



УДК 577.07:535.372

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НОВЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ НА ОСНОВЕ КАРДИОЛИПИНА

© 2009 г. И. А. Болдырев, Ю. Б. Павлова, Ю. Г. Молотковский#

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 09.06.2008 г. Принята к печати 30.06.2008 г.

Новые флуоресцентные липидные зонды, производные кардиолипина, AV12-CL и B7-CL, содержащие соответственно остатки 12-(9-антрил)-11E-додеценовой и 7-(4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3a,4a-диаза-s-индацен-8-ил)гептановой кислот синтезированы ацилированием 1-лизокардиолипина, в свою очередь полученного из кардиолипина бычьего сердца ферментализом бактериальной липазой. Зонды предназначены в первую очередь для исследования взаимодействий белков с анионными фосфолипидами.

Ключевые слова: флуоресцентные липидные зонды; кардиолипин; антрилвинил; BODIPY; синтез.

ВВЕДЕНИЕ

Кардиолипин (дифосфатидилглицерин) – сложный фосфолипид, в наибольшем количестве встречающийся в сердечной и скелетных мышцах, а также в бактериях (обзоры [1, 2]). Кардиолипин играет существенную роль в процессах, связанных с клеточной энергетикой, на что указывает высокое его содержание в митохондриях, а также с апоптозом, однако роль эта пока неясна (см. обзоры [3, 4]). В последние годы интерес к исследованиям биохимии и биофизики кардиолипина возрос (см., например, работы [5, 6] и литературу в них); этот интерес усиливается, кроме прочего, также и тем, что содержащиеся кардиолипин липосомы повышают эффективность доставки включенных в них лекарств к злокачественным клеткам [7, 8].

Как известно, флуоресцентные зонды входят в число важнейших инструментов для такого рода исследований [9], поэтому получение флуоресцентно-меченых аналогов кардиолипина приобрело в последнее время актуальность. Синтез подобных производных сопряжен с известными трудностями ввиду сложности и лабильности молекулы кардиолипина (I), содержащей свободную гидроксигруппу и две фосфатные функции. Разработанные методы полного синтеза кардиолипинов заданного строения [10, 11] довольно сложны и применяются редко.

Для получения различных производных по ацильным остаткам кардиолипина, как правило, применяются полусинтетические процедуры. “Классический” метод включает защиту свободной гид-

роксигруппы, например тетрагидропиранильным остатком [12]), ферментативное дезацилирование фосфолипазой A₂ из равновесных положений *sn*-2 и *sn*-2' (не доводя реакцию до конца, можно получить смесь моно- и дидезацилированного продуктов, разделяемую хроматографией), ацилирование одного из них требуемой кислотой и конечное удаление тетрагидропиранильной защиты [12]. Указанный путь можно сократить, воспользовавшись тем, что в кардиолипине свободная вторичная ОН-группа, расположенная между двумя фосфатными, отличается низкой реакционной способностью: она может быть ацилирована ангидридами кислот, ацилирование же ее жирными кислотами в присутствии дициклогексилкарбодиимида протекает очень медленно и с низкими выходами [1]. Это позволило Кузьминой и др. синтезировать ионофорные производные кардиолипина, не прибегая к защите его свободной гидроксигруппы [13].

К настоящему времени известно несколько флуоресцентно-меченых производных кардиолипина. Мустонен и Киннунен применяли его аналог, несущий остаток 10-(1-пиренил)декановой кислоты, о происхождении которого сообщается лишь, что он был по заказу получен “полным синтезом” фирмой KSV-Chemicals (Финляндия) [14] – возможно, имеется в виду описанный выше полусинтез. Пакард и др. описали родаминовое производное кардиолипина, названное ими коллареином (collarein) и полученное действием на природный фосфолипид лиссамин-родамин-В-сульфохлорида [15]; правильность изображенной авторами структуры вызывает сомнения. Вероятнее всего, было получено родаминилсульфонильное производное кардиолипина по свободной ОН-группе, т.е. зонд, существенно отличный от исходного фосфолипида; в дальнейшем он был упомянут в литературе лишь однажды [16].

Перошон и сотр. предложили получать антрил-меченый кардиолипин биосинтетическим путем: при

Сокращения: AV – 9-антрилвинил; AV12-CL – кардиолипин, несущий в *sn*-1-положении остаток 12-(9-антрил)-11E-додеценовой кислоты; B7-CL – кардиолипин, несущий в *sn*-1-положении остаток 7-(Me₄-BODIPY-8)гептановой кислоты; Me₄-BODIPY-8 – 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3a,4a-диаза-s-индацен-8-ил.

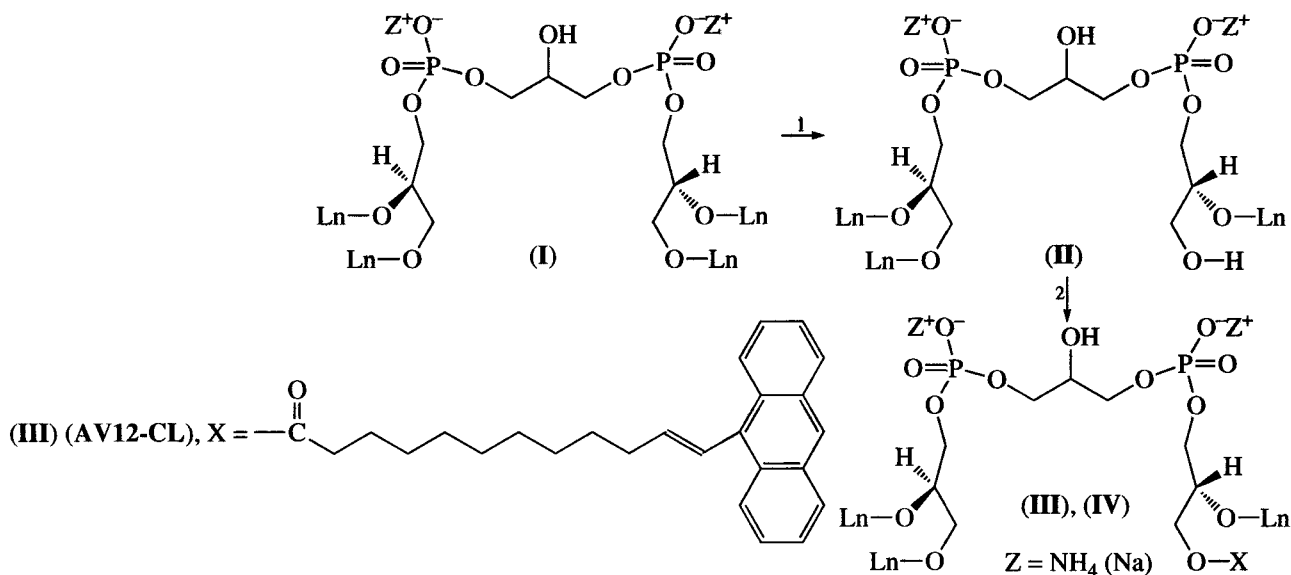
Автор для связи (тел./факс: (495) 330-66-01; эл. почта: jg-mol@ibch.ru).

добавлении в культуральную среду *Micrococcus luteus* 9-(2-антрил)нонановой кислоты она включается до уровня 6.7% в продуцируемый бактерией кардиолипин, который можно выделять в препаративных количествах [17]. Очевидный недостаток метода – низкий уровень включения метки. Описано включение в биосинтетические превращения добавленного к клеткам *E. coli* флуоресцентного фосфатидилглицерина с остатком 6-NBD-аминогексановой кислоты (NBD – 7-нитробенз-2-окса-1,3-диазолил), при этом образуется NBD-меченый кардиолипин, идентифицированный хроматографически [18]. Подобное же биосинтетическое включение в кардиолипин флуоресцентной паринаровой кислоты наблюдалось при добавлении ее в культуру клеток млекопитающих [19]. В обоих случаях флуоресцентный кардиолипин в индивидуальном виде выделен не был.

Как видно из этого краткого обзора, к настоящему времени нет описанного в доступной литературе полноценного метода получения флуоресцентных аналогов кардиолипина. В наших же биофизических исследованиях взаимодействий белков с анионными фосфолипидами – см., например, [20, 21] – такие зонды были бы весьма ценными инструментами; которые, несомненно, могут найти и другие применения. В настоящей работе описан синтез двух новых флуоресцентно-меченых кардиолипинов, ацилированных остатками 12-(9-антрил)-11*E*-додеценовой и 7-(Me₄-BODIPY-8)гептановой кислот.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор флуорофоров для новых зондов и методов синтеза были продиктованы следующими соображениями. Флуорофоры должны быть малополярными и располагаться в гидрофобной области мембраны, где они в наименьшей степени нарушают ее упаковку и влияют на физические свойства, что сводит к минимуму различия в поведении зонда и исходной молекулы, т.е. кардиолипина [22, 23]. Поэтому один из зондов, AV12-CL (III) (схема 1) несет антрилвинильный (AV) флуорофор, обладающий многими полезными качествами, в частности, он является хорошим акцептором энергии возбуждения белковых флуорофоров, что ценно при изучении липид-белковых взаимодействий [21, 22]. Другой зонд, B7-CL (IV) (схема 1) снабжен 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3*a*,4*a*-диза-*s*-индацен-8-ильным (Me₄-BODIPY-8) флуорофором, принадлежащим к BODIPY-семейству флуорофоров, отличающихся высокой чувствительностью и рядом других положительных качеств. Недавно мы синтезировали набор флуоресцентных зондов с Me₄-BODIPY-8-флуорофором на конце одной из жирнокислотных цепей и показали, что он погружается в бислой на максимальную глубину, допускаемую ацилом [24, 25].



1 – липаза из *Candida rugosa*; 2 – X–OH, DCC, 4-аминопиридин, 4-пирролидинопиридин.

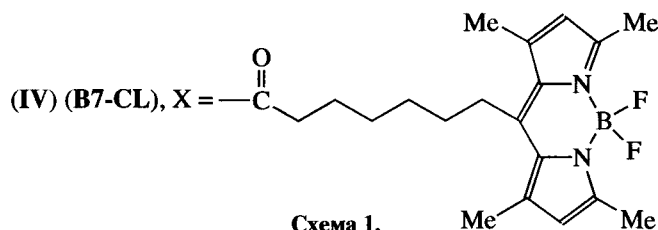


Схема 1.

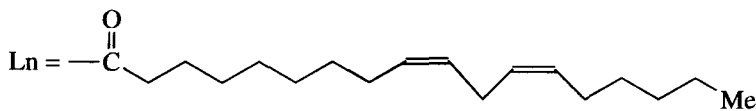


Схема 1. (Продолжение)

В качестве метода получения указанных зондов был выбран самый экономный по времени и затратам труда путь – полусинтез из природного кардиолипина (I) без промежуточного блокирования свободной гидроксигруппы перед ферментативным дезацилированием (схема 1). В нашем варианте такого синтеза, в отличие от ранее применявшегося [13], остаток природной кислоты отщеплялся не из положения *sn*-2 фосфолипазой A₂, а из положения *sn*-1 действием бактериальной липазы, с образованием 1-лизокардиолипина (II). Обоснование такого подхода в том, что первичная гидроксигруппа всегда более реакционноспособна, чем вторичная, поэтому избирательность последующего ацилирования флуоресцентной кислотой группы CH₂OH относительно малоактивного вторичного гидроксила, локализованного между двумя фосфатами, должна быть подавляющей. Дезацилирование фосфолипидов бактериальной липазой ранее с успехом применялось нами для синтеза флуоресцентных фосфолипидных зондов [26].

Исходным соединением служил кардиолипин бычьего сердца, содержащий в основном остатки линолевой кислоты, что отображено на схеме. Он был предпочтен кардиолипину, выделяемому из липидов кишечной палочки *E. coli*, который содержит, главным образом, остатки насыщенных жирных кислот [1]. Полученные из него зонды, имеющие в основном насыщенные ацильные остатки, труднее встраивались бы в природные мембранные системы по сравнению с зондами, синтезированными из ненасыщенного кардиолипина бычьего сердца. Однако работа с последним требует мер предосторожности против возможного перекисного окисления линолеоильных остатков.

Высокий выход лизосоединения (II) при дезацилировании кардиолипина липазой едва ли возможен ввиду присутствия в нем двух доступных для отщепления ацильных остатков в положениях *sn*-1 и *sn*-1' – образование бислизосоединения неизбежно. Для получения желаемого продукта с наибольшим содержанием, ход реакции ферментализации контролировали с помощью ТСХ. Лизосоединение (II) было получено с выходом около 39%, что можно считать вполне удовлетворительным результатом. Выделить побочный продукт, бислизосоединение, оказалось затруднительным из-за почти полного совпадения его хроматографического поведения с поведением холата, применявшегося при ферментализации в качестве детергента.

Строение фосфолипида (II) было подтверждено его масс-спектром (см. “Эксперимент. часть”). По данным спектров ¹H-ЯМР, строго доказать региоспецифичность отщепления ацильного остатка

только из *sn*-1-положения кардиолипина нам не удалось, ввиду тесного перекрывания сигналов от протонов трех глицериновых остатков, несущих необходимую информацию. Однако тот факт, что все бактериальные липазы расщепляют эфиры только первичных спиртов [27], а также мягкость условий ферментализации (рН 7.7, 36°C) позволяют утверждать, что полученное лизосоединение имеет строение (II) – см. схему 1.

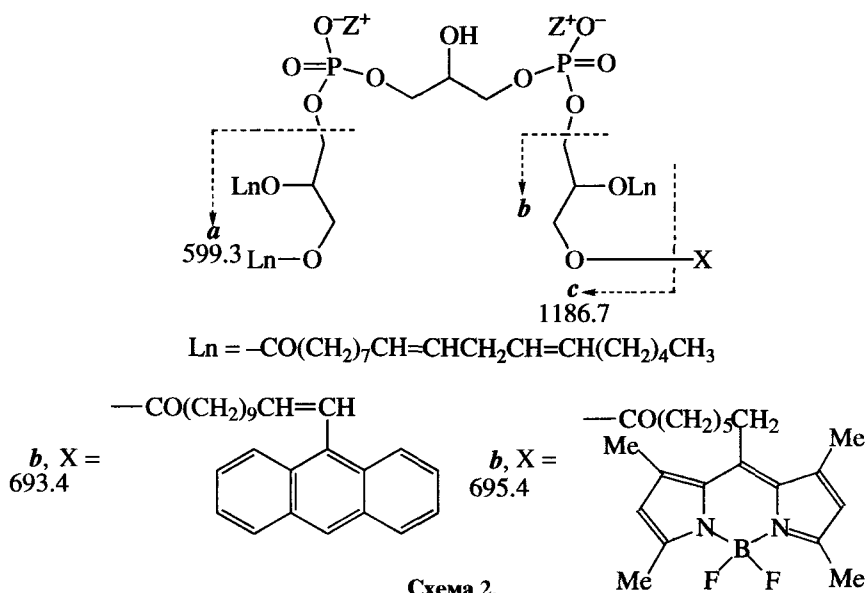
Это 1-лизосоединение было ацилировано 12-(9-антрил)-11*E*-додеценоевой кислотой [22] в присутствии DCC, 4-пирролидинопиридина и 4-аминопиридина по разработанной нами методике [28], что привело к AV-меченному кардиолипину (III) (AV12-CL). Подобным же образом при ацилировании лизосоединения (II) 7-(Me₄-BODIPY-8)гептановой кислотой [24] был получен Me₄-BODIPY-8-кардиолипид (IV) (B7-CL) – см. схему 1. Оба флуоресцентных зонда были выделены колоночной хроматографией на силикагеле в хлороформ-метанольной системе, содержащей аммиак, т.е. в виде аммониевых солей. Однако, как показывают данные MALDI-TOF-масс-спектров (см. ниже), в качестве противоионов в этих соединениях, как и в 1-лизокардиолипине (II) присутствуют также катионы щелочных металлов, в основном Na⁺, по-видимому, захваченные с поверхности силикагеля во время хроматографии.

Строение зондов AV12-CL и B7-CL подтверждается как данными ТСХ – оба зонда имеют одинаковую с природным кардиолипином (I) подвижность, – так и спектральными данными. УФ-спектр AV12-CL с максимумами при 253, 349, 366 и 385 нм – см. “Эксперимент. часть”, повторяет спектры других AV-соединений [22]; таким же образом спектр в видимой области B7-CL (λ_{max} 495 нм) аналогичен спектрам ранее полученных Me₄-BODIPY-8-зондов [24]. Спектры ¹H-ЯМР обоих зондов вполне соответствуют приписываемым структурам и в областях сигналов алифатических фрагментов молекул – литературным данным, см., например, [11]. Наиболее же доказательными представляются масс-спектры MALDI-TOF синтезированных веществ (см. “Эксперимент. часть”).

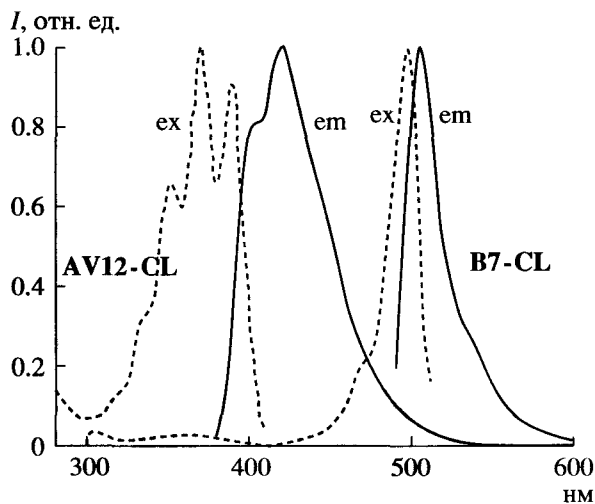
Исходный кардиолипид, будучи природным соединением, имеет неоднородный жирнокислотный состав, однако в нем преобладает линолевая кислота (87% от суммы; также имеется олеиновая – 8%). Поэтому в AV12-CL, как и в B7-CL, хотя это и групповые вещества, преобладающий компонент содержит, кроме флуоресцентно-меченого остатка, три линолеоильных ацила, как это показано на схеме – (III) и (IV), соответственно. Так как оба зонда и 1-лизокардиолипид (II) – дианионы, в масс-спектрах, снятых в режиме детектирования положительных

ионов, молекулярные ионы протонированных форм этих соединений отсутствуют, но имеются содержащие катион ионы типа $[M + Na]^+$, что характерно для ESI- и MALDI-масс-спектров кардиолипинов [11, 29]. В спектрах всех трех соединений пик с максимальной интенсивностью имеет m/z 599.2, это, очевидно, фрагмент **a**, образовавшийся при расщеплении дилинолеоильного фосфатидового участка молекулы (схема 2). В спектрах зондов AV12-CL и B7-CL присутствуют также интенсив-

ные ионы фрагментов **b**, происшедшие из фосфатидового остатка, несущего флуоресцентно-меченый ацил. Для зонда AV12-CL это пик с m/z 693.4; в спектре B7-CL – ион с m/z 695.4 и сопутствующие ему ионы с m/z 696.4 ($[b + H]^+$) и 675.4 ($[b - HF]^+$). В спектре зонда B7-CL присутствует также пик средней интенсивности с m/z 1186.7, который можно приписать фрагменту **c**, образовавшемуся при отрыве от исходной молекулы несущего флуорофор ацила.



Спектры флуоресценции обоих зондов, снятые в метаноле, вполне соответствуют ожидаемым. В



Нормализованные спектры возбуждения (пунктир) и испускания (сплошные линии) флуоресценции зондов AV12-CL (слева) и B7-CL (справа) в метаноле при 20°C; щели монохроматоров возбуждения и испускания 3 нм. AV12-CL (10 мкМ): спектр возбуждения снят при λ_{em} 430 нм, испускания – при λ_{ex} 370 нм; B7-CL (2 мкМ): спектр возбуждения снят при λ_{em} 520 нм, испускания – при λ_{ex} 480 нм.

спектре возбуждения AV12-CL наряду с коротковолновым максимумом при 256 нм присутствуют три характерных длинноволновых при 350, 368 и 387 нм; единственный максимум испускания – при 419 нм с плечом при ~402 нм (рисунок). Соответственно, B7-CL имеет в спектре возбуждения один узкий максимум при 496 нм и симметричный ему максимум испускания при 503 нм (рисунок).

Поведение синтезированных зондов в модельных мембранных системах, а также в клетках сейчас изучается; полученные данные составят предмет нашего следующего сообщения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали 4-аминопиридин, 4-пирролидинопиридин (Aldrich), липазу из *Candida rugosa*, холат натрия, дициклогексилкарбодимид (Sigma). Остальные реактивы производства Реахим (Россия). Метанол перегоняли над метилатом магния, хлороформ над пятиокисью фосфора. Остальные растворители использовали после обычной очистки. Для колоночной хроматографии применяли силикагель Kieselgel 60 (Merck, Германия), для ТСХ – пластинки с флуоресцентным индикатором Kieselgel 60 F₂₅₄ и без индикатора Kieselgel 60 (Merck) в системе $CHCl_3$ -MeOH – 4 M NH_4OH , 65 : 25 : 4; обнаружение фосфорно-мо-

либденовой кислотой с нагревом при $\sim 120^\circ\text{C}$ (А), молибденовым синим (Б) и УФ-облучением (В). 12-(9-Антрил)-11Е-додеценовая [30] и 7-(4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)гептановая [24] кислоты синтезированы как описано ранее. Кардиолипид из бычьего сердца (Avanti, США) содержал остатки линолевой ($\sim 87\%$) и олеиновой ($\sim 8\%$) кислот; доля остальных кислот менее 5%.

Масс-спектры снимали на MALDI-времяпролетном спектрометре UltraFlex TOF-TOF (Bruker Daltonics, Германия) в режиме детектирования положительных ионов с использованием рефлекторной; N_2 -лазер, 337 нм; матрица – 2,5-дигидроксibenзойная кислота; значения молекулярных масс в случае фосфатидовых кислот относятся к неионизированным соединениям. Электронные спектры веществ регистрировали на спектрофотометре СФ-256УВИ (ЛОМО Фотоника, Санкт-Петербург) в метаноле; спектры флуоресценции (в метаноле) – на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония). Спектры ^1H -ЯМР (δ , м.д. относительно Me_4Si , КССВ, Гц) записаны на спектрометре Bruker AVANCE 3 (Германия) при 600 МГц в смеси CDCl_3 - CD_3OD , 3 : 1.

1-(1,2-Диацил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-3-(2'-ацил-*sn*-глицеро-3'-фосфо)глицерин, диаммониевая соль (II), 1-лизокардиолипид. Смесь 22 мг кардиолипидина (I), 35 мг холата натрия, 3 мг 2,6-ди-*трет*-бутил-*n*-крезола (антиоксидант) и 0.1 М Трис- HCl -буфера, содержащего 5 мМ CaCl_2 и 0.02% NaN_3 , обрабатывали в слабом токе аргона в ультразвуковой ванне при 36°C до образования равномерной суспензии (около 7 мин). Добавляли раствор 10 мг липазы в 1 мл того же буфера, смесь инкубировали при 36°C и интенсивном перемешивании в атмосфере аргона, периодически контролируя состав смеси ТСХ (обнаружение: А, Б). Через ~ 2 ч, когда содержание продукта (II) (R_f 0.4–0.5) несколько превысило содержание исходного кардиолипидина (I) (R_f 0.6–0.7), к охлажденной смеси добавляли 20 мл смеси CHCl_3 - MeOH , 2 : 1, после перемешивания и разделения слоев центрифугированием при ~ 300 g, нижний слой отделяли, к верхнему добавляли 5 мл 20% NaCl , экстрагировали еще раз смесью CHCl_3 - MeOH , 2 : 1, и хлороформом (по 20 мл). Объединенный экстракт промывали 10 мл 30% NaCl , сушили ~ 1 г безводного Na_2SO_4 и упаривали. Из остатка хроматографией на колонке 5×100 мм с 1 г силикагеля в ступенчатой градиентной системе хлороформ против смеси метанол-конц. NH_4OH , 14 : 1, выделяли 7 мг (39%) 1-лизокардиолипидина (II) (бесцветный воск). MALDI-MS, m/z (I , %): 1247.625 [$M + K + \text{Na}$] $^+$ (27), 1225.629 [$M - 2\text{H} + \text{NH}_4 + \text{Na}$] $^+$ (14), 1209.668 [$M + \text{Na}$] $^+$ (60), 599.287 [фрагмент a] $^+$ (100). ^1H -ЯМР: 5.27–5.17 (~ 11 H, м, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.09 (2 H, м, RCOOCH), 4.08–3.82 (13 H, уш. м, HOCH_2 , HOCH , RCOOCH_2 , POCH_2), 2.64 (~ 5 H, м, $=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.20 (6 H, м, CH_2COO), 1.96–1.84 (12 H, м, $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 1.49 (6 H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 1.36–1.18 (~ 47 H, уш. м, CH_2), 0.84 (9 H, т, J 7, CH_3).

1-(1,2-Диацил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-3-{1'-[12-(9-антрил)-11Е-додеценоил]-2'-ацил-*sn*-глицеро-3'-

фосфо}глицерин, диаммониевая соль (III), AV12-CL. 1-Лизокардиолипид (6 мг, 4.9 мкмоль), чтобы освободить от ионов аммония, дважды упаривали со смесью 0.5 мл сухого хлороформа и 50 мкл диизопропилметиламина, высушивали 1 ч при ~ 10 Па. Затем к нему добавляли 5 мг (13 мкмоль) 12-(9-антрил)-11Е-додеценовой кислоты, 4 мг (42 мкмоль) 4-аминопиридина, 6 мг (41 мкмоль) 4-пирролидинопиридина, 2 мг 2,6-ди-*трет*-бутил-*n*-крезола и 0.6 мг сухого хлороформа, обрабатывали ~ 1 мин в атмосфере аргона в ультразвуковой ванне и прибавляли ~ 100 мкмоль дицилогексилкарбодиимида в виде 2.5 М раствора в CCl_4 , смесь интенсивно перемешивали 10 ч в атмосфере аргона. Затем к смеси добавляли 1 мл метанола и каплю конц. водного NH_4OH , перемешивали 5 мин и выпаривали при 30°C . Из остатка хроматографией на силикагеле (см. предыдущую методику) выделяли 3.3 мг (43%) фосфатида (II) в виде желтоватого воска. R_f 0.65 (обнаружение: А, Б, В). УФ, λ_{max} , нм (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 253 (1.3×10^5), 349 (6000), 366 (7900) и 385 (7000). MALDI-MS, m/z (I , %): 1587.857 [$M - \text{H} + 2 \text{Na}$] $^+$ (4.5), 1565.868 [$M + \text{Na}$] $^+$ (14), 693.405 [фрагмент b] $^+$ (27), 599.275 [фрагмент a] $^+$ (100). ^1H -ЯМР: 8.24 (1 H, с, аром. H10), 8.17 (м) + 8.04 (д, J 10) (2 H, аром. H1, H8), 7.86 (2 H, м, аром. H4, H5), 7.32 (4 H, м, аром. H2, H3, H6, H7), 6.84 (1 H, д, J 12.5, $\text{ArCH}=\text{CH}$), 6.2 (1 H, дд, J_1 12.5, J_2 7.3, $\text{ArCH}=\text{CH}$), 5.27–5.14 (~ 11 H, м, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.09 (2 H, м, RCOOCH), 4.13–3.71 (13 H, уш. м, HOCH , RCOOCH_2 , POCH_2), 3.52 (2 H, м, $\text{ArCH} = \text{CHCH}_2$), 2.64 (~ 5 H, м, $=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.25–2.12 (8 H, уш. м, CH_2COO), 1.97–1.84 (~ 11 H, м, $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 1.55–1.34 (10 H, уш. м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$, $\text{ArCH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 1.35–1.18 (~ 56 H, уш. м, CH_2), 0.84 (9 H, м, CH_3). Флуоресценция: λ_{ex} 256, 350, 368 и 387 нм (при испускании 430 нм), λ_{em} 419 нм (при возбуждении 370 нм).

1-(1,2-Диацил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-3-{1'-[7-(4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)гептаноил]-2'-ацил-*sn*-глицеро-3'-фосфо}глицерин, диаммониевая соль (IV), B7-CL. Из 2.2 мг (1.8 мкмоль) 1-лизокардиолипидина (II) и 1.2 мг (3.2 мкмоль) 7-(4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)гептановой кислоты по методике, аналогичной синтезу зонда (III), получали 1.2 мг (42%) фосфолипид (IV) (красный воск). R_f 0.63 (обнаружение: А, Б, В); УФ/видимый, λ_{max} , нм (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 495 (7.9×10^4). MALDI-MS, m/z (I , %): 1585.781 [$M + \text{NH}_4 + \text{Na}$] $^+$ (0.24), 1572.292 [$M - \text{F} + 2\text{Na}$] $^+$ (0.38), 1547.829 [$M - \text{HF} + \text{Na}$] $^+$ (0.63), 1186.693 [фрагмент c] $^+$ (1.08), 696.427 [фрагмент $b + \text{H}$] $^+$ (31), 695.388 [фрагмент b] $^+$ (5.4), 675.411 [фрагмент $b - \text{HF}$] $^+$ (65), 599.338 [фрагмент a] $^+$ (100). ^1H -ЯМР: 6.06 (2 H, с, аром.) 5.26–5.17 (~ 11 H, м, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.09 (2 H, м, RCOOCH), 4.10–3.83 (13 H, уш. м, HOCH , RCOOCH_2 , POCH_2), 2.64 (~ 5 H, м, $=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.46 (6 H, с, $\text{C}-\text{CH}_3$), 2.39 (6 H, с, $\text{C}-\text{CH}_3$), 2.27–2.12 (8 H, м, CH_2COO), 1.96–1.84 (~ 11 H, м, $=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 1.58–1.35 (8 H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 1.36–1.18 (~ 53 H, уш. м, CH_2), 0.85 (9 H, м, алиф. CH_3). Флуоресценция: λ_{ex}

496 нм (при испускании 520 нм), λ_{em} 503 нм (при возбуждении 480 нм).

Авторы выражают благодарность Н.Б. Полякову за съемку масс-спектров. Работа поддержана грантом № 06-04-48666 Российского фонда фундаментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ioannou P., Golding B.T. // *Prog. Lipid Res.* 1979. V. 17. P. 279–318.
2. Hoch F.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. V. 1113. P. 71–133.
3. Schlame M., Rua D., Greenberg M.L. // *Prog. Lipid Res.* 2000. V. 39. P. 257–288.
4. Ott M., Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. // *Apoptosis.* 2007. V. 12. P. 913–922.
5. Houtkooper R.H., Vaz F.M. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. X. P. Y Apr. 21 [Epub ahead of print].
6. Ioffe V.M., Gorbenko G.P., Deligeorgiev T., Gadjev N., Vasilev A. // *Biophys. Chem.* 2007. V. 128. P. 75–86.
7. Deborah J. // *Drug Discov. Devel.* 2002. V. 5. P. 28–32.
8. Agrawal V., Paul M.K., Mukhopadhyay A.K. // *J. Liposome Res.* 2005. V. 15. P. 141–155.
9. Michalet X., Kapanidis A.N., Laurence T., Pinaud F., Doose S., Pflughoeft M., Weiss S. // *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* 2003. V. 32. P. 161–182.
10. Paltauf F., Hermetter A. // *Prog. Lipid Res.* 1994. V. 33. P. 239–328.
11. Krishna U.M., Ahmad M.U., Ali S.M., Ahmad I. // *Lipids.* 2004. V. 39. P. 595–600.
12. Dale M.P., Robinson N.C. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. P. 8270–8275.
13. Кузьмина Е.В., Каплун А.П., Швец В.И., Саенко В.А., Егорова Е.М. // *Биоорганич. химия.* 1988. Т. 14. С. 1068–1074.
14. Mustonen P., Kinnunen P.K.J. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 1074–1080.
15. Packard B.S., Karukstis K.K., Klein M.P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V. 769. P. 201–208.
16. Packard B.S., Saxton M.J., Bissell M.J., Klein M.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 449–452.
17. Perochon E., de Bony J., Tocanne J.F. // *Biochem. Cell Biol.* 1990. V. 68. P. 373–376.
18. Huijbrechts R.P.H., de Kroon A.I.P.M., de Kruijff B. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. V. 1280. P. 41–50.
19. Ritov V.B., Banni S., Yalowich J.C., Day B.W., Claycamp H.G., Corongiu F.P., Kagan V.E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. V. 1283. P. 127–140.
20. Gorbenko G.P., Molotkovsky J.G., Kinnunen P.K.J. // *Biophys. J.* 2006. V. 90. P. 4093–4103.
21. Gorbenko G.P., Ioffe V.M., Molotkovsky J.G., Kinnunen P.K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1778. P. 1213–1221.
22. Bergelson L.D., Molotkovsky J.G., Manevich Y.M. // *Chem. Phys. Lipids.* 1985. V. 37. P. 165–195.
23. Молотковский Ю.Г. // *Биоорганич. химия.* 1999. Т. 25. С. 855–867.
24. Boldyrev I.A., Molotkovsky J.G. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2006. V. 32. P. 78–83 (Болдырев И.А., Молотковский Ю.Г. // *Биоорганич. химия.* 2006. Т. 32. С. 87–92).
25. 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.
26. Razinkov V.I., Hernandez-Jimenez E.I., Mikhalyov I.I., Cohen F.S., Molotkovsky J.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1329. P. 149–158.
27. Slotboom A.J., De Haas G.H., Bonsel P.P.M., Burbach-Westerhuis G.J., van Deenen L.L.M. // *Chem. Phys. Lipids.* 1970. V. 4. P. 15–29.
28. Vodovozova E.L., Molotkovsky J.G. // *Tetrahedron Lett.* 1994. V. 35. P. 1933–1936; *ibid.* Correction. 1994. V. 35. P. 8062.
29. Wang H.-Y.J., Jackson S.N., Woods A.S. // *J. Am. Mass Spectrom.* 2007. V. 18. P. 567–577.
30. Молотковский Ю.Г., Дмитриев П.И., Никулина Л.Ф., Бергельсон Л.Д. // *Биоорганич. химия.* 1979. Т. 5. С. 588–594.

Synthesis and Characteristics of New Fluorescent Probes Based on Cardiolipin

I. A. Boldyrev, Yu. A. Pavlova, and Jul. G. Molotkovsky*

*Phone/fax: +7 (495) 330-6601; e-mail: jgmol@ibch.ru
 Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
 ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

New fluorescent lipid probes, cardiolipin derivatives AV12-CL and B7-CL, bearing the residues of 12-(9-anthryl)-11E-dodecenoic and 7-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)heptanoic acid, respectively, have been synthesized by acylation of 1-lysocardiolipin, which had been obtained from bovine heart cardiolipin by enzymatic hydrolysis with bacterial lipase. The resulting probes are intended for the study of protein–anionic phospholipid interactions.

Key words: anthrylviny, BODIPY, cardiolipin, fluorescent lipid probes, synthesis