



УДК 547.782

ФЛУОРОГЕННЫЕ КРАСИТЕЛИ БЕЛКА NanoLuc НА ОСНОВЕ АРИЛИДЕН-ИМИДАЗОЛОНОВ

© 2024 г. Э. Р. Зайцева^{*, **}, Ю. А. Богданова^{*}, Н. С. Балеева^{*, #},
А. Ю. Смирнов^{*, **}, 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 15.05.2023 г.

После доработки 16.06.2023 г.

Принята к публикации 17.06.2023 г.

Синтезирован ряд *орто*-замещенных арилиден-имидазолонов и их стирольных производных. Установлено, что такие соединения можно применять в качестве флуорогенных лигандов для белка NanoLuc. В паре с этим белком они могут быть использованы для генетически-кодируемого мечения живых клеток во флуоресцентной микроскопии, что было показано путем окрашивания клеток НЕК293.

Ключевые слова: арилиден-имидазолон, флуороген-активирующий белки, флуорогены

DOI: 10.31857/S0132342324010073, **EDN:** OWHWEG

ВВЕДЕНИЕ

Последнее время во флуоресцентной микроскопии все чаще и чаще используются так называемые флуорогенные красители [1]. Красители такого типа в свободном виде в растворе не обладают выраженной флуоресценцией. Однако яркость флуоресценции этих веществ многократно увеличивается в результате их связывания с определенными объектами. Среди всего множества флуорогенных красителей отдельное место занимают арилиден-имидазолон – хромофоры флуоресцентных белков [2]. Они используются для флуорогенного окрашивания нуклеиновых кис-

лот [3, 4] и других клеточных компонентов [5, 6], а также крайне эффективны в качестве лигандов для флуороген-активирующих белков [7, 8]. Такие белки, в отличие от флуоресцентных белков, не формируют внутренний хромофор из собственных аминокислот, а образуют флуоресцентный комплекс с флуорогеном, который добавляется в систему извне [9]. Так, ранее на основе арилиден-имидазолонов и их стирольных производных была синтезирована линейка разноцветных флуорогенов для популярного флуороген-активирующего белка FAST и его мутантных форм [10, 11].

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок; PEI – полиэтиленимин.

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

Недавно нами было показано, что гетероциклические производные таких красителей также могут быть использованы для флуорогенного мечения белка NanoLuc [12]. В настоящей работе мы решили расширить возможность их применения в данной роли.

Белок NanoLuc (одна из самых известных люцифераз) катализирует реакцию биолюминесценции – процесс окисления органических молекул, сопровождающийся испусканием света [13]. Белок NanoLuc был разработан на основе люциферазы глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris*. Субстрат люциферазы глубоководной креветки – целентеразин, а белка NanoLuc – фуримазин. Эти соединения по строению очень похожи на такие арилиден-имидазолы, как хромофоры белков GFP и Kaede (схема 1). Ранее такое структурное подобие позволило нам выявить несколько флуорогенных лигандов,

содержащих в арилиденовой части пиррольную группу (схема 1), которые связывались с белком NanoLuc с образованием флуоресцентных комплексов [12]. Анализ полученных данных позволил предположить, что аналогичными свойствами будут обладать не только гетероциклические производные, но и соединения, содержащие в арилиденовом фрагменте бензольное кольцо с донорными заместителями в *орто*-положении. В связи с этим целью настоящей работы стал синтез ряда таких более отдаленных производных хромофоров белков GFP и Kaede и анализ возможности их применения в качестве флуорогенов для белка NanoLuc.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы мы синтезировали ряд арилиден-имидазолонов, содержащих разные заместители в *орто*-положении бензилиденового

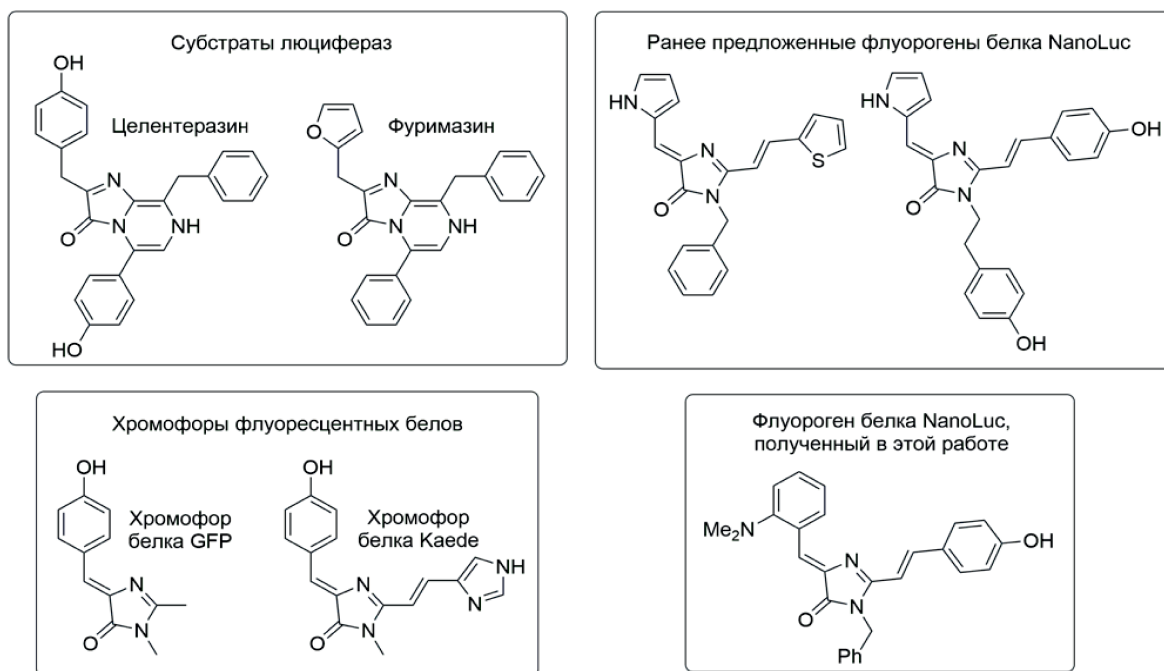


Схема 1. Структуры субстратов люцифераз, хромофоры флуоресцентных белков, ранее предложенные нами флуорогены для белка NanoLuc и флуороген для белка NanoLuc, полученный в этой работе.

фрагмента (схема 2, соединения (I)). Производные (I) были получены при взаимодействии исходных ароматических альдегидов с иминоэфиром и бензил-амином или тирамином. Затем из полученных арилиден-имидазолонов были синтезированы производные хромофора белка Kaede (схема 2, соединения (II)). Имидазолон конденсировали с бензальдегидом или 4-гидроксibenзальдегидом в пиридине в присутствии пиперидина.

Далее были изучены флуорогенные свойства всех полученных соединений. Сначала мы проверили, будет ли увеличиваться интенсивность флуоресценции соединений в присутствии белка NanoLuc. Было установлено, что для подавляющего большинства соединений добавление белка приводит лишь к незначительному (примерно трехкратному) усилению флуоресцентного сигнала. Однако для пары производных, содержащих диметиламинную или метоксигруппы в *орто*-положении, а также бензиль-

ный заместитель в имидазолоновом кольце и гидроксигруппу в *пара*-положении стирольного фрагмента (соединения (IIc) и (IIf)), наблюдалось заметное увеличение интенсивности флуоресценции более чем на порядок.

Далее мы изучили, насколько эффективно эти два соединения связываются с белком NanoLuc. Оказалось, что соединение с диметиламинной группой в *орто*-положении бензилиденового фрагмента (соединение (IIc)) обладает высокой аффинностью ($K_d = 0.05$ мкМ), в то время как производное, содержащее в том же положении метоксигруппу (соединение (IIf)), характеризуется очень слабым связыванием с белком ($K_d > 5$ мкМ).

На финальном этапе данного исследования мы изучили возможность окрашивания живых клеток с использованием соединения (IIc), которое обладает высокой аффинностью к белку и формирует комплекс с наиболее интенсивной флуоресценцией. Для этой

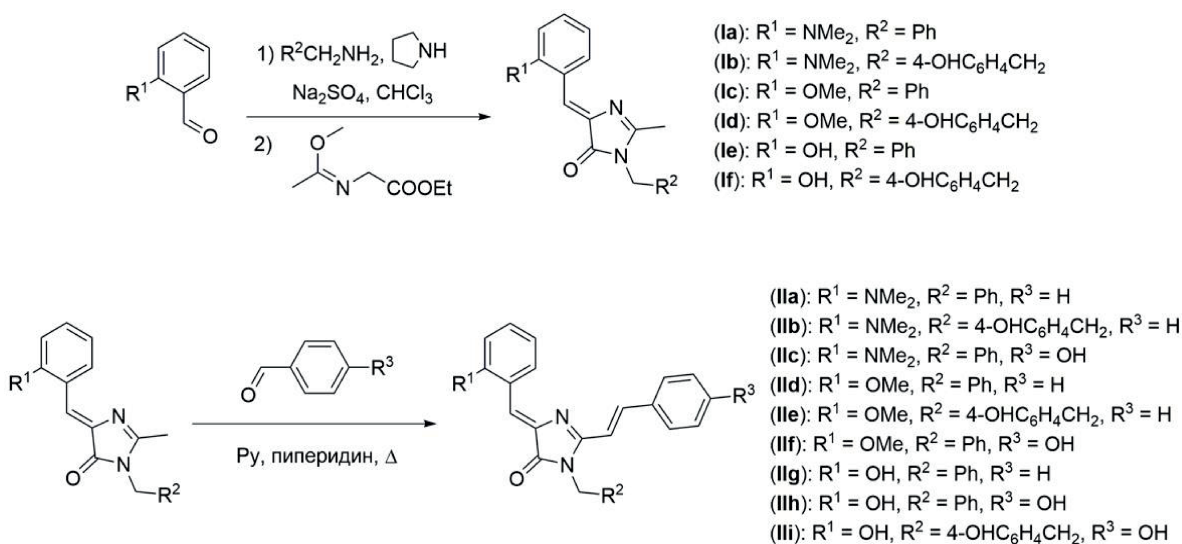


Схема 2. Схема синтеза соединений (I) и (II).

цели были использованы клетки HEK293, трансфицированные конструкцией NanoLuc-H2B. Конструкт экспрессировался клетками как единая полипептидная цепь под управлением CMV-промотора. Гистоны H2B – типичная модель для изучения генетически-кодируемого флуоресцентного мечения, т.к. в этом случае наблюдается достаточно яркий сигнал с четкой локализацией. Более того, такая локализация флуороген-активирующего белка также позволяет сразу оценить проницаемость красителя, поскольку для выраженного мечения ему необходимо проникнуть в ядро клетки. Мы показали, что при добавлении предложенного нами соединения (**IIc**) к соответствующим образом трансфицированным клеткам наблюдается выраженное целевое мечение при отсутствии сильного фонового окрашивания (рис. 1).

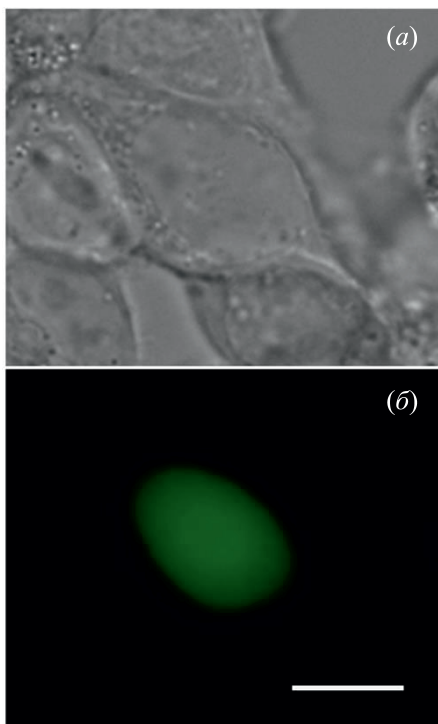


Рис. 1. Микрофотографии живых клеток HEK293, экспрессирующих локализирующуюся в ядре конструкцию H2B-NanoLuc в присутствии 5 мкМ соединения (**IIc**): (а) – изображение, полученное в проходящем свете; (б) – та же область, визуализированная с использованием куба TxRed. Масштабный отрезок—10 мкм.

Таким образом, мы показали, что производные хромофора Kaede на основе *орто*-замещенных бензилиден-имидазолонов и белок NanoLuc могут быть использованы для флуоресцентного мечения живых клеток во флуоресцентной микроскопии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на приборах Fourier 300 (300 МГц; Bruker, США) и Avance III NMR (700 МГц; Bruker, США) в DMSO- d_6 (внутренний стандарт – Me₄Si), спектры флуоресценции – на 96-луночном микропланшетном ридере Tecan Infinite 200 Pro M Nano (Tecan Trading AG, Швейцария). Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе TripleTOF 5600⁺ (AB Sciex, США) с ионизацией методом электроспрея (ESI). Напряжение на капилляре 5.5 кВ в режиме регистрации положительных ионов, 4.5 кВ в режиме регистрации отрицательных ионов. Поток газа-носителя – 15 Arb, газа-аспылителя – 25 Arb. Ввод проб производили с помощью шприцевого насоса со скоростью потока 20 мкл/мин.

Синтез (*Z*)-5-бензилиден-3-арил-2-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов (I**).** Соответствующий ароматический альдегид (10 ммоль) растворяли в хлороформе (50 мл) и смешивали с соответствующим амином (10.5 ммоль), пирролидином (7 мг, 0.1 ммоль) и безводным сульфатом натрия (10 г). Полученную смесь перемешивали в течение 72 ч при комнатной температуре, отфильтровывали и высушивали над безводным сульфатом натрия. Растворитель упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток смешивали с этил((метокси)амино)ацетатом (12 ммоль), при необходимости добавляли 5–10 мл метанола для равномерного смешивания. Полученную смесь перемешивали 72 ч при комнатной темпера-

туре. Растворитель упаривали при пониженном давлении. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент хлороформ–этанол 20 : 1).

Синтез (Z)-5-бензилиден-3-арил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов (II). К раствору соответствующего (Z)-5-бензилиден-3-арил-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она (1 ммоль) в пиридине (5 мл) добавляли пиперидин (0.02 мл) и соответствующий ароматический альдегид (5 ммоль). Полученную реакционную смесь кипятили 5–48 ч, прохождение реакции отслеживали с помощью тонкослойной хроматографии (элюент хлороформ–этанол 20 : 1). Далее реакционную смесь упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в этилацетате (35 мл), промывали фосфатным буфером (pH 7.0, 3 × 15 мл), насыщенным раствором хлорида калия (3 × 25 мл), высушивали над безводным сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент хлороформ–этанол 20 : 1).

(Z)-5-(2-(Диметиламино)бензилиден)-3-бензил-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Ia). Желтый порошок (2.07 г, 65%); т. пл. 135–137°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 8.57 (дд, *J* 7.9, 1.2, 1H), 7.33–7.40 (м, 4H), 7.30 (т, *J* 7.4, 1H), 7.26 (д, *J* 7.2, 2H), 7.14 (д, *J* 8.0, 1H), 7.08 (т, *J* 7.5, 1H), 4.84 (с, 2H), 2.73 (с, 6H), 2.27 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (176 МГц, DMSO-*d*₆): 170.1, 162.8, 154.8, 137.3, 136.7, 132.7, 130.8, 128.8, 127.5, 126.9, 126.6, 122.3, 122.0, 118.4, 45.0, 43.0, 15.5. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 320.1753; рассчитано для C₂₀H₂₂N₃O⁺, [*M* + H]⁺ 320.1757.

(Z)-5-(2-(Диметиламино)бензилиден)-3-(4-гидроксибензил)-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Ib). Желтый порошок (2.55 г, 73%); т. пл. 172–174°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 9.22

(с, 1H), 8.52 (дд, *J* 7.8, 1.3, 1H), 7.34 (т, *J* 8.5, 1H), 7.25 (с, 1H), 7.13 (д, *J* 7.6, 1H), 7.06 (т, *J* 7.5, 1H), 6.98 (д, *J* 8.4, 2H), 6.68 (д, *J* 8.6, 2H), 3.72 (т, *J* 7.2, 2H), 2.75 (т, *J* 7.1, 2H), 2.72 (с, 6H), 2.07 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (75 МГц, DMSO-*d*₆): 170.0, 163.2, 156.0, 154.7, 137.6, 132.7, 130.7, 129.8, 128.3, 126.7, 122.1, 121.5, 118.4, 115.3, 45.0, 42.1, 33.5, 15.0. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 350.1862; рассчитано для C₂₁H₂₄N₃O₂⁺, [*M* + H]⁺ 350.1863.

(Z)-5-(2-(Метоксибензилиден)-3-бензил-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Ic). Желтый порошок (2.40 г, 79%); т. пл. 123–125°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 8.72 (дд, *J* 7.8, 1.1, 1H), 7.39–7.43 (м, 2H), 7.37 (т, *J* 7.5, 2H), 7.30 (т, *J* 7.3, 1H), 7.24 (д, *J* 7.4, 2H), 7.09 (д, *J* 8.2, 1H), 7.04 (т, *J* 7.5, 1H), 4.83 (с, 2H), 3.89 (с, 3H), 2.27 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (75 МГц, DMSO-*d*₆): 169.9, 163.3, 158.5, 137.9, 136.7, 132.2, 132.0, 128.8, 127.5, 126.8, 122.2, 120.6, 118.7, 111.3, 55.7, 43.0, 15.6. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 307.1483; рассчитано для C₁₉H₁₉N₂O₂⁺, [*M* + H]⁺ 307.1441.

(Z)-5-(2-(Метоксибензилиден)-3-(4-гидроксибензил)-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Id). Желтый порошок (2.18 г, 65%); т. пл. 105–107°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 9.22 (с, 1H), 8.68 (дд, *J* 7.7, 1.4, 1H), 7.40 (т, *J* 8.7, 1H), 7.30 (с, 1H), 7.08 (д, *J* 8.4, 1H), 7.02 (т, *J* 7.5, 1H), 6.96 (д, *J* 8.4, 2H), 6.67 (д, *J* 8.4, 2H), 3.89 (с, 3H), 3.72 (т, *J* 7.1, 2H), 2.74 (т, *J* 7.1, 2H). ¹³C-ЯМР (75 МГц, DMSO-*d*₆): 169.8, 163.7, 158.4, 156.0, 138.1, 132.1, 131.8, 129.8, 128.2, 122.3, 120.6, 117.7, 115.3, 111.3, 55.7, 42.0, 33.4, 15.1. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 337.1551; рассчитано для C₂₀H₂₁N₂O₃⁺, [*M* + H]⁺ 337.1547.

(Z)-5-(2-Гидроксибензилиден)-3-бензил-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Ie). Желтый порошок (2.57 г, 88%); т. пл. 136–138°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 11.49 (с, 1H), 8.26 (д, *J* 7.8, 1H), 7.37 (т, *J* 7.5, 2H), 7.34 (с, 1H), 7.32–7.27 (м, 2H),

7.26 (д, J 7.0, 2H), 6.91–6.85 (м, 2H), 4.85 (с, 2H), 2.29 (с, 3H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 169.0, 161.6, 157.7, 136.6, 135.5, 133.7, 132.6, 128.8, 127.6, 126.9, 122.8, 120.4, 119.4, 116.7, 43.1, 15.5. HRMS (ESI) m/z : найдено M 293.1287; рассчитано для $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 293.1285.

(Z)-5-(2-Гидроксибензилиден)-3-(4-гидрокси-фенэтил)-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (If). Желтый порошок (2.19 г, 68%); т. пл. 221–223°C.

^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 11.71 (с, 1H), 9.23 (с, 1H), 8.15 (д, J 7.0, 1H), 7.27 (т, J 8.6, 1H), 7.23 (с, 1H), 6.97 (д, J 8.5, 2H), 6.90–6.83 (м, 2H), 6.67 (д, J 8.5, 2H), 3.74 (т, J 7.1, 2H), 2.75 (т, J 7.1, 2H), 2.06 (с, 3H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 168.7, 161.7, 157.6, 156.0, 135.4, 133.9, 132.6, 129.9, 128.2, 122.5, 120.3, 119.3, 116.9, 115.3, 42.2, 33.4, 14.9. HRMS (ESI) m/z : найдено M 323.1396; рассчитано для $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3^+$, $[M + \text{H}]^+$ 323.1390.

5-((Z)-2-(Диметиламино)бензилиден)-3-бензил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Ia).

Оранжевый порошок (360 мг, 89%); т. пл. 153–155°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 8.75 (дд, J 7.9, 1.7, 1H), 7.97 (д, J 15.6, 1H), 7.76 (д, J 6.6, 2H), 7.46–7.40 (м, 4H), 7.40–7.35 (м, 3H), 7.32 (д, J 7.0, 2H), 7.27 (т, J 7.2, 1H), 7.22 (д, J 15.7, 1H), 7.16 (д, J 8.3, 1H), 7.14 (т, J 7.2, 1H), 5.08 (с, 2H), 2.76 (с, 6H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 170.3, 159.4, 155.0, 140.2, 138.0, 137.3, 134.9, 133.0, 131.0, 130.2, 129.0, 128.8, 128.3, 127.5, 127.0, 126.9, 122.5, 122.3, 118.5, 113.9, 45.2, 42.6. HRMS (ESI) m/z : найдено M 408.2069; рассчитано для $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}^+$, $[M + \text{H}]^+$ 408.2070.

5-((Z)-2-(Диметиламино)бензилиден)-3-(4-гидроксифенэтил)-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Ib). Красный порошок (326 мг, 54%); т. пл. 136–138°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 9.13 (с, 1H), 8.70 (дд, J 7.7, 1.4, 1H), 7.88 (д, J 16.0, 1H), 7.75 (д, J 7.2, 2H), 7.47–7.43 (м, 3H), 7.37 (т, J 7.9,

1H), 7.30 (с, 1H), 7.15 (д, J 8.3, 1H), 7.12 (т, J 7.8, 1H), 7.02 (д, J 8.5, 2H), 6.93 (д, J 15.7, 1H), 6.64 (д, J 8.5, 2H), 3.98 (т, J 7.0, 2H), 2.78 (т, J 7.2, 2H), 2.75 (с, 6H). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 170.1, 159.7, 156.0, 154.9, 139.7, 138.2, 135.1, 132.9, 130.8, 130.0, 129.9, 128.9, 128.3, 128.1, 127.1, 122.2, 121.7, 118.4, 115.1, 113.8, 45.1, 41.2, 34.1. HRMS (ESI) m/z : найдено M 438.2172; рассчитано для $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 438.2176.

5-((Z)-2-(Диметиламино)бензилиден)-3-бензил-2-((E)-4-гидроксистирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Ic). Красный порошок (233 мг, 55%); т. пл. ~200°C с разложением.

^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 10.04 (с, 1H), 8.75 (дд, J 7.7, 1.7, 1H), 7.89 (д, J 15.7, 1H), 7.61 (д, J 8.8, 2H), 7.38–7.33 (м, 4H), 7.31 (д, J 6.8, 2H), 7.27 (т, J 7.3, 1H), 7.16–7.11 (м, 2H), 6.96 (д, J 15.6, 1H), 6.82 (д, J 8.7, 2H), 5.05 (с, 2H), 2.75 (с, 6H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 170.4, 159.9, 159.8, 154.8, 140.6, 138.3, 137.4, 132.9, 130.7, 130.4, 128.7, 127.5, 127.3, 126.9, 126.2, 122.3, 121.1, 118.4, 115.9, 110.0, 45.1, 42.5. HRMS (ESI) m/z : найдено M 424.2016; рассчитано для $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 424.2020.

5-((Z)-2-Метоксибензилиден)-3-бензил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (IId).

Оранжевый порошок (183 мг, 47%); т. пл. 196–198°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 8.91 (дд, J 7.8, 1.8, 1H), 7.99 (д, J 15.8, 1H), 7.77 (д, J 6.5, 2H), 7.48 (с, 1H), 7.46–7.41 (м, 4H), 7.36–7.34 (м, 2H), 7.30 (д, J 7.1, 2H), 7.26 (т, J 7.2, 1H), 7.21 (д, J 15.8, 1H), 7.13–7.09 (м, 2H), 5.08 (с, 2H), 3.92 (с, 3H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 170.1, 159.8, 158.7, 140.5, 138.6, 137.3, 134.9, 132.5, 132.1, 130.3, 129.0, 128.8, 128.3, 127.5, 126.9, 122.7, 120.9, 118.7, 113.8, 111.3, 55.8, 42.6. HRMS (ESI) m/z : найдено M 395.1757; рассчитано для $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 395.1754.

5-((Z)-2-Метоксибензилиден)-3-(4-гидрокси-фенэтил)-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (IIe). Оранжевый порошок (209 мг, 49%); т. пл. 153–155°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 9.12 (с, 1H), 8.88 (дд, *J* 7.7, 1.9, 1H), 7.90 (д, *J* 15.7, 1H), 7.76 (д, *J* 7.2, 2H), 7.48–7.41 (м, 4H), 7.37 (с, 1H), 7.11–7.07 (м, 2H), 7.00 (д, *J* 8.6, 2H), 6.92 (д, *J* 15.6, 1H), 6.63 (д, *J* 8.5, 2H), 3.98 (т, *J* 7.0, 2H), 3.91 (с, 3H), 2.77 (т, *J* 7.1, 2H). ¹³C-ЯМР (75 МГц, DMSO-*d*₆): 169.9, 160.1, 158.5, 156.0, 140.0, 138.7, 135.0, 132.4, 131.9, 130.1, 129.9, 128.9, 128.4, 128.0, 122.8, 120.8, 117.8, 115.2, 113.7, 111.2, 55.8, 41.2, 34.1. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 425.1859; рассчитано для C₂₇H₂₅N₂O₃⁺, [M + H]⁺ 425.1860.

5-((Z)-2-Метоксибензилиден)-3-бензил-2-((E)-4-гидроксистирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (IIф). Красный порошок (98 мг, 24%); т. пл. ~230°C с разложением. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 8.91 (дд, *J* 8.2, 1.7, 1H), 7.91 (д, *J* 15.5, 1H), 7.58 (д, *J* 8.8, 2H), 7.41 (тд, *J* 8.1, 1.8, 1H), 7.38 (с, 1H), 7.35 (т, *J* 7.6, 2H), 7.29 (д, *J* 7.0, 2H), 7.26 (т, *J* 7.3, 1H), 7.09 (д, *J* 8.0, 2H), 6.89 (д, *J* 15.6, 1H), 6.77 (д, *J* 8.7, 2H), 5.04 (с, 2H), 3.91 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (176 МГц, DMSO-*d*₆): 170.2, 160.3, 158.4 (2C), 141.2, 138.8, 137.3, 132.3, 131.6, 130.5 (2C), 128.7, 127.4, 126.9, 123.0, 120.8, 116.9, 116.3, 111.2 (2C), 55.8, 42.5. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 411.1708; рассчитано для C₂₆H₂₃N₂O₃⁺, [M + H]⁺ 411.1703.

5-((Z)-2-Гидроксибензилиден)-3-бензил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (IIг). Красный порошок (167 мг, 44%); т. пл. 148–150°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 11.54 (с, 1H), 8.43 (дд, *J* 8.2, 1.9, 1H), 7.90 (д, *J* 15.8, 1H), 7.77 (д, *J* 6.4, 2H), 7.47–7.42 (м, 4H), 7.37–7.34 (м, 2H), 7.33–7.30 (м, 3H), 7.27 (т, *J* 7.2, 1H), 7.24 (д, *J* 15.8, 1H), 6.94 (д, *J* 8.1, 2H), 5.10 (с, 2H). ¹³C-ЯМР (75 МГц, DMSO-*d*₆): 169.2, 157.9 (2C), 140.5, 137.2, 136.4, 134.8, 133.8, 132.7, 130.4, 129.0, 128.8, 128.4, 127.5, 126.9,

122.6, 121.0, 119.6, 116.6, 113.5, 42.7. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 381.1599; рассчитано для C₂₅H₂₁N₂O₂⁺, [M + H]⁺ 381.1598.

5-((Z)-2-Гидроксибензилиден)-3-бензил-2-((E)-4-гидроксистирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (IIh). Красный порошок (218 мг, 55%); т. пл. ~200°C с разложением. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 8.29 (д, *J* 7.6, 1H), 7.79 (д, *J* 15.4, 1H), 7.58 (д, *J* 8.6, 2H), 7.35 (т, *J* 7.6, 2H), 7.25–7.32 (м, 5H), 6.86–6.93 (м, 3H), 6.78 (д, *J* 8.6, 2H), 5.06 (с, 2H). ¹³C-ЯМР (75 МГц, DMSO-*d*₆): 169.1, 161.6, 158.6, 158.0, 141.1, 137.3, 136.1, 133.7, 132.4, 130.6, 128.7, 127.5, 126.9, 125.1, 121.8, 121.2, 119.0, 117.0, 116.3, 108.5, 42.6. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 397.1552; рассчитано для C₂₅H₂₁N₂O₃⁺, [M + H]⁺ 397.1547.

5-((Z)-2-Гидроксибензилиден)-3-(4-гидрокси-фенэтил)-2-((E)-4-гидроксистирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (IIi). Красный порошок (350 мг, 83%); т. пл. ~210°C с разложением. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 12.11 (с, 1H), 10.07 (с, 1H), 9.13 (с, 1H), 8.18 (д, *J* 8.0, 1H), 7.70 (д, *J* 15.6, 1H), 7.61 (д, *J* 8.8, 2H), 7.29 (т, *J* 6.8, 1H), 7.20 (с, 1H), 7.01 (д, *J* 8.5, 2H), 6.92–6.87 (м, 2H), 6.85 (д, *J* 8.7, 2H), 6.70 (д, *J* 15.6, 1H), 6.63 (д, *J* 8.5, 2H), 3.98 (т, *J* 7.1, 2H), 2.77 (т, *J* 7.0, 2H). ¹³C-ЯМР (75 МГц, DMSO-*d*₆): 168.6, 160.0, 158.0, 157.6, 156.0, 140.7, 136.0, 134.2, 132.5, 130.5, 129.9, 128.0, 126.0, 121.9, 121.0, 119.5, 117.0, 115.9, 115.2, 109.3, 41.4, 34.0. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 427.1646; рассчитано для C₂₆H₂₃N₂O₄⁺, [M + H]⁺ 427.1652.

Выделение и очистка белка NanoLuc. Препарат выделенного белка NanoLuc получали согласно описанной ранее методике [12].

Регистрация спектров флуоресценции. Увеличение интенсивности флуоресценции определяли как отношение интенсивности флуоресценции раствора хромофора в смеси с раствором белка к интен-

сивности флуоресценции раствора хромофора. Растворы соединений (I) и (II) в фосфатном буфере смешивали с раствором белка NanoLuc и через 15 мин регистрировали спектры флуоресценции. Конечная концентрация соединений (I) и (II) составляла 1 мкМ, белка NanoLuc – 10 мкМ. Величину K_d определяли спектрофлуориметрическим титрованием раствора белка NanoLuc растворами хромофора с различной концентрацией. Концентрация белка NanoLuc составляла 0.1 мкМ.

Получение ДНК-конструкций. Кодированная последовательность NanoLuc была синтезирована фирмой Клонинг Фасилити (Россия) и получена в плазмиде Level 0, созданной для клонирования MoClo. Для локализации в клеточном ядре последовательность, кодирующую NanoLuc [13], сливали с последовательностью белка-гистона H2B (UniProt ID: P06899), используя технологию Golden Gate согласно синтаксису MoClo. Конструкт был помещен между CMV-промотором и последовательностью SV40 poly(A). Для клонирования использовали эндонуклеазу рестрикции Eco31I (BsaI) (Thermo Scientific, США) и T4 ДНК-лигазу (Евроген, Россия). Правильность полученных конструкций была подтверждена секвенированием по Сэнгеру (Евроген, Россия).

Поддержание и трансфекция клеточной культуры НЕК293. Клеточная культура эмбриональных почек человека НЕК293 была получена из коллекции клеточных линий ИБХ РАН, отдел биофотоники. Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (ПанЭко, Россия) и смеси антибиотиков пенициллина (50 ед./мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (ПанЭко, Россия), DMEM с данными добавками далее именуется полной DMEM. Для культивирования использовали CO₂-инкубатор (Sanyo, Япония) при 5% CO₂, 37°C. Перед трансфекцией клетки высевали на

культуральные чашки диаметром 35 мм со стеклянным дном (SPL Life Sciences, Корея). Трансфекцию проводили при помощи полиэтиленимина (PEI; Polysciences, США). За 1 ч до начала трансфекции культуральную среду заменяли на 500 мкл Opti-MEM (ПанЭко, Россия). Далее в расчете на одну культуральную чашку смешивали 6 мкл PEI с 250 мкл Opti-MEM, 2 мкг плазмидной ДНК также смешивали с 250 мкл Opti-MEM в отдельном эппендорфе, инкубировали в течение 5 мин и смешивали два полученных раствора, после чего смесь инкубировали еще 20 мин и по каплям добавляли в культуральные чашки. Клетки инкубировали в присутствии смеси PEI–ДНК в течение 3 ч, затем заменяли среду на полную DMEM.

Микроскопия. Через 48 ч после трансфекции полную DMEM заменяли на среду для визуализации, состоящую из раствора Хэнкса (ПанЭко, Россия) с добавлением 20 mM HEPES (Sigma, Германия) и 5 мкМ соединения (IIc) (разведено из 20 mM стокового раствора в DMSO (Sigma-Aldrich, США)), и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Микроскопию проводили при помощи инвертированного микроскопа BZ-9000 (Япония, Keyence), оснащенного масляным объективом 60× PlanApo 1.40 NA (США, Nikon) и кубом TxRed, длины волн возбуждающего света 560/40, фильтр 594, длины волн детектируемого света 630/60. Полученные изображения обрабатывали в программе Fiji (<https://fiji.sc/>), в которой с помощью плагина “background subtraction from ROI” из изображения вычитали фоновые значения интенсивности флуоресценции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе был синтезирован ряд арилиден-имидазолонов – производных хромофоров белка

GFP и Kaede, содержащих *орто*-заместители в арилиденовом фрагменте. Было установлено, что соединения (**IIc**) и (**IIf**) способны связываться с белком NanoLuc и формировать флуоресцентные комплексы. Показано, что соединение (**IIc**), содержащее диметиламинный заместитель в бензилиденовом фрагменте и гидроксигруппу в стирольном фрагменте, можно применять для флуорогенного мечения белка NanoLuc. В паре соединение (**IIc**) и белок NanoLuc могут быть использованы в качестве генетически-кодируемой флуоресцентной метки для окрашивания живых клеток, что было продемонстрировано на примере окрашивания клеток НЕК293.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-73-10195).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Klymchenko A.S.* // *Acc. Chem. Res.* 2017. V. 50. P. 366–375.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00517>
2. *Baleeva N.S., Baranov M.S.* // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2016. V. 52. P. 444–446.
<https://doi.org/10.1007/s10593-016-1909-4>
3. *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>
4. *Feng G., Luo C., Yi H., Yuan L., Lin B., Luo X., Hu X., Wang H., Lei C., Nie Z.* // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. 10380–10392.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx803>
5. *Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Baranov M.S.* // *Dyes and Pigments.* 2019. V. 170. P. 107550.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107550>
6. *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>
7. *Dou J., Vorobieva A.A., Sheffler W., Doyle L.A., Park H., Bick M.J., Mao B., Foight G.W., Lee M.Y., Gagnon L.A., Carter L., Sankaran B., Ovchinnikov S., Marcos E., Huang P.S., Vaughan J.C., Stoddard B.L.* // *Nature.* 2018. V. 561. P. 485–491.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0509-0>
8. *Povarova N.V., Bozhanova N.G., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Baranov M.S., Yampolsky I.V., Lukyanov K.A., Mishin M.S.* // *J. Mater. Chem.* 2016. V. 4. P. 3036–3040.
<https://doi.org/10.1039/C5TC03931B>
9. *Bruchez M.P.* // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. V. 27. P. 18–23.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.05.014>
10. *Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Y., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshevskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., Baranov M.S.* // *Chem. Eur. J.* 2021. V. 27. P. 3986–3990.
<https://doi.org/10.1002/chem.202004760>

11. *Goncharuk M.V., Baleeva N.S., Nolde D.E., Gavrikov A.S., Mishin A.V., Mishin A.S., Sosorev A.Y., Arseniev A.S., Goncharuk S.A., Borshchevskiy V.I., Efremov R.G., Mineev K.S., Baranov M.S.* // *Commun. Biol.* 2022. V. 5. P. 706. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03662-9>
12. *Bogdanova Y.A., Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., Gavrikov A.S., Myasnyanko I.N., Goncharuk S.A., Kot E.F., Mineev K.S., Mishin A.S., Baranov M.S.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 7958. <https://doi.org/10.3390/ijms24097958>
13. *Hall M.P., Unch J., Binkowski B.F., Valley M.P., Butler B.L., Wood M.G., Otto P., Zimmerman K., Vidugiris G., Machleidt T., Robers M.B., Benink H.A., Eggers C.T., Slater M.R., Meisenheimer P.L., Klaubert D.H., Fan F., Encell L.P., Wood K.V.* // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. P. 1848–1857. <https://doi.org/10.1021/cb3002478>

Aryliden-Imidazolones As Fluorogens of NanoLuc Protein

**E. R. Zaitseva^{*, **}, Yu. A. Bogdanova^{*}, N. S. Baleeva^{*, #},
A. Yu. Smirnov^{*, **}, and M. S. Baranov^{*, **}**

[#] Phone: +7 (926) 704-13-72; e-mail: nsbaleeva@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*

We report a series of *orto*-substituted aryliden-imidazolones and their derivatives containing styrene moiety. These compounds can be used like ligands of NanoLuc protein. Together with NanoLuc this fluorogens can be used for genetically encoded labeling in fluorescence microscopy, as demonstrated by staining HEK293 cells.

Keywords: aryliden-imidazolones, fluorogen-activating proteins, fluorogens