БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2019, том 45, № 3, с. 333–336

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.782

ПОЛУЧЕНИЕ НОВОГО АНАЛОГА ХРОМОФОРА ЗЕЛЕНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА ИЗ ПРОИЗВОДНОГО КОРИЧНОГО АЛЬДЕГИДА

© 2019 г. С. О. Зайцева*, #, 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*

Поступила в редакцию 30.11.2018 г.
После доработки 04.12.2018 г.
Принята к публикации 19.12.2018 г.

Новое производное хромофора зеленого флуоресцентного белка (*Z*)-5-((*E*)-4-(4-гидроксифенил)аллилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он, было получено с использованием карбоксиимидата на ключевой стадии синтеза. Сравнение оптических свойств полученного соединения и классического аналога хромофора GFP – 5-(4-гидроксибензилиден)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она – показало, что максимумы поглощения и эмиссии созданного нами производного смещаются в более длинноволновую область с ростом размера сопряженной π-системы бензилиденового фрагмента.

Ключевые слова: имидазолоны, хромофоры, флуоресцентные красители, GFP, оптические свойства

DOI: 10.1134/S0132342319030072

Синтетические аналоги хромофоров флуоресцентных белков – различные бензилиденимидазолоны – являются предметом пристального внимания исследователей вот уже почти четыре десятилетия. Интенсивная окраска, небольшой размер, высокая растворимость и легко варьируемые с помощью заместителей спектральные характеристики позволяют успешно использовать данные соединения в химических и биологических исследованиях [1]. В качестве флуоресцентных [2] и флуорогенных [3] красителей такие молекулы могут применяться при визуализации разнообразных клеточных структур, мечения различных объектов, разработке ионных или pH-чувствительных сенсоров [4, 5].

Основной характеристикой, определяющей возможность применения аналога хромофора в качестве красителя, является положение максимумов абсорбции и эмиссии. В связи с тем, что область поглощения большинства биологических объектов лежит в коротковолновой части спектра, получение соединений, демонстрирующих существенный батохромный сдвиг, представляет актуальную задачу.

Как известно, подобного смещения часто удается добиться путем увеличения размера сопряженной π-системы молекулы красителя. Так, для различных производных хромофора GFP (5-(4-гидроксибензилиден)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она) (схема 1) подобная модификация чаще всего производится по второму положению имидазолонового цикла. В частности, введение в это положение стирольного фрагмента приводит к образованию производных хромофора белка Kaede (схема 1), обладающих заметным батохромным смещением [6]. Эти соединения находят применение в качестве красителей, а также могут использоваться как сенсибилизирующие краски в солнечных батареях [7].

В настоящей работе мы предложили альтернативный вариант увеличения системы сопряженных связей производного хромофора GFP для смещения положений максимумов абсорбции и эмиссии – модификацию по бензилиденовому фрагменту (схема 1).

Сокращения: DIBALH – гидрид диизобутилалюминия; GFP – зеленый флуоресцентный белок; PDC – дихромат пиридиния; TBAF – тетрабутиламмонийфторид; TBDMS – *трет*-бутилдиметилсилил.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (499) 724-81-22; эл. почта: snezhana_zaitseva@mail.ru).

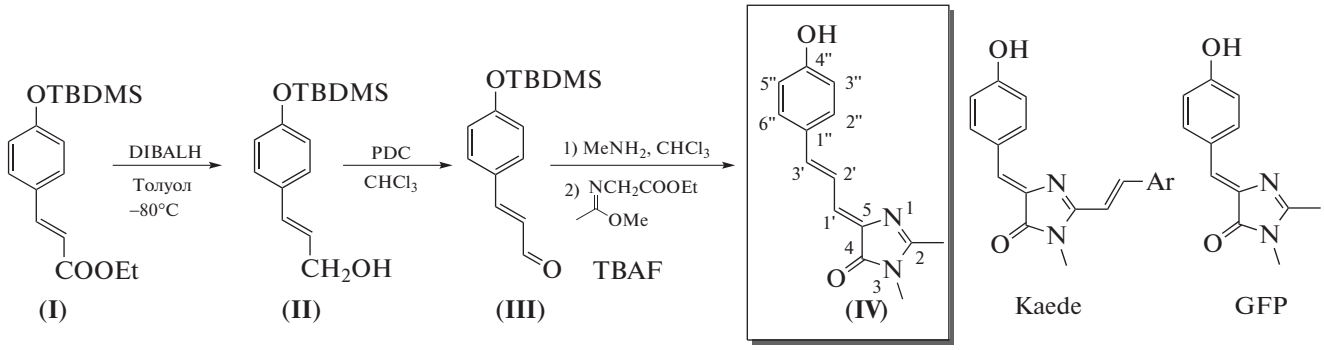

Схема 1. Схема синтеза производного (**IV**).

Синтез соединения (**IV**) был проведен с использованием производного коричного альдегида (схема 1), так как одним из наиболее универсальных методов синтеза бензилиденимидазолонов является взаимодействие оснований Шиффа, полученных из альдегидов, с карбоксиимидатом [8]. Необходимый альдегид (**III**) был получен с достаточно хорошим выходом из коммерчески доступного силилированного производного этилфенилакрилата (**I**) восстановлением и последующим окислением (схема 1). Удивительным образом образование основания Шиффа не было затруднено побочными реакциями α,β-непредельного альдегида. Из-за наличия сопряженных двойных связей конечное соединение (**IV**) было получено в виде смеси *E*- и *Z*-изомеров по обеим двойным связям, которую, однако, легко удалось перевести в индивидуальный изомер, а именно *E*- по положению 3' и *Z*- по положению 1' аллилиденового остатка (схема 1) в ходе медленного переосаждения из метанола, что хорошо подтверждается данными ЯМР: константа спин-спинового взаимодействия между атомами водорода при связи 2'-3' составляет 11.4 Гц, что соответствует *транс*-конфигурации, а положение сигнала протона при атоме 1' соответствует типичному положению для *Z*-изомеров других производных хромофора GFP, у которых эта конфигурация является наиболее стабильной [9].

Изучение оптических свойств полученного соединения (**IV**) (рис. 1, табл. 1), а также сравнение их со свойствами GFP показало, что введение увеличенной сопряженной π-системы в безилиденовой части молекулы приводит к батохромному смещению максимумов абсорбции и эмиссии.

Таким образом, нами был получен новый аналог хромофора GFP из производного коричного альдегида. Максимумы абсорбции и эмиссии данного соединения лежат в более длинноволновой области, чем у аналога хромофора GFP, за счет увеличения сопряженной системы π-связей в бензилиденовом фрагменте.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР (δ м.д., *J* Гц) зарегистрированы на приборе Bruker Avance III (700 МГц, США) в DMSO-d_6 и дейтерохлороформе (внутренний стандарт – Me_4Si). Спектры поглощения в УФ и видимом диапазонах регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio (США). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуо-

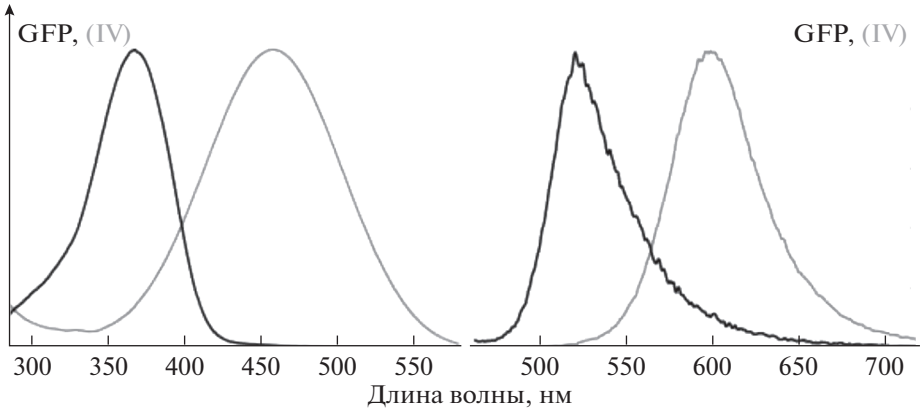

Рис. 1. Нормализованные спектры абсорбции (слева) и эмиссии (справа) растворов хромофора GFP (черный) и соединения (**IV**) (серый) в воде при pH 10.

Таблица 1. Положения максимумов поглощения и испускания хромофора GFP и соединения (**IV**)

Растворитель	GFP		(**IV**)	
	$\lambda_{абс}$, нм	$\lambda_{эм}$, нм	$\lambda_{абс}$, нм	$\lambda_{эм}$, нм
Диоксан	369	435	388	482
Этилацетат	367	420	386	491
Ацетонитрил	368	438	385	508
Метанол	370	436	397	513
Вода (нейтральная форма)	367	453	395	458
Вода (депротонированная форма)	425	491	458	600

риметре Varian Cary Eclipse (США). Температуры плавления определены на приборе SMP 30 (Великобритания) и не исправлены.

(*E*)-3-(4-((*трет*-Бутилдиметилсилил)окси)фенил)проп-2-ен-1-ол (II). Раствор 2.97 г (10 ммоль) этил-(*E*)-3-(4-((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-фенил)акрилата) (**I**) [10] в 60 мл толуола охлаждали до −80°C. Добавляли гидрид диизобутилалюминия (DIBALH) (10.6 мл, 60 ммоль), выдерживали 20 ч при −80°C. Затем в реакционную смесь добавляли 400 мл этилацетата и 150 мл раствора тартрата калия, перемешивали в течение 1 ч. Далее водную фазу экстрагировали этилацетатом (2 × 150 мл), органические фракции объединяли, промывали насыщ. раствором NaCl (2 × × 100 мл). Раствор высушивали над безводным Na_2SO_4, упаривали, и продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (EtOAc–гексан, 1 : 3). Выход продукта (**II**) 2.14 г (81%). ^{1}H-ЯМР: δ 7.28 (д, J_2 8.7, 2H, H2", H6"), 6.80 (д, J_2 8.7, 2H, H3", H5"), 6.56 (д, J_2 16.0, 1H, H3'), 6.25 (дт, J_2 15.8, 6.0, 1H, H2'), 4.30 (т, J_2 5.2, 2H, CH_2), 1.00 (с, 9H, *t*-Bu), 0.21 (с, 6H, 2 CH_3). Соответствует литературе [11].

(*E*)-3-(4-((*трет*-Бутилдиметилсилил)окси)фенил)акрилальдегид (III). К раствору спирта (**II**) в 50 мл хлороформа добавляли 20 экв. дихромата пиридиния. Раствор перемешивали в течение 1.5 ч при комнатной температуре, за протеканием реакции следили ТСХ в системе EtOAc-гексан, 1 : 3. Реакционную смесь отфильтровывали через 1 см силикагеля, упаривали. Выход 823 мг (39%). ^{1}H-ЯМР: δ 9.67 (д, J_2 7.7, 1H, CHO), 7.48 (д, J_2 8.5, 2H, H2", H6"), 7.42 (д, J_2 15.8, 1H, H3'), 6.89 (д, J_2 8.5, 2H, H3", H5"), 6.62 (дд, J_2 15.8, 7.7, 1H, H2'), 1.00 (с, 9H, *t*-Bu), 0.25 (с, 6H, 2 CH_3). Соответствует литературе [12].

5-([1*Z*,3*E*]-4-(4-Гидроксифенил)аллилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (IV). 1) К раствору 262 мг (1 ммоль) альдегида (**III**) в 20 мл хлороформа, добавляли 0.3 мл 40% водного раствора метиламина и безводный сульфат натрия (2 г). Смесь перемешивали в течение 48 ч при комнатной температуре, затем органическую фазу отделяли, высушивали над безводным Na_2SO_4 и упаривали.

2) Полученный имин (1 ммоль) смешивали с этил-2-((1-метоксиэтилиден)амино)ацетатом (175 мг, 1.1 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 36 ч. Затем в реакционную смесь добавляли 50 мл этилацетата, промывали водой (2 × 5 мл) и насыщ. раствором NaCl (2 × 5 мл). К органической фазе добавляли 10 экв. фторида тетрабутиламмония, перемешивали 10 мин и добавляли 2 мл ледяной уксусной кислоты. Реакционную смесь промывали водой (5 × 5 мл) и насыщ. раствором NaCl (3 × 5 мл). Раствор высушивали над безводным Na_2SO_4, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии (градиент EtOAc–EtOAc : *i*-PrOH, 1 : 4). Индивидуальный изомер (*E* по положению 3' и *Z*- по положению 1') был получен путем медленного переосаждения из метанола. Выход 88 мг (36%) желт. крист., т. пл. около 300°C с разложением. ^{1}H-ЯМР: δ 9.88 (с, 1H, OH), 7.44 (д, J_2 8.2, 2H, H2", H6"), 7.29 (дд, J_2 15.4, 11.6, 1H, H2'), 7.11 (д, J_2 15.6, 1H, H1'), 6.84 (д, J_2 11.4, 1H, H3'), 6.79 (д, J_2 8.2, 2H, H3", H5"), 3.06 (с, 3H, 3-CH_3), 2.29 (с, 3H, 2-CH_3). ^{13}C-ЯМР: δ 168.7 (C4), 161.0 (C2), 158.9 (C4"), 141.6 (C3'), 138.3 (C1'), 129.1 (C2", C6"), 127.4 (C1"), 127.3 (C5), 120.0 (C2'), 115.9 (C3", C5"), 26.1 (3-CH_3), 15.0 (2-CH_3).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа поддержана грантом РФФИ 17-00-00401_КОМФИ. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEFI62117X0018.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Walker C.L., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V., Mishin A.S., Duraj-Thatte A.M., Bahareh A., Tolbert L.M., Solntsev K.M.* // Curr. Opin. Chem. Biol. 2015. V. 27. P. 64–74.
2. *Yuan L., Lin W., Chen H., Zhu S., He L.* // Angew. Chem. 2013. V. 52. P. 10018–10022.
3. *Povarova N.V., Bozhanova N.G., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Baranov M.S., Yampolsky I.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S.* // J. Mater. Chem. C. 2016. V. 4. P. 3036–3040.
4. *Baldridge A., Solntsev K.M., Song C., Tanioka T., Kowalik J., Tolbert L.M.* // Chem. Commun. 2010. V. 46. P. 5686–5688.
5. *Olsen S., Baranov M.S., Baleeva N.S., Antonova M.M., Johnsond K.A., Solntsev K.M.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2016. V. 18. P. 26703–26711.
6. *Yampolsky I.V., Kislukhin A.A., Amatov T.T., Shcherbo D., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // Bioorg. Chem. 2008. V. 36. P. 96–104.
7. *Chuang W.T., Chen B.S., Chen K.Y., Cheng-Chih H.* // Chem. Commun. 2009. V. 45. P. 6982–6984.
8. *Baldridge A., Kowalik J., Tolbert L.M.* // Synthesis. 2010. № 14. P. 2424–2436.
9. *Bozhanova N.G., Baranov M.S., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Mineev K.S., Golodukhina S.V., Baleeva N.S., Lukyanov K.A., Mishin A.S.* // ACS Chem. Biol. 2017. V. 12. P. 1867–1873.
10. *Boschi D., Tron G. C., Lazzarato L., Chegaev K., Cena C., Di Stilo A., Giorgis M., Bertinaria M., Fruttero R., Gasco A.* // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 2886–2897.
11. *Hiroyuki A., Kawahara E., Kishida M., Kato K.* // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2006. V. 40. P. 8–15.
12. *Satoshi I., Rika O., Chihiro M., Masahiro K., Kazutoshi H., Mitsuhiro N., Yoshiharu A., Satoshi K., Takashi H., Shojiro M., Haruki N.* // Tetrahedron. 2013. V. 69. P. 3847–3856.

Synthesis of the New Green Fluorescent Protein Chromophore Analogue Starting from the Cinnamic Aldehyde Derivative

S. O. Zaitseva*, # and M. S. Baranov*

#Phone: +7 (499) 724-81-22; e-mail: snezhana_zaitseva@mail.ru

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

A novel derivative of green fluorescent protein chromophore (*Z*)-5-((*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)allylidene)-2,3-dimethyl-3,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-one was synthesised. The desired compound was prepared by the synthetic approach based on the use of carboxyimidate. Comparison of optical properties of the obtained compound and of the classical GFP chromophore analogue (*Z*)-5-(4-hydroxybenzylidene)-2,3-dimethyl-3,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-one showed the shift of absorption and emission maxima to the long-wavelength region induced by the increase of the conjugated π-system in the benzylidene fragment.

Keywords: imidazolones, chromophores, fluorescent dyes, GFP, optical properties