



УДК 547.782

СТИРОЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ИНДОЛА И ПИРАНОНА КАК ФЛУОРОГЕННЫЕ СУБСТРАТЫ ДЛЯ БЕЛКА FAST

© 2021 г. А. И. Соколов*, И. Н. Мяснянко*, 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 07.07.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г.

Принята к публикации 13.07.2020 г.

Синтезированы стирольные производные индола и пиранона. Исследована возможность их использования в качестве флуорогенов для белка FAST. Установлено, что производные индола не проявляют заметных флуорогенных свойств, в то время как производные пиранона демонстрируют высокую флуорогенность — их связывание с белком приводит к усилению флуоресценции и смещению максимумов эмиссии в длинноволновую область.

Ключевые слова: флуорогены, флуороген-активирующие белки, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342321010231

Генетически-кодируемые метки давно и активно используются во флуоресцентной микроскопии. В последнее время помимо традиционных флуоресцентных белков в подобной роли все чаще используются так называемые флуороген-активирующие белки [1–3]. Взаимодействие этих белков с флуорогенами — низкомолекулярными соединениями, которые в свободном виде не имеют выраженной флуоресценции — приводит к образованию флуоресцентного комплекса [4]. В отличие от флуоресцентных белков, такие белки можно использовать в отсутствие кислорода, и им не требуется дополнительного времени для созревания. Довольно часто заметные флуорогенные свойства проявляют соединения, имеющие в своей структуре подвижный заместитель, фиксация которого приводит к росту квантового выхода флуоресценции. Например, некоторые производные хромофора GFP и родственные им роданины, содержащие подвижный бензилиденный фрагмент, были успешно применены в качестве флуорогенов для белка FAST [5–8]. Также в роли флуорогенов довольно часто выступают красители, содержащие подвижные стирольные заместители [9–11].

В настоящей работе в качестве потенциальных флуорогенных красителей для белка FAST мы

предложили стирольные производные индола и пиранона. Такие соединения были получены с помощью конденсации ароматических альдегидов с исходными метил-3*H*-индолия перхлоратом (I) и метил-2*H*-пираноном (VI) в присутствии основания (схема 1).

Изучение оптических свойств показало, что полученные соединения характеризуются схожими свойствами. Производные индола (II) и (III), как и производные пиранона (VII) и (VIII), имеют максимумы абсорбции в области ~350 и ~500 нм для нейтральных и анионных форм соответственно (табл. 1). Также они характеризуются слабой флуоресценцией в области 500–600 нм в фосфатном буфере (с квантовым выходом <1%).

Было установлено, что добавление белка FAST в растворы производных пиранона (VII) и (VIII) приводит к усилению флуоресценции в 20–30 раз, а также батохромному сдвигу максимумов эмиссии на 50 нм (рис. 1). Напротив, производные индола (II) и (III) никак не реагировали на присутствие этого белка (рис. 1).

Таким образом, можно заключить, что стирольные производные пиранона могут быть использованы в качестве основы для создания флуорогенных красителей для белка FAST, в то время как индольные производные в подобной роли не перспективны.

Сокращения: GFP — зеленый флуоресцентный белок; FAST — Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag.

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

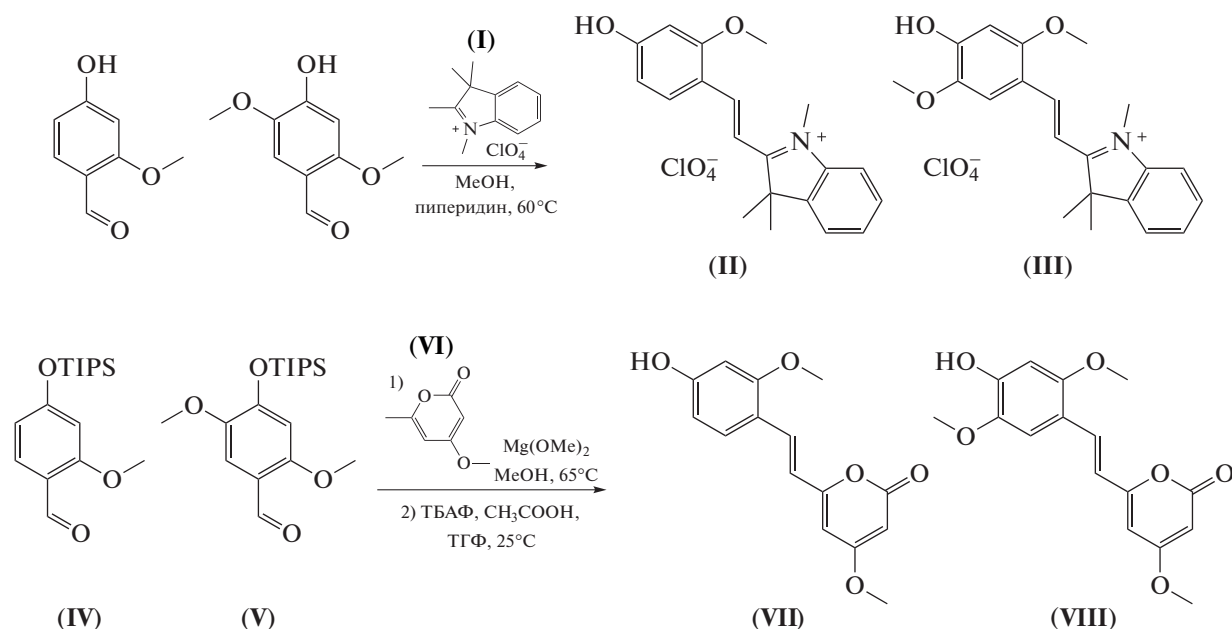


Схема 1. Схема синтеза производных (II), (III), (VII) и (VIII).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) зарегистрированы на приборе Bruker Avance III (700 МГц, США) при 303 К в DMSO- d_6 (внутренний стандарт – Me₄Si). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio (США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США). Температуры плавления определены на приборе SMP 30 (Великобритания) и не исправлены. Масс-спектры высокого разрешения записаны на приборе Bruker micrOTOF II, ионизация электрораспылением.

Препарат выделенного белка FAST получен согласно методике, описанной ранее [7].

Перхлораты *E*-2-(4-гидроксистирил)-1,3,3-триметил-3*H*-индолия. Соответствующий ароматический альдегид (1 ммоль), перхлорат 1,2,3,3-тетраметил-3*H*-индолия (1.05 ммоль, 271 мг) и пипе-

ридин (0.05 ммоль) растворяли в метаноле (10 мл) и перемешивали при 60°C в течение 4 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, выпавший осадок отфильтровывали, промывали метанолом (3 × 3 мл) и диэтиловым эфиром (3 × 5 мл). Полученный продукт сушили под вакуумом.

Перхлорат *E*-2-(4-гидрокси-2-метоксистирил)-1,3,3-триметил-3*H*-индолия (II). Оранжевый порошок (346 мг, 85%); т. пл. ~ 200°C с разложением; ¹H-ЯМР: 11.05 (с, 1H), 8.41 (д, J_2 16.2, 1H), 8.11 (д, J_2 8.6, 1H), 7.78–7.84 (м, 2H), 7.65–7.50 (м, 2H), 7.48 (д, J_2 16.0, 1H), 6.56–6.62 (м, 2H), 4.01 (с, 3H), 3.97 (с, 3H), 1.73 (с, 6H); ¹³C-ЯМР: 181.1, 165.8, 162.4, 148.2, 142.7, 141.9, 133.1, 128.8, 128.4, 122.6, 114.8, 114.3, 109.7, 108.5, 99.3, 56.2, 51.2, 33.6, 26.3; HRMS (ESI) m/z : найдено M 308.1651; рассчитано для C₂₀H₂₂NO₂⁺, [M]⁺ 308.1645.

Таблица 1. Оптические свойства соединений (II), (III), (VII) и (VIII) в свободном виде и в составе комплекса с белком FAST

| Соединение | Абсорбция в свободном виде, нм | | | Комплекс с белком FAST (фосфатный буфер, pH 7) | |
|------------|--------------------------------|--------|-----------------------|---|-------------|
| | ацетонитрил | | фосфатный буфер, pH 7 | абсорбция, нм | эмиссия, нм |
| | нейтр. | анион. | | | |
| (II) | 350 | 520 | 529 | 530 | 550 |
| (III) | 360 | 505 | 549 | 550 | 575 |
| (VII) | 368 | 477 | 372 | 480 | 550 |
| (VIII) | 385 | 502 | 383 | 500 | 595 |

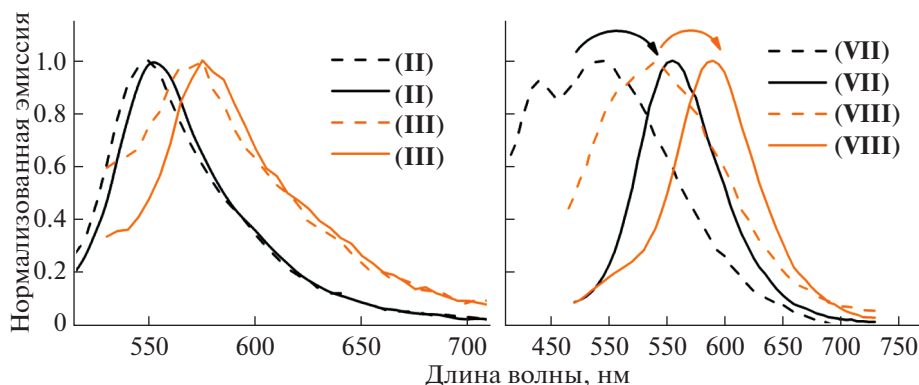


Рис. 1. Нормализованные спектры испускания соединений (II), (III), (VII) и (VIII) в свободном виде (пунктир) и в составе комплекса с белком (сплошная) в фосфатном буфере.

Перхлорат *E*-2-(4-гидрокси-2,5-диметоксистирил)-1,3,3-триметил-3*H*-индолия (III). Красный порошок (275 мг, 63%); т. пл. около 200°C с разложением; ¹H-ЯМР: 10.91 (уш.с., 1H), 8.44 (д, *J*₂ 16.0, 1H), 7.81 (д, *J*₂ 7.4, 1H), 7.79 (д, *J*₂ 7.8, 1H), 7.67 (с, 1H), 7.59 (т, *J*₂ 7.7, 1H), 7.54 (т, *J*₂ 7.3, 1H), 7.43 (д, *J*₂ 16.0, 1H), 6.65 (с, 1H), 4.02 (с, 3H), 3.93 (с, 3H), 3.88 (с, 3H), 1.73 (с, 6H); ¹³C-ЯМР: 180.8, 157.7, 156.3, 147.8, 143.0, 142.7, 141.9, 128.8, 128.2, 122.6, 114.2, 113.9, 112.8, 108.1, 100.2, 56.7, 56.6, 51.1, 33.5, 26.5; HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 338.1761; рассчитано для C₂₁H₂₄NO₃⁺, [*M*]⁺ 338.1751.

4-((Триизопропилсилил)окси)бензальдегиды. Соответствующий 4-гидроксибензальдегид (3 ммоль), триизопропилсилил хлорид (3.3 ммоль, 0.7 мл), диизопропилэтиламин (3.6 ммоль, 0.63 мл) и имидазол (0.3 ммоль, 20 мг) растворяли в ТГФ (25 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Затем реакционную смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (20 мл). Органический слой промывали насыщенным раствором хлорида натрия (50 мл), высушивали над безводным Na₂SO₄ и упаривали на ротонном испарителе. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент – гексан–этилацетат, 9 : 1).

2-Метокси-4-((триизопропилсилил)окси)бензальдегиды (IV). Бесцветное масло (924 мг, 99%); ¹H-ЯМР: 10.18 (с, 1H), 7.64 (д, *J*₂ 8.2, 1H), 6.52–6.57 (м, 2H), 3.87 (с, 3H), 1.35–1.00 (м, 21H); ¹³C-ЯМР: 187.1, 163.3, 162.7, 129.8, 118.7, 112.1, 103.4, 55.8, 17.6, 12.0; HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 309.1876; рассчитано для C₁₇H₂₉O₃Si⁺, [*M* + H]⁺ 309.1880.

2,5-Диметокси-4-((триизопропилсилил)окси)бензальдегиды (V). Бесцветное масло (994 мг, 98%); ¹H-ЯМР: 10.19 (с, 1H), 7.22 (с, 1H), 6.60 (с, 1H), 3.83 (с, 3H), 3.75 (с, 3H), 1.35–1.00 (м, 21H); ¹³C-ЯМР: 186.8, 157.6, 152.3, 144.9, 117.7, 109.5,

104.8, 56.2, 55.6, 17.6, 12.4; HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 339.1980; рассчитано для C₁₈H₃₁O₄Si⁺, [*M* + H]⁺ 339.1986.

(*E*)-6-(4-Гидроксистирил)-4-метокси-2*H*-пиран-2-оны. Магний (9 ммоль, 216 мг) растворяли в безводном метаноле (7 мл). К полученному раствору по каплям прибавляли раствор соответствующего бензальдегида (3 ммоль) и 4-метокси-6-метил-2*H*-пиран-2-она (504 мг, 3,6 ммоль) в метаноле (5 мл). Реакционную смесь кипятили в течение 5 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и упаривали на ротонном испарителе. Остаток растворяли в тетрагидрофуране (25 мл) и добавляли фторид тетрабутиламмония (940 мг, 3.6 ммоль) и уксусную кислоту (1 капля). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Затем реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в хлороформе (10 мл), промывали насыщенным раствором хлорида натрия (30 мл), высушивали над безводным Na₂SO₄ и упаривали. Полученный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент – хлороформ–метанол, 50 : 1).

(*E*)-6-(4-Гидрокси-2-метоксистирил)-4-метокси-2*H*-пиран-2-он (VII). Желтый порошок (30 мг, 4%); т. пл. 210–213°C; ¹H-ЯМР: 9.96 (с, 1H), 7.42–7.50 (м, 2H), 6.76 (д, *J*₂ 16.2, 1H), 6.45 (д, *J*₂ 2.3, 1H), 6.42 (дд, *J*₂ 8.5, 2.3, 1H), 6.18 (д, *J*₂ 2.3, 1H), 5.56 (д, *J*₂ 2.3, 1H), 3.82 (с, 3H), 3.82 (с, 3H); ¹³C-ЯМР: 171.1, 162.8, 160.5, 159.3, 158.9, 129.2, 128.6, 115.9, 114.7, 108.1, 99.7, 99.1, 87.8, 56.3, 55.4; HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 275.0913; рассчитано для C₁₅H₁₅O₅⁺, [*M* + H]⁺ 275.0914.

(*E*)-6-(4-Гидрокси-2,5-диметоксистирил)-4-метокси-2*H*-пиран-2-он (VIII). Оранжевый порошок (37 мг, 4%); т. пл. 226–229°C; ¹H-ЯМР: 9.61 (уш.с., 1H), 7.51 (д, *J*₂ 16.1, 1H), 7.21 (с, 1H), 6.81 (д, *J*₂ 16.2, 1H), 6.54 (с, 1H), 6.15 (с, 1H), 5.56 (с, 1H), 3.82 (с, 3H), 3.78 (с, 6H); ¹³C-ЯМР: 171.0, 162.7, 159.4,

153.0, 149.9, 142.0, 129.0, 115.9, 113.8, 111.1, 100.5, 99.5, 87.7, 56.4, 56.2, 55.8; HRMS (ESI) m/z : найдено M 305.1017; рассчитано для $C_{16}H_{17}O_6^+$, $[M + H]^+$ 305.1020.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 18-73-10105.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Szent-Gyorgyi C., Schmidt B.F., Schmidt B.A., Creeger Y., Fisher G.W., Zakel K.L., Adler S., Fitzpatrick J.A., Woolford C.A., Yan Q., Vasilev K.V., Berget P.B., Bruchez M.P., Jarvik J.W., Waggoner A.* // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 235–240.
<https://doi.org/10.1038/nbt1368>
2. *Bruchez M.P.* // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. V. 27. P. 18–23.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.05.014>
3. *Xu S., Hu H.Y.* // *Acta Pharm. Sin. B.* 2018. V. 8. P. 339–348.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.02.001>
4. *Jullien L., Gautier A.* // *Methods Appl. Fluoresc.* 2015. V. 3. P. 042007.
<https://doi.org/10.1088/2050-6120/3/4/042007>
5. *Plamont M.A., Billon-Denis R., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quérard J., Pan B., Rossignol J., Moncoq K., Morellet N., Volovitch M., Lescop E., Chen Y., Triller A., Vríz S., Saux T., Jullien L., Gautier A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016. V. 113. P. 497–502.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
6. *Li C., Plamont M. A., Sladitschek H. L., Rodrigues V., Aujard I., Neveu P., Saux T., Jullien L., Gautier A.* // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. P. 5598–5605.
<https://doi.org/10.1039/C7SC01364G>
7. *Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S.* // *Chem. Eur. J.* 2019. V. 25. P. 9592–9596.
<https://doi.org/10.1002/chem.201901151>
8. *Li C., Mourton A., Plamont M.A., Rodrigues V., Aujard I., Volovitch M., Le Saux T., Perez F., Vríz S., Jullien L., Joliot L., Gautier A.* // *Bioconjugate Chem.* 2018. V. 29. P. 1823–1828.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00180>
9. *Shank N.I., Zanotti K.J., Lanni F., Berget P.B., Armitage B.A.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 12960–2969.
<https://doi.org/10.1021/ja9016864>
10. *Tan X., Constantin T.P., Sloane K.L., Waggoner A.S., Bruchez M.P., Armitage B.A.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. P. 9001–9009.
<https://doi.org/10.1021/jacs.7b04211>
11. *Senutovitch N., Stanfield R.L., Bhattacharyya S., Rule G.S., Wilson I.A., Armitage B.A., Waggoner A.S., Berget P.B.* // *Biochem.* 2012. V. 51. P. 2471–2485.
<https://doi.org/10.1021/bi201422g>

Styrene Derivatives of Indole and Pyranone as Fluorogenic Substrates for FAST Protein

A. I. Sokolov*, I. N. Myasnyanko*, N. S. Baleeva*.,# and M. S. Baranov*, **

#Phone: +7 (926) 704-13-72; e-mail: nsbaleeva@gmail.com

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

**Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

We report novel styrene derivatives of indole and pyranone. The possibility of their use as fluorogens for FAST protein were investigated. Derivatives of indole do not exhibit noticeable fluorogenic properties, while derivatives of pyranone exhibit superior fluorogenic potential – binding to a protein leads to increase fluorescence intensity and a emission red shift.

Keywords: fluorogens, fluorogen-activating proteins, fluorescence