

ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И БЕЛОК-ЛИГАНДНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО РОТОРА НА ОСНОВЕ БОРДИПИРРОМЕТЕНА

Дудко А. Р

*Белорусский государственный университет;
chem.dudkoAR@gmail.com;*

науч. рук. — Хорецкий М. С.; Фалетров Я. В. — канд. хим. наук, доцент

Получено и охарактеризовано флуоресцентное производное бордипиррометена (8-фенил-4,4-дифторо-4-боро-3а,4а-диазо-5-индацен). Соединение представляет собой флуоресцентный молекулярный ротор (ФМР), параметры флуоресценции которого значительно зависят от показателей микроокружения. Рассмотрена зависимость интенсивности флуоресценции соединения от вязкости и состава среды при связывании его с белком бычьим сывороточным альбумином. Полученные данные важны для изучения ФМР на основе бордипиррометена и использования их в качестве флуорогенных зондов для анализа различных параметров сред, в том числе живых клеток.

Ключевые слова: BODIPY; молекулярный ротор; флуоресценция; альбумин; молекулярный докинг.

ВВЕДЕНИЕ

Производные бордипиррометена (BODIPY) являются известными флуорофорами для создания красителей, меток и зондов. Использование BODIPY обуславливается их оптическими свойствами, небольшими молекулярными размерами и приемлемой стабильностью в биологических средах [1]. Одним из применений BODIPY является получение на их основе флуоресцентных молекулярных роторов (ФМР), применяемых для анализа некоторых характеристик микроокружения молекул [2]. Фрагменты ФМР способны претерпевать свободное вращение относительно друг друга и, как правило, составляют единую систему сопряжения молекулы. Наличие такого свободного вращения заместителей понижает общую жёсткость системы и увеличивает вероятность безизлучательной релаксации, что влияет на величину квантового выхода флуоресценции (Φ). Нахождение ФМР в средах, способных влиять на внутримолекулярное вращение, оказывает эффект и на оптические свойства ФМР [3]. Это обуславливает интерес к ФМР, как к зондам, имеющим отклик на изменение таких параметров среды как вязкость, диэлектрическая проницаемость и т.д.

В данной работе получен и охарактеризован BODIPY ФМР, не содержащий дополнительных заместителей в структуре флуорофора. Рассмотрено влияние вязкости среды на интенсивность эмиссии флуоресценции ($I_{\text{фл}}$) соединения. Для оценки возможности применения такого BODIPY

ФМР в изучении белок-лигандных взаимодействий показана возможность его связывания с белком бычьим сывороточным альбумином (BSA), возможные сайты связывания предсказаны с помощью молекулярного докинга.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

Все реагенты поставлены Sigma Aldrich. Колоночная хроматография проводилась с использованием силикагеля с размером частиц 63-200 мкм в качестве стационарной фазы. Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) регистрировались на приборе Bruker Avance 500 MHz в дейтерохлороформе (CDCl_3). Спектры поглощения и эмиссии флуоресценции соединений записаны на спектрофлуориметре SOLAR CM2203.

Для титрования белок и лиганд были растворены в 1мМ фосфатном буфере с добавлением 5% N, N-диметилформамида. Кристаллическая структура BSA взята из базы данных белков RCSB Protein Data Bank (4f5s). Молекулярный докинг осуществлялся с помощью программного пакета MGLTools 1.5.6. и AutodockVina. Структура лиганда предварительно оптимизирована в программе ORCA 4.2.0 (PBE0, def2-TZVP). При определении Φ в качестве стандарта был использован раствор флуоресцина в 0,1 М NaOH (Φ 79%). В обсуждении $I_{\text{фл}}$ рассматривается как общая площадь под кривой эмиссии флуоресценции.

Синтез 8-фенил-4,4-дифторо-4-боро-3а,4а-диазо-S-индацена (1)

Соединение получено согласно литературной методике [4]. Выход реакции 13%. ^1H и ^{13}C ЯМР спектры соединения **1** содержат сигналы:

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7.95 (s, 2H), 7.64 – 7.48 (m, 5H), 6.94 (d, J = 4.2 Гц, 2H), 6.55 (d, J = 3.7 Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, CDCl_3) δ 147.51, 144.24, 135.08, 133.90, 130.89, 130.60, 128.56, 118.67.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Схема синтеза **1** представлена на рисунке 1. Для этого взаимодействием пиррола и бензальдегида в кислой среде был получен соответствующий фенилдипиррометан (**DIPY**), его окисление 2,3-дихлоро-5,6-дицианобензохиноном (DDQ) с последующей комплексацией эфиром трифторида бора позволило получить конечный ФМР **1**.

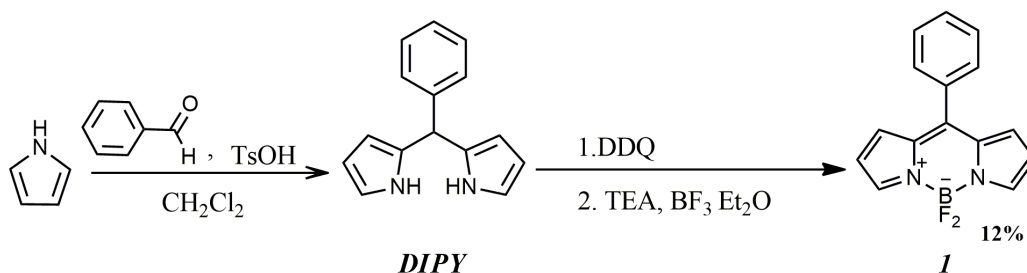


Рис. 1 Схема получения **1**

Для соединения **1** в этаноле установленное значение Φ составило 2,86%, а величина коэффициента молярной экстинкции при длине волны максимума поглощения $\epsilon_{499 \text{ нм}} = 56\,835 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Вместе с этим, полученный флуорофор не обладает ярко выраженным сольватохромизмом. При переходе от н-гексана к N,N-диметилформамиду максимум поглощения претерпевает гипсохромный сдвиг с 504 до 499 нм. Эмиссия флуоресценции изменяется схожим образом с 530 до 518 нм. Величины сдвигов Стокса для **1** также составляют небольшие значения.

Для молекулярных роторов подобной структуры ротация арильного заместителя относительно плоскости BODIPY является определяющим фактором параметров флуоресценции. Увеличение вязкости микроокружения затрудняет его свободное вращение, тем самым увеличивая значение Φ . Для изучения влияния данного фактора была установлена зависимость величины изменения $I_{\text{фл}}$ **1** в системе этанол-глицерин от динамической вязкости системы (η) (рисунок 2, А).

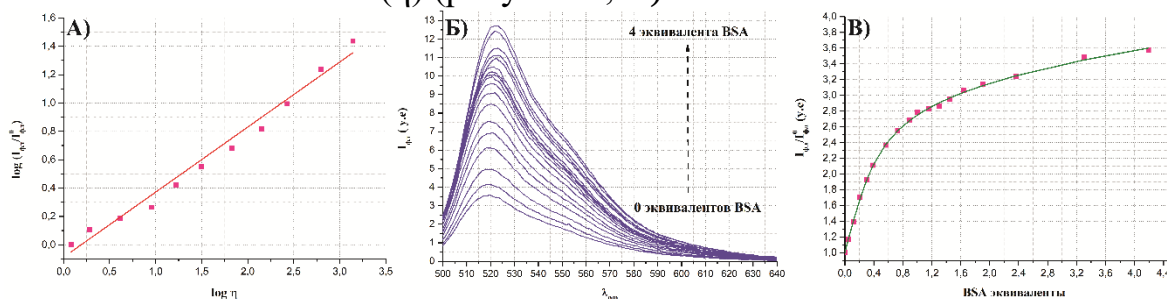


Рис 2. Полученные экспериментальные данные

(А) Зависимость логарифма отношения измеренной $I_{\text{фл}}$ к исходной $I_{\text{фл}}^0$ от логарифма вязкости среды. (Б) Спектры эмиссии флуоресценции **1** при различной концентраций BSA. (В) Кривая титрования **1** раствором BSA.

Соединение **1** не содержит в себе функциональных групп или атомов, одновременно способных специфически взаимодействовать с рассмотренным растворителем (например, образовывать водородные связи) и влиять на Φ . Группа BF_2 , в первую очередь, определяет дипольный момент соединения, и его сольватация напрямую не влияет на величину энергии барьера вращения фенильного заместителя относительно плоскости BODIPY. Это позволяет предположить, что изменение $I_{\text{фл}}$ при увеличении содержания

глицерина в первую очередь будет вызвано изменением вязкости среды. Данный факт полностью согласуется с полученными данными. При этом наблюдается линейная зависимость сопоставляемых величин. Тангенс угла наклона графика равен 0,49 и соответствует величине чувствительности флуоресценции **1** к изменению вязкости окружения.

Для изучения связывания между BSA и соединением **1** было проведено обратное титрование раствора **1**. Показано, что добавление в систему белка приводит к значительному увеличению $I_{\text{фл}}$ системы (рисунок 2, Б). При этом кривая титрования (рисунок 2, В) соответствует стехиометрии связывания два лиганда на субъединицу белка. Возможность связывания флуорофора в двух основных сайтах связывания BSA также подтверждена с помощью молекулярного докинга. Соединение **1** эффективно связывается в двух основных активных сайтах BSA (Sudlow sites DS1 и DS2). Значения свободных энергий связывания для первого и второго сайта составляют -9,4 и -8,5 ккал/моль соответственно. Для DS1 ближайшее окружение фенильного заместителя составляют остатки таких неполярных аминокислот как TYR149, LEU259, фрагмент BF2 стабилизирован водородной связью между гуанидиновым остатком ARG217 и атомами фтора **1**. Для DS2 ближайшее аминокислотное окружение составляют VAL408, LYS396 и LEU397 аналогично стабилизирующие связывание соединения **1** с белком.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что ФМР **1** может быть использован в качестве сенсора вязкости среды. При этом увеличение вязкости среды приводит к линейному увеличению интенсивности флуоресценции флуорофора. Обнаруженное связывание **1** с BSA позволяет рассматривать данное и схожие с ним соединения как потенциальные флуоресцентные инструменты для изучения различных параметров белок-лигандных взаимодействий.

Библиографические ссылки

1. Loudet A., Burgess K., BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties // Chemical Reviews. 2007. Vol. 107. P. 4891-4932.
2. López-Duarte I., A molecular rotor for measuring viscosity in plasma membranes of live cells / I. López-Duarte [et al.] // Chemical Communications. 2014. Vol. 50, № 40. P. 5282–5284.
3. Marfin Y. S., Fluorescent Properties of 8-phenylBODIPY in Ethanol – Ethylene Glycol Mixed Solutions / Y. S. Marfin [et al.] // Journal of Fluorescence. 2014. Vol. 24. P. 1613-1619.
4. Wagner R. W., Lindsey J. S. Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays / R. W. Wagner, J. S. Lindsey // Pure and Applied Chemistry. 1996. Vol. 68, №. 7. P. 1373-1380.