

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук**

---

*На правах рукописи*

Смирнов Александр Юрьевич

**Флуорогенные и сольватохромные красители на основе  
хромофора GFP**

специальность – 02.00.10 – биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва 2020

Работа выполнена в отделе биофотоники в группе химии гетероциклических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

**Научный руководитель:**

Кандидат химических наук Баранов Михаил Сергеевич

**Официальные оппоненты:**

Вацадзе Сергей Зурабович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией №2 (Лаборатория супрамолекулярной химии) федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН).

Тараканов Павел Александрович, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)"

Защита состоится 17 марта 2021 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан «    » 2021 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук  
В.А. Олейников**



## ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Современная биология немыслима без применения флуоресцентной микроскопии. Краеугольным камнем данного метода является флуоресцентная метка, которая вводится в исследуемый объект. Для успешного использования она должна обладать рядом определенных характеристик – селективным окрашиванием целевого объекта, низким фоновым сигналом, а также незначительным влиянием на свойства окрашиваемой системы (в частности отсутствием токсичности и малым размером). Желательно, чтобы положения максимумов поглощения и испускания лежали в длинноволновой области и по возможности соответствовали используемым в оборудовании фильтрам. Несмотря на то, что к настоящему моменту предложено множество флуоресцентных меток различных типов, которые активно поспособствовали революционному развитию биологических исследований в последние несколько десятилетий, идеальной флуоресцентной метки до сих пор не существует и разработка новых подходов к мечению остается актуальной задачей. В частности, в последние годы стало популярным использование так называемых флуорогенных красителей – веществ, чья флуоресценция в свободном виде выражена незначительно и проявляется интенсивно лишь при взаимодействии с целевым объектом.

Одной из самых распространенных флуоресцентных меток, используемых в современных биологических исследованиях, являются разнообразные флуоресцентные белки семейства зеленого флуоресцентного белка (GFP), который был обнаружен у медуз *Aequorea victoria* в 1962 г. Центральной частью данного белка, отвечающей за флуоресцентные свойства, является хромофор, образующийся из собственных аминокислотных остатков и имеющий структуру бензилиденимидазолон. Находясь внутри массивной белковой молекулы, этот хромофор проявляет ярко выраженную флуоресценцию, однако в свободной форме данное соединение флуоресцирует очень слабо. Ранее в нашей лаборатории было показано, что подобное свойство объясняется возможностью конформационных изменений молекулы хромофора, которые приводят к безызлучательному сбросу энергии возбуждения. Фиксация молекулы внутри белка или же внутренним мостиком приводит к значительному увеличению ее квантового выхода флуоресценции, а значит различные производные хромофора GFP являются отличной основой для создания флуорогенных маркеров.<sup>1</sup>

**Цели и задачи исследования.** Целью представленной работы является поиск новых флуорогенных производных хромофора GFP и изучения возможности их использования для флуоресцентного мечения биологических объектов. В рамках поставленной цели были реализованы следующие задачи:

- Систематическое изучение влияния различных заместителей на оптические свойства аналогов хромофора GFP.

---

<sup>1</sup> 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. Conformationally Locked Chromophores as Models of Excited-State Proton Transfer in Fluorescent Proteins // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Т. 134. № 13. С. 6025–6032.

- Выявление веществ с наиболее выраженной флуорогенностью, а также их модификация, направленная на смещение максимумов абсорбции и эмиссии новых веществ в длинноволновую область.
- Изучение возможности использования созданных флуорогенов в окрашивании живых систем и выявление закономерностей между их строением и свойствами.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** В результате проведённой работы были впервые синтезированы аналоги хромофора GFP, проявляющие заметное варьирование квантового выхода флуоресценции в различных средах и ярко выраженный сольватохромизм. Предложены новые методы их модификации, в частности, реакция кросс-сочетания терминальных ацетиленов и 2-метилсульфанилбензилиден-имидазолонов. В результате проведённой работы впервые показана возможность использования производных хромофора GFP в качестве флуорогенных красителей, пригодных для флуоресцентного мечения эндоплазматического ретикулула и митохондрий. Подробное изучение характеристик предложенных маркеров позволило сделать выводы о причинах селективности выявленного окрашивания, которые могут быть использованы при создании новых флуорогенных маркеров.

**Методология и методы исследования.** Синтетическая работа проводилась с применением классических методов органической и металлоорганической химии. Все новые соединения характеризовались методами ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , масс-спектрометрии высокого разрешения для веществ, обладающих выраженной окраской.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- Введение в бензилиденовый фрагмент производных хромофора GFP акцепторных групп и некоторых сопряженных структур приводит к усилению сольватохромизма и многократному увеличению интенсивности их флуоресценции в апротонных средах.
- Аналогичные производные хромофора белка *Kaede* и ауриновых соединений характеризуются заметным батохромным смещением максимумов поглощения эмиссии, а также зачастую демонстрируют достаточно высокий квантовый выход флуоресценции в апротонных средах, огромный Стоксов сдвиг и выраженный сольватохромизм в целом.
- Введение аминогруппы при кратной экзо-связи производных хромофора GFP не приводит к батохромному смещению максимумов поглощения и эмиссии, однако позволяет создать на их основе стабилизированные дифторборильным мостиком 5-аминометиленимидазоны, которые демонстрируют интенсивную флуоресценцию и ярко выраженный сольватохромизм.
- Взаимодействие 2-метилсульфанильных имидазолонов с терминальными ацетиленами приводит к образованию метилсульфанильных аналогов хромофора белка *Kaede*, которые также характеризуются заметным батохромным смещением максимумов поглощения и эмиссии.
- Полученные соединения могут применяться как сольватохромные флуорофоры, проявляющие высокую флуоресценцию в апротонных средах,

и могут быть использованы для селективного окрашивания отдельных клеточных органелл.

**Апробация полученных данных и публикации.** Основные материалы диссертации были доложены на международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва 2019), а также конкурсе молодых ученых в рамках XXXI зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2019). По материалам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах.

**Структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 128 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений, а также списка цитируемой литературы, включающего 165 ссылки. Диссертация содержит 77 рисунков и 21 таблицу.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

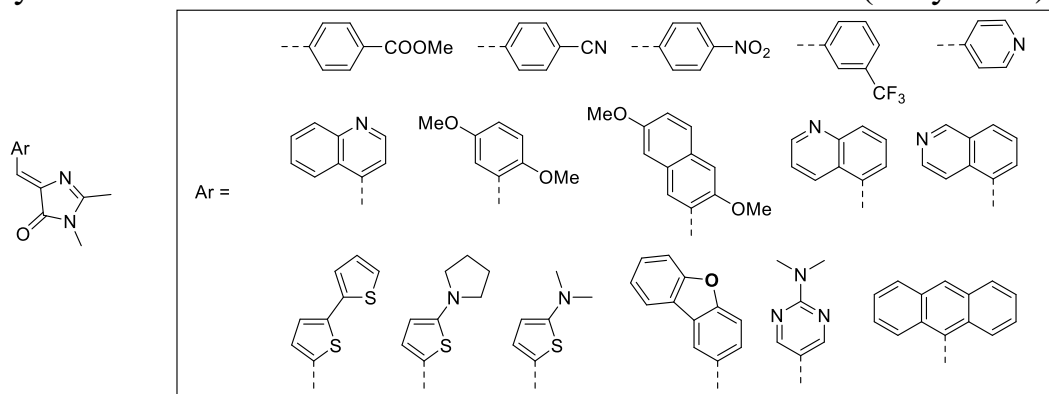
**Обзор литературы** представлен в первой главе диссертации и включает в себя три раздела. Первый раздел посвящен краткому описанию явления флуоресценции, а также требованиям, предъявляемым флуоресцентным красителям (флуорофорам) в биологии. Во втором разделе рассмотрены современные сольватохромные флуорофоры и их использование для визуализации биологических объектов. Третий раздел посвящен методам создания 5-бензилиден-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов – общего структурного ядра хромофоров флуоресцентных белков.

**Экспериментальная часть** представлена в третьей главе диссертации и включает в себя описание методов синтеза веществ, представленных в настоящей работе.

### Флуорогенные и сольватохромные аналоги хромофора зеленого флуоресцентного белка (GFP).

Основой флуоресцентных белков семейства GFP являются хромофоры, образующиеся из аминокислотных остатков и имеющих в основе структуру бензилиденимидазолон. В свободном от белка виде такие вещества практически не флуоресцируют из-за возможностей конформационной релаксации энергии возбуждения. Тем не менее, в литературе описано несколько родственных веществ, которые демонстрируют заметную эмиссию в липофильном окружении.

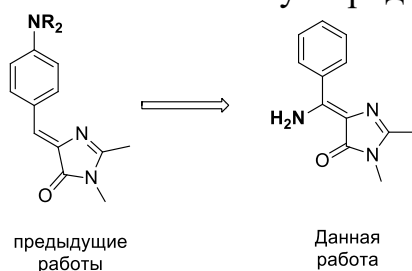
В данной работе мы решили систематически изучить возможные модификации бензилиденимидазолонов, которые приводили бы к увеличению их квантового выхода флуоресценции в том или ином окружении. В первой части работы нами был создан ряд новых аналогов хромофора GFP с различными заместителями в бензилидененом фрагменте. Синтез такого набора веществ позволил изучить влияние заместителей на оптические свойства (Рисунок 1).



**Рисунок 1.** Предполагаемые флуорофоры на основе аналога хромофора GFP.

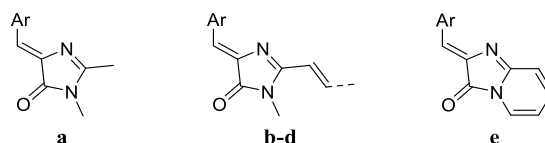
Известно, что стандартные аналоги хромофора GFP обладают достаточно коротковолновыми максимумами поглощения и испускания, что ограничивает область их применения в биологических исследованиях. Поэтому вторую часть нашей работы мы посвятили поиску новых путей модификации молекулы бензилиденимидазолон, способных сместить максимумы абсорбции и эмиссии в длинноволновую область с сохранением сольватохромных и флуоресцентных свойств. Известно, что введение аминогруппы в бензилидененовый фрагмент приводит к значительному батохромному сдвигу. Мы решили изучить

возможность синтеза 5-аминометиленимидазолонов, в которых данная донорная группа располагалась бы у метинового атома углерода. (Рисунок 2).



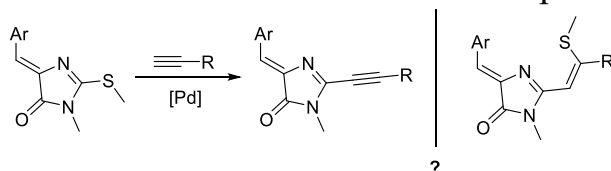
**Рисунок 2.** Введение аминогруппы при кратной экзо-связи.

Также был создан ряд производных с расширенной системой кратных связей **b-d**, являющиеся аналогами хромофора белка *Kaede* (Рисунок 3) их ауриноподобных аналогов **e**.



**Рисунок 3.** Общая структура флуорофоров с расширенной системой кратных связей.

Кроме того, мы решили исследовать возможности получения аналогов хромофора *Kaede*, содержащих тройную связь во втором положении имидазолонового цикла. В качестве исходных веществ мы использовали синтетически доступные 2-метилсульфанил-4-бензилиденимидазолон. На основании литературных данных возможно протекание двух реакций – либо образование ацетиленового аналога хромофора белка *Kaede*, либо же присоединение ацетилена и образование такого же хромофора с атомом серы при двойной связи (Рисунок 4). Оба варианта приводят к увеличению размера системы сопряженных связей и тем самым способствовать батохромному сдвигу.

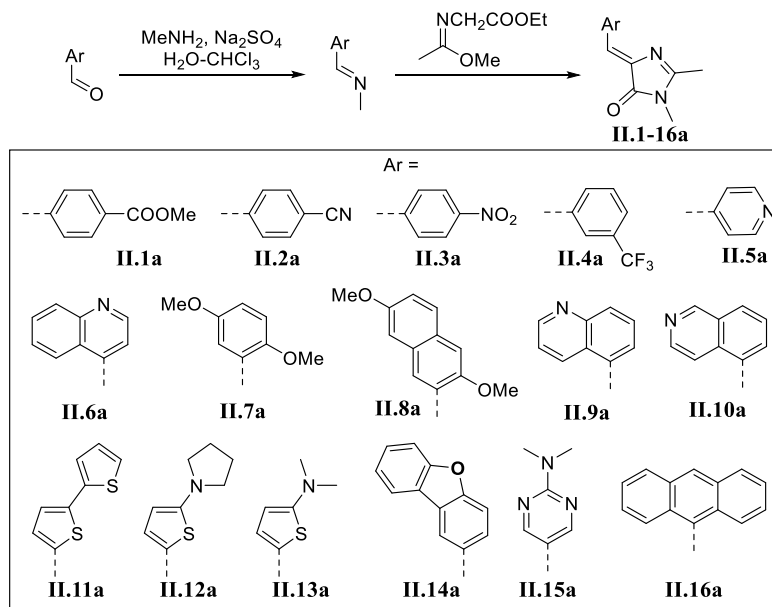


**Рисунок 4.** Возможные продукты реакции 2-метилсульфанилимидазолонов с ацетиленами.

Также на втором этапе нами были первично изучены оптические и иные физико-химические свойства полученных веществ.

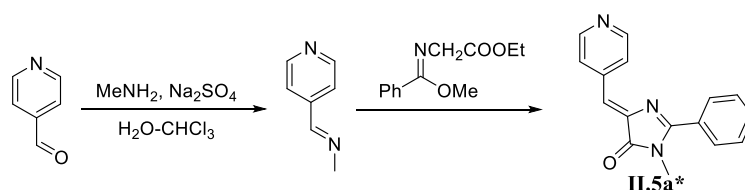
Третью часть нашей работы мы посвятили более подробному исследованию оптических свойств наиболее перспективных соединений, их сравнению друг с другом и выявлению перспективных флуорогенов, потенциально пригодных для меченья живых систем. Четвертая же часть данной работы посвящена исследованию нашими коллегами возможностей применения новых сольватохромных флуорогенов в качестве флуоресцентных меток различных органелл.

**3.1. Синтез и исследование производных хромофора GFP - изучение влияния заместителей в бензилиденовом фрагменте.** В качестве основной методики синтеза 2-метил-4-бензилиденимидазолонов мы использовали ставший уже классическим подход, основанный на [3+2] циклоприсоединении арилиминов и иминоэфиров (Рисунок 5).



**Рисунок 5.** Синтез 2-метил-4-бензилиденимидазонов **II.1-16a**.

Соединения были получены с хорошими выходами (Таблица 1) и представляли собой желтые, стабильные на воздухе порошки. Кроме того, было синтезировано и 2-фенилпроизводное **II.5a\*** из 4-пиридинового альдегида по аналогичной методике (Рисунок 6). Продукт также представлял собой желтый порошок.



**Рисунок 6.** Синтез 2-фенильного соединения **II.5a\***.

Оптические свойства растворов всех синтезированных соединений в ацетонитриле представлены ниже (Таблица 2).

**Таблица 1.** Оптические свойства полученных имидазолонов в ацетонитриле.

Соединение	Абсорбция, нм	Эмиссия, нм	КВФ <sup>2</sup> , %
<b>II.1a</b>	364	450	6.4
<b>II.2a</b>	365	454	6.0
<b>II.3a</b>	382	528	2.7
<b>II.4a</b>	353	435	1.8
<b>II.5a</b>	356	452	4.7
<b>II.5a*</b>	377	475	4.8
<b>II.6a</b>	377	462	0.2
<b>II.7a</b>	392	499	6.6
<b>II.8a</b>	371	545	8.4
<b>II.9a</b>	362	~450	<<0.1
<b>II.10a</b>	360	~450	<<0.1
<b>II.11a</b>	416	440	<0.1
<b>II.12a</b>	469	520	<0.1
<b>II.13a</b>	460	515	<0.1
<b>II.14a</b>	364	430	<0.1
<b>II.15a</b>	387	450	<0.1
<b>II.16a</b>	389	436	<0.1

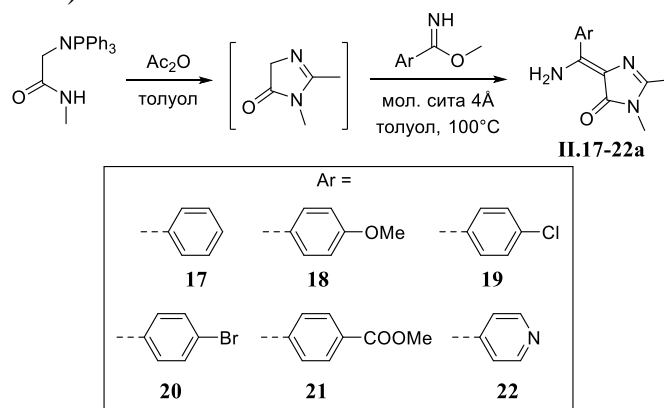
<sup>2</sup> Квантовый выход флуоресценции



Как видно из вышеприведенных данных, часть предложенных нами соединений проявляет очень слабую флуоресценцию в видимом диапазоне, в случае **II.9-10a** эмиссия оказалась столь невелика, что точно определить положение максимума испускания оказалось затруднительно. В итоге для дальнейших исследований мы отбросили соединения **II.9-16a**.

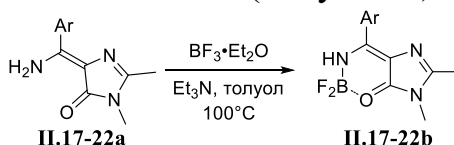
### 3.2. Модификация бензилиденимидазолонов.

**3.2.1 Синтез и исследование 5-аминометиленимидазолонов.** Для получения 5-аминометиленимидазолонов мы проводили конденсацию имидатов и имидазолна (Рисунок 7).



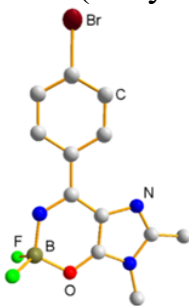
**Рисунок 7.** Синтез 5-аминометиленимидазолонов.

В результате нами была синтезирована серия новых соединений, представляющих собой стабильные на воздухе желтые порошки. При предварительном исследовании их оптических свойств выяснилось, что их максимумы абсорбции и эмиссии лежат в коротковолновой области, а квантовый выход флуоресценции оказался очень мал из-за того, что аминогруппа препятствовала переходу данных соединений в плоскую форму. Для их перевода в планарную форму и увеличения КВФ нами была предпринята попытка введения в эти молекулы дифторборильного мостика (Рисунок 8).



**Рисунок 8.** Синтез борированных 5-аминометиленимидазолонов.

В результате нами с хорошими выходами была получена серия новых соединений. Продукты представляли собой устойчивые на воздухе желтые порошки. Структура соединения **II.20b** также была однозначно подтверждена методом рентгеноструктурного анализа (Рисунок 9).



**Рисунок 9.** Структура соединения **II.20b** на основании данных РСА.

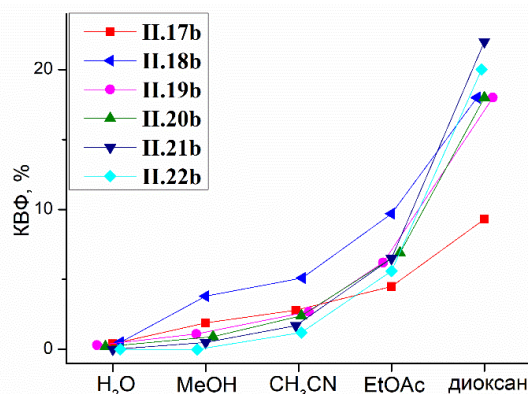
Оптические свойства новых борированных соединений в различных растворителях представлены в Таблице 2.

**Таблица 2.** Оптические свойства соединений **II.17b-22b** в различных растворителях.

Продукт		H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан
<b>II.17b</b>	Абс.	338 <sup>3</sup> (11 <sup>4</sup> )	341 (10)	348 (11)	352 (10)	351 (11)
	Эм.	470	472	480	470	460
<b>II.18b</b>	Абс.	343 (14)	343 (12)	352 (14)	353 (12)	351 (13)
	Эм.	468	460	468	461	456
<b>II.19b</b>	Абс.	346 (11)	349 (10)	353 (10)	360 (9)	355 (10)
	Эм.	481	483	490	470	431
<b>II.20b</b>	Абс.	346 (11)	350 (8)	353 (9)	361 (10)	361 (9)
	Эм.	481	490	490	470	431
<b>II.21b</b>	Абс.	349 (9)	359 (7)	365 (8)	372 (7)	368 (7)
	Эм.	-*	517	521	466	430
<b>II.22b</b>	Абс.	348 (7)	361 (7)	362 (7)	370 (7)	370 (6)
	Эм.	-*	-*	505	465	430

\* нет флуоресценции.

Полученные значения показывают, что растворитель слабо влияет на положение максимумов абсорбции борированных соединений **II.17b-22b**, и сильно - на максимумы эмиссии. Кроме того, нами были измерены и КВФ данных соединений (Рисунок 10).



**Рисунок 10.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.17b-22b** в различных растворителях.

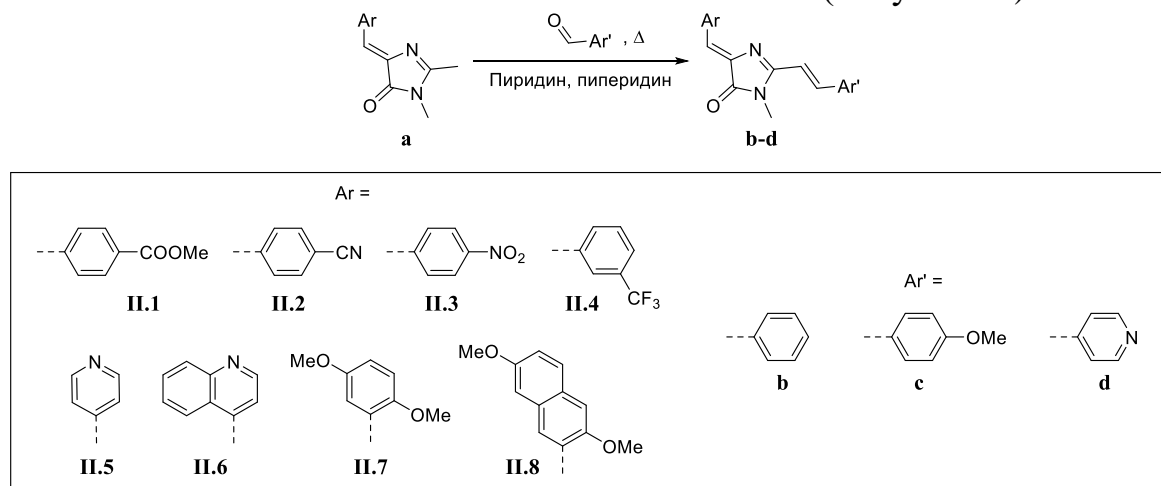
Как видно из полученных данных, стабилизация плоского состояния молекулы приводит к многократному увеличению интенсивности флуоресценции. Большой эффект на флуоресценцию оказывает не только бензилиденный заместитель, но и растворитель. Однако, к сожалению, все новые соединения хоть и показали интересные оптические свойства, их применение для биологических исследований является малоперспективным, так как они обладают слишком коротковолновыми максимумами абсорбции.

**3.2.2. Синтез аналогов хромофора белка *Kaede*.** Самым распространенным подходом для синтеза аналогов хромофора белка *Kaede* является конденсация альдегидов с 2-метилбензилиденимидазолонами. Благодаря этому несложно создавать библиотеки новых соединений, подбирая затем удовлетворяющие поставленным задачам. Синтез целевых продуктов проводился при нагревании в

<sup>3</sup> Здесь и далее указаны максимумы абсорбции и эмиссии в нм

<sup>4</sup> Здесь и далее в скобках указан коэффициент молярной экстинкции  $M^{-1} \times cm^{-1} \times 10^{-3}$

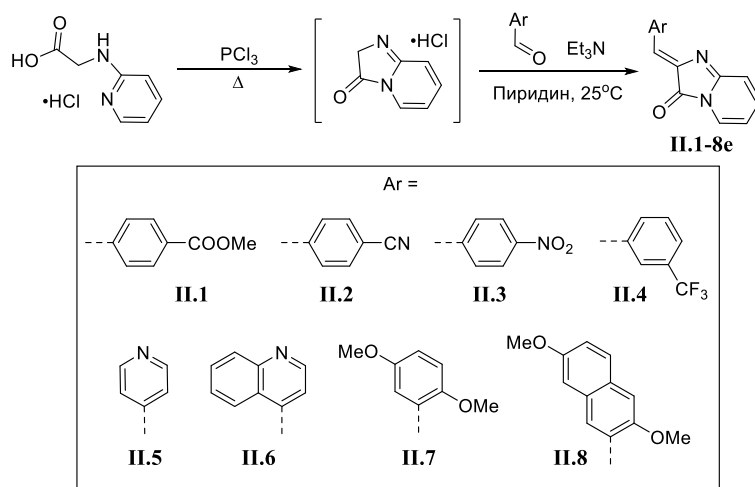
пиридине, в качестве исходных компонентов применялись бензилиденимидазолонны **II.1a-II.8a** как показавшие самые высокие КВФ (Рисунок 11).



**Рисунок 11.** Синтез аналогов хромофора белка *Kaede*.

В результате нами были успешно синтезированы 24 новых соединения с приемлемыми выходами. Полученные вещества представляли собой оранжевые либо красные порошки, стабильные на воздухе и в растворах.

**3.2.3. Синтез ауриноподобных флуорофоров.** Ауриноподобные бензилиденимидазолонные красители известны достаточно давно и в своей работе мы использовали одну из самых первых методик по их синтезу, заключающуюся в конденсации альдегидов и имидазо[1,2-а]пиридин-3(2Н)-оном (Рисунок 12).

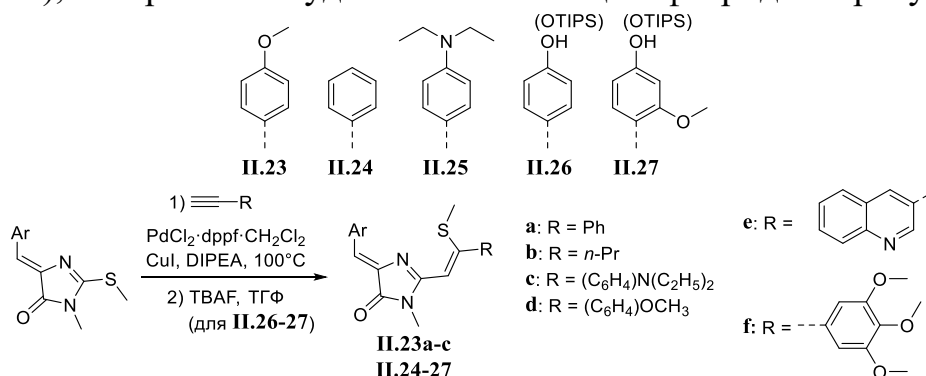


**Рисунок 12.** Синтез ауриноподобных имидазолонных флуорофоров.

Нами успешно была синтезирована серия новых соединений, представляющих собой темно-красные порошки, с удовлетворительными выходами.

**3.2.4. Исследование реакции кросс-сочетания 2-метилсульфанилимидазолонов с терминальными ацетиленами.** В процессе наших исследований реакций кросс-сочетания 2-метилсульфанилимидазолонов с ацетиленами мы выяснили, что в присутствии йодида меди и катализатора  $\text{Pd}[\text{Ph}_3\text{P}]_4$  происходит образование аналога хромофора белка *Kaede*, при этом метилсульфанильная группа оказывается при двойной связи (Рисунок 13). Ацетиленовый продукт не наблюдался вовсе. Соединения с гидроксигруппой, которые могут быть интересными для биологии из-за повышенной

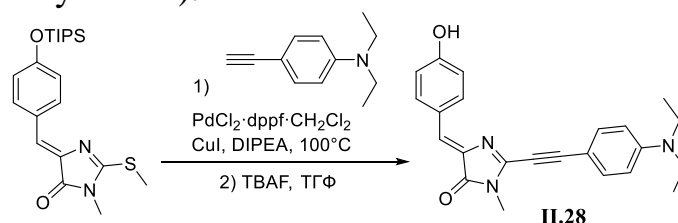
гидрофильности, предварительно были защищены триизопропилсилиловой защитой (TIPS), которая затем удалялась с помощью фторида тетрабутиламмония.



**Рисунок 13.** Полученные в результате реакции кросс-сочетания метилсульфанильные аналоги хромофора белка *Kaede*.

Мы выяснили, что соединения с донорными ацетиленами **II.23d-f** могут быть получены в процессе реакции, однако являются неустойчивыми и легко окисляются, что не позволило нам их исследовать. Остальные вещества были выделены с неплохими выходами и представляли собой желтые или красноватые порошки. Структура полученных веществ и конфигурация двойных связей была подтверждена с помощью двумерной спектроскопии ЯМР экспериментами  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC на примере соединения **II.23a**.

Единственный случай протекания данной реакции, приводящий к образованию ацетиленового производного, наблюдался при реакции 4-диэтиламинофенилацетилена с защищенным метилсульфанилимидазолоном. Нами был получен ацетиленовый продукт **II.28**, а винилового производного мы не обнаружили вовсе (Рисунок 14).



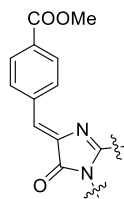
**Рисунок 14.** Реакция образования ацетиленового аналога хромофора белка *Kaede*.

К сожалению, было установлено, что все эти вещества не флуоресцентны и малостабильны на воздухе и особенно в растворах. Поэтому в качестве флуоресцентных меток для биологических объектов они в дальнейшем не были исследованы.

### 3.3. Исследование оптических свойств имидазолоновых флуорофоров

После предварительных исследований нами было проведено подробное изучение оптических свойств новых соединений в различных растворителях. Объектом исследования выступали показавшие заметную флуоресценцию имидазолы **II.1a-II.8a**, а также их производные **d-e**.

## Карбоксибензильные производные



II.1a-e

Ниже приведены нормализованные спектры поглощения и эмиссии данных соединений в ацетонитриле (Рисунок 15). Из полученных данных видно, что для соединений **II.1b-e** характерен значительный bathochromный сдвиг относительно исходного **II.1a**, также для всех соединений характерен большой Стоксов сдвиг.

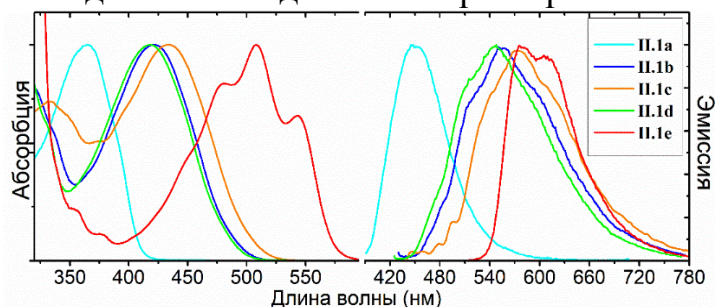
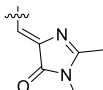
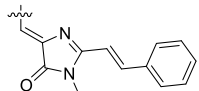
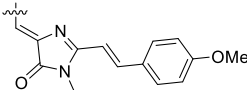
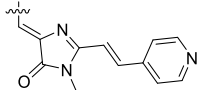
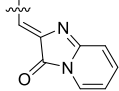


Рисунок 15. Нормализованные графики абсорбции и эмиссии соединений **II.1a-e** в ацетонитриле.

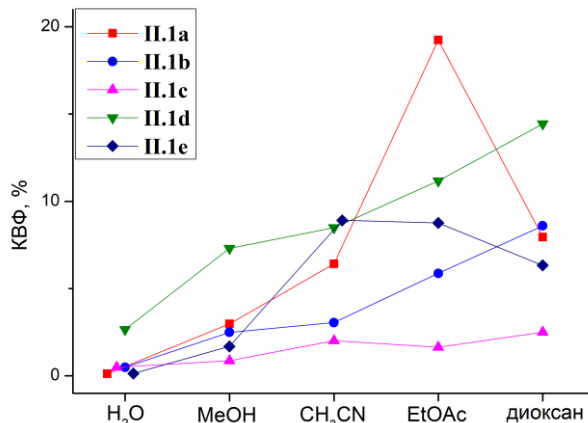
Эти же тенденции характерны как для этих же соединений в остальных растворителях, так и для остальных групп флуорофоров, потому дальше мы рассмотрим только основные моменты. Ниже приведены основные оптические свойства исследованных соединений (Таблица 3). Обращает на себя внимание тенденция к увеличению длины волны эмиссии и Стоксова сдвига при переходе к полярным растворителям.

Таблица 3. Оптические свойства соединений **II.1a-e** в различных растворителях.

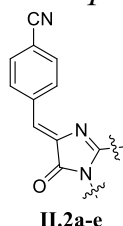
Продукт	H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан
<b>II.1a</b> 	Абс. 355 (16)	358 (16)	364 (16)	365 (16)	367 (15)
	Эм. 464	413	450	442	438
<b>II.1b</b> 	Абс. 399 (18)	418 (17)	422 (18)	420 (17)	423 (14)
	Эм. 591	553	555	551	547
<b>II.1c</b> 	Абс. 438 (20)	433 (19)	434 (20)	431 (21)	432 (15)
	Эм. 584	568	575	568	568
<b>II.1d</b> 	Абс. 409 (12)	416 (12)	417 (12)	419 (12)	421 (9)
	Эм. 547	550	546	541	543
<b>II.1e</b> 	Абс. 495 (12)	498 (12)	508 (13)	508 (13)	511 (10)
	Эм. 608	595	580	568	566

Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.1a-e** в органических растворителях оказались достаточно высокими (Рисунок 16), а в воде - низкими. Также заметно, что наименьший квантовый выход флуоресценции характерен для

4-метоксипроизводного **II.1c**, тогда как наибольший - для продукта конденсации с 4-пиридиальдегидом **II.1d**.

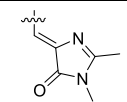
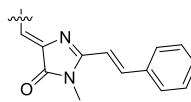
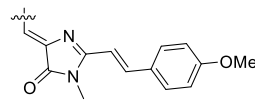
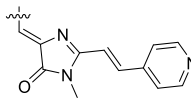
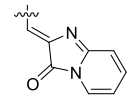


**Рисунок 16.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.1a-e** в различных растворителях.  
*Нитрильные производные*



Группа соединений с нитрильным акцепторным заместителем в пара-положении бензилиденового фрагмента также продемонстрировала схожие с **II.1a-e** оптические свойства (Таблица 4). Заметно уменьшение сольватохромизма, что, видимо, связано с меньшей поляризацией нитрильной группы.

**Таблица 4.** Оптические свойства соединений **II.2a-e** в различных растворителях.

Продукт	H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан	
<b>II.2a</b> 	Абс.	355 (14)	361 (12)	365 (13)	366 (12)	
	Эм.	456	447	454	446	411
<b>II.2b</b> 	Абс.	461 (19)	423 (19)	423 (19)	422 (20)	424 (7)
	Эм.	597	558	561	554	551
<b>II.2c</b> 	Абс.	443 (21)	436 (21)	436 (21)	433 (21)	435 (12)
	Эм.	596	576	585	576	574
<b>II.2d</b> 	Абс.	409 (16)	415 (15)	418 (16)	419 (16)	420 (12)
	Эм.	547	543	547	544	514
<b>II.2e</b> 	Абс.	497 (11)	505 (11)	512 (10)	512 (11)	514 (9)
	Эм.	616	604	587	574	570

Для квантовых выходов флуоресценции этих соединений также характерно некоторое снижение разброса от растворителя к растворителю (Рисунок 17).

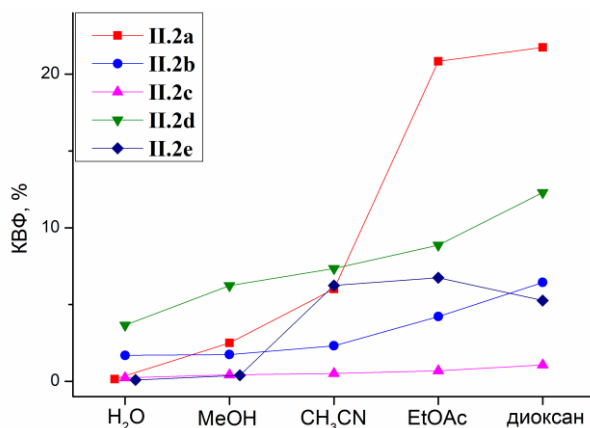
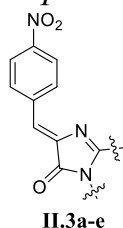


Рисунок 17. Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.2a-e** в различных растворителях.  
*Нитро производные*



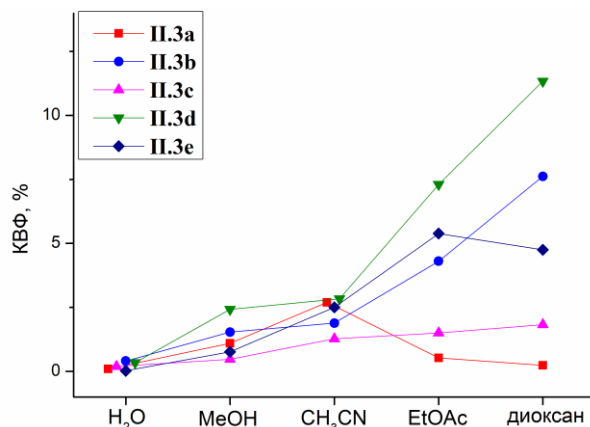
Для нитропроизводных **II.3a-e** характерен очень большой сольватохромизм и огромные Стоксовы сдвиги вплоть до 180 нм (Таблица 5). Также для них характерна плохая растворимость, особенно в воде.

Таблица 5. Оптические свойства соединений **II.3a-e** в различных растворителях.

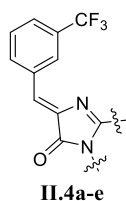
Продукт	H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан	
<b>II.3a</b> 	Абс. Эм.	370 (16) 635	375 (16) 588	382 (15) 528	383 (19) 485	384 (16) 480
<b>II.3b</b> 	Абс. Эм.	423 (12) 619	427 (12) 614	431 (13) 587	428 (13) 568	430 (8) 544
<b>II.3c</b> 	Абс. Эм.	450 (23) 636	448 (22) 632	452 (24) 618	449 (24) 594	452 (11) 585
<b>II.3d</b> 	Абс. Эм.	414 (18) 637	424 (17) 583	429 (17) 574	429 (18) 558	430 (10) 534
<b>II.3e</b> 	Абс. Эм.	507 (-) -	513 (6) 634	520 (3) 630	520 (6) 604	522 (4) 588

\* - слишком низкая растворимость

Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.3a-e** оказались невысокими, хотя и достаточными для их использования как флуоресцентных меток (Рисунок 18).



**Рисунок 18.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.3a-e** в различных растворителях. Трифторметильные производные



Для соединений с трифторметильной группой **II.4a-e** характерны относительно коротковолновые максимумы абсорбции и эмиссии, а также не слишком ярко выраженный сольватохромизм (Таблица 6). Однако Стоксовы сдвиги оказались достаточно велики.

**Таблица 6.** Оптические свойства соединений **II.4a-e** в различных растворителях.

Продукт		H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан
<b>II.4a</b>	Абс.	346 (12)	349 (12)	353 (12)	355 (13)	356 (12)
	Эм.	447	414	435	430	429
<b>II.4b</b>	Абс.	413 (10)	407 (14)	410 (14)	410 (15)	412 (14)
	Эм.	555	536	542	541	537
<b>II.4c</b>	Абс.	428 (12)	422 (19)	422 (17)	419 (15)	421 (18)
	Эм.	570	552	560	556	555
<b>II.4d</b>	Абс.	402 (9)	407 (11)	408 (11)	410 (12)	412 (11)
	Эм.	534	543	535	534	534
<b>II.4e</b>	Абс.	485 (5)	492 (8)	500 (9)	501 (9)	504 (9)
	Эм.	592	563	564	555	554

Квантовые выходы флуорофоров **II.4a-e** оказались умеренными, однако соединение **II.4d** с пиридиновым фрагментом продемонстрировал довольно неплохие значения (Рисунок 19). Но при этом наблюдалась нежелательная флуоресценция в водной среде.



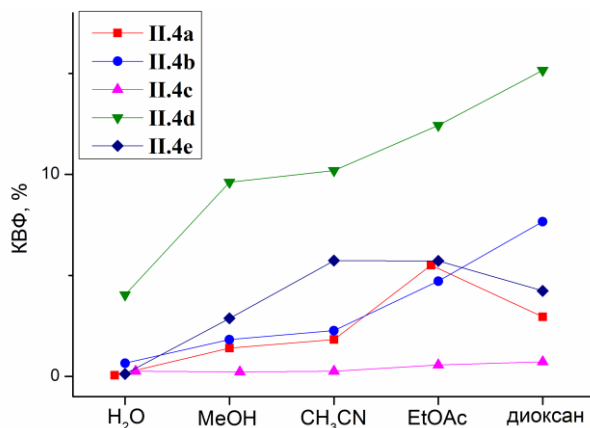
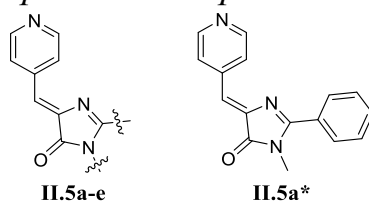


Рисунок 19. Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.4a-e** в различных растворителях.  
*Пиридиновые производные*

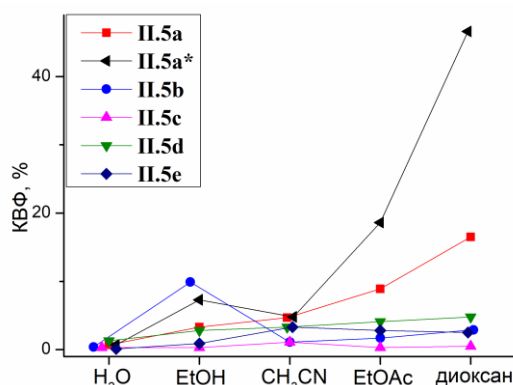


Для пиридиновых производных **II.5a-e** также оказался характерен довольно ограниченный сольватохромизм и сдвинутые в коротковолновую область максимумы абсорбции и эмиссии (Таблица 7). Относительно **II.5a** заметно смещение линий спектров **II.5a\*** в более длинноволновую область.

Таблица 7. Оптические свойства соединений **II.5a-e** и **II.5a\*** различных растворителях.

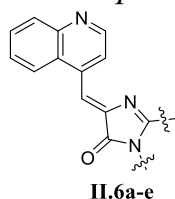
Продукт		H <sub>2</sub> O	EtOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан
<b>II.5a</b>		Абс. 347 (11)	351 (12)	356 (10)	353 (12)	357 (11)
	Эм.	464	453	452	442	439
<b>II.5a*</b>		Абс. 368 (17)	377 (18)	377 (10)	379 (12)	379 (17)
	Эм.	477	477	475	472	471
<b>II.5b</b>		Абс. 408 (11)	411 (11)	408 (11)	408 (11)	411 (10)
	Эм.	560	550	550	544	546
<b>II.5c</b>		Абс. 425 (14)	433 (12)	428 (13)	423 (12)	422 (13)
	Эм.	577	570	574	566	564
<b>II.5d</b>		Абс. 402 (14)	408 (17)	408 (15)	408 (16)	408 (16)
	Эм.	542	545	541	535	537
<b>II.5e</b>		Абс. 495 (15)	502 (15)	507 (16)	508 (17)	509 (16)
	Эм.	610	598	582	569	570

Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.5a-e** также были невелики, однако совершенно неожиданно флуорофор **II.5a\*** продемонстрировал очень большие значения данного параметра в диоксане (практически 50%, Рисунок 20).



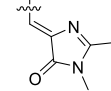
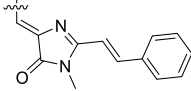
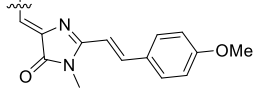
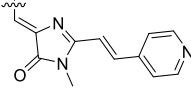
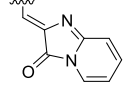
**Рисунок 20.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.5a-e** и **II.5a\*** в различных растворителях.

### Хинолиновые производные

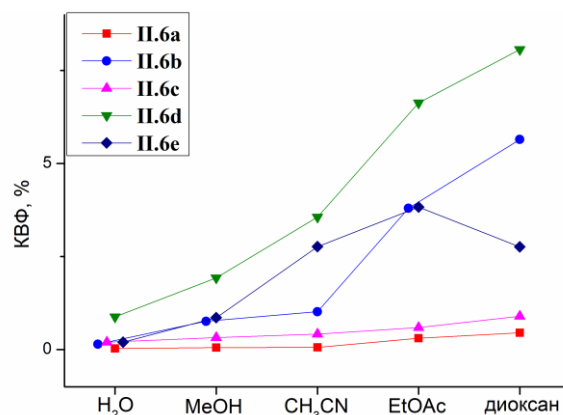


При переходе к хинолиновым производным **II.6a-e** заметно существенное смещение всех максимумов в более длинноволновую область относительно пиридиновых соединений **II.5a-e** (Таблица 8). При этом стоит отметить, что введение дополнительного сопряженного фенильного кольца в бензилиденновый фрагмент оказывает гораздо меньший эффект, чем наращивание ароматической системы во втором положении имидазолон. Также отметим, что соединение **II.6e** продемонстрировало очень слабое поглощение (низкий коэффициент экстинкции), что по всей видимости связано с тем, что в растворах для данного вещества невыгодна плоская сопряженная структура.

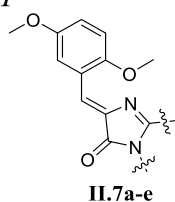
**Таблица 8.** Оптические свойства соединений **II.6a-e** в различных растворителях.

Продукт	H <sub>2</sub> O	EtOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан	
<b>II.6a</b> 	Абс.	360 (30)	369 (29)	377 (28)	377 (32)	380 (24)
	Эм.	481	466	462	453	449
<b>II.6b</b> 	Абс.	428 (16)	428 (15)	429 (14)	429 (15)	428 (11)
	Эм.	600	570	577	572	570
<b>II.6c</b> 	Абс.	454 (20)	447 (18)	444 (22)	441 (20)	442 (10)
	Эм.	592	595	597	590	588
<b>II.6d</b> 	Абс.	414 (11)	425 (12)	425 (11)	426 (11)	428 (10)
	Эм.	575	575	568	563	563
<b>II.6e</b> 	Абс.	503 (0.7)	514 (0.8)	520 (0.6)	520 (0.8)	522 (0.7)
	Эм.	622	612	600	583	580

Влияние дополнительного цикла в бензилиденном фрагменте флуорофоров **II.6a-e** относительно **II.5a-e** повлекло за собой также и снижение квантового выхода флуоресценции, что особенно заметно для 2-метилимидазолон **II.6a** (Рисунок 21).

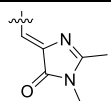
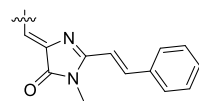
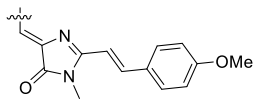
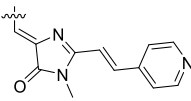
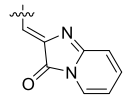


**Рисунок 21.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.6a-e** в различных растворителях. Диметокси-фенильные производные



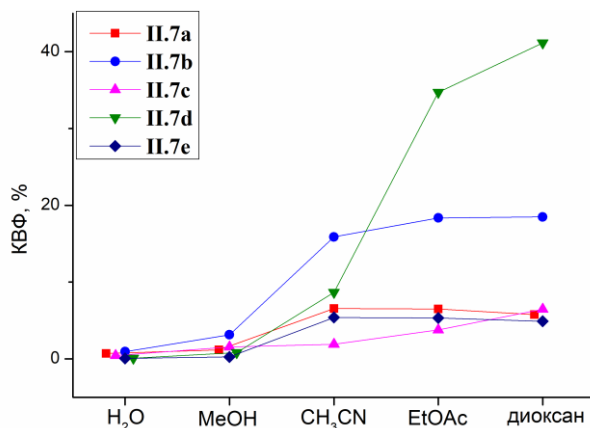
Группа диметоксипроизводных **II.7a-e** продемонстрировала значительный сольватохромизм и большие Стоксовы сдвиги (Таблица 9).

**Таблица 9.** Оптические свойства соединений **II.7a-e** в различных растворителях.

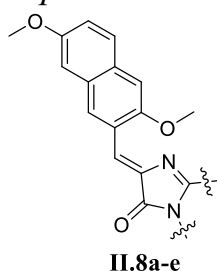
Продукт		H <sub>2</sub> O	EtOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан	
<b>II.7a</b>		Абс.	392 (14)	396 (12)	392 (11)	391 (14)	393 (4)
		Эм.	571	541	499	475	472
<b>II.7b</b>		Абс.	455 (15)	445 (14)	443 (14)	441 (16)	445 (10)
		Эм.	581	566	558	560	564
<b>II.7c</b>		Абс.	462 (25)	449 (24)	447 (25)	445 (26)	448 (15)
		Эм.	587	564	565	528	532
<b>II.7d</b>		Абс.	450 (-)*	454 (15)	450 (15)	448 (17)	452 (11)
		Эм.	533	601	582	567	564
<b>II.7e</b>		Абс.	496 (14)	499 (14)	505 (14)	505 (14)	509 (13)
		Эм.	606	550	555	550	554

\* - слишком низкая растворимость

Также оказалось, что данные соединения демонстрируют высокие квантовые выходы флуоресценции в полярных апротонных растворителях, однако практически не флуоресцируют в протонных (Рисунок 22).



**Рисунок 22.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.7a-e** в различных растворителях. Диметоксинафтильные производные

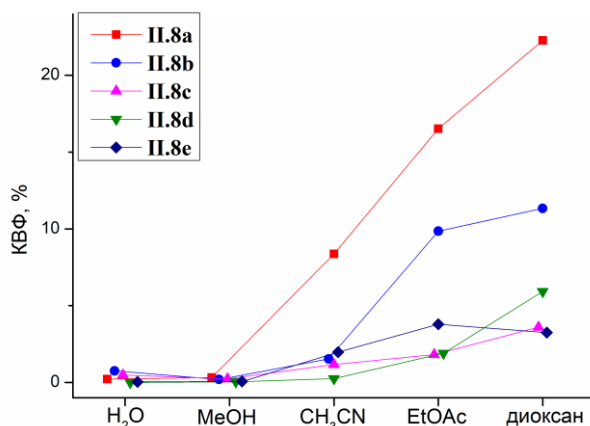


Достаточно парадоксальные оптические свойства продемонстрировали флуорофоры из группы **II.8a-e**. Будучи расширенными на один сопряженный цикл соединениями **II.7a-e**, были бы должны демонстрировать смещение максимумов абсорбции и эмиссии в более длинноволновую область. Однако подобного в явном виде не наблюдалось, а в некоторых случаях происходило даже гипсохромное смещение (Таблица 10). Из этого напрашивается вывод, что введение дополнительного ароматического сопряжения в бензилиденный фрагмент бензилиденимидазолонов не всегда оправдано.

**Таблица 10.** Оптические свойства соединений **II.8a-e** в различных растворителях.

Продукт		H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан	
<b>II.8a</b>		Абс.	371 (17)	370 (17)	371 (17)	369 (16)	371 (8)
		Эм.	506	600	545	508	504
<b>II.8b</b>		Абс.	439 (18)	434 (16)	438 (18)	438 (19)	439 (12)
		Эм.	596	626	601	560	561
<b>II.8c</b>		Абс.	448 (22)	444 (21)	446 (22)	445 (22)	446 (14)
		Эм.	588	615	577	565	566
<b>II.8d</b>		Абс.	396 (-)	432 (16)	437 (18)	438 (18)	440 (8)
		Эм.	-	584	563	585	575
<b>II.8e</b>		Абс.	467 (9)	498 (10)	509 (6)	509 (9)	512 (3)
		Эм.	610	600	562	556	559

Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.8a-e** (Рисунок 23) также оказались ниже, чем у соединений **II.7a-e**. Обращает на себя внимание тот факт, что флуоресценция исходного **II.8a** значительно превосходит флуоресценцию модифицированных **II.8b-d**.



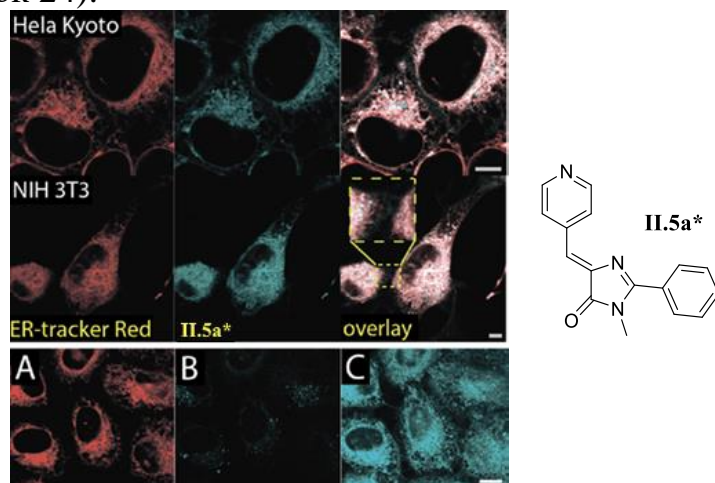
**Рисунок 23.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.8a-e** в различных растворителях.

**3.4. Окрашивание клеточных культур.** В ходе дальнейшей работы нашими коллегами из лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов, группы молекулярных меток для оптической наноскопии и группы редокс-биологии, была изучена возможность использования созданных соединений для окрашивания клеточных культур.

Для проведения этих опытов были выбраны стабильные вещества с длинноволновыми положениями максимумов и со значительным варьированием КВФ. Исходя из этих критериев, мы отбросили неустойчивые метилсульфанильные производные, которые обладали очень малой флуоресценцией в видимом диапазоне, а также борированные 5-аминометиленимидазолы. Также не проводились исследования соединений **II.1-8a**, которые обладают слишком коротковолновыми максимумами поглощения.

Было установлено, что практически во всех случаях добавление красителей в клеточную среду в концентрации 1-10 мкМ приводит к окрашиванию многих мембран, однако лишь в редких случаях данное окрашивание было селективно.

Первым соединением, продемонстрировавшим эффективное флуоресцентное окрашивание внутриклеточных органелл, оказалось **II.5a\***. Было установлено, что добавление его к клеткам Hela Kyoto и NIH 3T3 приводит к интенсивному окрашиванию эндоплазматического ретикулума. Селективность этого процесса была подтверждена с помощью ко-локализации с коммерческим красителем ER-tracker Red (Рисунок 24).



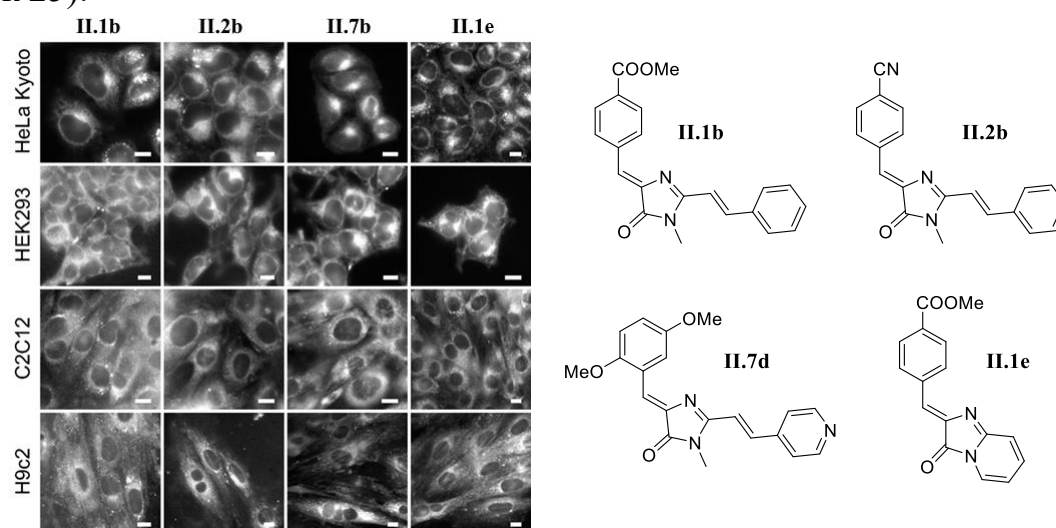
**Рисунок 24.** Конфокальная микроскопия клеток Hela Kyoto и NIH 3T3, окрашенных **II.5a\*** и ER-Tracker Red. Наверху живые клетки, внизу – сразу после обработки формальдегидом (A, B) и после добавления еще одной порции **II.5a\*** (C).

Было обнаружено небольшое различие в окрашивании в имеющихся ламеллоподии фибробластах NIH 3T3, в которых соединение **II.5a\*** также окрашивает структуры, примыкающие к эндоплазматическому ретикулуму. Предположительно, это самые тонкие или плотные отделы ретикулума, проникновение в которые красителя ER-tracker Red затруднено.

Соединение **II.5a\*** также продемонстрировало очень большую устойчивость в условиях флуоресцентной микроскопии, а также оказалось нетоксичным – добавление его в клеточную среду не приводит к гибели клеток в течение по крайней мере 10-12 часов. Но стоит отметить существенный недостаток данного флуоресцентного красителя – достаточно коротковолновый максимум абсорбции, из-за чего необходимо применять разрушительное для живых организмов излучение.

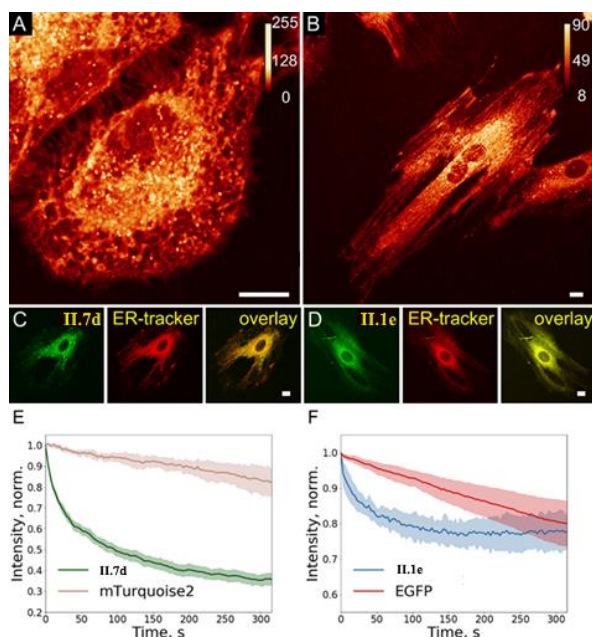
Данного недостатка оказались лишены аналоги хромофора *Kaede*, некоторые из которых также оказались селективны в отношении ЭПР. Такими соединениями стали **II.1b**, **II.1e**, **II.2b** и **II.7d**.

Исследования проводились на линиях клеток HeLa Kyoto, миобластах C2C12, кардиомиобластах H9c2 и модифицированных эмбриональных клетках HEK293. Для них для всех окрашивание оказалось селективно, что было подтверждено ко-локализацией с коммерческим красителем ER-tracker Red (Рисунок 25).



**Рисунок 25.** Окрашенные флуорофорами **II.1b**, **II.2b**, **II.7d**, **II.1e** эндоплазматического ретикулума в клетках HeLa Kyoto, HEK293, C2C12 и H9c2.

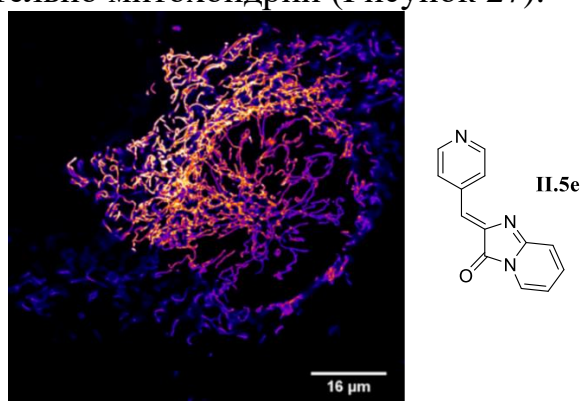
Было показано, что соединения **II.1b** и **II.2b** достаточно быстро обесцвечиваются в условиях широкопольной флуоресцентной микроскопии. Напротив, соединения **II.1e** и **II.7d** продемонстрировали очень яркий и контрастный сигнал, который оказался сопоставимым по фотостабильности с флуоресцентными белками (Рисунок 26).



**Рисунок 26.** Конфокальная микроскопия живых клеток. Окрашенный эндоплазматический ретикулум в клетках HeLa-Kyoto (A) и H9c2 (B). (C) и (D) – сравнение окрашивания **II.7d** и **II.1e** клеток H9c2 по сравнению с ER-tracker Red. (E) и (F) – графики фотостабильности соединений **II.7d** и **II.1e** в клетках HeLa Kyoto по сравнению с флуоресцентными протеинами для окрашивания цитоплазмы mTurquoise2 и EGFP.

Довольно трудно сказать, существует ли какая-то очевидная корреляция между структурой соединений и их способностью селективно окрашивать эндоплазматический ретикулум. По всей видимости, селективность данного процесса обусловлена комбинацией оптических свойств и подходящей степени полярности, которая обеспечивает накопление красителя только в целевых мембранах. Красители с избыточной липофильностью окрашивают другие мембраны и образуют флуоресцентные включения, в то время как слишком полярные красители не накапливаются в клетках и демонстрируют низкое отношение сигнал/шум.

Соединение **II.5e** также показало способность к флуоресцентному окрашиванию, что было продемонстрировано нашими коллегами. При обработке данным красителем клеток Hela Kyoto, HEK293, а также фибробластов NIH 3T3 и бета-клеток MIN6 наблюдалось селективное интенсивное флуоресцентное окрашивание исключительно митохондрий (Рисунок 27).

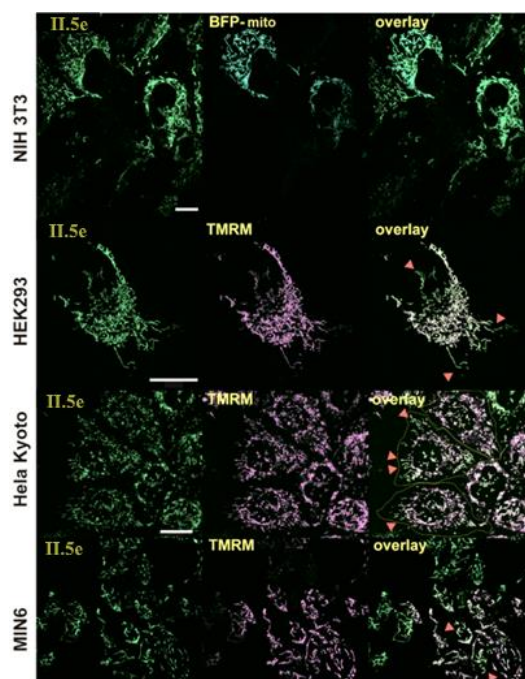


**Рисунок 27.** Окрашивание митохондрий флуорофором **II.5e** в фибробластах NIH 3T3.

В качестве сравнения был использован стандартный флуоресцентный маркер для меченья митохондрий – перхлорат метилового эфира тетраметилродамина (TMRM). Также для подтверждения локализации были использованы клетки,



трансфецированные синим флуоресцентным белком BFP-mito. Для сравнения были выбраны именно эти метки, так как они имеют максимумы адсорбции и эмиссии в областях, отличных от **II.5e**. Также данные флуоресцентные метки чувствительны к мембранному потенциалу митохондрий. Однако оказалось, что синтезированное нами соединение **II.5e** демонстрирует совершенно иной тип окрашивания – добавление его в клеточную среду приводит к равномерному окрашиванию всех митохондрий независимо от их метаболического статуса (Рисунок 28).



**Рисунок 28.** Флуоресцентное окрашивание митохондрий в клетках HeLa Kyoto, HEK293, NIH 3T3, MIN6 флуорофором **II.5e** и флуоресцентными красителями TMRM и BFP-mito.

На указанных снимках видно, что митохондрии в дистальной области клеток (отмечены красными треугольниками) более окрашены **II.5e**, так как имеют пониженный мембранный потенциал, тогда как митохондрии в центральной области одинаково эффективно окрашены как **II.5e**, так и TMRM. Более того, явно видно, что некоторые митохондрии более окрашены TMRM в центре и слабее по краям, в то время как **II.5e** окрашивает их равномерно. Также был проведен эксперимент с антибиотиком нигерицином. Данное вещество, являясь ионофором, удаляет митохондриальный протонный градиент, что приводит к исчезновению сигнала TMRM, однако не влияет на сигнал **II.5e**. Полученные данные позволяют утверждать, что флуорофор **II.5e** можно использовать для окрашивания митохондрий независимо от мембранного потенциала и дыхательной активности.

Скорость окрашивания митохондрий соединением **II.5e** сопоставима с окрашиванием TMRM, однако синтезированный нами флуорофор не требуется дополнительно отмывать, так как в водной среде он демонстрирует незначительную флуоресценцию. Также стоит подчеркнуть, что соединение **II.5e** проявило большую фотостабильность.



## ВЫВОДЫ

1. Синтезирована серия новых производных хромофора GFP с различными заместителями в бензилиденовом фрагменте. Показано, что введение в бензилиденовый фрагмент акцепторных групп и некоторых сопряженных структур приводит к усилению сольватохромизма и многократному увеличению интенсивности флуоресценции в апротонных средах.
2. Создана серия производных хромофора белка *Kaede* и ауриновых соединений с аналогичными заместителями в бензилиденовом фрагменте. Показано что данные соединения также демонстрируют достаточно высокий квантовый выход флуоресценции в апротонных средах.
3. Разработаны новые подходы к синтезу 5-аминометиленбензилиден-имидазолонов и их борированных производных. Показано, что введение аминогруппы не приводит к батохромному смещению максимумов поглощения и эмиссии, однако позволяет создать стабилизированные дифторборильным мостиком 5-аминометиленимида-золоны, которые демонстрируют интенсивную флуоресценцию и ярко выраженный сольватохромизм.
4. Взаимодействие 2-метилсульфанильных имидазолонов с терминальными ацетиленами приводит к образованию метилсульфанильных аналогов хромофора белка *Kaede*, которые характеризуются заметным батохромным смещением максимумов поглощения и эмиссии.
5. Исследованы оптические свойства новых соединений, определено влияние заместителей на оптические свойства. Выявлены соединения со Стоксовыми сдвигами, превышающими 100 нм, выраженным сольватохромизмом и значительным варьированием квантового выхода флуоресценции (более чем на два порядка) в различных средах, обуславливающим потенциальную флуорогенность.
6. Полученные соединения успешно использованы как селективные маркеры для эндоплазматического ретикулума (**II.1b**, **II.1e**, **II.2b**, **II.5a\***, **II.7d**) и митохондрий (**II.5e**).

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи

1. Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y.A., **Smirnov A.Y.**, Baleeva N.S., Krylov A.I., Baranov M.S. Pyridinium Analogues of Green Fluorescent Protein Chromophore: Fluorogenic Dyes with Large Solvent-Dependent Stokes Shift // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. Т. 9. № 8. С. 1958–1963.
2. Zaitseva S.O., Farkhutdinova D.A., Baleeva N.S., **Smirnov A.Y.**, Zagudaylova M.B., Shakhov A.M., Astafiev A.A., Baranov M.S., Bochenkova A. V. Excited-state locked amino analogues of the green fluorescent protein chromophore with a giant Stokes shift // *RSC Adv.* 2019. Т. 9. № 66. С. 38730–38734.
3. Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., **Smirnov A.Y.**, Zagudaylova M.B., Baranov M.S. Pyridine analogue of fluorescent protein chromophore: Fluorogenic dye suitable for mitochondria staining // *Dye. Pigment.* 2019. Т. 170. С. 107550.
4. **Smirnov A.Y.**, Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Zagudaylova M.B., Zaitseva S.O., Mishin A.S., Baranov M.S. Design of red-shifted and environment-sensitive fluorogens based on GFP chromophore core // *Dye. Pigment.* 2020. Т. 177. С. 108258.
5. Zaitseva E.R., **Smirnov A.Y.**, Scherbinina S.I., Zasedateleva V. V, Mineev K.S., Baranov M.S. Synthesis of methylsulfanyl analogs of *Kaede* protein chromophore // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2020. Т. 56. № 3. С. 399–402.
6. Зайцева С.О., **Смирнов А.Ю.**, Зайцева Э.Р., Балеева Н.С., Баранов М.С. Синтез и оптические свойства нового аналога хромофора белка *Kaede* // *Биоорганическая химия*, 2020. Т. 46, № 1. С. 106-109.

### Тезисы докладов на конференциях

1. **Смирнов А.Ю.** Флуоресцентные красители на основе хромофора *Kaede* белка // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2019» - М.: Издательство «Перо», 2019, с. 661.
2. Зайцева Э.Р., **Смирнов А.Ю.** Получение новых метилтиовинилимидазолоновых красителей–аналогов хромофора флуоресцентного белка *Kaede* // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2019» - М.: Издательство «Перо», 2019, с. 556.
3. **Смирнов А.Ю.**, Баранов М.С. Новые флуоресцентные красители на основе хромофора *Kaede* белка // Материалы XXXI Зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". - М.: ИБХ РАН - 2019 г., с. 89.

Для заметок