



УДК 577.115.4:577.352:535.372

Су5-МЕЧЕННЫЙ ФОСФАТИДИЛХОЛИН**© 2021 г. Ю. А. Грачёва*, Д. С. Третьякова**, О. Г. Замышляева*, Е. С. Кудряшова*,
Е. Л. Водовозова**, А. Ю. Федоров*, И. А. Болдырев**,#****Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Россия, 603950 Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23****ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 30.10.2020 г.

После доработки 11.11.2020 г.

Принята к публикации 14.11.2020 г.

Флуоресцентные липидные зонды широко применяются в качестве инструментов для исследования биологических функций липидов (метаболических путей и молекулярных механизмов заболеваний) и изучения свойств биологических мембран. В данной статье мы описываем новый флуоресцентный липидный зонд – Су5-меченный фосфатидилхолин (Су5-PC), приводим его геометрические параметры, методику синтеза, спектральные характеристики и данные по подвижности в липидной мембране. Су5-PC – хороший зонд для биоимиджинга – интенсивность его флуоресценции сохраняет линейную зависимость вплоть до высоких значений концентрации. Однако применение Су5-PC в исследованиях мембранной динамики невозможно, т.к. зонд нечувствителен даже к фазовому переходу в липидной мембране.

Ключевые слова: флуоресцентные липидные зонды, цианиновые красители, биологические мембраны

DOI: 10.31857/S0132342321050262

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные липидные зонды – распространенный инструмент для исследования биологических функций липидов [1]. Поведение липидных зондов в мембране зависит от структуры флуорофора. Оно различается для дифенилгекса триена [2], пирена [3], 4-нитробензо-2-окса-1,3-диазола (NBD) [4–6], производных группы BODIPY [7, 8] и других флуорофоров [9, 10]. Цианиновые флуорофоры широко применяются для мечения белков [11] и нуклеиновых кислот [12–15]. Для изучения биологических мембран используются диалкильные производные цианинов (DII, DIO, DID и DIR), сильно отличающиеся по структуре от молекул липидов [16, 17]. Стремясь разработать флуоресцентные зонды, как можно более близкие по структуре к природным липидам, мы синтезировали фосфолипидный аналог Су5-PC – фосфатидилхолин с флуорофором Су5,

присоединенным через ацильный линкер в *sn*-2-положение глицерина. Это распространенный дизайн липидных зондов для мембранных исследований [18–21]. Однако именно Су5-меченных фосфатидилхолинов до сих пор не было предложено. Су5 – достаточно полярный флуорофор, он применялся (в виде конъюгата с дибензоциклооктином для последующей реакции циклоприсоединения к азиду) для мечения встроенного в клеточную мембрану гликолипида, модифицированного азидогруппой по остатку маннозы [22, 23]. Мы считаем, что введение Су5 в гидрофобную часть молекулы фосфолипида представляет не меньший интерес. Во-первых, относительно неполярные метки, обладающие подходящими для биоимиджинга спектральными характеристиками, все равно вытесняются из плотно упакованной гидрофобной области мембраны в приповерхностную полярную область [8]. Во-вторых, полярные метки, такие как NBD, располагаются в полярной области мембраны независимо от места крепления в молекуле липида [5]. И, наконец, Су5 сорбируется на поверхности липидной мембраны из водного раствора, даже если флуорофор содержит сульфогруппы [24].

Сокращения: BODIPY – 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-5-индацен-8-ил; Су5 – цианиновый флуорофор, содержащий полиметиновую цепь из пяти атомов С; Су5-PC – Су5-меченный фосфатидилхолин; DMPC – 1,2-димиристоил-*sn*-глицерофосфохолин; NBD – 4-нитробензо-2-окса-1,3-диазол; TMV-PC – (1,3,5,7-тетраметил-BODIPY)-меченный фосфатидилхолин.

Автор для связи (тел.: +7 (495) 330-66-10; эл. почта: ivan@lipids.ibch.ru).

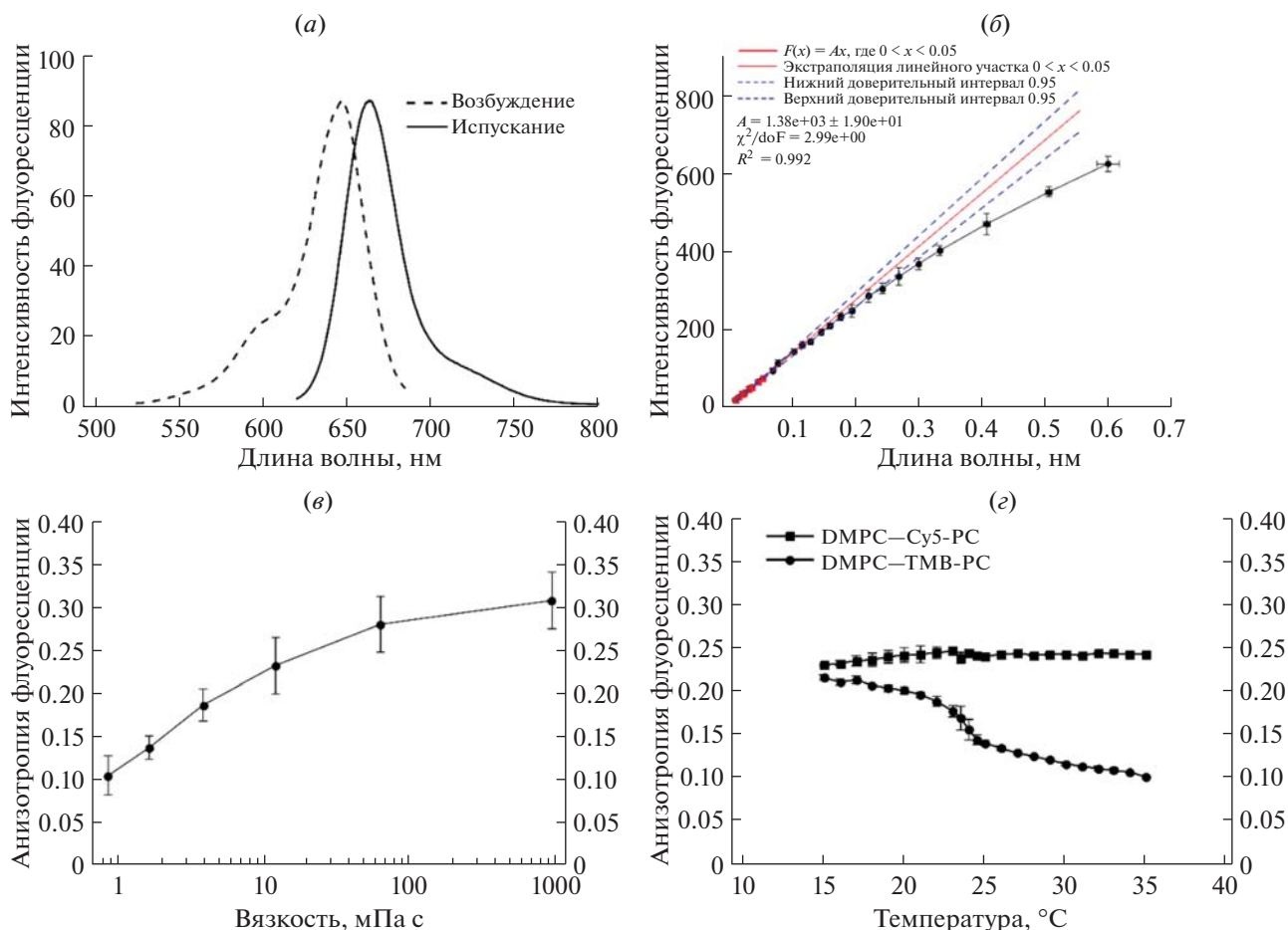


Рис. 1. (а) – Спектры возбуждения и испускания зонда Су5-РС в этаноле; (б) – зависимость интенсивности флуоресценции Су5-РС от концентрации; (в) – зависимость анизотропии флуоресценции Су5 от вязкости среды (смеси глицерина с водой); (г) – анизотропия флуоресценции фосфолипидных зондов Су5-РС и ТМВ-РС [8] в бислое DMPC в зависимости от температуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектральные характеристики Су5-РС идентичны таковым для исходного флуорофора Су5: $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{эм}} = 646/664$ нм (рис. 1а). С ростом концентрации Су5-РС в растворе эффект внутреннего фильтра не проявляется вплоть до оптической плотности 0.3 (что соответствует концентрации 1.2 мкМ, молярный коэффициент поглощения $\epsilon \sim 250000$) (рис. 1б). Это позволяет использовать Су5-РС в больших локальных концентрациях в мембранах, не опасаясь самотушения его флуоресценции, что важно для биоимиджинга липосом в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Анизотропия флуоресценции (r) – мера подвижности флуорофора. Если последний быстро и свободно вращается, анизотропия флуоресценции будет стремиться к нулю. Если молекула зафиксирована в пространстве, величина r будет равна предельному значению, характеристическому для данного флуорофора (но не более максимально возможного значения 0.4). Измерения

анизотропии флуоресценции позволяют оценить свойства среды, в которой находится флуорофор: с ростом вязкости среды подвижность флуорофора уменьшается, а величина r растет (рис. 1в). По изменению анизотропии флуоресценции отслеживают изменение фазового состояния липидной мембраны. На рис. 1г показано изменение анизотропии флуоресценции для BODIPY-меченого липида, ТМВ-РС [8], в липидном бислое из 1,2-димиристоил-*sn*-глицерофосфохолина (DMPC) при изменении температуры. DMPC при 24°C переходит из гелевой (S_0) в жидкую неупорядоченную фазу (L_d), и в районе точки фазового перехода анизотропия меняется скачкообразно. Однако в случае Су5-РС фазовый переход в липидном бислое практически не отражается на анизотропии флуоресценции зонда.

Можно было предположить, что вращение флуорофора Су5 затормаживается за счет электростатических взаимодействий с фосфатными группами двух соседних липидов в мембране.

Действительно, расстояние между катионными центрами (атомами N) Cy5 равно 9.8 Å (данные из оптимизированной геометрии флуорофора, программное обеспечение ORCA [25], уровень теории B3LYP), что очень близко к расстоянию между фосфатами соседних липидов – 9.1 Å (исходя из средней площади на один липид в 65 Å² [26]). Однако в работе Lam et al. [27] с помощью полноатомной молекулярной динамики показано, что ароматические системы цианиновых флуорофоров, включая атомы азота, погружены в область углеводородных цепей и не взаимодействуют с фосфатными группами липидов.

Мы считаем, что пониженная чувствительность анизотропии флуоресценции Cy5 к изменению фазового состояния внутри бислоя обусловлена коротким временем жизни возбужденного состояния. Для цианиновых красителей оно составляет менее 2 нс [28]. За это время соседние с зондом молекулы липидов не успевают переместиться на заметное расстояние. Соответственно, и сам флуорофор не успевает изменить своего положения в пространстве. Иными словами, короткое время жизни флуоресценции цианинового флуорофора не позволяет отличить друг от друга липидные среды с высоким (в фазе *L_d*) и низким (в фазе *S_o*) коэффициентом диффузии. Для зонда TMB-PC время жизни возбужденного состояния превышает 6 нс [8]. Этого оказывается достаточно, чтобы почувствовать разницу между динами-

кой липидов в жидкокристаллической и гелевой фазах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР (δ , м.д.; КССВ – *J*, Гц) регистрировали на спектрометре DD2 400 (Agilent, США) в CD₃OD при 25°C, используя TMS в качестве внутреннего стандарта. Масс-спектр получен на масс-спектрометре Microflex LT (Bruker, Германия); MS (MALDI-TOF). Электронные спектры (в этаноле) регистрировали на спектрофотометре СФ2000 (ООО “ОКБ Спектр”, Россия), спектры флуоресценции (в этаноле) – на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония), спектральные щели 5 нм. Спектр испускания в диапазоне 620–800 нм снимали при возбуждении 600 нм; спектр возбуждения в диапазоне 525–685 нм – при испускании 695 нм.

Синтез Cy5-PC из лизофосфатидилхолина (LysoPC) и карбоксипентильного производного Cy5 проводили в условиях реакции Штеглиха, как описано ранее [21] (схема 1). Целевой продукт выделяли хроматографией на силикагеле 60, элюируя градиентом метанола в хлороформе от 10 до 20%, затем системой CHCl₃ : MeOH : H₂O, 65 : 25 : 4 (выход 46%; темно-синее маслообразное вещество). Выход реакции синтеза зонда Cy5-PC (схема 1) составил 46%. Структура была подтверждена методами масс- (*m/z* 960.1 [M]⁺) и ЯМР-спектроскопии.

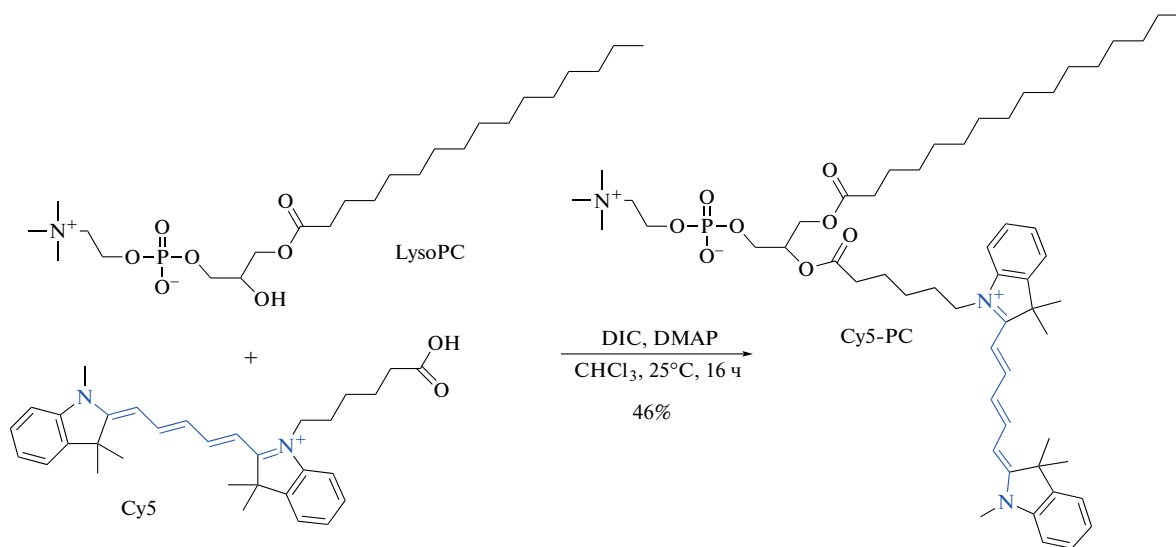


Схема 1. Схема синтеза флуоресцентного липидного зонда Cy5-PC. LysoPC – лизофосфатидилхолин, Cy5 – карбоксипентильное производное Cy5, DIC – диизопропилкарбодиимид, DMAP – 4-диметиламинопиридин.

¹H-ЯМР-спектр (400 МГц): 8.33–8.24 (м, 2H), 7.50 (д, *J* 7.1, 2H), 7.44–7.39 (м, 2H), 7.34–7.30 (м, 2H), 7.29–7.24 (м, 2H), 6.71–6.65 (м, 1H), 6.32 (д,

J 13.8, 2H), 4.31 (с, 2H), 4.16–4.10 (м, 2H), 3.76–3.57 (м, 7H), 3.31 (с, 3H), 3.27 (д, *J* 3.5, 9H), 2.35 (тд, *J* 14.4, 13.3, 7.0, 4H), 1.73 (с, 14H), 1.60 (квин-

тет, J 8.5, 7.7, 2H), 1.56–1.50 (м, 2H), 1.28 (уш. с, 26H), 0.89 (т, J 6.3, 3H).

^{31}P -ЯМР-спектр (162 МГц): –1.11.

^{13}C -ЯМР-спектр (101 МГц): 175.38, 174.95, 174.64, 174.50, 174.35, 155.62, 155.51, 144.24, 143.53, 142.67, 142.55, 129.73, 126.87, 126.23, 126.15, 123.43, 123.28, 112.00, 111.89, 104.58, 104.32, 71.98, 67.40, 67.35, 64.97, 63.52, 60.66, 54.77, 54.74, 50.51, 44.81, 34.86, 33.05, 31.73, 30.77, 30.73, 30.59, 30.42, 30.15, 28.16, 28.05, 27.88, 27.25, 25.99, 25.69, 23.73, 23.70, 14.46.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированный нами Су5-РС оказался зондом с узкой областью использования. Его применение в исследованиях мембранной динамики невозможно, т.к. зонд нечувствителен даже к фазовому переходу в липидной мембране. Однако Су5-РС – хороший зонд для биоимиджинга – интенсивность его флуоресценции сохраняет линейную зависимость вплоть до высоких значений концентрации. Су5-РС найдет применение для окрашивания мембран клеток и искусственных липидных мембран.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0729-2020-0039) в рамках базовой части государственного задания.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Varandas P., Cobb A., Segundo M., Silva E.* // *Bioconjugate Chem.* 2020, V. 31, P. 417–435. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00660>
2. *do Canto A., Robalo J., Santos P., Palace Carvalho A., Prates Ramalho J., Loura L.* // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2016, V. 1858, P. 2647–2661. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.07.013>
3. *Fraňová M.D., Vattulainen I., Ollila O.H.S.* // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2014, V. 1838, P. 1406–1411. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.030>
4. *Filipe H., Bowman D., Palmeira T., Cardoso R., Loura L., Moreno M.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015, V. 17, P. 27534–27547. <https://doi.org/10.1039/C5CP04191K>

5. *Filipe H., Pokorna S., Hof M., Amaro M., Loura L.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019, V. 21, P. 1682–1688. <https://doi.org/10.1039/C8CP06064A>
6. *Amaro M., Filipe H., Prates Ramalho J., Hof M., Loura L.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016, V. 18, P. 7042–7054. <https://doi.org/10.1039/C5CP05238F>
7. *Sachl R., Boldyrev I., Johansson L.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, V. 12, P. 6027–6034. <https://doi.org/10.1039/b926953c>
8. *Tretiakova D.S., Alekseeva A.S., Galimzyanov T.R., Boldyrev A.M., Chernyadyev A.Y., Ermakov Y.A., Baitishchev O.V., Vodovozova E.L., Boldyrev I.A.* // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2018, V. 1860, P. 2337–2347. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.020>
9. *Faller R.* // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2016, V. 1858, P. 2353–2361. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.014>
10. *Loura L., Prates Ramalho J.* // *Biophys. Rev.* 2009, V. 1, P. 141–148. <https://doi.org/10.1007/s12551-009-0016-5>
11. *Leisle L., Chadda R., Lueck J., Infield D., Galpin J., Krishnamani V., Robertson J., Ahern C.* // *eLife.* 2016, V. 5, P. e19088. <https://doi.org/10.7554/eLife.19088>
12. *Fegan A., Shirude P., Balasubramanian S.* // *Chem. Commun. (Camb).* 2008, V. 17, P. 2004–2006. <https://doi.org/10.1039/B801629A>
13. *Gerowska M., Hall L., Richardson J., Shelbourne M., Brown T.* // *Tetrahedron.* 2012, V. 68, P. 857–864. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.11.041>
14. *Lapa S.A., Guseinov T.O., Pavlov A.S., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020, V. 46, P. 557–562. <https://doi.org/10.1134/S1068162020040111>
15. *Shershov V.E., Miftakhov R.A., Kuznetsova V.E., Timofeev E.N., Grechishnikova I.V., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019, V. 68, P. 217–220. <https://doi.org/10.1134/S1068162019030051>
16. *Shim S.H., Xia C., Zhong G., Babcock H.P., Vaughan J.C., Huang B., Wang X., Xu C., Bi G.Q., Zhuang X.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012, V. 109, P. 13978–13983. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201882109>
17. *Daubeuf S., Bordier C., Hudrisier D., Joly E.* // *Cytometry A.* 2009, V. 75, P. 380–389. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20679>
18. *Boldyrev I.A., Zhai X., Momsen M.M., Brockman H.L., Brown R.E., Molotkovsky J.G.* // *J. Lipid Res.* 2007, V. 48, P. 1518–1532. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600459-JLR200>
19. *Boldyrev I.A., Molotkovsky J.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2006, V. 32, P. 78–83. <https://doi.org/10.1134/S1068162006010080>
20. *Polozov I.V., Molotkovsky J.G., Bergelson L.D.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1994, V. 69, P. 209–218. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0009-3084(94)90002-7)

21. *Alekseeva A., Tretiakova D., Melnikova D., Molotkovsky U., Boldyrev I.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2016. V. 42. P. 305–309.
<https://doi.org/10.1134/S1068162016030031>
22. *Shen L., Cai K., Yu J., Cheng J.* // *Bioconjugate Chem.* 2019. V. 30. P. 2317–2322.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00509>
23. *Shen L., Cai K., Yu J., Cheng J.* // *ACS Omega.* 2020. V. 5. P. 14111–14115.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01644>
24. *Hughes L., Rawle R., Boxer S.* // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e87649.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087649>
25. *Neese F.* // *WIREs Comput. Mol. Sci.* 2012. V. 2. P. 73–78.
<https://doi.org/10.1002/wcms.81>
26. *Petrache H.I., Dodd S.W., Brown M.F.* // *Biophys. J.* 2000. V. 79. P. 3172–3192.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76551-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76551-9)
27. *Lam K., Tajkhorshid E.* // *Biophys. J.* 2020. V. 119. P. 24–34.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.05.027>
28. *Gustafson T., Cao Q., Achilefu S., Berezin M.* // *ChemPhysChem.* 2012. V. 13. P. 716–723.
<https://doi.org/10.1002/cphc.201100916>

Cy5-Labeled Phosphatidylcholine

I. A. Gracheva*, D. S. Tretiakova, O. G. Zamyshlyayeva*, E. S. Kudriashova*, E. L. Vodovozova**,
A. Y. Fedorov*, and I. A. Boldyrev**,#**

*Phone: +7 (495) 330-66-10; e-mail: ivan@lipids.ibch.ru

*Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

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

Fluorescent lipid probes are widely used as tools for studying the biological functions of lipids (such as metabolic pathways and molecular mechanisms of diseases) and studying the properties of biological membranes. In this report, we describe a new fluorescent lipid probe, Cy5-labeled phosphatidylcholine (Cy5-PC), present its geometrical parameters, synthesis, spectral characteristics, and data on the mobility in lipid membrane. Cy5-PC is an excellent probe for bioimaging, the intensity of its fluorescence retains a linear dependence up to high concentrations. At the same time the use of Cy5-PC in studies of membrane dynamics is impossible, since the probe is insensitive even to the phase transition in the lipid membrane.

Keywords: fluorescent lipid probes, cyanine dyes, biological membrane