



УДК 547.788

ЦИАНИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ В КАЧЕСТВЕ ФЛУОРОГЕНОВ ДЛЯ БЕЛКОВ FAST И nanoFAST¹

© 2022 г. А. А. Хрулев*, Н. С. Балеева*, **, П. Н. Камзеева*, М. С. Баранов*, **, А. В. Аралов*.*#

*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 08.11.2021 г.

После доработки 11.11.2021 г.

Принята к публикации 13.11.2021 г.

Синтезировано семь новых цианиновых красителей. Данные соединения, вместе с одиннадцатью описанными производными этого же класса, опробованы в качестве флуорогенов для белков FAST и nanoFAST. Исследование увеличения интенсивности флуоресценции при взаимодействии с данными белками позволило выявить структурные элементы, пригодные в дизайне систем белкового мечения на основе пар цианиновый краситель–флуороген-активирующий белок.

Ключевые слова: цианиновые красители, флуороген-активирующие белки, флуоресценция

DOI: 10.31857/S013234232204011X

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время флуороген-активирующие белки, один из типов генетически кодируемых флуоресцентных меток, рассматриваются в качестве перспективных инструментов для изучения функционирования живых систем [1–3]. Подобные белки обладают способностью образовывать комплексы с низкомолекулярными флуорогенными соединениями (флуорогенами), имеющими слабовыраженную флуоресценцию в несвязанном состоянии в растворе, которая, однако, многократно увеличивается при взаимодействии с белком за счет фиксации молекулы красителя, ограничивающей безызлучательный сброс энергии после ее возбуждения [4]. В качестве подобных белков зарекомендовал себя белок FAST и недавно разработанный укороченный вариант nanoFAST, на данный момент представляющий собой самый короткий флуороген-активирующий белок [5, 6]. В качестве низкомолекулярного партнера подобных белков активно изучались производные хромофоров флуоресцентных белков [7], а также бензилиденновые производные роданинов [8], и получено множество пар белок–флуороген, покрывающих практически весь диапазон видимого излучения [9–11]. Тем не менее среди недостатков подобных систем флуорес-

центного мечения можно упомянуть умеренную яркость, в основном за счет низкого коэффициента молярного поглощения флуорогенов, составляющего для большинства представителей 20000–40000 M⁻¹ см⁻¹. Таким образом, повышение яркости подобных флуоресцирующих комплексов, в том числе за счет увеличения коэффициента молярного поглощения красителей, представляется актуальной задачей.

Цель данного исследования заключалась в оценке потенциала нового класса красителей в качестве низкомолекулярных флуорогенов для систем флуоресцентного мечения на основе белков FAST и nanoFAST.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

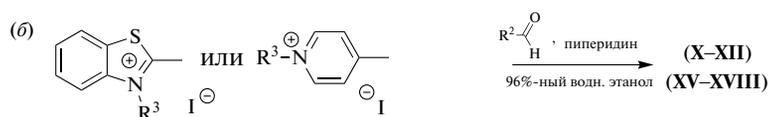
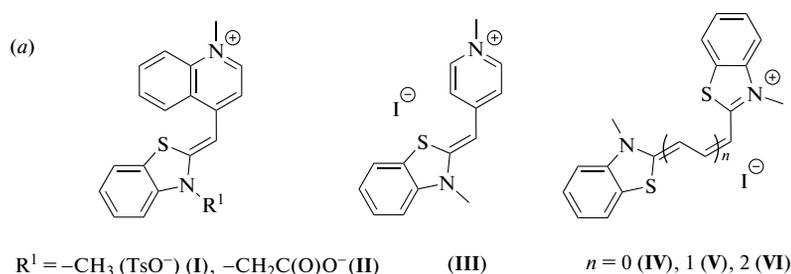
Цианиновые красители обладают рядом полезных свойств, среди которых следует отметить большие коэффициенты молярного поглощения, узкие полосы поглощения/излучения, высокую биосовместимость и низкую токсичность для биологических образцов [12]. В случае высокого квантового выхода флуоресценции флуорогена в комплексе с белком подобные красители могут обеспечить разработку новых эффективных систем мечения с большей яркостью. В настоящей работе мы решили опробовать набор из 18 цианиновых производных в качестве флуорогенов для белков FAST и nanoFAST (схема 1). Производные (I–IX), (XIII) и (XIV) получены по литературным

¹ Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S013234232204011X для авторизованных пользователей.

Автор для связи: (эл. почта: baruh238@mail.ru).

методикам [13–23], а новые производные (X–XII) и (XV–XVIII) синтезированы реакцией конденсации Кневенагеля кипячением карбанион-образу-

ющей и карбонил-содержащей электрофильной компонент в водном этаноле в присутствии каталитического количества пиперидина (схема 1) [24].



(в)

R^2						
R^3	$-CH_3$	$-(CH_2)_4SO_3^-$	$-CH_3$	$-(CH_2)_4SO_3^-$	$-CH_3$	$-(CH_2)_4SO_3^-$
	(VII)	(VIII)	(IX)	(X)	(XI)	(XII)
	(XIII)	(XIV)	(XV)	(XVI)	(XVII)	(XVIII)

Схема 1. (а) – Структуры цианиновых красителей (I–VI); (б) – схема синтеза производных (X–XII) и (XV–XVIII); (в) – структуры цианиновых красителей (VII–XVIII).

Изучение изменения интенсивности флуоресценции при взаимодействии с белками FAST и nanoFAST позволило выявить фрагменты, пригодные для последующего дизайна пар цианиновых красителей с данными белками. Так, сравнение симметричных красителей (IV–VI) показало перспективность триметинового звена соединения (V) (11,3-кратное увеличение интенсивности флуоресценции, см. табл. 1) для последующего дизайна цианиновых красителей с гетероциклическими фрагментами, отличными от бензотиазольного. Из гетероциклических фрагментов цианинов можно выделить бензотиазольный и 1,2,3,5,6,7-гек-

сагидропиридо[3,2,1-ij]хинолиновый (джулолидиновый)/1,2,2,4,6-пентаметил-1,2-дигидрохинолиновый фрагменты, наличие которых обеспечило “разгорание” красителей в 5–7 раз (см. табл. 1 для соединений (IX–XII)).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Препараты белков FAST и nanoFAST получали согласно описанным ранее методикам [6, 8]. Увеличение интенсивности флуоресценции определяли как отношение интенсивности флуоресценции раствора хромофор + белок к интенсивности

Таблица 1. Увеличение интенсивности флуоресценции соединений (IV–VI) и (IX–XII) при взаимодействии с белками FAST и nanoFAST

Соединение	Увеличение интенсивности флуоресценции при заданной длине волны возбуждения при взаимодействии с белком FAST (nanoFAST)				
	380 нм	430 нм	480 нм	530 нм	580 нм
(IV)	1.54 (1.71)	2.10 (2.50)	1.03 (1.11)	1.08 (1.10)	1.19 (1.37)
(V)	1.07 (1.43)	1.07 (1.22)	1.43 (1.75)	2.31 (3.16)	7.40 (11.30)
(VI)	1.49 (1.39)	1.10 (1.21)	1.10 (1.19)	1.39 (1.66)	1.09 (1.58)
(IX)	1.08 (1.41)	1.12 (1.26)	1.99 (2.09)	5.08 (4.84)	6.27 (5.53)
(X)	1.32 (1.42)	1.11 (1.27)	1.47 (1.84)	3.23 (4.61)	4.99 (7.00)
(XI)	1.34 (1.68)	1.21 (1.32)	2.34 (2.24)	4.87 (4.36)	7.15 (6.24)
(XII)	1.26 (1.62)	1.13 (1.26)	1.75 (1.85)	3.30 (3.60)	5.54 (6.62)

флуоресценции раствора свободного хромофора, зарегистрированным на планшет-ридере Tecan Infinite 200 Pro M Nano (Tecan Trading AG, Швейцария), работающем в двух режимах (1 и 10 мкМ раствор хромофора и белка соответственно). Регистрацию интенсивности флуоресценции обоих растворов осуществляли при одинаковой длине волны, приведенной для каждого соединения (табл. 1). Из-за используемых концентраций могли возникнуть ненасыщенные условия. Корректировку интенсивности поглощения не проводили.

Общая методика получения производных (X–XII) и (XV–XVIII). К раствору соответствующих карбанион-образующей компоненты (1 ммоль) и карбонил-содержащей компоненты (1.5 ммоль) в 96%-ном водном этаноле (15 мл) добавляли каталитическое количество пиперидина (10 мкл), полученный раствор кипятили с обратным холодильником в течение 20 ч. Реакционную смесь упаривали на роторном испарителе. Остаток растирали с ацетоном (5 мл), выпавший осадок отфильтровывали и промывали ацетоном (3 × 5 мл). Очистку целевого соединения проводили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле в градиенте концентраций метанола в дихлорметане (10 → 30%, v/v), получая соответствующее целевое соединение.

4-(2-(2-(2,3,6,7-Тетрагидро-1*H*,5*H*-пиридо[3,2,1-*ij*]хинолин-9-ил)винил)бензо[*d*]тиазол-3-ий-3-ил)бутан-1-сульфонат (X). Темно-фиолетовый аморфный порошок (180 мг, 77%).

Иодид 3-метил-2-(2-(1,2,2,4-тетраметил-1,2-дигидрохинолин-6-ил)винил)бензо[*d*]тиазол-3-ия (XI). Темно-красный аморфный порошок (85 мг, 73%).

4-(2-[2-(1,2,2,4-Тетраметил-1,2-дигидрохинолин-6-ил)винил]бензо[*d*]тиазол-3-ий-3-ил)бутан-1-сульфонат (XII). Темно-фиолетовый аморфный порошок (160 мг, 86%).

Иодид 1-метил-4-[2-(2,3,6,7-тетрагидро-1*H*,5*H*-пиридо[3,2,1-*ij*]хинолин-9-ил)винил]пиридин-1-ия (XV). Фиолетовый аморфный порошок (45 мг, 45%).

4-(4-[2-(2,3,6,7-Тетрагидро-1*H*,5*H*-бензо[*ij*]хинолизидин-9-ил)винил]пиридин-1-ий-1-ил)бутан-1-сульфонат (XVI). Темно-красный аморфный порошок (21 мг, 33%).

Иодид 1-метил-4-[2-(1,2,2,4-тетраметил-1,2-дигидрохинолин-6-ил)винил]пиридин-1-ия (XVII). Темно-красный аморфный порошок (60 мг, 50%).

4-(4-[2-(1,2,2,4-Тетраметил-1,2-дигидрохинолин-6-ил)винил]пиридин-1-ий-1-ил)бутан-1-сульфонат (XVIII). Красный аморфный порошок (90 мг, 70%).

Данные спектров полученных соединений (X–XII) и (XV–XVIII) приведены в дополнительных материалах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе синтезировано семь новых цианиновых красителей. Данные соединения, вместе с одиннадцатью описанными ранее производными, были оценены в качестве флуорогенов для белков FAST и nanoFAST. Выявлены структурные элементы цианиновых красителей, перспективные для последующего дизайна новых белковых флуоресцентных меток на основе пар цианиновый флуороген–FAST/nanoFAST, а именно бензотиазольный и 1,2,3,5,6,7-гексагидропиридо[3,2,1-*ij*]хинолиновый (джулолидиновый)/1,2,2,4,6-пентаметил-1,2-дигидрохинолиновый фрагменты, наличие которых обеспечило при взаимодействии с белками FAST и nanoFAST “разгорание” красителей в 5–7 раз.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-34-70143.

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

- Xu S., Hu H.Y.* // *Acta Pharm. Sin.* В. 2018. V. 8. P. 339–348.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.02.001>
- Péresse T., Gautier A.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 6142.
<https://doi.org/10.3390/ijms20246142>
- Gallo E.* // *Bioconj. Chem.* 2020. V. 31. P. 16–27.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00710>
- Baldrige A., Feng S., Chang Y.T., Tolbert L.M.* // *ACS Comb. Sci.* 2011. V. 13. P. 214–217.
<https://doi.org/10.1021/co200025e>
- 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. USA.* 2016. V. 113. P. 497–502.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
- Mineev K.S., Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Povarova N.V., Sokolov A.I., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Ruchkin D.A., Bukhdruker S., Remeeva A., Mishin A., Borshchevskiy V., Gordeliy V., Arseniev A.S., Gorbachev D.A., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S.* // *Chem. Sci.* 2021. V. 12. P. 6719–6725.
<https://doi.org/10.1039/d1sc01454d>
- 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>
- 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>
- 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.* // *Chem. Eur. J.* 2020. V. 27. P. 3986–3990.
<https://doi.org/10.1002/chem.202004760>
- Li C., Tebo A.G., Thauvin M., Plamont M., Volovitch M., Morin X., Vríz S., Gautier A.* // *Angew. Chemie.* 2020. V. 132. P. 18073–18079.
<https://doi.org/10.1002/ange.202006576>
- Балеева Н.С., Смирнов А.Ю., Мяснянко И.Н., Гавриков А.С., Баранов М.С.* // *Биоорг. химия.* 2021. Т. 47. С. 647–651. [*Baleeva N.S., Smirnov A.Yu., Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Baranov M.S.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 1118–1121.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162021050198>
- Li Y., Zhou Y., Yue X., Dai Z.* // *Adv. Healthc. Mater.* 2020. V. 9. P. 2001327.
<https://doi.org/10.1002/adhm.202001327>
- Wang L., Lin W., Sun W., Yan M., Zhao J., Guan L., Deng W., Zhang Y.* // *J. Org. Chem.* 2019. V. 84. P. 3960–3967.
<https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b03122>
- Dolgosheina E.V., Jeng S.C., Panchapakesan S.S., Cojocar R., Chen P.S., Wilson P.D., Hawkins N., Wiggins P.A., Unrau P.J.* // *ACS Chem. Biol.* 2014. V. 9. P. 2412–2420.
<https://doi.org/10.1021/cb500499x>
- Turaev A.V., Tsvetkov V.B., Tankevich M.V., Smirnov I.P., Aralov A.V., Pozmogova G.E., Varizhuk A.M.* // *Biochimie.* 2019. V. 162. P. 216–228.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.04.018>
- Kurutos A., Nikodinovic-Runic J., Veselinovic A., Veselinovic J.B., Kamounah F.S., Ilic-Tomic T.* // *New J. Chem.* 2021. V. 45. P. 12818–12829.
<https://doi.org/10.1039/D1NJ01659H>
- Quan-Quan S., Ru S., Jian-Feng G., Qing-Feng X., Na-Jun L., Jian-Mei L.* // *Dyes Pigm.* 2012. V. 93. P. 1506–1511.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2011.11.001>
- Rao T.V.S., Huff J.B., Bieniarz C.* // *Tetrahedron.* 1998. V. 54. P. 10627–10634.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00597-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00597-3)
- Vasilev A., Deligeorgiev T., Gadjev N., Kaloyanova S., Vaquero J., Alvarez-Builla J., Baeza A.* // *Dyes Pigm.* 2008. V. 77. P. 550–555.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2007.08.004>
- Al-horaibi S.A., Alrabie A.A., Alghamdi M.T., Al-Ostoot F.H., Garoon E.M., Rajbhoj A.S.* // *J. Mol. Struct.* 2021. V. 1224. P. 128836.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128836>
- Coe B.J., Foxon S.P., Harper E.C., Harris J.A., Helliwell M., Raftery J., Asselberghs I., Clays K., Franz E., Brunschwig B.S., Fitch A.G.* // *Dyes Pigm.* 2009. V. 82. P. 171–186.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2008.12.010>
- Fang-Fang S., Ying-Ming Z., Xian-Yin D., Hao-Yang Z., Yu L.* // *J. Org. Chem.* 2020. V. 85. P. 6131–6136.
<https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b03513>
- Zhong-Sheng W., Fu-You L., Chun-Hui H., Lu W., Min W., Lin-Pei J., Nan-Qiang L.* // *J. Phys. Chem. B.* 2000. V. 104. P. 9676–9682.
<https://doi.org/10.1021/jp001580p>
- Shindy H.A.* // *Dyes Pigm.* 2017. V. 145. P. 505–513.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.06.029>

Cyanine Dyes as Fluorogens for FAST and nanoFAST Proteins**A. A. Khrulev***, **N. S. Baleeva*[•] ****, **P. N. Kamzееva***, **M. S. Baranov*[•] ****, and **A. V. Aralov*[•] #**[#]*E-mail: baruh238@mail.ru*^{*}*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*

Seven new cyanine dyes were synthesized. These compounds, together with eleven described derivatives of the same class, have been probed as fluorogens for the FAST and nanoFAST proteins. The study of the increase in fluorescence intensity upon interaction with these proteins allowed to identify structural elements suitable for the design of protein labeling systems based on cyanine dye–fluorogen-activating protein pairs.

Keywords: cyanine dyes, fluorogen-activating proteins, fluorescence