



УДК 547.782

ТИОФЕНОВЫЙ АНАЛОГ ХРОМОФОРА GFP КАК ФЛУОРОГЕН ДЛЯ БЕЛКА FAST

© 2021 г. Н. С. Балеева*, **, #, А. Ю. Смирнов*, **, И. Н. Мяснянко*, **,
А. С. Гавриков*, 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 12.03.2021 г.

После доработки 25.03.2021 г.

Принята к публикации 28.03.2021 г.

Синтезировано тиофеновое производное хромофора белка GFP. Установлено, что введение тиофенового заместителя приводит к значительному возрастанию коэффициента экстинкции. Показано, что полученное соединение может быть использовано для флуоресцентной микроскопии в качестве пары для флуороген-активирующего белка FAST.

Ключевые слова: флуорогены, флуороген-активирующие белки, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342321050195

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы популярным типом генетически кодируемых флуоресцентных меток стали так называемые флуороген-активирующие белки [1–3]. Такие белки способны формировать комплексы с флуорогенами – низкомолекулярными люминесцирующими молекулами, имеющими в растворах лишь слабовыраженную флуоресценцию. В результате формирования комплекса и фиксации флуорогена белком происходит многократное усиление флуоресценции [4]. Представитель такой группы белков – белок FAST (Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag) [5]. Этот белок способен образовывать флуоресцентные комплексы с бензилиденовыми производными роданинов [6] или производными хромофоров флуоресцентных белков [7] (схема 1).

На данный момент для белка FAST создано более десятка флуорогенов, имеющих самую разную окраску [8, 9]. Однако все эти вещества образуют флуоресцентные комплексы с умеренной яркостью: их квантовый выход флуоресценции лежит в районе 20–30%, коэффициент экстинкции составляет 20000–40000 M⁻¹ см⁻¹. Поскольку

яркость флуоресцентных меток – одна из важнейших характеристик, актуальное направление дальнейшего исследования в области создания новых пар “белок FAST – флуороген” – поиск веществ, отличающихся более интенсивными поглощением и/или флуоресценцией. Поэтому целью данной работы стало создание соединения с такими свойствами на основе хромофора GFP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы исследовали, как влияет на оптические свойства флуоресцентного комплекса введение тиофенового заместителя в структуру флуорогена. Хорошо известно, что введение в молекулы красителей такого фрагмента может приводить к заметному росту коэффициента экстинкции [10, 11]. Для синтеза тиофенового аналога хромофора белка GFP (II) нами была выбрана палладий-катализируемая реакция кросс-сочетания (схема 1). Этот метод уже был использован для синтеза ряда бензилиденимидазолонов, содержащих различные ароматические заместители во втором положении имидазолонна [12, 13]. Целевое соединение было получено с общим выходом 38% из силилированного *para*-гидрокси-*meta*-метоксибензальдегида (схема 1).

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein); FAST – fluorescence-activating and absorption-shifting tag.

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

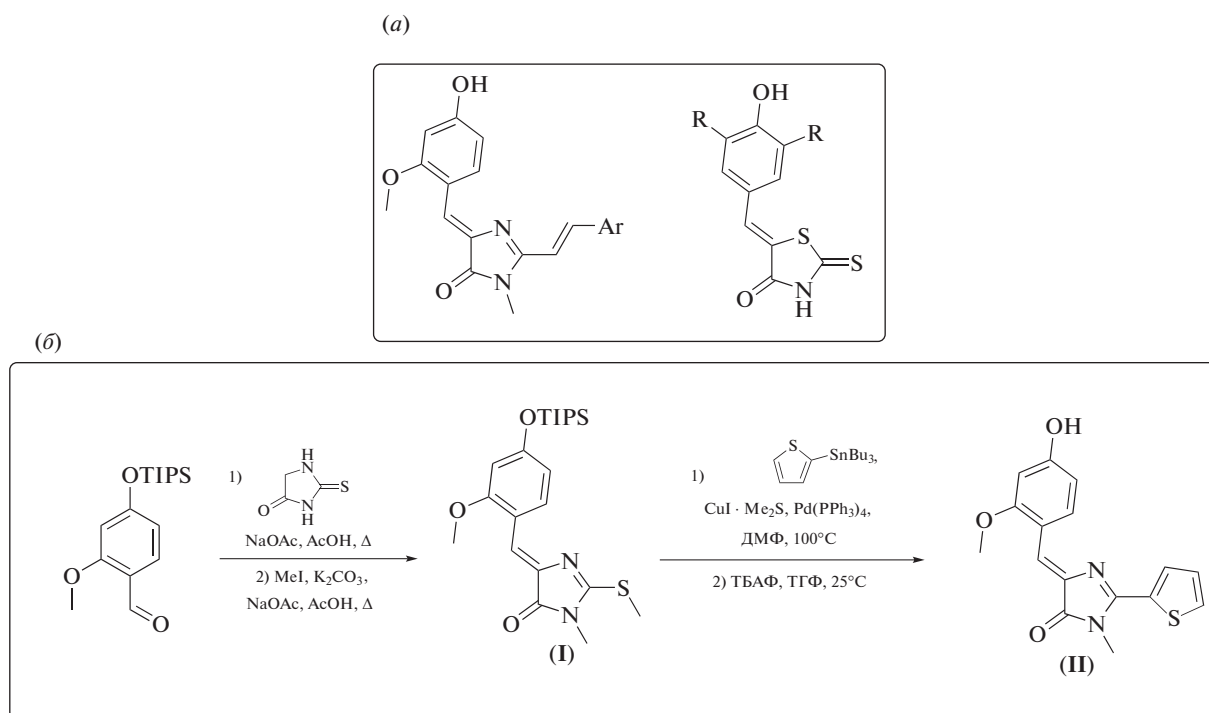


Схема 1. (а) – Примеры флуорогенов белка FAST; (б) – схема синтеза соединения (II).

Наличие гидроксигруппы в бензильденовом фрагменте соединения (II) обеспечивает возможность перехода молекулы в анионную форму. Было установлено, что максимум абсорбции нейтральной формы составляет 432 нм, а анионной – 492 нм. Обе формы характеризуются очень слабой флуоресценцией в области 510–545 нм с квантовым выходом менее 0.05% (табл. 1).

Дальнейшее исследование показало, что соединение (II) проявляет ярко выраженные флуорогенные свойства. Добавление белка FAST в раствор соединения (II) приводит к увеличению интенсивности флуоресценции в 150 раз и bathochromному смещению максимума абсорбции на 80 нм (рис. 1а). Последнее, очевидно, вызвано депротонированием гидроксигруппы, как и для других флуорогенов белка FAST [5]. Мы установили, что комплекс белка FAST с соединением (II) характеризуется квантовым выходом флуоресценции 2% и коэффициентом экстинкции $101500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (табл. 1). Таким образом, нам не удалось заметно повысить яркость, однако мы показали, что введение тиофенового фрагмента в структуру флуорогена позволяет значительно увеличить коэффициент экстинкции.

Мы исследовали возможность использования соединения (II) для окрашивания живых клеток линии HeLa Kyoto, трансфицированных конструкцией H2B-FAST. При добавлении соединения (II) в клеточную среду наблюдалось появление яркого флуоресцентного сигнала в отсутствие заметного нецелевого окрашивания (рис. 1б).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на спектрометре Avance III (700 МГц; Bruker, США) при 303 К в $\text{DMSO-}d_6$ (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 масс-спектрометре micrOTOF II (Bruker, Германия), ионизация электрораспылением.

(Z)-5-(2-Метокси-4-((триизопропилсилил)окси)бензильден)-3-метил-2-(метилтио)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (I). Смесь 2-метокси-4-((триизопропилсилил)окси)бензальдегида (2 г, 6.5 ммоль), 2-тиоксоимидазолидин-4-она (0.58 г, 5 ммоль) и ацетата натрия (1.76 г, 21.5 ммоль) в уксусной кислоте (15 мл) кипятили в течение 3 ч. Затем при интенсивном перемешивании реакционную смесь разбавляли водой (50 мл). Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой (20 мл) и диэтиловым эфиром (10 мл), сушили под вакуумом. Полученный осадок растворяли в ацетонитриле (65 мл), добавляли иодметан (1.6 мл, 3.7 г, 26 ммоль) и карбонат калия (3.6 г, 26 ммоль). Реакционную смесь кипятили 8 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и упаривали на роторном испарителе до четверти исходного объема. Затем остаток разбавляли этилацетатом (350 мл), промывали насыщенным

Таблица 1. Оптические свойства соединения (II) в фосфатном буфере в свободном виде и в виде комплекса с белком FAST

Соединение/комплекс		Положение максимума абсорбции, нм	Коэффициент экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	Положение максимума эмиссии, нм	Квантовый выход флуоресценции, %	K _d , мкМ
Соединение (II)	Нейтральная форма	432	75000	~510	<0.05	—
	Анионная форма	492	152500	545	<0.05	—
Комплекс белка FAST с соединением (II)		512	101500	543	2	0.21

раствором NaCl (150 мл), высушивали над безводным Na₂SO₄ и упаривали на ротормном испарителе. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент хлороформ–этанол, 99 : 1). Желтый порошок (1.7 г, 61%); т. пл. 152–154°C.

¹H-ЯМР: 8.74 (д, J₂ 8.8, 1 H), 7.15 (с, 1 H), 6.58 (дд, J₂ 8.5, 2.2, 1 H), 6.50 (д, J₂ 2.3, 1 H), 3.85 (с, 3 H), 3.07 (с, 3 H), 2.70 (с, 3 H), 1.31 (кв, J₂ 7.5, 3 H), 1.09 (д, J₂ 7.5, 18 H).

¹³C-ЯМР: 168.9, 164.0, 159.8, 158.8, 136.0, 133.1, 116.2, 115.3, 112.1, 102.9, 55.7, 26.2, 17.6, 12.4, 12.0.

HRMS (ESI) m/z: найдено M 435.2129; рассчитано для C₂₂H₃₅N₂O₃SSi⁺, [M]⁺ 435.2132.

5-((Z)-4-Гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-(тиофен-2-ил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II). (Z)-5-(2-Метокси-4-((триизопропилсилил)окси)бензилиден)-3-метил-2-(метилтио)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (0.43 г, 1 ммоль) растворяли в диметилформамиде (20 мл), добавляли 2-(трибутилстаннил)тиофен (0.35 мл, 1.1 ммоль), раствор CuI · Me₂S в диэтиловом эфире (0.84 М, 1.9 мл, 2.2 ммоль) и тетракис(трифенилфосфин)палладий (0.06 г, 0.05 ммоль) и пере-

мешивали при температуре 100°C в течение 15 ч в инертной атмосфере. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом (100 мл), промывали водой (3 × 25 мл), насыщенным раствором хлорида натрия (3 × 25 мл), высушивали над безводным Na₂SO₄ и упаривали на ротормном испарителе. Полученный остаток растворяли в тетрагидрофуране (50 мл), добавляли фторид тетрабутиламмония (0.48 г, 1.5 ммоль) и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь разбавляли этилацетатом (100 мл), промывали фосфатным буфером (pH 7; 5 × 25 мл), насыщенным раствором NaCl (3 × 25 мл), высушивали над безводным Na₂SO₄ и упаривали на ротормном испарителе. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент гексан–этилацетат, 1 : 1). Оранжевый порошок (0.2 г, 62%); т. пл. ~245°C с разложением.

¹H-ЯМР: 10.33 (с, 1 H), 8.71 (д, J₂ 8.6, 1 H), 7.96–7.96 (м, 2 H), 7.39 (с, 1 H), 7.32–7.29 (м, 1 H), 6.53 (дд, J₂ 8.6, 2.1, 1 H), 6.47 (д, J₂ 2.1, 1 H), 3.85 (с, 3 H), 3.44 (с, 3 H).

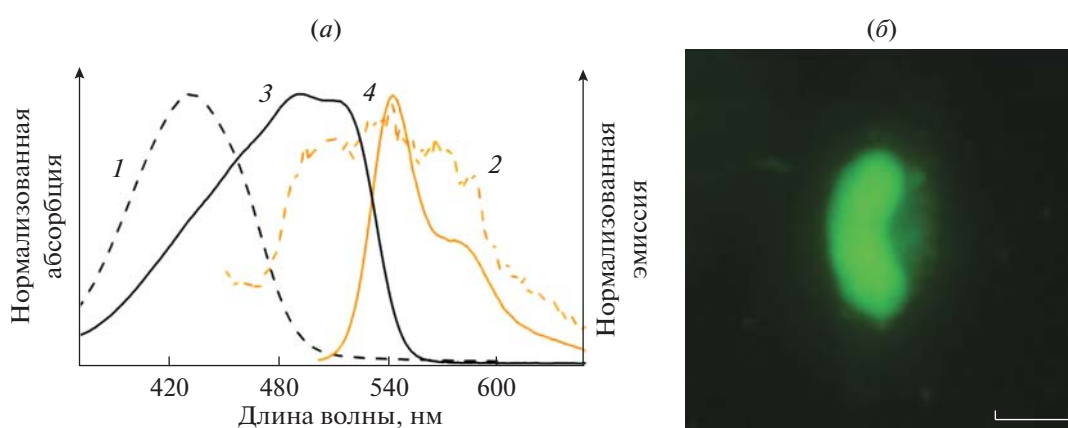


Рис. 1. (а) – Спектры абсорбции (черный) и эмиссии (оранжевый) соединения (II) в свободном виде (пунктирные кривые 1 и 2) и в виде комплекса с белком FAST (сплошные кривые 3 и 4) в фосфатном буфере; (б) – флуоресцентная микроскопия живых клеток HeLa Kyoto, временно трансфицированных конструкцией, кодирующей H2B-FAST. Конечная концентрация соединения (II) в растворе – 20 мкМ. Масштабный отрезок – 10 мкм.

^{13}C -ЯМР: 170.0, 162.1, 160.7, 154.4, 135.1, 133.9, 132.3, 131.8, 130.5, 128.9, 119.9, 114.3, 108.8, 98.7, 55.6, 28.3.

HRMS (ESI) m/z : найдено M 315.0794; рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$, $[M]^+$ 315.0798.

Экспрессия и выделение белка FAST. Препарат белка FAST получали согласно методике, опубликованной ранее [7].

Флуоресцентная микроскопия. Клеточную линию HeLa Kyoto (получена из EMBL) выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 50 ед./мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия), 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 10% бычьего сывороточного альбумина (HyClone, Thermo Scientific, США) при 37°C и 5% CO_2 . Для временной трансфекции использовали трансфекционный агент FuGENE 6 (Promega, США). Конструкция H2B-FAST, кодирующая белок слияния гистона H2B с белком FAST, была собрана по стандарту GoldenGate [14]. Непосредственно перед съемкой среду DMEM заменяли на раствор Хэнкса (ПанЭко, Россия) с 20 mM HEPES (Sigma, США).

Широкопольную флуоресцентную микроскопию проводили с помощью микроскопа Leica 6000 (Leica, Германия) с объективом HCX PL APO 100X/1.40-0.70NA. Микроскоп оснащен камерой Zyla sCMOS (Andor) и источником света CoolLED pE-300. При съемке использовали GFP-фильтр. Концентрация флуорогена в среде для имиджинга составляла 20 мкМ, мощность облучения – 2.5 Вт/см².

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезировано новое производное хромофора GFP, содержащее тиофеновый заместитель во втором положении имидазолонового фрагмента. Установлено, что это соединение способно формировать флуоресцентный комплекс с белком FAST, характеризующийся интенсивным поглощением с коэффициентом экстинкции 101500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Таким образом, можно заключить, что тиофеновые производные хромофоров флуоресцентных белков – перспективная основа для создания новой группы флуорогенов белка FAST, а также прочих флуороген-активирующих белков или иных мишеней.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-33-90142).

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

- 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>
- Péresse T., Gautier A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 6142. <https://doi.org/10.3390/ijms20246142>
- Gallo E. // *Bioconjugate 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>
- 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>
- Sun Y., Qu Z., Zhou Z., Gai L., Lu H. // *Org. Biomol. Chem.* 2019. V. 17. P. 3617–3622. <https://doi.org/10.1039/c9ob00030e>
- Kubota Ya., Kimura K., Jin J., Manseki K., Funabiki K., Matsui K. // *New J. Chem.* 2019. V. 43. P. 1156–1165. <https://doi.org/10.1039/C8NJ04672G>
- Oumouch S., Bourotte M., Schmitt M., Bourguignon J.-J. // *Synthesis.* 2005. V. 1. P. 25–27. <https://doi.org/10.1055/s-2004-834935>
- Gosling S., Rollin P., Tatibouët A. // *Synthesis.* 2011. V. 22. P. 3649–3660. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1260259>
- Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. // *PLoS One.* 2008. V. 3. P. e3647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>

Thiophene Analog of the GFP Chromophore as Fluorogen for FAST Protein**N. S. Baleeva^{*, **, #}, A. Yu. Smirnov^{*, **}, I. N. Myasnyanko^{*, **},
A. S. Gavrikov^{*}, 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 thiophene derivative of the GFP chromophore. The introduction of thiophene substituent leads to increase absorption intensity. Thiophene analogs can be used as fluorogens for the fluorogen-activating protein FAST protein in fluorescent microscopy.

Keywords: fluorogens, fluorogen-activating proteins, fluorescence