



УДК 547.782

## КОНФОРМАЦИОННО-ФИКСИРОВАННЫЙ 5-БЕНЗИЛИДЕН-4*H*-ИМИДАЗОЛТИОН КАК ФЛУОРОГЕННЫЙ КРАСИТЕЛЬ

© 2021 г. И. Н. Мяснянко\*, \*\*, М. А. Сычева\*, А. С. Гавриков\*,  
Н. С. Балеева\*, \*\*, #, М. С. Баранов\*, \*\*

\*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,  
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 22.03.2021 г.

После доработки 10.04.2021 г.

Принята к публикации 12.04.2021 г.

Синтезирован конформационно-фиксированный 5-(4-(диэтиламино)бензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-тион. Установлено, что производное хромофоров флуоресцентных белков, содержащее серу вместо кислорода в имидазолоновом фрагменте, характеризуется смещенными в длинноволновую область спектра поглощением и испусканием и более высоким коэффициентом экстинкции в сравнении с соответствующим производным, содержащим атом кислорода. Показано, что данное соединение может быть использовано во флуоресцентной микроскопии в качестве флуорогенного красителя для флуороген-активирующих белков на основе липокалина.

*Ключевые слова:* GFP, хромофоры, флуорогенные красители, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342321060208

### ВВЕДЕНИЕ

Производные хромофоров флуоресцентных белков – перспективная основа для разработки систем флуоресцентного мечения. Удобные методы синтеза и модификаций позволяют получать вещества с самой разной окраской и разными оптическими свойствами. Такие соединения могут быть использованы для визуализации в качестве флуорогенных лигандов для РНК и белков [1–3], а также для окрашивания отдельных клеточных органелл [4, 5].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что конформационно-фиксированный аминный аналог хромофора GFP (соединение (I), схема 1) может быть использован в качестве флуорогенного красителя для некоторых мутантных форм белка B1c семейства липокалинов [6]. Позднее мы также синтезировали ряд аналогов этого соединения, характеризующихся смещенными в длинноволновую область спектра поглощением и испусканием [7]. Разработка таких красителей – важная задача,

т.к. поглощение света биологическими объектами в области 700–900 нм минимально. Настоящая работа – продолжение этого исследования. Известно, что введение в молекулу красителя атомов серы может привести к смещению спектральных максимумов в длинноволновую область [8, 9]. Мы исследовали эффективность такой модификации на примере аминопроизводного хромофора GFP (I). С помощью известного тионирующего реагента Лавессона мы синтезировали тиопроизводное (II) (схема 1).

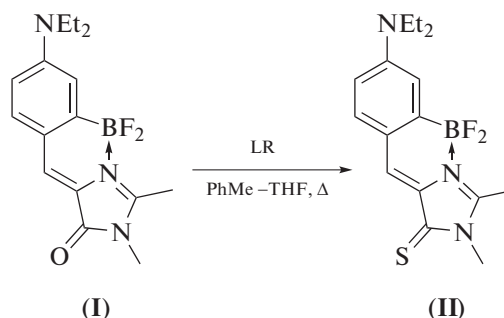


Схема 1. Схема синтеза производного (II). LR – реагент Лавессона (Lawesson's Reagent), PhMe – толуол, THF – тетрагидрофуран.

Исследование оптических свойств полученного соединения (II) и сравнение их со свойствами предшественника (I) показало, что замена кисло-

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцирующий белок (Green Fluorescent Protein).

# Автор для связи: (тел.: +7 (926) 704-13-72; эл. почта: nsbaleeva@gmail.com).

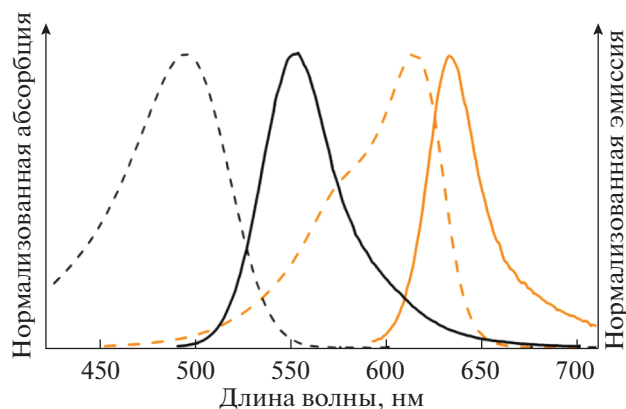


Рис. 1. Спектры абсорбции (пунктир) и эмиссии (сплошная) соединений (I) (черный) и (II) (оранжевый) в ацетонитриле.

рода на серу привела к заметным изменениям. Наблюдается батохромный сдвиг спектральных максимумов на 80–120 нм (рис. 1). Величина квантового выхода флуоресценции соединения (II) варьирует в диапазоне ~10–20% и в меньшей степени зависит от используемого растворителя (табл. 1). Также было обнаружено двух-трехкратное увеличение коэффициента экстинкции (табл. 1).

На следующем этапе работы мы продемонстрировали, что новое тиопроизводное (II) может быть использовано как лиганд для мутанта B1c-A36C/L141N (названного ранее DiB1) [7] для окрашивания живых клеток линии HeLa Kyoto, трансфицированных конструкцией H2B-TagBFP-DiB1. Использование такой конструкции позволило не только оценить возможность применения соединения (II) в качестве флуорогена белка DiB1, но и исследовать селективность окрашивания этой метки. Так, при добавлении тиопроизводного (II) в

клеточную среду наблюдалось появление флуоресцентного сигнала в красном канале (от пары DiB1–соединение (II)), который полностью соответствовал сигналу в синем канале (от белка BFP) (рис. 2), что говорит о селективности окрашивания предложенной нами пары белок–флуороген и отсутствии нецелевого окрашивания.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Оборудование.** Спектры ЯМР ( $\delta$ , м.д.;  $J$ , Гц) регистрировали на приборе Fourier 300 (300 МГц; Bruker, США) при 303 К в  $CDCl_3$  (внутренний стандарт –  $Me_4Si$ ), спектры поглощения – на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения записывали на приборе micrOTOF II (Bruker, США), ионизация электрораспылением.

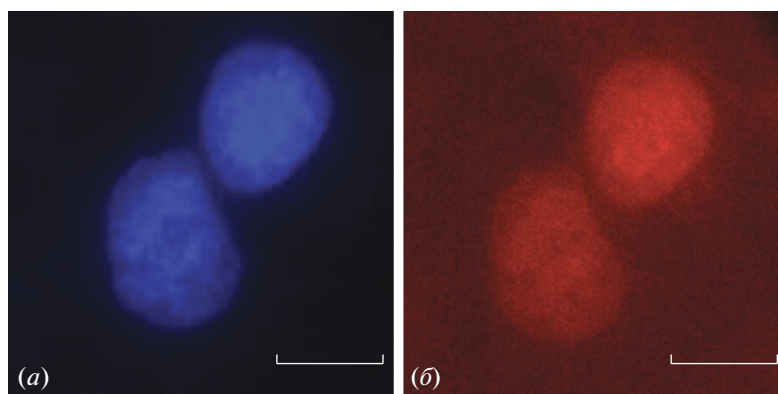
**Синтез.** Соединение (*Z*)-5-(4-(диэтиламино)-2-(дифторборанил)бензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (I) синтезировали согласно описанной ранее методике [10].

**(*Z*)-5-(4-(Диэтиламино)-2-(дифторборанил)бензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-тион (II).** К раствору соединения (I) (150 мг, 0.5 ммоль) в 8 мл смеси толуол–тетрагидрофуран (1 : 1) добавляли 2,4-бис(4-метоксибензил)-1,3,2,4-дифосфетан-2,4-дисульфид (реагент Лавессона) (405 мг, 1 ммоль) и кипятили в течение 10 мин. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали на ротационном испарителе. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент хлористый метилен–эта-

Таблица 1. Оптические свойства соединений (I) и (II) в разных растворителях

| Растворитель | Соединение | Максимум абсорбции, нм | Коэффициент экстинкции, $M^{-1} cm^{-1}$ | Максимум эмиссии, нм | Квантовый выход флуоресценции, % |
|--------------|------------|------------------------|--|----------------------|----------------------------------|
| Вода         | (I)        | 520                    | 54000                                    | 563                  | 3                                |
|              | (II)       | 611                    | 98000                                    | 627                  | 9                                |
| Метанол      | (I)        | 505                    | 48000                                    | 557                  | 22                               |
|              | (II)       | 613                    | 137000                                   | 630                  | 8                                |
| Ацетонитрил  | (I)        | 494                    | 46000                                    | 554                  | 31                               |
|              | (II)       | 614                    | 114000                                   | 632                  | 10                               |
| Этилацетат   | (I)        | 492                    | 47000                                    | 538                  | 63                               |
|              | (II)       | 609                    | 105000                                   | 631                  | 16                               |
| Диоксан      | (I)        | 497                    | 51000                                    | 538                  | 72                               |
|              | (II)       | 610                    | 98000                                    | 630                  | 23                               |

Примечание: данные для соединения (I) взяты из статьи Varanov et al. [10].



**Рис. 2.** Флуоресцентная микроскопия живых клеток HeLa Kyoto, временно трансфицированных конструкцией, кодирующей H2B-TagBFP-DiB1, в синем (а) и красном (б) каналах. Конечная концентрация соединения (II) в растворе – 5 мкМ. Масштабный отрезок – 10 мкм.

нол, 97 : 3). Фиолетовый порошок (85 мг, 50%); т. пл. ~ 250°C с разложением;  $^1\text{H}$ -ЯМР: 7.78 (с, 1 H), 7.43 (д,  $J_2$  8.9, 1 H), 7.13 (с, 1 H), 6.63 (дд,  $J_2$  8.9, 2.7, 1 H), 3.62 (с, 3 H), 3.56 (кв,  $J_2$  7.0, 4 H), 2.83 (с, 3 H), 1.29 (т,  $J_2$  7.0, 6 H);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 177.2, 156.3, 153.1, 137.9, 135.3, 134.4, 124.1, 115.6, 111.9, 45.2, 30.3, 29.7, 12.8; HRMS (ESI)  $m/z$ : найдено  $M$  316.1478; рассчитано для  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{BFN}_3\text{S}^+$ ,  $[M]^+$  316.1450.

**Флуоресцентная микроскопия.** Клеточную линию HeLa Kyoto выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 50 ед./мл пеницилина, 50 мг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 10% бычьего сывороточного альбумина (HyClone, Thermo Scientific, США) при 37°C и 5%  $\text{CO}_2$ . Для временной трансфекции конструкцией H2B-TagBFP-DiB1 использовали трансфекционный агент FuGENE 6 (Promega, США). Непосредственно перед съемкой среду DMEM заменяли на раствор Хэнкса (ПанЭко, Россия) с 20 мМ HEPES (Sigma, США).

Широкопольную флуоресцентную микроскопию проводили с помощью микроскопа Leica 6000 (Leica, Германия) с объективом HCX PL APO 100×/1.40-0.70NA. Микроскоп оснащен камерой Zyla sCMOS (Andor, Oxford Instruments, Великобритания) и источником света CoolLED pE-300. При съемке использовали фильтры BFP и mCherry. Концентрация флуорогена в среде составляла 5 мкМ, мощность облучения – 2 В/см<sup>2</sup> в синем канале (фильтр BFP) и 3.4 В/см<sup>2</sup> в красном канале (фильтр mCherry).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

5-Бензилиден-4Н-имидазолтионы – высокоперспективная основа для создания флуорогенных красителей, характеризующаяся смещенными в длинноволновую область спектра поглоще-

нием и испусканием. Такие соединения могут быть использованы в качестве лигандов флуороген-активирующих белков для окрашивания живых клеток во флуоресцентной микроскопии.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-73-10105).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R. // *Science*. 2011. V. 333. P. 642–646. <https://doi.org/10.1126/science.1207339>
2. Filonov G.S., Moon J.D., Svensen N., Jaffrey S.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. V. 136. P. 16299–16308. <https://doi.org/10.1021/ja508478x>
3. Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Yu., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshchinskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // *Chem. Eur. J.* 2020. V. 27. P. 3986–3990. <https://doi.org/10.1002/chem.202004760>
4. Li X., Zhao R., Wang Y., Huang C. // *J. Mater. Chem. B*. 2018. V. 6. P. 6592–6598. <https://doi.org/10.1039/C8TB01885E>
5. Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., Smirnov A.Yu., Zagudaylova M.B.,

- Baranov M.S.* // *Dyes Pigm.* 2019. V. 170. P. 107550.  
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107550>
6. *Bozhanova N.G., Baranov M.S., Klementieva N.V., Sarkisyan K.S., Gavrikov A.S., Yampolsky I.V., Zagaynova E.V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S.* // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. P. 7138–7142.  
<https://doi.org/10.1039/C7SC01628J>
7. *Bozhanova N.G., Baranov M.S., Baleeva N.S., Gavrikov A.S., Mishin A.S.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 3778.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19123778>
8. *Ohulchansky T.Y., Donnelly D.J., Detty M.R., Prasad P.N.* // *J. Phys. Chem. B.* 2004. V. 108. P. 8668–8672.  
<https://doi.org/10.1021/jp0370674>
9. *Grimm J.B., Tkachuk A.N., Xie L., Choi H., Mohar B., Falco N., Schaefer K., Patel R., Zheng Qi., Liu Z., Lippincott-Schwartz J., Brown T.A., Lavis L.D.* // *Nat. Methods.* 2020. V. 17. P. 815–821.  
<https://doi.org/10.1038/s41592-020-0909-6>
10. *Baranov M.S., Solntsev K.M., Baleeva N.S., Mishin A.S., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V.* // *Chem. Eur. J.* 2014. V. 20. P. 13234–13241.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201403678>

## Conformationally Locked 5-Benzylidene-4*H*-Imidazolthion as Fluorogenic Dye

I. N. Myasnyanko<sup>\*, \*\*</sup>, M. A. Sycheva<sup>\*</sup>, A. S. Gavrikov<sup>\*</sup>, N. S. Baleeva<sup>\*, \*\*, #</sup>, and M. S. Baranov<sup>\*, \*\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (926) 704-13-72; e-mail: [nsbaleeva@gmail.com](mailto:nsbaleeva@gmail.com)

<sup>\*</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

<sup>\*\*</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

We report novel conformationally locked 5-(4-(diethylamino)benzylidene)-2,3-dimethyl-3,5-dihydro-4*H*-imidazole-4-thion. Derivatives of conformationally locked chromophores of the fluorescent protein containing sulfur instead of oxygen in the imidazolone fragment are characterized by red-shifted spectra and higher extinction coefficient relative to the corresponding derivative containing an oxygen atom. That compound can be used as fluorogenic dyes for lipocalin-based fluorogen-activating proteins in fluorescent microscopy.

*Keywords:* GFP, chromophores, fluorogenic dyes, fluorescence