



УДК 577.07:535.372

СИНТЕЗ НОВЫХ ЖЕСТКИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БИХРОМОФОРНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ДОНОР-ДОНОРНОЙ МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ (DDEM)

© 2005 г. И. А. Болдырев, Юл. 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

Поступило в редакцию 29.12.2004 г. Принято к печати 13.01.2005 г.

Для совершенствования метода DDEM (донор-донорная миграция возбуждения) синтезированы три новых бихромофорных флуоресцентных зонда, имеющих каждый две идентичные флуоресцентные 7-диэтиламинокумарин-3-илкарбонильные группы, присоединенные через дополнительные вставки к бистероиду, жесткому декациклическому спейсеру. Вставками служат остатки β-аланина и L-серина, что создает неодинаковое ближайшее окружение флуорофоров; третий зонд имеет одинаковые β-аланиновые вставки.

Ключевые слова: флуоресцентные бихромофорные зонды; DDEM; спектры флуоресценции; синтез.

Ранее мы сообщали [1, 2] о синтезе ряда флуоресцентных бихромофорных зондов, предназначенных для изучения процессов миграции энергии возбуждения между флуорофорами в модельных системах (см. обзор [3]).

Развитие метода донор-донорной миграции энергии (DDEM) потребовало рассмотрения условий, в которых энергия мигрирует между флуорофорами, находящимися в различном окружении; именно такие ситуации имеют место в большинстве биологических и модельных систем. В таких асимметричных (с точки зрения фотофизики) системах миграция энергии частично обратима, для ее описания была предложена модель частичной донор-донорной миграции энергии (partial donor-donor energy migration, PDDEM) [4]. С использованием этой модели и синтезированных зондов [1, 2] были измерены мембранные параметры, в частности толщина липосомного бислоя, в котором по разные его стороны находились одинаковые (роданильные или флуоресценцильные) флуорофоры [5, 6].

Для дальнейшего усовершенствования метода PDDEM требуются усложненные бифлуорофорные зонды, в которых один и тот же флуорофор изначально находится в двух разных окружениях, т.е. в соседстве с группировками разной полярности.

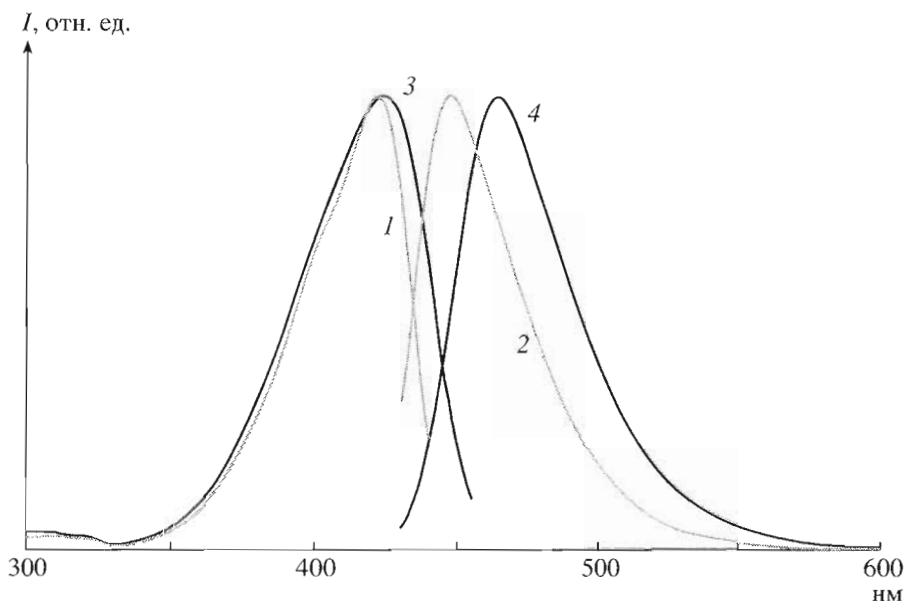
Сокращения: BOP – (бензотриазол-1-илокси)-трис(диметиламино)фосфоний; DEAC – 7-диэтиламинокумарин-3-карбонильная кислота; DDEM – донор-донорная миграция энергии (donor-donor energy migration); PDDEM – частичная донор-донорная миграция энергии (partial donor-donor energy migration).

[#]Автор для переписки (тел./факс: (095) 330-6601; эл. почта: jgmoi@ibch.ru).

Исследуя PDDEM в таких зондах, погруженных в различные среды, можно более точно установить закономерности изучаемого явления.

В настоящем сообщении описан синтез таких зондов (см. схему). Соединения (VII) и (VIII) имеют по два одинаковых флуорофора, остатка 7-диэтиламинокумарин-3-карбонильной кислоты (DEAC), присоединенных к аминогруппам разных промежуточных вставок – остатков β-аланина (в обоих зондах) и O-ацетилсерина (в зонде (VII)) или серина (в зонде (VIII)), в свою очередь, расположенных по двум противоположным сторонам жесткой декациклической системы, так называемого бистероида [7]. Таким образом, в этих соединениях одинаковые флуорофоры имеют разное ближайшее окружение, создаваемое дополнительной ацетокси-(VII) или гидроксигруппой (VIII). Кроме того, в качестве стандарта сравнения был получен зонд (V), в котором оба флуорофора, присоединенные к β-аланиновым вставкам, находятся в одинаковом окружении (строго говоря, некоторые отличия имеются и здесь, поскольку молекула бистероида асимметрична в центральной своей части, но эти отличия столь незначительны, что не сказываются на фотофизических свойствах флуорофоров [1]).

Выбор остатка DEAC в качестве флуорофора был обусловлен тем, что DEAC легко ацилирует аминогруппы; при этом у производных сохраняется хороший квантовый выход [8]. Параметры флуоресценции группы, как и у большинства других полярных флуорофоров, весьма чувствительны к полярности окружения. Кроме того, положение максимума возбуждения производных (420–425 нм)



Спектры возбуждения (1, 3) при $\lambda_{\text{em}} 465$ нм и испускания (2, 4) при $\lambda_{\text{ex}} 415$ нм зонда (VIII) в хлороформе (1, 2) и этаноле (3, 4) концентрации ~ 1 мкМ; температура 20°C.

бить для этой цели гидразинолиз, с успехом применяемый для дезацетилирования в углеводной химии, было невозможно из-за присутствия в спейсере кетогруппы. Использование метанола с карбонатом калия не дало высокой избирательности алкоголиза именно ацетоксигруппы; метанолиз привел к заметному расщеплению сложноэфирных связей остатков β -аланина и серина с бистероидом; выход на этой стадии составил около 50%.

Следует отметить, что выделение DEAC-меченных соединений (V), (VII), (VIII) представляет известные трудности, поскольку эти вещества, будучи бис-третичными ароматическими аминами, требуют использования при хроматографии кислых элюентов, но такие элюенты, содержащие, например TFA, могут вызывать алкоголиз сложноэфирных связей. По этой причине мы не применяли для выделения зондов (V), (VII), (VIII) обращенно-фазовую хроматографию, а использовали прямую фазу и в качестве элюента смеси хлороформ–этилацетат– CH_3COOH .

Зонд (VII) был выделен в виде двух соединений, имевших близкую подвижность на прямой фазе (силикагеле), но идентичные по подвижности на обращенной фазе RP18; оба вещества имели почти идентичные спектральные характеристики (см. ниже). Полагаем, что эти соединения – стереоизомеры, возникшие при введении в молекулу зонда асимметрического остатка *L*-серина. Собственно, изомеров может быть четыре (бистероидный спейсер асимметричен), поэтому вопрос о строении выделенных изомеров зонда (VII) и их гомогенности остается пока открытым. Зонд (VIII)

был получен из одного выделенного изомера соединения (VII).

Строение полученных соединений было подтверждено данными масс-спектрометрии с бомбардировкой ускоренными атомами (FAB) и с химической ионизацией (CI), а также спектрами $^1\text{H-NMR}$. В последних важнейшим диагностическим показателем было соотношение между интенсивностями синглетных сигналов ангулярных метильных групп бистероида при δ 0.67 и 0.84 м. д., а также его *O*-метильной группы ($\delta \sim 3.30$) и отдельно стоящих сигналов ароматических протонов DEAC-группы в области δ 6.4–8.6 м. д. (в $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$).

УФ-спектры зондов (V), (VII), (VIII) в этаноле близки спектру DEAC, с тем, однако, отличием, что они сдвинуты в длинноволновую область: у всех зондов λ_{max} 420 нм, у кислоты – 392 нм (в этаноле). У всех трех зондов (V), (VII), (VIII) спектры возбуждения имеют как в неполярном растворителе (хлороформ), так и в полярном (этанол) один максимум при 422–425 нм (спектры 1 и 3, рисунк; приведены спектры зонда (VIII)), соответствующий максимуму спектра поглощения. Положение максимума спектра испускания зависит от полярности окружения: ~ 450 нм в хлороформе и ~ 465 нм в этаноле (спектры 2 и 4 соответственно). Эти параметры DEAC-зондов, а также удовлетворительный квантовый выход зондов (0.2–0.4; данные предварительные) позволяет предполагать, что зонды (V), (VII), (VIII) найдут должное применение в экспериментах для развития модели DDEM.

Работа поддержана грантами № 00-04-48416 и 03-04-48420 Российского фонда фундаментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grechishnikova I.V., Johansson L.B.-Å., Molotkovsky J.G. // *Chem. Phys. Lipids*. 1996. V. 81. P. 87–98.
2. Юхансон Л.Б.-А., Калинин С.В., Филатова К.А., Молотковский Ю.Г. // *Биоорган. химия*. 2003. Т. 29. С. 91–96.
3. Karolin J., Johansson L.B.-Å. // *Trends Phys. Chemistry*. 1997. V. 6. P. 171–185.
4. Bergström F., Hagglof P., Karolin J., Ny T., Johansson L.B.-Å. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 12477–12481.
5. Kalinin S.V., Molotkovsky J.G., Johansson L.B.-Å. // *Spectrochimica Acta A*. 2002. V. 58. P. 1087–1097.
6. Kalinin S.V., Molotkovsky J.G., Johansson L.B.-Å. // *J. Phys. Chem.* 2003. V. 107. P. 3318–3324.
7. Latt S.A., Cheung H.T., Blout E.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 1965. V. 87. P. 995–1003.
8. Haugland R.P. // *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Sixth Ed. / Ed. M.T.Z. Spence. Eugene (OR): Molecular Probes, 1996. P. 35–39.
9. Takechi H., Oda Y., Nishizono N., Oda K., Machida M. // *Chem. Pharm. Bull.* 2000. V. 48. P. 1702–1710.

A Synthesis of New Rigid Fluorescent Bichromophoric Probes for Studying Mechanisms of Donor–Donor Energy Migration

I. A. Boldyrev and Jul. G. Molotkovsky[#]

[#] Phone/fax: +7 (095) 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

Three new fluorescent probes were synthesized for improving the method of studying donor–donor energy migration (DDEM). Each probe has two identical fluorescent 7-diethylaminocoumarin-3-carbonyl groups attached to a rigid bisteroid dodecacyclic spacer through additional inserts. In two probes, the inserts are β -Ala and L-Ser residues, which provide for a different nearest environment of the fluorophores. The third probe has identical β -Ala inserts. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: DDEM, fluorescent bichromophoric probes, fluorescence spectra, synthesis