



УДК 547.782

АНАЛОГ ХРОМОФОРА БЕЛКА КАЕДЕ КАК ИНСТРУМЕНТ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ ЯДРА И МИТОХОНДРИЙ ЖИВЫХ КЛЕТОК¹

© 2025 г. Д. И. Рудик*, А. Р. Гильванов*, **, М. С. Баранов*, **, Ю. А. Богданова*, **, #

* ФГБУН ГНЦ “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 им. Н.И. Пирогова,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 03.04.2025 г.

После доработки 24.04.2025 г.

Принята к публикации 25.04.2025 г.

Синтезирована серия из трех красителей – аналогов хромофора флуоресцентного белка Kaede с различными заместителями. По результатам флуоресцентной микроскопии был выявлен перспективный флуороген – 5-((Z)-2-(дифторборанил)-4-(диметиламино)-5-гидроксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4Н-имидацол-4-он. Продемонстрировано использование этого красителя в широкопольной флуоресцентной микроскопии для одновременного селективного окрашивания ядра и митохондрий в живых клетках на примере клеточной линии HeLa Kyoto. Полученное соединение может найти применение в области визуализации процессов живых систем.

Ключевые слова: арилиден-имидацолоны, флуорогены, митохондрии, ядро

DOI: 10.7868/S1998286025060153

ВВЕДЕНИЕ

Явление флуоресценции активно используется в биологии с целью мечения и визуализации клеточных структур, отдельных типов клеток или различных процессов в реальном времени при помощи специальных флуоресцентных меток. Один из ярких примеров таких меток – молекулы-флуорогены [1]. Флуорогены не флуоресцируют в свободном виде в водных растворах, но приобретают флуоресцентные свойства при связывании с мишениями, в качестве которых могут выступать белки [2–4], нуклеиновые кислоты [5, 6] или компартменты клеточных органелл [7, 8]. Таким образом, применение флуорогенов позволяет проводить микроскопию с высокой специфичностью мечения при низком фоновом сигнале.

Флуорогенные красители ряда арилиден-имидацолонов – особенно привлекательный инстру-

мент для мечения внутриклеточных структур. Данные соединения структурно схожи со зрелыми хромофорами GFP-подобных белков и характеризуются низкой токсичностью, высокой растворимостью в воде и малыми размерами [9, 10]. Кроме того, данные соединения отличаются простотой синтеза, что при введении определенных заместителей и функциональных групп позволяет получать соединения с различными спектральными свойствами.

Ранее было показано, что введение в арилиденовый фрагмент дополнительных заместителей в *meta*-положение к имидацолоновой части молекулы приводит к существенным изменениям фотофизических свойств. Так, например, введение трифторметильной группы позволило получить красители с сильным варьированием квантового выхода флуоресценции в зависимости от полярности среды [11], а в результате введения pH-чувстви-

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.7868/S1998286025060153 для авторизованных пользователей.

Автор для связи: (тел.: +7 (965) 315-15-19; эл. почта: zashiki.vvarashi@gmail.com).

ствительных групп были получены красители для селективного окрашивания клеточных компартментов с низким pH [12]. Таким образом, нами было продемонстрировано применение арилиден-имидацолоновых красителей для окрашивания ряда клеточных органелл: эндоплазматического ретикулума [11, 13, 14], лизосом [12] и адипосом [16]. Введение новых заместителей и дальнейшая оптимизация фотофизических свойств арилиден-имидацолонов может привести к получению красителей, специфически окрашивающих и другие клеточные структуры. Одной из возможных целей служат митохондрии и/или ядра. Митохондрии играют ключевую роль в энергетическом обмене клеток и регуляции их гомеостаза [17]. Совместно с хранящими генетическую информацию клеток ядрами митохондрии играют важную роль в процессе программируемой клеточной гибели – апоптозе [18, 19]. Красители, окрашивающие одновременно обе эти органеллы, находят свое применение в биомедицинских исследованиях [20].

Целью данной работы был синтез новых флуорогенов арилиден-имидацолонового ряда и исследование возможности их применения для окрашивания клеточных структур живых клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения целевых красителей (схема 1) был синтезирован защищенный альдегид (**I**), из которого по стандартной двухстадийной методике получали арилиденимидацолон (**II**) [21]. На

первой стадии альдегид обрабатывали раствором метиламина в хлороформе, контролируя протекание реакции с помощью ^1H -ЯМР-спектрометрии. На второй стадии полученный имин реагировал с карбоксимидацолом по реакции [3+2]-циклоприсоединения с образованием арилиден-имидацолона (**II**). Далее по предложенном нами ранее протоколу было синтезировано дифторборильное производное (**III**) [22]. Соединение получали в две стадии: сначала исходный хромофор реагировал с избытком трибромида бора в дихлорэтане, затем в полученном дигромборильном производном замещали атомы брома на фтор действием водного раствора фтороводородной кислоты [23]. Примечательно, что в данном случае наблюдалось образование только одного регионаизомера, в котором BF_2 -группа находилась в *пара*-положении к гидроксигруппе. Целевые молекулы (**IVa–IVc**) были получены конденсацией соединения (**III**) с соответствующими ароматическими альдегидами. Благодаря наличию сильной акцепторной дифторборильной группы реакция конденсации протекает достаточно быстро – как правило, в течение 10 мин. В качестве альдегидов были выбраны незамещенный бензальдегид, 4-метоксибензальдегид и 4-пиридинкарбальдегид для получения соединений с различными донорными и акцепторными мотивами.

На следующем этапе работы нами были изучены фотофизические свойства полученных красителей в четырех растворителях с различной полярностью. Было показано, что максимумы

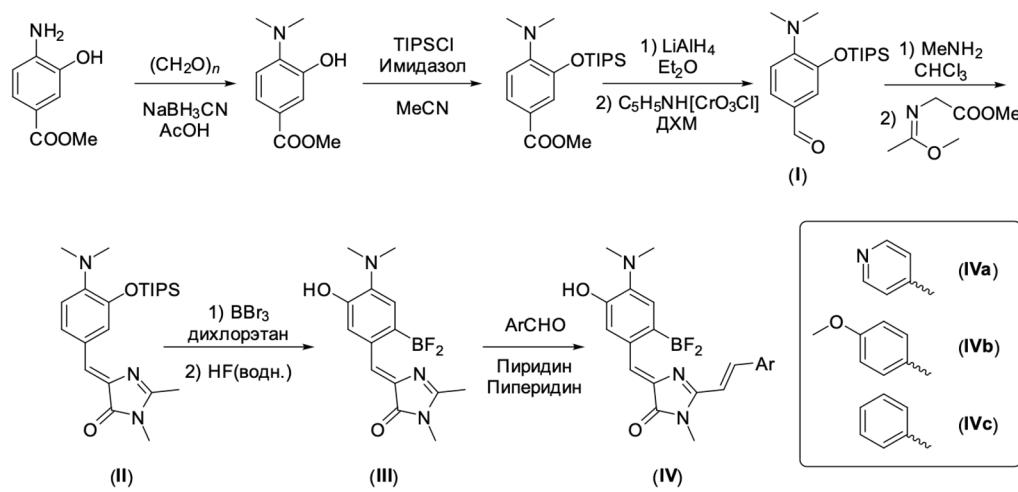


Схема 1. Синтез целевых соединений (I–IV).

поглощения лежат в интервале 530–605 нм, а максимумы эмиссии – в области 600–730 нм (рис. 1). Соединения характеризуются ярко выраженным сольватохромизмом и варьированием квантового выхода флуоресценции в зависимости от полярности среды (рис. 2).

Ранее нами были описаны хромофоры с аналогичными сольватохромными свойствами, благодаря которым красители селективно окрашивали эндоплазматический ретикулум и адipo-

сомы [11–14, 16]. Мы изучили возможность селективного окрашивания структурных компонентов клеток млекопитающих с помощью флуоресцентной микроскопии. Было показано, что соединение (IVa) позволило визуализировать митохондрии и клеточное ядро в красном флуоресцентном канале при существенном времени инкубации живых клеток линии HeLa Kyoto в присутствии флуорогена (не менее 30 мин) и при его концентрации не менее 20 мМ (рис. 3).

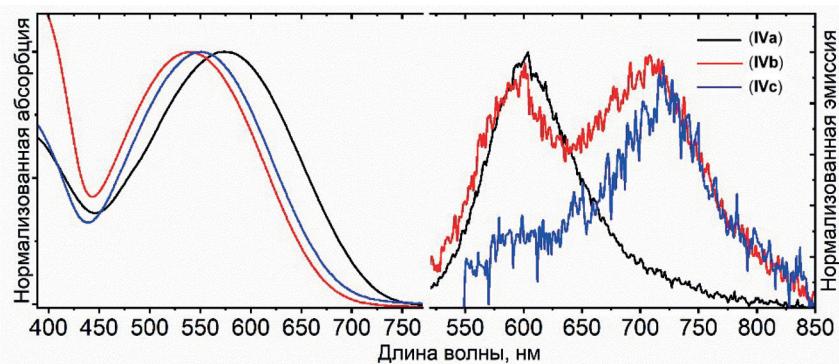


Рис. 1. Спектры поглощения и испускания соединений (IVa–IVc) в диоксане.

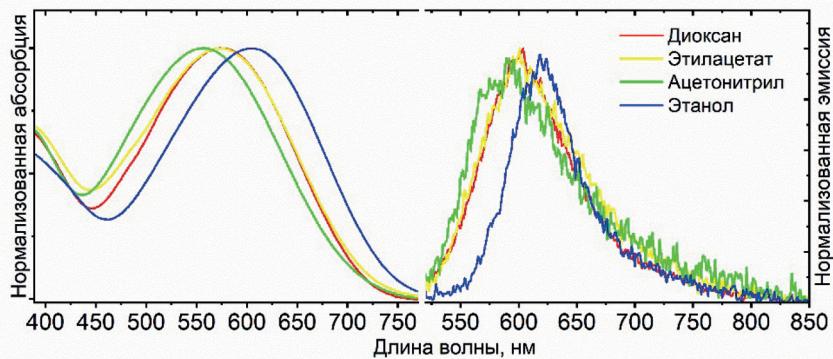


Рис. 2. Спектры поглощения и испускания соединения (IVa) в различных растворителях.

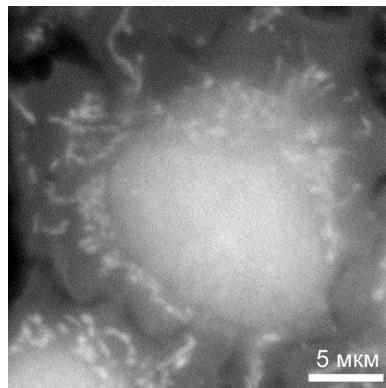


Рис. 3. Микрофотография живой клетки HeLa Kyoto, окрашенной красителем (IVa), полученные с использованием широкопольной флуоресцентной микроскопии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и приборы. Коммерчески доступные реагенты использовали без дополнительной очистки. Для колоночной хроматографии применяли силикагель E. Merck Kieselgel 60 (Merck, США). Тонкослойную хроматографию (TCX) проводили на пластинах со стеклянной подложкой из силикагеля 60 F₂₅₄ (Merck, США). Визуализацию осуществляли в УФ-свете (254 или 365 нм). Спектры ЯМР регистрировали на спектрометрах Avance III 700 МГц, Avance 800 и Fourier 300 (Bruker, Германия) при 303 К. Химические сдвиги определяли относительно остаточных сигналов

растворителя CDCl_3 (7.27 м.д. для ^1H и 77.0 м.д. для ^{13}C) или $\text{DMSO}-d_6$ (2.51 м.д. для ^1H и 39.5 м.д. для ^{13}C). Температуры плавления измеряли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) без исправления. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) регистрировали на приборе AB Sciex TripleTOF 5600+ (Sciex, США) с использованием ионизации электрораспылением (ESI). Измерения проводили в режиме положительных ионов (напряжение на границе раздела фаз капилляров – 5500 В); диапазон масс m/z 50–3000. С помощью шприца вводили растворы в метаноле с 0.1%-ной муравьиной кислотой. В качестве сухого газа использовали азот. Спектры в УФ-видимом диапазоне регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 (Agilent, США). Спектры возбуждения и испускания флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра Agilent Cary Eclipse (Agilent, США) при 530–900 нм.

Синтез (Z)-5-(4-(диметиламино)-3-((триизопропилсилил)окси)бензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4Н-имида́зол-4-она (II). К раствору ароматического альдегида (I) (1 ммоль, 1 экв., синтез описан в дополнительных материалах) в CHCl_3 (7 мл) добавляли 35%-ный раствор метиламина в изопропаноле (5 ммоль, 5 экв.) и Na_2SO_4 (1 г). Смесь перемешивали в течение 48 ч при 25°C. Протекание реакции контролировали с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии. Затем смесь фильтровали от Na_2SO_4 , фильтрат собирали, растворитель упаривали при пониженном давлении. К полученному остатку добавляли безводный метанол (3 мл) и метил-2-((1-метоксиэтилiden)-амино)ацетат (1.3 ммоль, 1.3 экв.). Смесь перемешивали 24 ч при комнатной температуре, после чего растворитель упаривали при пониженном давлении, полученный продукт очищали колончной хроматографией на силикагеле (элюент гексан– EtOAc , 4 : 1).

Синтез (Z)-5-(2-(дифторборанеил)-4-(диметиламино)-5-гидроксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4Н-имида́зол-4-она (III). К раствору (Z)-5-(4-(диметиламино)-3-((триизопропилсилил)окси)бензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4Н-имида́зол-4-она (II) (5 ммоль) в дихлорэтане (120 мл) добавляли молекулярные сита (10 г 3 Å и 10 г 4 Å) и прикалывали раствор BBr_3 (25 мл, 1 М в дихлорэтане). Реакционную смесь перемешивали при кипячении в течение 2 ч. Затем фильт-

ровали, сита на фильтре промывали EtOAc (150 мл) и EtOH (50 мл). К полученному раствору добавляли 20 мл водного раствора HF и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавили насыщенным раствором NaHCO_3 (150 мл) и доводили pH до 6–7. Органический слой отделяли, водный слой экстрагировали EtOAc (2×200 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным раствором NaCl (3×100 мл) и сушили над безводным Na_2SO_4 . Растворитель упаривали при пониженном давлении, полученный продукт очищали флем-хроматографией на силикагеле (элюент CH_2Cl_2 – EtOH , 25 : 1).

Синтез аналогов хромофора белка Kaede (IVa–IVc). К раствору (Z)-5-(2-(дифторборанеил)-4-(диметиламино)-5-гидроксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4Н-имида́зол-4-она (III) (0.3 ммоль) в пиридине (2 мл) добавляли соответствующий альдегид (1.5 ммоль) и катализическое количество пиперидина. Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 10 мин. Полученный раствор упаривали при пониженном давлении, полученный продукт очищали флем-хроматографией на силикагеле (элюент CH_2Cl_2 – EtOH , 25 : 1) и при необходимости дополнительно очищали перекристаллизацией из MeCN .

Поддержание клеточной культуры. Клеточная культура опухоли шейки матки человека HeLa Kyoto была получена из коллекции клеточных линий отдела геномики и постгеномных технологий ФГБУН “ИБХ” РАН. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 в инкубаторе MCO-175 (Sanyo, Япония). Для культивирования использовали среду DMEM (ПанЭко, Россия), содержащую 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Cytiva, США), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Для проведения микроскопии клетки высевали на 35-мм конфокальные чашки со смотровым окном 13 мм (SPL, Южная Корея).

Флуоресцентная микроскопия. Флуоресцентную микроскопию проводили при помощи микроскопа Keyence BZ9000 (Keyence, Япония) с масляным объективом 60×/1.40 NA Plan Apo (Nikon, Япония). Для проведения микроскопии клеточную среду заменяли на раствор солей Хэнкса (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 мМ HEPES (Corning, США), pH 7, содержащий краситель в

концентрации 20 мкМ, и инкубировали в течение 30 мин. Краситель разводили из 10 мМ стокового раствора в DMSO. Микроскопию проводили при комнатной температуре с использованием набора фильтров TxRed (фильтр возбуждения – 560/40, дихроическое зеркало – 595, эмиссионный фильтр – 630/60) (Keyence, Япония). Полученные микрофотографии обрабатывали в программе Fiji Image J 1.54f (<https://fiji.sc/>).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезировано три новых производных хромофора белка Kaede. Изучены оптические свойства этих соединений. Показано, что одновременное введение диметиламино- и гидроксигрупп совместно с дифторбирильной группой позволяют получить сольватохромные флуоресцентные красители. Соединение (**IVa**) было успешно использовано для селективного окрашивания ядра и митохондрий в живых клетках линии HeLa Kyoto при проведении широкопольной флуоресцентной микроскопии. Синтезированное соединение обладает потенциалом для расширения арсенала методов клеточной визуализации и изучения динамических процессов живых систем.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-74-00013).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – ЮАБ, МСБ; написание статьи – ЮАБ, ДИР; анализ данных – ДИР, АРГ; администрирование проекта – ЮАБ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Klymchenko A.S. // Acc. Chem. Res.* 2017. V. 50. P. 366–375.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00517>
2. *Plamont M.-A., Plamont M., Billon-Denis E., 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., Vriz S., Le Saux T., Jullien L., Gautier A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 497–502.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
3. *Szent-Gyorgyi C., Schmidt B.F., Creeger Y., Fisher G.W., Zabel 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>
4. *Bogdanova Yu.A., Zaitseva E.R., Smirnov A.Yu., Baleeva N.S., Gavrikov A.S., Myasnyanko I.N., Goncharuk S.A., Kot E.F., Mineev K.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // IJMS.* 2023. V. 24. P. 7958.
<https://doi.org/10.3390/ijms24097958>
5. *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>
6. *Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R. // Science.* 2011. V. 333. P. 642–646.
<https://doi.org/10.1126/science>
7. *Hu F., Liu B. // Org. Biomol. Chem.* 2016. V. 14. P. 9931–9944.
<https://doi.org/10.1039/C6OB01414C>
8. *Hoi N.E., Lee J.Y., Park E.C., Lee J.H., Lee J. // Molecules.* 2021. V. 26. P. 217.
<https://doi.org/10.3390/molecules26010217>
9. *Walker C.L., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V., Mishin A.S., Bommaris A.S., Duraj-Thatte A.M., Azizi B., Tolbert L.M., Solntsev K.M. // Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. V. 27. P. 64–74.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.002>
10. *Baleeva N.S., Baranov M.S. // Chem. Heterocycl. Comp.* 2016. V. 52. P. 444–446.
<https://doi.org/10.1007/3266>
11. *Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Baleeva N.S., Kubilitski V.S., Smirnov A.Yu., Bogdanova Yu.A., Krasnova S.A., Myasnyanko I.N., Mishin A.S., Baranov M.S. // IJMS.* 2023. V. 24. P. 9923.
<https://doi.org/10.3390/ijms24129923>

12. Rudik D.I., Perfilov M.M., Sokolov A.I., Chen C., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Mishin A.S., Fang C., Bogdanova Y.A., Baranov M.S. // IJMS. 2024. V. 25. P. 10448.
<https://doi.org/10.3390/ijms251910448>
13. Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Mikhaylov A.A., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Mishin A.S., Baranov M.S. // Dyes and Pigments. 2022. V. 198. P. 110033.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.110033>
14. Smirnov A.Yu., Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Zagudaylova M.B., Zaitseva S.O., Mishin A.S., Baranov M.S. // Dyes and Pigments. 2020. V. 177. P. 108258.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108258>
15. Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y.A., Smirnov A.Yu., Baleeva N.S., Krylov A.I., Baranov M.S. // J. Phys. Chem. Lett. 2018. V. 9. P. 1958–1963.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.8b00512>
16. Rudik D.I., Gil'yanov A.R., Smirnov A.Yu., Bogdanova Yu.A., Krasnova S.A., Baranov M.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2025. V. 51. P. 145–150.
<https://doi.org/10.1134/S1068162025010133>
17. Cottet-Rousselle C., Ronot X., Leverve X., Mayol J.F. // Cytometry Pt A. 2011. V. 79A. P. 405–425.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.21061>
18. Prokhorova E.A., Zamaraev A.V., Kopeina G.S., Zhivotovskiy B., Lavrik I.N. // Cell. Mol. Life Sci. 2015. V. 72. P. 4593–4612.
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-2031-y>
19. Abate M., Festa A., Falco M., Lombardi A., Luce A., Grimaldi A., Zappavigna S., Sperlongano P., Irace C., Caraglia M., Misso G. // Semin. Cell Dev. Biol. 2020. V. 98. P. 139–153.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdcb.2019.05.022>
20. Yang R., He X., Niu G., Meng F., Lu Q., Liu Z., Yu X. // ACS Sens. 2021. V. 6. P. 1552–1559.
<https://doi.org/10.1021/acssensors.0c02372>
21. Baldridge A., Kowalik J., Tolbert L. // Synthesis. 2010. V. 2010. P. 2424–2436.
<https://doi.org/10.1055/s-0029-1218796>
22. Chen C., Boulanger S.A., Sokolov A.I., Baranov M.S., Fang C. // Chemosensors. 2021. V. 9. P. 234.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors9080234>
23. Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L.V., Tolbert L.M., Yampolsky I.V., Solntsev K.M. // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. P. 6025–6032.
<https://doi.org/10.1021/ja3010144>

Kaede Protein Chromophore Analogue as a Tool for Simultaneous Selective Staining of the Nucleus and Mitochondria

D. I. Rudik*, A. R. Gilvanov, **, M. S. Baranov**, and Yu. A. Bogdanova*, **, #**

#Phone: +7 (965) 315-11-19; e-mail: zashiki.vvarashi@gmail.com

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

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

A series of three dyes – analogs of the chromophore of the fluorescent protein Kaede with various substituents – was synthesized. Based on fluorescence microscopy results, a promising fluorogen was identified: 5-((Z)-2-(difluoroboranyl)-4-(dimethylamino)-5-hydroxybenzylidene)-3-methyl-2-((E)-2-(pyridin-4-yl)-vinyl)-3,5-dihydro-4H-imidazol-4-one. The successful application of this dye in wide-field fluorescence microscopy for simultaneous selective staining of nuclei and mitochondria in living cells was demonstrated using the HeLa Kyoto cell line as an example. The synthesized compound may find application in the field of visualization of living system processes.

Keywords: arylidene imidazolones, fluorogens, mitochondria, nucleus