



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-донарная 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-донарной 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-донарной 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 (родаминильные или флуоресциильные) 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 полярно-

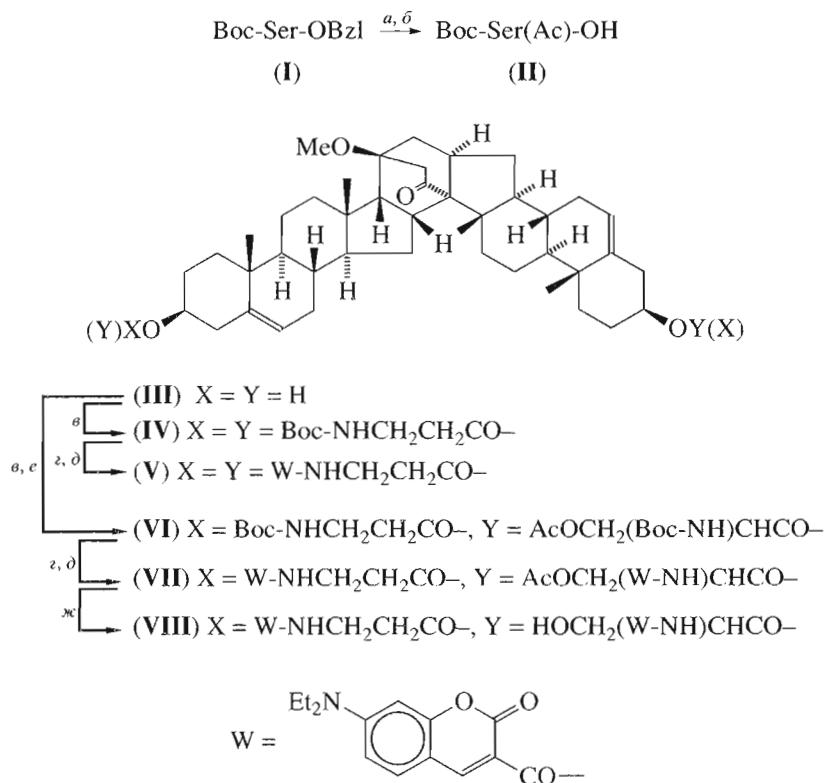
сти. Исследуя PDDEM в таких зондах, погруженных в различные среды, можно более точно установить закономерности изучаемого явления.

В настоящем сообщении описан синтез таких зондов (см. схему). Соединения (VII) и (VIII) имеют по два одинаковых флуорофора, остатка 7-диэтиламинокумарин-3-карбоновой 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)

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

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



a – Ac₂O/Et₃N; *b* – H₂/Pd; *c* – Bos-HN(CH₂)₂COOH/DCC/4-пирролидинопиридин; *d* – TFA; *e* – DEAC/BOP/EtPr₂N; *f* – (II)/DCC/4-пирролидинопиридин; *g* – K₂CO₃/MeOH.

позволяет применять DEAC-группу в качестве акцептора энергии возбуждения белковых флуорофоров, что расширяет возможности DEAC-зондов при изучении липид-белковых взаимодействий. В ряде лабораторий проводятся исследования модификации DEAC с целью создания новых флуорофоров и зондов на их основе (см. [9] и цитированную там литературу).

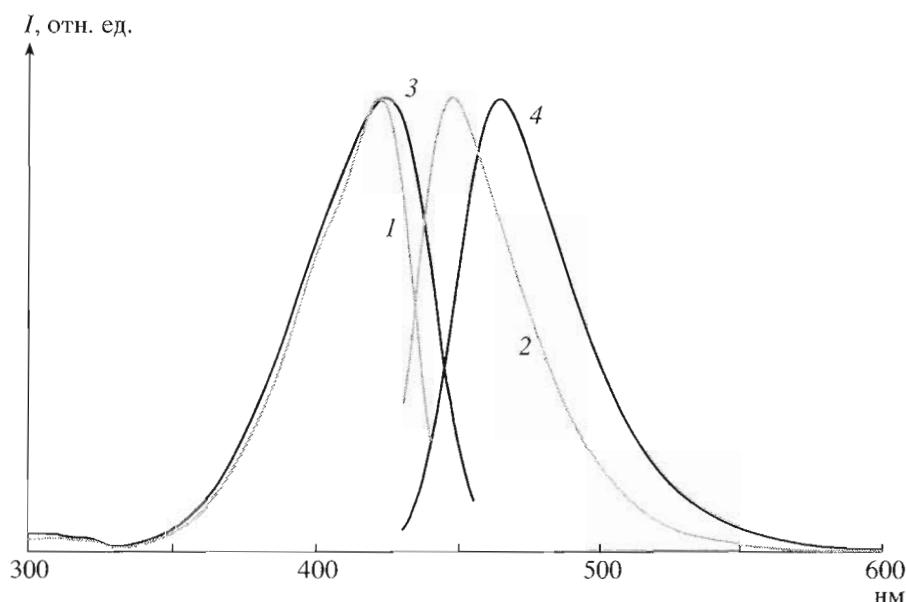
Расстояние между флуорофорами, непосредственно присоединенными к бистероиду, оценивается в ~ 20 Å [7]; введение дополнительных вставок – остатков β -аланина и серина – увеличивает указанное расстояние до ~ 30 Å (при вытянутой конформации зонда). Это значение близко к средней толщине мембранныного бислоя, поэтому при расположении бифлуорофорных зондов (V), (VII), (VIII) перпендикулярно бислою, оба флуорофора зонда должны будут находиться в зоне полярных головок по разные стороны мембраны. Ранее мы показали, что бихромофорный зонд, образованный неполярным спейсером и полярными флуорофорами, располагается именно таким образом [5].

Синтез DEAC-зондов был проведен классическими методами. При синтезе первого из них (**V**), бистероид (**III**) ацилировали *N*-Вос-β-аланином с

использованием карбодиимидного метода; в полученном диэфире (**IV**) Вос-защиту удаляли действием TFA и образовавшийся диамин ацилировали DEAC в присутствии конденсирующего реагента BOP (Fluka), методом, хорошо зарекомендовавшим себя при получении других флуоресцентных зондов [2] (схема).

Для синтеза двух других зондов (**VII**), (**VIII**) бензиловый эфир *N*-Boc-*L*-серина (**I**) (NovaBiochem) был превращен в *N*-Boc-*O*-Ac-*L*-серин (**II**) ацетилированием ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{Et}_3\text{N}$) и последующим гидрогенолизом над палладиевым катализатором в диоксане. Бистероид (**III**) сначала ацилировали, как описано выше, *N*-Boc- β -аланином (1.3 экв.). Выделенный из продуктов реакции моноэфир *N*-Boc- β -аланина и бистероида далее ацилировали производным серина (**II**). Полученный диэфир (**VI**) последовательным действием TFA и DEAC (Molecular Probes) с ВОР был превращен в зонд (**VII**), в котором ближайшее окружение одного из флуорофоров благодаря непосредственной близости ацетоксигруппы всегда отличается от окружения другого флуорофора.

Зонд (VIII) был получен из соединения (VII) основным метанолизом ацетоксигруппы. Употреб-



Спектры возбуждения (*1, 3*) при λ_{em} 465 нм и испускания (*2, 4*) при λ_{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 спайсере 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-меченых 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 спайсер 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 ^1H -ЯМР. 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*, рисунок; 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. // Биоорганическая 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