

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук**

---

*На правах рукописи*

Мяснянко Иван Николаевич

**Производные хромофоров флуоресцентных белков как  
флуорогенные красители для белка FAST**

специальность – 1.4.9 – биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва 2021



## ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Исследование сложных комплексных процессов, происходящих в живых системах, невозможно без детального наблюдения перемещений и взаимодействий биологических молекул. Так как большая часть биологических объектов бесцветна, прямое рассмотрение таких процессов является затруднительным без введения в систему метки. Одним из распространенных методов визуализации вводимых меток является флуоресцентная микроскопия, а в качестве меток при этом используются различные флуорофоров. В настоящее время самой популярной флуоресцентной меткой являются генетически кодируемые флуоресцентные белки семейства GFP. Это особое семейство белков, которые способны поглощать и излучать свет благодаря присутствию внутри белка небольшой молекулы – хромофора. Изменение структуры хромофора приводит к изменению флуоресцентных свойств белка, благодаря чему сейчас доступно множество мутантных вариантов флуоресцентных белков, имеющих самую различную окраску. Однако применение этих белков имеет некоторые ограничения. Образование хромофора требует присутствия кислорода и занимает определенное время. Значительный размер флуоресцентных белков, более 220 аминокислот, может существенным образом нарушить функции меченого биологического объекта. Поэтому работы, направленные на разработку новых методов и совершенствование уже существующих систем флуоресцентного мечения по-прежнему являются важными и актуальными.

Новым типом генетически кодируемых флуоресцентных меток стали так называемые флуороген-активирующие белки. Такие белки сами по себе бесцветны и не содержат хромофорной группы, однако они способны образовывать комплексы с флуорогенами. В свою очередь, флуорогены, которые являются низкомолекулярными соединениями, проявляют крайне слабую флуоресценцию в растворах, однако приобретают ее при связывании с целевым объектом – флуороген-активирующим белком. Такая система мечения удачно сочетает в себе достоинства генетически кодируемых меток и химических маркеров, а потому имеет высокий потенциал в практическом применении.

Одним из перспективных флуороген-активирующих белков, созданных на текущий момент, является белок под названием FAST (от англ. Fluorescence-activating and Absorption-Shifting Tag). Этот белок образует флуоресцентные комплексы при взаимодействии с производными 4-гидроксипиридила. На его основе было разработано множество подходов к флуоресцентному мечению и показана его высокая эффективность в сравнении с классическими флуоресцентными белками. Тем не менее, на данный момент метки, разработанные на основе этого и других флуороген-активирующих белков, существенно ограничены по цветовому разнообразию. В частности, крайне востребованной является разработка меток, флуоресцирующих в длинноволновой области спектра, где поглощение света биологическими объектами минимально.

Производные хромофоров флуоресцентных белков, имеющие химическую структуру арилиденимидазолонов, являются перспективными кандидатами на

роль флуорогенов. Синтезированные в свободном от белка виде, эти вещества зачастую практически нефлуоресцентны в растворах. Однако внутренняя или внешняя фиксация молекулы приводит к значительному росту квантового выхода флуоресценции. Ранее в нашей лаборатории были проведены исследования зависимости оптических свойств таких соединений от их строения, в результате чего было показано, что введение различных заместителей в такие молекулы позволяет получить вещества с самой разной окраской.

**Цели и задачи исследования.** Целью этой работы стало создание новых флуорогенов для белка FAST на основе производных хромофоров флуоресцентных белков.

В рамках поставленной цели были определены следующие задачи:

- Разработка новых методов синтеза и модификации производных хромофоров флуоресцентных белков.
- Синтез первичной библиотеки веществ, являющихся потенциальными флуорогенами для белка FAST.
- Проведение скрининга и выявление соединений, демонстрирующих эффективное связывание и увеличение интенсивности флуоресценции при взаимодействии с белком FAST.
- Выявление взаимосвязи между строением веществ, способностью связываться с белком FAST и свойствами образующихся комплексов.
- Создание расширенной библиотеки соединений на основе выявленных закономерностей, направленное на увеличение цветового разнообразия флуорогенов для белка FAST.
- Проведение скрининга расширенной библиотеки. Выявление наиболее эффективных флуорогенов. Подробное изучение оптических свойств комплексов всех выявленных флуорогенов с флуороген-активирующим белком FAST.
- Определение возможности применения всех выявленных флуорогенов в качестве флуоресцентной метки в живых системах.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** В результате проведенной работы, были разработаны новые методы синтеза ранее труднодоступных производных хромофоров флуоресцентных белков, создана большая библиотека потенциальных флуорогенов и выявлены соединения, эффективно взаимодействующие с белком FAST. В результате анализа полученных данных был проведён синтез расширенной библиотеки соединений и выявлено множество эффективных флуорогенов, имеющих самую разную окраску. Впервые в данной работе была показана возможность использования производных хромофоров флуоресцентных белков в роли флуорогенов белка FAST. Доступность методов их синтеза и модификаций позволяет легко варьировать оптические свойства их комплексов с белком и тем самым создавать флуоресцентные метки, которые могут быть использованы для многоцветного мечения в живых системах.

**Методология и методы исследования.** Синтез новых соединений осуществлялся с привлечением классических методов органической химии.

Строение всех новых соединений было подтверждено с помощью методов  $^1\text{H}$  ЯМР,  $^{13}\text{C}$  ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения. Оптические свойства соединений и их комплексов были изучены с помощью классических подходов оптической спектроскопии. Нарботка белка FAST и проведение исследований живых объектов с помощью флуоресцентной микроскопии проведено коллегами из Лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов и Группы молекулярных меток для оптической наноскопии ИБХ РАН.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- Реакция *O*-алкилирования амидацетатов с помощью солей триэтиоксония может быть использована для синтеза бензилиденимидазолонов, с различными заместителями во втором положении имидазолонового цикла.
- Окисление бензилиденимидазолонов диоксидом селена может быть использовано для создания широкого набора замещенных производных, отличающихся заметным батохромным смещением максимумов абсорбции и эмиссии.
- Производные хромофоров флуоресцентных белков могут быть использованы в качестве перспективных лигандов флуороген-активирующего белка FAST.

**Апробация полученных данных и публикации.** Основные результаты работы были доложены на конкурсе молодых ученых в рамках XXXII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2020), а также на конкурсе молодых ученых в рамках XXXIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2021). По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах.

**Структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 156 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений, а также списка цитируемой литературы, включающего 249 ссылки. Диссертация содержит 9 рисунков, 67 схем и 10 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Генетически кодируемые флуороген-активирующие белки имеют некоторые преимущества в сравнении с прочими методами флуоресцентного маркирования. Малый размер вводимой метки снижает вероятность нарушения функций исследуемого белка после мечения. Благодаря тому, что флуоресцирует метка исключительно после образования комплекса белок-флуороген, снижается уровень фоновой флуоресценции и исключается необходимость отмывки избыточного количества флуорогена. Кроме того исследователь может инициировать флуоресцентный сигнал в любой момент простым добавлением флуорогена или убрать его, с помощью замены среды. Также использование синтетического флуорогена значительно упрощает задачу по увеличению цветового разнообразия такого типа меток.

Производные хромофоров флуоресцентных белков высокоперспективны в качестве флуорогенов. Они имеют малый размер и высокую гидрофильность. Разработано большое количество удобных синтетических подходов, позволяющих получать бензилиденимидазолы различной окраски. Кроме того известно, что эти соединения имеют крайне слабую флуоресценцию в растворе из-за подвижности бензилиденового фрагмента, которая приводит к безызлучательному высвобождению энергии возбужденного состояния. Однако внешняя или внутренняя фиксация этого подвижного фрагмента приводит к многократному росту интенсивности флуоресценции.

Настоящая работа посвящена расширению возможностей использования 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов в роли флуорогенных красителей. Первая часть работы посвящена разработке новых подходов к синтезу и модификации этих соединений, в частности, предложены подходы, позволяющие создавать бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-оны, которые характеризуются более длинноволновым положением спектров поглощения и эмиссии. Вторая часть работы посвящена созданию новых флуорогенов для известного флуороген-активирующего белка FAST.

### **1. Новые методы синтеза и модификации бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов**

Одной из важных задач при разработке флуоресцентных маркеров является создание более красных меток. Поглощение и флуоресценция таких соединений должны лежать в длинноволновой области примерно в диапазоне 700-900 нм. Свет с такой длиной волны в наименьшей степени поглощается биологическими объектами. Поэтому первая часть работы посвящена разработке новых химических модификаций, позволяющих в значительной степени сместить максимумы абсорбции и эмиссии 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов в красную область спектра.

#### **1.1 Синтез 4-арилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов с помощью реакции *O*-алкилирования амидоацетатов**

4-Бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-оны, имеющие во втором положении имидазолонна акцепторные заместители, например кетогруппы, характеризуются более длинноволновыми поглощением и испусканием. Благодаря высокой

реакционной способности алкильного остатка во втором положении, имидазолы под воздействием диоксида селена легко могут быть окислены до альдегидов или кетонов. Однако синтез исходных имидазолонов, особенно тех, что содержат бензильный заместитель во втором положении, зачастую затруднен.

Один из самых популярных подходов к синтезу бензилиденимидазолонов заключается в использовании реакции циклоприсоединения оснований Шиффа к иминоэфирам. Иминоэфиры в свою очередь в основном получают из соответствующих нитрилов в две стадии:

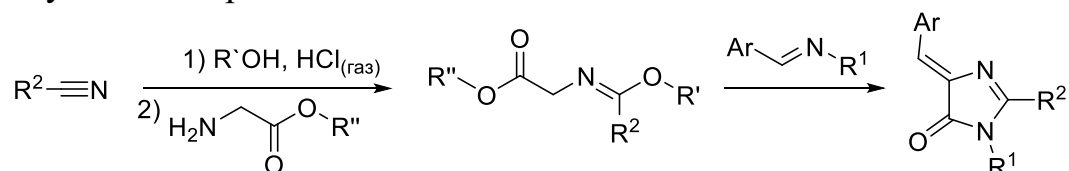


Схема 1. Синтез имидазолонов из имидатов.

Однако у этого подхода есть один существенный недостаток – ограниченный круг нитрилов, подходящих для данной реакции, а следовательно и ограниченный круг заместителей, которые можно ввести во второе положение имидазолана.

В настоящей работе была предложена модификация этого метода, позволяющая получить имидазолы, содержащие разные заместители во втором положении, включая бензильные. В качестве альтернативного способа получения иминоэфиров мы использовали реакцию *O*-алкилирования амидоацетатов **1** с помощью тетрафторбората триэтилоксония:

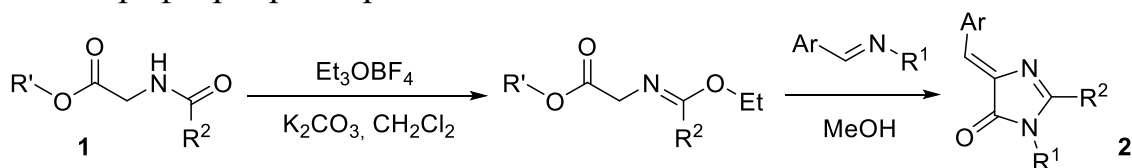
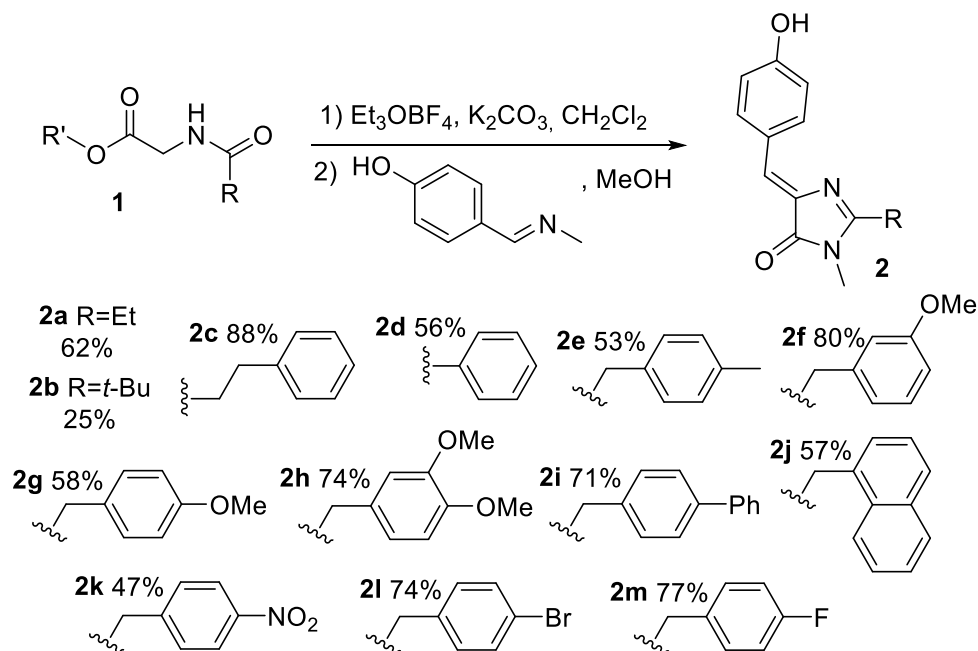


Схема 2. Синтез имидатов из амидоацетатов.

Тетрафторборат триэтилоксония взаимодействует с амидами при комнатной температуре в присутствии карбоната калия в хлористом метиле с образованием иминоэфиров. В препаративном плане можно обойтись без выделения полученных соединений. Так, реакционную смесь промывают насыщенным раствором хлорида натрия, упаривают и без дополнительной очистки вводят в реакцию циклоприсоединения с основанием Шиффа.

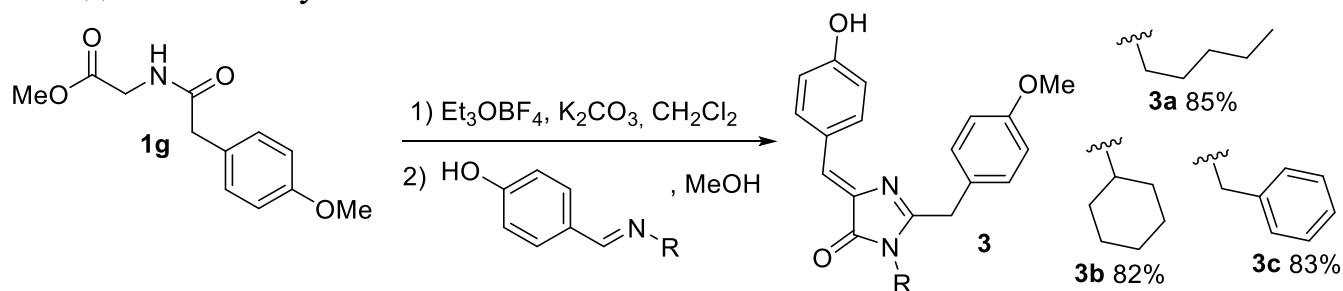
С помощью предложенной методики были получены производные 4-(4-гидроксибензилиден)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-она **2a-m**, содержащие во втором положении имидазолана различные заместители, в том числе искомые бензильные группы. Универсальность данного метода была продемонстрирована синтезом соединений с этильным, *трет*-бутильным, фенильным и фенилэтильным остатками:



**Схема 3. Ряд производных 4-(4-гидроксбензилиден)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-она, полученных по разработанному в данной работе методу.**

В ходе синтеза было замечено, что строение вводимого в положение С2 заместителя существенно влияет на ход реакции. Выход реакции варьировался от 25 до 90% (схема 3). С минимальным выходом 25% было получено производное **2b**, содержащее *трет*-бутильный заместитель. Впрочем, стоит отметить, что и ранее синтез этого вещества удавалось проводить лишь с крайне низкими выходами.

Далее было изучено влияние заместителя на атоме азота. Было показано, что заместитель в первом положении имидазолон имеет минимальное влияние – выходы во всех случаях составили 80-85%:



**Схема 4. 4-(4-Гидроксбензилиден)-2-(4-метоксибензил)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-оны с разными заместителями в первом положении.**

Применимость этого метода также была исследована в синтезе имидазолонов с разными арилиденовыми заместителями (схема 5). В зависимости от использованного основания Шиффа выход реакции составлял от 30 до 85%.



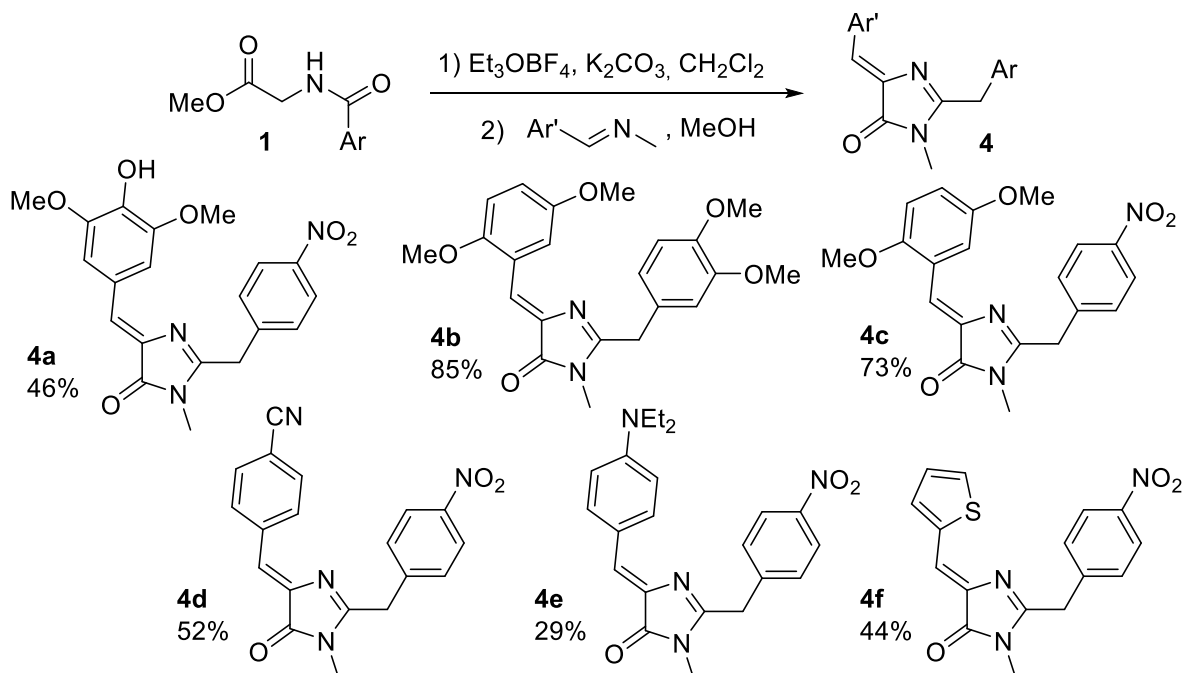


Схема 5. Варьирование ариленового заместителя в четвертом положении 2-бензилимидазолонa.

На следующем этапе некоторые производные 4-(4-гидроксибензилиден)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-она с бензильным заместителем в положении С2 были окислены до соответствующих 2-ароилпроизводных. Реакция осуществлялась под действием небольшого избытка диоксида селена в диоксане при кипячении:

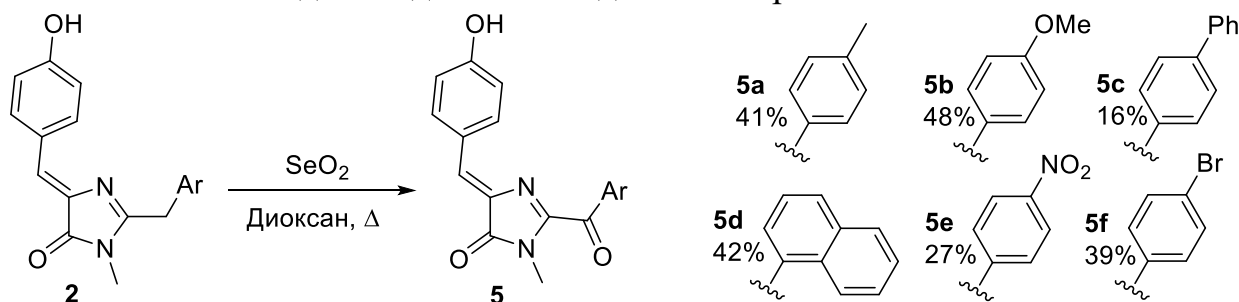


Схема 6. Синтез кетонов 5.

Изучение оптических свойств исходных имидазолонов **2** и их окисленных производных **5** показало, что введение кетогруппы приводит к батохромному сдвигу спектральных максимумов в среднем на 50 нм (таблица 1). Синтезированные кетоны **5** и их предшественники **2** имеют в четвертом положении бензилидена гидроксигруппу и могут существовать в виде анионов. Было установлено, что для депротонированной формы кетонов характерно поглощение около 600 нм (таблица 1). Также стоит обратить внимание, что природа ароматического заместителя при кето-группе практически не влияет на оптические свойства производных **5**. По всей видимости данный фрагмент не в полной мере входит в общую сопряженную систему молекулы.

Таблица 1. Максимумы абсорбции (в нм) имидазолонов 2 и кетонов 5 в ацетонитриле.

Соединение	Нейтральная форма	Анионная форма
2e	370	481
5a	418	592
2g	370	481
5b	414	591
2i	370	483
5c	423	602
2j	371	483
5d	423	596
2k	373	490
5e	440	616
2l	372	484
5f	427	602

Таким образом, в настоящей работе был разработан удобный подход к синтезу 4-арилиденимидазолонов, содержащих во втором положении имидазольного ядра разные заместители. Окисление 4-гидроксибензиледеновых производных позволило получить ряд кетонов с абсорбцией в области 600 нм, что делает их хорошими кандидатами на роль флуорогенных красителей.

### 1.2 Реакция окисления диоксидом селена

Ранее в нашем коллективе было показано, что окисление заместителя в 2-ом положении 4-арилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов может приводить к формированию циклических амидов, что приводит к батохромному сдвигу на ~50 нм. Нами было предположено, что введение дополнительной С=О группы может привести к более сильному сдвигу в длинноволновую область. Для получения таких соединений на первой стадии при взаимодействии ароматических альдегидов с имидазом были синтезированы имидазолы **6a-f**, содержащие эфирную группу в боковой цепи. Затем при реакции с аминами из этих эфиров были получены соответствующие амиды **7a-f**:

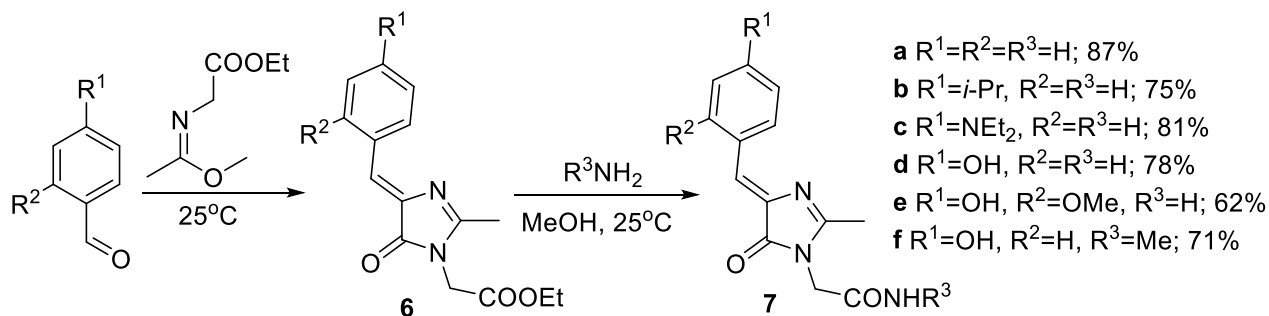
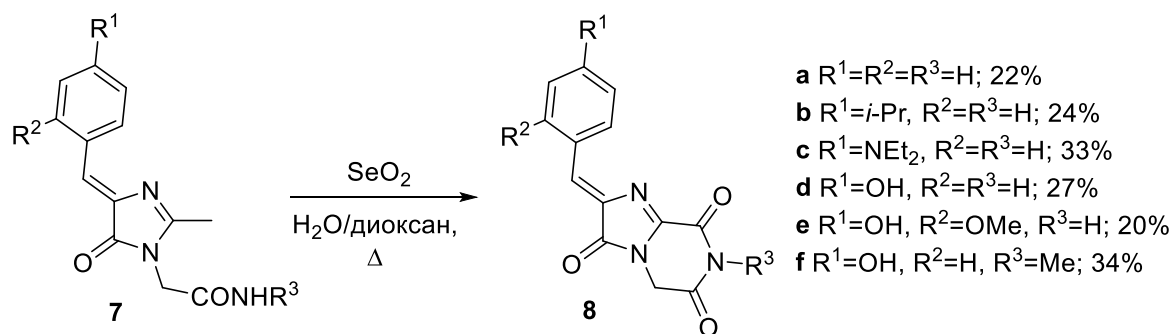


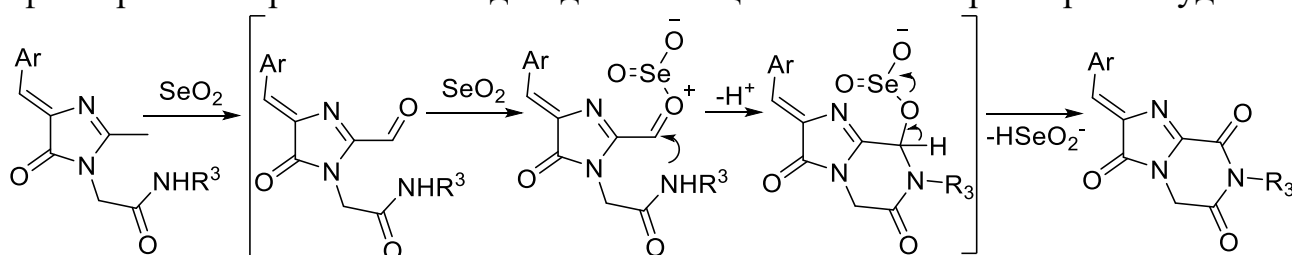
Схема 7. Синтез амидов 7 для изучения реакции окисления SeO<sub>2</sub>.

На заключительном нами было изучено окисление соединений **7a-f** до циклических иминов **8a-f** под воздействием избытка диоксида селена при кипячении в смеси вода-диоксан:



**Схема 8. Получение циклических имидов 8a-f.**

Механизм этого превращения, по всей видимости, включает формирование альдегида, который затем подвергается нуклеофильной атаке и избыточному окислению (схема 9). Однако подтвердить предложенный механизм, и зафиксировать образование альдегида с помощью масс-спектрометрии не удалось.



**Схема 9. Возможный механизм окисления.**

Изучение оптических свойств исходных амидов **7** и имидов **8** показало, что подобное окисление приводит к батохромному смещению положений максимумов поглощения и эмиссии в среднем на 70 нм (таблица 2). Также заметно возрастание величины стоксового сдвига в ряде случаев почти до 100 нм:

**Таблица 2. Оптические свойства амидов 7a-f и имидов 8a-f в ацетонитриле.**

Соединение	Нейтральная форма	Анионная форма	Стоксов сдвиг
<b>7a</b>	345	408	63
<b>8a</b>	409	498	89
<b>7b</b>	355	415	60
<b>8b</b>	420	507	87
<b>7c</b>	430	494	64
<b>8c</b>	512	605	93
<b>7d</b>	363	408	45
<b>8d</b>	409	506	97
<b>7e</b>	361	407	46
<b>8e</b>	412	510	98

Заметное влияние на положение спектральных максимумов также оказывает электронный характер заместителей  $R^1$  и  $R^2$  в бензильденовом фрагменте (Схема 8). Так с увеличением донорного характера введенного заместителя максимумы поглощения и испускания в большей степени смещаются в длинноволновую

область, что хорошо коррелирует с данными, полученными ранее в нашей лаборатории для других 4-арилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-оно<sup>1</sup>.

Сравнение оптических свойств новых циклических иминов **8b** и **8c** с ранее полученными циклическими амидами показало, что введение дополнительной C=O группы действительно приводит к большему батохромному сдвигу на 30 нм.

В заключении также можно отметить, что все полученные новые циклические имины **8a-f** имеют квантовый выход флуоресценции около 0.1-0.2%. Такие оптические свойства – эмиссия в области 500-600 нм и слабая флуоресценция в свободном виде, говорят о перспективности использования подобных соединений в качестве флуорогенных красителей.

## 2. Новые флуорогены белка FAST

Производные хромофоров флуоресцентных белков имеют высокий флуорогенный потенциал. В частности, в нашей лаборатории уже было показано, что некоторые производные этой группы могут быть использованы в роли флуорогенных красителей для отдельных клеточных органелл, в то время как другие могут быть использованы в роли флуорогенов для флуороген-активирующих белков, сконструированных нашими коллегами из ИБХ на базе белка семейства липокалинов.

Флуороген-активирующий белок FAST (от англ. Fluorescence-activating and Absorption-Shifting Tag) также является перспективным объектом для связывания производных хромофоров. Этот белок образует флуоресцентные комплексы при взаимодействии с производными 4-гидроксибензилиденроданина (рисунок 1А). Помимо многократного усиления флуоресцентного сигнала при формировании комплекса также происходит батохромное смещение спектральных максимумов флуорогена, обусловленное депротонированием гидроксигруппы.

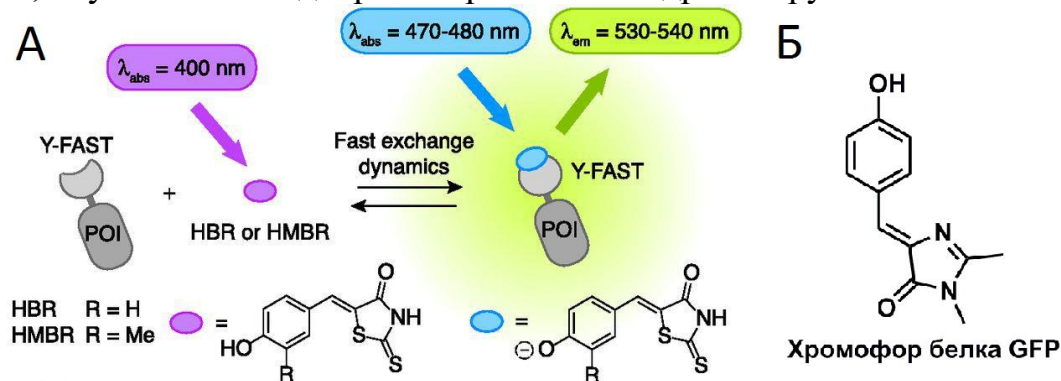


Рисунок 1. Роданиновые флуорогены белка FAST<sup>2</sup> и хромофор белка GFP.

Высокое структурное подобие хромофоров флуоресцентных белков с роданиновым флуорогеном (рисунок 1Б), позволяет предположить, что белок FAST будет также эффективно образовывать флуоресцентные комплексы и с производными 4-гидроксибензилиденимидазолона.

<sup>1</sup> Baranov M.S., Solntsev K.M., Baleeva N.S., Mishin A.S., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Yampolsky I. V. Red-Shifted Fluorescent Aminated Derivatives of a Conformationally Locked GFP Chromophore // *Chem. - A Eur. J.* 2014. Т. 20. № 41. С. 13234–13241

<sup>2</sup> Plamont M.A. и др. Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. Т. 113. № 3. С. 497–502.

В связи с этим вторая часть настоящей работы посвящена созданию флуорогенов для белка FAST на основе производных 4-гидроксibenзилиденимидазолонa с разным цветовым окрашиванием, и выявлению самых перспективных кандидатов.

## 2.1 Поиск новых флуорогенов для белка FAST среди различных 4-гидроксibenзилиденимидазолонов

Существенным отличием роданиновых лигандов белка FAST от хромофоров флуоресцентных белков является присутствие более крупных атомов серы в роданиновом фрагменте (рисунок 1А, Б). Поэтому для выявления перспективных кандидатов на роль флуорогенов белка FAST были протестированы разные производные хромофоров флуоресцентных белков, содержащие гидроксигруппы в четвертом положении бензилидена.

В это исследование были включены кетоны **5a-f** и циклические имиды **8d-f**, синтез которых был описан выше. Также из библиотеки соединений, ранее полученных в нашей лаборатории, была использована серия производных хромофора белка GFP **GA02-06**, содержащая разные алкильные остатки во втором положении имидазолонa. Кроме того был синтезирован ряд аналогов хромофора белка Kaede **10a-e** и **11a-i** (схема 10). Синтез этой группы соединений проводился с помощью конденсации различных альдегидов по метильной группе, находящейся во втором положении имидазолонового цикла.

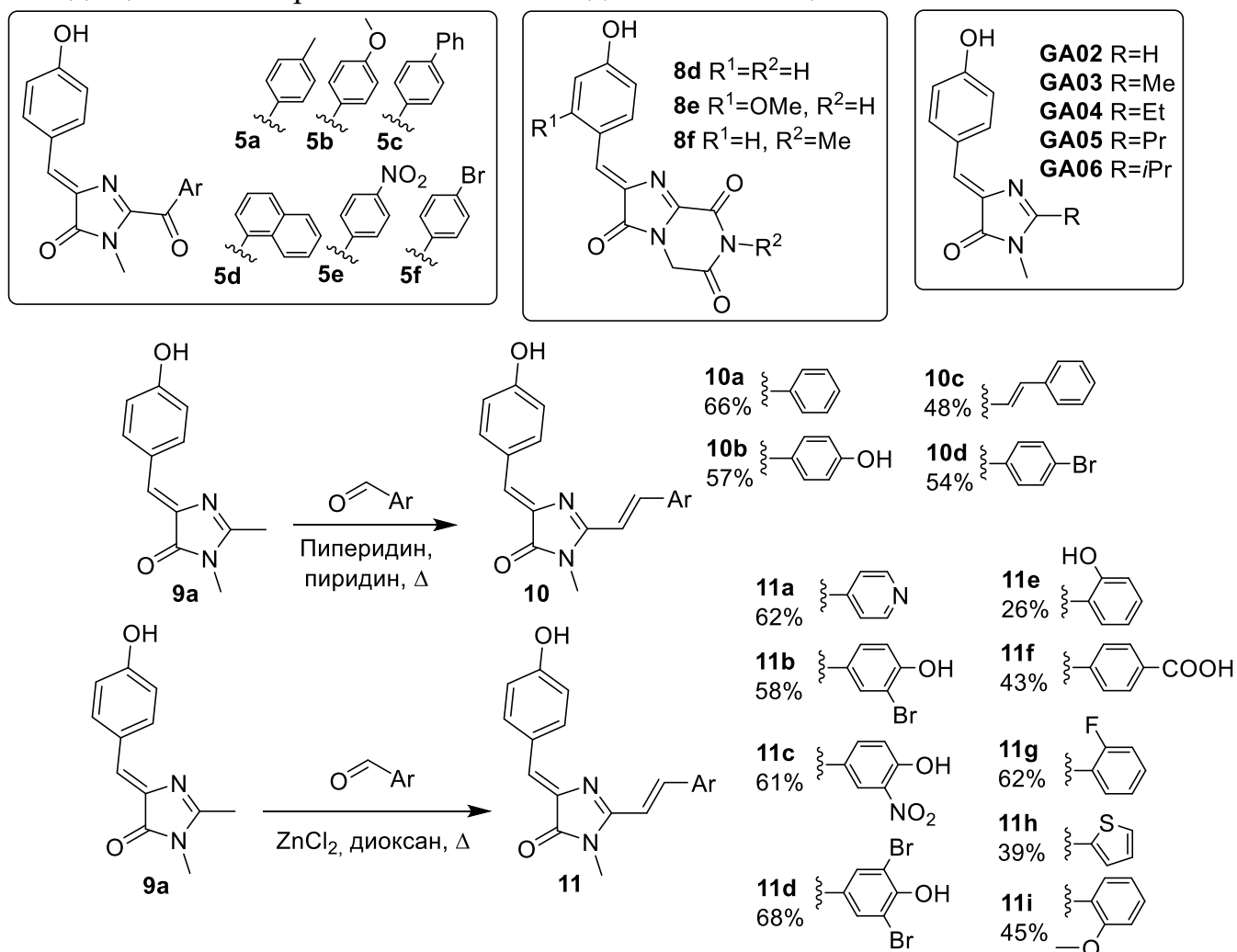


Схема 10. Структуры потенциальных флуорогенов белка FAST.

Сотрудниками лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов ИБХ РАН был подготовлен образец белка FAST, иммобилизованного на металл-аффинной смоле TALON. Выявление эффективных флуорогенов проводилось с помощью масштабного скрининга. Небольшие количества смолы смешивали с растворами потенциальных флуорогенов в многолучных плашках и осматривали на флуоресцентном микроскопе в различных каналах. В результате было установлено, что для двух соединений **11a** и **11d** (схема 10), после взаимодействия с белком FAST наблюдается заметное усиление флуоресценции.

Эксперименты с очищенным белком в растворе показали, что при образовании комплексов происходит примерно десятикратное возрастание интенсивности флуоресценции. Также было установлено, что флуорогены сильно отличаются по степени связывания с белком. Для производного **11a** наблюдается очень слабое связывание с  $K_D$  около 50 мкМ, что существенно затрудняет дальнейшее исследование этого комплекса. В то время как  $K_D$  соединения **11d** намного меньше (таблица 3). Однако дальнейшее изучение оптических свойств комплекса белка FAST с производным **11d** показало, что квантовый выход этой пары крайне мал:

**Таблица 3. Оптические свойства соединений 11a и 11d в виде комплекса с белком FAST в фосфатном буфере.**

Соед.	Абсорбция, нм	Коэффициент экстинкции, $M^{-1}cm^{-1}$	Эмиссия, нм	Квантовый выход флуоресценции, %	$K_D$ , $\mu M$
<b>11a</b>	537	-	604	-	~50
<b>11d</b>	480	21000	600	1.2	0.54

Полученные результаты подтверждают изначальную гипотезу, что производные хромофоров GFP, такие как вещества **11a** и **11d**, будут проявлять флуорогенные свойства при смешивании с белком FAST. Однако из-за незначительного усиления флуоресцентного сигнала, а также слабого связывания (производное **11a**) и низкого квантового выхода (производное **11d**) они не могут быть использованы для мечения. Однако эти соединения являются отличной основой для создания новых производных, среди которых могут быть выявлены более перспективные флуорогены.

Оптические свойства свободных форм флуорогенов **11a** и **11d** также были изучены. Соединения **11a** и **11d**, как и все 4-гидроксibenзилиденимидазолон, могут переходить в анионную форму. Было установлено, что процесс депротонирования сопровождается батохромным сдвигом максимумов на 50-80 нм (таблица 4),  $pK_a$  соединения **11a** составляет 7.55, а соединения **11d** – 8.15.

**Таблица 4. Оптические свойства соединений 11a и 11d в составе комплекса с белком FAST и в свободном виде.**

	<b>11a</b>		<b>11d</b>	
	Абсорбция, нм нейтр./анион.	Эмиссия, нм нейтр./анион.	Абсорбция, нм нейтр./анион.	Эмиссия, нм нейтр./анион.
<b>В свободном виде (вода)</b>	430/511	545/600	480/512	560/600
<b>Комплекс (PBS)</b>	537	604	480	600

Стоит отметить, что оптические свойства комплексов в большей степени схожи со свойствами свободных флуорогенов в анионной форме (таблица 4). Вероятно, что при формировании комплексов с белком FAST производные имидазолонов, как и роданиновые флуорогены, депротонируются, и происходит bathochromное смещение спектральных максимумов.

На следующем этапе этого исследования на флуорогенную активность был протестирован расширенный ряд производных флуорогенов **11a** и **11d**. Для всех новых соединений было решено сохранить структурный фрагмент 4-(4-гидроксибензилидена), который очевидно имеет важное значение в процессе связывания с белком. Чтобы сместить положения спектральных максимумов в длинноволновую область в бензилиденный фрагмент были введены дополнительные электронодонорные группы, а в стирольный остаток – акцепторные (схема 11).

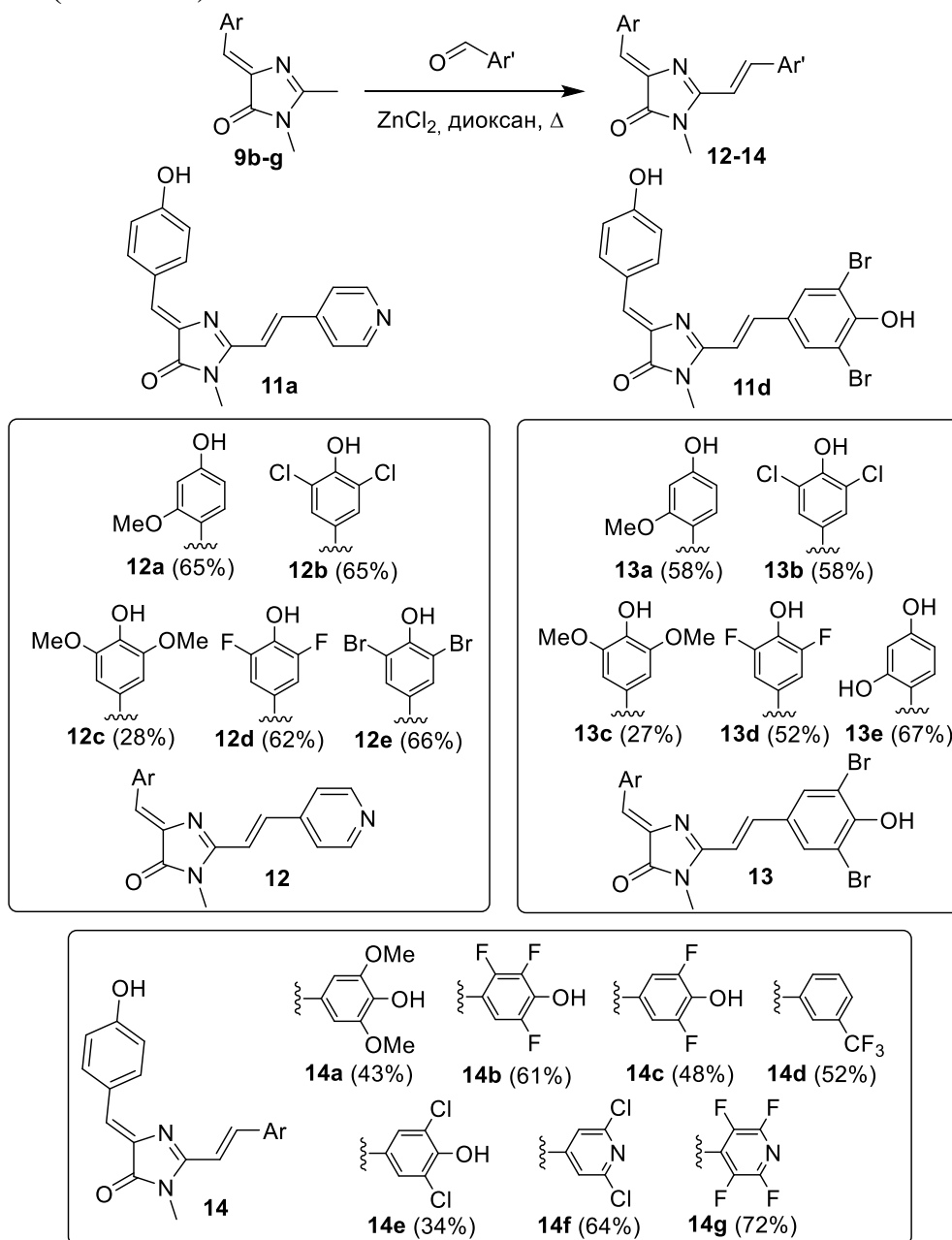


Схема 11. Аналоги хромофора белка Kaede как потенциальные флуорогены белка FAST (в скобках приведены выходы реакции).

Скрининг проводился путем смешивания каждого вещества с белком FAST, иммобилизованного на металл-аффинной смоле TALON. В результате было замечено, что для соединений **12c** и **12e** добавление белка не приводит к усилению флуоресцентного сигнала. Увеличение интенсивности сигнала в 10-30 раз наблюдалось для соединений **12d** и **13c-e**. Такие же результаты были получены для ряда соединений **14a-g**, содержащие разные заместителей в стирольном фрагменте. Более сильное разгорание, в 50-80 раз, было зафиксировано для производных, содержащих атомы хлора в бензилиденовом фрагменте (**12b** и **13b**). Но к наибольшему росту флуоресценции привело введение метоксигруппы во второе положение бензилиденового фрагмента. Для соединений **12a** и **13a** флуоресцентный сигнал усиливался при смешивании с белком FAST почти в 200 раз.

Важно отметить, что помимо способности образовывать флуоресцентные комплексы флуорогены должны соответствовать и другим требованиям. Для красителей, используемых во флуоресцентной микроскопии, также необходимыми характеристиками являются способность проникать через клеточные мембраны и отсутствие неспецифического окрашивания. Поэтому в продолжение этого исследования вещества, проявившие флуорогенные свойства, были использованы для окрашивания в живых клетках.

Сотрудниками лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов ИБХ РАН был создан ряд конструкций, белков слияния гистона H2B или белков цитоскелета с белком FAST, которые были использованы для временной трансфекции клеток линии HeLa Kyoto. Исследуемые флуорогены добавляли в клеточную среду до конечной концентрации 5-10  $\mu\text{M}$ .

Большинство исследуемых веществ не окрашивали ядра клеток, трансфицированных конструкцией H2B-FAST. Добавление лишь некоторых соединений (**11a**, **12b** и **14a**) приводило к появлению слабой флуоресценции. Наиболее яркий сигнал был получен при использовании производного **12a** (рис. 2А). Значимое усиление флуоресцентного сигнала соединения **12a** также наблюдалось на более сложной модели цитоскелета (рис. 2Б, В). Стоит также отметить, что при использовании этого флуорогена не наблюдалось неспецифического окрашивания.

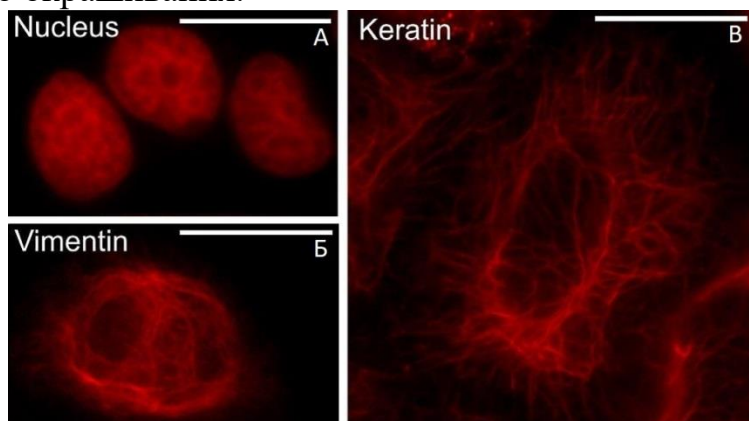


Рисунок 2. Флуоресцентная широкопольная микроскопия конструкций белка FAST с флуорогеном **12a** в клетках HeLa Kyoto; масштабная линейка 20  $\mu\text{m}$ .



Исследование оптических свойств показало, что спектральные характеристики комплекса **12a**-FAST схожи со свойствами комплекса, образующегося с ранее предложенным флуорогеном **HBR-DOM**<sup>3</sup> (схема 12). Положение максимумов абсорбции и эмиссии этих комплексов практически совпадают (таблица 5). Однако, стоит отметить, что спектр флуоресценции пары **12a**-FAST имеет заметно более широкую форму (рис. 3). Применение такой метки позволит детектировать флуоресцентный сигнал в большем диапазоне, до 700 нм.

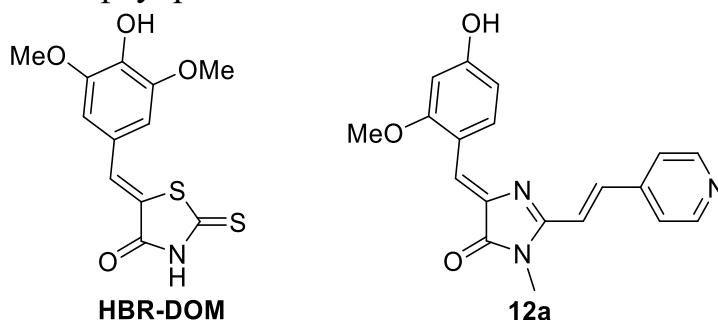


Схема 12. Структуры флуорогенов **HBR-DOM** и **12a**.

Таблица 5. Оптические свойства соединений **12a** и **HBR-DOM** в виде комплекса с белком FAST в фосфатном буфере.

Соединение	Абсорбция, нм	Коэффициент экстинкции, М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	Эмиссия, нм	Квантовый выход флуоресценции, %	K <sub>D</sub> , μM
<b>HBR-DOM</b>	520	39000	600	31	0.97
<b>12a</b>	562	23000	606	25	0.25

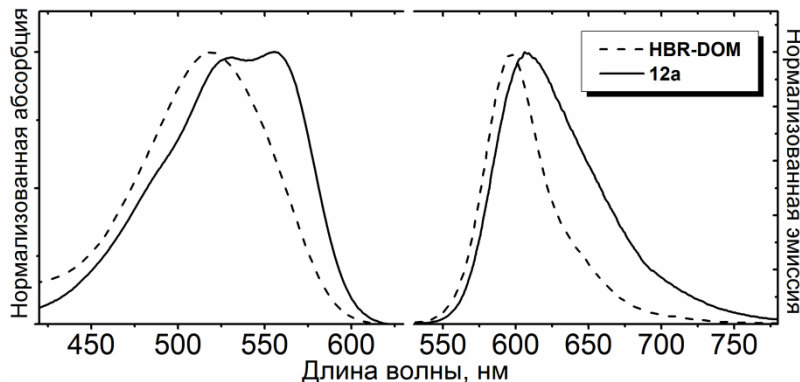


Рисунок 3. Спектры абсорбции и эмиссии комплексов **12a**-FAST и **HBR-DOM**-FAST в фосфатном буфере.

Взаимодействие белка FAST с производным **12a** приводит к смещению спектральных максимумов. Очевидно, что формирование флуоресцентного комплекса **12a**-FAST, как и в случае вышеописанных флуорогенов, сопровождается депротонированием гидроксигруппы. Положения максимумов абсорбции и эмиссии комплекса близки соответствующим анионной формы свободного соединения **12a** (таблица 6).

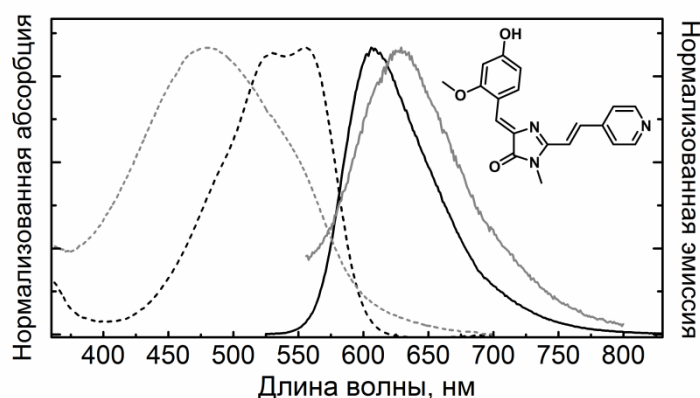
<sup>3</sup> Li C., Plamont M.A., Sladitschek H.L., Rodrigues V., Aujard I., Neveu P., Le Saux T., Jullien L., Gautier A. Dynamic multicolor protein labeling in living cells // *Chem. Sci.* 2017. T. 8. № 8. С. 5598–5605.

**Таблица 6. Оптические свойства производного **12a** в составе комплекса с белком FAST и в свободном виде.**

	Абсорбция, нм нейтр./анион.	Эмиссия, нм нейтр./анион.
<b>В свободном виде (вода)</b>	455/528	570/630
<b>Комплекс (PBS)</b>	558	610

Изучение спектров поглощения производного **12a** при разном значении pH в воде показало, что депротонирование происходит в диапазоне pH 6-8.5 и характеризуется pKa 7.40. Эти данные позволяют предположить, что при флуоресцентном мечении живых клеток свободный флуороген **12a**, который не связан белком FAST, будет существовать в двух формах и потенциально может создавать фоновую флуоресценцию.

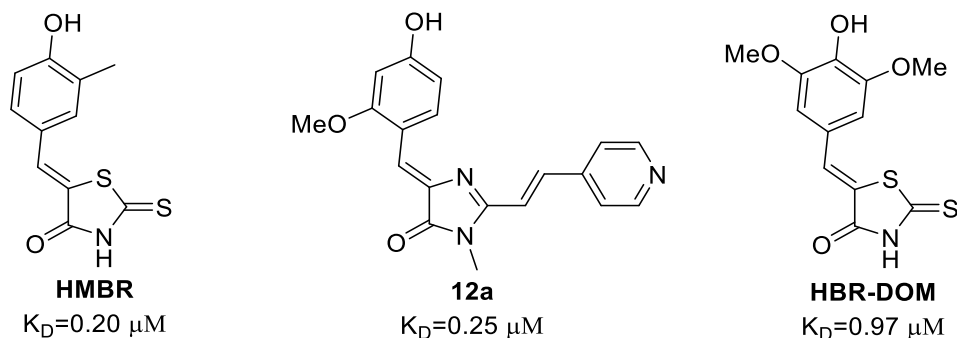
Было установлено, что в растворах соединения **12a** в фосфатном буфере действительно присутствуют и нейтральная и депротонированная форма. При сравнении спектров поглощения и флуоресценции комплекса **12a**-FAST и свободного флуорогена **12a** в фосфатном буфере можно увидеть сильное перекрывание сигналов, особенно хорошо это заметно в спектрах эмиссии:



**Рисунок 4. Спектры абсорбции (пунктирная линия) и эмиссии (сплошная линия) соединения **12a** в свободном виде (серый) и в виде комплекса с белком FAST (черный) в фосфатном буфере.**

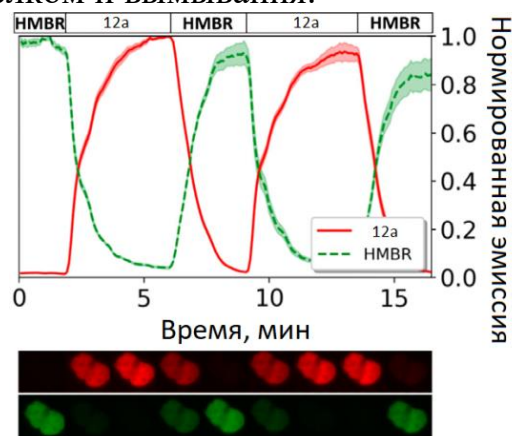
Однако, квантовый выход флуоресценции нейтральной и анионной формы соединения **12a** в водных растворах не превышает 0.2 %, что на два порядка меньше квантового выхода комплекса **12a**-FAST (квантовый выход равен 25 %). Таким образом, незначительная фоновая флуоресценция несвязанного флуорогена будет обеспечивать хорошую контрастность флуоресцентного сигнала метки.

Константа диссоциации комплекса **12a**-FAST составила 0.25  $\mu$ M, что близко к аналогичным показателям некоторых из ранее предложенных флуорогенов:



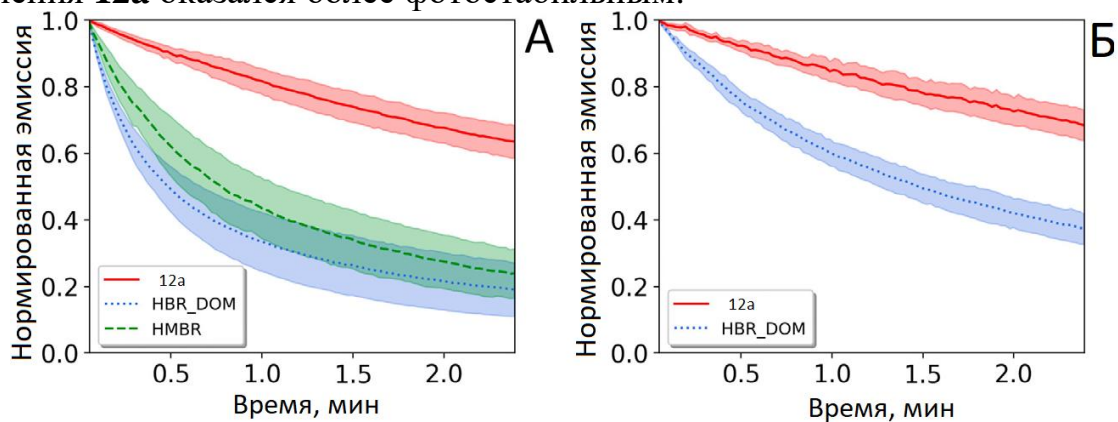
**Схема 13. Флуорогены HMBR, HBR-DOM и 12a.**

Окрашивание живых клеток линии HEK293NT, трансфицированных H2B-FAST, показало, что флуороген **12a** имеет аналогичную флуорогену **HMBR** скорость связывания с белком и вымывания:



**Рисунок 5. Флуоресцентная микроскопия клеток линии HEK293NT, трансфицированных вектором H2B-FAST, при попеременном добавлении и отмывании флуорогенов HMBR и 12a; масштабная линейка 10μm.**

Также наши коллеги из лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов показали, что этот комплекс, в сравнении с ранее предложенными роданиновыми, имеет заметно большую устойчивость в условиях флуоресцентной микроскопии. При интенсивном облучении зеленым и синим светом комплекс соединения **12a** оказался более флустабильным:



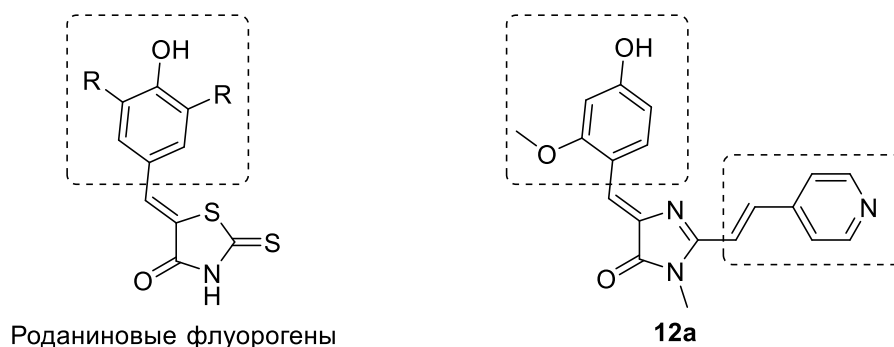
**Рисунок 6. Кривые фотообесцвечивания флуоресцентного сигнала комплексов флуороген-белок в ядрах клеток линии HeLa Kyoto, полученные при облучении лазером 488 нм (А) и 543 нм (Б).**

В заключении можно сказать, что соединение **12a** может быть использовано в качестве флуорогена белка FAST для визуализации структур и процессов в живых системах во флуоресцентной микроскопии. Флуоресцентный комплекс, образующийся при взаимодействии белка с новым флуорогеном, по своим характеристикам сопоставим ранее предложенным. Соединение **12a** не уступает роданиновым производным по эффективности связывания с белком. Более того, новый лиганд формирует комплекс с более широким спектром флуоресценции и заметно большей фотостабильностью.

## 2.2 Расширение палитры флуорогенов для белка FAST

Широкий спектр задач, решаемых с помощью флуоресцентной микроскопии, довольно часто требует разработки меток разной окраски. Такие метки позволяют одновременно следить за разными биологическими объектами в разных каналах микроскопа. Расширить цветовую палитру меток на основе флуороген-активирующих белков значительно проще в сравнении с другими флуоресцентными маркерами. Так как окраска такой метки зависит от флуорогена, то для изменения цвета необходимо модифицировать лишь молекулу флуорогена с помощью химических методов.

Флуорогены белка FAST, созданные на основе производных хромофоров флуоресцентных белков, более доступны для химической модификации, чем роданиновые флуорогены. Молекула 4-гидроксибензилиденроданина имеет только одно направление для модификации – бензилиденовый фрагмент. В то время как ряд производных **12a** может быть легко расширен варьированием стирольных заместителей (схема 14). Кроме того, на сегодняшний день разработано много удобных подходов к созданию и модификации разных имидазолонов.



**Схема 14. Направление для модификации флуорогенов белка FAST.**

Благодаря высокой реакционной способности алкильного заместителя во втором положении имидазольного кольца на следующем этапе данной работы был получен ряд аналогов соединения **12a**, содержащих различные заместители при двойной связи (схема 15).

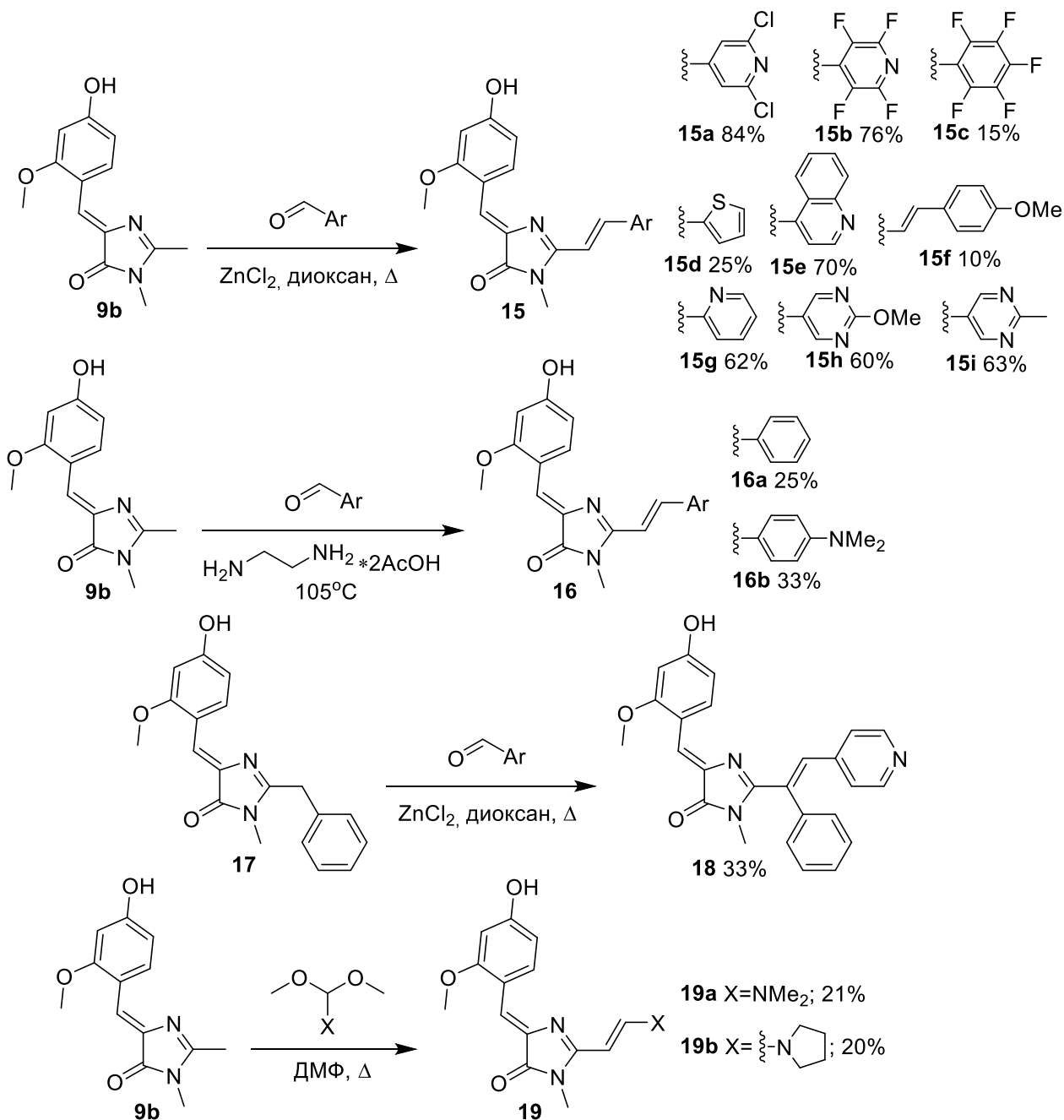
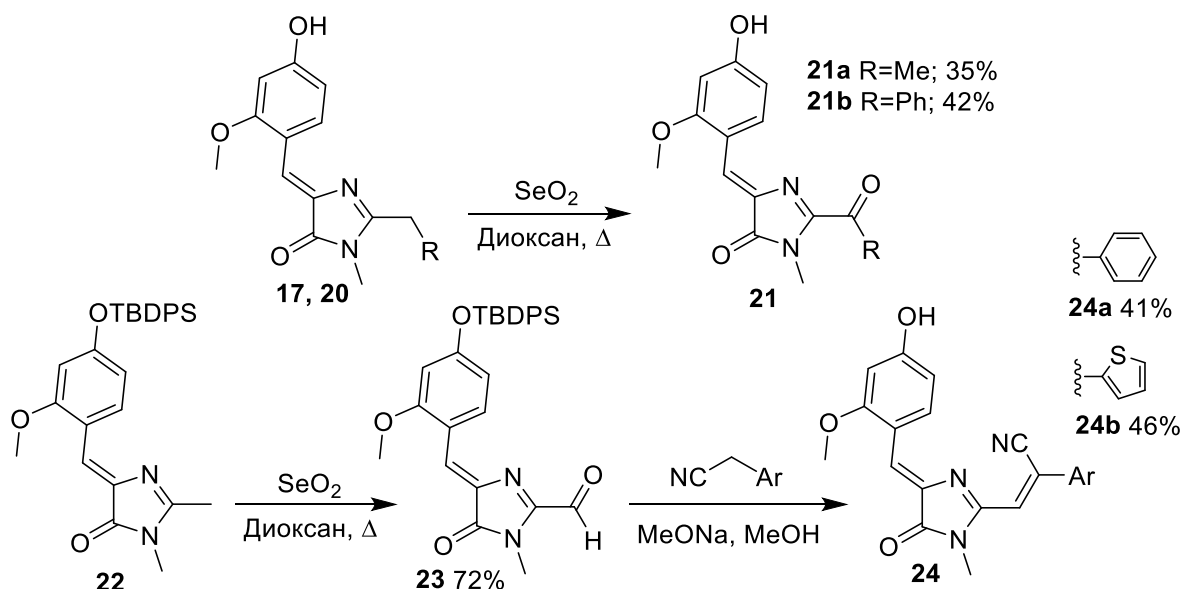


Схема 15. Синтез аналогов соединения **12a**.

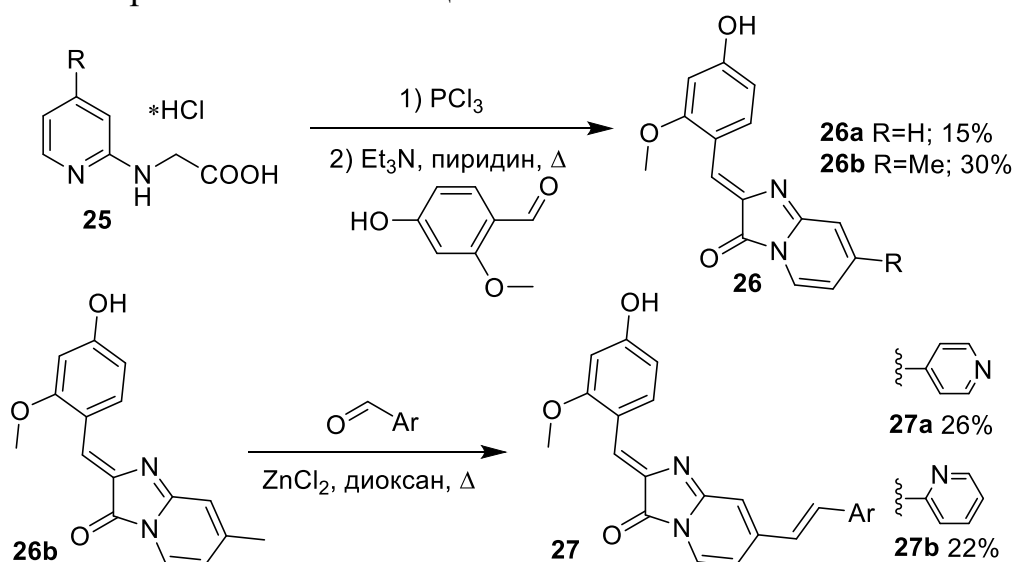
Введение заместителей разного характера позволило получить библиотеку соединений, характеризующихся и гипсохромным и батохромным смещением спектральных максимумов относительно производного **12a**.

С использованием реакции окисления были синтезированы кетонные производные **21a-b** и альдегидный аналог **23** (схема 16). При взаимодействии последнего с различными ароматическими нитрилами были получены аналоги **24a-b**, содержащие нитрильный заместитель при двойной связи:



**Схема 16. Использование диоксида селена в синтезе флуорогенов белка FAST.**

Ряд производных соединения **12a** также был расширен имидазо[1,2-*a*]пиридин-3(2*H*)-онами – аналогами, содержащими дополнительное конденсированное ароматическое кольцо:



**Схема 17. Синтез циклических аналогов 12a.**

Из литературных данных известно, что введение кето- и нитрильных групп, а также удлинение  $\pi$ -системы сопряженных связей позволяет значительно сместить поглощение и флуоресценцию в длинноволновую область.

Образец белка FAST был подготовлен сотрудниками лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов ИБХ РАН. Скрининг этой библиотеки проводился уже не на иммобилизованном белке, а в растворе с использованием плашечного ридера. Было установлено, что все полученные соединения проявляют флуорогенные свойства. Однако в некоторых случаях интенсивность сигнала увеличивалась не более чем в 50 раз. Такие результаты были получены для енаминных **19a-b**, кетонных **21a-b** и циклического **26a** производных, а также аналогов **18** и **24a-b**, содержащих дополнительные заместители при двойной связи. Поэтому эти соединения были исключены из дальнейшего исследования.

Изучение оптических свойств новых комплексов с белком FAST показало, что все они имеют квантовый выход флуоресценции от 5 до 30 %, за исключением циклического производного **26b** (таблица 7). Также было отмечено, что введение различных арильных заместителей незначительно влияет на константу связывания – величина  $K_D$  изменяется в диапазоне от 0.15 до 0.95  $\mu\text{M}$ :

**Таблица 7. Оптические свойства соединений 12a, 15a-i, 16a-b, 26b и 27a-b в виде комплекса с белком FAST в фосфатном буфере (вещества расположены в порядке увеличения батохромного сдвига максимума флуоресценции).**

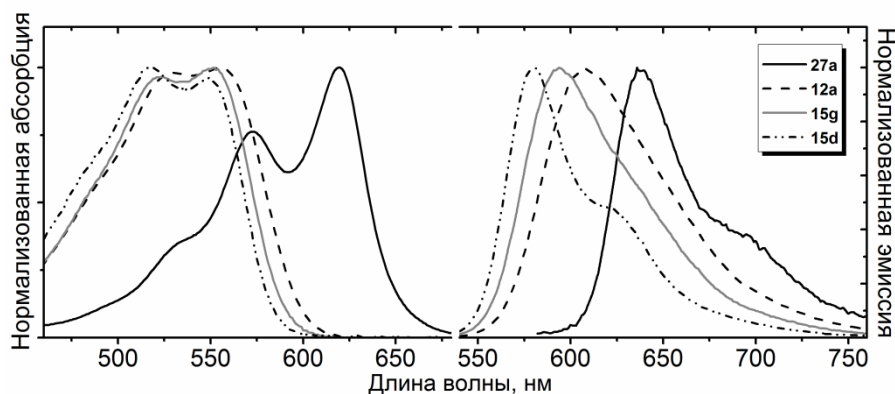
	Абсорбция, нм	$\epsilon$ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Эмиссия, нм	КВФ, %	$K_D$ , $\mu\text{M}$	Яркость (КВФ $\cdot$ $\epsilon$ )
<b>16a</b>	539	33000	570	26	0.44	8600
<b>15d</b>	549	34000	579	28	0.58	9500
<b>15h</b>	547	36000	582	15	0.44	5400
<b>26b</b>	570	65500	584	0.7	0.21	450
<b>15f</b>	525	22500	588	~5	0.86	~5400
<b>15c</b>	519	21000	590	~15	0.93	~3000
<b>15g</b>	552	47000	593	32	0.44	15000
<b>15i</b>	552	47000	595	14	0.16	6600
<b>16b</b>	549	41500	605	20	0.40	8300
<b>12a</b>	562	23000	606	25	0.25	5800
<b>27b</b>	617	40000	634	14	0.17	5600
<b>27a</b>	619	56000	636	18	0.14	10100
<b>15e</b>	533	21000	641	5,5	0.27	1200
<b>15a</b>	542	16500	644	29	0.16	5000
<b>15b</b>	542	15500	645	32	0.29	4800

КВФ – квантовый выход флуоресценции,  $\epsilon$  – коэффициент молярного поглощения

Введение разных электронодонорных и акцепторных групп позволило получить комплексы с флуоресценцией в диапазоне 550-650 нм (таблица 7). Наиболее красные производные были получены при увеличении системы сопряженных двойных связей (циклические производные **27a-b** или соединение **15e**) и введении в пиридиновое кольцо галогенов (соединения **15a** и **15b**).

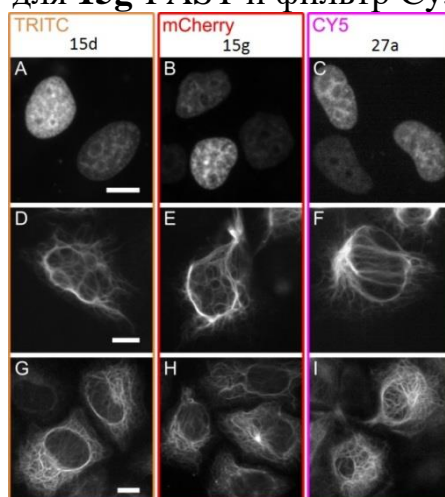
На следующем этапе этого исследования нашими коллегами из лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов ИБХ РАН новые флуорогены были протестированы в окрашивании живых клеток HeLa, трансфицированных конструкцией H2B-TagBFP2-FAST. Флуоресцентный белок TagBFP2 был использован в качестве стандарта для оценки яркости и уровня фоновой флуоресценции по отношению к флуоресцентному сигналу комплекса. Для проведения этого эксперимента из всех соединений, представленных в таблице 7 были отобраны те, которые при формировании комплекса с белком FAST демонстрируют большую яркость или имеют более красную флуоресценцию чем соединение **12a**. В результате было установлено, что для трех соединений **15d**, **15g** и **27a** наблюдается эффективное окрашивание ядер клеток в отсутствие нецелевой флуоресценции.

Флуорогены **15d** и **15g** характеризуются гипсохромным сдвигом спектральных максимумов относительно производного **12a**, а соединение **27a** – батохромным:



**Рисунок 7.** Спектры абсорбции и эмиссии соединений **15d**, **15g**, **12a** и **27a** в виде комплекса с белком FAST в фосфатном буфере.

Сотрудниками лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов ИБХ РАН было показано, что такая разница позволяет отслеживать меченые объекты с использованием разных флуоресцентных фильтров. Фильтр TRITC использовался для детектирования флуоресцентного сигнала комплекса **15d**-FAST, фильтр mCherry для **15g**-FAST и фильтр Cy5 для **27a**-FAST:



**Рисунок 8.** Флуоресцентная микроскопия клеток линии HeLa, трансфицированных конструкцией H2B-FAST (A, B, C), виментин-FAST (D, E, F) и цитокератин-FAST (G, H, I) с флуорогенами **15d**, **15g** и **27a**; масштабная линейка 10µм.

В результате было продемонстрировано, что бензилиденимидазолонны являются отличной основой для создания флуорогенов белка FAST различной окраски. Современные удобные и доступные химические методы позволяют синтезировать библиотеки производных имидазолонов с различными заместителями и разными оптическими свойствами.



## ВЫВОДЫ

1. На основе реакции *O*-алкилирования амидоацетатов тетрафторборатом триэтиоксония разработан новый метод синтеза бензилиденимидазолонов, позволяющий получать производные с разными вариантами заместителя во втором положении имидазолонового цикла.
2. Показано, что окисление при помощи диоксида селена может быть использовано для создания широкого набора замещенных бензилиденимидазолонов, отличающихся заметным bathochromным смещением максимумов абсорбции и эмиссии по сравнению с исходными соединениями.
3. С помощью скрининга библиотеки веществ показано, что некоторые производные хромофоров флуоресцентных белков демонстрируют эффективное связывание с флуороген-активирующим белком FAST, сопровождающееся многократным возрастанием интенсивности флуоресценции.
4. Определены взаимосвязи между строением производных хромофоров флуоресцентных белков, способностью связываться с белком FAST и свойствами образующихся комплексов. Предложены направления для структурной модификации флуорогенов.
5. Получена группа веществ, различающихся по своей окраске, которые могут быть использованы в роли флуорогенов белка FAST. Показано что они могут применяться во флуоресцентной микроскопии для окрашивания живых систем.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи

1. Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Yu., **Myasnyanko I.N.**, Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S. Red-shifted substrates for FAST fluorogen-activating protein based on the GFP-like chromophores // *Chem. Eur. J.* 2019. Т. 25. № 41. С. 9592-9596.
2. Sokolov A.I., **Myasnyanko I.N.**, Baleeva N.S., Baranov, M.S. Convenient and Versatile Synthetic Protocol for Arylidene-1H-imidazol-5(4H)-ones // *ChemistrySelect.* 2020. Т. 5. № 23. С. 7000-7003.
3. Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., **Myasnyanko I.N.**, Sokolov A.I., Baranov M.S. Synthesis of 2-arylideneimidazo[1,2-a]pyrazine-3,6,8(2H,5H,7H)-triones as a result of oxidation of 4-arylidene-2-methyl-1H-imidazol-5(4H)-ones with selenium dioxide // *Chem. Heterocycl. Comp.* 2020. Т. 56. № 1. С. 116–119.
4. **Myasnyanko I.N.**, Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Yu., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshevskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., Baranov, M.S. Color Tuning of Fluorogens for FAST Fluorogen-Activating Protein // *Chem. Eur. J.* 2020. Т. 27. № 12. С. 3986-3990.

### Тезисы докладов на конференциях

1. **Мяснянко И.Н.**, Балеева Н.С., Баранов М.С. Новые флуорогены для белка FAST // Материалы XXXII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – М: ИБХ РАН – 2020. С. 22.
2. **Мяснянко И.Н.**, Балеева Н.С., Баранов М.С. Новые флуорогены для белка FAST с расширенным цветовым разнообразием // Материалы XXXIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – М: ИБХ РАН – 2021. С. 85.