

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

На правах рукописи

Баранов Михаил Сергеевич

**Арилиден-имидазолонь: от структурно-функциональных исследований к
созданию новых флуорофоров для живых систем**

Специальность 1.4.9 – «биоорганическая химия»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва 2022

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 консультант:

Член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, Лукьянов Константин Анатольевич.

Официальные оппоненты:

Ферштат Леонид Леонидович — д.х.н., заведующий лабораторией азотсодержащих соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук.

Белоглазкина Елена Кимовна — д.х.н., профессор кафедры органической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ощепков Максим Сергеевич — д.х.н., заведующий кафедрой химии и технологии биомедицинских препаратов, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Российского химико-технологического университет им. Д.И. Менделеева

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Защита состоится 12 октября 2022 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института 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 ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан « »

2022

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор физико-математических наук**



В.А. Олейников

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Настоящая работа посвящена изучению 4-арилиден-1H-имидазол-5(4H)-онов (арилиден-имидазолонов), разработке новых методов синтеза, выявлению структурно-функциональных закономерностей и созданию на их основе новых флуорофоров для живых систем. Арилиден-имидазолы давно привлекают исследователей. С одной стороны, эти гетероциклические производные могут быть получены с помощью простых синтетических процедур, они имеют небольшой размер, интенсивную и разнообразную окраску и хорошую растворимость в воде, что делает их отличными претендентами на роль потенциальных биологически активных веществ или красителей. С другой стороны, эти производные являются структурной основой хромофоров флуоресцентных белков, что делает их важными модельными производными для изучения строения и функции таких белков. Более того, в составе флуоресцентных белков арилиден-имидазолы проявляют интенсивную флуоресценцию, но не имеют ее в свободном от белка виде. Эта особенность вызвана возможностью безызлучательного сброса энергии возбуждения за счет подвижности арилиденового фрагмента молекулы. Фиксация этого фрагмента внутренним мостиком позволяет создавать высокофлуоресцентные производные арилиден-имидазолонов, которые могут быть использованы в роли флуоресцентных красителей. Возможность инициации флуоресценции арилиден-имидазолонов за счет внешнего воздействия позволяет говорить о перспективности их использования в роли флуорогенов, то есть производных, флуоресцирующих лишь при связывании с каким-то заданным целевым объектом.

Несмотря на синтетическую доступность простых производных арилиден-имидазолонов, синтез производных с более сложной структурой и разнообразными заместителями затруднен. В связи с этим, создание новых и универсальных методов синтеза и модификации арилиден-имидазолонов все еще остается важной исследовательской задачей. Более того, практически неисследованной является возможность вовлечения этих веществ в реакции циклоприсоединения по кратной экзосвязи, что может стать методом построения уникальных спироциклических производных, родственных производным природных аминокислот.

Также не до конца проработанной является возможность создания флуоресцентных красителей на основе арилиден-имидазолонов с внутренним фиксирующим мостиком. Такие красители потенциально могут иметь целый ряд преимуществ относительно флуоресцентных красителей, используемых в повседневной практике. При аналогичных оптических свойствах арилиден-имидазолы имеют гораздо меньший размер, что позволяет снизить их влияние на изучаемый объект.

Не менее интересным и практически неизученным направлением является использование арилиден-имидазолонов в роли флуорогенов. На момент начала работ по настоящей диссертации в литературе не было представлено практически ни одной работы, в которой бы арилиден-имидазолы были использованы в подобной роли. Позднее была предложена серия флуороген-связывающих аптамеров, которые в паре с арилиден-имидазолами могли быть использованы для визуализации нуклеиновых кислот. Однако возможность использования арилиден-имидазолонов в качестве флуорогенов для генетически-кодируемого мечения живых систем в паре с флуороген-активирующими белками была впервые предложена и полноценно изучена лишь в работах автора настоящей диссертации.

Целью настоящей работы является структурно-функциональное исследование арилиден-имидазолонов, а также создание на их основе флуорофоров для мечения живых систем.

В рамках данной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- разработать новые методы синтеза арилиден-имидазолонов;
- разработать новые методы модификации арилиден-имидазолонов;
- разработать подходы к созданию арилиден-имидазолонов с внутренним фиксирующим мостиком и синтезировать серию таких веществ;
- изучить свойства созданных арилиден-имидазолонов с внутренним фиксирующим мостиком и определить возможность их использования в роли флуорофоров;
- изучить возможность использования арилиден-имидазолонов в роли флуорогенов для флуоресцентного мечения отдельных органелл живых клеток;
- изучить возможность использования арилиден-имидазолонов в роли флуорогенов для генетически-кодируемого флуоресцентного мечения в паре с флуороген-активирующими белками.

Данная работа имеет очевидную **научную новизну**. В результате проведенного исследования впервые предложены универсальные методы синтеза арилиден-имидазолонов, позволяющие варьировать заместители в любых положениях таких молекул. В работе впервые предложен ряд универсальных подходов к модификации этих веществ, в частности, впервые предложены методы создания некоторых производных, отличающихся длинноволновым положением максимумов поглощения и эмиссии, а также впервые продемонстрирована возможность использования арилиден-имидазолонов в реакциях циклоприсоединения. В ходе выполнения работы автором впервые создан ряд арилиден-имидазолонов с внутренним мостиком, в результате чего показано ключевое влияние подвижности арилиденового фрагмента на возможность безызлучательного сброса энергии возбуждения. Введение подобного мостика позволило подтвердить влияние конформационной фиксации хромофора на свойства серии флуоресцентных белков, а также создать ряд новых высокофлуоресцентных соединений. В ходе этой работы были впервые выявлены арилиден-имидазолы, обладающие свойствами сильных фотокислот, то есть веществ, чья кислотность резко возрастает при поглощении квантов света. Анализ взаимосвязи между строением и свойствами арилиден-имидазолонов позволил автору впервые предложить серию арилиден-имидазолонов, характеризующихся выраженным сольватохромным варьированием квантового выхода флуоресценции. Созданные арилиден-имидазолы были впервые успешно использованы для селективного флуоресцентного окрашивания эндоплазматического ретикулула и митохондрий живых клеток. В настоящей работе впервые показана возможность использования арилиден-имидазолонов в роли флуорогенов в паре с флуороген-активирующим белком FAST для генетически-кодируемого мечения живых систем. Выявление таких флуорогенов позволило впервые расшифровать структуру этого флуороген-активирующего белка, как в свободном виде, так и в комплексе с флуорогеном, а также предложить его новый усеченный вариант.

Теоретическая и практическая значимость работы. В ходе выполнения работы автором предложена серия новых методов синтеза и модификации арилиден-имидазолонов, которые могут быть использованы широким кругом исследователей для создания новых флуоресцентных и флуорогенных производных. Изучение созданных веществ позволило выявить взаимосвязи между строением и свойствами арилиден-имидазолонов, что позволяет предсказывать характеристики новых арилиден-имидазолонов. Показано, что конформационная фиксация арилиден-имидазолонов внутренним мостиком позволяет существенно увеличить квантовый выход флуоресценции, а созданные таким образом вещества могут быть использованы как флуорофоры для мечения компонентов живых систем в реальной исследовательской практике. В результате проведенной работы создана серия красителей, пригодных для флуоресцентного мечения эндоплазматического ретикулула. Также в работе создан

уникальный краситель, пригодный для флуоресцентного мечения митохондрий, который позволяет окрашивать митохондрии независимо от их метаболического статуса и мембранного потенциала, что может быть важно для проведения различных исследований. Создана серия флуорогенных арилиден-имидазолонов разнообразной окраски, которые могут быть использованы в паре с флуороген-активирующим белком FAST для генетически-кодируемого мечения живых систем. Разработан уникальный флуороген-активирующий белок nanoFAST, который является одной из самых маленьких генетически-кодируемых меток, что позволяет заметно снизить влияние метки на поведение изучаемых объектов.

Методология и методы исследования. Настоящая работа находится на стыке двух научных дисциплин – химии и биологии. Для изучения всех выдвинутых предположений в работе в первую очередь проводится синтез заявленных молекул с использованием известных технологий современной органической химии, а также с помощью уникальных методик, разработанных автором. Все полученные в результате химического синтеза соединения подвергнуты анализу с использованием общепринятых методов органической химии, которые позволяют однозначно подтвердить строение созданных веществ. Так, для подтверждения строения используется спектроскопия ядерного магнитного резонанса на ядрах ^1H и ^{13}C , масс-спектрометрия высокого разрешения, а при необходимости также рентгеноструктурный анализ. Результаты этих исследований, а также методы проведения предложенных реакций представлены в соответствующем разделе настоящей работы. Последующее изучение оптических и иных физико-химических свойств синтезированных веществ позволяет проводить взаимосвязи между строением и свойствами и предлагать новые производные с определенными характеристиками. Такой подход определяет в некотором смысле итерационный характер исследования, когда в ходе проводимых работ проводится серия повторяющихся процедур синтеза, изучения характеристик, их анализа, выявления закономерностей, а затем нового синтеза. Изучение оптических свойств синтезированных веществ в работе проводится с применением общепринятых методов исследования оптических свойств флуорофоров, а именно - оптической спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии. Методология проведения таких работ и отдельные результаты также представлены в соответствующем разделе настоящей диссертации. Изучение возможности прикладного использования созданных в настоящей работе флуорофоров и флуорогенов для флуоресцентного мечения живых систем проведено с применением методов классической молекулярной и клеточной биологии. Для визуализации использованы современные широкопольные и конфокальные флуоресцентные микроскопы.

Положения, выносимые на защиту.

- Синтез арилиден-имидазолонов, содержащих разнообразные заместители в различных положениях имидазолонового цикла, может быть успешно осуществлён либо с использованием легкодоступных амидов азидоуксусной кислоты, либо с применением O-алкилирования амидаоцетатов солями триэтиоксония.

- Метильная группа во втором положении имидазолонового цикла арилиден-имидазолонов является универсальным фрагментом для модификации этих веществ с использованием реакций окисления, а также конденсации с карбонильными и карбоксильными производными. В результате таких превращений могут быть получены производные, характеризующиеся более длинноволновым положением максимумов поглощения.

- Кратная экзо-связь арилиден-имидазолов может вступать в разнообразные реакции циклоприсоединения, в частности с азометинметиридом или илидами серы.

Такая модификация может быть использована в построении геометрически жестких спироциклических производных перспективных в качестве основы для новых биологически-активных веществ.

- Введение внутреннего фиксирующего мостика позволяет существенно повысить интенсивность флуоресценции самых разных арилиден-имидазолонов, в том числе производных хромофоров различных флуоресцентных белков.

- Введение различных заместителей, а также увеличение размера системы сопряженных связей арилиден-имидазолонов с фиксирующим мостиком позволяют варьировать свойства создаваемых соединений, в частности, сместить максимумы поглощения и эмиссии в длинноволновую область, создавать фотокислотные производные или производные чувствительные к pH и иным свойствам среды.

- Арилиден-имидазолы с фиксирующим мостиком могут быть использованы для флуоресцентного мечения компонентов живых систем.

- Введение в арилиденовый фрагмент арилиден-имидазолонов акцепторных групп и некоторых сопряженных структур приводит к появлению сольватохромного варьирования интенсивности флуоресценции, в частности многократному ее усилению в некоторых апротонных средах.

- Отдельные арилиден-имидазолы с сольватохромным варьированием интенсивности флуоресценции могут быть использованы как флуорогены для селективного флуоресцентного мечения эндоплазматического ретикулума или митохондрий живых клеток. Мечение митохондрий выявленным флуорогеном происходит потенциалнезависимо, что выгодно отличает предложенный флуороген от существующих маркеров для митохондрий.

- Арилиден-имидазолы, содержащие в четвертом положении арилиденового фрагмента гидроксильную группу, могут быть использованы как лиганды флуороген-активирующего белка FAST. Выявлено несколько арилиден-имидазолонов с различной окраской, которые могут быть эффективно использованы в паре с этим белком для генетически-кодируемого мечения компонентов живых систем.

- С использованием одного из выявленных флуорогенов методом спектроскопии ЯМР установлена структура белка FAST в свободном виде и в комплексе с флуорогеном. Показано, что в ходе связывания происходит значительная перестройка и организация N-концевой части белка.

- Усеченная версия белка FAST также может быть использована в роли флуороген-активирующего белка для генетически-кодируемого мечения компонентов живых систем в паре с найденным в настоящей работе флуорогеном. Такой белок является одной из самых маленьких генетически-кодируемых меток для живых систем.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные научные результаты диссертации опубликованы в 50 статьях в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, из них – 2 обзора. Отдельные результаты работы были представлены на российских и международных научных конференциях, например, на зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» в 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020 и 2021 годах, на международной конференции «Ломоносов» в 2014, 2016, 2018, 2019, 2020 и 2021 годах, а также симпозиуме «Белки и пептиды» в 2017 году.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и двух приложений. Диссертация изложена на 260 страницах, содержит 185 схем, 151 таблицу, 200 источников литературы и два приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Литературный обзор. Обзор литературы представлен в первой главе диссертации и включает в себя четыре раздела. Первый раздел посвящен структуре хромофоров флуоресцентных белков. Во втором разделе изложены методы синтеза 5-арилиден-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-онов (арилиден-имидазолонов). В третьем разделе описаны арилметеновые флуоресцентные красители, а четвертый посвящен использованию флуорогенных красителей для мечения биологических объектов.

Экспериментальная часть. Экспериментальная часть представлена в третьей главе диссертации и включает в себя описание методов использованных в настоящей работе.

Обсуждение результатов.

1. Новые подходы к синтезу и модификации арилиден-имидазолонов

1.1 Использование производных азидоуксусной кислоты

Различные азидоорганические соединения давно используются в синтезе гетероциклических производных. В частности, производные имидазолонов могут быть получены из производных азидокоричной кислоты. В настоящей работе нам удалось существенно расширить возможности использования этих реагентов. Так, ранее нами уже был разработан подход, позволяющий синтезировать производные арилиден-имидазолонов, содержащие различные алкильные группы во втором положении имидазолонового цикла, исходя из амидов азидокоричной кислоты **1.1.1**. Подобные амиды можно легко конвертировать в соответствующие фасфазены, а затем под действием ангидридов карбоновых кислот в целевые имидазолы **1.1.2**. В ходе дальнейших исследований мы показали, что такие вещества реагируют не только с ангидридами и хлорангидридами алифатических кислот, но и с различными изоцианатами с образованием 2-амино-имидазолонов **1.1.3** (Схема 1).

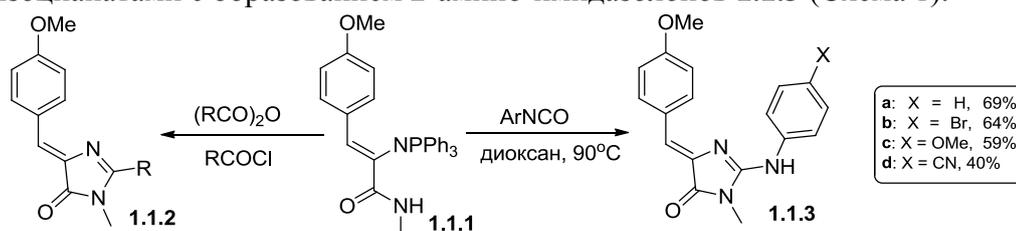


Схема 1. Амиды азидокоричной кислоты в синтезе арилиден-имидазолонов.

Впоследствии аналогичным образом мы использовали производные азидоуксусной кислоты. Реакция последних с ангидридами позволяет генерировать «насыщенные» имидазолы (1Н-имидазол-5(4Н)-оны), которые можно использовать в конденсации с карбонильными соединениями. С использованием предложенного метода мы синтезировали три группы арилиден-имидазолонов с разными заместителями в имидазолоновом кольце **1.1.5**, **1.1.7** и **1.1.10** (Схема 2).

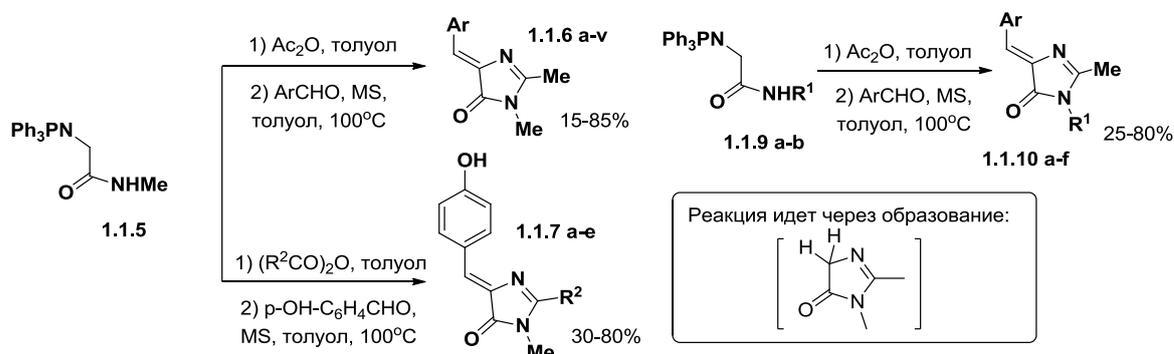


Схема 2. Производные азидоуксусной кислоты в синтезе арилиден-имидазолонов.

На следующем этапе работ мы показали, что «насыщенные» имидазолы также могут быть использованы в реакциях конденсации с имидатами. В результате подобной реакции нами была получена серия арилиден-имидазолонов, содержащих дополнительную аминную группу при кратной экзо-связи (Схема 3).

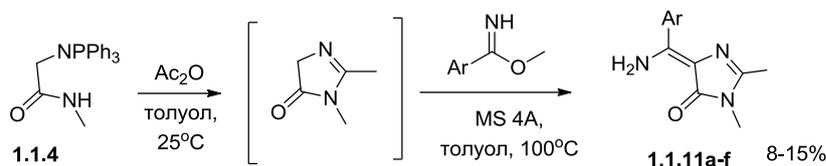


Схема 3. Конденсация 1H-имидазол-5(4H)-онов с имидами.

Также мы показали, что помимо ароматических альдегидов в конденсации могут быть использованы ацетали формамидов, что позволило синтезировать серию аминотиленовых имидазолонов (Схема 4).

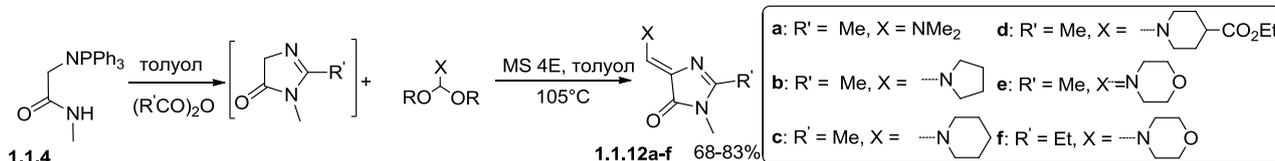


Схема 4. Конденсация 1H-имидазол-5(4H)-онов с ацетальми формамидов.

Таким образом, мы предложили ряд новых подходов к использованию производных азидоуксусной кислоты в синтезе арилиден-имидазолонов и аминотилено-имидазолонов, а также синтезировали целую серию соединений с самыми разными заместителями.

1.2 Использование солей триэтилоксония

Наиболее популярным и известным методом синтеза арилиден-имидазолонов является использование конденсации оснований Шиффа с карбоксиимидами. Однако данные карбоксиимидаты являются труднодоступными, так как обычно их получают из нитрилов действием газообразного HCl в метаноле, с последующим введением остатка глицина. Такой подход является технически сложным и ограничивает круг заместителей, вводимых во второе положение имидазолонового цикла, доступностью соответствующих нитрилов. В настоящей работе мы показали, что карбоксиимидаты также могут быть получены из амидов эфиров глицина **1.2.1** действием солей триэтилоксония в присутствии карбоната калия (Схема 5).

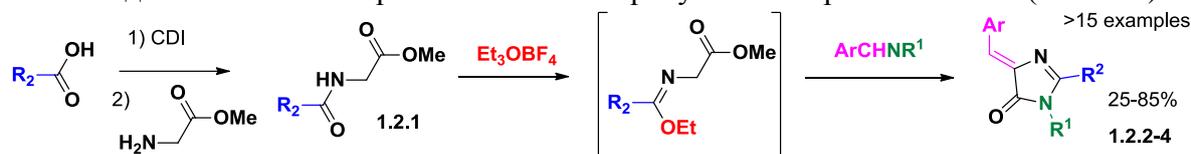


Схема 5. Синтез арилиден-имидазолонов с использованием солей триэтилксония.

Данный подход позволил варьировать заместители во всех положениях имидазолонового цикла, а также арилиденом фрагменте, что ранее было невозможно ни для одного из существующих подходов к синтезу арилиден-имидазолонов.

1.3 Использование металло-комплексного катализа

Использование металлокомплексного катализа широко распространено в синтезе органических соединений. Ранее в литературе было представлено лишь несколько подходов к синтезу арилиден-имидазолонов, связанных с использованием 2-(алкилтио)-5-арил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов, которые успешно вовлекались в реакции арирования. В настоящей работе мы установили, что в условиях реакции Соногаширы основным продуктом в большинстве случаев становятся метилтиовиниловые производные **1.3.2** и лишь в одном случае мы получили арилацетиленовое производное **1.3.3** (Схема 6).

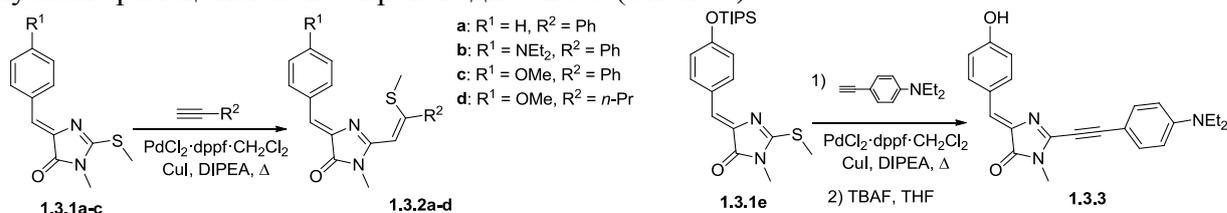


Схема 6. Металло-комплексный катализ в синтезе арилиден-имидазолонов.

Мы показали, что обнаруженная реакция не протекает ни в отсутствие палладиевого катализатора, ни в отсутствие йодида меди. Вероятно, механизм этой реакции аналогичен обычной реакции Соногаширы. Поскольку в продуктах реакции зачастую не наблюдался целевой арил-ацетиленовый продукт, а также не наблюдалось выделение метантиола, можно

предположить, что тиольная группа присоединяется не по нуклеофильному механизму к готовому ацетилену, а переносится еще в каталитическом цикле.

Также нам удалось показать, что готовые арилиден-имидазолонны могут быть успешно вовлечены в палладий-катализируемые реакции, в том случае, когда молекула содержит атомы брома или йода (Схема 7).

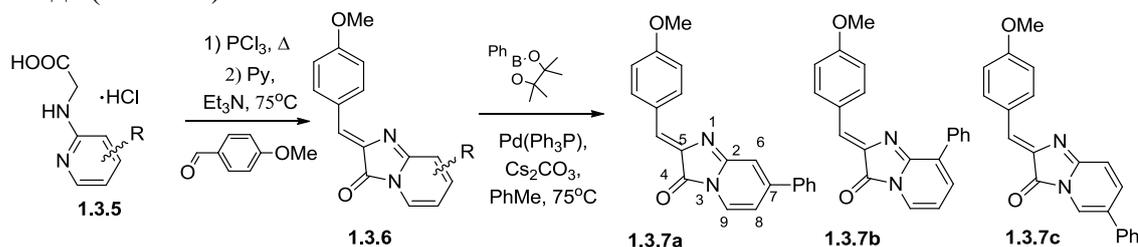


Схема 7. Синтез производных 1.3.7.

Введение ауриноподобного фрагмента приводит к заметному батохромному смещению максимумов относительно соответствующего ациклического производного, однако положение фенильного заместителя практически не влияет ни на положение максимумов, ни даже на форму спектра. Тем не менее, можно предположить, что подобная модификация может стать перспективной в создании новых флуорогенных или флуоресцентных красителей, а сама принципиальная возможность проведения этой реакции говорит о перспективности использования галогенированных арилиден-имидазолонов в палладий-катализируемых превращениях.

Таким образом, по результатам работ, представленных в данном разделе можно сделать вывод, что реакции металло-комплексного катализа могут быть успешно использованы как для синтеза, так и модификации различных арилиден-имидазолонов, в частности могут быть использованы для синтеза новых веществ с расширенной системой кратных связей, отличающихся заметным батохромным смещением спектров поглощения и эмиссии.

1.4 Окисление алкильного остатка во втором положении

Окисление алкильного остатка во втором положении имидазолонового цикла давно используется в синтезе арилиден-имидазолонов содержащих дополнительную карбонильную группу. Данный метод не только позволил создавать новые производные, отличающиеся более длинноволновым положением максимум абсорбции и эмиссии, но также стал ключевым в синтезе хромофора белка AsFP. В настоящей работе мы расширили синтетические возможности этого метода и создали ряд новых производных, которые в дальнейшем были протестированы в роли новых флуорогенных красителей.

В первую очередь мы показали, что введение во второе положение цикла бензильных заместителей позволяет проводить окисление в более мягких условиях (Схема 8).

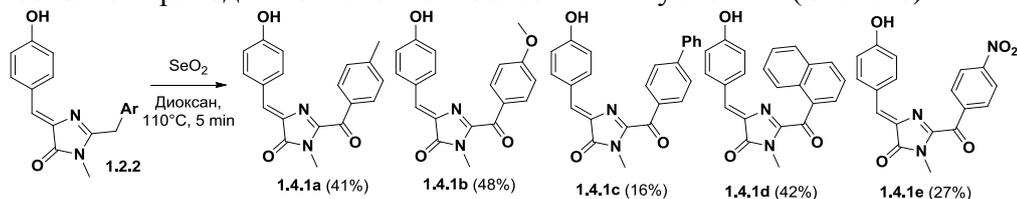


Схема 8. Окисление арилиден-имидазолонов 1.2.2.

Выходы образующихся кетонов были умеренными и слабо зависели от заместителей в бензильном фрагменте. Однако введение такой группы позволило получать продукты, отличающиеся еще большим батохромным сдвигом спектральных максимумов относительно арилиден-имидазолонов с алкильной группой (за счет большего увеличения системы сопряженных связей).

В ходе дальнейших исследований мы показали, что окисление метильной группы, лежащей во втором положении имидазолонового цикла может протекать и далее, до карбоксильных, а не карбонильных производных. Для этого в молекуле должна содержаться дополнительная амидная группа (Схема 9).

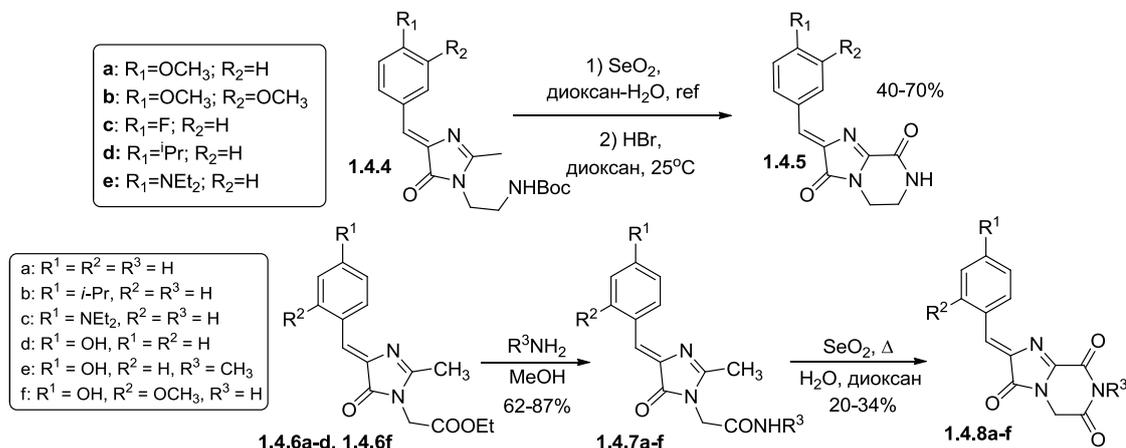


Схема 9. Избыточное окисление метильной группы в арилиден-имидазолонах.

Изучение оптических свойств полученных веществ показало, что также как и кето-производные они отличаются заметным bathochromным смещением максимумов поглощения.

Таким образом, по результатам работ, представленных в данном разделе, можно сделать вывод, что окисление диоксидом селена метильной группы во втором положении имидазолонового цикла различных арилиден-имидазолонов представляет собой отличный метод модификации этих веществ. Данный подход позволяет создавать не только карбонильные, но и карбоксильные производные, причем все полученные соединения характеризуются более длинноволновым положением максимумов поглощения и эмиссии в сравнении с исходными метильными производными.

1.5 Реакции кратной экзо-связи

Еще одним местом возможной модификации арилиден-имидазолонов является кратная экзо-связь арилиденового фрагмента. В ходе настоящей работы мы установили, что весьма перспективным превращением являются различные реакции циклоприсоединения. В результате таких превращений образуются спироциклические имидазолы, в которых два цикла связаны через четвертичный атом углерода. Подобные вещества востребованы в медицинской химии, когда для воздействия на биологические мишени требуется одновременное сочетание липофильности, геометрической жесткости, а также фиксированного положения заместителей. В литературе соответствующая тенденция по переходу от классических плоских гетероциклических производных к спироциклическим даже получила интересное название: «escape from flatland».

Среди многочисленных реакций циклоприсоединения популярной в последние годы стала реакция C=C связи с N-бензилазометинметилидом. В нашей работе мы показали, что арилиден-имидазолы также могут быть использованы как субстраты для подобного превращения (Схема 10).

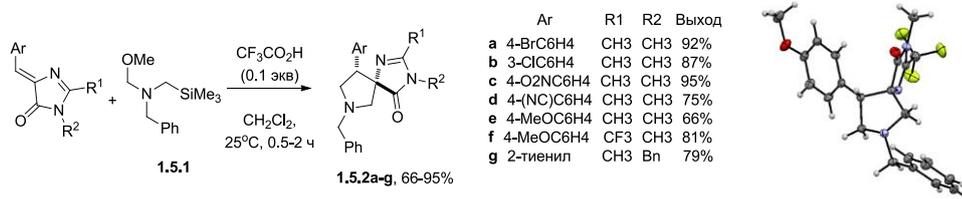


Схема 10. Реакция арилиден-имидазолонов с N-бензилазометинметилидом.

Выход реакции закономерно снижался при использовании арилиден-имидазолона с более донорными заместителями в арилиденовом фрагменте. Использование же различных групп в имидазолоновой части практически не сказывалось на эффективности процесса.

Еще одним примером образования спироциклических производных стала реакция циклопропанирования арилиден-имидазолонов илидом серы на основе диметилсульфоксида (Схема 11).

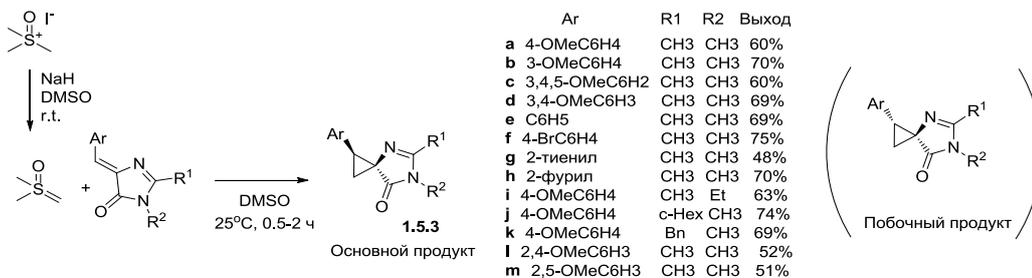


Схема 11. Реакция арилиден-имидазолонов с илидом серы.

В отличие от присоединения N-бензилазومتинметилда в данной реакции образовывалась смесь двух возможных изомеров, так как процесс присоединения илида серы является менее согласованным. Однако основным продуктом также оказывался цис-изомер, а небольшая примесь второго продукта легко отделялась колоночной хроматографией или перекристаллизацией.

Производные циклопропана, содержащие одновременно два заместителя с выраженными электронодонорными или электроноакцепторными свойствами давно привлекают исследователей и получили отдельное название – донорно-акцепторных циклопропанов (ДАЦ или DAC в англоязычной литературе). Подобное замещение позволяет проводить раскрытие этих малых циклов в присутствии каталитических количеств кислот, а образующиеся линейные катионо-анионы могут быть вовлечены в реакции присоединения или циклоприсоединения.

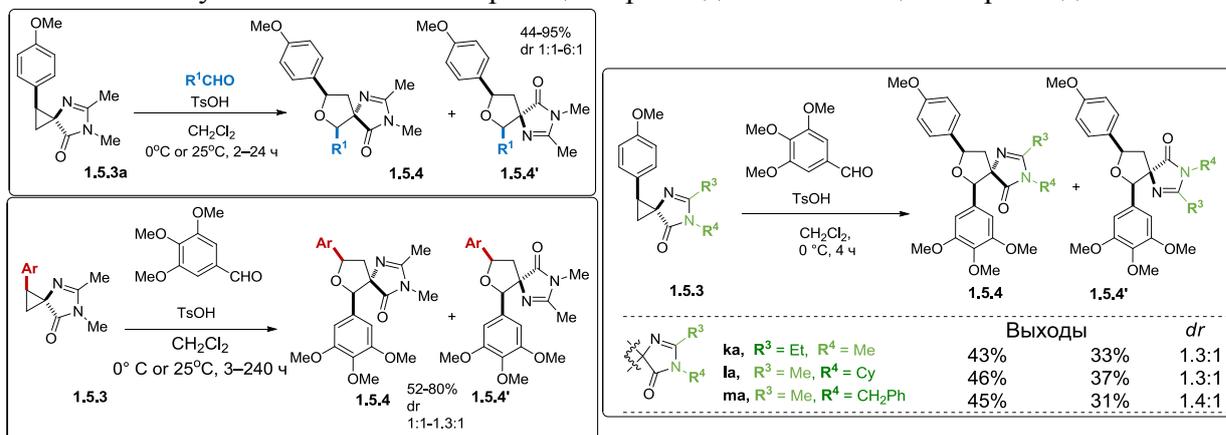


Схема 12. Реакция производных 1.5.3 с альдегидами.

Мы проверили возможность вовлечения производных 1.5.3 в подобные превращения и установили, что раскрытие этих циклопропанов эффективно протекает в присутствии толуолсульфоновой кислоты, а образующиеся 1,3-диполярнофилы могут быть вовлечены в реакцию с альдегидами с образованием спироциклических производных тетрагидрофурана (Схема 12).

Также мы показали, что полученные циклопропаны 1.5.3 могут быть использованы в реакции нуклеофильного раскрытия со спиртами (Схема 13).

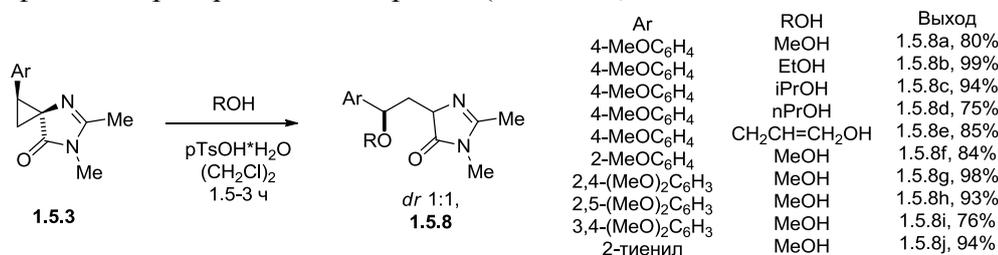


Схема 13. Реакция производных 1.5.3 со спиртами.

Таким образом, в результате проведенного исследования мы показали, что арилиден-имидазолы могут быть использованы для получения спироциклических производных имидазолонов. Полученные из арилиден-имидазолонов производные циклопропана относятся к классу так называемых донорно-акцепторных циклопропанов и могут быть использованы как 1,3-диполярные синтоны в синтезе самых разных продуктов, в том числе спироциклического строения.

1.6 Конденсация алкильного остатка во втором положении

Еще одной известной реакцией свойственной для алкильной группы во втором положении имидазолонового цикла является конденсация с карбонильными производными. Наиболее типичным примером этого превращения является реакция 2-метил-арилиден-имидазолонов с ароматическими альдегидами с образованием стирольных производных. Это превращение хорошо описано в литературе для этого и других гетероциклов и может протекать в самых разных условиях – при простом нагревании, а также при действии кислотных или основных катализаторов.

В данной работе мы широко использовали эту реакцию для создания самых разных производных. Большая часть из них будет описана далее в разделах, посвященных флуорогенным красителям. Ниже приводим отдельный пример использования этой конденсации, который позволил нам получить серию производных (Схема 14), характеризующихся заметным батохромным смещением максимумов поглощения и эмиссии.

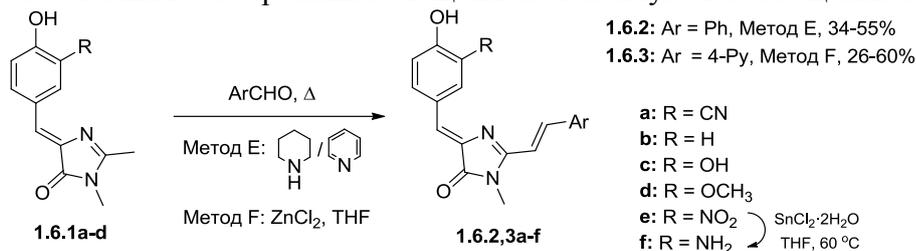


Схема 14. Конденсация с ароматическими альдегидами.

На данном примере хорошо видно, что конденсация может происходить как в присутствии кислот – в данном случае хлорида цинка, так и основания - пиперидин в пиридине. Оба метода характеризуются схожими выходами реакции, однако кислотный катализ более эффективен для реакции с альдегидами, содержащими акцепторные группы.

В ходе дальнейшей работы мы показали, что в аналогичную конденсацию могут вступать не только карбонильные, производные но и ароматические хлорангидриды (Схема 15). В результате такой реакции образуются кетоны **1.6.4**:

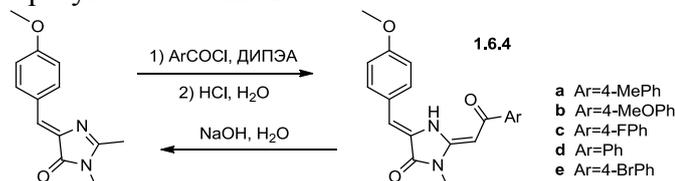


Схема 15. Конденсация с ароматическими хлорангидридами.

Таким образом, в ходе проведенной работы мы показали, что метильная группа, лежащая во втором положении имидазолонового цикла, является отличным местом для разнообразной модификации арилиден-имидазолонов, приводящей к образованию соединений с расширенной системой кратных связей и заметным батохромным смещением максимумов поглощения и эмиссии.

2. Арилиден-имидазолы с внутренним фиксирующим мостиком

Ранее автором настоящей работы были проведены исследования синтетических производных хромофора GFP, которые показали, что непосредственное влияние на квантовый выход флуоресценции таких веществ, также как и для прочих арилметеновых красителей, оказывает подвижность арилиденового фрагмента (в рамках диссертационной работы автора на соискание степени кандидата наук «Физико-химические свойства хромофора GFP и флуоресцентные красители на его основе», Москва, Институт биоорганической химии РАН, 2013). Было показано, что при введении в молекулу 4-гидроксиприлиден-имидазольона, фиксирующей дифторборильной группы (Схема 16), происходит существенное, более чем на два порядка, увеличение КВФ. Предложенный метод введения BF₂-группы в молекулу арилиден-имидазольона оказался достаточно универсальным и позволил создать целую серию родственных соединений, характеризующихся заметной интенсивностью флуоресценции. В данном разделе диссертации будет рассказано о развитии этого направления исследований.

2.1 Борированный аналог хромофора белка GFP

Ключевым направлением работ связанных с различными производными конформационно-зафиксированного аналога хромофора GFP стало создание разнообразных фотокислотных производных. Наличие фенольной группы в молекуле хромофора обуславливает возможность его депротонирования (Схема 16). Этот процесс характеризуется рКа около 6.5 и сопровождается батохромным смещением максимумов поглощения и эмиссии.

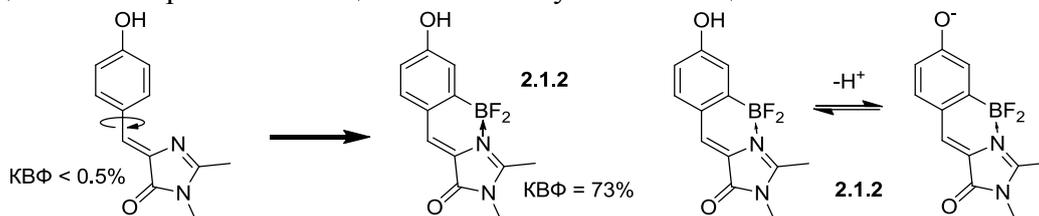


Схема 16. Хромофор GFP с фиксирующей дифторборильной 2.1.2 группой и его депротонирование.

Интересен однако тот факт, что нейтральный хромофор также излучает в области соответствующей анионной форме. Данное явление хорошо описано для некоторых белков семейства GFP. В спектрах поглощения таких белков наблюдается два максимума при 398 нм и 482 нм, которые соответствуют нейтральной и анионным формам. Тем не менее, в спектрах флуоресценции наблюдается лишь один пик с максимумом около 510 нм, который соответствует излучению аниона, что говорит о том, что нейтральный хромофора белка после возбуждения депротонируется и лишь затем излучает квант света. Аналогично, при возбуждении водных растворов соединения 2.1.2 на длине волны, соответствующей нейтральной форме (400 нм), для большинства значений рН наблюдалось флуоресценция с двумя максимумами - 485 и 527 нм. Данный феномен говорит о наличии эффекта переноса протона в возбужденном состоянии (в данном случае к молекуле воды), при этом после поглощения кванта света, молекула может либо флуоресцировать как есть, либо сначала диссоциировать с переносом протона на молекулу растворителя, а затем испустить квант света уже в анионной форме. рКа данного процесса ниже, чем рКа молекулы в невозбужденном состоянии и для производного 2.1.2 составляет 2.3 (здесь и далее обозначается как рКа* - рКа возбужденного состояния). Таким образом, из достаточно слабой кислоты этот хромофор при возбуждении превращается в кислоту средней силы.

Заметного усиления данного эффекта удалось достигнуть при введении в молекулу дополнительных атомов фтора (Схема 17).

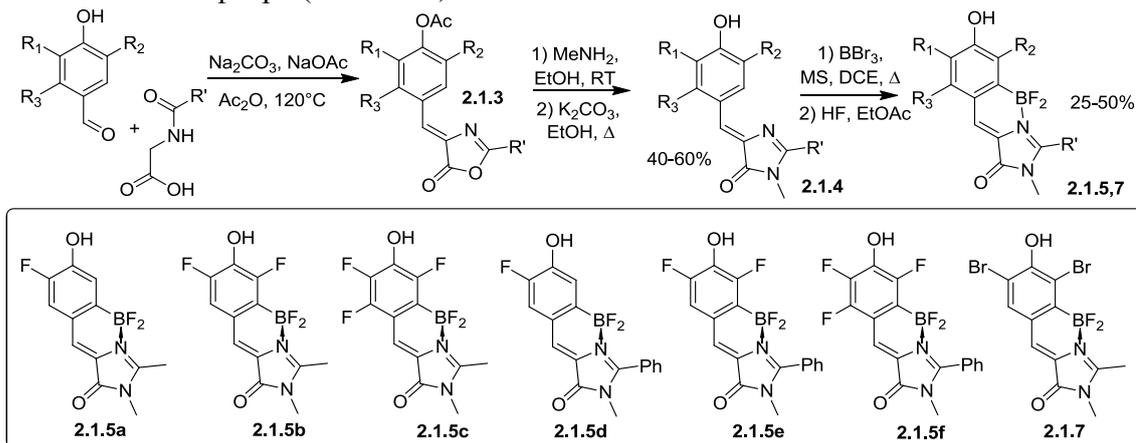


Схема 17. Фторированные аналоги хромофора белка GFP и метод их синтеза.

В результате данной модификации рКа* понизился ниже нуля, что позволяет называть полученные вещества так называемыми «суперфотокислотами». Термин «суперфотокислотность» был введен ранее для различных нафтильных соединений и применяется для соединений для которых характерны сверхбыстрые перенос протона и экстремально низкий рКа*. Введение всего двух атомов фтора привело к снижению рКа* ниже -4, в результате чего полученное соединение демонстрировало эмиссию анионной формы даже в

6M серной кислоте. Более того, введение двух и трех атомов фтора привело к тому, что перенос протона происходил даже в неводных средах.

Трифторированные производные **2.1.5c,f**, представляли собой две сильнейшие суперфотокислоты в созданной линейке. Они имеют pK_a^* - 5,0 и - 5,5 соответственно, и могут эффективно переносить протон в органические растворители, такие как метанол, и практически не демонстрируют эмиссии нейтральной формы в такой среде. Еще большего эффекта удалось достигнуть с помощью введения в молекулу атомов брома – вещество **2.1.7** (Схема 17).

Таким образом, в данном разделе мы показали, что различные производные хромофора белка GFP (арилиден-имидазолон, содержащего гидроксильную группу в пара-положении арилиденового фрагмента) содержащие дифторборильную группу проявляют заметную флуоресценцию, интенсивность и длина волны которой существенным образом зависят от наличия протона в гидроксильной группе. В ходе работы создан ряд фотокислотных соединений.

2.2 Борированные аналоги хромофоров других флуоресцентных белков

Одним из направлений работ по созданию новых флуоресцентных белков на основе GFP стала замена тирозина формирующего хромофор на другие ароматические аминокислоты – в первую очередь фенилаланин и триптофан. В результате этой работы был создан ряд флуоресцентных белков с синей и голубой флуоресценцией. Хромофоры этих белков представляли собой арилиден-имидазолон в арилиденовой части которых находился остаток индола и незамещенное бензольное кольцо (Схема 18). В настоящей работе мы получили их производные с дифторборильным мостиком – **2.2.3**. Также как и в случае производных хромофора GFP подобная модификация привела к более чем 100-кратному увеличению квантовых выходов флуоресценции веществ **2.2.3** относительно исходных имидазолонов **2.2.2**.

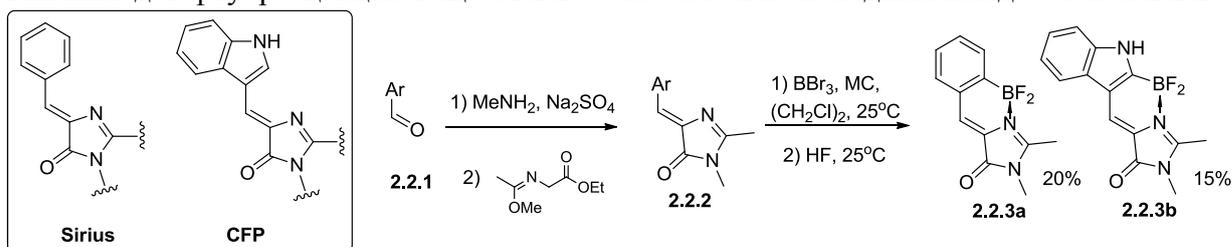


Схема 18. Хромофоры белка Sirius и цианового флуоресцентного белка (CFP). Получение производных **2.2.3**.

Таблица 1. Характеристики соединений **2.2.2** и **2.2.3**, а также белков Sirius и CFP.

Растворитель	2.2.3a			2.2.3b		
	Макс. Погл., нм	Макс. Эмисс., нм	КВФ (%)	Макс. Погл., нм	Макс. Эмисс., нм	КВФ (%)
Вода	368	430	~10 ^а	476	520	69
EtOH	365	426	~20 ^а	482	516	66
Ацетонитрил	360	420	55	461	509	68
EtOAc	362	421	63	468	504	64
Диоксан	365	422	78	472	502	65
Вода	Sirius			CFP		
	355	424	24	434	474	40

а – величина зависела от концентрации

Стоит отметить, что в отличие от полученных ранее данных для производных хромофора GFP, квантовые выходы флуоресценции белков Sirius и CFP оказались заметно ниже, чем у хромофоров **2.2.3**, что говорит о потенциале роста этой величины и перспективности поиска новых, более ярких белков с такими хромофорами.

Еще одним примером флуоресцентных белков, содержащих хромофор, сформированный собственными аминокислотными остатками, является белок Kaede и его аналоги (Схема 19).

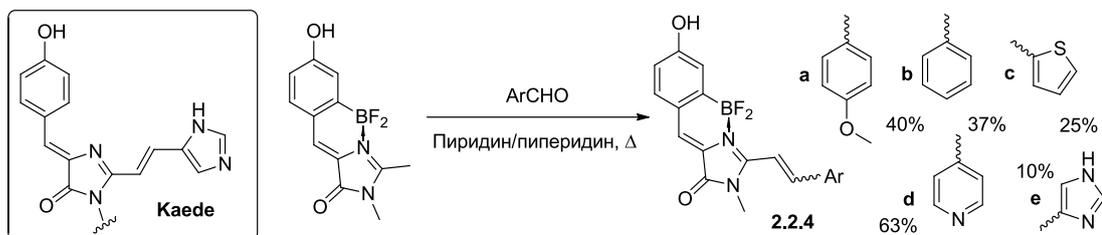


Схема 19. Хромофор белка Kaede. Синтез его аналогов, содержащих дифторборильную группу

Мы также попытались создать аналоги этого хромофора, содержащие дополнительную фиксирующую дифторборильную группу. Это исследование показало, в данном случае на величину квантового выхода флуоресценции оказывает влияние не только подвижность арилиденового фрагмента хромофора, но также и подвижность стирольного остатка, лежащего во втором положении имидазолонового цикла. Синтез аналогов хромофора Kaede, содержащих дифторборильную группу, проводился с использованием реакции конденсации борированного аналога хромофора GFP и ароматических альдегидов (Схема 20). Как оказалось, предложенная фиксация действительно позволяет повысить интенсивность флуоресценции. Однако во всем ряду соединений **2.2.4** квантовые выходы флуоресценции не превышали 15%. Вероятно, невысокий квантовый выход флуоресценции соединений **2.2.5** связан с тем, что введенная стирольная группа также обладает определенными степенями свободы, что может приводить к безызлучательному сбросу энергии возбужденного состояния. Поэтому на следующем этапе работ нами были созданы производные, в которых эта кратная связь фиксирована (Схема 20).

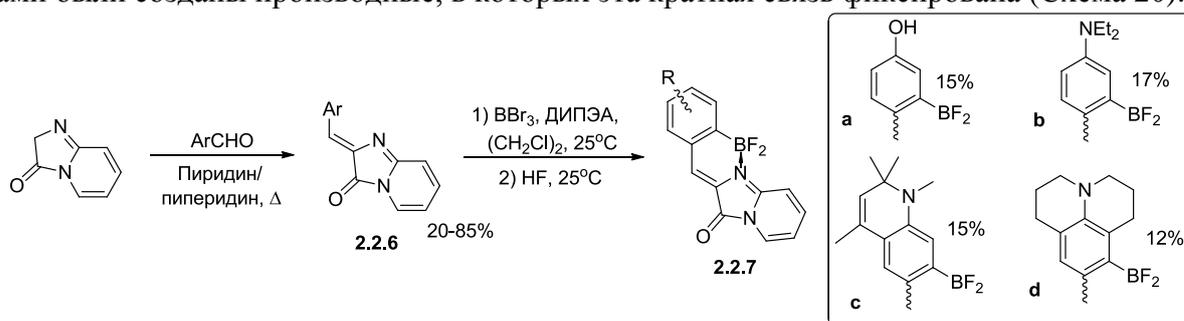


Схема 20. Аналоги хромофора белка Kaede с полностью фиксированной структурой.

Как оказалось, предложенная модификация действительно приводит к заметному возрастанию квантового выхода флуоресценции (Таблица 2).

Таблица 2. Квантовые выходы флуоресценции соединений **2.2.7**.

Соединение	H ₂ O	EtOH	CH ₃ CN	EtOAc	Диоксан
2.2.7a	-	-	0.53	0.47	-
2.2.7b	0.19	0.37	0.40	0.53	0.66
2.2.7c	0.07	0.15	0.15	0.23	0.33
2.2.7d	0.05	0.08	0.08	0.16	0.26

Таким образом, мы показали, что подвижность арилиденового фрагмента хромофоров различных флуоресцентных белков, а также кратной связи стирольного фрагмента производных хромофора белка Kaede, в существенной степени влияют на эффективность безызлучательного сброса энергии возбуждения, а их фиксация приводит к существенному увеличению квантового выхода флуоресценции.

2.3 Борированные арилиден-имидазолы с аминной группой

Как известно для большинства арилметеновых красителей замена фенольной группы на аминную группу позволяет избавиться от pH зависимых переходов в физиологической области, а также приводит к заметному батохромному смещению положений спектральных максимумов. В связи с этим одним из направлений нашей работы стало создание конформационно-фиксированных арилиден-имидазолонов, содержащих аминную группу в арилиденовом фрагменте (Схема 21).

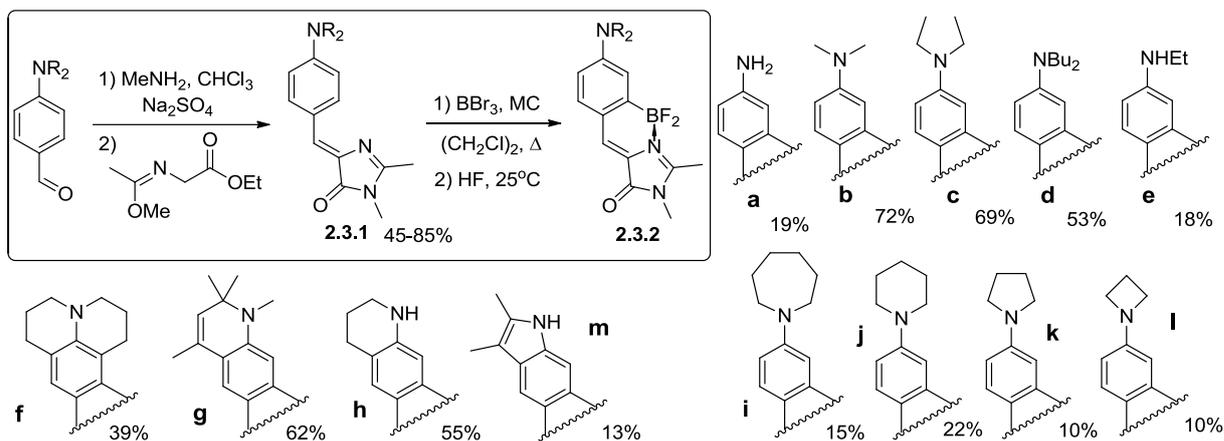


Схема 21. Арилиден-имидазолон с аминной группой и их синтез.

Как оказалось, замена гидроксильной группы в молекуле конформационно-фиксированного арилиден-имидазолон действительно позволила сместить спектральные максимумы в длинноволновую область спектра (Таблица 3), а также избежать рН зависимых переходов в физиологическом диапазоне. Однако, большая часть полученных веществ отличалась заметным варьированием величины квантового выхода флуоресценции в различных растворителях.

Таблица 3. Характеристики соединений **2.3.2a-g** в различных растворителях.

		2.3.2a	2.3.2c	2.3.2d	2.3.2e	2.3.2h	2.3.2f	2.3.2g
Вода	Поглощение	461(30) ^a	520(53)	518(- ^b)	495(31)	515(45)	547(56)	541(33)
	Эмиссия	530	563	562	548	560	586	616
EtOH	Поглощение	480(33)	505(48)	508(47)	500(35)	512(45)	533(50)	531(33)
	Эмиссия	532	557	560	544	556	577	601
CH ₃ CN	Поглощение	453(35)	494(45)	497(45)	475(32)	487(44)	521(49)	515(35)
	Эмиссия	517	554	556	536	547	574	595
EtOAc	Поглощение	459(38)	492(47)	495(47)	477(36)	492(43)	516(46)	513(38)
	Эмиссия	512	538	542	527	540	563	578
Диоксан	Поглощение	462(36)	497(51)	499(53)	481(36)	494(45)	519(54)	518(39)
	Эмиссия	506	538	538	521	533	556	571

a – (максимум в нанометрах, в скобках указан коэффициент молярного поглощения (м см)⁻¹ * 10⁻³).

Так, созданные в первую очередь соединения **2.3.2b-d** демонстрировали разброс квантового выхода от 3 до 70% между водой и диоксаном (Таблица 4).

Таблица 4. Квантовые выходы флуоресценции соединений **2.3.2a-g**.

	Вода	EtOH	CH ₃ CN	EtOAc	Диоксан
2.3.2a	0.70	0.67	0.67	0.66	0.82
2.3.2b	0.05	0.35	0.48	0.67	0.78
2.3.2c	0.03	0.22	0.31	0.63	0.72
2.3.2d	-	0.27	0.37	0.64	0.73
2.3.2e	0.65	0.82	0.77	0.93	0.89
2.3.2h	0.63	0.64	0.67	0.64	0.65
2.3.2f	0.48	0.76	0.76	0.69	0.86
2.3.2g	0.13	0.50	0.57	0.62	0.68

Такое поведение ранее уже наблюдалось для многих других красителей содержащих аминные группы. Этот феномен объясняется тем, что подобные молекулы помимо основного возбужденного состояния (которое может переходить в невозбужденное состояние с испусканием света) имеют также и дополнительное возбужденное состояние с высокой степенью перераспределения заряда. Очевидно, что на формирование такого состояния существенное влияние оказывает электронодонорный характер заместителей, лежащих при атоме азота. В связи с этим все производные, содержащие один или два атома водорода в аминной группе, в наименьшей степени демонстрировали варьирование квантового выхода. Наиболее типичным методом предотвращения формирования нефлуоресцентного возбужденного состояния с переносом заряда является фиксирование алкильных групп при атоме азота к орто-положениям ароматического кольца, т.е. создание различных производных

ди или тетрагидрохинолина. Формирование планарного состояния сопровождается существенным изменением угла между атомами С-N-C аминогруппы, его формирование может быть затруднено за счет введения в молекулу малых циклов – пирролидинового и азетидинового.

В результате, среди всех созданных нами аминопроизводных, можно выявить шесть структур, которые характеризовались невысокой степенью варьирования квантового выхода флуоресценции в различных растворителях: **2.3.2a,h,e,k,l** и **f**, содержащие либо атомы водорода при атоме азота, либо остаток пиррола, азетидина или юлолитдина.

Таким образом, нами был создан ряд аминных производных конформационно-зафиксированных арилиден-имидазолонов, а также показано, что некоторые из них потенциально могут быть использованы в роли флуоресцентных или флуорогенных красителей, а также флуоресцентных сенсоров.

2.4 Борированные арилиден-имидазолы с увеличенной системой сопряженных связей

Еще одним важным направлением модификации флуоресцентных красителей является увеличение системы сопряженных связей. Такая модификация зачастую приводит к заметному батохромному смещению спектральных максимумов и часто ведет к увеличению Стоксового сдвига. В связи с этим еще одним направлением настоящей работы стало введение в арилиден-имидазолы нафталиновых фрагментов, а также дополнительных двойных и тройных связей. Наиболее очевидным фрагментом молекулы, в который можно ввести нафталиновый фрагмент является арилиденная группа (Схема 22). Изучение оптических характеристик полученных веществ показало, что предложенная модификация действительно приводит к значительному батохромному смещению максимумов, причем введение в молекулу аминных групп позволяет сместить положение максимумов эмиссии почти до 700 нм (Таблица 5).

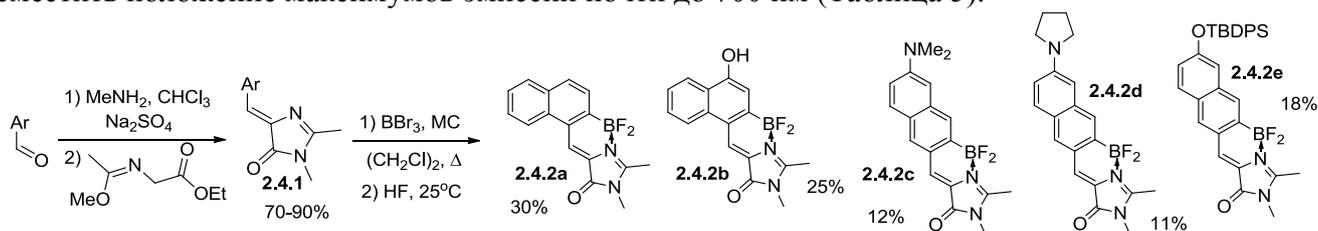


Схема 22. Нафталинсодержащие производные.

Таблица 5. Характеристики соединений **2.4.2** в различных растворителях.

Соед.	Заместитель		H ₂ O	EtOH	CH ₃ CN	EtOAc	Диоксан
2.4.2a		Поглощение	427	436	425 (19000)	428 (19500)	435 (20000)
		Эмиссия	532	510	497	484	483
2.4.2b		Поглощение	465 (15000)	479 (20000)	458 (23000)	467 (23500)	474 (21000)
		Эмиссия	554	543	532	525	523
2.4.2f		Поглощение	424 (14000)	430 (14500)	422 (17500)	429 (17500)	433 (18000)
		Эмиссия	564	550	524	511	504
2.4.2d		Поглощение	511	510 (26000)	498 (30000)	498 (30000)	508 (31500)
		Эмиссия	674	653	646	617	602
2.1.1		Поглощение	404	416	402	410	414
		Эмиссия	485	483	469	465	464

Заметное влияние на свойства полученных веществ оказал не только характер введенных групп, но также и их взаимное расположение в нафталиновом фрагменте. Оказалось, что удаление имидазолоновой группы и донорного заместителя друг от друга приводит не только к батохромному сдвигу спектральных максимумов, но и к росту величины Стоксового сдвига, которая в случае производных, содержащих аминные группы достигала 200 нм. Также как и во всех упомянутых выше случаях, введение дифторборильной группы приводило к значимому увеличению интенсивности флуоресценции – квантовые выходы флуоресценции полученных соединений **2.4.2** лишь в отдельных случаях оказывались ниже 5% (Таблица 6).

Таблица 6 Квантовые выходы флуоресценции соединений **2.4.2**.

Соединение	H ₂ O	EtOH	CH ₃ CN	EtOAc	Диоксан
2.4.2a	0.65	0.30	0.86	0.95	0.98
2.4.2b	0.77	0.65	0.80	0.80	0.86
2.4.2f	0.27	0.61	0.77	0.88	0.94
2.4.2c	0.04	0.19	0.29	0.40	0.45
2.4.2d	0.02	0.13	0.20	0.31	0.34

Как и в случае с простыми арилиденновыми производными, которые были описаны выше, введение аминных групп привело к заметному варьированию величины квантового выхода флуоресценции в зависимости от используемого растворителя. Разброс этой величины для диметиламинного производного **2.4.2c** достигал одного порядка между водой и диоксаном. Вероятно в данном случае, наличие аминной группы также обуславливает возможность формирования отдельных нефлуоресцентных форм возбужденного состояния, характеризующихся высокой степенью перераспределения заряда.

Таким образом, нам удалось создать ряд нафталиновых производных хромофора GFP с введенной фиксирующей дифторборильной группой и показать, что данная модификация позволяет сместить максимумы поглощения и эмиссии в длинноволновую область с сохранением прочих характеристик (величины квантового выхода флуоресценции и характера его варьирования, а также характера pH зависимых переходов и pKa).

2.5 Борированные арилиден-имидазолы, содержащие линкерные группы

Еще одним направлением настоящей работы стало создание конформационно-фиксированных арилиден-имидазолонов, содержащих линкерные группы. Данная работа была начата еще в рамках диссертационной работы автора на соискание степени кандидата наук («Физико-химические свойства хромофора GFP и флуоресцентные красители на его основе», Москва, Институт биоорганической химии РАН, 2013), однако в дальнейшем круг этих соединений и примеров их использования был заметно расширен.

Потенциально функционализированные производные, содержащие дифторборильную фиксирующую группу, могли бы быть созданы из соответствующих арилиден-имидазолонов, без этого мостика. Однако, введение дифторборильного остатка сопряжено с использованием такого жесткого реагента, как трибромид бора, который также реагирует с большинством функциональных групп. Фактически единственным набором соединений, который удалось создать с помощью этого подхода стал набор различных производных хромофора GFP. Все эти вещества были созданы с использованием имидазолонов, содержащих в своей структуре остаток аминокислотной или аминовалериановой кислоты. Более того, для успешного превращения нам потребовалось вводить дополнительные защитные группы, а также выделять и очищать промежуточно образующийся сложный эфир. Тем не менее, такая технология позволила создать ряд веществ с суммарными выходами около 10-25% (Схема 23).

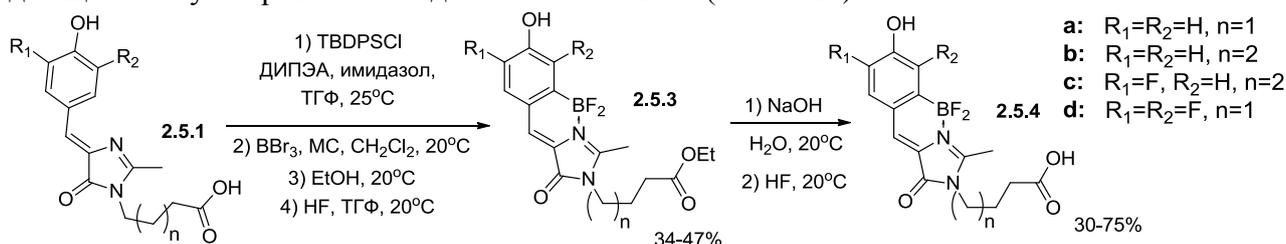


Схема 23. Синтез производных **2.5.4**

Первым примером их использования стало создание флуоресцентно-меченого необратимого ингибитора цистеиновых катепсинов человека. Эти ферменты участвуют в разных физиологических процессах и представляют собой важную мишень для исследований, направленных на поиск новых лекарственных средств. Исследование созданного производного показало, что оно действительно проявляет высокую ингибирующую активность и может быть использовано для визуализации белка, причем связывание маркера происходит именно с активным центром.

Еще одним примером использования созданных маркеров стала работа проведенная коллективом профессора Сергея Завриева (ИБХ РАН, Москва). В ходе этого исследования была изучена возможность использования маркера **2.5.4a** в качестве флуоресцентной метки для линейного зонда в количественной ПЦР. Исследование поводилось на примере системы детекции фитопатогенного гриба *Fusarium avenaceum*. Для сравнительной оценки характеристик **2.5.4a** использовали зонды, меченые красителями – FAM и **2.5.4a**. Было показано, что созданный нами краситель вполне может быть использован как флуоресцентная метка для гидролизуемых зондов в количественной ПЦР. Также было установлено, что созданная метка лишь незначительно уступает по своим параметрам коммерчески-доступным красителям традиционно используемым в качестве флуоресцентных меток для детекции сигнала на канале FAM.

Третьим примером использования предложенных нами красителей стало создание ионообменных мембран, проведенное коллективом профессора Шейна Ардо (США, Калифорния, Университет Ирвайн). Наличие эффекта переноса протона возбужденного состояния позволяет использовать предложенный нами краситель для создания мембран, чья электропроводимость может быть индуцирована действием света. Нашими коллегами была проведена масштабная работа по введению в мембраны различных фотокислот, имеющих самый разный рКа возбужденного состояния. Изначально предполагалось, что введение веществ с более низким рКа* позволит улучшить свойства данных материалов, однако проведенная работа показала, что кислотность возбужденного состояния не коррелирует с фотоэлектрическим напряжением. При оценке фотоотклика серии биполярных мембран, изготовленных путем наслоения фотокислотной катионообменной мембраны на анионообменную мембрану, не было выявлено четкой корреляции между суммарным электрическим потенциалом и фотоэлектрическими характеристиками. Таким образом, использование наших красителей позволило пролить свет на некоторые фундаментальные проблемы конструирования подобных мембран и предложить новые подходы к их созданию.

Как уже было сказано, предложенный нами подход к функционализации оказался недостаточно эффективным и позволял создавать лишь производные хромофора GFP. В связи с этим, еще одним направлением нашей работы стало создание более универсального подхода к функционализации флуоресцентных красителей. Для этой цели в настоящей работе нами был предложен подход, основанный на использовании реакции [2+3] циклоприсоединения азидов к терминальным енаминам. (Схема 24).

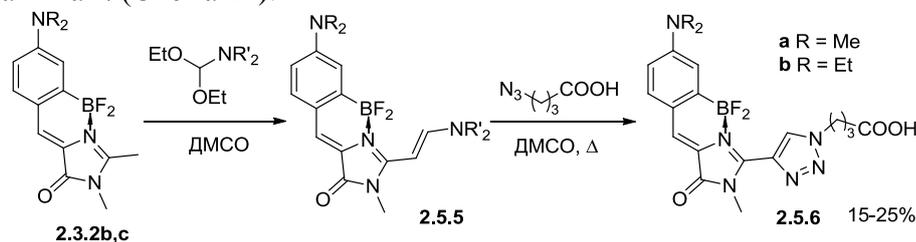


Схема 24. Синтез производных **2.5.6**.

В ходе дальнейшей работы мы показали, что предложенный подход может также быть использован и для других флуоресцентных красителей.

Таким образом, в результате проведенной работы нами был создан ряд функционализированных производных флуоресцентных арилиден-имидазолонов, содержащих дифторборильный мостик. Предложен универсальный подход к функционализации флуоресцентных красителей. Показана возможность прикладного использования созданных веществ.

2.6 Борированные арилиден-имидазолонны с заместителями в мета-положении

Как хорошо известно, положение заместителей может драматически сказываться на свойствах флуоресцентных красителей. Мы установили, что введение электронодонорных групп в мета положение арилиден-имидазолонов, содержащих дифторборильный мостик, также может существенно влиять на их физико-химические свойства. В частности, интересным феноменом в свойствах арилиден-имидазолонов стало поведение соединения, у которого гидроксильная группа расположена в мета-положении (Схема 26). Введение дифторборильного мостика в такой арилиден-имидазолон не привело к увеличению интенсивности флуоресценции. Низкий квантовый выход наблюдался во всех исследованных нами растворителях, но что более интересно, в некоторых из них наблюдалось уширение спектра флуоресценции и даже формирование отдельного максимума эмиссии с большей длиной волны (Схема 25).

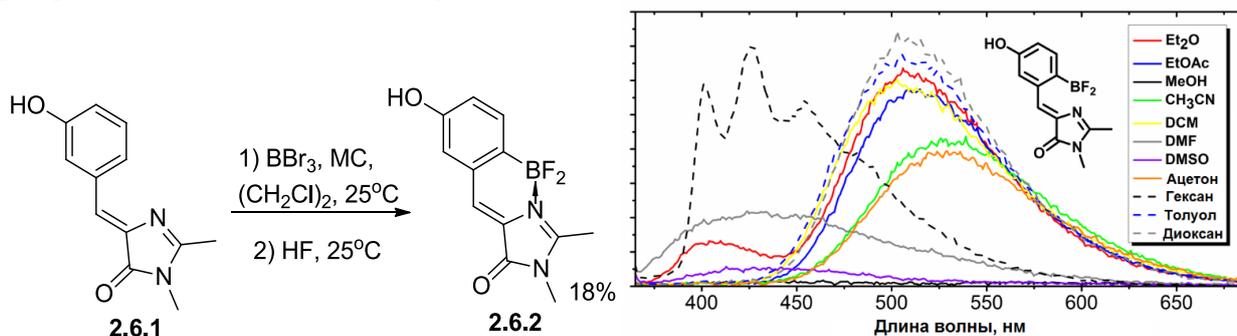


Схема 25. Мета-гидроксильное производное 2.6.2 и его спектры эмиссии.

Проведенные нашими коллегами из МГУ (лаборатория квантовой фотодинамики Анастасии Боченковой, кафедра физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова) квантово-химические расчеты, позволили объяснить такое поведение. По всей видимости, такое свойство объясняется тем фактом, что данные молекулы имеют две относительно близких по энергии нижних свободных молекулярных орбитали, причем переход из одной из них в основное состояние практически запрещен. По этой причине поглощение кванта света происходит с переходом электрона не на нижнюю орбиталь, а на орбиталь, характеризующуюся чуть большей энергией (S_1' на схеме 26). Затем быстро происходит релаксация до нижней свободной орбитали (S_1 на схеме 26), из которой релаксация в основное состояние происходит медленно и практически безызлучательным образом. Эта модель объясняет не только низкий квантовый выход, но и наличие двух полос эмиссии – более длинноволновое излучение оказывается характерно для редко происходящей эмиссии при переходе $S_1 \rightarrow S_0$. Подобный феномен уже был ранее описан и предсказан для родственных имидазольных систем без дифторборильного мостика и получил название «мета-эффект».

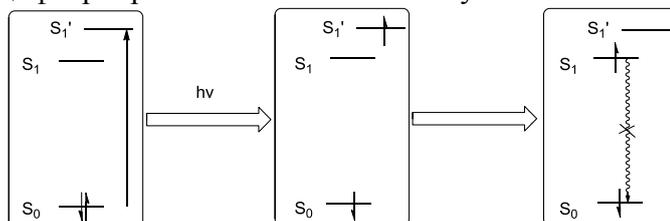


Схема 26. Вероятное объяснение особенностей поведения соединения 2.6.2.

С одной стороны, эта особенность не позволяет использовать такие вещества, как флуорофоры. Однако, с другой стороны, возможность управлять этим эффектом, может позволить конструировать флуоресцентные сенсоры. Мы предположили, что это будет возможно за счет одновременного введения в молекулу двух электронодонорных групп и в мета, и в пара положениях. Как оказалось, в зависимости от соотношения донорной силы введенных групп полученные арилиден-имидазолонны могут либо проявлять заметную флуоресценцию, либо нет.

Первым примером таких веществ стали N-гидроксипроизводные борированного хромофора GFP. Наличие N-гидроксильной группы предполагает возможность перехода этих соединений в депротонированную форму. Изучение спектров эмиссии показало, что такое депротонирование сопровождается заметным изменением интенсивности флуоресценции

(Схема 27). По всей видимости, депротонирование N-гидрокси группы существенно увеличивает ее электронодонорный эффект, что приводит к возникновению «мета-эффекта» и «выключает» флуоресценцию молекулы. Такая особенность позволяет предположить высокий потенциал производного **2.6.6b** и аналогичных ему веществ в роли рН сенсорных соединений. Близость рКа выявленного перехода к физиологическим значениям позволяет предположить возможность использования в исследовании процессов, протекающих в живых системах.

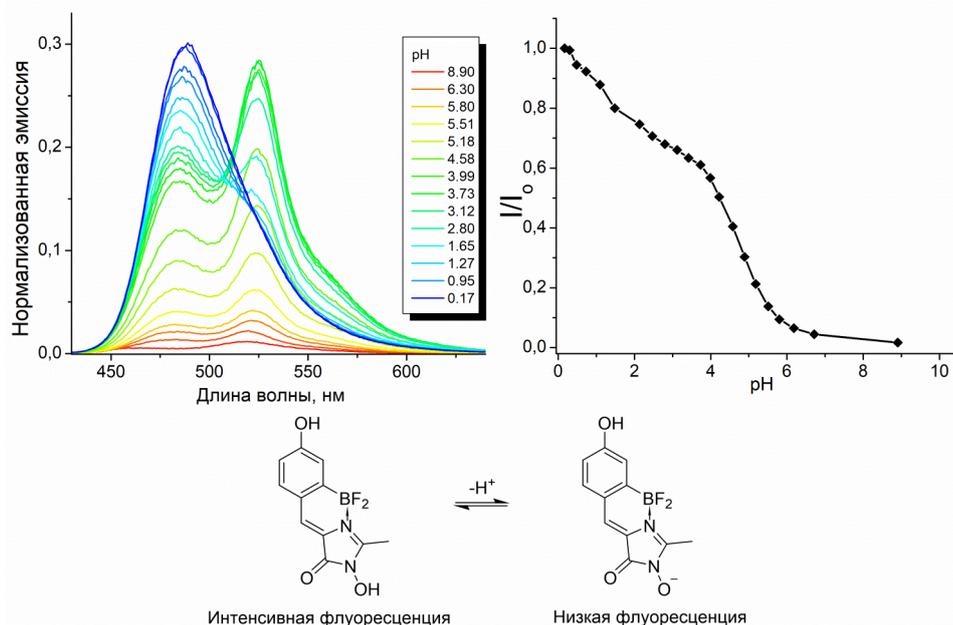


Схема 27. Спектры флуоресценции **2.6.6b** при различном значении рН.

Следующей группой веществ, в которых мог бы проявиться «мета-эффект», стали производные содержащие одновременно атом кислорода в мета-положении и атом азота в пара-положении арилиденового фрагмента.

Синтез таких арилиден-имидазолонов проводился исходя из доступного эфира 4-амино-3-гидрокси бензойной кислоты **2.6.7**, который с помощью нескольких химических трансформаций превращали в соответствующие альдегиды **2.6.11** и **2.6.16**. Арилиден-имидазолы без дифторборильного мостика (**2.6.17** и **2.6.18**) получали из этих альдегидов через циклоприсоединение карбоксиимидата к основаниям Шиффа. Борирование проводили по описанной выше технологии с трибромидом бора, что позволило получить два производных **2.6.19** и **2.6.20** (Схема 28). Изучение оптических характеристик соединений показало, что они мало отличаются от аналогичных аминированных арилиден-имидазолонов без дополнительного атома кислорода. Так, соединения **2.6.18** и **2.6.17** оказались практически нефлуоресцентны в любых средах. Квантовые выходы флуоресценции соединения **2.6.20** оказались высоки во всех средах, а квантовые выходы флуоресценции **2.6.19** возрастали при переходе от более полярных и протонных растворителей к менее полярным и апротонным (Таблица 7).

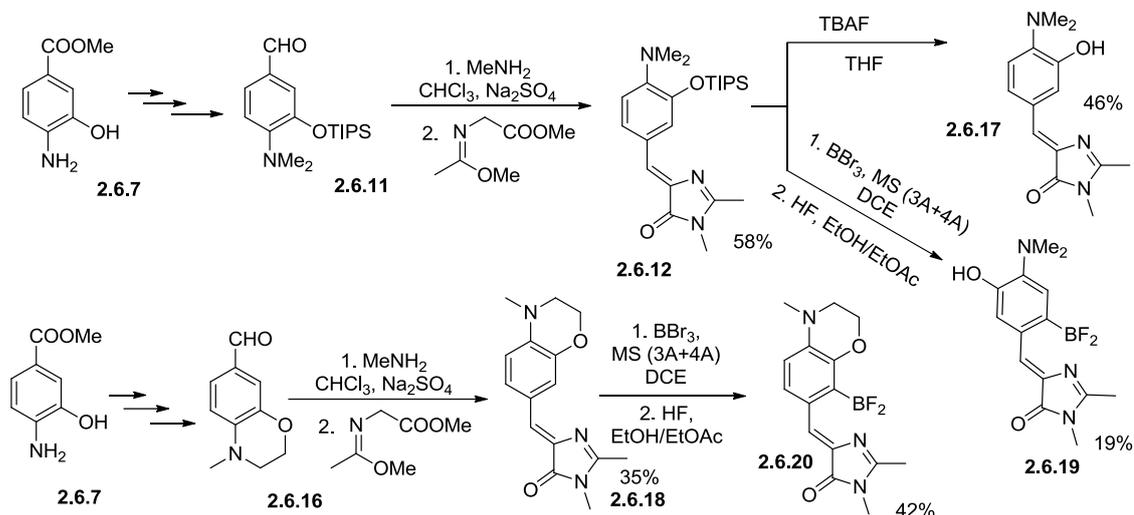


Схема 28. Синтез производных **2.6.18-20**.

Таблица 7. Оптические свойства соединений **2.6.19** и **2.6.20**.

Растворитель	2.6.19			2.6.20		
	Макс. Поглощения, нм	Макс. Эмиссии, нм	КВФ, %	Макс. Поглощения, нм	Макс. Эмиссии, нм	КВФ, %
Вода	448	582	2	517	579	49
TFE	469	617	3.6	521	574	74.6
MeOH	468	620	6	504	575.5	68.3
EtOH	490	618	12.5	505.5	575	79.2
Изопропанол	505	624	16.4	509	573	61.2
Ацетонитрил	464	603	15.9	495	567	78.4
Диметилформамид	489	621	14.8	500.5	574	78.7
Ацетон	476	602	29.6	494.5	565	79.3
Дихлорметан	433	589	62.6	509	558	86.8
EtOAc	477	590	46.3	493	555	79.5
Диоксан	476	583	59.2	497	547	88.2
Толуол	433	571	69.3	506	542	86.8

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что присутствие в пара-положении группы с сильно электронодонорным эффектом (в данном случае аминной группы) нивелирует «мета-эффект» заместителя, лежащего в мета-положении, если его электронодонорный эффект оказывается ниже. Поскольку гидроксильные или алкоксигруппы являются более слабыми донорами, чем аминная группа, в случае соединений **2.6.19** и **2.6.20** «мета-эффект» не проявляется (Схема 29). Большим донорным характером обладает депротонированная гидроксильная группа. Мы изучили поведение соединения **2.6.19** в разных растворителях в присутствии ДБУ и установили, что в этом случае флуоресценция действительно ослабевает или даже пропадает вовсе.

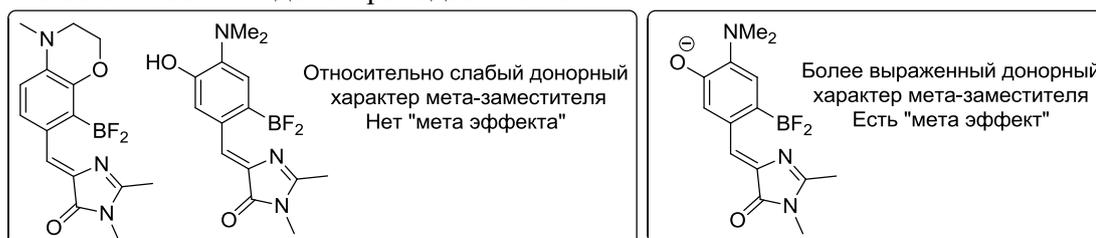


Схема 29. Проявление «мета-эффекта» производных **2.6.19** и **2.6.20**.

Следующим шагом работы стало создание арилиден-имидазолонов, в которых атомы азота и кислорода в арилиденовом фрагменте занимали бы другие положения (Схема 30).

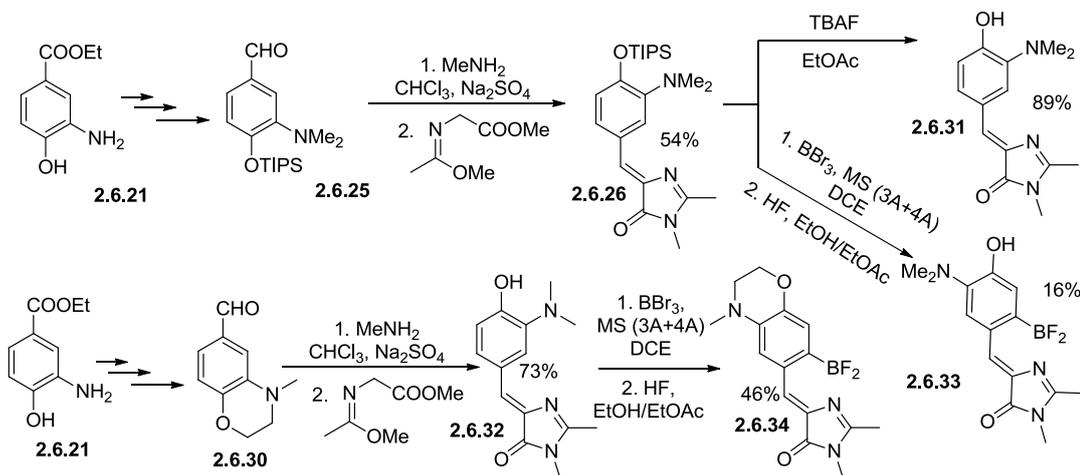


Схема 30. Синтез производных **2.6.31-34**.

Изучение оптических спектров соединения **2.6.31** не выявило никаких заметных особенностей поведения (Таблица 8). Такой неборированный арилиден-имидазолон проявлял крайне низкую интенсивность флуоресценции. В тоже время поведение вещества **2.6.32** оказалось неожиданным – данное соединение характеризовалось заметной интенсивностью флуоресценции в неполярных и апротонных средах, что позволяет говорить о его высоком потенциале в роли флуорогена.

Таблица 8. Оптические свойства соединений **2.6.32** и **2.6.31** в различных растворителях.

Растворитель	2.6.32			2.6.31		
	Макс. Поглощения,	Макс. Эмиссии,	КВФ, %	Макс. Поглощения,	Макс. Эмиссии,	КВФ, %
	нм	нм		нм	нм	
H ₂ O(pH=7.5)	377	-	-	402	-	-
Метанол	361	~625	<1	380	-	-
CH ₃ CN	401	586	17	372	605	-
EtOAc	401	539	24	372	551	-
Диоксан	404	526	25	375	543	-

Еще более неожиданным оказалось поведение веществ **2.6.33** и **2.6.34**. Так, для производного с циклическим заместителем значительной флуоресценции не наблюдалось ни в одном из использованных растворителей (Схема 31). При этом спектры эмиссии этого вещества имели два выраженных максимума, что говорит о наличии дополнительной орбитали с низкой энергией, для которой переход в основное состояние затруднён, а значит о проявлении упомянутого «мета-эффекта», который и приводит к гашению флуоресценции.

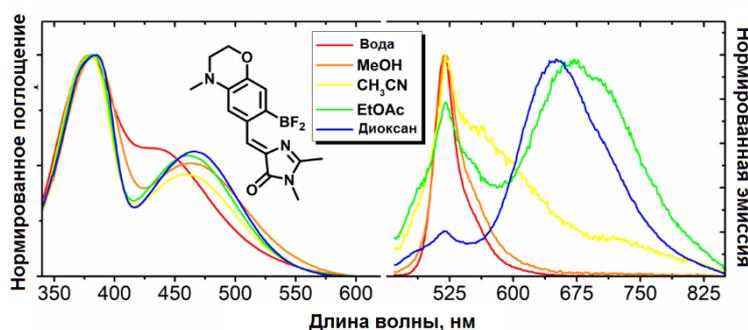


Схема 31. Спектры поглощения и эмиссии соединения **2.6.34**.

Поведение производного **2.6.33** оказалось несколько иным. Для этого вещества со свободным гидроксилом, интенсивная эмиссия наблюдалась в воде, при нейтральном или кислом pH, а также во влажных полярных растворителях. Мы более подробно изучили спектры этого вещества в воде при разном значении pH и обнаружили, что для него характерно три отдельных состояния с рKa перехода между ними около 5 и 9. Можно предположить, что эти два pH-зависимых перехода связаны с протонированием диметиламинной группы и

депротонированием фенольного гидроксила, а три различных спектра поглощения отвечают нейтральной, депротонированной (по фенольному гидроксилу) и протонированной (по диметиламинной группе) формам этого имидазолон. Изучение спектров эмиссии при разном рН показало некоторое расхождение с рКа полученными для спектров поглощения - в спектрах эмиссии наблюдался лишь один пик с максимумом около 515 нм, интенсивность которого начинала немного падать при рН около 5 и сходила на нет при рН более 9.

Вероятно, соединение **2.6.33** оказывается флуоресцентно лишь в тех случаях, когда гидроксильная группа оказывается депротонирована, а диметиламинный остаток оказывается протонирован, либо за счет внешнего воздействия, либо за счет внутримолекулярного переноса протона с гидроксильной группы. Таким образом, единственной флуоресцентной формой становится катионо-анионная форма молекулы. Вероятный механизм процессов, происходящих при фотовозбуждении молекулы **2.6.33**, а также ее флуоресцентные и нефлуоресцентные формы представлены на схеме 32.

Таким образом, молекула **2.6.33** стала отличным примером проявления «мета-эффекта» в борированных арилиден-имидазолон. Ее флуоресценция наблюдается лишь в тех случаях, когда электронодонорный эффект диметиламинной группы оказывается «выключен» за счет протонирования, а электронодонорный эффект гидроксильной группы в пара-положении оказывается «включен» за счет ее депротонирования.

Как показали наши коллеги из США (коллектив профессора Фанга Чонга, США, Орегон) с помощью квантово-механических расчетов, данный внутримолекулярный перенос возможен лишь при наличии мостиковой молекулы воды, что и объясняет интенсивную эмиссию лишь в водных средах. Интересно, что данный феномен потенциально позволяет использовать данный имидазолон не только в роли рН-сенсора, но и в качестве сенсора воды, что может быть немаловажно для промышленных технологий органического синтеза, в которых выявление влаги в органических средах является критическим для успешного проведения отдельных синтетических превращений.

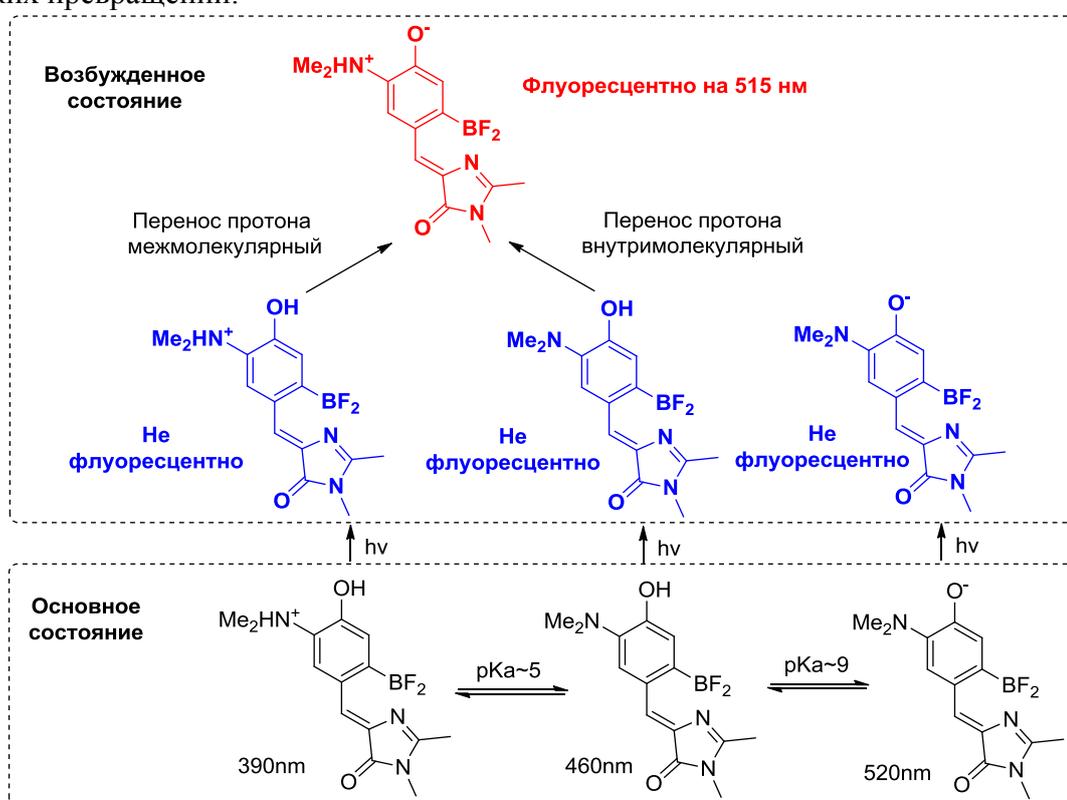


Схема 32. Вероятный рН-зависимый механизм образования флуоресцентных и нефлуоресцентных форм производного **2.6.33** за счет проявления «мета-эффекта».

В завершении раздела расскажем о борированном арилиден-имидазолоне, содержащем одновременно два атома азота в мета- и пара-положениях арилиденового фрагмента (Схема 33).

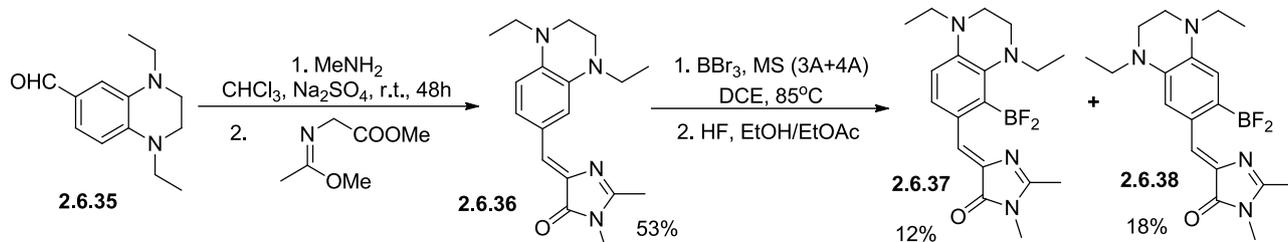


Схема 33. Синтез производных **2.6.36-38**.

Арилиден-имидазолон **2.6.36** по своим свойствам оказался похож на соединение **2.6.32**. У него также наблюдалось заметное увеличение интенсивности флуоресценции при переходе к апротонным и неполярным средам. Заметное bathochromное смещение и специфическое изменение спектров эмиссии при переходе к более полярным растворителям говорят о том, что для этих веществ возможно наличие дополнительного возбужденного состояния с более низкой энергией, переход из которого в основное состояние характеризуется низким КВФ (Таблица 9).

Таблица 9. Оптические свойства соединения **2.6.36** в различных растворителях.

Растворитель	2.6.36		
	Макс. Поглощения, нм	Макс. Эмиссии, нм	КВФ, %
H ₂ O (pH=7.5)	480	-	-
Метанол	480	~620	<1
CH ₃ CN	464	~610	~1,5
EtOAc	460	560	12
Диоскван	462	552	11

В отличие от результата, полученного для производных **2.6.18** и **2.6.32**, борирование имидазолон **2.6.36** привело к образованию смеси из двух продуктов – **2.6.37** и **2.6.38**. Оба этих вещества характеризовались крайне слабой флуоресценцией во всех органических растворителях и воде при высоком значении pH. Однако при подкислении водных растворов обоих веществ наблюдалось значительное (более чем на 2-3 порядка) увеличение интенсивности флуоресценции (Таблица 10).

Таблица 10. Оптические свойства соединений **2.6.37** и **2.6.38** в различных растворителях.

Растворитель	2.6.37			2.6.38		
	Макс. Поглощения, нм	Макс. Эмиссии, нм	КВФ, %	Макс. Поглощения, нм	Макс. Эмиссии, нм	КВФ, %
H ₂ O	489	545	>50 (pH<7.0)	555	550	>50 (pH<4.0)
Methanol	516	~540	<1	568	~590	<1
CH ₃ CN	505	~540	<1	555	~580	<1
EtOAc	502	~550	<1	550	~570	<1
Dioxane	505	~550	<1	552	~570	<1

Анализ спектров поглощения этих веществ в воде при различном pH позволил определить их pKa, который составил 7,6 и 4,0 для **2.6.37** и **2.6.38** соответственно. Аналогичным образом изменялись и спектры эмиссии этих веществ. В обоих случаях наблюдался один единственный максимум излучения около 550 нм, интенсивность которого нарастала при уменьшении pH.

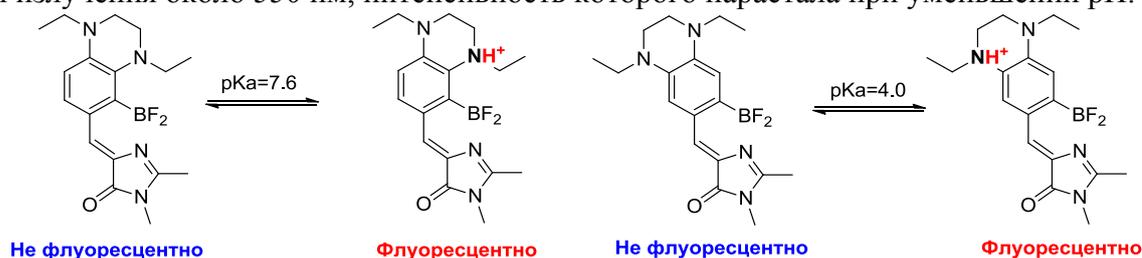


Схема 34. Вероятный pH-зависимый механизм образования флуоресцентных и нефлуоресцентных форм производных **2.6.37-38** за счет проявления «мета-эффекта».

Также как и для производного **2.6.33** такое поведение вероятнее всего объясняется тем, что в кислых средах из-за протонирования ослабевает электронодонорный эффект атома азота в мета-положении (Схема 34). Это приводит к исчезновению «мета-эффекта» и как следствие, появлению флуоресценции. Такая особенность потенциально может позволить использовать данные вещества в роли рН сенсоров. Более того, для **2.6.37** рН-зависимый переход лежит в физиологической области, что делает его потенциально привлекательным для изучения живых систем. Такие работы являются одной из задач наших дальнейших исследований.

Таким образом, по результатам работ, представленных в настоящем разделе, можно сделать вывод, что введение электронодонорных заместителей в мета-положения борированных арилиден-имидазолонов может в некоторых случаях блокировать их флуоресценцию. Введение в это положение рН-чувствительных групп с изменяющимися электронодонорными свойствами позволяет создавать рН-чувствительные флуоресцентные сенсоры, потенциально применимые для исследования живых систем.

2.7 Прочие подходы к созданию арилиден-имидазолонов с внутренним фиксирующим мостиком

Помимо упомянутого выше метода создания конформационно-фиксированных производных хромофоров флуоресцентных белков, нами была предпринята другая серия попыток создания похожих соединений. В первую очередь мы попытались использовать упомянутые выше имидазолы **1.1.11**, содержащие дополнительную аминную группу. В молекулы был введен дифторборильный мостик (Схема 35), который исходя из данных РСА встроился между атомами азота и кислорода.

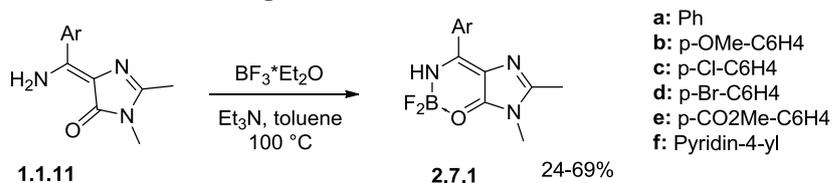


Схема 35. Создание конформационно-фиксированных производных **2.7.1**.

Введение дифторборильного мостика резко увеличило квантовый выход флуоресценции предложенных амино-арилиден-имидазолонов. Однако все созданные соединения характеризовались достаточно коротковолновым положением максимумов абсорбции и эмиссии. Более того, все созданные соединения демонстрировали очень близкие положения полос поглощения независимо от введенного арильного заместителя.

Соединения **2.7.1** также демонстрировали значительные варьирование квантового выхода флуоресценции в различных растворителях. Наименьшие значения наблюдались в полярных и протонных средах. В некоторых случаях в воде флуоресценция полностью пропадала. Батохромные сдвиги и гашение флуоресценции в полярных и протонных растворителях позволяют предположить, что эти соединения имеют большие дипольные моменты в своем первом возбужденном состоянии, которые больше, чем в основном состоянии. Действительно, максимумы поглощения слабо зависят от природы растворителя, в то время как максимумы излучения заметно варьируют.

Таким образом, по результатам проведенной работы описанной в данном разделе, можно сделать вывод, что наиболее удобным подходом к внутримолекулярной конформационной фиксации арилиден-имидазолонов является введение дифторборильного мостика, представленное в прошлых разделах. Именно этот подход позволяет создавать широкий набор производных с самой разной структурой и высоким спектральным разнообразием, а также с хорошими выходами.

3. Арилиден-имидазолы как флуорогенные красители для мечения биологических объектов

3.1 Сенсоры полярности: флуорогены для отдельных клеточных органелл

В последние годы популярной технологией флуоресцентного мечения стало использование так называемых флуорогенных красителей или флуорогенов. Эти вещества не флуоресцируют в растворе в свободном виде, а приобретают выраженную флуоресценцию лишь при связывании с целевым объектом. Такая особенность позволяет существенно повысить

контрастность и зачастую избежать нецелевого мечения. В качестве целевых объектов, которые вызывают флуоресценцию флуорогена, могут выступать белки или нуклеиновые кислоты, а также целые органеллы. В данном разделе мы расскажем о возможности использования арилиден-имидазолонов именно в последней роли. Окрашивание отдельных органелл живых клеток флуорогенными красителями происходит не за счет связывания молекулы флуорогена с конкретной мишенью, а за счет сочетания их липофильных/гидрофильных свойств и специфического сольватохромного поведения – выраженного варьирования квантового выхода флуоресценции в зависимости от свойств среды. Определенная степень липофильности позволяет таким молекулам накапливаться в мембранах целевых органелл, а варьирование КВФ позволяет избежать нецелевого сигнала. Фактически, подобные вещества могут быть названы «сенсорами полярности», так как их флуоресцентный отклик наблюдается лишь в средах с определенными сольватационными свойствами, то есть определенной степенью кислотности, основности, полярности и гидрофобности.

Очевидно, что ключевым требованием, предъявляемым к потенциальным флуорогенам-сенсорам полярности является наличие выраженного варьирования КВФ в зависимости от свойств среды, в том числе низкой флуоресценции в водных средах. Еще в ходе синтеза различных арилиден-имидазолонов, упомянутых выше, мы установили, что некоторые из них действительно проявляют вырожденную флуоресценцию в апротонных и неполярных средах даже без введения в них фиксирующего дифторборильного мостика. Анализ наших данных, а также существующей литературы показал, что подобным свойством обладают арилиден-имидазолы, содержащие в арилиденовом фрагменте либо две электронодонорные группы во втором и пятом положениях, либо одну электроноакцепторную группу в четвертом положении.

Проведенный нами направленный синтез таких арилиден-имидазолонов **3.1.1** (Схема 36) показал, что эта закономерность наблюдается в широком диапазоне производных.

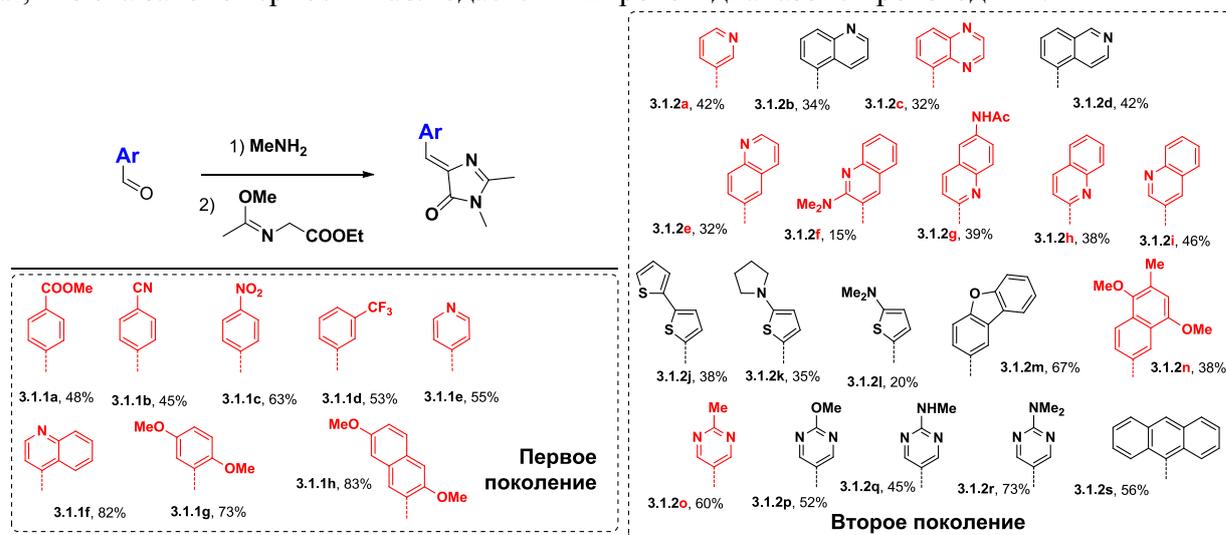


Схема 36. Синтез производных **3.1.1** и **3.1.2**. Красным цветом выделены арилиден-имидазолы с выраженным сольватохромным варьированием КВФ.

Наличие сольватохромного варьирования КВФ определялось по сопоставлению оптических свойств в пяти растворителях – воде, спирте, ацетонитриле, этилацетате и диоксане. Такой набор растворителей позволяет оценить поведение созданных веществ как в полярных протонных (вода, спирт), полярных апротонных (ацетонитрил), так и менее полярных (диоксан, этилацетат) средах. Мы показали, что для всей линейки созданных веществ **3.1.1** наблюдается заметное возрастание величины КВФ при переходе от воды к диоксану и этилацетату (Схема 37). Также для всех веществ наблюдалось заметное смещение максимумов поглощения и эмиссии в зависимости от среды. При этом максимумы поглощения при переходе к более полярным средам зачастую смещались в коротковолновую область, а максимумы эмиссии наоборот, то есть в более полярных средах наблюдалось увеличение Стоксова сдвига (Спектральные характеристики приведены в Приложении Б диссертации).

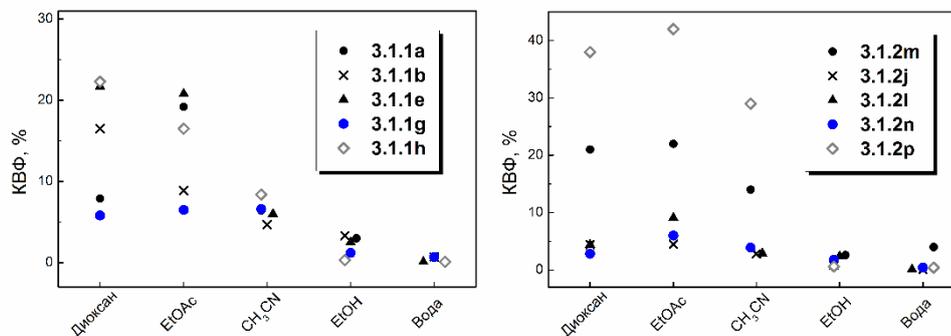


Схема 37. Квантовые выходы флуоресценции некоторых производных **3.1.1-2**.

Таким образом, мы показали, что в качестве электроноакцепторной группы в четвертом положении арилиденового фрагмента могут выступать как сложноэфирная (**3.11a**), так и нитрильная (**3.11b**) или нитро (**3.11c**) группы, а также может быть использовано производное полученное из 4-пиридин-карбальдегида (**3.11e**). Мы также показали, что 2,5-дизамещение донорными группами может быть расширено на производные нафталина. С удивлением мы также выявили, что заметным варьированием величины КВФ обладает производное с трифторметильной группой. Поскольку такое поведение выбивается из общей логики построения сенсоров полярности, нами был проведен синтез расширенного набора арилиден-имидазолонов – **3.1.2**. Изучение этой группы веществ показало, что заметным сольватохромным варьированием КВФ обладают очень многие арилиден-имидазолонны с электроноакцепторными группами. Фактически все производные пиридина, хинолина или их аналогов характеризовались выраженным увеличением КВФ при переходе к менее полярному окружению.

Тем не менее, введение электроноакцепторных групп в арилиденовый фрагмент привело также к заметному гипсохромному смещению максимумов поглощения и эмиссии. Для большинства таких веществ спектры поглощения (а значит и возбуждения) лежали в фототоксичной для живых систем области менее 400 нм. Батохромного смещения спектров удалось достичь лишь при введении донорных групп или/и введении дополнительных аннелированных колец в арилиденовый фрагмент. Однако и в этих случаях максимумы поглощения редко достигали 400 нм (Приложение Б, Схема 38).

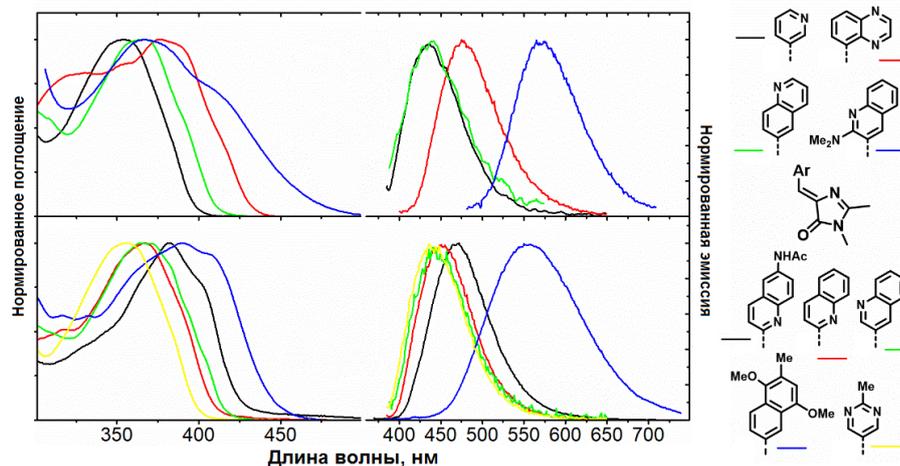


Схема 38. Спектры флуоресценции и поглощения некоторых производных **3.1.2**.

В связи с этим следующей целью работ стало создание производных с увеличенной системой сопряженных связей, что могло позволить сместить максимумы поглощения и эмиссии создаваемых флуорогенов в красную область. В такую модификацию были вовлечены только производные показавшие значимый разброс величины КВФ в разных растворителях (Схема 39).

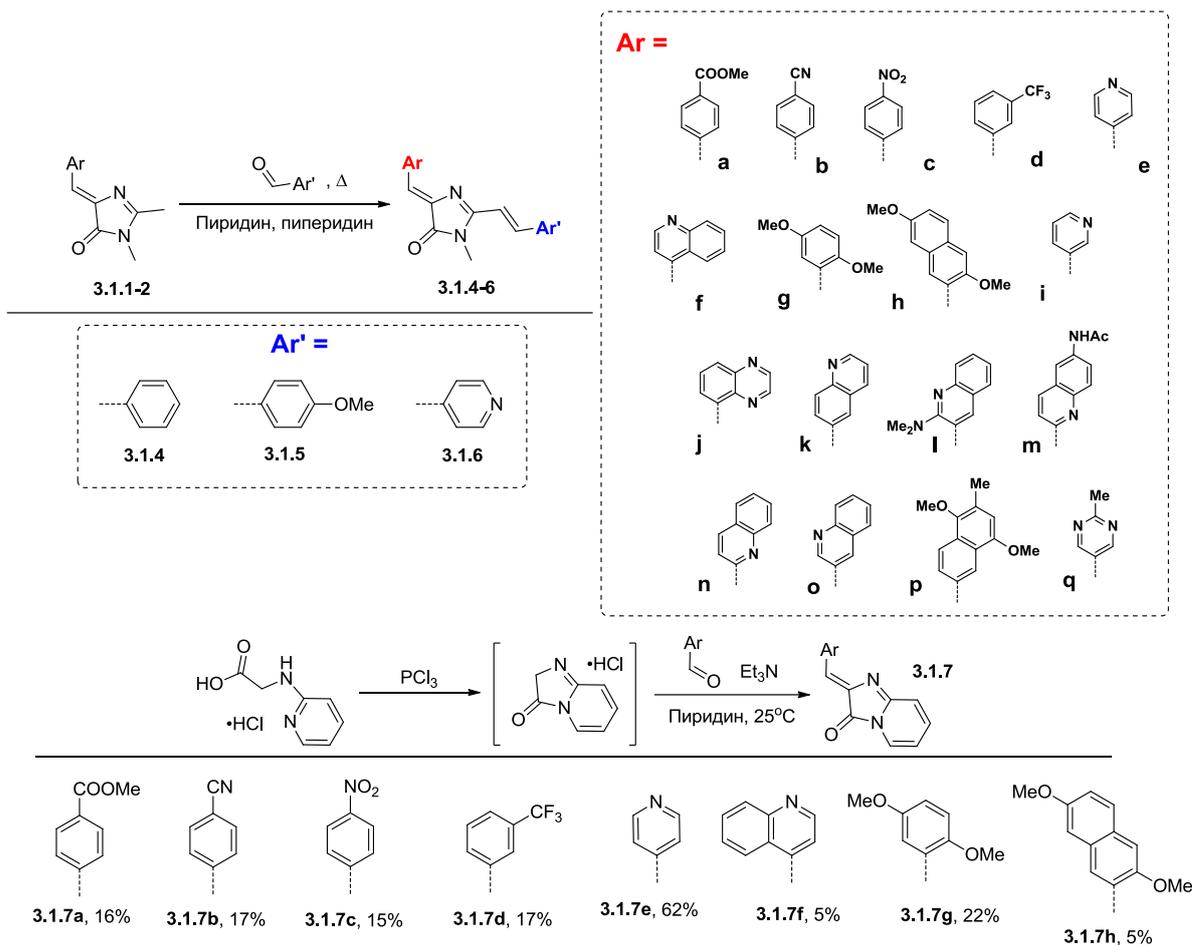


Схема 39. Синтез производных 3.1.4-7.

Изучение оптических свойств всех полученных веществ показало, что введение дополнительного стирольного фрагмента во всех случаях приводило к значительному батохромному сдвигу и увеличению коэффициента экстинкции.

Суммируя все результаты, можно сформулировать следующие закономерности поведения созданных нами веществ:

- Во всех случаях спектры поглощения смещались в длинноволновую область при переходе от полярных растворителей к неполярным, а спектры эмиссии, напротив, характеризовались максимальным батохромным смещением в полярных и протонных средах.

- Во всех случаях максимальные Стоксовы сдвига наблюдались в более полярных средах.

- Введение стирольного фрагмента привело к заметному батохромному смещению максимумов относительно исходных метильных производных. При этом влияние заместителей в стирольном фрагменте на положения максимумов было различным и не подчинялось каким-то закономерностям.

- Введение ауруноподобного фрагмента привело к еще большему батохромному смещению максимумов относительно исходных метильных производных.

- Квантовые выходы флуоресценции созданных веществ зачастую повышались в ряду растворителей вода-спирт-ацетонитрил-этилацетат-диоксан. Изредка максимальное значение КВФ наблюдалось не в диоксане, а в этилацетате и лишь в одном случае (производное 3.1.7e) максимальный КВФ наблюдался в ацетонитриле.

- Введение в электронно-донорной метоксигруппы в стирольном фрагменте существенно снизило сольватохромный разброс квантового выхода флуоресценции.

Описанные закономерности проиллюстрированы на нескольких примерах на схеме 40 ниже, а полный набор спектральных характеристик приведен в приложении Б.

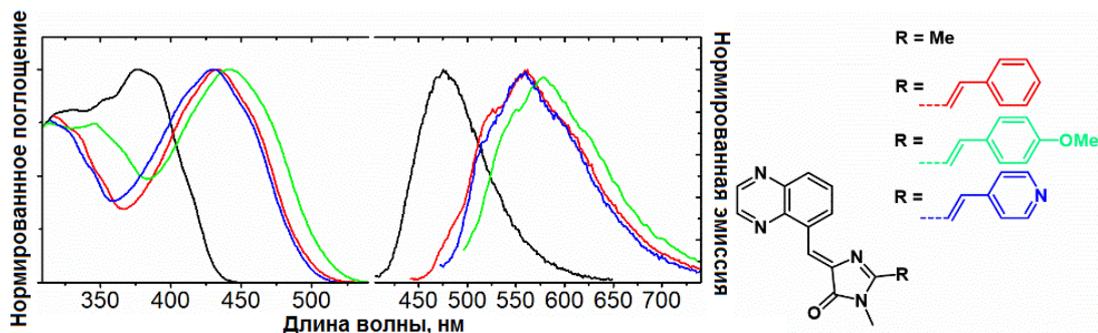


Схема 40. Спектры поглощения и флуоресценции производных **3.1.2c** и **3.1.4-6j**.

Следующим шагом нашей работы стало изучение возможности использования созданных веществ в окрашивании живых систем. Нами был проведен масштабный скрининг созданной нами библиотеки в отношении клеток HeLa Kyoto в условиях флуоресцентной микроскопии. Для проведения скрининга флуорогены добавляли в клеточную среду в конечных концентрациях от 1 до 20 мкМ, а затем получали изображения на флуоресцентном микроскопе. Результаты скрининга показали, что добавление флуорогенов к клеткам приводит к окрашиванию самых разных структур. Однако в большинстве случаев подобное окрашивание оказывается совершенно неселективным, а иногда даже сопровождается гибелью клеток. Нам удалось выявить два случая селективного мечения: одна группа веществ селективно окрашивала эндоплазматический ретикулум (ЭПР) клеток, а еще один краситель селективно окрашивал митохондрии.

Окрашивание ЭПР наблюдалось примерно в десятке случаев, однако однозначно селективным оно было лишь для пяти флуорогенов – **3.1.3**, **3.1.7a**, **3.1.6g**, **3.1.4d** и **3.1.6p** (Схема 41).

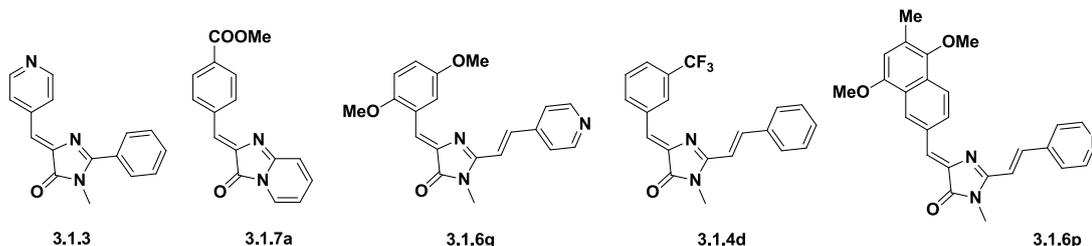


Схема 41. Флуорогены пригодные для селективного окрашивания ЭПР.

Эндоплазматический ретикулум - это клеточная мембранная структура, связанная с внешней ядерной мембраной. Как часть клеточной секреторной системы, ЭПР принимает участие в фолдировании белков и их посттрансляционной модификации, а также является местом, где происходит синтез фосфолипидов. ЭПР может подвергаться так называемому ЭПР-стрессу - дисбалансу количества синтезируемых белков, который может возникнуть в результате патологического состояния клетки (например, гипоксии, гипогликемии). В связи с этим, мечение ЭПР является важным при изучении различных клеточных патологий. Более того, даже сама структура ЭПР и многие особенности его работы в секреторных путях эукариотических клеток могут различаться у разных организмов и до конца не изучены, а потому до сих пор являются предметом фундаментальных исследований. Наиболее распространенные красители для эндоплазматического ретикулума - ER трекеры Red и Green (Invitrogen) - не являются флуорогенными красителями. Их структура содержит обычный флуоресцентный краситель и дополнительную часть, которая позволяет избирательно связываться со специфическими белками (рецепторами сульфонилмочевины) в мембране ЭПР. Таким образом, вариации в экспрессии этих белков или в типе клеток могут привести к некорректному мечению. Напротив, мечение мембранно-специфическими флуорогенными красителями может стать более универсальным методом окрашивания ЭПР из-за независимости от экспрессии конкретных белков.

Первым из выявленных нами соединений, селективных в отношении ЭПР, стало производное **3.1.3**. Добавление этого вещества в клеточную среду в концентрации 3-20 мкМ приводило к практически мгновенному появлению сигнала, ассоциированного с мембранами ЭПР. Данное окрашивание было протестировано на двух различных культурах клеток - HeLa

Kyoto и NIH 3T3. Селективность окрашивания была подтверждена сравнительными экспериментами с коммерчески доступным красителем ER-tracker Red (Схема 42).

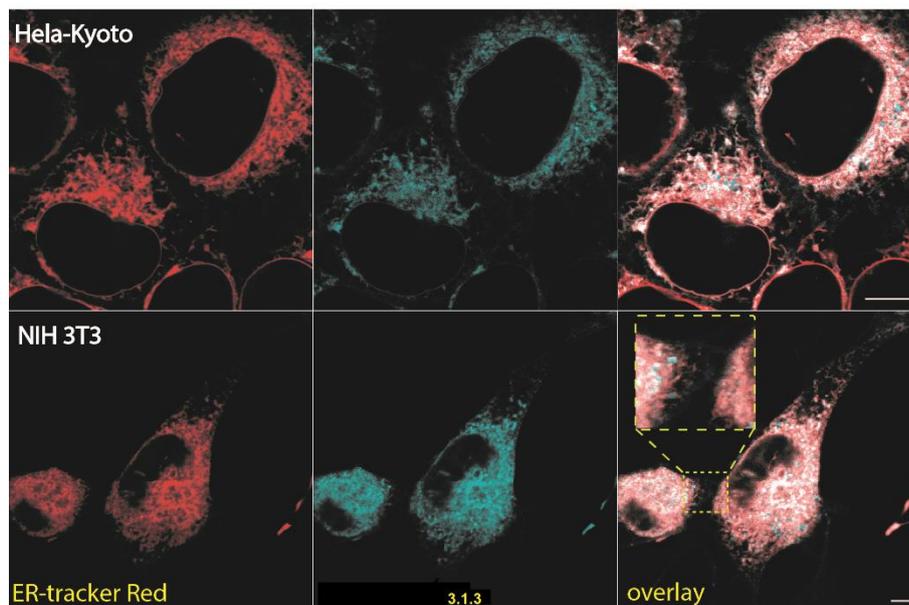


Схема 42. Конфокальная микроскопия клеток HeLa Kyoto и NIH 3T3, окрашенных флуорогеном 3.1.3 и ER-Tracker Red.

Важным потенциальным преимуществом флуорогенных красителей является фотостабильность вызываемого ими флуоресцентного сигнала. Высокая фотостабильность окрашивания в случае флуорогенов должна обеспечиваться за счет возможности обмена между свободным флуорогеном в растворе и флуорогеном, окрасившим целевой объект, что позволяет новым молекулам красителя все время поступать в целевой объект взамен фотообесцвеченных. Мы установили, что для производного 3.1.3 это явление отлично наблюдается. Сравнительное изучение клеток HeLa Kyoto, окрашенных этим флуорогеном, и клеток, трансфицированных локализованным в эндоплазматическом ретикулуме синим флуоресцентным белком BFP-KDEL, в условиях конфокальной флуоресцентной микроскопии выявило значительное различие в фотостабильности сигнала. Мы установили, что за то время, когда флуоресценция BFP падает более чем в пять раз, флуоресценция красителя 3.1.3 практически не изменяется

Ключевым же недостатком этого вещества стал весьма коротковолновый максимум поглощения, который предполагал использование в микроскопии фототоксичного возбуждающего облучения. Этому недостатка оказались лишены другие найденные нами флуорогены для ЭПР.

Следующими по хронологии обнаружения и изучения оказались производные 3.1.7a и 3.1.6g. Эти вещества хорошо и быстро окрашивали ЭПР самых разных клеточных линий менее чем через одну минуту после их добавления в клеточную среду (Схема 43).

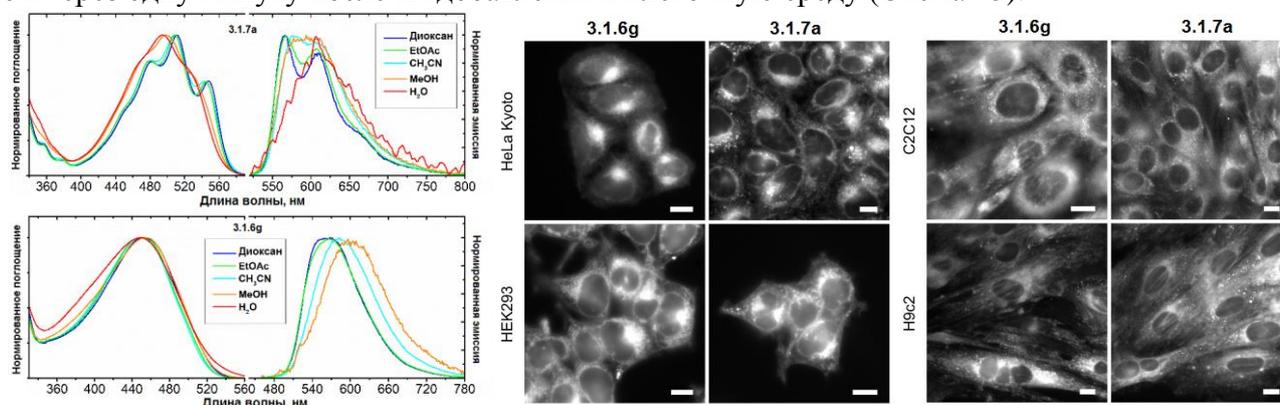


Схема 43. Спектры поглощения и флуоресценции производных 3.1.7a и 3.1.6g. Широкопольная флуоресцентная микроскопия клеток HeLa Kyoto, HEK293, C2C12 и H9c2 при добавлении 3.1.7a и 3.1.6g.

Спектры этих соединений находились в более длинноволновой области в сравнении с производным **3.1.3** и позволяли использовать в микроскопии менее фототоксичное возбуждающее излучение. Локализация окрашивания в ЭПР была подтверждена сравнением с коммерчески доступным красителем ER-tracker Red в условиях конфокальной флуоресцентной микроскопии. В этих же условиях мы также показали, что фотостабильность окрашивания предложенными красителями оказывается сопоставимой с фотостабильностью флуоресцентных белков

Еще одним красителем селективным по отношению к ЭПР, стало производное **3.1.4d**. Спектры этого производного также лежали в более длинноволновой области, чем у флуорогена **3.1.3**, однако находились в той же области, что и у производных **3.1.7a** и **3.1.6g**. Добавление его в клеточную среду также приводило к мгновенному появлению флуоресценции, ассоциированной со структурами ЭПР, что подтверждалось сравнением с коммерчески доступным красителем ER-tracker Red. Селективное окрашивание ЭПР было подтверждено на клетках HeLa Kyoto, CT26 и HEK293T (Схема 44).

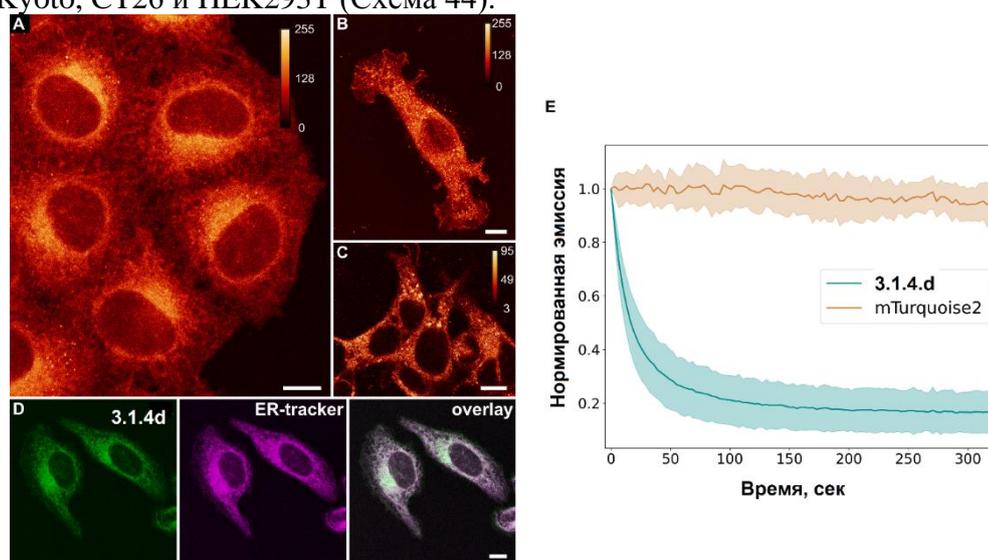


Схема 44. Широкопольная флуоресцентная микроскопия клеток HeLa Kyoto (A), CT26 (B) и HEK293T (C), окрашенных производным **3.1.4d**. (D) Сравнение с коммерчески доступным красителем ER-tracker Red. (E) Анализ фотостабильности в клетках HeLa Kyoto в сравнении с белком mTurquoise.

Последним производным в линейке выявленных красителей для ЭПР стало производное **3.1.6p**. Возможность использования этого вещества для мечения ЭПР была продемонстрирована в ряду различных клеточных линий - Hela Kyoto, 3T3 NiH и H9c2. Для подтверждения селективности также был использован коммерчески доступный краситель ER-tracker Red (Схема 45).

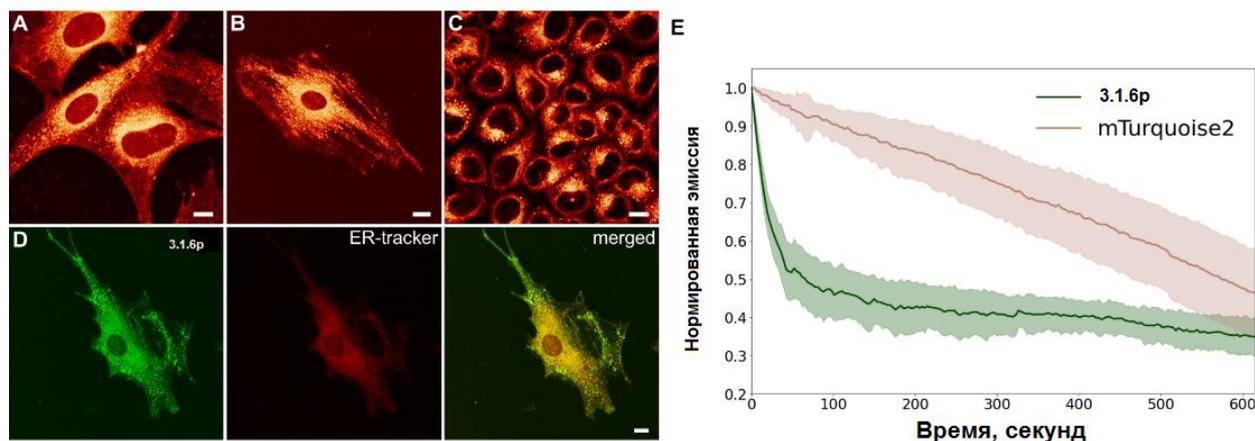


Схема 45. Конфокальная флуоресцентная микроскопия клеток, окрашенных флуорогеном **3.1.6p**. (A) фибробласты 3T3 NiH, (B) кардиомиобласты H9c2 и (C) HeLa Kyoto с добавлением 10 мкМ **3.1.6p** (добавлен из 1 мМ раствора в ДМСО). (D) Сравнение с коммерчески доступным

красителем *ER-tracker Red. (E)* Анализ фотостабильности в клетках *HeLa Kyoto* в сравнении с белком *mTurquoise2*.

Таким образом мы показали, что различные арилиден-имидазолы с выраженным варьированием квантового выхода флуоресценции в различных растворителях могут быть использованы для селективного флуоресцентного окрашивания эндоплазматического ретикулама различных живых клеток. Анализ структур выявленных селективных флуорогенов не позволил обнаружить закономерностей между строением и способностью селективно окрашивать ЭПР, что говорит о том, данное окрашивание возникает лишь при благоприятном сочетании определенной степени гидрофобности красителя и его способности увеличивать КВФ в неполярных и апротонных средах. В связи с этим дальнейший поиск аналогичных красителей целесообразно представляется проводить путем скрининга масштабных библиотек флуорогенов на живых клетках. При этом важной задачей остается создание веществ, характеризующихся более длинноволновым положением максимумов поглощения и эмиссии, так как весь набор созданных флуорогенов отличался спектрами поглощения, лежащими в области до 500 нм, и требовал для возбуждения флуоресценции относительно коротковолнового излучения.

Еще одним примером селективного окрашивания клеточных органелл в исследуемом наборе веществ стало производное **3.1.7e**, добавление которого в клеточную среду приводило к исключительному мечению митохондрий (Схема 46). Такое поведение оказалось не характерно более ни для одного из созданных веществ **3.1.1-7** и заслуживает отдельного рассмотрения.

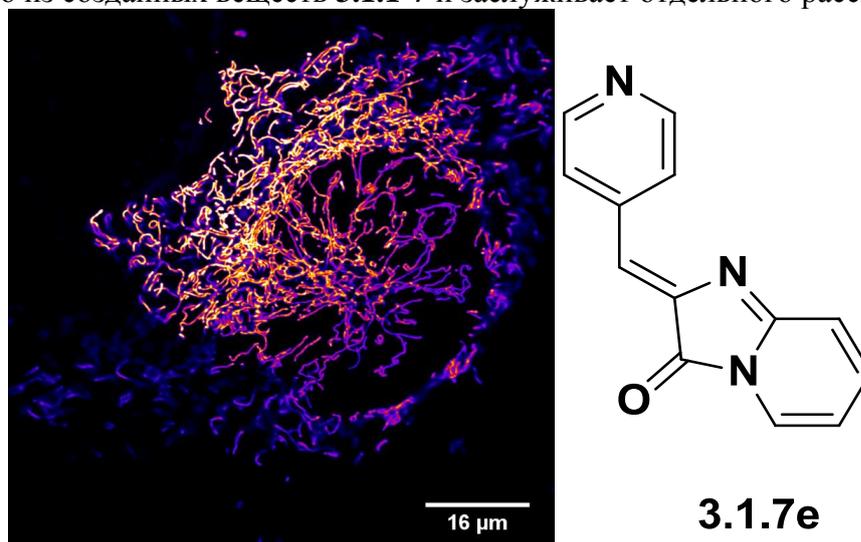


Схема 46. Конфокальная флуоресцентная микроскопия фибробластов *NIH 3T3* с добавлением 7 мкМ красителя **3.1.7e** и его структура.

Мы показали, что добавление **3.1.7e** приводит к селективному окрашиванию митохондрий, если его конечная концентрация оказывается в диапазоне 3-10 мкМ, причем окрашивание возникает менее чем через одну минуту после добавления. Это было подтверждено в ряду различных клеточных линий: *HeLa-Kyoto*, *HEK293*, *NIH 3T3* и *MIN6*. Селективность окрашивания была подтверждена совместной локализацией с метиловым эфиром тетраметилродамина (**TMRM**) или на клетках трансфицированных конструкцией **BFP-mito** (синий флуоресцентный белок с митохондриальной локализацией). Эти метки были выбраны, так как их можно наблюдать одновременно с **3.1.7e** в разных каналах микроскопа. При этом **TMRM** является одним из наиболее часто используемых потенциал-зависимых флуоресцентных красителей для митохондрий, а **BFP-mito** окрашивает митохондрии независимо от потенциала.

Митохондрии – это своего рода «энергетические станции» живых клеток, которые снабжают энергией многие метаболические пути. В зависимости от внутриклеточного положения в клетке митохондрии обладают разным мембранным потенциалом и, соответственно, проявляют разную метаболическую активность. Краситель **TMRM**, используемый для сравнения, обладает определенной степенью липофильности, что позволяет ему проникать в мембраны, но, что более важно, он заряжен. В связи с этим он в основном накапливается и флуоресцирует лишь в мембранах тех митохондрий, которые имеют более высокий мембранный потенциал (градиент протонов) и, следовательно, более высокую

дыхательную активность. Все это позволяет использовать **TMRM** для изучения этих процессов и сравнения активности отдельных митохондрий и клеток с помощью флуоресцентной микроскопии.

Совершенно иным был характер окрашивания митохондрий предложенным нами красителем **3.1.7e**. Добавление его в клеточную среду приводит к равномерному окрашиванию всех митохондрий, а значит, это окрашивание не зависит от их метаболического статуса.

Скорость окрашивания митохондрий красителем **3.1.7e** оказалась сравнима со скоростью окрашивания **TMRM**, однако это окрашивание не требовало дополнительной процедуры отмывки избытка красителя, поскольку флуороген **3.1.7e** не имеет флуоресценции в водной среде и не дает фонового сигнала. Кроме того, **3.1.7e** оказался чрезвычайно фотостабильным.

Единственным практическим недостатком использования **3.1.7e** в качестве красителя для митохондрий является высокая зависимость эффективности окрашивания от плотности (конфлюэнтности) клеток. Так, концентрация в 7-8 мкМ подходит только для конфлюэнтности, близкой к 70%. В тоже время меньшие значения конфлюэнтности требуют использования более низкой концентрации, поскольку избыток красителя может привести к нецелевому окрашиванию. В связи с этим для успешного окрашивания иногда требуется поэтапное добавление от 1 до 12 мкМ красителя до успешного результата. Кроме того, было обнаружено, что соединение **3.1.7e** стабильно в различных растворителях (включая воду и спирты) в нейтральных условиях при комнатной температуре (до нескольких дней), но разлагается в клеточной среде в течение 3-4 часов. Это затрудняет его использование в длительных экспериментах, хотя в целом химические красители и так редко используются для длительного флуоресцентного окрашивания, для которого обычно лучше подходят флуоресцентные белки.

Более подробное изучение сольваторомных свойств соединения **3.1.7e** показало, что оно, как и другие его аналоги, демонстрирует существенное различие между положениями максимумов поглощения и эмиссии в полярных и неполярных средах. Однако характер варьирования КВФ в разных растворителях для этого вещества оказался совершенно иным. Наиболее длинноволновые положения максимумов излучения **3.1.7e**, наблюдались в наиболее полярных и протонных растворителях (например, воде), тогда как КВФ был самым низким в этих случаях. Однако, в отличие от многих других производных **3.1.1-7**, самая высокая интенсивность флуоресценции производного **3.1.7e** наблюдалась в апротонных, но полярных средах (например, ацетонтрил, ДМСО, ДМФ, пиридин и т. п.). Такое неожиданное сольватохромное поведение производного **3.1.7e** в сочетании с его достаточной липофильностью ($\log P = 1,4$) вероятно и объясняют избирательное окрашивание высокополярных митохондриальных мембран, а отсутствие заряда (в отличие от **TMRM**) может объяснить равномерность этого окрашивания.

Таким образом, нами был создан новый флуорогенный краситель **3.1.7e**, пригодный для флуоресцентного окрашивания митохондрий живых клеток. Краситель характеризуется большим Стоксовым сдвигом, выраженной сольватохромностью и значительным варьированием квантового выхода флуоресценции в зависимости от растворителя. Уникальный характер этого варьирования в сочетании с определённой степенью липофильности производного **3.1.7e** делает его уникальным инструментом для флуоресцентного мечения митохондрий в живых клетках, что подтверждено рядом различных примеров. Сравнение с существующим коммерческим красителем **TMRM** показало, что окрашивание красителем **3.1.7e** является потенциал-независимым, что делает его уникальным инструментом для изучения митохондрий независимо от их метаболической активности.

3.2 Флуорогены для флуороген-активирующего белка FAST

За последние десять лет важной областью применения флуорогенных красителей стало их использование в паре с флуороген-активирующими белками (ФАБ). Таки белки стали отличной заменой флуоресцентным белкам (ФБ), используемым для генетически-кодируемого мечения живых систем. В отличие от флуоресцентных белков, флуороген-активирующие белки не имеют собственного хромофора и не флуоресцентны. Флуоресценция этих белков возникает при связывании с молекулой низкомолекулярного флуорогена, который также не флуоресцентен в свободном от белка виде (Схема 47).

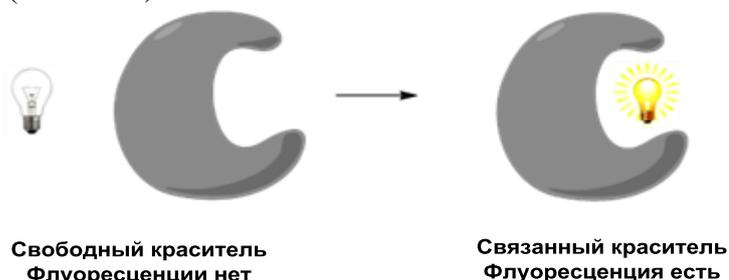


Схема 47. Принцип работы флуорогенных красителей.

Такой подход позволяет избежать множества недостатков, связанных с использованием классических флуоресцентных белков. Так, флуороген-активирующим белкам не требуется время и кислород для созревания. Их флуоресценция может быть индуцирована строго в необходимый момент добавлением флуорогена и может быть «выключена» при отмывании. Также цветовое разнообразие флуорогенов оказывается намного больше, так как их структура не ограничена строением природных аминокислот. Размер флуороген-активирующих белков зачастую меньше размера флуоресцентных белков, а фотостабильность пары ФАБ-флуороген оказывается заметно выше, так как после фоторазрушения молекула флуорогена может быть обменена с молекулой флуорогена из среды.

Одним из популярных ФАБ в последние годы стал так называемый белок FAST, (от англ. Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag). Данный белок был создан на основе фотоактивного желтого белка (РУР)-рецептора из *Halorhodospira halophila*. Предложенные для этого белка лиганды имеют небольшой размер, легко проникают через мембраны и характеризуются более чем 500-кратным увеличением интенсивности флуоресценции, происходящим при связывании. Более того, предложенный белок имеет очень небольшой размер – всего 14 кДа. Природным лигандом белка РУР является гидроксикоричная кислота, которая ковалентно связывается с остатком цистеина в кармане белка. Создатели белка FAST провели мутагенез РУР – они заменили цистеин на глицин и расширили карман связывания, за счет чего этот белок стал обратимо связывать флуорогены из семейства 4-гидрокси-арилиден-роданинов. Связывание этих веществ с карманом белка происходит в первую очередь за счет депротонирования фенольной группы с участием аминокислот E46 и Y42. С одной стороны, это обуславливает связывание за счет электростатических взаимодействий, а с другой, приводит к батохромному смещению максимумов поглощения и эмиссии флуорогена, что увеличивает контрастность со свободной, нейтральной формой флуорогена (эта особенность нашла свое отражение в названии белка – «absorption-Shifting Tag»).

Мы предположили, что различные 4-гидрокси-арилиден-имидазолы также могут выступать в роли флуорогенов для данного белка (Схема 48). Их преимущества относительно предложенных ранее роданинов очевидны – арилиден-имидазолы имеют больше мест для возможной структурной модификации и, как следствие, потенциально имеют гораздо большее цветовое разнообразие. В связи с этим, отдельным направлением наших работ стало создание новых флуорогенов для белка FAST на основе арилиден-имидазолов.

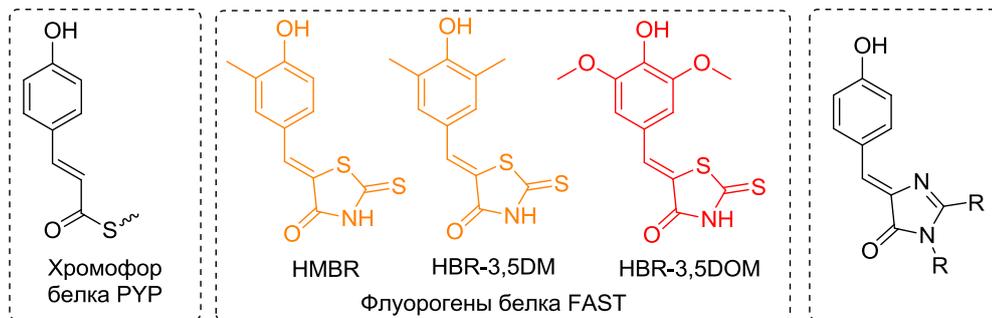


Схема 48. Исходный субстрат белка PYP, опубликованные ранее флуорогены белка FAST на основе роданинов и их аналогия с арилиден-имидазолонами.

За время проведения нами этих работ, авторами изначального белка FAST также было предложено множество новых флуорогенов. Помимо исходного **HMBR**, имеющего желтую флуоресценцию (изначально белок FAST даже назвался Y-FAST, от англ «Yellow»), авторами были созданы красные и дальнекрасные флуорогены. Однако проведенная нами работа показала, что созданные нами флуорогены не уступают по своим характеристикам роданиновым производным, а использование одного из наших флуорогенов даже позволило изучить структуру белка FAST и его комплексов, что стало основой для создания его уменьшенной версии.

Свою работу по созданию новых флуорогенов для белка FAST мы начали с масштабного скрининга имеющихся у нас 4-гидрокси-арилиден-имидазолонов. В этой работе были использованы упомянутые в прошлых разделах производные **1.1.7**, **1.2.2**, **1.4.6**, **1.4.2** и **1.4.8**. Также нами была создана дополнительная библиотека производных хромофора белка Каеде – соединений **3.2.1**. Попарное смешивание растворов, созданных нами флуорогенов с белком FAST, иммобилизованным на смоле TALON в многоруночных планшетах и последующая фиксация изображений с помощью флуоресцентной микроскопии позволила нам выявить соединения, которые проявляют выраженное увеличение флуоресценции при взаимодействии с белком. Среди всех веществ, вошедших в изначальную библиотеку, наибольшее увеличение флуоресценции наблюдалось для веществ **3.2.1e** и **3.2.1h** (Схема 49).

Более подробное их изучение на препаратах выделенного белка позволило определить константы связывания и оценить степень увеличения флуоресценции. Оказалось, что вещество с дибромфенольной группой хорошо связывается с белком, но имеет низкий квантовый выход флуоресценции в комплексе, а пиридиновое производное **3.2.1e** имеет очень высокую константу диссоциации, из-за чего нам даже не удалось оценить КВФ соответствующего комплекса (Таблица 11).

Таблица 11. Свойства комплексов веществ **3.2.1e** и **3.2.1h** с белком FAST.

	Макс. Поглощения, нм	Макс. Эмиссии, нм	КВФ, %	K_D , μM
3.2.1e	537	604	-	~ 50
3.2.1h	480	600	1.2	0.54

Положение максимумов поглощения и эмиссии этих комплексов соответствуют положению максимумов депротонированных форм соответствующих флуорогенов, что говорит о том, что также как и для роданиновых производных, связывание с белком FAST происходит за счет депротонирования фенольной группы и происходит в том же кармане связывания. Эти результаты подтверждают изначальную гипотезу о возможности использования арилиден-имидазолонов в качестве флуорогенов для белка FAST, однако говорят также о необходимости более тщательного подбора лиганда, так как выявленные характеристики не позволяют использовать эти два вещества во флуоресцентной микроскопии.

На следующем этапе работы мы провели синтез расширенной библиотеки лигандов, используя структуру имидазолонов **3.2.1e** и **3.2.1h** в качестве основы. Синтез такой библиотеки проводился по двум направлениям. В первой группе веществ мы сохранили стирольный заместитель и ввели в молекулу дополнительные группы в арилиденовом фрагменте (с сохранением 4-гидроксильной группы) – соединения **3.2.3** и **3.2.4**. Во второй мы сохранили

незамещенный 4-гидрокси арилиденовый фрагмент и расширили разнообразие заместителей в стирильном фрагменте – соединения **3.2.5** (Схема 49).

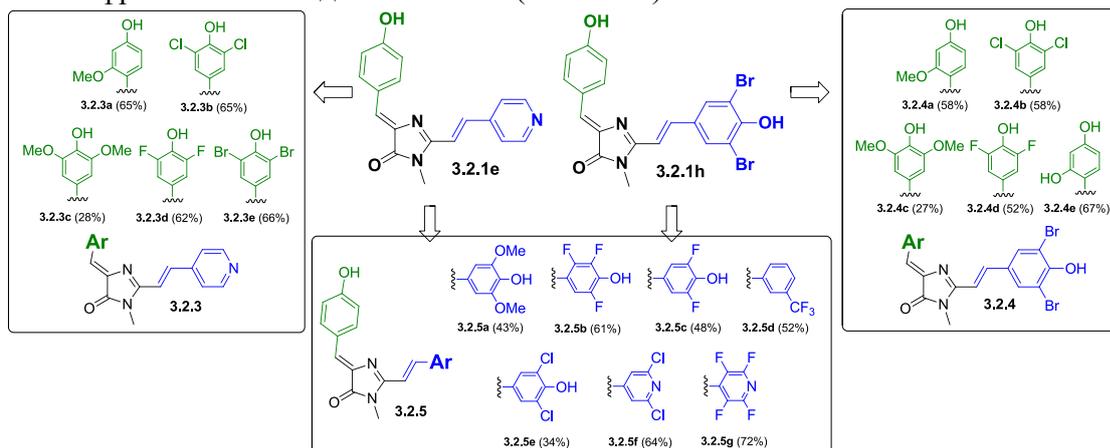


Схема 49. Синтез веществ **3.2.3-5**.

Скрининг полученной библиотеки с белком FAST, иммобилизованным на смоле TALON, показал, что при взаимодействии с белком FAST: для веществ **3.2.5**, **3.2.4c-e** и **3.2.3d** интенсивность флуоресценции увеличивается в 10-30 раз; для веществ **3.2.4b** и **3.2.3b** интенсивность флуоресценции увеличивается в 50-80 раз; для веществ **3.2.4a** и **3.2.3a** интенсивность флуоресценции увеличивается более чем в 200 раз.

Поскольку усиление флуоресценции и эффективное связывание *in vitro* не гарантирует пригодности флуорогена для микроскопии живых систем из-за возможности нецелевого окрашивания, плохой диффузии через мембраны и прочих проблем, на следующем этапе мы приступили непосредственно к экспериментам с живыми клетками. Мы обнаружили, что большинство идентифицированных веществ не смогли пометить ядра клеток, трансфецированных белком FAST в гистонах H2B. Очень слабый сигнал был виден для флуорогенов **3.2.1e**, **3.2.3b** и **3.2.3c**, тогда как заметный и яркий сигнал наблюдался только для соединения **3.2.3a**. Мы показали, что это вещество эффективно для флуоресцентного мечения клеток, временно трансфецированных различными конструкциями белка FAST (Схема 50).

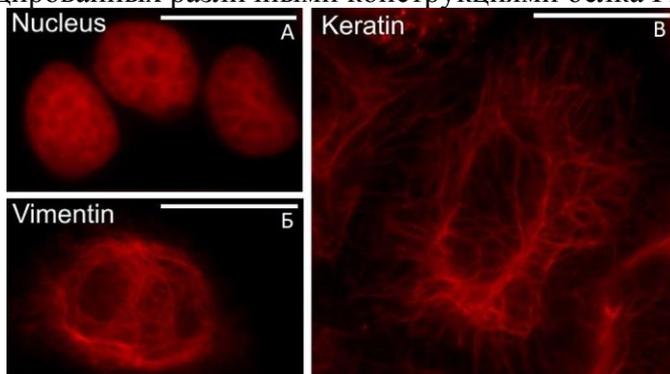


Схема 50. Широкопольная флуоресцентная микроскопия клеток HeLa Kyoto, временно трансфецированных различными конструкциями белка FAST с добавлением флуорогена **3.2.3a**.

Исследование оптических свойств флуорогена **3.2.3a** и его комплекса с белком FAST показало, что при взаимодействии с белком это вещество также подвергается депротонированию по фенольной группе. Практически одновременно с получением данных результатов, коллективом из Франции для белка FAST был предложен роданиновый флуороген **HBR-DOM**, содержащий две метокси группы в арилиденовом фрагменте (Схема 48).

Спектральные характеристики комплекса этого вещества с белком FAST оказались очень похожи на характеристики комплекса предложенного нами флуорогена **3.2.3a** (Таблица 12).

Таблица 12. Свойства комплексов флуорогенов **3.2.3a** и **HBR-DOM** с белком **FAST**.

	Макс. Поглощение, нм	Коэффициент молярного поглощения, $M^{-1}cm^{-1}$	Макс. Эмиссии, нм	КВФ, %	K_D , μM
HBR-DOM	520	39000	600	31	0.97
3.2.3a	562	23000	606	25	0.25

Несмотря на несколько меньший коэффициент молярного поглощения и КВФ, предложенный нами флуороген отличался несколькими ключевыми преимуществами. Во-первых, он обладал гораздо меньшей флуоресценцией в свободном виде, а во-вторых, мечение нашим флуорогеном оказалось гораздо более фотостабильно в условиях флуоресцентной микроскопии (Схема 51).

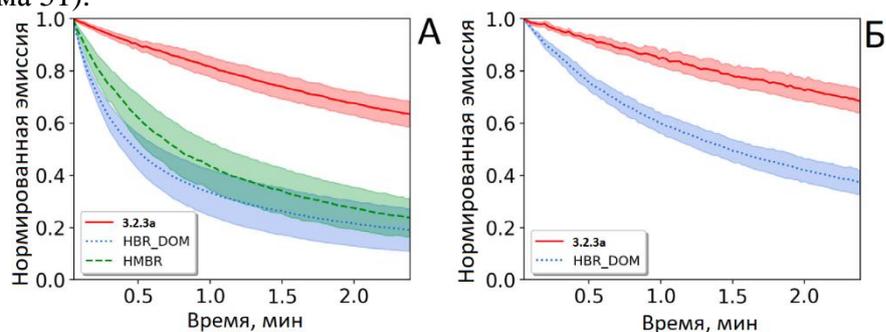


Схема 51. Кривые фотообесцвечивания флуоресцентного сигнала комплексов флуороген-белок в ядрах клеток линии HeLa Kyoto, полученные при облучении лазерами с длиной волны 488 нм (А) и 543 нм (Б).

Такая высокая фотостабильность вероятно объясняется возможностью обмена флуорогена в комплексе с белком со свободными молекулами в растворе. Именно эта возможность и является весомым преимуществом флуороген-активирующих белков относительно классических флуоресцентных белков. Если в молекуле ФБ происходит необратимое «выгорание» хромофора, то такая молекула белка более не может давать флуоресцентный сигнал в микроскопии. В случае же ФАБ «выгорание» флуорогена в кармане белка не всегда приводит к потере сигнала, так как разрушенная молекула может обмениваться на свободную молекулу из раствора. Безусловно, в некоторых случаях фотообесцвечивание сопровождается химическим взаимодействием флуорогена с аминокислотными остатками белка, что и объясняет определенную скорость фотообесцвечивания комплексов ФАБ-флуороген, однако именно для предложенного нами вещества **3.2.3a**, вероятность этих процессов оказалась заметно ниже, чем для роданиновых флуорогенов, что говорит о гораздо больших перспективах его прикладного использования.

Следующим этапом нашей работы стало расширения цветового разнообразия лигандов белка FAST на основе арилиден-имидазолонов (Схема 52). Исходя из полученных данных, можно предположить, что 2-метокси-4-гидрокси-арилиденный фрагмент является консервативным и его необходимо сохранять для эффективного связывания с белком. Поэтому мы сосредоточили свою работу на изменении заместителей во втором положении имидазолонового цикла.

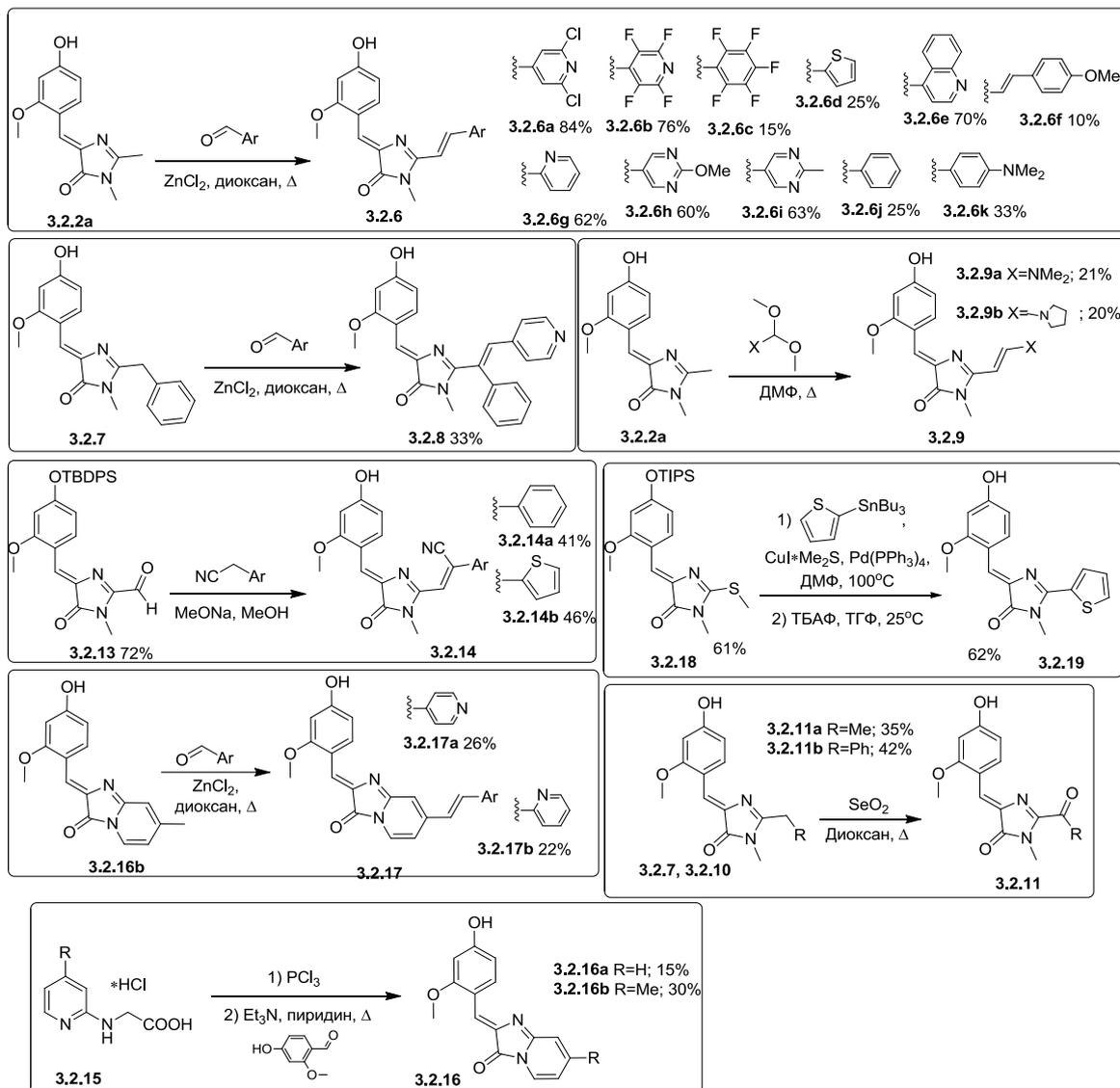


Схема 52. Синтез производных **3.2.6-19**.

В результате скрининга полученной библиотеки веществ мы установили, что все созданные вещества проявляют ту или иную степень увеличения флуоресценции при связывании с белком FAST. Однако в большинстве случаев интенсивность флуоресценции увеличивалась меньше чем в 50 раз. В частности, слабым увеличением флуоресценции характеризовались все енаминные **3.2.9** и кетонные производные **3.2.11**. Невысокой степенью увеличения флуоресценции также характеризовались производные с дополнительными заместителями при кратной связи (**3.2.8** и **3.2.14**) и производные **3.2.16**. Таким образом, в дальнейшую работу были вовлечены только стирольные производные **3.2.6** и **3.2.17**, а также производное **3.2.19**. Для всех этих веществ мы определили константы диссоциации и изучили оптические свойства образующихся комплексов (Таблица 13).

В результате нам удалось выявить целую серию новых эффективных флуорогенов для белка FAST с самой разной окраской. Для проведения дальнейших экспериментов на живых системах мы выбрали только те вещества, которые демонстрировали либо большую яркость (произведение коэффициента молярного поглощения на величину КВФ), чем производное **3.2.3a**, либо те, для которых комплексы с белком FAST характеризуются более длинноволновым положением максимумов эмиссии. Последние были отобраны, так как свет с большей длиной волны лучше проникает через живые ткани и является менее фототоксичным, что делает эти вещества более перспективными во флуоресцентной микроскопии живых систем.

Таблица 13. Свойства комплексов соединений 3.2.6, 3.2.16 и 3.2.17- с белком FAST (приведены в порядке увеличения длины волны).

	Макс. Поглощения, нм	Коэффициент молярного поглощения (ε), М ⁻¹ см ⁻¹	Макс. Эмиссии, нм	КВФ, %	К _D , μМ	Яркость (КВФ•ε)
3.2.19	512	101500	543	1.6	0.21	1600
3.2.6j	539	33000	570	26	0.44	8600
3.2.6d	549	34000	579	28	0.58	9500
3.2.6h	547	36000	582	15	0.44	5400
3.2.16b	570	65500	584	0.7	0.21	450
3.2.6f	525	22500	588	~5	0.86	~5400
3.2.6c	519	21000	590	~15	0.93	~3000
3.2.6g	552	47000	593	32	0.44	15000
3.2.6i	552	47000	595	14	0.16	6600
3.2.6k	549	41500	605	20	0.40	8300
3.2.3a	562	23000	606	25	0.25	5800
3.2.17b	617	40000	634	14	0.17	5600
3.2.17a	619	56000	636	18	0.14	10100
3.2.6e	533	21000	641	5,5	0.27	1200
3.2.6a	542	16500	644	29	0.16	5000
3.2.6b	542	15500	645	32	0.29	4800

Для сравнения этих веществ в условиях реального мечения живых систем были использованы клетки HeLa, трансфицированные конструкцией H2B-TagBFP2-FAST, содержащей помимо белка FAST, также синий флуоресцентный белок, флуоресценцию которого можно было использовать в качестве внутреннего референса. Также эксперимент на живых клетках позволил выявить производные, которые характеризовались заметным нецелевым окрашиванием – локализованным не в ядре.

В результате этой работы нами было определено три соединения, демонстрирующих яркий целевой сигнал и отсутствие нецелевого мечения – **3.2.6d**, **3.2.6g** и **3.2.17a**. Нам удалось продемонстрировать, что эти производные могут быть успешно использованы для мечения живых систем, причем каждое из них более эффективно для разных фильтров. Так, для вещества **3.2.6d** лучше всего подходил «оранжевый» фильтр TRITC, для веществ **3.2.6g** и **3.2.3a** лучше всего подходил «красный» фильтр mCherry, а для **3.2.17a** удавалось успешно использовать «дальнекрасный» фильтр Cy5 (Схема 53).

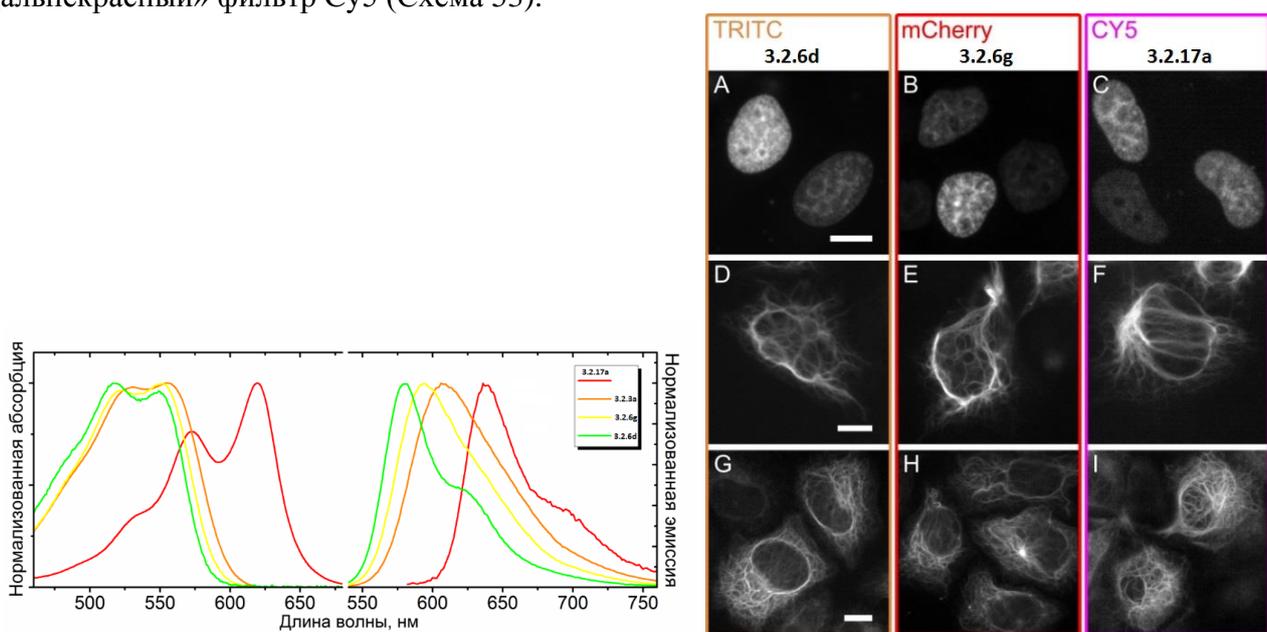


Схема 53. Спектры поглощения и эмиссии комплексов соединений 3.2.3a, 3.2.6d, 3.2.6g и 3.2.17a с белком FAST. Флуоресцентная микроскопия клеток HeLa, с различной локализацией

белка FAST: гистон H2B (A, B, C), виментин (D, E, F) и цитокератин (G, H, I) с флуорогенами **3.2.6d**, **3.2.6g** и **3.2.17a**.

Почти полностью покрыть палитру цветов видимого спектра нам удалось с привлечением флуорогена **3.2.20b**. Найти данное вещество нам удалось случайно, в ходе изучения производных, содержащих во втором положении имидазолонового цикла трифторметильную группу (Схема 54).

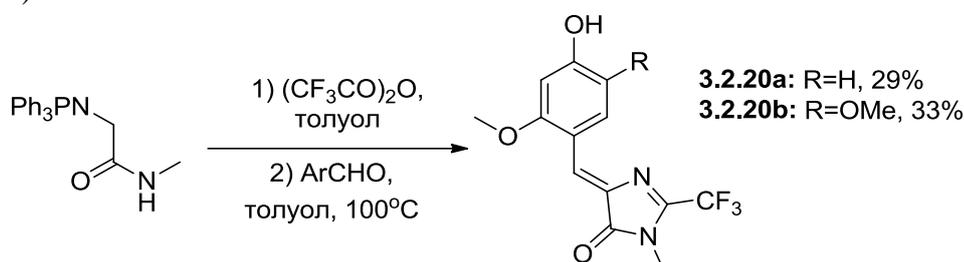


Схема 54. Синтез производных **3.2.20**.

Флуороген **3.2.20b** идеально дополнил палитру созданных нами флуорогенов, так как отлично подходило к «зеленому» фильтру флуоресцентных микроскопов. По положению максимумов поглощения и эмиссии комплекса с белком FAST это вещество было очень похоже на предложенный ранее роданиновый флуороген **HMBR**, однако в отличие от него оно характеризовалось гораздо большей яркостью комплекса из-за значительного коэффициента молярного поглощения (Таблица 14).

Таблица 14. Свойства комплексов соединений **3.2.20b** и **HMBR** с белком FAST.

	Макс. Поглощения, нм	Коэффициент молярного поглощения (ϵ), $M^{-1}cm^{-1}$	Макс. Эмиссии, нм	КВФ, %	K_D , μM	Яркость (КВФ $\cdot\epsilon$)
3.2.20b	523	91500	538	21	0.52	19200
HMBR	483	45000	540	33	0.13	14850

Мы также показали, что флуороген **3.2.20b** эффективен для флуорогенного мечения клеток, трансфицированных различными слияниями FAST - яркий и контрастный сигнал наблюдался в различных субклеточных локализациях без неспецифического окрашивания (Схема 54).

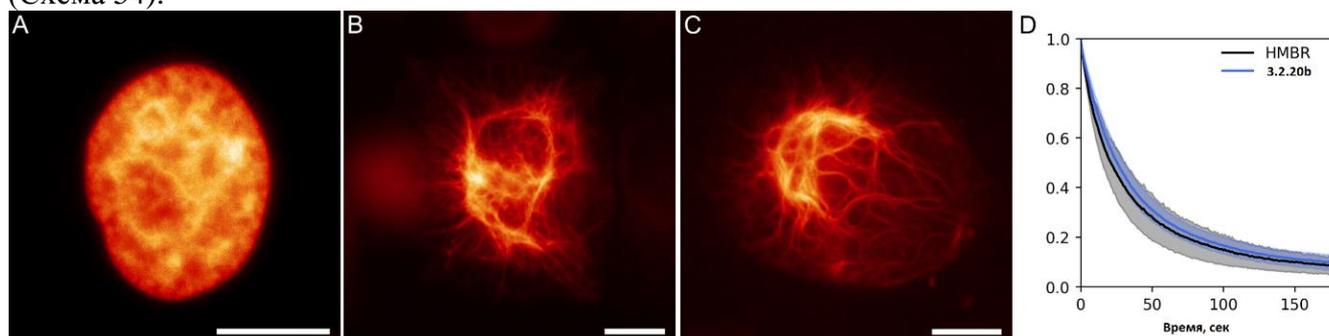


Схема 54. Мечение живых клеток с помощью белка FAST в паре с флуорогенами **3.2.20b** и **HMBR**. Широкопольная флуоресцентная микроскопия клеток HeLa Kyoto, временно трансфицированных слияниями FAST H2B (A), цитокератина (B), виментина (C); (D) сравнение кривых фотообесцвечивания комплексов FAST с **3.2.20b** и **HMBR** (концентрация 5 μM) при одинаковых условиях визуализации (область 885,7 μm^2 , сканированная лазером 31,8 мкВт 488 нм).

Фотостабильность комплекса **3.2.20b** с белком FAST оказалась сопоставима со стабильностью комплекса флуорогена **HMBR**, однако сравнительная яркость в условиях реальной микроскопии оказалась почти в полтора раза выше, что говорит о большей перспективности его использования.

Таким образом, в ходе проведенной работы нами была создана целая линейка флуорогенов для белка FAST на основе арилиден-имидазолонов с различной окраской. Созданные нами флуорогены покрывают диапазон от зеленого до дальнекрасного. Они не уступают ранее

предложенным флуорогенам из семейства роданинов по своим оптическим характеристикам, и более того, зачастую демонстрируют гораздо большую фотостабильность, что делает их более перспективными для прикладного использования.

На следующем этапе работ мы решили изучить структуру белка FAST в свободном виде и в комплексе с флуорогенами.

В течение многих месяцев наши коллеги из МФТИ (коллектив Валентина Борщевского) пытались кристаллизовать белок FAST как в присутствии различных лигандов (HMBR, **3.2.3a** и др.), так и без них, и в самых разных условиях кристаллизации. В ходе этих работ коллегам несколько раз удавалось получить хорошие кристаллы и разрешить их структуру с помощью РСА. Однако мы с удивлением обнаружили, что во всех этих случаях, белок принимал димерную форму без лиганда. Причем в этом димере происходило заметное взаимодействие фрагментов двух белковых молекул друг с другом – фрагменты A30-L33, I39-N43 и T50-R52 переплетались с соответствующими элементами симметричной молекулы, образуя вместе один большой двенадцатинитевой β -лист.

В связи с этим дальнейшая работа была сосредоточена на изучении структуры методом ЯМР. Для этого нашими коллегами из Лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии (ИБХ РАН) был получен образец изотопно-меченного белка, после чего методами ЯМР был изучен комплекс белка с флуорогеном **3.2.3a** и его свободная форма. В отличие от данных рентгеновского исследования обе формы белка присутствовали в растворе исключительно в мономерной форме. В комплексе с флуорогеном белок FAST образует 5-нитевой β -лист, а также имеет пять α -спиралей, при этом лиганд помещается внутри гидрофобной полости и стабилизирован тремя водородными связями. Подобно остатку 4-гидроксикоричной кислоты в исходном белке РУР, кислород фенольного кольца флуорогена **3.2.3a** дает водородную связь с аминокислотным остатком E46 и более удаленный полярный контакт с фенольной группой аминокислоты Y42. Кроме того, карбонильная группа имидазольного фрагмента флуорогена образует водородную связь с NH группой триптофана W94. Кроме того, связыванию лиганда способствует взаимодействие с гидрофобными аминокислотными остатками I31, T50, V66, A67, P68, T70, I96, P97, V107 и V122 и π -стэкинг с кольцами аминокислот F62 и F75. Молекула лиганда больше, чем полость белка и его стирольно-пиридиновый фрагмент частично выходит наружу, хотя при этом он также может взаимодействовать с более отдаленной аминокислотой - аргинином R52 (Схема 55).

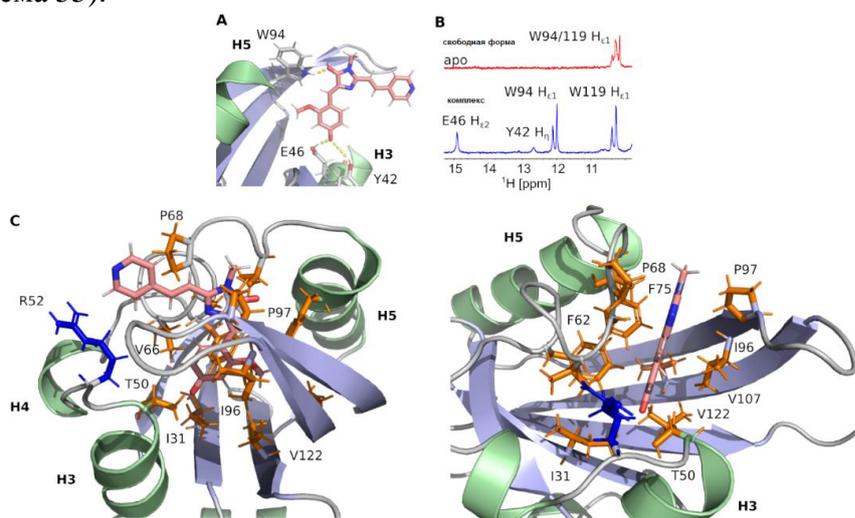


Схема 55. Детализованное взаимодействие флуорогена **3.2.3a** с белком FAST. А - водородные связи, участвующие в связывании флуорогена. Б – фрагмент ЯМР спектров 1H белка FAST в свободной форме (красный) и в комплексе с **3.2.3a** (синий). С - взаимодействия, обнаруженные в составе комплекса FAST:**3.2.3a**. Боковые цепи гидрофобных остатков окрашены в оранжевый цвет, положительно заряженный аргинин R52 показан синим цветом.

Выявленные взаимодействия флуорогена с белком FAST хорошо коррелируют со всеми ранее полученными данными, а именно объясняют необходимость присутствия фенольной группы в четвертом положении арилиденового фрагмента и объясняют ее депротонирование,

они также объясняют необходимость присутствия карбонильного фрагмента или его аналога, а также объясняют возможность варьирования заместителей во втором положении имидазольного цикла, так как этот фрагмент находится вне полости белка. Дальнейший анализ ЯМР спектров выявил серьезные различия в строении свободного белка и его комплекса. Оказалось, что в свободной форме белок гораздо менее упорядочен, чем в комплексе с флуорогеном **3.2.3a** (Схема 56).

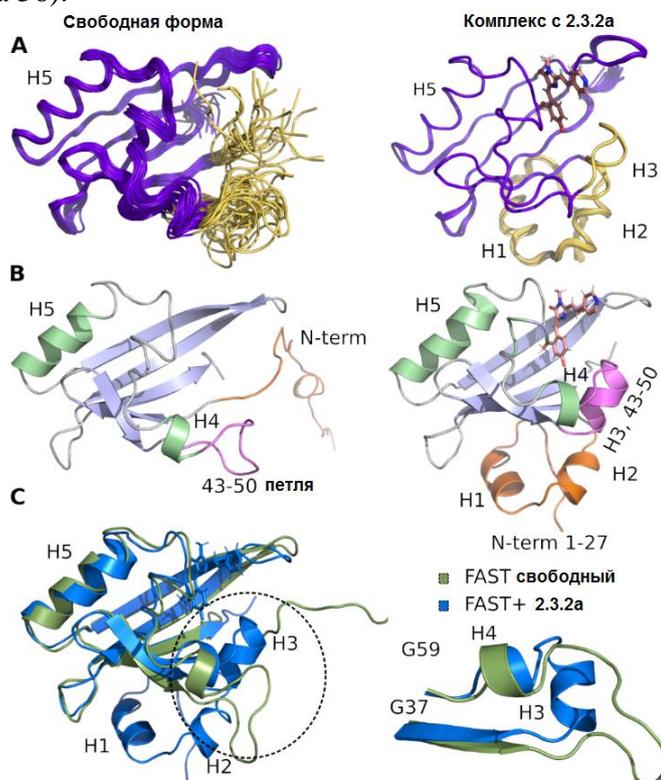


Схема 56. Трехмерная структура белка FAST в свободной форме (A, B слева, суперпозиция на C) и в комплексе с флуорогеном **3.2.3a** (A, B справа, суперпозиция на C). A - 20 лучших структур ЯМР, наложенных на атомы основной цепи элементов вторичной структуры. N-конец и область 43-50, которые изменяют структуру при связывании лиганда, выделены цветом слоновой кости. B – основные элементы структуры: α-спирали показаны зеленым цветом, а β-тяжи показаны синим цветом. N-конец и область 43-50 выделены оранжевым и пурпурным соответственно. C - структуры свободного белка (зеленый) и комплекса (синий), наложенные на атомы основной цепи β-тяжей и спирали H5.

Было установлено, вся N-концевая часть, включающая спирали H1 и H2, в свободном белке оказалась полностью разупорядоченной. Связывание лиганда с FAST индуцирует образование спирали H3 и стабилизирует N-концевые остатки. Очевидно, что связывание флуорогенов с белком FAST начинается до структуризации N-концевого фрагмента, а значит связывание может происходить и в его отсутствии, а укороченный FAST может сохранять флуороген-активирующие свойства.

В связи с этим, на следующем этапе работ нами был создан укороченный вариант белка FAST, усеченный до 26-го аминокислотного остатка с N-концевой части. Полученный мутант содержал всего 99 аминокислот и был назван нами nanoFAST. Мы обнаружили, что такой белок не активен в отношении таких известных флуорогенов как **HMBR**, **HBR-DOM**, **3.2.3a** и других. Вероятно, это связано с тем, что белковый карман в свободной форме белка FAST немного увеличен, а значит, карман nanoFAST также должен быть больше, чем в исходном FAST. Для того чтобы выявить потенциальные флуорогены для белка nanoFAST, нами был проведен синтез библиотеки флуорогенов с большим числом или размером заместителей в арилиденовом фрагменте (Схема 57). Скрининг этой библиотеки показал, что введение дополнительных объемных заместителей действительно позволяет восстановить связывание лиганда с белком. Он оказался наиболее эффективным в случае 2,5 дизамещенных веществ, особенно 2,5 диметокси-роданина - соединения **HBR-DOM2**. Интенсивность флуоресценции этого вещества

увеличивалась более чем в сто раз при взаимодействии с белком nanoFAST. Квантовый выход флуоресценции комплекса достиг 55%, а константа связывания оказалась близкой к 1 мкМ, что аналогично характеристике ранее полученных пар с FAST (Таблица 15).

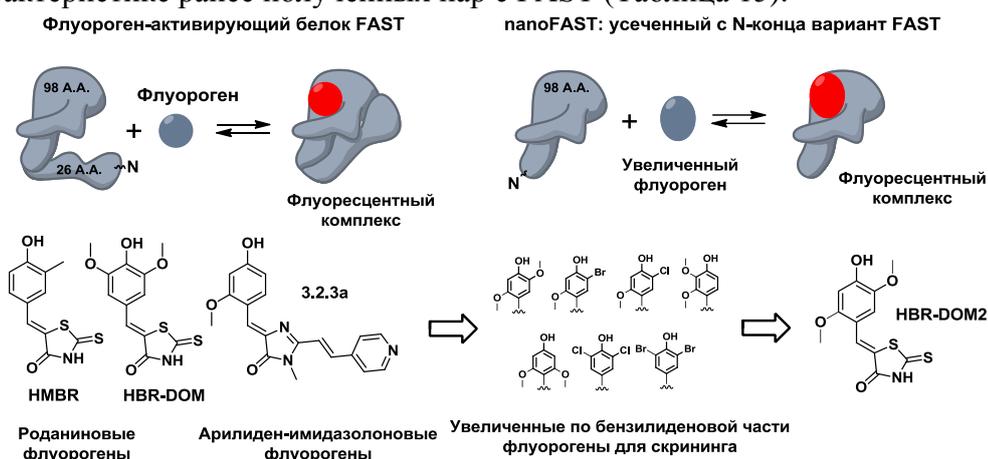


Схема 57. Принцип работы белка FAST, выявленный по ЯМР, создание белка nanoFAST и поиск его флуорогенов.

Таблица 15. Свойства комплексов ряда соединений с белками FAST и nanoFAST.

	Макс. Поглощение, нм	Коэффициент молярного поглощения (ϵ), $M^{-1}cm^{-1}$	Макс. Эмиссии, нм	КВФ, %	K_D , μM	Яркость (КВФ $\cdot\epsilon$)
FAST: 3.2.3a	562	23000	606	25	0.25	5800
FAST: HMBR	483	45000	540	33	0.13	14850
FAST: HBR-DOM	520	39000	600	31	0.97	12000
FAST: HBR-DOM2	510	30500	566	54	0.021	16500
Nano FAST: HBR-DOM2	502	25500	563	56	0.85	14300

Спектры поглощения и эмиссии комплекса **HBR-DOM2** с белком nanoFAST лежали между спектрами комплексов белка FAST с флуорогенами **3.2.3a** и **HMBR**, причем изменения в спектрах, происходящие при связывании **HBR-DOM2** с FAST и nanoFAST, также говорили о депротонировании его фенольной части.

На следующем этапе мы показали, что данная пара может быть успешно использована для мечения живых систем. Флуоресцентный сигнал полученного комплекса оказался достаточно фотостабильным. Мы сравнили его с флуоресцентным белком mNeonGreen, который имеет аналогичный спектр поглощения, и показали, что их кривые фотообесцвечивания ведут себя аналогичным образом. Мы также подтвердили, что связывание нашего флуорогена с белком nanoFAST нековалентно и, при необходимости, его можно легко вымыть из клеточной среды (Схема 58).

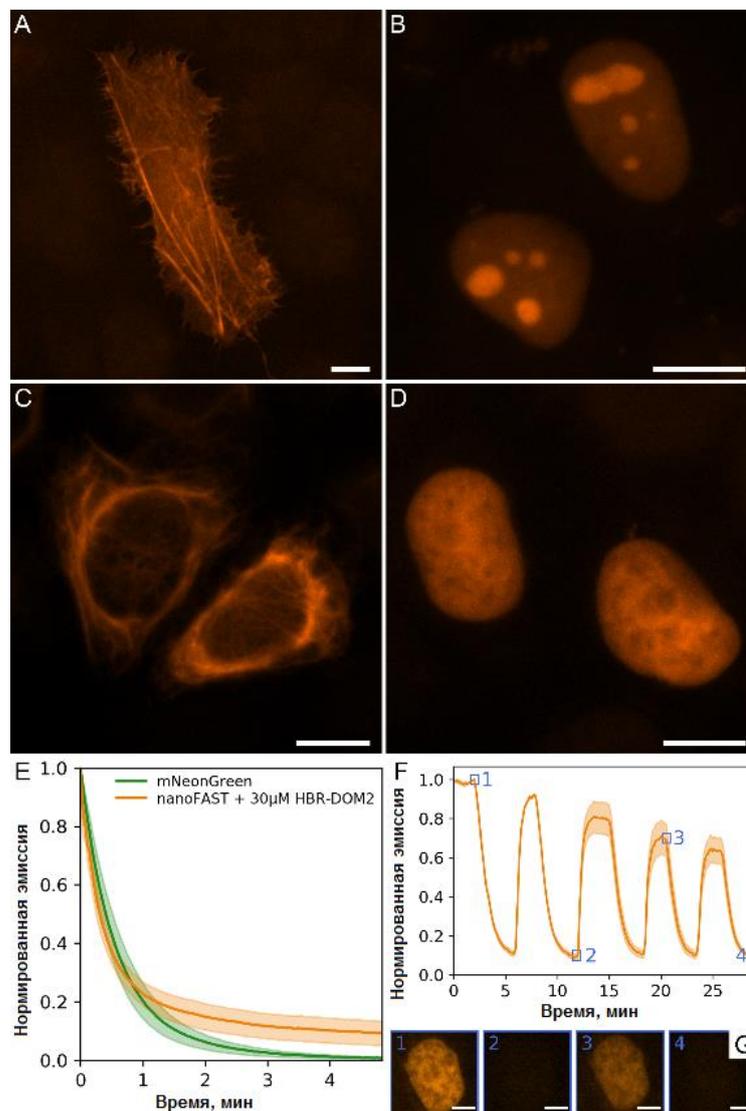


Схема 58. Флуоресцентная микроскопия живых клеток *HeLa*, временно трансфицированных (A) *lfeact-nanoFAST*, (B) *3xNLS-nanoFAST*, (C) *виментин-nanoFAST* и (D) конструкции *H2B-nanoFAST* в присутствии 5 мкМ **HBR-DOM2**. (E) Фотообесцвечивание комплекса *nanoFAST* с флуорогеном **HBR-DOM2** по сравнению с белком *mNeonGreen* в условиях конфокальной микроскопии. (F) Последовательное окрашивание и вымывание живых клеток *HeLa*, временно трансфицированных конструкцией *H2B-nanoFAST*.

Таким образом, в результате этой работы мы впервые установили структуру белка FAST в свободном виде и в комплексе с флуорогеном. Наши данные показывают, что структурная организация FAST близка к структуре родительского фотоактивного белка PYP, при этом апо-состояние FAST соответствует индуцированной светом форме PYP, а связанное с лигандом состояние соответствует основной конформации белка. Основной особенностью поведения белка FAST является значительная перестройка и организация его N-конца при связывании с флуорогеном. Исходя из этого, мы предположили, что удаление этой части белка можно проводить без потери флуороген-активирующих свойств. Мы сократили белок FAST на 26 аминокислотных остатков и нашли подходящий лиганд для полученного таким образом белка *nanoFAST*. Затем мы показали, что данная пара может быть успешно использована во флуоресцентной микроскопии. В результате можно сказать, что нами была успешно создана самая короткая генетически-кодируемая метка (по состоянию на конец 2021 года) на основе флуороген-активирующего белка, содержащая всего 98 аминокислотных остатков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование посвящено такому классу гетероциклических производных как 4-арилиден-1H-имидазол-5(4H)-оны (арилиден-имидазолы). Одним из типичных и наиболее известных примеров подобных структур являются хромофоры флуоресцентных белков, в составе которых арилиден-имидазолы обуславливают наличие окраски и флуоресценции. Арилиден-имидазолы имеют небольшой размер, интенсивную и разнообразную окраску, а также зачастую нетоксичны. В связи с этим, такие вещества являются отличными претендентами на роль новых флуорогенов или флуорофоров для живых систем.

В результате проведенного исследования предложена серия новых методов синтеза и модификации арилиден-имидазолонов. С использованием предложенных подходов создано множество новых веществ, в том числе отличающихся длинноволновым положением максимумов поглощения и эмиссии. Также показана возможность участия арилиден-имидазолонов в реакциях циклоприсоединения с образованием спироциклических производных.

В ходе выполнения работы создана серия арилиден-имидазолонов с внутренним фиксирующим мостиком, в результате чего показано ключевое влияние подвижности арилиденового фрагмента на возможность безызлучательного сброса энергии возбуждения. Введение подобного мостика позволило создать ряд новых высокофлуоресцентных соединений. Установлено, что введение различных заместителей, а также увеличение размера системы сопряженных связей арилиден-имидазолонов с фиксирующим мостиком позволяют варьировать свойства создаваемых соединений, в частности сместить максимумы поглощения и эмиссии в длинноволновую область, создавать фотокислотные производные или производные чувствительные к pH и иным свойствам среды.

Анализ взаимосвязи между строением и свойствами созданных арилиден-имидазолонов позволил автору впервые предложить серию арилиден-имидазолонов, характеризующихся выраженным сольватохромным варьированием квантового выхода флуоресценции. Такие арилиден-имидазолы были успешно использованы для селективного флуоресцентного окрашивания эндоплазматического ретикулума и митохондрий живых клеток. Предложенный краситель для митохондрий является уникальным в своем роде, так как позволяет окрашивать митохондрии равномерно вне зависимости от их метаболического статуса, что невозможно при использовании существующих маркеров. Также в данной работе показана возможность использования арилиден-имидазолонов в роли флуорогенов в паре с флуороген-активирующим белком FAST для генетически-кодируемого мечения живых систем. Выявление таких флуорогенов позволило впервые расшифровать структуру этого белка, как в свободном виде, так и в комплексе с флуорогеном, а также предложить новый усеченный вариант этого флуороген-активирующего белка. Данный вариант белка получил название nanoFAST и в паре с флуорогеном HBR-DOM2 по состоянию на конец 2021 года является самой короткой генетически-кодируемой меткой для живых систем, содержащей всего 98 аминокислот.

Очевидно, что проведенная работа может стать основой для проведения многих дальнейших исследований. В частности, перспективным представляется дальнейшее изучение реакций циклоприсоединения арилиден-имидазолонов, поскольку эти реакции могут стать уникальным подходом к созданию новых биологически-активных производных с жёсткой структурой. Среди таких реакций особенно интересно использование нового класса донорно-акцепторных циклопропанов, созданных на

основе арилиден-имидазолонов, так как такие ДАЦ являются уникальными в своем роде в силу простоты активации.

Не менее перспективным представляется дальнейшее использование арилиден-имидазолонов с внутренним фиксирующим мостиком в роли флуорофоров для живых систем. Разработанный в настоящей диссертации подход к введению функциональных групп в молекулы этих и других флуоресцентных красителей поможет создавать производные, которые могут быть ковалентно связаны с различными биологическими мишенями. Разработанные в диссертации подходы по модификации арилиден-имидазолонов позволяют создавать производные с самой разной окраской и иными свойствами, необходимыми для решения самых разных задач во флуоресцентном мечении живых систем.

Выявленные автором закономерности между строением и свойствами арилиден-имидазолонов с сольватохромным варьированием квантового выхода флуоресценции позволяют говорить о перспективе создания новых флуорогенов, пригодных для селективного окрашивания отдельных органелл живых клеток. В частности, важным направлением является создание веществ, характеризующихся более длинноволновым положением максимумов поглощения и эмиссии, которые в перспективе могут быть использованы для окрашивания не только клеточных линий, но и целых живых организмов.

Еще больший интерес представляют собой результаты по использованию арилиден-имидазолонов для генетически-кодируемого мечения в паре с белком FAST и его усеченной версией nanoFAST. Созданные библиотеки флуорогенов, активируемых этими белками, могут быть использованы при поиске более эффективных пар на основе мутантных форм этих белков, а также для создания иных систем мечения, в частности, создания “расщепленных” (“split”) белков, пригодных для изучения белок-белкового взаимодействия, а также круговых пермутантов для создания сенсорных систем, или же поиска пар белок-флуороген с различными временами жизни флуоресценции для использования во времяразрешенной (FLIM) микроскопии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Обзоры

1) Baleeva N.S., **Baranov M.S.** Synthesis and properties of 5-methylidene-3,5-dihydro-4H-imidazole-4-ones (microreview) // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2016. Т. 52. № 7. С. 444–446.

2) Nizovtsev A.V., **Baranov M.S.** Synthesis of 6H-1,2-oxazin-6-ones (microreview) // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2020. Т. 56 № 10. С. 1280–1282.

Статьи

1) Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Mikhaylov A.A., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Mishin A.S., **Baranov M.S.** Environment-sensitive fluorogens based on a GFP chromophore structural motif // *Dyes and Pigments.* 2022. Т. 198. С. 110033.

2) Myasnyanko I.N., Baleeva N.S., **Baranov M.S.** Study of the position of the conjugated substitute influence on the optical properties if the Kaede protein chromophorus derivatives // *Russ J Bioorg Chem.* 2022. Т. 48. № 3. С. 110-113.

3) Boulanger S.A., Chen C., Myasnyanko I.N., Sokolov A.I., **Baranov M.S.**, Fang C. Excited State Dynamics of a meta-Dimethylamino Locked GFP Chromophore as a Fluorescence Turn-on Water Sensor // *Photochem. Photobiol.* 2022. Т. 98 №2. С. 311-324

4) Myasnyanko I.N., Sycheva M.A., Gavrikov A.S., Baleeva N.S., **Baranov M.S.** Conformationally Locked 5-Benzylidene-4H-Imidazolthion as a Fluorogenic Dye // *Russ J Bioorg Chem.* 2021. Т. 47. № 6. С. 1362-1365.

5) Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., **Baranov M.S.** A Thiophene Analog of the GFP Chromophore As Fluorogen for FAST Protein // *Russ J Bioorg Chem.* 2021. Т. 47. № 5. С. 1118-1121.

6) Sokolov A.I., Myasnyanko I.N., Baleeva N. S., **Baranov M.S.** Styrene Derivatives of Indole and Pyranone as Fluorogenic Substrates for FAST Protein // *Russ J Bioorg Chem.* 2021. Т. 47. № 1. С. 316-319.

7) Boulanger S.A., Chen C., Tang L., Zhu L., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., **Baranov M.S.**, Fang C. Shedding light on ultrafast ring-twisting pathways of halogenated GFP chromophores from the excited to ground state // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2021. № 23. С. 14636-14648.

8) Nizovtsev A.V., Sokolov A.I., Smirnov A.Y., Mikhaylov A.A., Myasnyanko I.N., Belozeroва O.A., Baleeva N.S., Usmanova L., **Baranov M.S.** O-Alkylation Redirected Condensation of 5-Hydroxy-1,2-oxazine-6-ones with Primary Amines for Synthesis of 5-Hydroxyiminopyridine-2,6(1H,3H)-diones // *ChemistrySelect.* 2021. № 6. С. 8938-8941.

9) Mineev K.S., Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Povarova N.V., Sokolov A.I., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Ruchkin D.A., Bukhdruker S., Remeeva A., Mishin A., Borshchevskiy V., Gordeliy V., Arseniev A.S., Gorbachev D.A., Gavrikov A.S., Mishin A.S., **Baranov M.S.** NanoFAST: structure-based design of a small fluorogen-activating protein with only 98 amino acids // *Chem. Sci.* 2021. № 12. С. 6719-6725.

10) Chen C., Boulanger S.A., Sokolov A.I., **Baranov M.S.**, Fang C. A Novel Dialkylamino GFP Chromophore as an Environment-Polarity Sensor Reveals the Role of Twisted Intramolecular Charge Transfer // *Chemosensors.* 2021. Т. 9. №8. С. 234-251.

11) Chen C., Tachibana S.R., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Bogdanov A.M., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Malyshevskaya K.K., **Baranov M.S.**, Fang C. Developing Bright Green Fluorescent Protein (GFP)-like Fluorogens for Live-Cell Imaging with Nonpolar Protein–Chromophore Interactions // *Chem. Eur. J.* 2021. № 27. С. 8946-8950.

- 12) 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.** Color Tuning of Fluorogens for FAST Fluorogen-Activating Protein// *Chem. Eur. J.* 2021. № 27. C. 3986-3990.
- 13) Ikonnikova V.A., Zhigileva E.A., Kuleshov A.V., Shirokova V.V., **Baranov M.S.**, Mikhaylov A.A. Nucleophilic ring opening of imidazolone activated donor–acceptor cyclopropanes with alcohols // *Mendeleev Commun.* 2021. № 31. C. 657-658.
- 14) Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Mishin A.S., **Baranov M.S.** Synthesis and Optical Properties of the New Acetylene Kaede Chromophore Analog // *Russ J Bioorg Chem.* 2020. T. 46. № 3. C. 458–461.
- 15) Sokolov A.I., Myasnyanko I.N., Baleeva N.S., **Baranov M.S.** Convenient and Versatile Synthetic Protocol for Arylidene-1H-imidazol-5(4H)-ones // *ChemistrySelect.* 2020. T. 5. C. 7000 –7003.
- 16) Baleeva N.S. Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., **Baranov M.S.** Synthesis and Optical Properties of the Conformationally Locked Indole and Indoline Derivatives of the GFP Chromophore // *Russ J Bioorg Chem.* 2020. T. 46. №. 5. C. 862–865.
- 17) 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. T. 56. № 3. C. 399–402.
- 18) Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Ivanov I.A., Mineev K.S., **Baranov M.S.** Synthesis of 5-(aminomethylidene)imidazol-4-ones by using N,N-dialkylformamide acetals // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2020. T. 56. № 8. C. 1097–1099.
- 19) Mikhaylov A.A., Solyev P.N., Kuleshov A.V., Kublitskii V.S., Korlyukov A.A., Lushpa V.A., **Baranov M.S.** Imidazolone-activated donor-acceptor cyclopropanes with a peripheral stereocenter. A study on stereoselectivity of cycloaddition with aldehydes // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2020. T. 56. № 8. C. 1092–1096.
- 20) 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 // *Dyes and Pigments.* 2020. T. 177. C. 108258.
- 21) Mikhaylov A.A., Kuleshov A.V., Solyev P.N., Korlyukov A.A., Dorovatovskii P.V., Mineev K.S., **Baranov M.S.** Imidazol-5-one as an Acceptor in Donor-Acceptor Cyclopropanes: Cycloaddition with Aldehydes. // *Org. Lett.* 2020. T. 22. № 7. C. 2740-2745
- 22) Zaitseva S.O., Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., **Baranov M.S.** Synthesis and Optical Properties of the New Kaede Chromophore Analog // *Russ J Bioorg Chem.* 2020. T. 46. C. 120–123.
- 23) Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Sokolov A.I., **Baranov M.S.** Synthesis of 2-arylideneimidazo[1,2-a]pyrazine-3,6,8(2H,5H,7H)-triones as a result of oxidation of 4-arylidene-2-methyl-1H-imidazole-5(4H)-ones with selenium dioxide// *Chem. Heterocycl. Compd.* 2020. T. 56. № 1. C. 116–119.
- 24) Chen C., Zhu L., Boulanger S.A., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., **Baranov M.S.**, Fang C. Ultrafast excited-state proton transfer dynamics in dihalogenated non-fluorescent and fluorescent GFP chromophores // *J. Chem. Phys.* 2020. № 152. C. 021101.
- 25) Kuleshov A.V., Solyev P.N., Volodin A.D., Korlyukov A.A., **Baranov M.S.**, Mikhaylov A.A. (3+2) Cycloaddition of N-benzylazomethine methylide with 4-arylidene-1H-imidazole-5(4H)-ones. // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2020. T. 56. № 1. C. 108–111.
- 26) Zaitseva S.O., Farkhutdinova D.A., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.Z., 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. № 9. 38730-38734.

- 27) Smirnov A.Y., Zaitseva E.R., Belozerova O.A., Alekseyev R.S., Baleeva N.S., Zagudaylova M.B., Mikhaylov A.A., **Baranov M.S.** Nitroacetic Esters in the Regioselective Synthesis of Isoxazole-3,5-dicarboxylic Acid Derivatives// *J. Org. Chem.* 2019. T. 84. C. 15417–15428.
- 28) Baleeva N.S., Khavroshechkina A.V., Zaitseva E.R., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., **Baranov M.S.** Naphthalene derivatives of a conformationally locked GFP chromophore with large stokes shifts // *Tetrahedron Lett.* 2019 T. 60. № 34. C. 150963.
- 29) 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 // *Dyes and Pigments.* 2019. № 170. C. 107550.
- 30) 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.** Red-shifted substrates for FAST fluorogen-activating protein based on the GFP-like chromophores // *Chem. Eur. J.* 2019. T. 25. № 41. C. 9592-9596.
- 31) Chen C., Zhu L., **Baranov M.S.**, Tang L., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Yampolsky I.V., Solntsev K.M., Fang C. Photoinduced Proton Transfer of GFP-Inspired Fluorescent Superphotoacids: Principles and Design. // *J Phys Chem B.* 2019. T. 123. № 17. C. 3804–3821.
- 32) Zaitseva S.O., **Baranov M.S.** Synthesis of the New Green Fluorescent Protein Chromophore Analogue Starting from a Cinnamic Aldehyde Derivative. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. T. 45. № 3. C. 214–216.
- 33) Chen C., **Baranov M.S.**, Zhu L., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Zaitseva S.O., Yampolsky I.V., Solntsev K.M., Fang C. Designing redder and brighter fluorophores by synergistic tuning of ground and excited states // *Chem Commun.* 2019. T. 55. № 17. 2537–2540.
- 34) Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Mineev K.S., Khavroshechkina A.V., Zagudaylova M.B., **Baranov M.S.** Enamine–azide [2+3]-cycloaddition as a method to introduce functional groups into fluorescent dyes // *Tetrahedron Lett.* 2019. № 5. C. 456-459.
- 35) Stakheev A.A., Ryazantsev D. Yu., Zvezdina Yu. K., **Baranov M.S.**, Zavriev S.K. // A Novel Fluorescent GFP Chromophore Analog-Based Dye for Quantitative PCR // *Biochemistry (moscow).* 2018. T. 83. № 7. C. 855-860.
- 36) Zaitseva S.O., Golodukhina S.V., Baleeva N.S., Levina E.A., Smirnov A.Yu., Zagudaylova M.B., **Baranov M.S.** Azidoacetic Acid Amides in the Synthesis of Substituted Arylidene-1-H-imidazole-5-(4H)-ones // *ChemistrySelect.* 2018. № 3. C. 8593-8596.
- 37) Smirnov A.Yu., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Mineev K.S., **Baranov M.S.** Derivatives of azidocinnamic acid in the synthesis of 2-amino-4-arylidene-1H-imidazole-5(4H)-ones // *Chem. Het. Comp.* 2018. T. 54. № 6. C. 625-629.
- 38) Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y., Smirnov A.Yu, Baleeva N.S, Krylov A., **Baranov M.S.** Pyridinium Analogues of Green Fluorescent Protein Chromophore: Fluorogenic Dyes With Large Solvent-Dependent Stokes Shift // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. № 9. C. 1958-1963.
- 39) Baleeva N.S., Gorbachev D.A., **Baranov M.S.** The Role of C2-Substituents in the Имидазолон Ring in the Degradation of GFP Chromophore Derivatives// *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. T. 44. № 3. C. 354-357.
- 40) Chen C., Liu W., **Baranov M.S.**, Baleeva N.S., Yampolsky I.V., Zhu L., Wang Y., Shamir A., Solntsev K.M., Fang C. Unveiling Structural Motions of a Highly Fluorescent Superphotoacid by Locking and Fluorinating the GFP Chromophore in Solution// *J. Phys. Chem. Lett.* 2017. № 8. C. 5921–5928.

- 41) Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Gorbachev D.A., Zagudaylova M.B., **Baranov M.S.** The role of N-substituents in radiationless deactivation of aminated derivatives of locked GFP chromophore // *Eur. J. Org. Chem.* 2017. № 35. C. 5219–5224.
- 42) Baleeva N.S., Levina E.A., **Baranov M.S.** Synthesis of 2-arylidene-6,7-дигидроimidazo[1,2-a]pyrazine-3,8(2H,5H)-dions by oxidation of 4-arylidene-2-methyl-1H-imidazole-5(4H)-ones with selenium dioxide // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2017. T. 53. № 8. C. 930–933.
- 43) Bozhanova N.G., **Baranov M.S.**, Sarkisyan K.S., Gritchenko R., Mineev K.S., Golodukhina S.V., Baleeva N.S., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Yellow and orange fluorescent proteins with tryptophan-based chromophores // *ACS Chem. Biol.* 2017. T. 12. № 7. C. 1867–1873.
- 44) Baleeva N.S., **Baranov M.S.** The Sonogashira reaction as a new method for the modification of borated analogues of the green fluorescence protein chromophore // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. T. 43. № 5. C. 612–615.
- 45) Olsen S.C, **Baranov M.S.**, Baleeva N.S., Antonova M.M., Johnson K., Solntsev K.M. pH-Sensitive fluorophores from locked GFP chromophores by a non-alternant analogue of the photochemical meta effect // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. T. 18. C. 26703-26711.
- 46) Baleeva N.S., Tsarkova A.S., **Baranov M.S.** Conformationally locked chromophores of CFP and Sirius protein // *Tetrahedron Lett.* 2016, T. 57. № 27. C. 3043-3045.
- 47) Baleeva N.S., Yampolsky I.V., **Baranov M.S.** Conformationally Locked GFP Chromophore Derivatives as Potential Fluorescent Sensors // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2016. T. 42. C. 453-456.
- 48) Golodukhina S.V., Baleeva N.S., Mineev K.S, **Baranov M.S.** Reversible condensation of 4-arylidene-1,2-dimethyl-1H-imidazole-5(4H)-ones with aromatic acyl chlorides // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2015. T. 51. № 10. C. 944–947.