БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 1996, том 22, № 4, с. 303–306

УДК 547.953:542.95

МЯГКОЕ НЕФЕРМЕНТАТИВНОЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ФОСФОДИЭФИРНОЙ СВЯЗИ В ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛАМИНАХ

© 1996 г. А. В. Жуков[#], Э. И. Кузнецова, А. Г. Верещагин

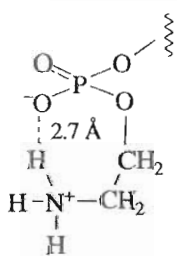
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, Ботаническая, 35

Поступила в редакцию 15.06.95 г. После доработки 21.11.95 г.

Ацетилирование фосфатидилэтаноламина вызывает изменение конформации его полярной головки; вследствие этого P–O–C-связь в N-ацетилфосфатидилэтаноламине может быть гидролизована (с образованием ацетамида этаноламина) в более мягких условиях, чем в исходном фосфатидилэтаноламине.

Ключевые слова: фосфолипиды, гидролиз, полярная головная группа.

Результаты нашей предыдущей работы [1], а также литературные данные [2–5] свидетельствуют о том, что неферментативное расщепление связи P–O–C между остатками ортофосфорной кислоты и этаноламина в молекуле *sn*-3-фосфатидилэтаноламина требует применения весьма жестких условий, вызывающих дальнейшее интенсивное разрушение продуктов реакции. По-видимому, высокая устойчивость этой связи обусловлена тем, что фосфоэтаноламмониевая полярная головная группа PE представляет собой прочную семичленную кольцевую структуру [6–10] с нейтральным или слабоотрицательным зарядом при pH 4–8 [10–12].



Образование кольцевой ПГГ вызвано внутримолекулярным электростатическим притяжением противоположно заряженных групп, а также присутствием водородной связи [6, 7, 10, 13].

Существование прочной внутримолекулярной водородной связи между группами NH_3^+ и PO_2^- было доказано ранее с помощью ЯМР-спектроскопии [8, 13, 14]. Благодаря внутримолекулярному взаимодействию в кольцевой ПГГ ее атом азота располагается на близком расстоянии (2.7 Å) от кислородных атомов фосфата [10], а из-за отсутствия в этой группе PE свободных доноров/акцепторов водородных связей она очень слабо гидратирована [15–17]. Можно считать, что последнее обстоятельство затрудняет сольволиз P–O–C-связи в PE и в продукте его дезацилирования.

Задача настоящей работы состояла в нахождении способа гидролиза этой связи в мягких условиях. Чтобы устранить внутримолекулярное взаимодействие в PE, мы перевели его в N-ацетильное производное (PENAc), которое имеет практически нейтральную NH-группу и несет отрицательный заряд, локализованный в ПГГ [15, 17]. Способность ПГГ к гидратации как по остатку фосфата, так и вблизи группы NH при этом резко усиливается [15], что должно привести к значительному снижению устойчивости P–O–C-связи к гидролизу.

N-Ацетилирование PE мы проводили в мягких условиях – действием 10% раствора Ac_2O в метаноле при комнатной температуре; эту методику предложили Гейвер и Свили [18] для избирательного N-ацетилирования сфингозиновых оснований (таблица, опыт 1). PE при этом исчезает, и появляется новое вещество с относительной ТСХ-подвижностью R_{PE} = 1.86 (см. "Экспериментальную часть"); далее это вещество было идентифицировано как PENAc.

Сокращения: ВРФ – водорастворимая фракция продуктов дез-О-ацилирования N-ацетилированных фосфолипидов; ПГГ – полярная головная группа фосфолипидов; EtnNAcOAc – N,O-диацетил-Etn; DNP – 2,4-динитрофенол; Etn – этаноламин; EtnNAc – N-ацетил-Etn; PMA – фосфорномолибденовая кислота; PE – *sn*-3-фосфатидилэтаноламин; PENAc – N-ацетил-PE; R_{DNP} и R_{PE} – подвижность при ТСХ относительно DNP и PE; $V_R^{отн}$ – относительный удерживаемый объем при ГЖХ.

[#] Автор для переписки.

Реакции фосфолипидов и их азотистых оснований[1]*

Параметры реакции	Номер опыта					
	1	2	3	4		5
Субстрат реакции	PE	PENAc	ВРФ	Etn		EtnNAc
Реагент, реакция среды	Ac_2O[2]*	MeOH, MeONa[3]*	Слабо-кислая[4]*	Ac_2O[2]*		MeOH, кислая[5]*
Температура (°C) и длительность реакции (ч)	20; 16.0	56; 1.5	100; 1.5	20; 16.0		56; 1.0
Главный продукт реакции	PENAc	ВРФ	EtnNAc	EtnNAc	EtnNAcOAc	Etn
Подвижность продукта при ТСХ (R_{DNP})	1.86[6]*	н. о.[7]*	6[8]*	6.00[8]*	11[8]*	0.33[9]*
То же при ГЖХ ($V_R^{отн}$)	н. о.	н. о.	1.32[10]*	1.31[10]*	2.31[10]*	0.44[11]*
Цветная реакция продукта с нингидрином	–	»	–	–	–	+
То же с реактивом Васьковского [19]	+	»	–	–	–	–
Асимметричность ГЖХ-пика продукта	–	–	1.07	1.07	–	–
Предел детектирования продукта с пламенно-ионизационным детектором, мкг	–	–	0.03	0.03	–	0.50

[1]* Продукты реакций в опытах 1 и 3–5 давали также положительную цветную реакцию с PMA.
[2]* 10% раствор в MeOH.
[3]* 1.2% раствор MeONa в MeOH.
[4]* 0.2 мМ HCl, pH 4.
[5]* 4.6% раствор HCl в MeOH.
[6]* R_{PE}, в системе $CHCl_3$–MeOH – 13 н. NH_4OH (32 : 10 : 1).
[7]* Не определяли.
[8]* В системе $CHCl_3$–MeOH (3 : 1).
[9]* В системе $CHCl_3$–MeOH – 13 н. NH_4OH (21 : 26 : 10).
[10]* Относительно метилсалицилата.
[11]* Относительно 1-октанола [1].

Гидролиз P–O–C-связи в PENAc, как и в исходном PE [1], проводили в гомогенной водной среде, и потому субстратом этой реакции служила водорастворимая фракция (ВРФ) продуктов дез-O-ацилирования N-ацетилированных фосфолипидов (таблица, опыт 2). При подборе катализатора гидролиза ВРФ мы исходили из того, что поведение фосфатной группы PENAc с двумя нейтральными заместителями алифатической природы должно быть аналогично поведению диалкилфосфатов. Однако детальных исследований, посвященных гидролизу соединений этого класса, мы не обнаружили. В то же время имеется ряд соответствующих работ в отношении моноалкил- и моноарилфосфатов [12, 20–23]. Было показано, что скорость их гидролиза определяется главным образом числом отрицательных зарядов на фосфатной группе. Эта скорость достигает максимума для моноионной формы фосфомоноэфиров, $ROP(O)(O^-)OH$, которая образуется при повышении pH реакционной среды с <1 до 4–5 [12, 20].

В настоящей работе обработка ВРФ 0.2 мМ HCl (pH 4) привела к образованию с удовлетворительным выходом вещества с R_{DNP} = 6 при ТСХ (см. "Экспериментальную часть"). Это вещество по всем хроматографическим (таблица, опыт 3) и масс-спектрометрическим показателям [24] не отличалось от полученного нами стандарта EtnNAc (таблица, опыт 4). Таким образом, вещество с R_{PE} = 1.86 – это PENAc. Также ясно, что разбавленная HCl с pH 4 способна катализировать гидролиз как фосфомоно-, так и фосфодиэфиров; разрыва амидной связи в PENAc при этом не отмечается.

В наших предварительных опытах (данные не приводятся) мы пытались достичь расщепления P–O–C-связи в PENAc в щелочной или сильнокислой (pH < 1) средах, однако образования EtnNAc при этом не происходило. Фосфомоноэфиры в таких условиях также не гидролизуются, поскольку подход диполя H_2O к атому фосфора дианионной (при pH ≥ 8.5) и неионной (при pH ≤ 1) форм фосфатной группы невозможен или сильно затруднен [20, 21, 23].

Поскольку раствор HCl в метаноле наряду с метанолизом сложных эфиров жирных кислот вызывает также расщепление связи CO–NH (таблица, опыт 5), для избирательного дез-O-ацилирования PENAc мы использовали метанольный раствор MeONa (опыт 2). Оба эти раствора неактивны к P–O–C-связи, а что касается гидролизующих ее водных растворов, то раствор NaOH (0.37 н. [1]) расщепляет эту связь (в весьма жестких условиях) в PE (но не в PENAc), а 0.2 мМ HCl, pH 4 (опыт 3), – в PENAc (но не в PE).

Мы полагаем, что предложенный нами метод дает возможность получать этаноламин из PE в

биохимических исследованиях без разрушения, с количественным выходом, а также осуществлять мягкий неферментативный гидролиз P–O–C- и амидных связей в других N-производных PE, в частности в природных N-ацил-PE, что важно для получения достоверных данных о составе высших жирных кислот их N-ацильных групп [15, 25]. Кроме того, этот метод может найти применение для расщепления ПГГ других аминофосфолипидов и гидролиза остатков фосфоэтаноламина, содержащихся в ряде природных липидов и липополисахаридов [26, 27]. Наконец, обнаружение того факта, что введение ацильного заместителя в аминогруппу PE оказывает сильное влияние на характер гидролиза P–O–C-связи PE, отделенной от этой NH_2-группы двумя метиленовыми группами, может иметь значение для дальнейших исследований по химии и биохимии других, в том числе и нелипидных, органических соединений фосфора. Преимущества неферментативного разрыва P–O–C-связи PE по сравнению с ее гидролизом, катализируемым фосфолипазой D, обсуждались нами ранее [1].

В продуктах реакции ацетилирования этаноламина наряду с EtnNAc было обнаружено в значительном количестве вещество с $R_{DNP} = 11$ (таблица, опыт 4). Далее мы идентифицировали его как N,O-диацетилэтаноламин (EtnNAcOAc) по данным масс-спектрометрии, *m/z*: 145 (M^+), 102 ($M^+ - COCH_3$), 85 ($M^+ - CH_3COOH$), 73 ($M^+ - CH_2NHCOCH_3$), 72 ($M^+ - CH_3COOCH_2$). Образование EtnNAcOAc при ацетилировании этаноламина противоречит утверждению Гейвера и Свили [18] о том, что при выполнении этой реакции в метанольном растворе она селективна к аминогруппе. Таким образом, при ацетилировании смесей липидов в этих условиях (таблица, опыт 1) возможность замещения их OH-групп следует учитывать.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Раствор MeONa (50 мг Na/10 мл метанола) и 0.2 мМ HCl, pH 4, получали непосредственно перед употреблением. Водный 13 н. раствор NH_4OH (ос. ч.), гелий (техн.), хлористый ацетил (х. ч.), нингидрин (Chemapol, Чехия), уксусный ангидрид (х. ч.) и метанол (ос. ч.), а также Хромосорб W-AW и неполярную стационарную фазу для ГЖХ (поликсилоксан OV-17, Serva, ФРГ) использовали без дополнительной очистки. Остальные реактивы не отличались от применявшихся ранее [1].

N-Ацетилирование фосфатидилэтаноламина и сольволиз полученного продукта ацетилирования (таблица). Фосфолипиды семян сои (100 мг), не содержавшие свободного этаноламина [1], выдерживали с 0.5 мл уксусного ангидрида в 4 мл метанола (опыт 1). Часть реакционной смеси (1/100) разделяли с помощью ТСХ (см. ниже). Остальную часть продуктов реакции подвергали дез-О-ацилированию с 2 мл метанольного раствора MeONa (опыт 2), образовавшиеся эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном, а водную фракцию выпаривали. Сухой остаток гидролизовали с 3 мл 0.2 мМ HCl, pH 4 (опыт 3), половину объема воды отгоняли в виде ее азеотропной смеси с *н*-пропанолом [1] и продукты гидролиза ВРФ экстрагировали хлороформом (5 × 3 мл). Содержавшееся в экстракте вещество с $R_{DNP} = 6$ (предположительно EtnNAc) выделяли препаративной ТСХ (см. ниже) с выходом 2 мг (60%).

Для регенерации этаноламина из этого вещества 1 мг последнего, 3 мл безводного метанола и 0.1 мл хлористого ацетила кипятили 1 ч (таблица, опыт 5); сухой остаток метанолизата экстрагировали хлороформом и содержание этаноламина в полученном экстракте оценивали с помощью ТСХ [1].

Получение стандартного препарата EtnNAc и его идентификация. Этаноламин (50 мг) ацетилировали как описано выше (таблица, опыт 4) и продукты реакции выделяли препаративной ТСХ. Выход EtnNAc составлял 60%, $R_{DNP} = 6$, МС, *m/z*: 103 (M^+), 85 ($M^+ - H_2O$), 72 ($M^+ - CH_2OH$), 60 ($M^+ - COCH_3$) [24].

Хроматография и масс-спектрометрия. Разделение исходных и N-ацетилированных фосфолипидов (50 мкг) выполняли методом проточной ТСХ ([28]; см. также сноску 6 в таблице). Для аналитической ТСХ (см. сноску 8 в таблице) на пластинку 14 × 5 см наносили 40 мкг продуктов гидролиза (при pH 4) водорастворимой фракции ацетилированных фосфолипидов и по 40 мкг синтетических препаратов EtnNAc или EtnNAcOAc. После разделения пластинку обрабатывали неспецифическим реагентом – фосфорномолибденовой кислотой (PMA). Рассчитывали также нижний предел детектирования EtnNAc и EtnNAcOAc, который затем использовали для приближенной оценки их содержания [1]. Амино- и фосфатные группы обнаруживали нингидрином и реактивом Васьковского соответственно [29, 19].

Препаративную ТСХ продуктов гидролиза водорастворимой фракции и ацетилирования этаноламина выполняли аналогично. На пластинки размером 15 × 15 см наносили по 120 и 200 мкг указанных веществ; после проявления вещества с сорбента элюировали смесью хлороформа и метанола (2 : 1). Было получено по ~1 мг EtnNAc и EtnNAcOAc; степень их чистоты контролировали аналитической ТСХ.

Для ГЖХ-разделения EtnNAc и EtnNAcOAc использовали спиральную стеклянную колонку (0.3 см × 1.2 м) с Хромосорбом W-AW, содержавшим 3% неполярной жидкой фазы OV-17 [28], при температуре испарительной камеры, колонки и детектора 170, 160 и 160°C соответственно. Масса проб EtnNAc и EtnNAcOAc составляла

1 мкг; стандартом для расчета их относительного удерживания служил метилсалицилат (2 мкг). Остальные параметры ГЖХ, а также методы расчета нижнего предела чувствительности пламенно-ионизационного детектора к EtnNAc и EtnNAcOAc и определения асимметричности их ГЖХ-пиков не отличались от применявшихся ранее [1].

Масс-спектры EtnNAc и EtnNAcOAc снимали на хроматомасс-спектрометре Finnigan 3000 (США). Пробы (1–2 мкг) разделяли на капиллярной ГЖХ-колонке (0.2 мм × 50 м) с химически связанной жидкой фазой, содержавшей метил- и фенилсиликоновые эластомеры (19 : 1; Finnigan, США). Температура колонки 160°C, расход гелия 2 мл/мин, ионизирующее напряжение 70 эВ, ток эмиссии катода 100 мкА, ускоряющее напряжение 3 кВ.

Приносим благодарность проф. Э.Е. Нифантьеву за обсуждение результатов настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Жуков А.В., Верещагин А.Г.* // Физиология растений. 1994. Т. 41. С. 420–424.
2. *De Koning A.J.* // Analyst. 1966. V. 91. P. 523–525.
3. *Lester R.L., White D.C.* // J. Lipid Res. 1967. V. 8. P. 565–569.
4. *Кейтс М.* Техника липидологии. М.: Мир, 1975. С. 94–96.
5. *Menon A.K., Stevens V.L.* // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 15277–15280.
6. *Sundaralingam M.* // Nature. 1968. V. 217. P. 35–37.
7. *Henderson T.O., Glonek T., Myers T.C.* // Biochemistry. 1974. V. 13. P. 623–628.
8. *Seimiya T., Ashida M., Hayashi M., Muramatsu T., Hara I.* // Chem. Phys. Lipids. 1978. V. 21. P. 69–76.
9. *Корнена Е.П., Арутюнян Н.С.* // Масложировая пром-сть. 1985. № 8. С. 14–18.
10. *Pascher I., Lundmark M., Nyholm P.-A., Sundell S.* // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1113. P. 339–344.
11. *Boggs J.M.* // Can. J. Biochem. 1980. V. 58. P. 755–770.
12. *Корбридж Д.* Фосфор. М.: Мир, 1982. С. 42–44.
13. *Головня Р.В., Журавлева И.Л., Зенин С.В., Поляков В.А., Сергеев Г.В.* // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1973. С. 2595–2597.
14. *Merchant T.E., Glonek T.* // J. Lipid Res. 1990. V. 31. P. 479–483.
15. *Lafrance D., Marion D., Pezolot M.* // Biochemistry. 1970. V. 29. P. 4592–4599.
16. *Brown P.M., Silvius J.R.* // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V. 980. P. 181–190.
17. *Wright S.E., Huang L.* // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1103. P. 172–178.
18. *Gaver R., Sweeley C.C.* // J. Am. Chem. Soc. 1966. V. 88. P. 3643–3646.
19. *Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M.* // J. Chromatogr. 1975. V. 114. P. 129–141.
20. *Desjobert A.* // Bull. Soc. Chim. Fr. 1947. V. 14. P. 809–812.
21. *Chanley J.D., Gindber E.M., Sobotka H.* // J. Am. Chem. Soc. 1952. V. 74. P. 4347–4351.
22. *Barnard P.W.C., Bunton C.A., Llewellyn D.R., Oldham K.A., Silver B.L., Vernon C.A.* // Chemistry and Industry. 1955. P. 760–764.
23. *Chanley J.D., Feageson E.* // J. Am. Chem. Soc. 1955. V. 77. P. 4002–4007.
24. Eight Peak Index of Mass Spectra. 1983. 3rd ed. № 1. Part 1. P. 7–57.
25. *Aneja R., Chadha J.S., Knaggs J.A.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1969. V. 36. P. 401–406.
26. *Rietschel E.T., Sidorczyk Z., Zähringer U., Wallenweber H.W., Lüderitz O.* // ACS Symposium. Ser. 231. Bacterial Lipopolysaccharides / Eds L. Anderson, F.M. Unger. Washington, D.C.: ACS, 1983. P. 195–218.
27. *Stahl N., Baldwin M.A., Hecker R., Pan K.M., Burlingame A.L., Prusiner S.B.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 5043–5053.
28. *Андерсен А.А.* Газовая хроматография аминосоединений. Рига: Зинатне, 1982. С. 160–175.
29. *Жуков А.В., Стефанов К.Л., Верещагин А.Г.* // Физиология растений. 1987. Т. 34. С. 518–523.

Mild Nonenzymic Hydrolysis of Phosphodiester Bond in Phosphatidylethanolamines

A. V. Zhukov,[1] E. I. Kuznetsova, and A. G. Vereshchagin

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, ul. Botanicheskaya 35, Moscow, 127276 Russia

Abstract—Acetylation of phosphatidylethanolamine changes the charge and conformation of its polar head and, as a result, makes the P–O–C bond in *N*-acetylphosphatidylethanolamine accessible to hydrolysis (with the formation of *N*-acetylethanolamine) under milder conditions than those required for the hydrolysis of phosphatidylethanolamine.

Key words: phospholipids, hydrolysis, polar head group.

[1] To whom correspondence should be addressed.