



УДК 547.782

# Nano-frFAST: ДИЗАЙН НОВОЙ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОЙ ДАЛЬНЕ-КРАСНОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ МЕТКИ<sup>1</sup>

© 2025 г. Е. Л. Соколинская\*, \*\*, Ю. А. Богданова\*, \*\*, И. Н. Мяснянко\*\*,  
А. И. Соколов\*, \*\*, С. А. Краснова\*, #, М. С. Баранов\*, \*\*

\* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\* Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,  
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 05.09.2024 г.

После доработки 24.09.2024 г.

Принята к публикации 25.09.2024 г.

Предложен новый флуороген-активирующий белок nano-frFAST, содержащий всего 98 аминокислот, на основе комбинации ранее созданных флуороген-активирующих белков nanoFAST и frFAST. Синтезирована серия флуорогенов с увеличенной системой сопряженных связей, потенциально способных к связыванию с данным белком. По результатам исследования выявлен перспективный флуороген – (Z)-5-((E)-3-(4-гидрокси-2,5-диметоксифенил)аллилиден)-2-тиоксотиазолидин-4-он (HPAR-DOM). Показано, что комплекс nano-frFAST–HPAR-DOM может быть использован в качестве генетически кодируемой дальне-красной флуоресцентной метки для окрашивания отдельных структур живых клеток.

*Ключевые слова:* арилиден-азолон, арилаллилиден-азолон, флуороген-активирующие белки, флуорогены, флуоресцентное мечение

**DOI:** 10.31857/S0132342325010131, **EDN:** LYMUUX

## ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные метки давно и эффективно используются в микроскопии для визуализации процессов, протекающих в отдельных живых клетках и целых организмах. Особой популярностью пользуются генетически кодируемые метки, которые вводятся в исследуемые объекты методами молекулярной генетики [1, 2]. Один из вариантов таких меток – флуороген-активирующие белки, активно используемые рядом коллективов по всему миру [3–5]. Такие белки не флуоресцентны сами по себе, поэтому требуют наличия в системе

особого соединения – низкомолекулярного флуорогена. Флуоресценция свободных флуорогенов в растворах также незначительна, однако, обратимо связываясь с карманом флуороген-активирующего белка, флуорогены переходят в высокофлуоресцентную форму. В отличие от классических генетически кодируемых флуоресцентных меток, основанных на флуоресцентных белках, флуороген-активирующие белки не зависят от присутствия в системе кислорода [6, 7] и не имеют этапа созревания, который в случае флуоресцентных белков может длиться в течение не-

<sup>1</sup> Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342325010131 для авторизованных пользователей.

Сокращения: FAST – Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag; frFAST – дальне-красный FAST (far-red FAST); nanoFAST – укороченный FAST (the shortened FAST); nano-frFAST – укороченный frFAST (the shortened frFAST); HPAR-3OM – (4-гидрокси-3-метоксифенил)аллилиден-роданин; HPAR-DOM – (4-гидрокси-2,5-диметоксифенил)аллилиден-роданин; КВФ – квантовый выход флуоресценции; ТСХ – тонкослойная хроматография.

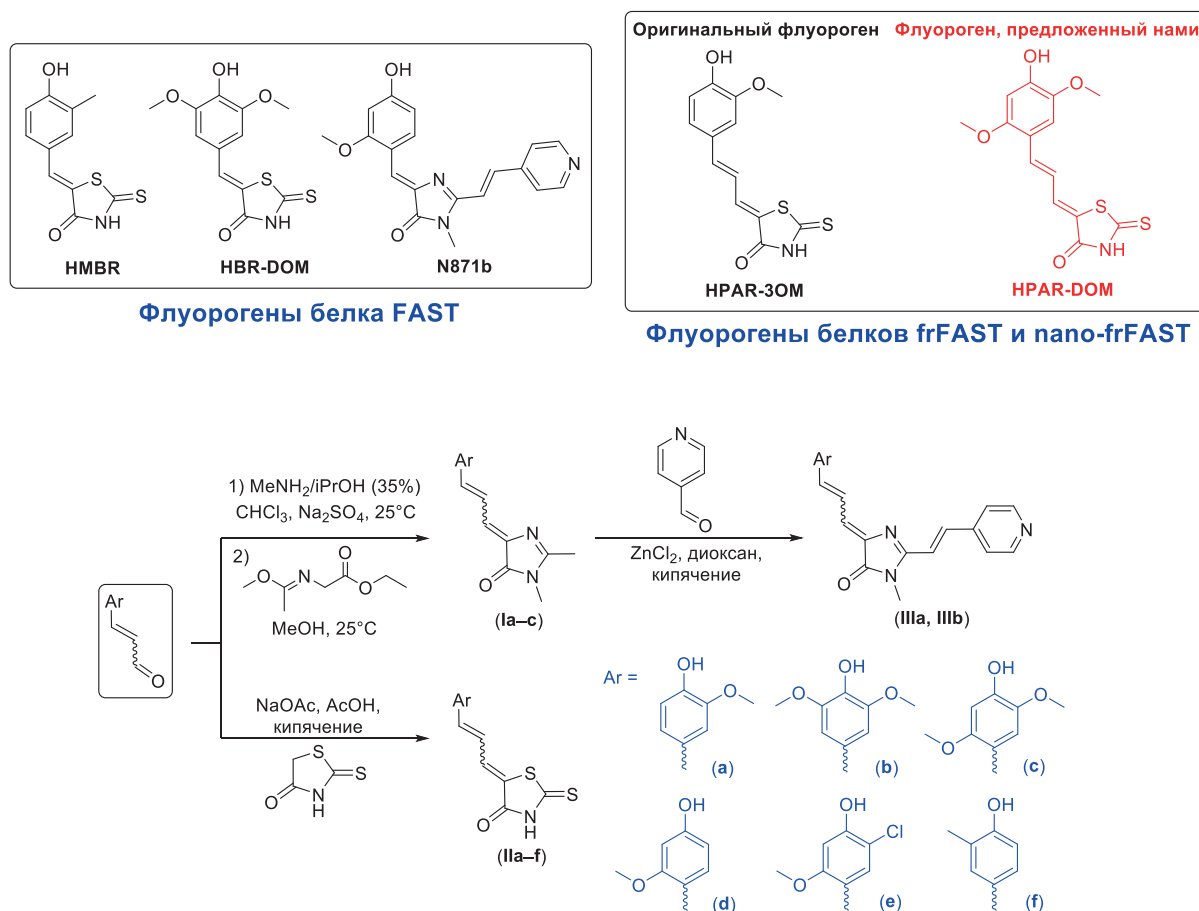
# Автор для связи: (тел.: +7 (964) 865-16-24; эл. почта: svetlanakr2002@mail.ru).

скольких десятков минут или даже часов [8]. Кроме того, флуороген-активирующие белки обладают относительно небольшими размерами. Например, белок FAST (Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag) – один из популярнейших флуороген-активирующих белков – состоит всего из 126 а.о., а его молекулярная масса составляет 13.7 кДа [5]. Путем мутагенеза было разработано большое разнообразие аналогов белка FAST, способных к связыванию широкого круга флуорогенов (схема 1), соответствующие комплексы которых характеризовались различными спектральными свойствами [9–12]. Среди прочих версий этого белка стоит отметить вариант, названный frFAST, флуоресцирующий в комплексе со специфическим флуорогеном в дальне-красной области, что особенно ценно для микроскопии *in vivo* [13]. Такое смещение максимумов испускания в длинноволновый диапазон стало возможно за счет увеличения размера флуороген-связывающего

кармана, который позволяет взаимодействовать с флуорогенами с увеличенной системой сопряженных связей. Так, вместо классических арилиден-азолонов белок frFAST связывает их аналог – (4-гидрокси-3-метоксифенил)аллилиден-роданин (HPAR-3OM) (схема 1).

Несколько лет назад коллективом нашей группы на основе белка FAST был разработан папоFAST – новый флуороген-активирующий белок меньшего размера, состоящий всего из 98 а.о. и имеющий молекулярную массу 10.8 кДа [4]. Путем рационального направленного мутагенеза нам также удалось создать вариант папоFAST, способный связывать три различных флуорогена, преимущественно флуоресцирующих в зеленой, оранжевой или красной, но не дальне-красной областях [14].

Целью данной работы стало создание варианта папоFAST, включающего аминокислотные замены



**Схема 1.** Структурные формулы известных флуорогенов белков FAST и frFAST, нового предложенного флуорогена для разработанного белка папоFAST, а также подходы к синтезу.

полноразмерного белка frFAST, а также серии новых флуорогенов с увеличенной системой сопряженных связей, способных связываться с предложенным белком и флуоресцировать в дальне-красной области. Кроме того, в наши задачи входила проверка возможности применения выявленных пар белок–флуороген во флуоресцентном мечении клеточных компартментов в широкопольной микроскопии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первую очередь мы внесли характерные для frFAST аминокислотные замены F62L, D71V, P73S, E74G и V107I (нумерация аминокислот соответствует полноразмерному белку FAST) в полученный нами ранее усеченный вариант этого белка – nanoFAST. Новая версия флуороген-активирующего белка получила название nano-frFAST. Полный сиквенс nano-frFAST приведен в п. 1 дополнительных материалов. Белковый препарат nano-frFAST получали с использованием штамма BL21(DE3) *Escherichia coli*, а затем очищали методом металл-аффинной хроматографии.

Серия новых флуорогенов для белка nano-frFAST была получена на основе классических арилиден-имидазолонов [4] и арилиден-роданинов [5]. Арилаллилиден-имидазолон (**Ia–c**) были синтезированы в две стадии по известной литературной методике [15]. Сначала реакцией соответствующих производных коричневого альдегида с метиламином были получены различные имины, которые затем были вовлечены в реакцию с этил-2-((1-метоксиэтилиден)амино)ацетатом, что привело к образованию целевых соединений с выходами 11, 28 и 53% соответственно (схема 1). Далее из полученных арилаллилиден-имидазолонов (**Ia**, **Ib**) по известной технологии [15] синтезировали производные со стирольным фрагментом (**IIa**, **IIb**). Для этого соединения (**Ia**, **Ib**) конденсировали с изоникотиновым альдегидом в присутствии хлорида цинка и получали целевые вещества с выходами 50 и 32% соответственно (схема 1).

Арилаллилиден-роданины (**IIa–IIf**) были синтезированы по модифицированной литературной методике [16] конденсацией Кнёвенагеля в смеси  $\text{AcONa}/\text{AcOH}$  (схема 1). Данные соединения были выделены с умеренными выходами 39–73%.

Строение новых синтезированных флуорогенов (**Ia–IIb**) было подтверждено методами ЯМР-

спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS). При этом во всех случаях спектральные данные соответствовали строению предложенных веществ (см. п. 2 и 6 дополнительных материалов). Важно отметить, что полученные соединения преимущественно были выделены в виде смесей (*Z/E*):(*Z/Z*)-изомеров в различных соотношениях, где двойная *экзо*-связь при имидазолоне и роданине всегда принимала *Z*-конфигурацию, а в *цис/транс*-форме существовала кратная связь, относящаяся к исходному альдегиду. Лишь три соединения (**Ia**, **IIb**, **IId**) удалось получить в виде единственного наиболее термодинамически стабильного (*Z/E*)-изомера. *Z*-конфигурация двойной *экзо*-связи была подтверждена характерным положением сигнала в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах (7–8 м.д.). Ранее такие же результаты были получены для иных арилиден-имидазолонов и арилиден-роданинов, содержащих одну двойную связь и имеющих именно *Z*-конфигурацию [17, 18]. Кроме того, как было сказано ранее, данные изомеры наиболее термодинамически стабильны. Например, в исследовании [18] было показано, что при комнатной температуре классические арилиден-имидазолон в большинстве случаев существуют исключительно в виде *Z*-изомеров.

Далее мы проводили первичный скрининг *in vitro*. Для этого смешивали растворы флуорогенов и белка nano-frFAST в фосфатном буфере (pH 7.4) в соотношении 1 : 10, после чего анализировали интенсивность флуоресценции полученных смесей, а также растворов флуорогенов без белка с помощью плащечного ридера и оценивали их соотношение (см. п. 3 дополнительных материалов). По результатам скрининга наиболее перспективным оказалось соединение (**IIc**), которому мы присвоили шифр HPAR-DOM. Интересно отметить, что структура этого вещества оказалась похожей на структуры флуорогенов, ранее предложенных для усеченного белка nanoFAST и содержавших в арилиденовом фрагменте не только гидроксильную группу в четвертом положении, но и два объемных заместителя в положениях 2 и 5. Спектрофлуориметрическое титрование nano-frFAST этим флуорогеном позволило рассчитать константу диссоциации образующегося комплекса (см. табл. 1 и п. 4 дополнительных материалов).

Затем были изучены оптические свойства полученного комплекса белок–флуороген, а также раст-

воров соединения (**IIc**) без nano-frFAST в нейтральной и депротонированной формах, рассчитаны квантовые выходы флуоресценции (КВФ) (см. рис. 1, табл. 1 и п. 5 дополнительных материалов). Показано, что максимум испускания комплекса nano-frFAST–HPAR-DOM находится на 662 нм, что соответствует дальне-красному диапазону спектра. Интересно, что максимум эмиссии депротонированного флуорогена в отсутствие белка расположен на той же длине волны. По этой причине можно предположить, что в комплексе с белком соединение (**IIc**) преимущественно существует в депротонированной форме, что ранее наблюдалось и в случае других аналогов белка FAST [11, 13]. Кроме того, важно отметить, что в свободном от белка виде флуороген HPAR-DOM имеет КВФ < 0.05%, тогда как при связывании с nano-frFAST КВФ возрастает до 13.7% (табл. 1). Таким образом, предложенная пара в целом не уступает известным парам белок–флуороген на основе полноразмерного белка FAST [11, 13] (табл. 1).

В заключительной части нашей работы мы изучили возможность использования комплекса nano-frFAST–HPAR-DOM для флуоресцентного

мечения отдельных компартментов в живых клетках HeLa Kyoto. Для этого клетки HeLa Kyoto были трансфицированы молекулярно-генетическими конструктами, позволяющими экспрессировать nano-frFAST, слитый с белком H2B (ядерная локализация) или с цитокератином человека (цитоскелет), под управлением CMV-промотора. Показано, что добавление в среду для микроскопии флуорогена (**IIc**) приводит к появлению выраженной флуоресценции в дальне-красном Cy5-канале (рис. 2). При этом локализация флуоресценции полностью соответствовала ожидаемым клеточным компартментам (ядро или цитоскелет в зависимости от используемого молекулярно-генетического конструкта).

Таким образом, в ходе данной работы мы предложили новый флуороген-активирующий белок nano-frFAST, синтезировали наиболее подходящий для него флуороген HPAR-DOM и продемонстрировали возможность применения комплекса nano-frFAST–HPAR-DOM для флуоресцентного мечения отдельных компартментов живых клеток HeLa Kyoto в дальне-красной области спектра.

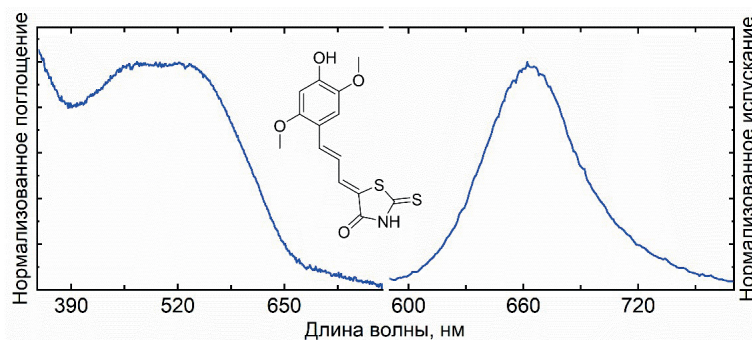


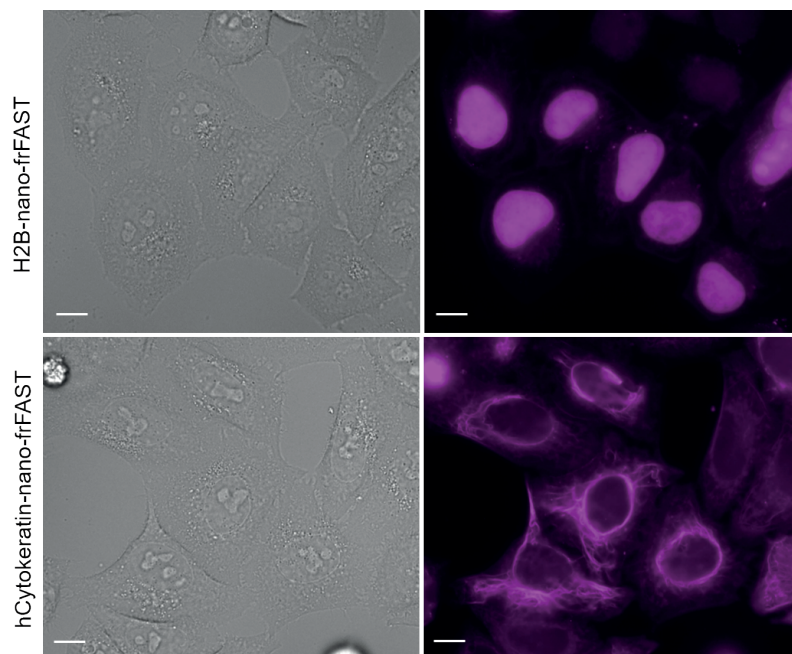
Рис. 1. Спектры поглощения и испускания комплекса nano-frFAST–HPAR-DOM в фосфатном буфере.

Таблица 1. Свойства комплексов белок–флуороген для белков nano-frFAST, frFAST и FAST

| Белок       | Флуороген              | $K_D$ , мкМ     | $\epsilon$ , $M^{-1} cm^{-1}$ | Абс, нм | КВФ, % | Эм, нм |
|-------------|------------------------|-----------------|-------------------------------|---------|--------|--------|
| nano-frFAST | HPAR-DOM               | $0.55 \pm 0.09$ | $\sim 25\,000$                | 450–540 | 13.7   | 662    |
| –           | HPAR-DOM (нейтр.)      | –               | 22 000                        | 433     | <0.05  | 625    |
| –           | HPAR-DOM (депротонир.) | –               | 35 500                        | 515     | <0.05  | 662    |
| frFAST      | HPAR-3OM               | 1.0 [13]        | 45 000                        | 555     | 21     | 670    |
|             | HMBR                   | 0.20 [11]       | 45 000                        | 481     | 23     | 540    |
| FAST        | HBR-DOM                | 1.14 [11]       | 39 000                        | 518     | 31     | 600    |
|             | N871b                  | 0.25 [11]       | 23 000                        | 562     | 25     | 606    |

Примечание:  $\epsilon$  – молярный коэффициент экстинкции, Абс – максимум поглощения, КВФ – квантовый выход флуоресценции, Эм – максимум испускания.





**Рис. 2.** Репрезентативные микрофотографии клеток Hela Kyoto, экспрессирующих генетические конструкции H2B-nano-frFAST (верхняя панель) и hCytokeratin-nano-frFAST (нижняя панель) в присутствии 10 мкМ флуорогена HPAR-DOM. Масштабный отрезок 10 мкм.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Оборудование.** Коммерчески доступные реагенты использовали без дополнительной очистки. Для колоночной хроматографии применяли силикагель Kieselgel 60 (Merck, Германия). Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на силикагеле 60 F254 на стеклянных пластинах (Merck, Германия). Визуализацию осуществляли УФ-светом (254 или 312 нм) и действием насыщенного раствора  $\text{KMnO}_4$ . Спектры ЯМР ( $\delta$ , м.д.;  $J$ , Гц) регистрировали на спектрометрах Avance III NMR (700 МГц), Avance III 800 и DPX 300 (Bruker, Германия) при 303 К. Химические сдвиги приведены относительно остаточных пиков  $\text{DMSO}-d_6$  (2.50 м.д. для  $^1\text{H}$  и 39.5 м.д. для  $^{13}\text{C}$ ). Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе TripleTOF 5600+ (AB Sciex, США) с ионизацией методом электроспрея (ESI). Напряжение на капилляре составляло 5.5 кВ в режиме регистрации положительных ионов, диапазон  $m/z$  50–3000. Внешнюю или внутреннюю калибровку проводили с помощью ESI Tuning Mix (Agilent, США). В качестве газ-носителя применяли сухой азот, его выходная

температура была установлена на 180°C. Названия соединений по IUPAC были сгенерированы с использованием программного обеспечения ChemBioDraw Ultra 13.0 (<https://revvitysignals.com/>). Микроскопию проводили при помощи инвертированного микроскопа BZ-9000 (Keyence, Япония), оснащенного масляным объективом 60× PlanApo 1.40 NA (Nikon, США). Для поддержания клеточной культуры использовали инкубатор MCO-175 (Sanyo, Япония). Бактериальные клетки наращивали при помощи шейкера-инкубатора New Brunswick Excella E25 (Eppendorf, Германия), клеточную массу осаждали с использованием центрифуги Heraeus Multifuge 3SR (Thermo Fisher Scientific, США). Скрининг библиотеки веществ и определение констант диссоциации проводили с помощью плащечного ридера Infinite 200 Pro M Nano (Tecan, Австрия).

**Получение препарата рекомбинантного белка nano-frFAST в *E. coli*.** Синтез нуклеотидной последовательности, кодирующей nano-frFAST, был заказан в компании Клонинг Фасилити (Россия), полученный ген клонировали в векторе pET-28a, содержащем C-концевой гистидиновый таг. Нарботку белка проводили с использованием штамма BL21(DE3) *E. coli* в среде M9. Клетки

наращивали при 37°C в течение 4–5 ч в шейкере-инкубаторе New Brunswick Excella E25 (Eppendorf, Германия) при 220 об/мин. Экспрессию белка индуцировали при  $OD_{600} \sim 0.6$  в конечной концентрации 0.5 мМ. Экспрессию белка проводили в течение 4 ч, после чего клетки осаждали в центрифуге Heraeus Multifuge 3SR (Thermo Fisher Scientific, США) при 4500 об/мин в течение 30 мин при 4°C. Белок очищали при помощи металл-аффинной хроматографии. Клетки из 1900 мл среды M9 (Sigma-Aldrich, США) ресуспендировали в 75 мл лизирующего буфера (20 мМ Трис, pH 8.0, 500 мМ NaCl) с добавлением 200 мкМ PMSF (Servicebio, Китай) и подвергали 80 циклам обработки ультразвуком (соникатор Sonic VibraCell, США, с титановым коническим наконечником 5 мм) на льду в импульсном режиме с активным интервалом 15 с при 40%-ной мощности с последующим охлаждением в течение 45 с. Лизат осаждали в центрифуге Eppendorf 5415R (Eppendorf, Германия) при 13 200 об/мин в течение 30 мин при 4°C. Супернатант фильтровали с использованием фильтра (GVS Filter Technology, Великобритания) с размером пор 0.20 мкм и переносили в 50-мл пробирку, содержащую 3 мл смолы Talon (Takara Bio, Япония), предварительно уравновешенной лизирующим буфером. Пробирку инкубировали при комнатной температуре на ротаторе в течение 20 мин для связывания белка со смолой, после чего содержимое переносили в стеклянную колонку. Колонку промывали 7.5 мл буфера для металл-аффинной хроматографии IMAC (20 мМ Трис, pH 8.0, 200 мМ NaCl), содержащего 10 мМ имидазола. Целевой белок элюировали 15 мл IMAC-буфера, содержащего 500 мМ имидазола, и обес-соливали на колонках Amicon Ultra-4 (Merck Millipore, Германия) в PBS.

**Синтез 2,3-диметил-5-(3-(арил)аллилиден)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов (Ia–Ic)** (*общая методика*). Соответствующее производное коричневого альдегида (0.34 ммоль, 1 экв.) растворяли в  $CHCl_3$  (5 мл) и смешивали с 10.8 М раствором метиламина в изопропанол (1.2 ммоль, 3.5 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 10 сут при 25°C. Протекание реакции контролировали с помощью  $^1H$ -ЯМР-спектроскопии. Далее растворитель упаривали при пониженном давлении, образовавшийся остаток смешивали с этил-2-((1-метоксиэтилиден)амино)ацетатом (0.37 ммоль, 1.1 экв.) и добавляли метанол (1 мл). Полученную

смесь перемешивали в течение 15–20 сут при 25°C. Протекание реакции также контролировали с помощью  $^1H$ -ЯМР-спектроскопии. По достижении полной конверсии растворитель упаривали при пониженном давлении. Полученный твердый остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле ( $CH_2Cl_2$ –MeOH).

**Синтез 5-(3-(арил)аллилиден)-3-метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов (IIIa, IIIb)** (*общая методика*). К раствору 2,3-диметил-5-(3-(арил)аллилиден)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов (**Ia**, **Ib**) (0.20 ммоль, 1 экв.) в диоксане (1.2 мл) добавляли безводный  $ZnCl_2$  (0.044 ммоль, 0.2 экв.) и изоникотинальдегид (0.24 ммоль, 1.2 экв.). Смесь кипятили в течение 5–6 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ ( $CH_2Cl_2$ –MeOH, 100 : 5). Затем смесь охлаждали, а растворитель упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в EtOAc (60 мл) и промывали 0.5 М PBS ( $2 \times 20$  мл). Органический слой сушили над  $Na_2SO_4$ , после чего фильтровали, собирали фильтрат, растворитель упаривали при пониженном давлении. Образовавшийся продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле ( $CH_2Cl_2 \rightarrow CH_2Cl_2$ –MeOH, 100 : 5).

**Синтез 5-(3-(арил)аллилиден)-2-тиоксо-тиазолидин-4-онов (IIa–f)** (*общая методика*). Соответствующее производное коричневого альдегида (0.31 ммоль, 1 экв.), 2-тиоксотиазолидин-4-он (0.37 ммоль, 1.2 экв.) и безводный ацетат натрия (0.93 ммоль, 3 экв.) растворяли в ледяной уксусной кислоте (2.5 мл). Реакционную смесь кипятили в течение 4–11 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ ( $CH_2Cl_2$ –MeOH, 100 : 5). Далее реакционную смесь охлаждали до 25°C, разбавляли EtOAc (80 мл) и последовательно промывали 0.5 М PBS ( $2 \times 10$  мл) и насыщенным раствором KCl ( $1 \times 10$  мл). Органический слой сушили над  $Na_2SO_4$ , после чего фильтровали, собирали фильтрат, растворитель упаривали при пониженном давлении. Образовавшийся продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле ( $CH_2Cl_2$ –MeOH).

Выходы реакций, температуры плавления и спектральные характеристики синтезированных соединений приведены в п. 2 дополнительных материалов.

**Скрининг *in vitro*.** Эффективность связывания соединений (**Ia–IIIb**) с белком nano-frFAST прове-

ряли с использованием растворов, содержащих 1 мкМ флуорогенов и 10 мкМ белка в фосфатном буфере (pH 7.4; Amresco, США). Усиление флуоресценции при возможном связывании веществ с белком определяли как отношение интегральной интенсивности флуоресценции смеси флуорогена и белка к аналогичной интенсивности флуоресценции раствора свободного флуорогена на приборе Infinite 200 Pro M Nano (Tecan, США) в планшетном формате. Оба раствора возбуждали на шести длинах волн (380, 430, 480, 530, 580 и 630 нм соответственно).

**Титрование белка nano-frFAST флуорогеном HPAR-DOM.** Константы связывания определяли спектрофлуориметрическим титрованием nano-frFAST растворами соединения (IIc) различной начальной концентрации (0.1, 1, 10, 80 мкМ) на приборе Infinite 200 Pro M Nano (Tecan, США) в планшетном формате. Концентрация белка составляла 0.1 мкМ. Все эксперименты проводили при 25°C в фосфатном буфере (pH 7.4; Amresco, США). Для анализа полученных данных применяли программное обеспечение Origin 8.6 (<https://www.originlab.com/>). Методом наименьших квадратов были найдены константы диссоциации ( $K_D$ ). Данные в табл. 1 представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка.

**Оптические свойства комплекса nano-frFAST–HPAR-DOM и флуорогена HPAR-DOM в свободной форме.** Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Оптические свойства соответствующего комплекса исследовали в фосфатном буфере (pH 7.4; Amresco, США) с использованием 4.8 мкМ раствора как для спектров поглощения, так и для спектров испускания. Белок добавляли в таком количестве, чтобы доля комплекса nano-frFAST–HPAR-DOM составляла >95%. Общую концентрацию белка для получения комплекса рассчитывали по уравнению:

$$[Pr_0] = \frac{K_D \times (\alpha \times [Chr_0])}{[Chr_0] - (\alpha \times [Chr_0])} + (\alpha \times [Chr_0]),$$

где  $K_D$  – константа диссоциации комплекса,  $[Chr_0]$  – общая концентрация флуорогена,  $\alpha$  – доля комплекса nano-frFAST–HPAR-DOM.

Квантовый выход флуоресценции (КВФ) комплекса находили в соответствии с описанным в литературе протоколом [19]. В качестве стандарта ис-

пользовали оксазин 1 (Sigma-Aldrich, США). Общая концентрация флуорогена в исследуемом растворе составляла 5 мкМ для измерения спектров абсорбции и эмиссии, при этом белок добавляли в такой концентрации, чтобы доля комплекса nano-frFAST–HPAR-DOM была >95%. Расчет КВФ проводили по формуле:

$$КВФ_x = КВФ_{ст} \times \frac{F_x}{F_{ст}} \times \frac{1 - 10^{A_{ст}}}{1 - 10^{A_x}} \times \frac{n_x^2}{n_{ст}^2},$$

где  $F$  – площадь под спектром испускания,  $A$  – оптическая плотность на длине волны возбуждения,  $n$  – показатель преломления растворителя; индекс “x” относится к исследуемому соединению, индекс “ст” – к стандарту.

Оптические свойства флуорогена HPAR-DOM в свободной форме исследовали в воде или в смеси воды и 0.1% DBU (pH 10) с использованием растворов с концентрациями 10 и 20 мкМ для регистрирования спектров поглощения и испускания соответственно.

**Флуоресцентная микроскопия живых клеток.** Клетки линии HeLa, взятые из коллекции клеточных линий отдела геномики и постгеномных технологий ИБХ РАН, культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Biosera, Франция) и 100 мкг/мл смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (ПанЭко, Россия). Для транзientной трансфекции использовали реагент GenJect-39 (Молекта, Россия). Трансфекцию проводили в среде Opti-MEM (Gibco, США) в пропорции 1 мкл реагента на 1 мкг ДНК согласно протоколу производителя. Микроскопию живых клеток проводили через 24 ч после трансфекции при 37°C с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа BioRevoBZ-9000 (Keyence, Япония) и иммерсионного объектива 60× PlanApo 1.40 NA (Nikon, США). Флуоресценцию флуорогена HPAR-DOM возбуждали при помощи светофильтра OP66839 BZ filter Cy5 (Keyence, Япония) (возбуждение 620/60, поглощение 700/75). Обработку полученных изображений проводили с использованием пакета программ Fiji Image J 1.54f (<https://fiji.sc/>).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе нами предложен новый флуороген-активирующий белок nano-frFAST, а также синтезирована новая серия флуорогенов с увеличенной системой сопряженных связей, потен-



циально способных связываться с данным белком. Изучение полученной библиотеки веществ позволило выявить наиболее перспективное соединение – (Z)-5-((E)-3-(4-гидрокси-2,5-диметоксифенил)аллилиден)-2-тиоксотиазолидин-4-он ((IIc), HPAR-DOM), для которого было обнаружено значительное увеличение флуоресценции при взаимодействии с белком nano-frFAST. Данный комплекс был всесторонне охарактеризован – определена константа диссоциации, величина квантового выхода флуоресценции, а также форма и положения спектров поглощения и испускания. Изучение оптических свойств флуорогена в свободном виде показало, что так же, как и во многих других случаях, связывание с белком приводит к депротонированию его фенольного фрагмента. Показано, что комплекс nano-frFAST–HPAR-DOM может быть использован в качестве генетически кодируемой дальне-красной флуоресцентной метки для окрашивания отдельных структур живых клеток.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации 124020900020-4.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равноценный вклад в написание статьи.

#### ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Snapp E.L. // Trends Cell Biol. 2009. V. 19. P. 649–655. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.08.002>
2. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // Physiol. Rev. 2010. V. 90. P. 1103–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
3. Hori Y., Ueno H., Mizukami S., Kikuchi K. // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 16610–16611. <https://doi.org/10.1021/ja904800k>
4. Mineev K.S., Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Povarova N.V., Sokolov A.I., Baleeva N.S., Smirnov A.Yu., 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. // Chem. Sci. 2021. V. 12. P. 6719–6725. <https://doi.org/10.1039/d1sc01454d>
5. Plamont M.-A., Billon-Denis E., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quérard J., Pan B., Rossignol J., Moncoq K., Morellet N., Volovitch M., Lescop E., Chen Y., Triller A., Vríz S., Saux T. Le, Jullien L., Gautier A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 497–502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
6. Hocq R., Bottone S., Gautier A., Pflügl S. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2023. V. 11. P. 1226889. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1226889>
7. Tsien R.Y. // Annu. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
8. Remington S.J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2006. V. 16. P. 714–721. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.10.001>
9. Benaissa H., Ounoughi K., Aujard I., Fischer E., Goïame R., Nguyen J., Tebo A.G., Li C., Le Saux T., Bertolin G., Tramier M., Danglot L., Pietrancosta N., Morin X., Jullien L., Gautier A. // Nat. Commun. 2021. V. 12. P. 6989. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27334-0>
10. Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Yu., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshevskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // Chemistry. 2021. V. 27. P. 3986–3990. <https://doi.org/10.1002/chem.202004760>
11. Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Yu., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // Chemistry. 2019. V. 25. P. 9592–9596. <https://doi.org/10.1002/chem.201901151>
12. 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. // Chemistry. 2021. V. 27. P. 8946–8950. <https://doi.org/10.1002/chem.202101250>
13. Li C., Tebo A.G., Thauvin M., Plamont M.-A., Volovitch M., Morin X., Vríz S., Gautier A. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2020. V. 59. P. 17917–17923. <https://doi.org/10.1002/anie.202006576>



14. *Baleeva N.S., Bogdanova Y.A., Goncharuk M.V., Sokolov A.I., Myasnyanko I.N., Kublitski V.S., Smirnov A.Yu., Gilvanov A.R., Goncharuk S.A., Mineev K.S., Baranov M.S.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. P. 3054. <https://doi.org/10.3390/ijms25053054>
15. *Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Smirnov A.Yu., Mikhaylov A.A., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Mishin A.S., Baranov M.S.* // *Dyes Pigm.* 2022. V. 198. P. 110033. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.110033>
16. *Campaigne E., White R.L.* // *J. Heterocycl. Chem.* 1988. V. 25. P. 367–373. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570250203>
17. *Radi M., Botta L., Casaluce G., Bernardini M., Botta M.* // *J. Comb. Chem.* 2010. V. 12. P. 200–205. <https://doi.org/10.1021/cc9001789>
18. *Voliani V., Bizzarri R., Nifosi R., Abbruzzetti S., Grandi E., Viappiani C., Beltram F.* // *J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 112. P. 10714–10722. <https://doi.org/10.1021/jp802419h>
19. *Würth C., Grabolle M., Pauli J., Spieles M., Resch-Genger U.* // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. P. 1535–1550. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.087>

## Nano-frFAST: Design of a New Genetically-Encoded Far-Red Fluorescent Label

**E. L. Sokolinskaya<sup>\*, \*\*</sup>, Yu. A. Bogdanova<sup>\*, \*\*</sup>, I. N. Myasnyanko<sup>\*\*</sup>, A. I. Sokolov<sup>\*, \*\*</sup>, S. A. Krasnova<sup>\*, #</sup>, and M. S. Baranov<sup>\*, \*\*</sup>**

<sup>#</sup> Phone: +7 (964) 865-16-24; e-mail: svetlanakr2002@mail.ru

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

<sup>\*\*</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

We propose a new fluorogen-activating protein nano-frFAST with only 98 amino acids based on a combination of the previously created fluorogen-activating proteins nanoFAST and frFAST. A series of fluorogens with an increased system of conjugated bonds, which are potentially capable of binding to this protein, were synthesized. Based on the results of the study, a promising fluorogen which is (Z)-5-((E)-3-(4-hydroxy-2,5-dimethoxyphenyl)allylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one (HPAR-DOM) was identified. We demonstrate that the nano-frFAST–HPAR-DOM complex can be used as a genetically encoded far-red fluorescent label for staining individual structures of living cells.

**Keywords:** *arylidene-azolones, arylallylidene-azolones, fluorogen-activating proteins, fluorogens, fluorescent labeling*