



УДК 577.07:535.372

НОВЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БИХРОМОФОРНЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ДОНОР-ДОНОРНОЙ МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ (DDEM)

© 2003 г. Л. Б.-А. Юхансон*, С. В. Калинин*, К. А. Филатова**, Ю. Г. Молотковский***

* Университет г. Умео, Умео, Швеция;

** Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 11.12.2001 г. Принята к печати 26.02.2002 г.

Для исследования закономерностей миграции энергии возбуждения между двумя одинаковыми флуорофорами синтезированы три новых флуоресцентных зонда, несущие каждый по две одинаковые метки – дансильные, 7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ильные (NBD) или флуоресцеинильные. Разделителями служат жесткая цепь бис(8-аминооктиламида) 4,4'-бифенилдикарбоновой кислоты или более гибкая дотриаконтандиовая кислота, обеспечивающие внутримолекулярную миграцию энергии между флуорофорами на расстояниях 3.2–3.5 нм.

Ключевые слова: флуоресцентные бихромофорные зонды; DDEM; синтез.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение строения биологических объектов и процессов в них путем введения в них двух одинаковых флуорофоров и измерения миграции энергии возбуждения между ними (donor-donor energy migration, DDEM) – сравнительно новый метод в биохимических и биофизических исследованиях, однако у него, по-видимому, хорошие перспективы (см. обзор [1]). Метод особенно удобен при изучении сложных молекул (белки, сложные липиды, смешанные биполимеры): он требует введения двух одинаковых флуорофоров в определенные участки молекул, что несравненно проще и удобнее, чем введение двух разных группировок, необходимых в случае применения обычного метода переноса энергии возбуждения (FRET, fluorescence resonance energy transfer) – см. обзор [2]. С помощью метода DDEM были получены новые интересные результаты при изучении структуры белков [3]. Однако, чтобы расширить применение метода, нужны дальнейшие исследования – поиск подходящих флуоресцентных групп, углубленный теоретический анализ для определения расстояний между флуорофорами, проявляющими неодинаковые фотофизические свойства. Последнее может быть результатом локальных раз-

личий в химическом окружении разных участков биомакромолекулы. Недавно была разработана расширенная теоретическая модель метода, который определен как частичная донор-донорная миграция энергии (partial donor-donor energy migration, PDDEM) [4]. Тщательная проверка положений теории требует дальнейших экспериментов, прежде всего с помощью модельных соединений.

Ранее с этой целью мы синтезировали ряд модельных бифлуорофорных зондов, в которых два одинаковых флуорофора – 9-антрильные, 3-периленильные или родаминильные 101 остатки – разделены алифатической цепью C₃₂ или системой сопряженных колец [5]. Эти зонды были применены для исследования закономерностей процесса DDEM [6, 7]. Для дальнейшего расширения этих исследований мы предприняли синтез еще трех подобных зондов, в которых по концам протяженной молекулы-разделителя помещены два одинаковых флуорофора: дансильные, 7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ильные (NBD) или флуоресцеинильные. Выбор именно этих группировок был обусловлен тем, что их флуоресцентные параметры зависят от свойств ближайшего окружения, что отвечает целям планируемых исследований. В качестве разделителей были применены бис(8-аминооктиламид) 4,4'-бифенилдикарбоновой кислоты (II) или дотриаконтандиовая кислота (VI) (схема). Описание этого синтеза, а также некоторые флуоресцентные свойства полученных зондов составляют предмет настоящего сообщения.

Сокращения: дансил (Dns) – 5-диметиламино-1-нафталинсульфонил; BOP – (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфоний; DDEM – донор-донорная миграция энергии (donor-donor energy migration); NBD – 7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил.

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

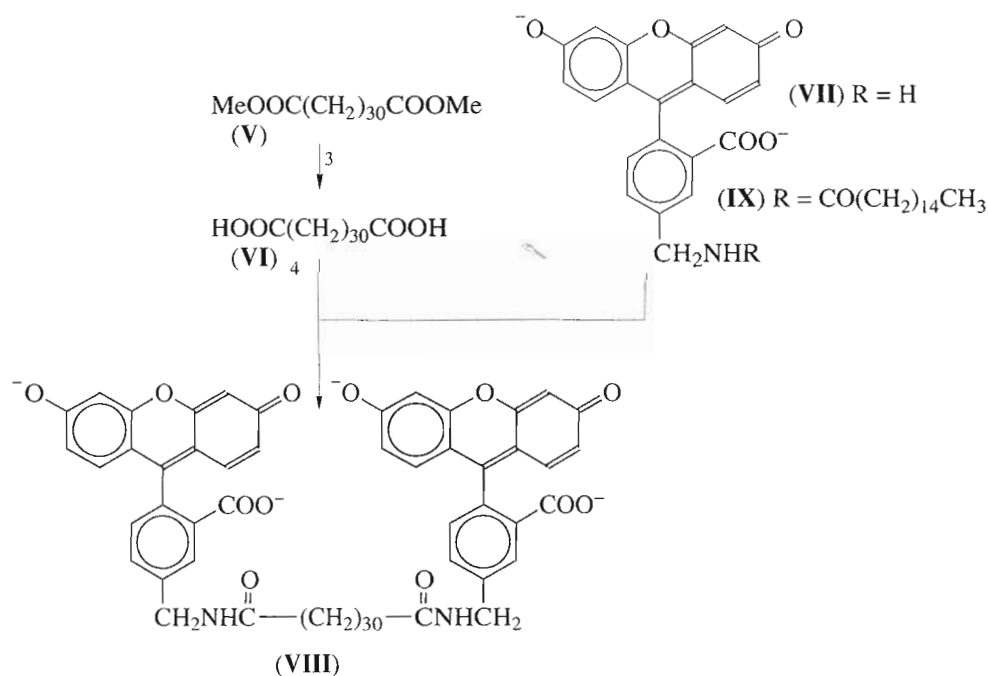
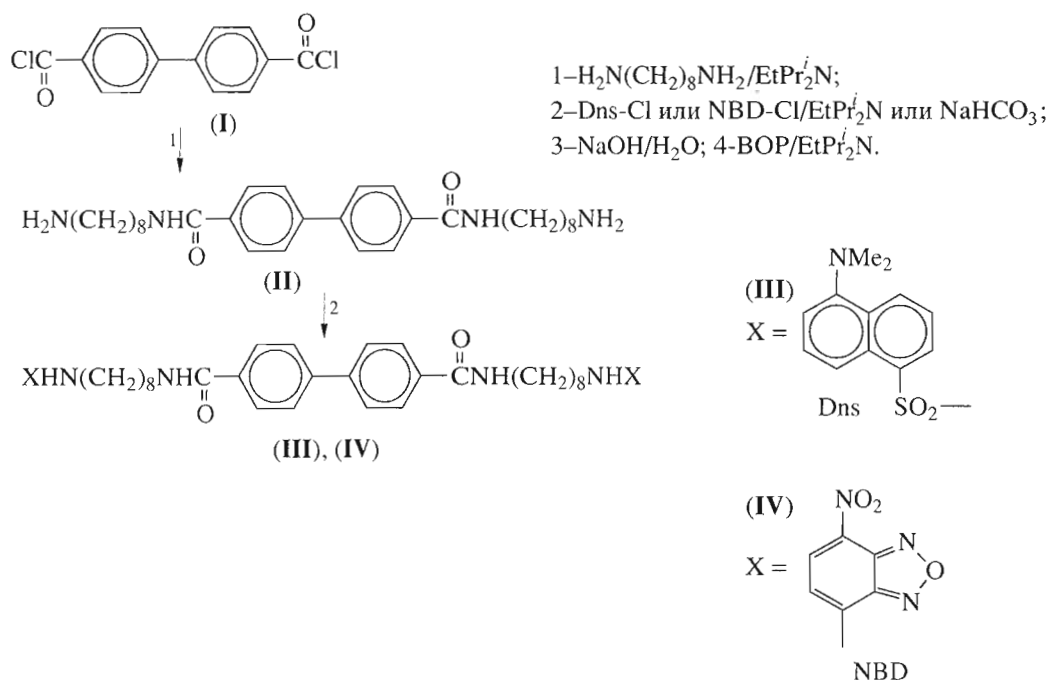
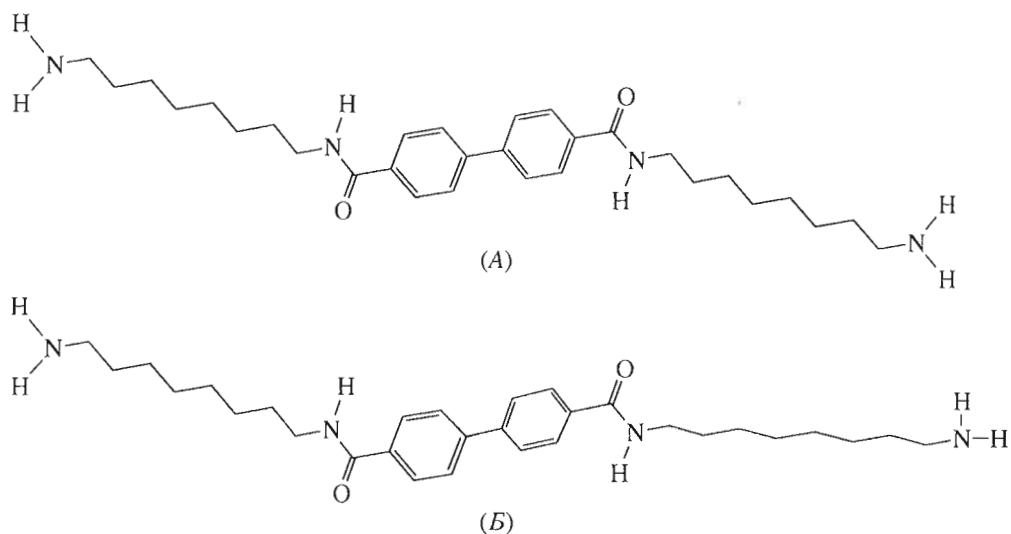


Схема.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве флуорофоров описанных здесь зондов, предназначенных для DDEM-исследований, были выбраны группировки, чьи флуоресцентные характеристики зависят в значительной степени от свойств окружающей среды – полярности (дансил, NBD), способности образовывать водородные связи (NBD), от pH (флуоресцеинил) [8].

Для зондов с дансильными и NBD флуорофорами в качестве разделителя был взят ω, ω' -бисдиамин (II), полученный реакцией дихлорангидрида 4,4'-бифенилдикарбоновой кислоты (I) с избытком октаметиленамина. Входящий в среднюю часть разделителя остаток бифенилдикарбоновой кислоты представляет собой жесткий стержень, и предварительные расчеты (см. “Эксперимент. часть”) показывают, что в молекуле разде-



Разделитель (II) в наиболее устойчивых вытянутых конформациях (A) и (B).

лителя (II) концевые аминогруппы расположены на расстоянии около 3.3 нм при наиболее вытянутой устойчивой конформации октаметиленовых цепей (рисунок, A); в другой устойчивой конформации (рисунок, B) это расстояние равно 3.2 нм. При этом группировки, присоединенные к концам такого разделителя, оказываются фиксированными более определенным образом, с меньшей возможностью сближения, чем это допускает алифатическая цепь 1,32-дотриаконтандиола в DDEM-зондах, ранее описанных нами [5], или цепь дотриаконтандионовой кислоты (см. ниже). Из диамина (II) реакцией с дансилхлоридом или 4-хлор-7-нитробенз-2,1,3-оксадиазолом были получены бисдансильное (III) и бис-NBD (IV) производные соответственно.

Зонд (VIII) с двумя флуоресцеиновыми флуорофорами имеет в качестве разделителя алифатическую цепь дотриаконтандионовой кислоты (VI), подобно синтезированному ранее [5] бисродаминильному зонду на основе 1,32-дотриаконтандиола. Насыщенная цепь последнего или дикислоты (VI) должна иметь большую подвижность, чем разделитель (II), однако преобладающая конформация подобных соединений (болаамфифилов), имеющих полярные группировки на концах алифатической цепи, – вытянутая, особенно в мембранах [9]. Кроме того, полностью гидрофобная цепь разделителя способствует тому, что бифлуорофорный зонд на его основе при введении в бислой располагается преимущественно перпендикулярно к нему, что было показано для упомянутого выше бисродаминил-1,32-дотриаконтандиола [6]; такая локализация зонда расширяет возможности DDEM-экспериментов. Концевые группировки полностью вытянутой алифатической цепи C_{32} оказываются разнесенными на рас-

стояние около 3.5 нм [6]. Наши предварительные данные показывают, что зонд (VIII) в липидном бислое располагается перпендикулярно последнему.

Дикарбоновая кислота (VI) была получена из ее диметилового эфира (V) [5] омылением NaOH при нагреве в водном изопропанол; надо отметить, что она отличается низкой растворимостью в большинстве органических растворителей. Весьма низкой оказалась и реакционная способность кислоты (VI): получить из нее диамид (VIII) с 5-(α -аминометил)флуоресцеином (VII) по одному из классических методов – через активированный бис-*n*-нитрофениловый эфир – удалось лишь с низким выходом, не более 6% (данные не приведены).

Более приемлемый выход был достигнут при активировании карбоксиллов (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфонием (BOP); этот эффективный активирующий агент, уже более десятилетия широко применяемый в пептидной химии, оказался весьма удобным конденсирующим реагентом и в липидных синтезах [10]. Но и в этом случае получение активированного эфира дикарбоновой кислоты и реакция его с аминокислотным флуоресцеином протекали намного медленнее (см. “Эксперимент. часть”), чем это описано для ацилирования сфингозина [10]; выход бифлуорофорного зонда (VIII) составил 22%.

Для выявления при спектральных исследованиях деталей взаимодействия обоих флуорофоров зонда (VIII) потребовался, в качестве стандарта сравнения, также его близкий аналог с одним флуорофором, поэтому мы получили из аминокислотного флуоресцеина (VII) его *N*-пальмитоильное производное (IX). Это вещество представляет собой как бы половину зонда (VIII); его синтез был

проведен традиционным методом – путем ацилирования амина (VII) пальмитоилхлоридом в присутствии основания в водном THF.

Спектры поглощения и флуоресценции синтезированных зондов вполне соответствуют параметрам описанных ранее зондов с теми же флуорофорами. При этом как и ожидалось, величины молярного поглощения в максимумах бихромофорных зондов (III), (IV) и (VIII) (см. “Эксперимент. часть”) примерно вдвое превышают соответствующие величины для близких по строению дансильных [11], NBD- [12] и флуоресцеиновых [13] производных.

Спектры испускания бисдансильного зонда (III) показывают характерную для *N*-дансильных производных зависимость положения максимума от полярности среды: λ_{em} составляет 490 нм в диоксане, 516 – в этаноле и 521 – в смеси метанол–вода, 9 : 1, что близко данным для других *N*-дансильных производных [11]. Подобную же зависимость от полярности среды демонстрирует и бис-NBD-производное (IV): λ_{em} составляет 520 нм в диоксане, 533 – в этаноле и 538 – в 90% метаноле. Однако, в отличие от бисдансильного производного (III), для зонда (IV) значительная зависимость от среды наблюдается не только у максимума испускания, но также у обоих максимумов возбуждения; так, основной λ_{ex} в диоксане равен 455, в этаноле 470, а в смеси метанол–вода, 9 : 1, – 473 нм. Это явление вполне согласуется с литературными данными о влиянии природы растворителя на спектры поглощения и флуоресценции NBD-хромофора [12, 14]; предполагается, что значительный сдвиг максимума поглощения (и соответственно возбуждения) в растворителях-донорах протона индуцирован водородными связями NBD-растворитель, что ускоряет конверсию $S_1 \rightarrow S_0$ хромофора [14].

Бисфлуоресцеиновое производное (VIII) и его “усеченный” аналог (IX) отличаются от остальных описанных здесь зондов тем, что флуоресцеиновый хромофор – ионизуемый, параметры его флуоресценции зависят от ионной формы, в которой он находится, т.е. от pH среды. Наибольший квантовый выход (0.93) имеет дианион флуоресцеина, преобладающий при $pH \geq 6.43$ [15]. Спектры возбуждения и испускания, как и поглощения, зондов (VIII) и (IX) мы регистрировали в полярных средах с добавлением гидроксида тетраметиламмония, т.е. для дианионных форм. Оба зонда в этаноле имеют λ_{ex} 501 и λ_{em} 520 нм, а в смеси метанол–вода, 9 : 1, максимумы немного сдвигаются в коротковолновую область, до 498 и 518 нм соответственно.

Дальнейшее изучение флуоресцентных свойств описанных здесь зондов, их поведения в модельных системах будет предметом наших последующих сообщений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали пальмитоилхлорид, DCC, TFA, 4,4'-бифенилдикарбоновую кислоту, *N*-этилдиизопропиламин, 1,8-диаминооктан, 5-диметиламино-1-нафталинсульфохлорид (дансилхлорид) (Fluka, Швейцария), гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфония (BOP-реагент), 1-метилимидазол (Aldrich, США), гидрохлорид 5-(аминометил)флуоресцеина (Molecular Probes, США), 7-нитро-4-хлорбенз-2-окса-1,3-диазол (NBD-хлорид) (Serva, Германия), остальные реактивы и растворители фирмы “Реахим” (Россия). Сухой хлороформ получали перегонкой над пятиокисью фосфора, остальные растворители (отечественного производства) использовали после обычной очистки. Для колоночной хроматографии применяли силикагель Kieselgel 60, обращенно-фазовый адсорбент LiChroprep RP-18 (25–40 мкм, Merck, Германия) и окись алюминия (Реахим); для ТСХ – пластинки с флуоресцентным индикатором Kieselgel 60 F₂₅₄ и без индикатора Kieselgel 60 (Merck), а также с обращенной фазой Nano-SIL C₁₈-100 (Macherey-Nagel, Германия). Обнаружение при ТСХ: фосфорномолибденовой кислотой (А), нингидрином (Б) и УФ-облучением (В). Дихлорангидрид 4,4'-бифенилдикарбоновой кислоты был получен кипячением дикислоты с избытком хлористого тионила в $CHCl_3$ с 0.05% DMF, т. пл. 181–183°C; (из $CHCl_3$ -толуола), лит. данные: т. пл. 184°C [16]. Диметиловый эфир дотриакондандиовой кислоты (V) получали как описано ранее [5].

Масс-спектры снимали на MALDI-времяпролетном приборе Vision 2000 (ThermoBioanalysis, Англия; матрица – 2,5-дигидроксибензойная кислота; N₂-лазер, 337 нм, 3 нс-импульс, максимальная энергия импульса 250 мкДж) или на ESI-времяпролетном приборе Finnigan MAT (ввод в смеси хлороформ–метанол–ацетонитрил, 1 : 1 : 2 + 0.5% муравьиной кислоты); УФ-спектры веществ регистрировали на спектрофотометре Ultrospec II (LKB, Швеция); спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония). Спектры ¹H-ЯМР (δ , м.д. относительно Me₄Si) регистрировали на спектрометре Bruker WM 500 (Германия) в смеси CDCl₃–CD₃OH, 1 : 1. Расчет конформаций в вакууме производили с помощью программы Hyperchem 4.5, метод расчета AM1. Растворители удаляли в вакууме на роторном испарителе при температуре не более 40°C. С флуоресцентными веществами работали только при свете ламп накаливания мощностью не более 60 Вт.

Бис(8-аминооктиламид) 4,4'-бифенилдикарбоновой кислоты (II). К раствору 400 мг (2.77 ммоль) 1,8-диаминооктана и 1.1 мл (6.4 ммоль) *N*-этилдиизопропиламина в 10 мл сухого хлороформа прибавили по каплям за 10 мин при перемешивании раствор 50 мг (0.18 ммоль) дихлорангидрида 4,4'-би-

фенилдикарбоновой кислоты в 5 мл хлороформа, перемешивали еще 30 мин – выпал объемистый осадок. Смесь разбавили 20 мл метанола, осадок отфильтровали, промыли 5 мл метанола, высушили в вакууме, растерли с 5 мл смеси метанол–вода–TFA, 47 : 50 : 3, взвесь частично растворилась. Ее нанесли на колонку 10 × 85 мм с 2.5 г LiChroprep RP-18, промыли 40 мл той же смеси растворителей, затем 30 мл метанола элюировали 47 мг (36%) бис-TFA-соли диамина (II) в виде бесцветного порошка, однородного хроматографически – R_f 0.1 при ТСХ на Nano-SIL C₁₈-100 (метанол–вода–TFA, 50 : 45 : 5; Б, В) и 0.4 на Kieselgel 60 F₂₅₄ (хлороформ–метанол–7 н. NH₄OH, 65 : 25 : 4; А–В), с интервалом плавления 180–185°C. MALDI-MS, m/z : 496 [$M + H$]⁺. Спектр ¹H-ЯМР: 1.21 (16H, ш.м, H3–H6), 1.47 (8H, ш.м, H2 и H7 цепи), 2.71 (4H, т, CH₂NH₂), 3.25 (4H, т, CH₂NHCO), 7.52 и 7.72 (по 4H, два д, аром. H2 и H3, $J_{2,3}$ 8.4 Гц). УФ (в этаноле), λ_{\max} 280 нм (ϵ 2.5 × 10⁴).

Бис[8-(5-диметиламинонафталин-1-сульфониламино)октиламид] 4,4'-бифенилдикарбоновой кислоты (III). К раствору 5 мг (6.92 мкмоль) бистрифторацетата диамина (II) и 20 мкл *N*-этилдиизопропиламина в 4 мл смеси хлороформ–изопропанол, 1 : 1, добавляли раствор 10 мг (37 мкмоль) дансилхлорида в 0.5 мл хлороформа, перемешивали 6 ч, после двухкратной хроматографии на силикагеле в хлороформе с 1–3% метанола получили 4 мг (60%) продукта (III) в виде оранжевого аморфного вещества, однородного хроматографически, R_f 0.65 при ТСХ на Kieselgel 60 (хлороформ–метанол–вода, 90 : 9.5 : 0.5; А–В), ESI-MS, m/z : 961.42 [$M + H$]⁺. УФ (в этаноле) 335 нм (ϵ 9 × 10³).

Бис[8-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-иламино)октиламид] 4,4'-бифенилдикарбоновой кислоты (IV). К раствору 5 мг (6.92 мкмоль) бистрифторацетата диамина (II) в 2 мл смеси хлороформ–изопропанол, 1 : 3, добавляли раствор 14 мг (70 мкмоль) NBD-хлорида в 1 мл того же растворителя, затем 150 мкл 1 М NaHCO₃, интенсивно перемешивали 2 ч при 55°C в атмосфере аргона, хроматографией на силикагеле в хлороформе выделяли 4 мг (71%) продукта (IV) в виде красного аморфного вещества, однородного хроматографически, R_f 0.40 при ТСХ на Kieselgel 60 (хлороформ–изопропанол, 19 : 1; А–В), MALDI-MS, m/z : 821 [M]⁺. УФ (в этаноле) 469 нм (ϵ 4.1 × 10⁴).

Дотриакондандиовая кислота (VI). К раствору 60 мг (0.11 ммоль) диметилового эфира (V) в 25 мл горячего изопропанола добавляли 4 мл воды и 0.6 мл 45% NaOH, выдерживали 12 ч при 60°C, подкисляли в горячем виде 3 н. HCl до pH 2, охлаждали, осадок отсасывали, промывали водой и высушивали. Получали 56 мг (98%) дикарбоновой кислоты (VI) (бесцветный порошок) с т. пл. 123–125°C; образец после кристаллизации из то-

луола с 1% CH₃COOH имел т. пл. 125–127°C. Лит. данные: т. пл. 124–127°C [17], 128–129°C [18].

Бис(флуоресцеинил-5-метиламид) дотриакондандиовой кислоты (VIII). К суспензии 2.3 мг (4.5 мкмоль) дикарбоновой кислоты (VI) в смеси 0.7 мл дихлорметана и 1 мл THF добавляли 15 мкл 1-метилимидазола и 4.4 мг (9.9 мкмоль) BOP-реактента, перемешивали сутки в атмосфере аргона. К полученному раствору добавляли 15 мкл *N*-этилдиизопропиламина и 4.8 мг (12 мкмоль) гидрохлорида 5-(аминометил)флуоресцеина (VII) и перемешивали 6 сут, добавляя THF по мере его испарения; контроль – ТСХ на Nano-SIL C₁₈-100 в системе метанол–вода–TFA, 39 : 10 : 1 (В). Растворитель упаривали, остаток растворяли в 2 мл метанола, добавляли ~1 мг гидроксида тетраметиламмония и наносили на колонку 5 × 70 мм с 0.9 г LiChroprep RP-18, элюируя метанолом, получали 1.2 мг (22%) чистого продукта (VIII): оранжевое аморфное вещество, R_f 0.4 на Nano-SIL C₁₈-100 (дихлорметан–метанол–вода–TFA, 20 : 50 : 10 : 5; Б, В; у исходного производного флуоресцеина (VII) R_f ~ 0.9). ESI-MS, m/z : 1197.56 [M]⁺. УФ (в 5 мМ Me₄NOH в метаноле): 497 нм (ϵ 1.4 × 10⁵).

5-(Гексадеканоиламинометил)флуоресцеин (IX). Суспензию 2 мг (5 мкмоль) гидрохлорида 5-(аминометил)флуоресцеина (VII) в смеси 1 мл THF, 0.1 мл воды и 20 мкл 1-метилимидазола перемешивали 5 мин, добавляли 100 мкл 10% раствора пальмитоилхлорида (36 мкмоль) в THF, перемешивали 2 ч, смесь упаривали в вакууме. Из остатка хроматографией на LiChroprep RP-18 (см. синтез зонда (VIII)) выделяли 2.4 мг (80%) вещества (IX); аморфное оранжевое вещество с R_f 0.5 на Nano-SIL C₁₈-100 (дихлорметан–метанол–вода–TFA, 20 : 50 : 10 : 5; В). ESI-MS, m/z : 600 [M]⁺. УФ (в 5 мМ Me₄NOH в метаноле): 497 нм (ϵ 7.2 × 10⁴).

Флуоресцентные измерения проводили в кварцевых кюветках 10 × 10 мм при 20°C. Спектры возбуждения регистрировали при длине волны испускания 520, 550 и 550 нм, спектры испускания флуоресценции – при возбуждении на 340, 470 и 460 нм для зондов (III), (IV) и (VIII, IX) соответственно; щели на возбуждении и испускании 1.5 и 3 нм соответственно.

Авторы выражают благодарность д-ру Бу Эку (Шведский сельскохозяйственный университет, Упсала, Швеция) за съемку масс-спектров.

Работа поддержана грантами № 00-04-48416 и 02-04-48287 Российского фонда фундаментальных исследований, а также Шведской Королевской Академией наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karolin J., Johansson L.B.-Å. // Trends Phys. Chemistry. 1997. V. 6. P. 171–185.

2. Wu P.G., Brand L. // *Anal. Biochem.* 1994. V. 218. P. 1–13.
3. Bergström F., Hagglof P., Karolin J., Ny T., Johansson L.B.-Å. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 12477–12481.
4. Kalinin S.V., Molotkovsky J.G., Johansson L.B.-Å. // *Spectrochimica Acta A.* 2002. V. 58. P. 1087–1097.
5. Grechishnikova I.V., Johansson L.B.-Å., Molotkovsky J.G. // *Chem. Phys. Lipids.* 1996. V. 81. P. 87–98.
6. Karolin J., Bogen S.-T., Johansson L.B.-Å., Molotkovsky J.G. // *J. Fluorescence.* 1995. V. 5. P. 279–284.
7. Johansson L.B.-Å., Bergström F., Edman P., Grechishnikova I.P., Molotkovsky J.G. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1996. V. 92. P. 1563–1567.
8. Молотковский Ю.А. // *Биоорган. химия.* 1999. Т. 25. С. 855–867.
9. Thompson D.H., Wong K.F., Humphry-Baker R., Wheeler J.J., Kim J.-M., Rananavare S.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. V. 114. P. 9035–9042.
10. Duffin G.R., Ellames G.J., Hartmann S., Herbert J.M., Smith D.I. // *J. Chem. Soc.* 2000. PT 1. P. 2237–2242.
11. Waggoner S.S., Stryer L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1970. V. 67. P. 579–589.
12. Chattopadhyay A. // *Chem. Phys. Lipids.* 1990. V. 53. P. 1–15.
13. Haugland R.P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.* Sixth Ed. / Ed M.T.Z. Spence. Eugene (OR): Molecular Probes, 1996. P. 19–22.
14. Lin S., Struve W.S. // *Photochem. Photobiol.* 1991. V. 54. P. 361–365.
15. Sjöback R., Nygren J., Kubista M. // *Spectrochim. Acta. Part A.* 1995. V. 51. P. L7–L21.
16. Герм. пат. (D.R.P.) 701 953 (1935).
17. Buchta E., Huhn C. // *Liebigs Ann.* 1966. B. 695. S. 42–48.
18. Hünig S., Buysch H.-J. // *Chem. Ber.* 1967. B. 100. S. 4017–4026.

New Fluorescent Bichromophoric Probes for the Donor–Donor Energy Migration (DDEM) Studies

L. B.-Å. Johansson*, S. V. Kalinin*, K. A. Filatova**, and Jul. G. Molotkovsky***

*Phonelfax: +7 (095) 330-6601, e-mail: jgmol@ibch.ru

*Umeå University, Umeå, Sweden

***Shemya-In-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

Three fluorescent probes were synthesized for studying the excitation energy migration between two identical fluorophores. Each probe has two identical fluorescent groups (dansyl, 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl, or fluoresceinyl) linked by the rigid bis-(8-aminooctyl)amide of 4,4'-biphenyldicarboxylic acid or flexible dotriacetonedioic acid spacer, which enables the intramolecular energy migration through the distance of 3.2–3.5 nm. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: donor–donor energy migration (DDEM), fluorescent bichromophoric probes, synthesis