

Nitroxidok és diamágneses származékaik: szintézis és alkalmazás, biomolekulák spin és kettős (spin és fluoreszcens) jelölése

Kálai Tamás,^a Jekő József,^b Hideg Éva^c és Hideg Kálmán^{a*}

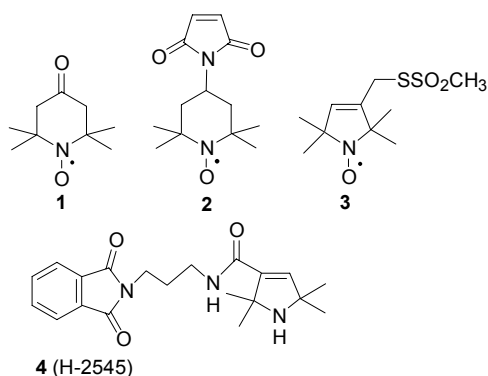
^aPTE ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet, Szigeti út 12, 7624 Pécs

^bNyíregyházi Főiskola Kémia Tanszék, Sóstói út 31/B, 4400 Nyíregyháza

^cMTA-SzBK Növénybiológiai Intézet, Temesvári krt. 62, 6727 Szeged

1. Bevezetés

A stabilis nitroxid szabad gyököket Rozantsev és munkatársai fedezték fel az 1960-as években. A triacetonamin oxidációjával a 4-oxo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxidhoz (**1**) jutottak. Ebből a vegyületből kiindulva számos öt- és hattagú nitroxid vegyület szintetizálható.¹ A nitroxidok legelső és máig legelterjedtebb alkalmazása a McConnell által bevezetett spinjelölés.² Ez azt jelenti, hogy a nitroxidokat a fehérjék módosításához használt funkciós csoporttal pl. maleimiddel látták el (**2**) és ezzel a paramágneses reagenssel kovalensen módosították a vizsgálni kívánt fehérjét. Az így módosított molekulát az elektron spin rezonancia készülék üregébe helyezve egy anizotróp tripllett jelet kaptak. Az anizotrópia mértékéből tudtak következtetni a jelölés helyének kis környezetének szerkezetére ill. tudták követni a bekövetkező konformációs változásokat. A nitroxidokat azóta számos területen alkalmazzák: kooxidánsként,³ reaktív szabad gyökök analitikájában,⁴ műanyagiparban⁵ és anyagtudományi kutatásokban is.⁶



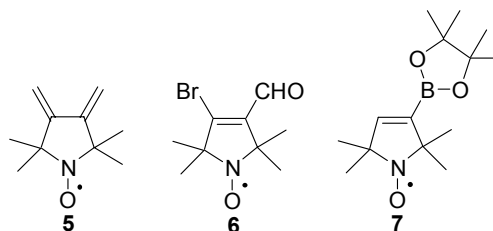
1. ábra. Korábban előállított spinjelzők és kardioprotektív kísérleti gyógyszer.

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán (korábban POTE) az 1970-es években Hideg Kálmán és Hankovszky Olga kezdett el foglalkozni a nitroxidok kémiájával. 1979-ben ők szervezték az első nemzetközi kongresszust ebben a tárgykörben. Az akkoriban szintetizált számos vegyület közül a cisztein oldalláncok reverzibilis módosítására alkalmas allilmetántiosulfonátot (**3**) vezették be⁷ és elsőik között vetették fel, hogy a nitroxidok ill. elővegyületeik a terápiában is hasznosak lehetnek. Az 1980-as években⁸ szintetizált pirrolin gyűrűt tartalmazó ftálimid-származék (**4**, H-2545), kardioprotektív és antiaritmiás szerként klinika II fázisig jutott (1. ábra).

Jelen közleményünkben az új spinjelző vegyületek és a kettősen (fluoreszcens és spin) jelölő vegyületek szintézise és vizsgálata területén végzett munkánk néhány eredményét mutatjuk be.

2. Új, spinjelző vegyületek szintézise

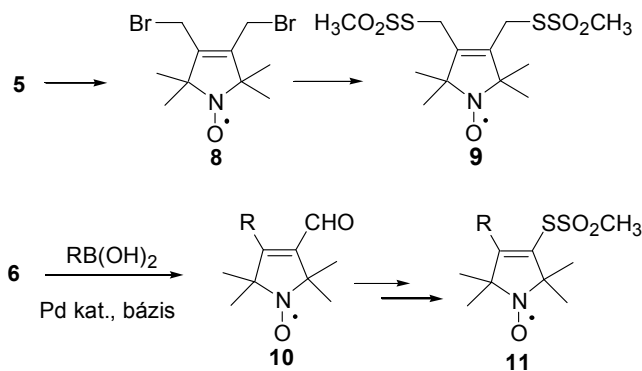
A **3** vegyület továbbfejlesztésének egyik lehetősége volt, hogy a pirrolingyűrű 4-es helyzetébe új szubsztituentet építünk be. Ehhez új kulcsvegyületeket szintetizáltunk, mint az **5** szimmetrikus paramágneses diént,⁹ **6** aldehidet¹⁰ és a **7** paramágneses boronsav észtert¹¹ (2. ábra).



2. ábra. Néhány paramágneses kulcsvegyület.

* Főszerző. Tel.:36-72-536-220; fax:36-72-536-219; e-mail: kalman.hideg@aok.pte.hu

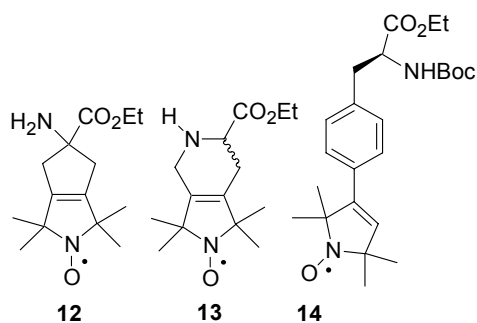
A szimmetrikus paramágneses diémből 1,4-brómaddícióval a **8** vegyületet, majd abból szubsztitúciós reakcióval a cisztein oldalláncok közötti keresztkötések kialakítására alkalmas **9** bisz-metántioszulfonátot állítottuk elő.⁹ A **6** aldehidet Suzuki-reakcióban boronsavakkal reagáltatva **10** aldehidhez jutottunk, amelyből többlépéses reakcióban kaptuk **11** metántioszulfonátokat (3. ábra).¹² Az így előállított vegyületekkel a Los Angelesi Egyetemen cisztein pontmutánsok vizsgálatára használták.^{13, 14}



R: Me, Ph, 2-furil, dodecil

3. ábra. 3,4-diszubsztituált pirrolingyűrűs spinjelző vegyületek szintézise.

A fehérjék módosításának lehetséges módja, hogy a peptidláncba paramágneses aminosavakat építünk be. Intézetünkben korábban is előállítottak O'Donnell-szintézissel paramágneses aminosavakat.¹⁵ Legutóbbi munkáinkban **12**, **13** rotációban gátolt oldalláncú aminosavakat¹⁶ ill. a fenilalanin paramágneses analogonját (**14**) állítottuk elő **7** boronsav észter és megfelelően védett *L*-tirozinból kiindulva vagy a racém vegyület rezolválásával^{17,18} (4. ábra).

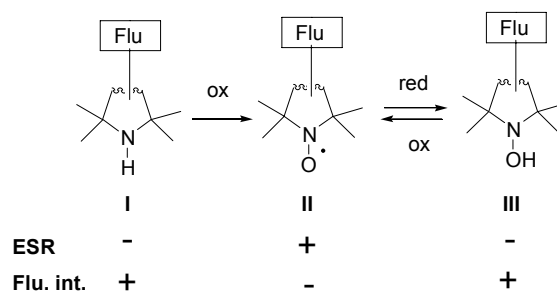


4. ábra. Új, paramágneses aminosavak

3. Új, kettős (spin és fluoreszcens) szenzorvegyületek szintézise és növényfiziológiai alkalmazása

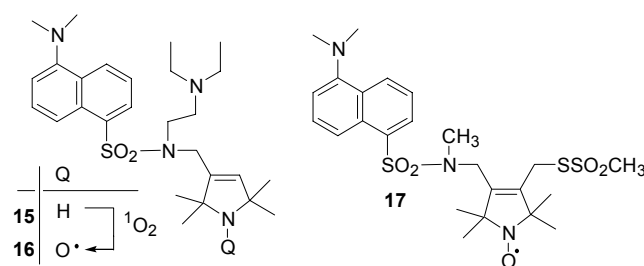
A stabilis nitroxid szabad gyökhöz (akceptor) kapcsolt fluorofór (donor) fluoreszcencia intenzitása lecsökken.¹⁹ Ezt a felismerést úgy fejlesztettük tovább, hogy nem a nitroxidhoz, hanem annak elővegyületéhez kapcsoltuk a fluorofórt. Ha az így kapott **I** vegyület nitroxiddá oxidálódik (**II**) a fluoreszcencia intenzitása lecsökken, viszont a szenzorvegyület ESR aktívvá válik, ha a nitroxid hidroxilaminná redukálódik (**III**) a szenzor vegyület ismét erősen fluoreszkál és az ESR jel intenzitása ismét

lecsökken (5. ábra). Mivel a redox folyamat két független biofizikai módszerrel (ESR és fluoreszcencia spektroszkópia) követhető, ezért a vegyületeket kettős szenzoroknak nevezzük.



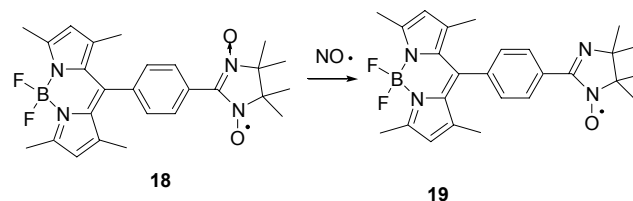
5. ábra. A kettős szenzor vegyületek működésének vázlatos elve.

A **15** vegyülettel (DanePy) dohány levélben a nagy intenzitású megvilágítás (pl. erős napfény) okozta stressz során a fotoszintetikus apparátusban keletkező, és ott oxidatív membrán károsodást kiváltó szingulett oxigén képződést sikerült *in vivo* kimutatni. A fény-stressz közben képző szingulett oxigén a szterikusán gátolt amint nitroxiddá (**16**) oxidálja, ezzel lecsökkentve a szenzor vegyület fluoreszcenciáját a levél kloroplasztiszaiban.²⁰



6. ábra. A DanePy (**15**) szerkezete és oxidációja a fény stressz közben termelődő szingulett oxigénnel és a fluoreszcens és spin jelölésre alkalmas **17** vegyület.

A fluoroforhoz kapcsolt nitroxidot reagáló funkció csoporttal kibővítve a **17**⁹ kettősen jelölő vegyülethez jutottunk, amely alkalmas a fehérjék hely- és funkcióspecifikus módosítására szimultán fluoreszcens- és spin-jelzéssel (6. ábra). A BODIPY fluorofór és a nitronil-nitroxid összekapcsolásával a nitrogen-monoxid kimutatására alkalmas vegyület (**18**) kaptuk. Amikor ez nitrogén-monoxid hatására **19** imino-nitroxiddá alakul mind a fluoreszcencia intenzitásában, mind az UV abszorpcióban, mind az ESR jel csatolásában változás következik be²¹ (7. ábra).



7. ábra. Nitrogén-monoxid detektálása **18** nitronil-nitroxid vegyülettel.

A spinjelzők és további kettősen jelölők szintéziséről egy közelmúltban megjelent összefoglaló közleményünkben is beszámoltunk.²²

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük az OTKA (T48334, T42951) valamint az OTKA-NKTH (K67597) támogatását. K. T. köszöni az Oktatási Minisztérium (Eötvös-ösztöndíj) az MTA (Bolyai-ösztöndíj) támogatását.

Hivatkozások

- Rozantsev, E. G. *Free Nitroxyl Radicals*, Plenum: New York, **1970**.
- Hubbell, W. L.; McConnell, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 314.
- Nerbouh, N.; Bobbit, J. M.; Brückner, C. *Org. Prep. Proced. Int.* **2004**, *36*, 1.
- Li, B. B.; Blough, N. V.; Gutierrez, P. L. *Free Rad. Biol. Med.* **2000**, *29*, 548.
- Abbasian, M.; Entezami, A. A. *Polymers for Adv. Technol.* **2007**, *18*, 306.
- Sugano, T.; Blundell, S. J.; Hayes, W.; Day, P. *Polyhedron* **2003**, *22*, 2343.
- Berliner, L. J.; Grünwald, J.; Hankovszky, H. O.; Hideg, K. *Anal. Biochem.* **1982**, *119*, 450.
- Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Bódi, I.; Frank, L. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1138.
- Kálai, T.; Balog, M.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **1999**, 973.
- Kálai, T.; Balog, M.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **1998**, 1476.
- Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8395.
- Kálai, T.; Balog, M.; Jekő, J.; Hubbell, W. L.; Hideg, K. *Synthesis* **2002**, 2365.
- Columbus, L.; Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K.; Hubbell, W. L. *Biochemistry* **2001**, *40*, 3828.
- Guo, Z.; Hideg, K.; Kálai, T.; Cascio, D.; Hubbell, W. L. *Protein Sci.* **2007**, *16*, 1069.
- Lex, L.; Hideg, K.; Hankovszky, H. O. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1448.
- Balog, M.; Kálai, T.; Jekő, J.; Berente, Z.; Steinhoff, H.-J.; Engelhard, M.; Hideg, K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9213.
- Balog, M.; Kálai, T.; Jekő, J.; Steinhoff, H.-J.; Engelhard, M.; Hideg, K. *Synlett* **2004**, 2591.
- Kálai, T.; Schindler, J.; Balog, M.; Fogassy, E.; Hideg, K. *Tetrahedron* (in press).
- Vogel, V. R.; Rubtsova, E. T.; Likhentein, G. I.; Hideg, K. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1994**, *83*, 229.
- Hideg, É.; Kálai, T.; Hideg, K.; Vass, I. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11405.
- Kálai, T.; Hideg, K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10352.
- Hideg, K.; Kálai, T.; Sár, P. C. *J. Heterocyclic Chem.* **2005**, *42*, 437.

Nitroxides and their diamagnetic derivatives: synthesis and application. Spin and double (spin and fluorescent) labeling of biomolecules.

Since their discovery in the 1960's¹, stable free nitroxide radicals have been applied extensively, in a large variety of roles, such as spin labels², co-oxidants³, spin traps⁴, mediators of free radical polymerization⁵ and paramagnetic building blocks.⁶ In our laboratory we started to deal with nitroxides four decades ago. The most important compounds were compound **3**⁷ as a SH-specific spin label and compound **4** as a cardioprotective agent.⁸ In the recent years we have synthesized new, 3,4-disubstituted pyrroline nitroxide based spin labels **9**, **11**¹²⁻¹⁴ starting from **5**, **6** and **7** and as key compounds.^{9,10} As another approach for of protein modification amino acids, paramagnetic amino acids can be incorporated into the peptide chain. For this purpose, we have synthesized several paramagnetic amino acids with side chains featuring a variety of size, polarity and flexibility. (**12-14**).¹⁶⁻¹⁸

Fluorophores respond to the attachment of nitroxides by quenching their fluorescence. Consequently, attaching a pre-nitroxide to a fluorophore yields the highly fluorescent compound **I**, capable of yielding a paramagnetic, EPR active compound **II** with low fluorescence upon oxidation of the sterically hindered amine. However, the nitroxide might be reduced to hydroxylamine **III** exhibiting high fluorescence again. These compounds, the so called double sensors, allow following the redox processes both by fluorescence spectroscopy and by EPR. This idea was used utilized detect singlet oxygen *in vivo*, in leaves by compound **15** which is oxidizable to compound **16** with decreased fluorescence intensity.²⁰ This compound was also improved by "supplying" the nitroxide ring with a reactive group giving compound **17** capable of simultaneous spin and fluorescent labeling of the same site of a protein. The combination of nitronyl nitroxide with a BODIPY dye affords **18** sensor for detection of NO.²¹