нм.

Поскольку ганглиозиды и сфингомиелин имеют сходную неполярную часть молекулы (церамидный остаток), мы провели сравнение спектров испускания периленоилмеченых ганглиозида PG_{M1} и сфингомиелина PSM после их включения в везикулы из яичного фосфатидилхолина (EPC) или из смеси EPC — BSM — холестерин с добавкой 5% ганглиозида G_{M1} при 11 и 40° С (рис. 5). Видно, что в этих условиях спектры зондов PSM и PG_{M1} практически совпадают. Аналогичное совпадение наблюдалось также между спектрами зондов PSM и PG_{M2} (данные не приведены).

Спектр испускания периленоильного флуорофора весьма чувствителен к полярности окружения, в частности к содержанию в бислое воды [19, 22]. На положение максимума испускания и форму спектра влияет также строение молекулы зонда. Например, фосфатидилхолин и сфингомиелин, несущие один и тот же остаток 9-(3-периленоил)нонановой кислоты, различаются, хотя и незначительно, по положению максимума испускания [22]. Совпадение спектров испускания ганглиозидного и сфингомиелинового зонда, снятых в гомогенной среде (везикулах из яичного фосфатидилхолина), показывает, что олигосахаридная цепь ганглиозида G_{M1} не вызывает заметного нарушения упаковки фосфолипидного бислоя. Совпадение спектров испускания обоих зондов как в гомогенном, так и в многокомпонентном бислое дает основание предположить (хотя и не может быть исчерпывающим доказательством), что в этих условиях оба зонда находятся в одинаковом окружении, т. е. распределены равномерно. Эти наши данные согласуются с результатами Массерини и Фрейре, которые с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии и флуоресцентных методов пришли к выводу, что гомогенный по керамидному составу ганглиозид G_{M1} в фосфатидилхолиновом бислое в отсутствие кальция распределен равномерно [23]; Акуоти и др. показали также, что иренилмеченый ганглиозид G_{M1} равномерно распределяется в везикулах из EPC [17]. С другой стороны, имеются данные, что ганглиозид G_{M1} при концентрациях 1—14 мол.% в липосомах из дипальмитоил- или димиристоил-фосфатидилхолина образует отдельные домены [24]. Не исключено, однако, что эти домены — артефакт, поскольку применявшийся метод (криофрактография) может воздействовать на состояние мембраны.

Вопрос о состоянии и поведении ганглиозидов в мембранах еще мало изучен; мы полагаем, что синтезированные нами флуоресцентные зонды помогут в исследованиях в этой области. Ранее было показано близкое подобие синтезированных нами флуоресцентных фосфолипидов их природным прототипам [8]; данные настоящей работы показывают, что флуоресцентные ганглиозиды AG_{M3} , PG_{M3} , AG_{M1} и PG_{M1} по своим свойствам также близки соответствующим природным ганглиозидам и, следовательно, могут быть применены в качестве эффективных инструментов изучения биологических мембран.

Экспериментальная часть

Температуры плавления (исправлены) определяли на столике Кофлера. Спектры флуоресценции (скорректированы) снимали на спектрофлуориметре Hitachi 650 (Япония), УФ-спектры — на спектрофотометре Specord UV VIS (Carl Zeiss, ГДР).

Все работы с флуоресцентными веществами проводили при рассеянном свете лампы накаливания. Использовали *N*-гидроксисукцинимид (Fluka, Швейцария), *N,N'*-дидиэтилкарбодимид (DCC) и тетраметиламмонийгидроксид (Serva, ФРГ), нейраминидазу из *Vibrio cholerae* (Koch-Light, Англия). *транс*-12-(9-Антрил)-11-додеценонная кислота [13], 9-(3-периленоил)нонановая кислота [14] были получены как описано ранее. Ганглиозид G_{M3} (I) получали из печени человека по методу [25], ганглиозид G_{M1} (V) — из мозга крупного рогатого скота по методу [26]. Сфинголипиды основания выделенных липидов G_{M3} и G_{M1} анализировали по методу [27]. В G_{M3} обнаружены основания* 18:1 (95), 18:0 (5), в G_{M1} — основания 18:1 (54), 18:0 (3,5), 20:1 (40), 20:0 (2,5).

Для колоночной хроматографии применяли силикагель 40/100 мкм (Сhemarol, ЧССР), силикагель 60H (Merck, ФРГ), отделенный от мелких фракций декантированием, окись алюминия II степени активности (Reanal, ВНР). Для ТСХ использовали силуфол UV₂₅₄ (ЧССР) и силуфол фирмы Merck (ФРГ).

Системы для проявления тонкослойных хроматограмм (объемные соотношения): 1) хлороформ — метанол — 2,5 н. водный аммиак, 60:40:9; 2) хлороформ — изопропанол, 10:1; 3) хлороформ — этилацетат, 10:1. Реагенты для обнаружения: А — фосфоромолибденовая кислота, универсальный реагент; Б — резорциновый реагент, для спалсодержащих гликолипидов; В — нингидрин, для свободных аминов; Г — УФ-облучение, для флуоресцентных соединений. Растворители очищали по обычным методикам. Выпаривание проводили под вакуумом при температуре не выше 40°С.

Нейраминозиллактозилсфингозин, $NeuAc2 \rightarrow 3Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\beta 1 \rightarrow 1'$ -сфингозин (II). Раствор 50 мг ганглиозида G_{M3} в 15 мл *n*-бутанола обрабатывали 1,5 мл 10 М водного тетраметиламмонийгидроксида (100°С, 13 ч), охлаждали, упаривали под вакуумом, растворяли в 5 мл воды и диализовали против 3 л воды в течение 2 сут при 4°С, меняя воду дважды в день. Содержимое диализного мешка упаривали и остаток хроматографировали на колонке (1×16 см) с 8 г силикагеля линейно-градиентной системой хлороформ — метанол — 2,5 н. водный аммиак, 65:25:4 — 60:40:9, контролируя состав фракций в системе 1 (обнаружители Б и В), $R_{G_{M3}} 0,43$. Выход 10%.

Деацелированный ганглиозид G_{M1} , $Gal\beta 1 \rightarrow 3GalNAc\beta 1 \rightarrow 4(NeuAc2 \rightarrow 3)Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\beta 1 \rightarrow 1'$ -сфингозин (VI) получали аналогично гликолипиду (II). Из 80 мг G_{M1} (V) получали 27,3 мг гликолипида (VI). $R_{G_{M1}} 0,19$.

N-Гидроксисукцинимидный эфир *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценонной кислоты получали по методу [28]. К раствору 100 мг *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценонной кислоты и 100 мг *N*-гидроксисукцинимид в 0,5 мл диоксана при 0°С и перемешивании по каплям добавляли 0,25 мл 20% раствора DCC в хлороформе, перемешивали 20 мин при 0°С и 1 ч при 20°С. Затем добавляли еще 0,1 мл раствора DCC и через 15 ч еще 0,1 мл того же раствора. Протекание реакции и последующее выделение контролировали ТСХ в системе 2 (реагенты А и Г). Через 1 ч реакционную смесь фильтровали через 15 г окиси алюминия (высота слоя 3 см) в системе хлороформ — изопропанол, 5:1, и хроматографировали на колонке (1,6×20 см) с 20 г силикагеля в системе хлороформ — этилацетат, 5:1. Получали 30 мг активированного эфира в виде желтого масла. Для *N*-гидроксисукцинимидного эфира *транс*-12-(9-антрил)-11-додеценонной кислоты в связи с его значительной нестойкостью удовлетворительного анализа получить не удалось.

N-Гидроксисукцинимидный эфир 9-(3-периленоил)нонановой кислоты получали по методу [28]. К раствору 25 мг 9-(3-периленоил)нонановой кислоты в 30 мл хлороформа добавляли раствор 160 мг *N*-гидроксисукцинимид в 1 мл диоксана, затем 0,1 мл 20% раствора DCC в хлороформе, через 0,5 ч добавляли еще 0,1 мл раствора DCC, выдерживали 2 ч при 40°С и оставляли на 18 ч при 20°С. Реакционную смесь упаривали и хроматографировали на колонке (1,8×28 см) с 40 г силикагеля в системе хлороформ — этилацетат, 50:1. Протекание реакции и качество разделения контролировали ТСХ в системе 3 (реагенты А и Г). Получали 33 мг индивидуального хроматографически активированного эфира в виде оранжевого порошка, после кристаллизации из эфира т. пл. 161–164°С. Найдено, %: С 76,3, Н 6,2, N 2,5. $C_{34}H_{31}O_5N$. Вычислено, %: С 76,5, Н 5,9, N 2,6.

* Для основания через двоеточие указано число С-атомов и двойных связей, в скобках — процентное содержание.

Антрилвинилмеченый ганглиозид G_{M3} , $NeuAc\alpha 2 \rightarrow 3Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\beta 1 \rightarrow 1'-\{N-[транс-12-(9-антрил)-11-додеценоил]\}$ сфингозин (IVa). К раствору 3 мг нейраминозиллактозилсфингозина (II) в 0,5 мл 0,5 М водного $NaHCO_3$ добавляли 0,5 мл эфира и затем N-гидроксисукцинимидного эфира транс-12-(9-антрил)-11-додеценовой кислоты (14 мг, в виде 0,5% раствора в эфире, порциями по 0,4 мл через каждые 40 мин). Реакцию проводили в плотно закрытой круглодонной колбе при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке в течение 6 ч при 50°С (постоянный уровень поддерживали периодическим добавлением эфира) и реакционную смесь оставляли на 18 ч при 20°С. Протекание реакции и последующее выделение контролировали ТСХ в системе 1 (реагенты Б и Г). Затем реакционную смесь упаривали, растворяли в 2 мл воды и диализовали 1 сут против 2 л воды при 4°С, 3 раза меняя воду. Хроматографией на колонке (0,7×25 см) с 2 г силикагеля в градиентной системе хлороформ – метанол – 2,5 н. водный аммиак, 65 : 25 : 1 – 60 : 35 : 8, выделяли 1,5 мг дезацетилантрилвинилмеченого ганглиозида G_{M3} (IIIa), $R_{G_{M3}}$ 0,63.

К раствору 1,5 мг гликолипида (IIIa) в 0,6 мл метанола добавляли 0,6 мл 4% водного $NaHCO_3$, охлаждали до 0°С, добавляли 15 мкл уксусного ангидрида тремя порциями по 5 мкл через каждые 15 мин. Протекание ацетилирования контролировали ТСХ в системе 1 (реагенты Б и Г). Реакционную смесь упаривали, растворяли в 1 мл воды и диализовали сутки против 2 л воды при 4°С, 3 раза меняя воду. Хроматографией на колонке (0,6×15 см) с 1 г силикагеля в градиентной системе хлороформ – метанол – 2,5 н. водный аммиак, 65 : 25 : 1 – 65 : 25 : 4, выделяли 400 мкг ганглиозида (IVa), хроматографическая подвижность которого одинакова с таковой ганглиозида G_{M3} (система 1).

Образец (5 мкг) антрилвинилмеченого ганглиозида G_{M3} (IVa) расщепляли нейраминидазой по методу [11], единственный флуоресцирующий продукт реакции имел одинаковую хроматографическую подвижность с природным лактозилцерамидом [29] и синтетическим антрилвинилмеченым лактозилцерамидом, $Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\beta 1 \rightarrow 1'-\{N-[транс-12-(9-антрил)-11-додеценоил]\}$ сфингозином [9] в системе 1 (реагент Г). УФ (в метаноле): λ_{max} , нм (ε): 257 (90 000), 350 (5200), 370 (9400), 388 (8700).

Периленоилмеченый ганглиозид G_{M3} , $NeuAc\alpha 2 \rightarrow 3Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\beta 1 \rightarrow 1'-\{N-[9-(3-периленоил)нонаноил]\}$ сфингозин (IVб). По методике, описанной выше для гликолипида (IVa), из 10 мг дезацелированного ганглиозида G_{M3} (II), растворенного в 3 мл 0,5 М водного $NaHCO_3$, с добавлением 3 мл эфира и 30 мг N-гидроксисукцинимидного эфира 9-(3-периленоил)нонаноной кислоты (1% раствор в бензоле, добавляли сначала 0,5 мл, затем по 0,2 мл через каждые 40 мин, при 55°С в течение 10 ч) получали 12 мг соединения (IIIб), имеющего одинаковую хроматографическую подвижность с гликолипидом (IIIa).

Гликолипид (IIIб) ацетилировали, как описано для ганглиозида (IVa), получали 9,5 мкг ганглиозида (IVб), хроматографические свойства которого аналогичны таковым исходного ганглиозида G_{M3} и антрилвинилмеченого ганглиозида G_{M3} (IVa). Периленоилмеченый ганглиозид G_{M3} аналогично природному расщепляется нейраминидазой [11], образует периленоилмеченый лактозилцерамид, сходный по хроматографической подвижности с природным лактозилцерамидом [29] и антрилвинилмеченым лактозилцерамидом [9]. УФ-спектр ганглиозида PG_{M3} аналогичен УФ-спектру ганглиозида PG_{M1} (VIIIб) (см. ниже).

Антрилвинилмеченый ганглиозид G_{M1} , $Gal\beta 1 \rightarrow 3GalNAc\beta 1 \rightarrow 4(NeuAc\alpha 2 \rightarrow 3)Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\beta 1 \rightarrow 1'-\{N-[транс-12-(9-антрил)-11-додеценоил]\}$ сфингозин (VIIIa) синтезировали аналогично гликолипиду (IVa). Из 20 мг гликолипида (VI) и 70 мг N-гидроксисукцинимидного эфира транс-12-(9-антрил)-11-додеценовой кислоты получали 6,65 мг дезацетилантрилвинилмеченого ганглиозида G_{M1} (VIIa), $R_{G_{M1}}$ 0,58, который затем переводили в антрилвинилмеченый ганглиозид G_{M1} (VIIIa) (выход 3,5 мг), идентичный по хроматографической подвижности в системе 1 ганглиозиду G_{M1} . УФ-спектр ганглиозида AG_{M1} аналогичен УФ-спектру ганглиозида AG_{M3} (IVa).

Периленоилмеченый ганглиозид G_{M1} , $Gal\beta 1 \rightarrow 3GalNAc\beta 1 \rightarrow 4(NeuAc\alpha 2 \rightarrow 3)Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\beta 1 \rightarrow 1'-\{N-[9-(3-периленоил)нонаноил]\}$ сфингозин (VIIIб). По методике, описанной выше для ганглиозида (IVб), из 6 мг дезацелированного ганглиозида G_{M1} (VI) и 20 мг N-гидроксисукцинимидного эфира 9-(3-периленоил)нонаноной кислоты получали 4,65 мг дезацетилпериленоилмеченого ганглиозида G_{M1} (VIIб), $R_{G_{M1}}$ 0,58, после ацетилирования которого выделяли 3,3 мг периленоилмеченого ганглиозида G_{M1} (VIIIб), одинакового по хроматографической подвижности с природным ганглиозидом G_{M1} . УФ (в метаноле), λ_{max} , нм (ε): 233 (3·10⁵), 257 (71 000), 447 (29 000).

ЛИТЕРАТУРА

1. Проказова Н. В. // Успехи биол. химии. 1982. Т. 23. № 1. С. 40–60.
2. Staerk J., Ronneberger H. J., Wiegandt H., Ziegler W. // Eur. J. Biochem. 1974. V. 48. № 1. P. 103–110.
3. Haywood A. M., Boyer B. P. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 646. № 1. P. 31–35.
4. Bergelson L. D., Bukrinskaya A. G., Prokazova N. V., Shaposhnikova G. I., Kocharov S. I., Shevchenko V. P., Kornilova G. V., Fomina-Ageeva E. V. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 128. № 2/3. P. 467–474.
5. Spiegel S. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 21. P. 5947–5952.
6. Neuenhofer S., Schwarzmann G., Egge H., Sandhoff K. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 2. P. 525–532.

7. *Sonnino S., Kirschner G., Ghidoni R., Acquotti D., Tettamanti G.* // *J. Lipid Res.* 1985. V. 26. № 2. P. 248–257.
8. *Bergelson L. D., Molotkovsky Jul. G., Manevich Y. M.* // *Chem. and Phys. Lipids.* 1985. V. 37. № 2. P. 165–195.
9. *Имбс А. Б., Мологковский Юл. Г., Бергельсон Л. Д.* // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 4. С. 527–532.
10. *Perkins H. R.* // *Biochem. J.* 1969. V. 111. № 2. P. 195.
11. *Balalubramanian A. S.* // *Indian J. Biochem.* 1971. V. 8. № 1. P. 77–81.
12. *Mikhailov A. T., Prokazova N. V., Zvezdina N. D., Kocharov S. L., Malchenko L. A., Vuznikov G. A., Bergelson L. D.* // *Differentiation.* 1981. V. 18. № 1. P. 43–50.
13. *Мологковский Юл. Г., Дмитриев П. И., Никулина Л. Ф., Бергельсон Л. Д.* // *Биоорган. химия.* 1979. Т. 5. № 4. С. 588–594.
14. *Мологковский Юл. Г., Бергельсон Л. Д.* // *Биоорган. химия.* 1982. Т. 8. № 9. С. 1256–1262.
15. *De Vony J., Tocanne J.-F.* // *Chem. and Phys. Lipids.* 1983. V. 32. № 2. P. 105–121.
16. *De Vony J., Tocanne J.-F.* // *Eur. J. Biochem.* 1984. V. 143. № 2. P. 379–386.
17. *Acquotti D., Sonnino S., Masserini M., Casella L., Fronza G., Tettamanti G.* // *Chem. and Phys. Lipids.* 1986. V. 40. № 1. P. 76–86.
18. *Мологковский Юл. Г., Дмитриев П. И., Мологковская И. М., Бергельсон Л. Д., Маневич Е. М.* // *Биоорган. химия.* 1981. Т. 7. № 4. С. 586–600.
19. *Molotkovsky Jul. G., Manevich Y. M., Babak V. I., Bergelson L. D.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 778. № 2. P. 281–288.
20. *Morgan C. C., Thomas E. W., Ylanni J. P.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1983. V. 728. № 2. P. 356–362.
21. *Galla H.-J., Hartmann W.* // *Chem. and Phys. Lipids.* 1980. V. 27. № 2. P. 199–219.
22. *Мологковский Юл. Г., Карюхина М. О., Бергельсон Л. Д.* // *Биол. мембраны.* 1987. Т. 4. № 4. С. 387–394.
23. *Masserini M., Freire E.* // *Biochemistry.* 1986. V. 25. № 5. P. 1043–1049.
24. *Mehlhorn J. E., Parraga G., Barber K. R., Grant C. W. M.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. V. 863. № 2. P. 139–155.
25. *Seyfried T. N., Ando S., Yu R. K.* // *J. Lipid Res.* 1978. V. 19. № 3. P. 538–543.
26. *Svennerholm L.* // *Methods in Carbohydrate Chem.* 1972. V. 6. № 2. P. 464–474.
27. *Vaver V. A., Ushakov A. N.* // *Methods of Biochemical Analysis.* V. 25/Ed. Glick D. N. Y.: Wiley, 1980. P. 327–406.
28. *Galardy R. E., Lyman C. C., J'Amieson J. D., Morton P. K.* // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. № 11. P. 3510–3518.
29. *Yamada K., Sasaki T.* // *J. Biochem.* 1982. V. 92. № 2. P. 457–464.

Поступила в редакцию
15.III.1988

NEW FLUORESCENT GANGLIOSIDES: SYNTHESIS AND PROPERTIES

MIKHALYOV I. I., TIMOFEEVA N. G., KOGTEV L. S., MOLOTKOVSKY Jul. G.,
BERGELSON L. D.

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

Fluorescently labeled gangliosides G_{M3} and G_{M1} acylated with 12-(9-anthryl)-11-*trans*-dodecenoic or 9-(3-perylenoyl)nonanoic acid are synthesized and their fluorescent characteristics in different media presented. In model liquid-crystalline membranes the probes proved to behave similarly to their natural prototypes and can, therefore, be used as tools in membrane studies.