



УДК 577.07:535.372

## НОВЫЕ 4,4-ДИФТОР-3*a*,4*a*-ДИАЗА-*s*-ИНДАЦЕН (BODIPY)-МЕЧЕННЫЕ СФИНГОЛИПИДЫ ДЛЯ МЕМБРАННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© 2010 г. И. А. Болдырев, Ю. Г. Молотковский\*

Учреждение РАН 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 21.12.2009 г. Принята к печати 29.12.2009 г.

Описан синтез ряда новых флуоресцентно-меченных сфинголипидов, содержащих 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3*a*,4*a*-диаза-*s*-индацен-8-ильную (Me<sub>4</sub>-BODIPY-8) группу в ω-положении жирно-кислотного остатка. Полученные зонды нашли применение при исследовании биологических и модельных мембранных систем.

*Ключевые слова:* флуоресцентные липидные зонды; BODIPY; синтез; мембранные исследования.

### ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные зонды на основе молекулы 4,4-дифтор-4-бора-3*a*,4*a*-диаза-*s*-индацена (BODIPY), модифицированные по положениям 1, 3, 5, 7 или 8, получили значительное распространение благодаря отличным оптическим характеристикам, превосходящим таковые большинства других флуорофоров [1]. Описано большое число BODIPY-меченных соединений [2]; многие из этих зондов широко применяются в биологических исследованиях [3, 4].

Ранее мы сообщали о синтезе и поведении в мембранных системах ряда фосфо- и гликолипидных флуоресцентных зондов, несущих 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3*a*,4*a*-диаза-*s*-индацен-8-ильный (Me<sub>4</sub>-BODIPY-8) флуорофор на конце ацильной цепи; была показана их высокая чувствительность и близкое подобие соответствующим природным липидам [5–7]. Некоторые из полученных зондов были использованы в мембранных исследованиях [8, 9]. Опыт этого применения показал необходимость синтеза новых BODIPY-меченных зондов и совершенствования уже имеющихся. В частности, для кинетических исследований гликолипидпереносящего белка необходим субстрат, флуоресцентно-меченный галактозилцерамид, с более высокой чувствительностью, чем применяемый до сих пор антривинилмеченный зонд [10]. Представлялось желательным использовать для этой цели галактозилцерамиды с достаточно длинными ацильными остатками, носителями BODIPY-флуорофора.

Сокращения: BOP – (бензотриазол-1-илокси)трис-(диметиламино)фосфоний; Me<sub>4</sub>-BODIPY – 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3*a*,4*a*-диаза-*s*-индаценил.

\* Автор для связи (тел./факс: (495) 330-6601; эл. почта: jgmol@ibch.ru).

Здесь следует отметить также, что в последнее время особый интерес привлекают сфинголипиды, непрямые компоненты мембранных рафтов [11] и участники сигнальных процессов [12]; это делает получение новых флуоресцентных аналогов сфинголипидов актуальным.

В настоящем сообщении описан синтез флуоресцентных зондов – аналогов ряда сфинголипидов, меченных Me<sub>4</sub>-BODIPY-8-флуорофором, которые уже нашли применение в мембранных исследованиях (см. ниже) или включены в планы таких исследований.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наш выбор именно Me<sub>4</sub>-BODIPY-8-группы для построения новых зондов обусловлен тем, что, как показано нами ранее [6], этот флуорофор, обладающий осевой симметрией, отличается от других представителей семейства BODIPY меньшей полярностью, а также низкой способностью к образованию димеров, что во многих случаях упрощает интерпретацию результатов биофизических исследований. Правда, проявление димеризации, к которой склонны несимметричные флуорофоры семейства BODIPY, может быть использовано, например, при конфокальной микроскопии клеток или других мембранных систем как показатель высокой концентрации меченого вещества в определенном клеточном компартменте или органелле [13]. Однако ценность такого подхода, по нашему мнению, снижается необходимостью применения высоких концентраций зонда, что приводит к искажениям в мембранной системе.

Имея в виду дополнить уже имеющийся набор [5, 7], для синтеза новых зондов были использованы флуоресцентно-меченные кислоты с длиной

ацильного остатка, несущего флуорофор, в 7, 9 и 15 C-атомов. Из этих кислот две, 7-(Me<sub>4</sub>-BODIPY-8)гептановая (II) и 9-(Me<sub>4</sub>-BODIPY-8)нонановая

(III), были получены ранее [5]; 15-(Me<sub>4</sub>-BODIPY-8)гексадекановая кислота (IV) была синтезирована нами аналогичным образом (см. схему).

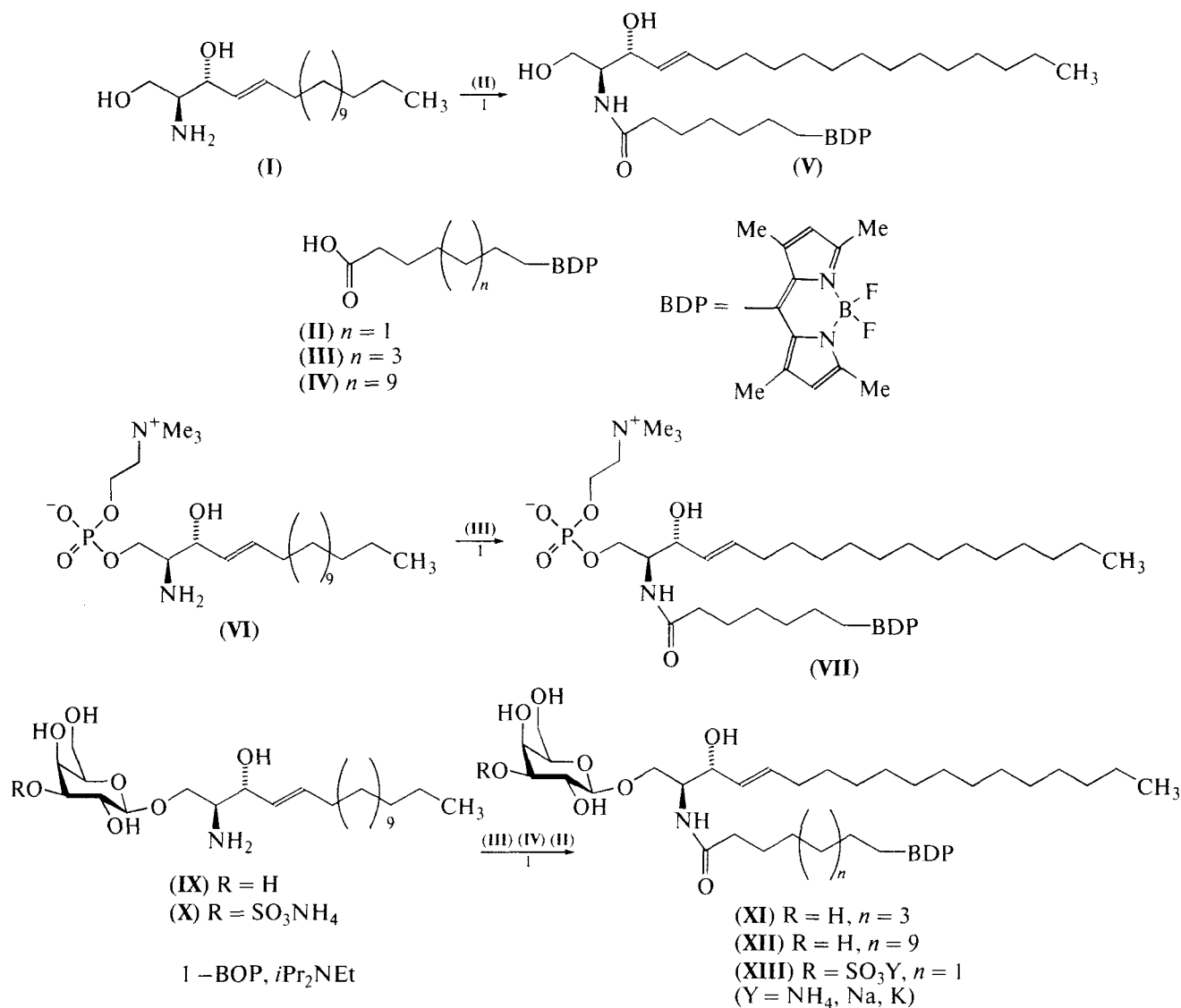


Схема синтеза.

Все флуоресцентно-меченные производные сфинголипидов: Me<sub>4</sub>-BODIPY-8-церамид (V), -сфингомиелин (VII), -галактозилцерамиды (XI), (XII) и -сульфатид (XIII) были получены из соответствующих природных дезацелированных соединений – сфингозина (I), сфингозилфосфохолина (VI), галактозилсфингозина (IX) и 3-*O*-сульфата галактозилсфингозина (X), соответственно (см. схему). *N*-Ацилирование во всех случаях проводили при активировании карбоксила меченой кислоты (бензотриазол-1-илокси)трис-(диметиламино)фосфонием (BOP); этот эффективный активирующий агент, широко применяемый в пеп-

тидной химии, продуктивно используется и в липидных синтесах [14].

Полученные зонды (V), (VII), (XI), (XII) и (XIII) обладают почти идентичными спектральными характеристиками – поглощением с  $\lambda_{max}$  498 нм ( $\epsilon$  8–9 × 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> в этаноле) и характерными для BODIPY-производных спектрами флуоресценции с узкими максимумами возбуждения и испускания и малым стоксовым сдвигом:  $\lambda_{ex}$  497 и  $\lambda_{em}$  506–508 нм (в этаноле); подробнее о спектральных свойствах Me<sub>4</sub>-BODIPY-8-зондов и их поведении в мембранах см. в работе [6].

К настоящему времени Me<sub>4</sub>-BODIPY-8-церамид (V) был применен в качестве флуоресцентного красителя для клеточных органелл при конфокальной микроскопии, что будет материалом одной из наших последующих публикаций.

Было показано также [15], что галактозилцерамид (XI) с остатком 9-(Me<sub>4</sub>-BODIPY-8)нонановой кислоты может служить высокочувствительным флуоресцентным субстратом гликолипидпереносящего белка. Me<sub>4</sub>-BODIPY-8-сульфатид (XIII) был с успехом применен для изучения строения и функций нитевидных выростов (цитонем) нейтрофилов крови человека, а также роли цитонем в процессах фагоцитоза болезнетворных микроорганизмов [16, 17].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали гексадекандиовую кислоту, 2,4-диметилпиррол, эфират трехфтористого бора, гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)трис-(диметиламино)фосфония (BOP), диизопропилиэтиламин, *L*-эритро-сфингозин (Sigma), силикагель 60 и пластинки для ТСХ DC-Alufolien Kieselgel-60 (Merck, Германия). Остальные реактивы производства Реахим (Россия). Диизопропилиэтиламин перегоняли над нингидрином, затем над порошкообразным КОН; метанол перегоняли над метилатом магния, хлороформ и хлористый метилен над пятиокисью фосфора. Остальные растворители использовали после обычной очистки. Для колоночной хроматографии применяли силикагель Kieselgel 60 (Merck), для ТСХ – пластинки с флуоресцентным индикатором Kieselgel 60 F<sub>254</sub> и без индикатора Kieselgel 60 (Merck). Обнаружение при ТСХ: фосфорно-молибденовой кислотой (А), нингидрином (Б) и УФ-облучением (В). Метил-9-(4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)гептановую (II) и метил-9-(4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)нонановую (III) кислоты [5], сфингозин-1-фосфохолин (VI) [18], 1-*O*-β-*D*-галактозил-эритро-сфингозин (IX) [19], 3-*O*-сульфо-1-*O*-β-*D*-галактозил-эритро-сфингозин (X) [20], монометиловый эфир гексадекандиовой кислоты [21] и монохлорангидрид из него (использован без очистки) [5] были получены как описано ранее.

Масс-спектры снимали на MALDI-времяпролетном спектрометре UltraFlex (Bruker Daltonics, Германия): N<sub>2</sub>-лазер, 337 нм, матрица – 2,5-дигидроксibenзойная кислота, а также на ESI-времяпролетном спектрометре MX-5311 (ИАП РАН, СПб) с наноспрейной ионизацией. Электронные спектры веществ регистрировали на спектрофотометре СФ-256УВИ (ЛОМО Фотоника, СПб) в этаноле; спектры флуоресценции (в этаноле) – на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония).

**16-(4,4-Дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)гексадекандиовая кислота (IV).** Хлорангидрид монометилового эфира гексадекандиовой кислоты действием 2,4-диметилпиррола в сухом хлороформе в атмосфере аргона превращали в соответствующий дипиррометен, который в реакции с триэтиламино (подробное описание см. [5]) образовал метиловый эфир кислоты (IV), выделенный хроматографией в градиентной системе петролейный эфир–хлористый метилен в виде красного порошка, выход 27%, т. пл. 54–55°C, *R<sub>f</sub>* 0.18 (гексан–хлористый метилен, 4 : 6; А, В); УФ (в этаноле), 498 нм (ε ~ 9 × 10<sup>4</sup>); ESI-MS, *m/z*: 502.39 [*M*]<sup>+</sup>; 483.38 [*M* – F]<sup>+</sup>; 525.36 [*M* + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 1.25 (18 H, м, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>), 1.49 (2 H, м, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.62 (4 H, м, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.30 (2 H, м, COCH<sub>2</sub>), 2.42 (6 H, с, CCH<sub>3</sub>), 2.51 (6 H, с, CCH<sub>3</sub>), 2.93 (2 H, т, CCH<sub>2</sub>), 3.68 (3 H, м, OCH<sub>3</sub>), 6.05 (2 H, с, аром.).

Метиловый эфир кислоты (IV) омыляли 0.1 М КОН в водном изопропанол в атмосфере аргона [5], с выходом ~90% получали кислоту (IV) в виде аморфного порошка, индивидуального хроматографически, *R<sub>f</sub>* ~ 0.6 (бензол–этилацетат–AcOH, 80 : 19 : 1; А, Б, В), который использовали далее без дополнительной очистки.

***N*-[7-(4,4-Дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)гептаноил]сфингозин (V).** К раствору 4 мг (10.9 мкмоль) 7-(Me<sub>4</sub>-BODIPY-8)гептановой кислоты (II) и 5 мкл *i*Pr<sub>2</sub>EtN в 0.5 мл сухого CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> прибавляли BOP (5 мг), перемешивали 2 ч при 20°C, затем добавляли раствор 4 мг (11.5 мкмоль) сфингозина в 0.5 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и 5 мкл *i*Pr<sub>2</sub>EtN; смесь перемешивали 2 ч и оставляли на ночь. После упаривания смеси, из остатка хроматографией на силикагеле в системе хлороформ–метанол (0.5 → 3%) выделяли 3.5 мг (49%) церамида (V) в виде красной аморфной массы, *R<sub>f</sub>* ~ 0.4 (хлороформ–метанол, 19 : 1; А, Б, В), ESI-MS, *m/z*: 658.34 [*M* + H]<sup>+</sup>; 638.33 [*M* – F]<sup>+</sup>; 681.31 [*M* + Na]<sup>+</sup>.

***N*-[9-(4,4-Дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)нонаноил]сфингозин-1-фосфохолин (VII).** 5.5 мг (13.6 мкмоль) 9-(Me<sub>4</sub>-BODIPY-8)нонановой кислоты (III) обрабатывали 6.5 мг BOP и 7 мкл *i*Pr<sub>2</sub>EtN (см. выше); полученный раствор и 5 мкл *i*Pr<sub>2</sub>EtN добавляли к суспензии 6 мг (12.4 мкмоль) сфингозин-1-фосфохолина (VI) в 0.8 мл смеси хлороформ–*i*PrOH–THF, 2 : 1 : 3, перемешивали 2 ч и оставляли на ночь. Из смеси хроматографией на силикагеле в градиентной системе хлороформ–метанол с 1.5% воды (10 → 30%) выделяли 5 мг (43%) сфингомиелина (VII) в виде красной аморфной массы, *R<sub>f</sub>* ~ 0.4 в системе хлороформ–метанол–4 М NH<sub>4</sub>OH, 65 : 35 : 8 (А, Б, В, молибденовый синий), вещество имеет одинаковую с природным сфингомиелином хроматографическую

подвижность. ESI-MS,  $m/z$ : 850.82  $[M]^+$ ; 851.82  $[M + H]^+$ ; 873.80  $[M + Na]^+$ .

***N*-[9-(4,4-Дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)нонаноил]-1β-*O*-β-*D*-галактозилсфингозин (XI).** 5 мг (12.4 мкмоль) 9-(Me<sub>4</sub>-BODIPY-8)нонаноной кислоты (III) обрабатывали 6 мг BOP и 6 мкл *i*Pr<sub>2</sub>EtN (см. выше); раствор и 5 мкл *i*Pr<sub>2</sub>EtN смешивали с раствором 5.5 мг (11.9 мкмоль) 1-*O*-β-*D*-галактозилсфингозина (IX) в 1 мл THF, оставляли на ночь. Из смеси хроматографией на силикагеле в системе хлороформ–метанол (5 → 20%) выделяли 4.5 мг (45%) галактозилсфингозида (XI) в виде красной аморфной массы,  $R_f \sim 0.6$  в системе хлороформ–метанол–AcOH, 78 : 20 : 3 (А, Б, В); вещество имеет одинаковую с природным галактозилсфингозином хроматографическую подвижность. ESI-MS,  $m/z$ : 847.75  $[M]^+$ ; 829.76  $[M - F + H]^+$ ; 848.78  $[M + H]^+$ ; 870.77  $[M + Na]^+$ .

***N*-[16-(4,4-Дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)гексадеканойл]-1β-*O*-β-*D*-галактозилсфингозин (XII)** получали, как описано для аналога (XI), исходя из 9 мг (18.4 мкмоль) 15-(Me<sub>4</sub>-BODIPY-8)гексадекановой кислоты (IV) и 10 мг (21.7 мкмоль) 1-*O*-β-*D*-галактозилсфингозина (IX), выход 10 мг (58%). Красная аморфная масса,  $R_f$  0.65 в системе хлороформ–метанол–AcOH, 78 : 20 : 3 (А, Б, В), ESI-MS,  $m/z$ : 932.51  $[M + H]^+$ , 912.57  $[M - F]^+$ , 954.47  $[M + Na]^+$ , 994.30  $[M + Cu]^+$  (источником ионов меди была, по-видимому, игла шприца Hamilton, применявшегося для введения пробы в масс-спектрометр).

**3-*O*-Сульфо-*D*-галактозил-β1-1'-*N*-[7-(4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)гептаноил]-эритро-сфингозин (XIII).** 7.5 мг (20 мкмоль) 7-(Me<sub>4</sub>-BODIPY-8)гептаноной кислоты (II) обрабатывали 9.5 мг (21.4 мкмоль) BOP и 10 мкл *i*Pr<sub>2</sub>EtN в 0.5 мл сухого CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, через 2 ч к раствору прибавляли раствор 8.2 мг (15.1 мкмоль) 3-*O*-сульфо-1-*O*-β-*D*-галактозил-эритро-сфингозина (X) и 10 мкл *i*Pr<sub>2</sub>EtN в 0.6 мл смеси CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–THF, 1 : 1, контролируя ход реакции ТСХ в системе хлороформ–метанол–AcOH, 78 : 20 : 3 (А, В). Через сутки смесь упаривали в вакууме, из остатка двухкратной хроматографией на силикагеле в градиентной системе хлороформ–метанол–вода–AcOH, 92 : 3 : 5 (5 → 15%) выделяли сульфатид (XIII), в виде хроматографически индивидуального красного аморфного вещества с  $R_f$  0.25 в системе хлороформ–метанол–AcOH, 78 : 20 : 3 (А, Б, В), выход 7 мг (46%). MALDI-MS,  $m/z$ : 944.52  $[M - H + 2Na]^+$ ; 960.48  $[M - H + Na + K]^+$  (величина  $M$ , 899.495, рассчитана для протонированной формы).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность И.В. Назимову (ИБХ РАН) за съемку ESI-масс-спектров.

Работа поддержана грантами № 09-04-00313 и 09-04-90423 Российского фонда фундаментальных исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnson I.D., Kang H.C., Haugland R.P. // *Anal. Biochem.* 1991. V. 198. P. 228–237.
2. Loudet A., Burgess K. // *Chem. Rev.* 2007. V. 107. P. 4891–4932.
3. Gonçalves M.S.T. // *Chem. Rev.* 2009. V. 109. P. 190–212.
4. Marks D.L., Bittman R., Pagano R.E. // *Histochem. Cell Biol.* 2008. V. 130. P. 819–832.
5. Boldyrev I.A., Molotkovsky J.G. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2006. V. 32. P. 78–84 (Болдырев И.А., Молотковский Ю.Г. // *Биоорганическая химия.* 2006. Т. 32. С. 87–92).
6. 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.
7. Omelkov A.V., Pavlova Yu.B., Boldyrev I.A., Molotkovsky J.G. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2007. V. 33. P. 505–510 (Омельков А.В., Павлова Ю.Б., Болдырев И.А., Молотковский Ю.Г. // *Биоорганическая химия.* 2007. Т. 33. С. 544–549).
8. Zhai X., Boldyrev I.A., Momsen M.M., Mizuno N.K., Molotkovsky J.G., Brockman H.L., Brown R.E. // 50<sup>th</sup> Ann. Biophys. Soc. Meeting, Salt Lake City, UT, USA Feb. 18–22, 2006. / *Biophys. J.* 2006. V. 90. P. 275–Pos.
9. Болдырев И.А., Жай К., Браун Р., Молотковский Ю.Г. // XVIII зимняя молодежная научная школа “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”. Москва, 7–10 февр. 2006 г. Сб. тезисов. С. 17.
10. Brown R.E., Mattjus P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1771. P. 746–760.
11. Ramstedt B., Slotte J.P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1758. P. 1945–1956.
12. Ипатова О.М., Торховская Т.И., Захарова Т.С., Халилов Э.М. // *Биохимия.* 2006. Т. 71. С. 588–593.
13. Marks D.L., Robert Bittman R., Pagano R.E. // *Histochem. Cell. Biol.* 2008. V. 130. P. 819–832.
14. Duffin G.R., Ellames G.J., Hartmann S., Herbert J.M., Smith D.I. // *J. Chem. Soc. PT 1.* 2000. P. 2237–2242.
15. Zhai X., Boldyrev I.A., Pike H.M., Molotkovsky J.G., Brown R.E. // Abstract of a poster at 51<sup>th</sup> Annual Biophysical Society Meeting, Baltimore MD, March, 2007 / *Biophys. J.* 2007. Supplement. P. 431a. Abstract 2067-Pos.
16. Galkina S.I., Romanova J.M., Stadnichuk V.I., Pushkareva M.A., Molotkovsky J.G., Sud'ina G.F. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2009. V. 56. P. 162–171.
17. Galkina S.I., Stadnichuk V.I., Molotkovsky J.G., Romanova J.M., Sud'ina G.F., Klein T. // *Cell Adhesion & Migration.* 2010. V. 4. P. 32–38.
18. Stoffel W., Assmann G. // *Z. Physiol. Chem.* 1972. V. 353. P. 65–74.
19. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В., Молотковский Ю.Г., Батраков С.Г., Барсуков Л.И., Проказова Н.В. Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981. С. 202–203.
20. Koshy K.M., Boggs J.M. // *Lipids.* 1982. V. 17. P. 998–1000.
21. Sobotka H., Stynler F. // *J. Am. Chem. Soc.* 1950. V. 72. P. 5139–5143.

## New 4,4-Difluoro-3*a*,4*a*-Diaza-*s*-Indacene (BODIPY) Labeled Sphingolipids for Membrane Studies

I. A. Boldyrev, J. 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*

The synthesis of a series of new fluorescence labeled sphingolipids containing 4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3*a*,4*a*-diaza-*s*-indacene-8-yl (Me<sub>4</sub>-BODIPY-8) group at ω-position of a fatty acyl residue is described. The obtained probes were used in studies of biological and model membrane systems.

*Key words: fluorescent lipid probes; BODIPY; synthesis; membrane studies*