

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Ямпольский Илья Викторович

**Строение и механизмы функционирования новых
субстратов биolumинесценции (люциферин) и
хромофоров флуоресцентных белков**

специальность 02.00.10 - биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора химических наук

Москва 2016

Работа выполнена в группе синтеза природных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук

Научные консультанты:

Лукьянов Сергей Анатольевич, академик РАН, доктор биологических наук
Гительзон Иосиф Исаевич, академик РАН, доктор медицинских наук

Официальные оппоненты:

Доктор химических наук, профессор кафедры органической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологического университет им. Д.И.Менделеева»

**Смушкевич
Юрий
Исаевич**

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

**Исмаилов
Анвар
Джураевич**

Доктор медицинских наук, директор НИИ Биомедицинских технологий Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Загайнова
Елена
Вадимовна**

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Защита состоится 12 октября 2016 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук по адресу 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте Института www.ibch.ru.

Автореферат разослан _____ 2016 г.

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



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Излучение видимого света живыми организмами, обусловленное флуоресценцией и биолюминесценцией, широко распространено в природе. Светятся многие бактерии, простейшие, животные, грибы. Около 17 типов и 700 родов содержат светящиеся виды. В случае биолюминесценции излучение света происходит в результате взаимодействия между белком-люциферазой и субстратом – молекулой люциферина. Люцифераза катализирует окисление люциферина кислородом воздуха и его последующее превращение в молекулу оксилуциферина в возбужденном состоянии, которая испускает квант видимого света при переходе в нормальное состояние. На сегодняшний день известно о существовании около 30 различных механизмов биолюминесценции, однако до 2014 года лишь для семи природных люциферинов и нескольких десятков люцифераз были определены структуры.

Поиск и детальное исследование новых химических механизмов флуоресценции и биолюминесценции является актуальным направлением на стыке нескольких дисциплин: биохимии, молекулярной генетики, эволюционной биологии, молекулярной биологии, биоорганической химии и медицины.

С фундаментальной точки зрения, изучение новых механизмов люминесценции, структур флуорофоров, люциферинов, люцифераз и кодирующих их генов приближает нас к разгадке возникновения феноменов флуоресценции и биолюминесценции, их приспособительного смысла, позволяют проследить пути эволюции различных организмов, выяснить значение флуоресценции и люминесценции для биохимии и этологии живых организмов.

С практической точки зрения, открытие новых химических механизмов люминесценции и флуоресценции приводит к разработке серии новых методов визуализации биологических объектов, качественного и количественного анализа, клинических аналитических методов и тест-систем для скрининга лекарственных кандидатов.

Настоящая работа была направлена на изучение новых химических механизмов, лежащих в основе излучения света живыми организмами, а также на исследование возможностей их применения.

Цель работы. Настоящая работа была направлена на изучение новых химических механизмов, лежащих в основе излучения света некоторыми живыми организмами, а также на исследование возможностей их применения.

Для этого нами были поставлены и реализованы следующие задачи:

1. Изучить механизм созревания хромофора красного флуоресцентного белка DsRed с использованием синтетических модельных соединений.
2. Создать флуоресцентный краситель нового типа на основе конформационно-фиксированного хромофора зеленого флуоресцентного белка GFP.
3. Изучить возможность существования остатка депротонированного триптофана в составе хромофора флуоресцентного белка
4. Выделить, установить строение и механизм действия люциферина *Fridericia heliota*.
5. Выделить и определить строение структурных аналогов люциферина биолюминесцентного почвенного червя *Fridericia heliota*.
6. Выделить, установить строение и механизм действия люциферина высших грибов и его биосинтетического предшественника.

Научная новизна и практическая ценность работы. В настоящей работе впервые была показана способность GFP-подобных хромофоров к автоокислению в основной среде с образованием хромофора DsRed.

Впервые получен аналог хромофора GFP с конфигурационно-фиксированным бензилиденовым фрагментом. Полученное соединение р-НОВДИ-BF2 является наиболее близким синтетическим аналогом хромофора GFP, обладающим яркой флуоресценцией в растворе. Полученный флуоресцентный краситель нового типа обладает низкой молекулярной массой, высокой растворимостью, низкой токсичностью и химической стабильностью, что делает его перспективным кандидатом для практического применения при мечении биомолекул а также живых клеток.

На модельном соединении хромофора флуоресцентного белка CFP показано, что NH-группа остатка триптофана в данном хромофоре обладает экстремально низким значением pKa. С помощью мутагенеза получен флуоресцентный белок WasCFP, хромофор которого содержит депротонированный остаток триптофана. Таким образом, впервые показана возможность депротонирования индольного остатка триптофана в составе белка при физиологических условиях.

Из биомассы люминесцентного почвенного червя *Fridericia heliota* (Enchytraeidae) выделены природные соединения, названные CompX, AsLn2, AsLn5, AsLn7, AsLn11 и AsLn12. Их химическое строение установлено спектральными методами. Показано, что данные соединения являются представителями нового, ранее не обнаруженного класса природных пептидов у наземных животных.

Из биомассы люминесцентного червя *Fridericia heliota* выделен субстрат новой биолюминесцентной системы – люциферин *Fridericia*. Комбинацией методов ЯМР, масс-спектрометрии высокого разрешения и встречного синтеза установлено его химическое строение. Также, установлено строение продукта биолюминесцентной реакции *Fridericia* – оксилуциферина. Показано, что в ходе биолюминесцентной реакции происходит окислительное декарбоксилирование люциферина *Fridericia*, а механизм люминесцентной реакции включает активацию молекулы люциферина за счет АТФ-зависимого образования аденилата по карбоксильной группе остатка лизина.

Впервые установлено химическое строение биосинтетического предшественника люциферина люминесцентных грибов: (Е)-6-(3,4-дигидроксистирил)-4-гидрокси-2Н-пиран-2-она. Показано, что в люминесцентных грибах происходит его НАД(Ф)-Н зависящая конверсия при катализе специфическим водорастворимым ферментом, приводящая к образованию люциферина грибов. Проведен энзиматический синтез люциферина грибов, установлено его химическое строение: (Е)-6-(3,4-дигидроксистирил)-3,4-дигидрокси-2Н-пиран-2-он. Строение люциферина грибов доказано встречным синтезом.

С практической точки зрения, открытые в данной работе люциферины двух новых биолюминесцентных систем представляются перспективными для разработки новых методов визуализации биологических объектов (биоимиджинга), мониторинга окружающей среды и технологических процессов.

Апробация полученных результатов. Результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных симпозиумах и конференциях, в том числе International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, 2011, St-Petersburg, Russia; 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 23-28 June 2014, Uppsala, Sweden; International Scientific Conference “Science of the Future, Russian Federation, 2014, St-Petersburg, Russia; 19th

International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 2016, Tsukuba, Japan.

Публикации по теме работы: По материалам диссертации опубликовано 27 статей в российских и международных научных журналах.

Личный вклад автора. Основные результаты были получены лично автором, либо под его непосредственным руководством. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, выбор методов, анализ и подготовку результатов к публикации.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов работы и их обсуждения, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Работа изложена на 219 страницах, содержит 34 схемы, 83 рисунка и 16 таблиц. Список литературы включает 394 источника.

1. Автоокисление синтетического хромофора GFP с образованием DsRed-подобного красного хромофора

Мы изучили один из возможных механизмов образования DsRed-подобных хромофоров, используя химический синтез биомиметических GFP-подобных хромофоров, содержащих α -ацетиламино-заместитель, моделирующий аминокислоту в положении 65, отвечающую за формирование DsRed ацилимино группы. Мы обнаружили, что модельные хромофоры подвергаются окислительной конверсии из зеленой формы в красную под действием молекулярного кислорода в основных условиях. Эта реакция приводит к образованию DsRed-подобных хромофоров с ацилиминным фрагментом, а также к образованию новых хромофоров, образующихся в результате четырехэлектронного окисления.

Синтез α -ацетиламино-замещенных 4-(4-гидроксibenзилиден)имидазолин-5-онов

N-Ацилирование общего O-бензилированного предшественника **3.1.1** ацетиламинокислотой (Gly, Phe, Leu) с использованием стандартных методов пептидного синтеза (DCC/HOBt) и последующая реакция с избытком метиламина привели к получению желаемого производного β -гидрокситирозина **3.1.2** с высоким выходом (схема 1.1). Последний O-ацилировали и дебензилировали в стандартных условиях каталитического гидрирования. Результирующий **3.1.3** был подвергнут элиминированию и циклизации под действием основания. В случае **3.1.3c** реакция шла поэтапно с образованием производного дегидротирозина **3.1.4c** на первом этапе. Синтез **3.1.5a** проводился в анаэробной среде, так как даже следы кислорода значительно снижали выход целевого продукта (см. ниже). В случае получения производных *трет*-лейцина скорости пептидного синтеза и циклизации значительно снижались, вероятно в связи со стерическими затруднениями, обусловленными объемной *трет*-бутильной группой.

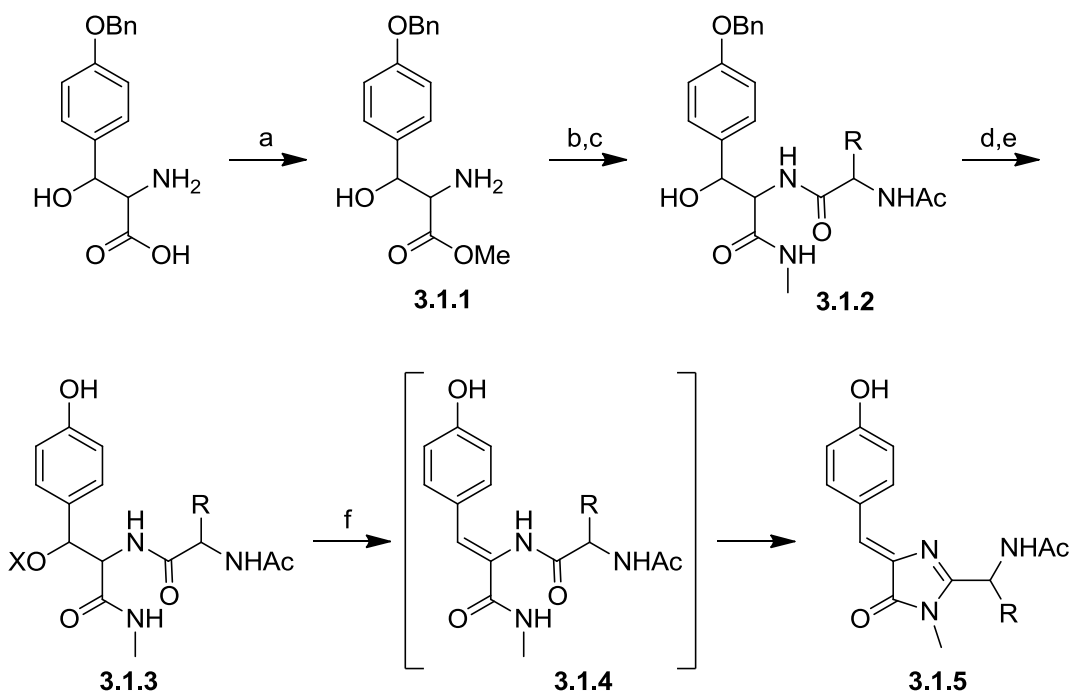


Схема 1.1. Синтез модельных GFP-подобных хромофоров **3.1.5a-c**.

Автоокисление α -ациламино-замещенных хромофоров **3.1.5a-c** и 2-этил-замещенного хромофора **3.1.10**

Хромофоры **3.1.5a-c** подвергаются автоокислению в присутствии оснований. Время полураспада (ВП) **3.1.5a** в ТГФ при комнатной температуре сокращается с 8 часов до 20 минут при добавлении 0.01M триэтиламина. Скорости автоокисления сильно зависят от природы аминокислотного остатка, уменьшаясь в следующем порядке: производное Gly **3.1.5a** (ВП < 1 мин, при 100°C в ДМФ/ CS_2CO_3), производное Phe **3.1.5b** (ВП ~3 ч, в тех же условиях) и *трет*-лейциновый аналог **3.1.5c** (практически инертен).

Автоокисление **3.1.5a** приводило к образованию двух продуктов **3.1.6** и **3.1.7** (схема 1.2), соотношение которых зависело от природы используемого основания, температуры и присутствия воды. Так, в ДМФ в присутствии диизопропилэтиламина, карбоната цезия или фторида тетрабутиламмония соотношения **3.1.6:3.1.7** были 3:1, 1:1.5 и 1:2 соответственно. При повышении температуры среди продуктов реакции помимо соединений **3.1.6** и **3.1.7** наблюдался альдегид **3.1.8**. Эксперимент по нагреванию чистого **3.1.6** в ДМФ в присутствии основания показал, что **3.1.8** является результатом разложения **3.1.6**. При окислении **3.1.5a** в безводных условиях выход **3.1.7** оставался неизменным, в то время как наблюдались только следы **3.1.6**.

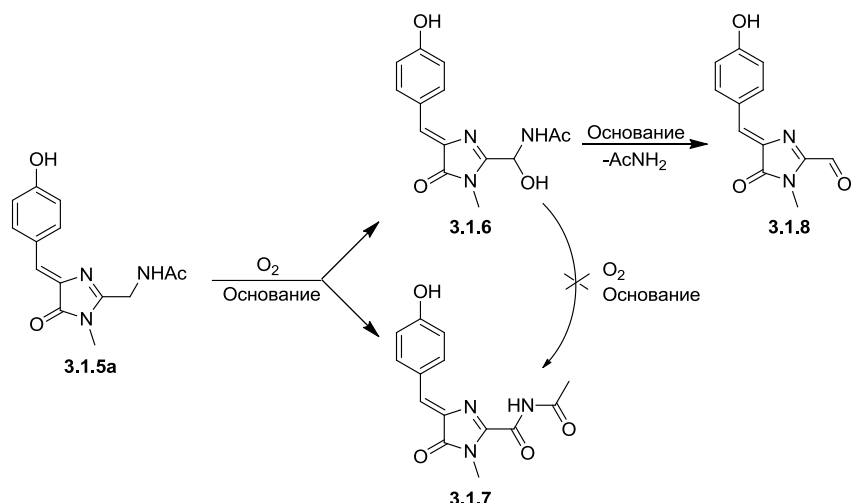


Схема 1.2. Автоокисление глицинового производного GFP-подобного хромофора **3.1.5a**

Очищенный **3.1.6** оставался неизменным при автоокислении в тех же условиях, что позволило предположить два различных механизма образования **3.1.6** и **3.1.7** из **3.1.5a** (схема 1.2). Предположительным альтернативным путем может являться автоокисление негидратированного ацилиминового промежуточного соединения, но такой механизм можно исключить, так как скорость реакции автоокисления должна быть намного меньше, чем скорость гидратирования.

Автоокисление производного фенилаланина **3.1.5b** привело к получению смеси цис- и транс-изомеров хромофора **3.1.9** DsRed-типа (схема 1.3). *трет*-Лейциновый аналог **3.1.5c** проявил практически полную инертность в реакции автоокисления даже в более жестких условиях (продолжительное кипячение в насыщенном кислороде ДМФ в присутствии Cs₂CO₃).

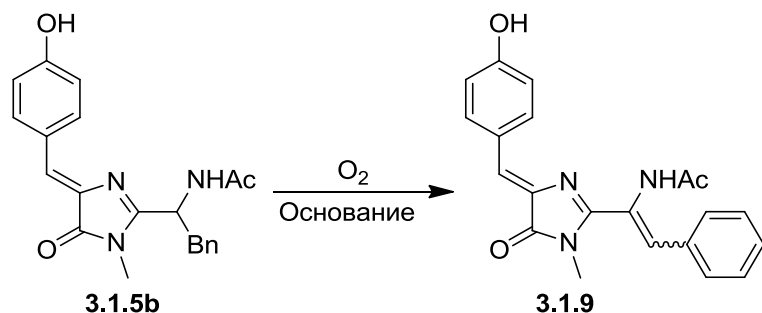


Схема 1.3. Автоокисление GFP-подобного хромофора производного фенилаланина **3.1.5b**.

Исследование способности хромофора **3.1.10** к автоокислению проводили в тех же условиях. Скорость автоокисления была крайне низкой (ВП ~6 ч, при 100°C в ДМФ/Cs₂CO₃). В результате были выделены два основных продукта реакции: оксопроизводное **3.1.11** и гидантоин **3.1.12** (схема 1.4).

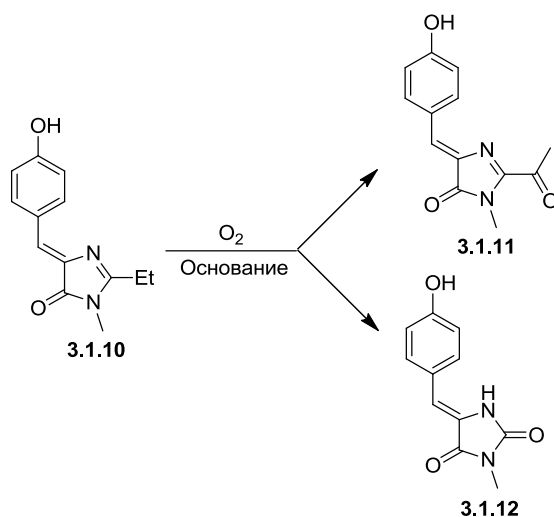


Схема 1.4. Автоокисление этил-замещенного хромофора **3.1.10**.

Спектральные характеристики хромофоров 3.1.5а-с, 3.1.6, 3.1.7 и 3.1.9

Как и ожидалось, **3.1.5** и **3.1.6** обладали спектральными характеристиками, аналогичными простейшему 2-метил-замещенному хромофору (таблица 1.1). Для максимумов поглощения хромофоров **3.1.7** и **3.1.9**, напротив, наблюдался сильный сдвиг в длинноволновую область как для нейтральных, так и для анионных форм (таблица 1.1). Интересно заметить, что максимум поглощения хромофора **3.1.9** (514нм в основном ДМФ) обладал значительным гипсохромным сдвигом по сравнению с соответствующим Kaede-подобным хромофором, не содержащим N-ациламино группы (553нм). Анионные формы **3.1.7** и **3.1.9** обладали слабой красной флуоресценцией (квантовый выход флуоресценции $\sim 5 \cdot 10^{-4}$). Наблюдалась значительная разница между максимумами поглощения и возбуждения хромофора **3.1.9** в основном ДМФ. Эта же особенность была описана для близкого структурного аналога **3.1.9** - Kaede-подобного хромофора FYG [Yampolsky и др., 2008], а также для ряда мутантных флуоресцентных белков [Vulina и др., 2002].

Таблица 1.1. Спектральные свойства хромофоров **3.1.5а-с, 3.1.6, 3.1.7** и **3.1.9**.

	Нейтр. форма ^a	Анионная форма ^b	
	макс. абс., нм (ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$)	макс. абс., нм (ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$)	макс. эмисс., нм
5, 6	376	492	-
7	419 (48000)	577 (77000)	603
9	400 (25000)	514 (46000)	618

^a измеряли в 10mM AcOH в ДМФ

^b измеряли в 5mM Cs₂CO₃ в ДМФ

Синтез GFP-подобных субстратов реакции автоокисления

Известные на сегодняшний день методы синтеза имидазолонов включают основно-катализируемую циклизацию производных дегидротирозина, конденсации амидинов или имидатов с подходящими 1,2-диэлектрофилами, внутримолекулярную циклизацию аза-Виттига α -азидоимидов и кросс-сочетание бороновых кислот с тиоимидазолоном. Мы разработали подход к синтезу ранее неизвестных α -ацетиламино-замещенных GFP-подобных хромофоров **3.1.5**, основанный на циклизации производных дегидротирозина **3.1.4** (схема 1.1.). Мы обнаружили, что реакция Эрленмейера (азлактонизация), часто применяемая для получения производных дегидротирозина, не совместима с наличием α -ацетиламиногруппы, вероятно по причине перегруппировки получаемого азлактона в N-ацилдикетопиперазин, описанной в литературе [Boyd и др., 1995]. Прямое N-ацилирование O-защищенного дегидротирозина показало себя неэффективным [Shin и др., 1988], в связи с чем, мы использовали легкодоступный синтетический аналог **3.1.1**. В противоположность литературным данным по сходным соединениям [Shigematsu и др., 1997], обработка **3.1.2** ацетилхлоридом либо тозилхлоридом в присутствии широкого спектра оснований приводила к фрагментации N-ацилированного β -гидрокситирозина с получением 4-бензилоксибензальдегида. Решить данную проблему удалось с использованием кислот Льюиса. Наилучший выход продукта для остатков глицина и *трет*-лейцина был получен с использованием комбинации реагентов $ZnCl_2/(EtCO)_2O$, в случае фенилаланина был использован ацетилбромид в уксусном ангидриде. Карбонат калия был использован на стадии циклизации вместо предложенного ранее Cs_2CO_3 [Yampolsky, Balashova, Lukyanov, 2009] в связи со сложностью отделения высокополярного продукта **3.1.5a** от солей цезия. Синтез **3.1.5a** требовал инертной атмосферы, в связи с высокой реакционной способностью последнего по отношению к кислороду.

Механизм автоокисления

Мы обнаружили, что скорость реакции автоокисления в значительной степени зависит от основности среды и от природы боковой цепи аминокислоты. В нейтральной и кислой средах (AcOH или трифторуксусная кислота (ТФУ) в CH_2Cl_2 , ТГФ или ДМФ) **3.1.5a** окислялся крайне медленно. Добавление оснований приводило к резкому увеличению скорости реакции. Увеличение концентрации и силы используемого основания приводили к еще большему повышению скорости реакции. Другим скорость-лимитирующим фактором являлся размер боковой цепи аминокислоты, что подтверждалось многократным снижением скорости автоокисления в ряду от **3.1.5a** до **3.1.5c**. Ускоряющий и направляющий эффект N-ациламиногруппы на автоокисление наблюдается при сравнении свойств хромофоров **3.1.5** с этил-замещенным хромофором **3.1.10**, подвергающимся автоокислению крайне медленно, с получением отличных продуктов (схема 1.5).

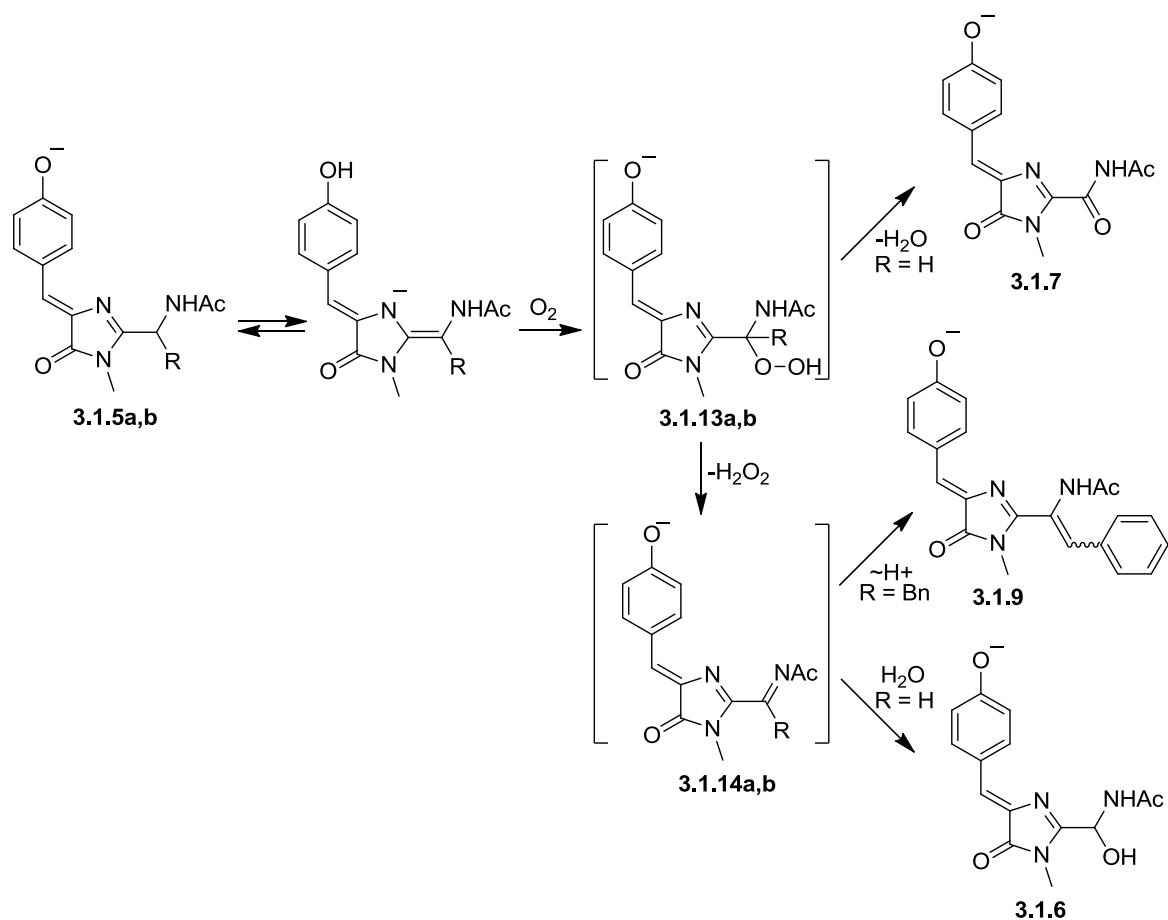


Схема 1.5. Предположительный механизм автоокисления GFP-подобных хромофоров **3.1.5a** и **3.1.5b**, приводящего к получению стабильных форм DsRed-подобных ацилиминов **3.1.6** и **3.1.9**, а также имида **3.1.7**.

На основании приведенных выше данных мы предположили, что α -гидропероксид **3.1.13** (впервые предложенный в механизме созревания хромофора DsRed [Yarbrough и др., 2001]) является промежуточным соединением во всех наблюдаемых реакциях автоокисления (схема 1.5). Его дальнейшие преобразования определяются природой аминокислотного остатка. Так, элиминирование пероксида водорода приводит к нестабильным DsRed-подобным ацилиминам **3.1.14a** и **3.1.14b**. В случае производного фенилаланина **3.1.14b** наиболее очевидным путем стабилизации является таутомеризация в енамин **3.1.9**, в то время как гидратация глицинового интермедиата **3.1.14a** приводит к получению гидросиламида **3.1.6**. Для глицинового хромофора **3.1.13a** возможен также другой путь фрагментации, возникающий в связи с отсутствием боковой цепи аминокислотного остатка: расщепление α -гидропероксида по связи O-O с выделением воды и образованием продукта четырехэлектронного окисления – имида **3.1.7**, формирующегося независимо от продукта двухэлектронного окисления – гидросиламида **3.1.6**. Соотношение продуктов **3.1.6:3.1.7**, вероятно, зависит от относительных скоростей депротонирования СН- и NH-групп гидропероксида **3.1.13a**.

Снижение скорости автоокисления этил-имидазолон **3.1.10** можно объяснить влиянием электронодонорной терминальной метильной группы и, как следствие, снижением СН-кислотности α -положения. В связи с этим, наряду с расщеплением O-O связи гидропероксида **3.1.15**, происходит циклизация в диоксетановый интермедиат с последующим элиминированием ацетальдегида, приводящим к образованию гидантоина **3.1.12** (схема 1.6).

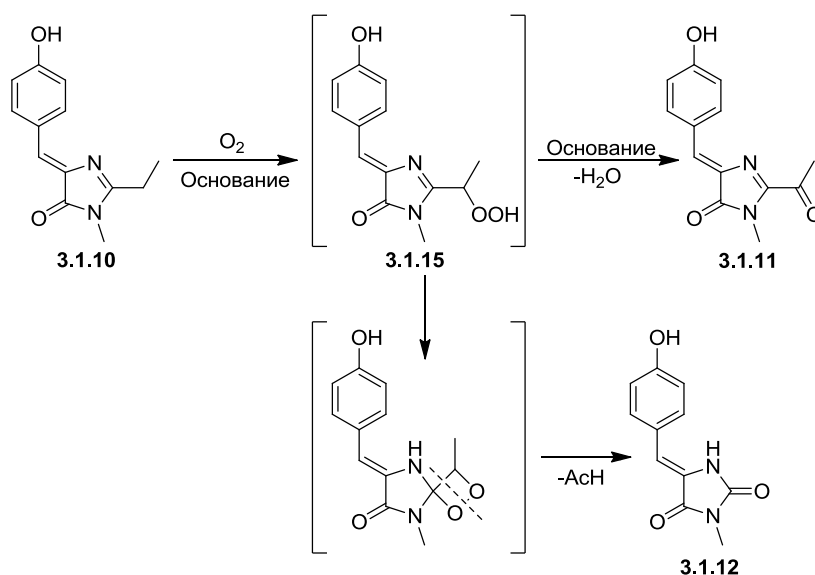


Схема 1.6. Механизм автоокисления 2-этил-замещенного хромофора **3.1.10**.

Выделение ацилиминов **3.1.14** было затруднено в связи с их высокой электрофильностью. Попытки получить пространственно-затрудненный и, как следствие, менее реакционноспособный *трет*-бутил-замещенный ацилимин оказались неудачными из-за инертности *трет*-лейцинового производного **3.1.5с** по отношению к кислороду (проведение реакции при высоких температурах приводило к разложению, не связанному с автоокислением). Низкая реакционная способность **3.1.5с**, вероятно, обусловлена электронодонорным и стерическим эффектами *трет*-бутильной группы.

Значимость результатов для биохимии флуоресцентных белков

Полученные данные впервые демонстрируют склонность хромофора GFP к автоокислению в положении 65С- α , необходимым и достаточным условием для которого являются основные условия. Следует подчеркнуть, что условия автоокисления имеют близкое сходство с природными условиями созревания флуоресцентных белков. Действительно, диметилформамид подобен полиамидному скелету белка, а в случае пространственно незатрудненных аналогов хромофора реакция автоокисления проходит эффективно при комнатной температуре с высокой скоростью (ВП ~ 20 мин), что сравнимо со скоростью созревания хромофора красного флуоресцентного белка.

Таким образом, в красных флуоресцентных белках, созревание которых проходит через GFP-подобный интермедиат (таких как z2FP574 и asFP595), белковое окружение хромофора играет роль основного катализа. Остатки аминокислот, действующие как основания в непосредственной близости от хромофора, могут играть решающую роль в процессе формирования красного хромофора. В частности, полученные нами новые данные позволяют предложить новый механизм созревания хромофора z2FP574. Полностью созревший белок z2FP574 имеет DsRed-подобный хромофор, образованный остатками трех аминокислот Asp65-Тур66-Gly67, в котором Asp65 декарбоксилирован [Pletneva и др., 2006, 2007]. Ранее было показано, что созревание z2FP574 происходит через промежуточное соединение GFP-типа, а хромофоробразующий остаток Asp65 имеет важное значение в окислительной конверсии из зеленой формы в красную [Pakhomov, Martynov, 2007]. Для объяснения наблюдаемых взаимосвязей между образованием ацилимина и декарбоксилированием

Asp65, Пахомов и Мартынов предложили механизм единовременного окисления и декарбоксилирования. Однако на основании полученных нами данных становится очевидным, что переход хромофора белка z2FP574 из зеленой формы в красную происходит в результате двух последовательных необратимых реакций. В настоящей работе мы показали, что окисление в положении 65 требует депротонирования Ca . Таким образом, мы предполагаем, что депротонированная карбоксильная группа боковой цепи Asp65 может являться основанием, способствующим отщеплению протона в положении 65C- α (схема 1.7). Дальнейшее окисление приводит к образованию β -иминокарбоновой кислоты, легко подвергающейся декарбоксилированию. Интересно, что мутация D65E белка z2FP574 приводит лишь к частичному ингибированию конверсии из зеленой формы в красную и полному подавлению декарбоксилирования [Pakhomov, Martynov, 2007], что согласуется с предлагаемой нами моделью и противоречит «единовременному окислению-декарбоксилированию».

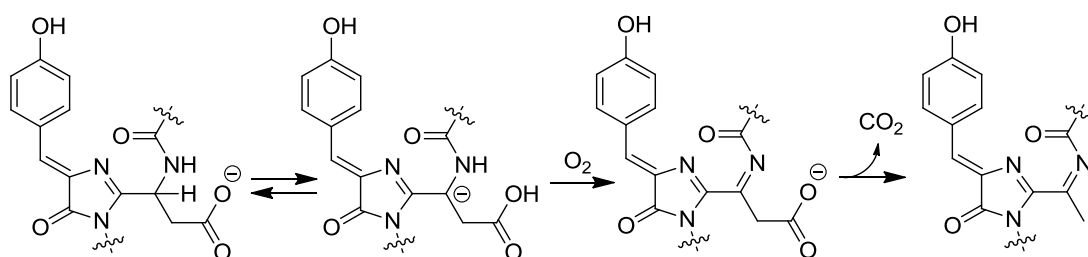


Схема 1.7. Вероятный механизм созревания хромофора z2FP574

В литературе существует несколько примеров, показывающих, что введение карбоксилат-аниона (способного выступать в качестве основания) в непосредственной близости от 65C- α приводит к образованию красного хромофора. Единственная замена Asn65Asp приводит к конверсии зеленого флуоресцентного белка zFP506 в двуцветный, где примерно треть белка испускает в красной области спектра [Pakhomov, Martynov, 2007]. Кроме того, было показано, что только остатки глутаминовой и аспаргиновой кислот в положении 65 приводят к появлению красной флуоресценции в желтом флуоресцентном белке zFP538 [Remington и др., 2005].

Нами был обнаружен новый имид-замещенный хромофор, получаемый в результате четырехэлектронного окисления предшественника GFP-типа на основе глицина. В связи с этим хромофоробразующая последовательность Gly-Tyr-Gly представляется перспективной, поскольку на ее основе возможно получение нового типа красных флуоресцентных белков, несущих имид-замещенный хромофор. Подобный хромофор до сих пор не был обнаружен в известных флуоресцентных белках. Его расширенная сопряженная π -система, совместно с электроноакцепторным эффектом имидного заместителя, способствуют значительному батохромному сдвигу испускания результирующего белка, что позволяет поставить его в один ряд с хромофорами таких белков как DsRed, Kaede или asFP595. Можно предположить, что формирование нового хромофора в белке может проходить в стандартных условиях созревания DsRed-подобных хромофоров.

Полученные нами результаты проливают свет на эволюцию флуоресцентных белков. Было признано, что цветовое разнообразие белков GFP-типа возникло независимо в различных эволюционных ветвях [Shagin и др., 2004]. В частности, многочисленные независимые появления красных флуоресцентных белков и хромопротеинов, несущих DsRed-подобные хромофоры, является интригующим примером конвергентной эволюции на молекулярном уровне. Легкость протекания

автоокисления в положении 65, примыкающем к хромофору GFP-типа помогает раскрыть эту «тайну», демонстрируя, что переход из зеленой формы в красную не так затруднен, как это считалось ранее.

Наконец, неожиданно высокая реакционная способность 65С-α по отношению к кислороду вызывает парадоксальный вопрос: почему не все флуоресцентные белки красные? Действительно, все зеленые флуоресцентные белки содержат GFP-подобные хромофоры, со склонным к окислению остатком в положении 65. Можно было бы ожидать, по меньшей мере, медленного превращения GFP в красные формы, особенно в тех случаях, когда в положении 65 находятся остатки небольших аминокислот (таких как Ser65 в *A. victoria*, Gly65 в рачках [Shagin и др., 2004] и ланцетниках [Vomati, Manning, Deheyn, 2009]). Тем не менее, известно, что даже длительное (в течение многих лет) хранение зеленых флуоресцентных белков не приводит к появлению красной флуоресценции. Кажется, что только отсутствие сильных основных групп вблизи положения 65 обеспечивает стабильность зеленого хромофора в зеленых флуоресцентных белках. Таким образом, возникает новый подход к генерации RFP из различных GFP - введение основных остатков в непосредственной близости от позиции 65. Это может стать важным шагом на пути к рациональному дизайну новых флуоресцентных белков для конкретных прикладных нужд.

2. Конформационно-фиксированный хромофор GFP

С целью исследовать фотофизическое поведение хромофоров флуоресцентных белков, включающее межмолекулярный перенос протона в возбужденном состоянии (ESPT), нами в сотрудничестве с группами Солнцева и Балдриджа (технологический университет Джорджии, США) был синтезирован высокофлуоресцентный аналог хромофора GFP с необратимо фиксированной геометрией, в котором фиксация происходит за счет взаимодействия неподеленной электронной пары атома азота имидазолонового кольца со свободной орбиталью атома бора дифторборильной группы: ((5Z)-5-[(2-дифторметил-4-гидроксифенил)-метилен]-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он, *p*-HOBDI-BF₂, схема 2.1). *p*-HOBDI-BF₂ является наиболее близким к нативному хромофору GFP из всех известных аналогов.

Синтез борированного аналога хромофора GFP

Для синтеза *p*-HOBDI-BF₂ нами была использована недавно описанная реакция борирования биарильных соединений, содержащих атом азота в орто-положении одного из ароматических колец [Ishida и др., 2010]. В связи с тем, что оригинальная методика характеризовалась осмолением и низкими выходами, связанными с присутствием основания - диизопропилэтиламина, нами была проведена модификация этого метода. На стадии борирования трибромидом бора были использованы молекулярные сита для связывания образующегося HBr. Последующее действие фторида тетрабутиламмония (ТБАФ), используемого для удаления силильной защиты фенольного гидроксила позволило также заменить дибромоборильную группу на более устойчивую дифтороборильную. Синтез приведен на схеме 2.1.

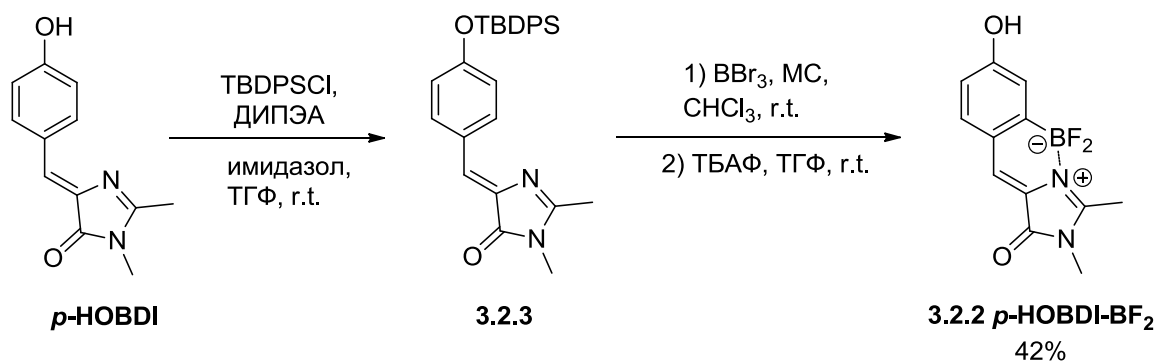


Схема 2.1. Синтез $p\text{-HOBDI-BF}_2$ с использованием молекулярных сит.

Строение пространственно-фиксированного хромофора $p\text{-HOBDI-BF}_2$ было подтверждено методами ЯМР, а также масс-спектрометрии высокого разрешения и рентгеноструктурным анализом, что не оставляет сомнений по поводу его структуры (рис. 2.1). Согласно данным PCA молекула $p\text{-HOBDI-BF}_2$ имеет планарную структуру: все атомы кроме фтора и атомов водорода метильных групп занимают инвариантные позиции в плоскости зеркала.

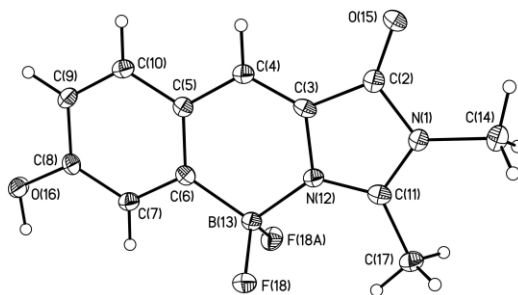


Рисунок 2.1. Общий вид $p\text{-HOBDI-BF}_2$ в тепловых эллипсоидах с 50% вероятностью

Свойства $p\text{-HOBDI-BF}_2$

Максимумы спектров поглощения и испускания $p\text{-HOBDI-BF}_2$ в различных растворителях оказались близки к аналогичным параметрам $p\text{-HOBDI}$ и имели лишь незначительный (30-40 нм) батохромный сдвиг. Одной из отличительных черт полученного нами хромофора $p\text{-HOBDI-BF}_2$ являлась его ярко выраженная флуоресценция с квантовым выходом в ацетонитриле, достигающим 73%, близким к аналогичному значению для GFP дикого типа (79%) и одному из ранее изученных бор-фиксированных хромофоров (81%) [Wu, Burgess, 2008].

Изучение спектров абсорбции и эмиссии соединения $p\text{-HOBDI-BF}_2$ в различных растворителях позволило исследовать его сольватохромные свойства, применив подход Камлета-Тафта [Kamlet и др., 1983].

$$\nu = \nu_0 + \rho\pi^* + A\alpha + B\beta \quad (1)$$

Величины и направления сольватохромных сдвигов сильно зависели от ионизации хромофоров. Полученные нами данные четко демонстрируют увеличение дипольного момента $p\text{-HOBDI}$ при ионизации, а также его амфотерные свойства. Исключительно сильная флуоресценция $p\text{-HOBDI-BF}_2$ позволила нам провести исследование сольватохромного поведения его спектров поглощения и эмиссии (таблица 2.1).

Таблица 2.1. Сольватохромные коэффициенты (в $10^3/\text{см}$), нейтральной и анионной форм p -HOBDI-BF₂ и p -HOBDI (поглощение анионной формы) в соответствии с уравнением 1.

	\square_0	ρ	A	B	R^a
Абс. Ан	18.7	-0.1	1.5	0	0.95
p -HOBDI ^b	22.9	-1.4	1.7	0.53	0.94
Эм. Нейтр.	22.1	-1.1	-0.2	-0.5	0.83
Эм. Ан.	18.4	-0.2	0.7	0	0.86

^a Коэффициент корреляции. ^b [Dong, Solntsev, Tolbert, 2006]

Сдвиг в спектре поглощения депротонированной формы p -HOBDI-BF₂ определяется только кислотностью растворителя. Интересно, что величина этого взаимодействия уменьшается в два раза в возбужденном состоянии, что свидетельствует об уменьшении основности аниона (или увеличении кислотности нейтральной формы) при возбуждении. Сходная зависимость уже наблюдалась ранее для некоторых фотокислот [McGrier и др., 2008; Solntsev и др., 1998; Solntsev, Nuppert, Agmon, 1998].

В отличие от p -HOBDI, хромофор p -HOBDI-BF₂ легко растворим в воде. Максимум спектра поглощения p -HOBDI-BF₂ в нейтральной и основной средах смещен в длинноволновую область по сравнению с p -HOBDI и гораздо ближе к максимумам поглощения p -HOBDIME⁺ в тех же условиях. Как и следовало ожидать, при увеличении pH пик при 400 нм уменьшался, в то время как новый пик при 485 нм увеличивался (рис. 2.2а). На спектрах наблюдается изобестическая точка при 425 нм и pKa 6.4.

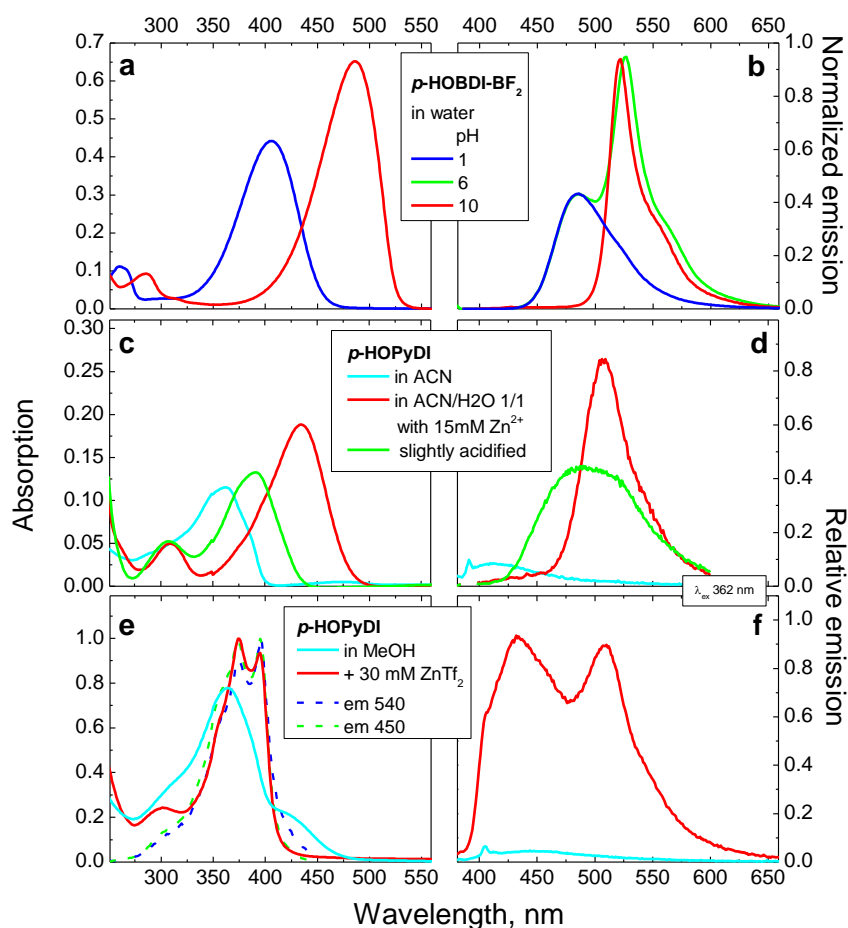


Рисунок 2.2. Спектры поглощения и эмиссии p -HOBDI-BF₂ и p -HOPyDI в различных растворителях. Спектры поглощения p -HOBDI-BF₂ в воде при pH 1 и 6 идентичны. Рисунок воспроизводится по статье Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L.V., Tolbert L.M., **Yampolsky I.V.**, Solntsev KM. Conformationally locked chromophores as a model of excited state proton transfer in fluorescent proteins. **J. Am. Chem. Soc.** 2012, 134, 6025-6032.

Как протонированная (R*OH), так и депротонированная (R*O⁻) формы p -HOBDI-BF₂ обладают яркой флуоресценцией. При возбуждении с длиной волны 400 нм в спектрах испускания наблюдалось два пика с максимумами при 485 нм и 527 нм (рис. 2.2b), что говорит о наличии известного эффекта переноса протона в возбужденном состоянии на молекулу воды [Arnaut, Formosinho, 1993; Martynov и др., 1977]. Более подробное исследование этой реакции обнаружило, что конверсия синего и зеленого максимумов испускания происходит при низких значениях pH, соответствующих рКа* 2.1.

Разница между рКа* возбужденного состояния и рКа основного состояния оценивалась с использованием модифицированного уравнения Ферстера [Grabowski, Grabowska, 1976]:

$$\Delta pK_a = \frac{\left[\frac{h\nu_{AROH} + h\nu_{FR*OH}}{2} - \frac{h\nu_{ARO^-} + h\nu_{FR*O^-}}{2} \right]}{RT \ln 10} \quad (2)$$

где $h\nu_{AX}$ и $h\nu_{FX}$ энергии электронных переходов, полученные для соответствующих состояний X из максимумов спектров поглощения и эмиссии. Подставив данные максимумов поглощения и испускания для воды, получили $\Delta pK_a = 5.8$. С учетом значения рКа основного состояния 6.4 получили значение рКа* = 0.6,

что очень близко к значению, полученному с помощью рН-титрования флуоресценции.

Интересно провести параллель между спектрами флуоресценции *p*-HOBDI-BF₂ в 3М растворе ацетата натрия и спектрами эмиссии мутанта GFP дикого типа H148D/S65T [Leiderman и др., 2007; Stoner-Ма и др., 2008]. В обоих случаях наблюдается только испускание депротонированной формы хромофора в возбужденном состоянии. Таким образом, можно заключить, что 3М концентрация акцептора протонов в растворе имитирует взаимодействие хромофор-аспаргиновая кислота в мутанте H148D/S65T.

Таким образом, разработан метод пространственной фиксации подвижного бензилиденового фрагмента в составе хромофора GFP путем введения дифторборильного заместителя. Полученное соединение *p*-HOBDI-BF₂ является наиболее близким синтетическим аналогом хромофора GFP, обладающим яркой флуоресценцией в растворе. Показано, что введение дифторборильной группы приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции хромофора GFP в растворе более чем на 3 порядка за счет подавления фотоизомеризационной деактивации. Изучение фотофизических свойств *p*-HOBDI-BF₂ (рКа основного и возбужденного состояний, сольватохромизм, термодинамика и кинетика переноса протона) показало его выраженные фотокислотные свойства, аналогичные таковым флуоресцентных белков.

3. Флуоресцентный белок WasCFP с ионизированным остатком триптофана в составе хромофора

До настоящего времени заряженные состояния хромофоров Trp66-содержащих синих ФБ не были описаны. Более того, даже теоретическая возможность их существования не обсуждалась. Здесь мы опишем флуоресцентный белок с анионным хромофором на основе триптофана, полученный при помощи направленной эволюции белка Cerulean.

Боковая цепь триптофана не существует в анионном состоянии в биологических системах из-за чрезвычайно высокого рКа депротонирования индола (около 20). Тем не менее, в случае расширенной ароматической системы хромофора на основе триптофана можно ожидать некоторых изменений в рКа из-за более эффективной делокализации отрицательного заряда.

Действительно, мы заметили, что в сильно основных условиях в спектрах синтетического хромофора синего ФБ ((5*Z*)-5-(1*H*-индол-3-илметилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он) наблюдается батохромный сдвиг около 60 нм с рКа 12.4 (рис. 3.1). Мы наблюдали подобный батохромный сдвиг в спектре поглощения голубого флуоресцентного белка mCerulean при денатурации в 5М NaOH. Наиболее вероятным объяснением такого изменения спектра является депротонирование индольного азота. Эти результаты побудили нас использовать направленный мутагенез с целью получить флуоресцентный белок с анионным хромофором на основе Trp66. Мы ожидали, что максимумы спектров анионной формы хромофора на основе триптофана будут смещены в красную область по сравнению с нейтральной формой.

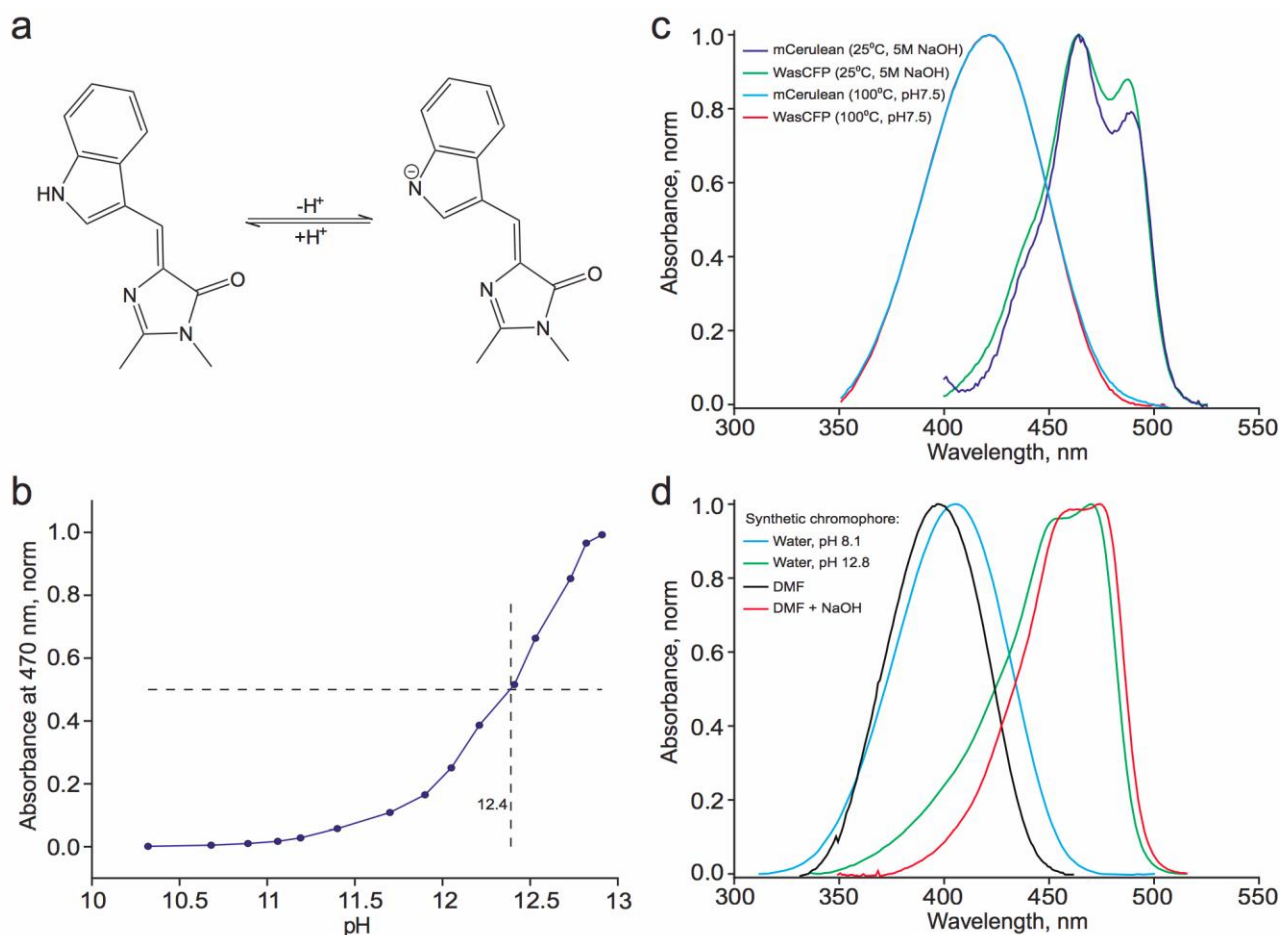


Рисунок 3.1. Ионизация синтетического CFP-хромофора, а также CFP-хромофора во флуоресцентном белке. (a) Структуры синтетического CFP-хромофора в нейтральном и анионном состояниях. (b) рН-титрование синтетического CFP-хромофора. (c) Нормализованные спектры поглощения WasCFP и mCerulean, денатурированных в нейтральных (рН 7.5, 100°C) и щелочных условиях (5M NaOH, 25°C). (d) Нормализованные спектры поглощения синтетического CFP-хромофора при рН 8.1 и 12.8. Рисунок воспроизводится по статье Sarkisyan K.S., **Yampolsky I.V.**, Solntsev K.M., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Tryptophan-based chromophore in fluorescent proteins can be anionic. **Scientific Reports** 2012, 2, Art. 608.

Для проверки нашего предположения о возможности ионизации триптофанового хромофора мы решили провести мутагенез голубого ФБ mCerulean и ввести остатки лизина и аргинина по позициям, пространственно сближенным с Trp66, в частности, 61, 146, 203 и 205. Мы предположили, что положительно заряженные боковые цепи этих аминокислот потенциально могут стабилизировать отрицательный заряд индольного фрагмента. Действительно, в спектрах мутантного белка, несущего замену V61K, наблюдался небольшой дополнительный пик возбуждения при 494 нм с испусканием при 505 нм (рис. 3.2). Далее случайный мутагенез был использован для повышения относительной интенсивности зеленой флуоресценции и общей яркости испускания.

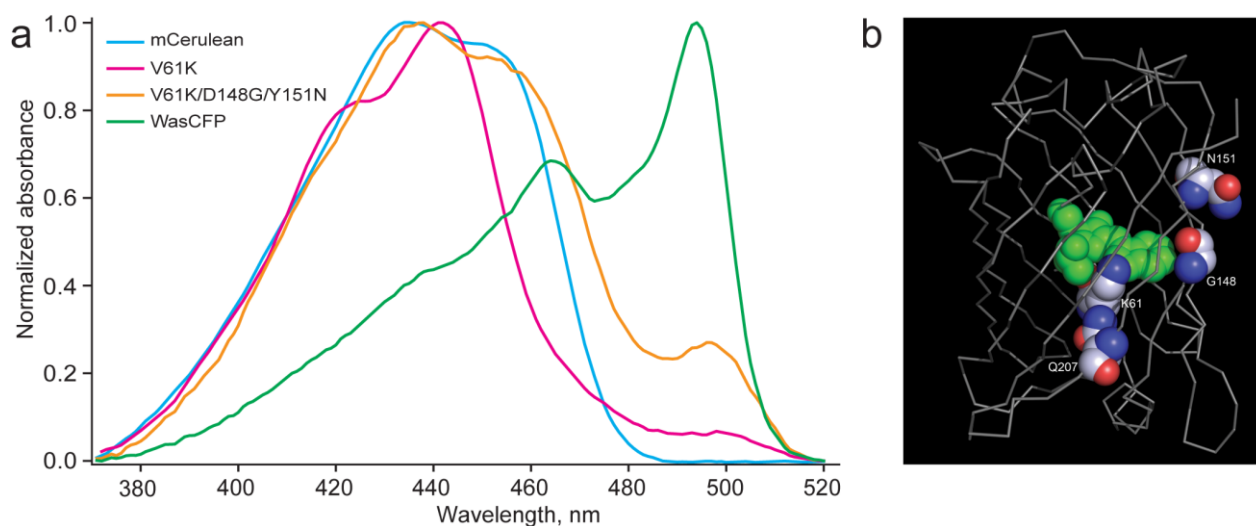


Рисунок 3.2. Сайт-специфический и случайный мутагенез mCerulean. (a) Нормализованные спектры поглощения mCerulean и его мутантных аналогов после нескольких последовательных раундов мутагенеза. Все спектры были измерены при pH 7,4 и 4°C. Cerulean - голубой, V61K - розовый, V61K /D148G /Y151N – желтый, WasCFP (V61K / D148G / Y151N / L207Q) - зеленый. (b) Моделирование аминокислотных замен V61K, D148G, Y151N и L207Q на основе кристаллической структуры Cerulean. Рисунок воспроизводится по статье Sarkisyan K.S., **Yampolsky I.V.**, Solntsev K.M., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Tryptophan-based chromophore in fluorescent proteins can be anionic. **Scientific Reports** 2012, 2, Art. 608.

Варианты, отобранные после нескольких последовательных раундов случайного мутагенеза, показали постепенное увеличение доли пика поглощения при 494 нм (рис. 3.2). Для дальнейшей работы нами был выбран наиболее яркий из полученных мутантных белков, несущий аминокислотные замены: V61K, D148G, Y151N и L207Q, названный нами WasCFP. WasCFP обладал зеленой флуоресценцией (максимумы возбуждения и испускания при 494 и 505 нм, соответственно, квантовый выход 85%; коэффициент поглощения при 494 нм $51000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), хотя более коротковолновые спектральные линии, свойственные Cerulean (максимумы возбуждения и эмиссии при 437 и 477 нм соответственно, квантовый выход 48%; коэффициент поглощения при 437 нм $28000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) также сохранялось.

pH-Зависимые спектральные изменения в спектрах флуоресцентных белков повсеместно используются для определения степени ионизации хромофора [Chudakov и др., 2010; Piatkevich и др., 2010; Tsien, 1998] В частности, можно было ожидать увеличения доли депротонированной формы хромофора с увеличением pH. Исследование спектральных свойств WasCFP выявило их сильную зависимость от pH и температуры, при изменении которых наблюдалась быстрая обратимая конверсия между голубой и зеленой формами (рис. 3.3). Щелочные условия и/или низкая температура оказались стабилизирующими факторами для зеленой формы WasCFP. Таким образом, зеленая форма WasCFP доминировала как при pH 7,4 и 4°C, так и при pH 8.1 и 25°C. Следует отметить, что в спектре поглощения зеленой формы WasCFP наблюдался батохромный сдвиг, аналогичный депротонированной форме mCerulean в сильнощелочных условиях (рис. 3.1d). Из полученных данных нами был сделан вывод о том, что зеленая форма WasCFP имеет Trp66 в анионном состоянии (рис. 3.3c).

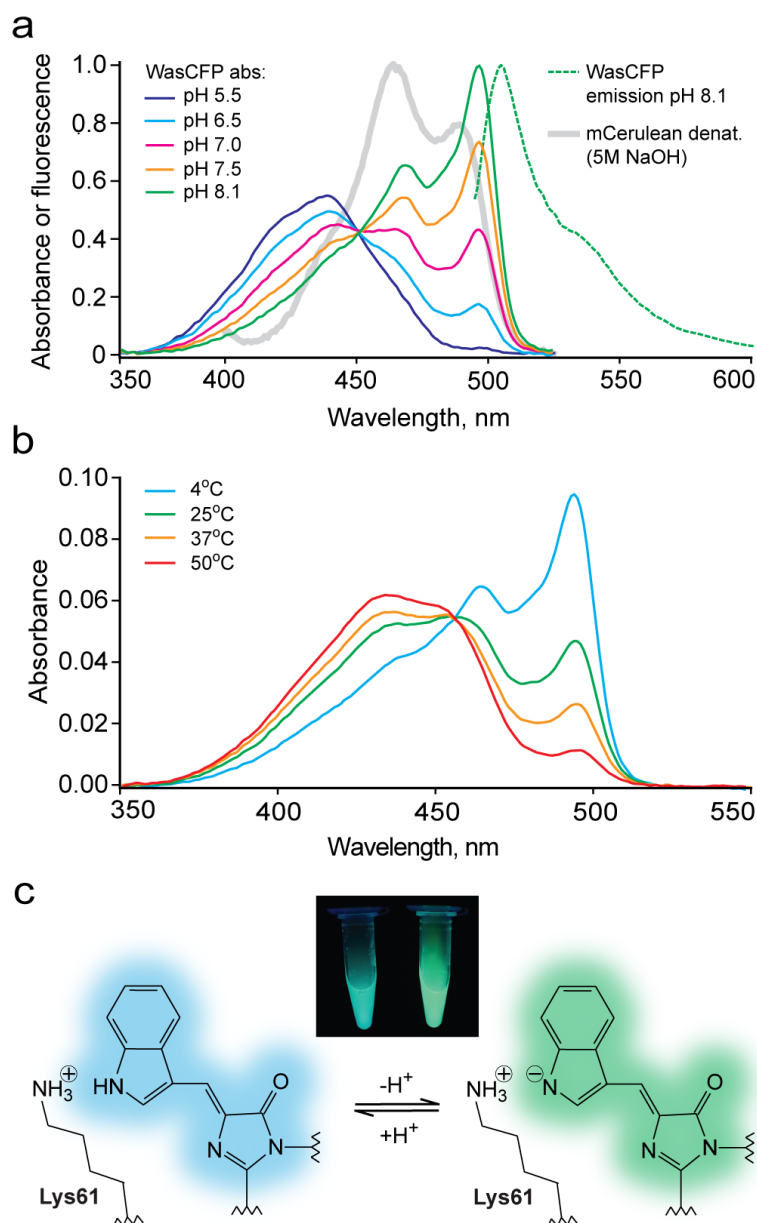


Рисунок 3.3. Спектральные свойства WasCFP. (a) Спектры поглощения WasCFP при различных pH (сплошные цветные линии) при 4°C. Пунктирная зеленая линия – эмиссия WasCFP при pH 8.1. Серая линия – спектр поглощения mCerulean, денатурированного в щелочи. (b) Температурная зависимость спектра поглощения WasCFP при pH 7.4. (c) Флуоресценция WasCFP при pH 5.0 и pH 8.0 (облучение ультрафиолетовым светом). Нейтральная голубая форма хромофора подвергается ионизации при повышении pH с получением депротонированной формы, стабилизируемой положительно заряженным Lys61. Рисунок воспроизводится по статье Sarkisyan K.S., **Yampolsky I.V.**, Solntsev K.M., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Tryptophan-based chromophore in fluorescent proteins can be anionic. **Scientific Reports** 2012, 2, Art. 608.

Неожиданным оказалось спектральное поведение WasCFP в растворах мочевины. Как правило, флуоресцентные белки устойчивы к действию таких денатурирующих агентов, как растворы мочевины или гидрохлорида гуанидиния даже при высоких концентрациях последних [Verkhusha и др., 2003], однако поглощение WasCFP изменялось уже в присутствии 0,25М раствора мочевины. Интересно отметить, что наличие мочевины приводило к увеличению пика при 494

нм (зеленая форма), но не влияло на поглощение при более коротких длинах волн (голубая форма).

Для WasCFP замена V61K является ключевой, поскольку одной этой мутации было достаточно для появления новой зеленой флуоресцентной формы. Несмотря на то, что рКа боковой цепи лизина в растворе равен 10.4, известно, что он может достигать значения 12.1 в составе белка [Kesvatera и др., 1996]. Остальные мутации способствовали смещению равновесия от голубой формы в зеленую, а также повысили сворачиваемость и яркость результирующего белка. Анализ кристаллической структуры Cerulean [Lelimosin и др., 2009] выявил, что боковая цепь аминокислоты в положении 207 находится в тесном контакте с боковой цепью аминокислоты в положении 61. Как следствие замена L207Q, вероятно, способствует изменению конформации Lys61. Также хорошо известно, что замены в позиции 148 имеют большое влияние на свойства хромофоров [Chudakov и др., 2010; Piatkevich и др., 2010; Rizzo и др., 2004; Tsien, 1998]. Мы полагаем, что замена Asp148 на меньшую аминокислоту Gly обеспечивает дополнительное пространство рядом с хромофором, что позволяет ему адаптироваться к микроизменениям среды, обусловленным объемной боковой цепью Lys61.

Существует ли хромофор WasCFP в депротонированном состоянии? Так как прямое наблюдение ионизации хромофора флуоресцентного белка является затруднительным, для ответа на этот вопрос нами было применено рН-титрование, а также другие методы косвенного доказательства ионизации.

Убедительным доказательством анионной природы хромофора WasCFP стали данные рН-титрования. Действительно, увеличение рН от кислых до мягких основных условий приводило к конверсии WasCFP из голубой формы в зеленую. Этот переход был аналогичен наблюдаемому рН-зависимому батохромному сдвигу при депротонировании фенольного гидроксила в различных зеленых, желтых и красных флуоресцентных белках, содержащих хромофоры на основе тирозина. Более того, в спектре поглощения mCerulean, денатурированного в сильнощелочных условиях (5M NaOH, хромофор mCerulean находится в анионной форме), наблюдается батохромный сдвиг, подобный зеленой форме WasCFP.

Стоит заметить, что зеленая форма возникла в результате введения положительно заряженного лизина, способствующего стабилизации отрицательного заряда хромофора. Температурную зависимость спектров поглощения WasCFP можно объяснить взаимодействием между Lys61 и индольным фрагментом хромофора. Принимая во внимание высокий рКа, отщепление протона, вероятно, сильно зависит от близости аминогруппы Lys61 к атому азота индола. Как следствие, увеличение внутримолекулярных движений в белке при более высоких температурах, приводит к исчезновению зеленой формы.

Стоит рассмотреть также два других возможных объяснения наблюдаемого батохромного сдвига в спектрах WasCFP. Во-первых, известно, что формирование ацилиминной связи в хромофорах DsRed-типа расширяет сопряженную электронную систему хромофора и, как следствие, приводит к сильному смещению в красную область спектра. Примером флуоресцентного белка, содержащего триптофан и ацилиминную связь в хромофоре, является mHoneydew – мутантная форма мономерного красного флуоресцентного белка mRFP [Shaner и др., 2004]. Этот белок обладает широким двухпиковым спектром с пиками возбуждения при 487 и 504 нм, пиками испускания при 537 и 562 нм и проявляет высокую рН-стабильность (рКа <4). Описанные свойства mHoneydew значительно разнятся с таковыми WasCFP. Более того, гель-электрофорез денатурированного WasCFP не выявил фрагментации белковой цепи, являющейся характерной для хромофоров белков с DsRed-типа [Gross

и др., 2000]. Как следствие, представляется сомнительным, что формирование ацилиминного фрагмента DsRed-типа является причиной быстрой и обратимой рН- и температурно-зависимой конверсии голубой и зеленой форм в WasCFP.

Вторым возможным объяснением батохромного сдвига в спектрах флуоресцентных белков является наличие стэкинг-взаимодействия между хромофором и его аминокислотным окружением. Подобный эффект был впервые обнаружен в желтых мутантах GFP, содержащих Tyr203, играющий ключевую роль в стэкинг-взаимодействии с хромофором [Chudakov и др., 2010; Ormö и др., 1996]. Введение Tyr203 в ECFP привело к образованию мутанта ECGFP, отличающегося батохромным сдвигом спектров (максимумы поглощения и эмиссии при 463 и 506 нм соответственно) [Sawano, Miyawaki, 2000]. В отличие от WasCFP, ECGFP обладал чрезвычайной рН-стабильностью и не претерпевал практически никаких изменений в спектре поглощения в диапазоне рН от 4 до 12. Очевидные различия в свойствах ECGFP и WasCFP, а также отсутствие остатков ароматических аминокислот вблизи хромофора WasCFP позволили нам сделать вывод о том, что стэкинг-взаимодействия также не являются причиной наблюдаемого батохромного сдвига в спектрах WasCFP.

Таким образом, нами было доказано, что хромофоры флуоресцентных белков на основе триптофана могут существовать в депротонированном состоянии. Также на примере нового мутантного белка впервые наблюдалось депротонирование индольного фрагмента в биологической системе. Переход между протонированным и депротонированным Trp66 во флуоресцентных белках стал новым способом контроля спектральных свойств ФБ. Высокий квантовый выход флуоресценции WasCFP делает его отличным донором энергии при ферстеровском резонансном переносе энергии (FRET). Высокая чувствительность WasCFP к воздействиям среды (в частности, к присутствию мочевины) означает, что даже незначительные конформационные изменения в белковой глобуле влекут за собой значительные изменения в его спектрах. Это свойство является актуальным для создания генетически кодируемых сенсоров, в которых изменения конформации чувствительных доменов в ответ на изменение среды приводят к легко наблюдаемым изменениям флуоресцентных свойств белка.

4. CompX и AsLn2 – природные аналоги люциферина биOLUMИнесцентного червя *F. heliota*

На основе сравнительных исследований физиологии и биохимии различных видов почвенных червей долгое время существовала гипотеза о единой природе механизма, лежащего в основе свечения этих животных. Все изученные до 2014 года олигохеты (*Diplocardia*, *Diplostrema*, *Fletcherodrilus*, *Octochaetus*, *Pontodrilus*, и *Spenceriella*) секретировали люминесцентную слизь. Характерной чертой их биOLUMИнесцентных реакций являлось участие перекиси водорода, более того, люциферин вида *Diplocardia longa* – N-изовалерил-3-амино-1-пропаналь – проявлял биOLUMИнесцентную активность в присутствии люцифераз всех изученных олигохет [Ohtsuka, Rudie, Wampler, 1976].

В 1990 году Валентином Петушковым с коллегами в окрестностях Красноярска был обнаружен новый вид биOLUMИнесцентных олигохет *Fridericia heliota* Zaleskaja, 1990 (Annelida: Clitellata: Oligochaeta: Enchytraeidae). Это небольшие (~ 15 мм в длину, 0,5 мм в диаметре и ~ 2 мг по массе), бело-желтые черви, обитающие в лесной почве и испускающие синий свет (λ_{\max} люминесценции 478 нм) при механической стимуляции. Люминесценция *Fridericia heliota* локализована в эпидермальных клетках (рис 4.1).[Rota и др., 2003].

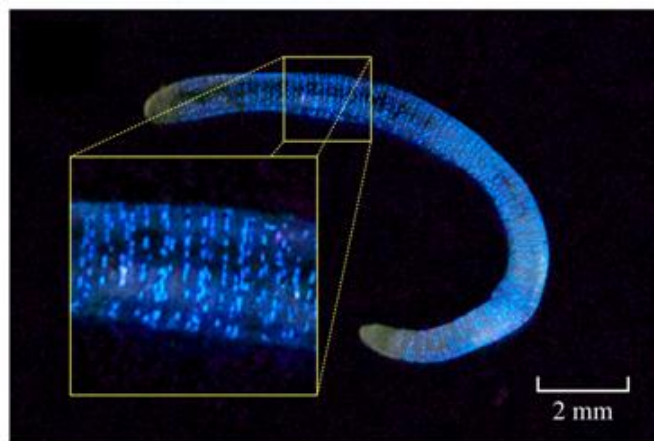


Рисунок 4.1. Биолуминесценция почвенных червей *Fridericia heliota*.

Несмотря на то, что этот вид был впервые описан в 1990 году [Petushkov, Rodionova, Bondar, 2003; Rodionova, Bondar, Petushkov, 2003], более глубокое изучение механизма свечения этих червей началось лишь в 2003. Первичные исследования были направлены на таксономическое описание нового вида червей и разделение компонентов их биолуминесцентной реакции. Было установлено, что новая система включает в себя пять компонентов, необходимых для испускания видимого света λ_{max} при 478 нм: ~ 70 кДа люциферазу, ~ 0.5 кДа люциферин, кислород воздуха, ионы магния и АТФ [Petushkov, Rodionova, Bondar, 2003; Rodionova, Bondar, Petushkov, 2003]. Новая биолуминесцентная система проявляла pH- и температурную зависимость, с максимальным светоиспусканием наблюдаемым при pH 8.2 и 33°C соответственно [Petushkov, Rodionova, 2005]. Также было установлено, что неионогенные детергенты, такие как Triton X-100, способствуют протеканию реакции биолуминесценции, в то время как анионные детергенты и различные анионы обладают ингибирующими свойствами [Rodionova, Petushkov, 2006]. Более того, было установлено, что биолуминесцентная система червей *F. heliota* является уникальной, так как люциферин и люцифераза этого червя не обладают люминесцентной активностью в перекрестных реакциях с люциферазами или люциферинами других организмов.

Дальнейшие исследования были направлены на выделение и установление структуры люциферина *Fridericia heliota* [Marques и др., 2011; Petushkov, Rodionova, 2007]. Низкомолекулярная фракция экстракта червей содержала соединения не установленного состава, названные CompX, AsLn1, AsLn2 и AsLn3. Эти соединения проявляли хроматографическую подвижность и УФ-спектральные свойства, близкие к таковым люциферина *Fridericia heliota*, однако не обладали люминесцентной активностью при смешивании с люциферазой этого червя или другими известными люциферазами.

Мы предположили, что эти соединения могут являться неактивными природными аналогами люциферина – его биосинтетическими предшественниками или продуктами деградации. Принимая во внимание чрезвычайно малую концентрацию люциферина, тогда как количества CompX и AsLn2 в 30 и 20 раз соответственно превышали количество люциферина, мы пришли к выводу о необходимости в первую очередь определить структуру и синтезировать CompX.

Серия последовательных хроматографических опытов позволила выделить 150 мкг чистого CompX (3.4.1) и ~ 100 мкг чистого AsLn2 (3.4.2) из 90 г биомассы *F. heliota*. УФ-спектры поглощения 3.4.1 (рис. 4.2) выявили pH-зависимость в области 2.8-5.0. При pH 2.8 наблюдаются максимумы при 234 нм (локальный максимум) и при

296 нм, тогда как при рН 4.0 λ_{max} при 230 нм (локальный максимум) и 294 нм, а при рН 5.0 λ_{max} при 228 нм (локальный максимум) и 288 нм, что позволило предположить наличие ионогенных групп с pK_a около 4.

Исследуемые соединения CompX и AsLn2 обладали способностью к флуоресценции, схожей с таковой люциферина (рис. 4.2b), с длинами волн максимальной эмиссии (λ_{em}), лежащими в синей области видимого спектра. Спектр флуоресценции CompX показал $\lambda_{\text{em}}=460$ нм в кислом водном растворе и $\lambda_{\text{em}}=457$ нм в щелочном водном растворе. Стоксов сдвиг CompX был достаточно велик как в кислой (150 нм), так и в щелочной (167 нм) средах, что позволило предположить сильную делокализацию электронов.

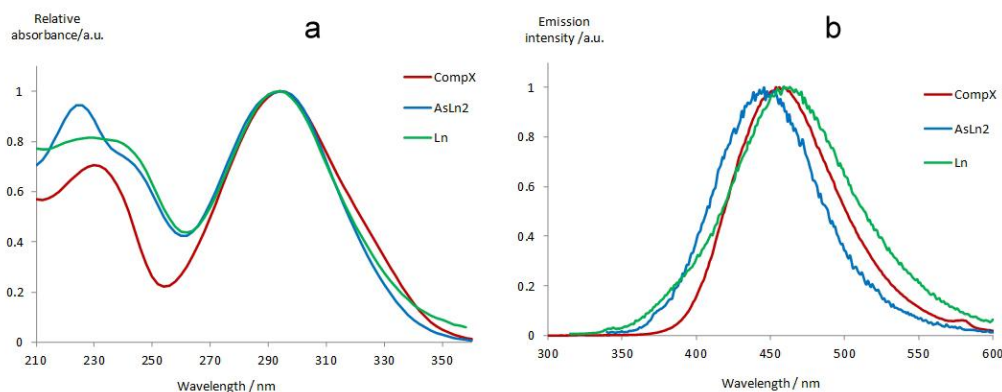


Рисунок 4.2. Спектры поглощения (a) и флуоресцентной эмиссии (b) люциферина *Fridericia heliota* (зеленый), AsLn2 (синий) и CompX (красный) при рН 4.0 в воде. Рисунок воспроизводится по статье Petushkov V.N., Tsarkova A.S., Dubinnyi M.A., Rodionova N.S., Marques S.M., Esteves da Silva J. C.G., Shimomura O., Yampolsky I.V. CompX, a luciferin-related tyrosine derivative from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. Structure elucidation and total synthesis. **Tetrahedron Lett.** 2014, 55, 460-462.

Установление структуры CompX

В масс-спектрах высокого разрешения CompX наблюдался молекулярный ион с m/z 239.0598, соответствующий элементному составу $C_{11}O_6H_{11}^+$, (расчетное m/z 239.0550). В спектре 1H ЯМР CompX наблюдались характерные пики 3 протонов в ароматической области: дублет с небольшой константой спин-спинового взаимодействия (2.2 Гц, H5), дублет с большой константой (8.5 Гц, H8) и дублет дублетов (2.2 и 8.5 Гц, H9), с равными значениями интегралов. Такая картина характерна для бензольного кольца с тремя незамещенными протонами, где два протона занимают соседнее положение, а третий находится в мета-положении к первому и пара-положении ко второму протону. Также в спектре наблюдались синглет при 6.89 м.д. (1 протон) и метокси-группа (три протона). Таким образом, в спектре ПМР наблюдались 7 из 10 протонов. 1H ЯМР спектры CompX проявляли сильную рН-зависимость, что позволило предположить наличие одной или нескольких ионизуемых групп. Все одиннадцать атомов углерода давали сигналы в спектрах 2D HSQC и 2D HMBSC: 8 сигналов в слабом поле, 2 карбоксильных углерода и 1 сигнал метокси-группы. Анализ кросс-пиков двухмерного спектра HMBSC позволил установить, что метоксигруппа связана с атомом углерода C2. Для того же углерода наблюдался кросс-пик HMBSC с винильным протоном H3, который, в свою очередь, коррелировал с атомами углерода 1, 2, 5 и 9 (рис. 4.3a). Для карбоксильной группы C10 наблюдался кросс-пик только с дублетом H-5. Принимая во внимание тот

факт, что в спектрах НМВС, за редким исключением, невозможно различить взаимодействия более чем через три связи, единственной структурой, которая согласуется с полученными данными ЯМР и масс-спектрометрии, является 5-(2-карбоксо-2-метоксивинил)-2-гидроксибензойная кислота (рис. 4.3b,c). В спектрах ЯМР не наблюдались сигналы трех протонов: двух карбоксильных групп и фенольного гидроксила. Для определения конфигурации трехзамещенной двойной связи нами были получены синтетические пространственные изомеры (*E*- и *Z*-) CompX, спектры ROESY которых были сопоставлены с природным CompX.

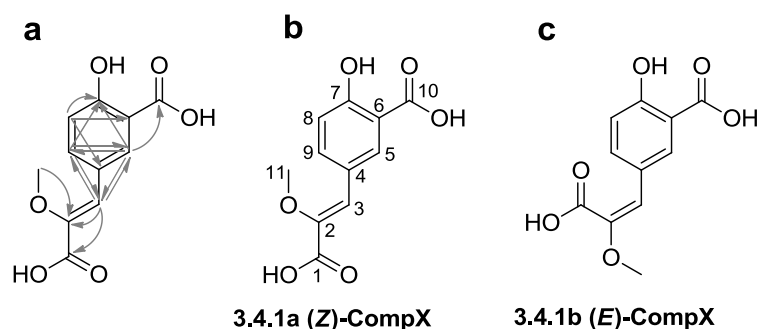


Рисунок 4.3. Структуры CompX и CompX (*E*)-изомера. (a) Наблюдаемые кросс-пики в спектрах НМВС природного CompX. (b) Нумерация углеродов в CompX (c) Синтетический (*E*)-изомер CompX с противоположной конфигурацией C2-C3 двойной связи.

Ключевым этапом синтеза CompX являлось олефинирование 5-формилсалициловой кислоты по Хорнеру-Вадсворту-Эммонсу, позволившее получить оба пространственных изомера CompX в соотношении 2:1 (*Z*:*E*) (схема 4.1). Согласно спектрам поглощения и флуоресцентной эмиссии, а также данным ряда 1D и 2D спектров ЯМР, основной *Z*-изомер был идентичен природному образцу (рис. 4.4), тогда как минорный *E*-изомер отличался наличием кросс-пика в спектре ROESY между метокси-группой H11 и винильным протоном H3 (рис. 4.5). Наиболее существенными отличиями изомеров были химические сдвиги углерода C3 и соответствующего протона (Δ 18.2 и 0.93 м.д. соответственно), а также отсутствие у *E*-изомера CompX флуоресцентных свойств.

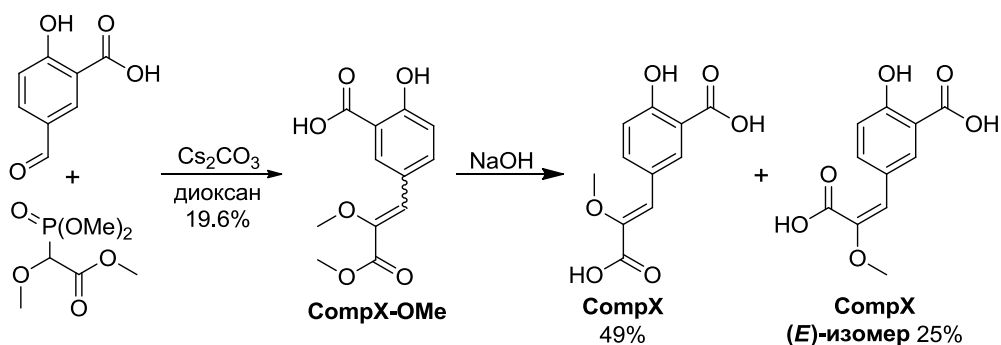


Схема 4.1. Синтез двух пространственных изомеров CompX (*E*- и *Z*-).

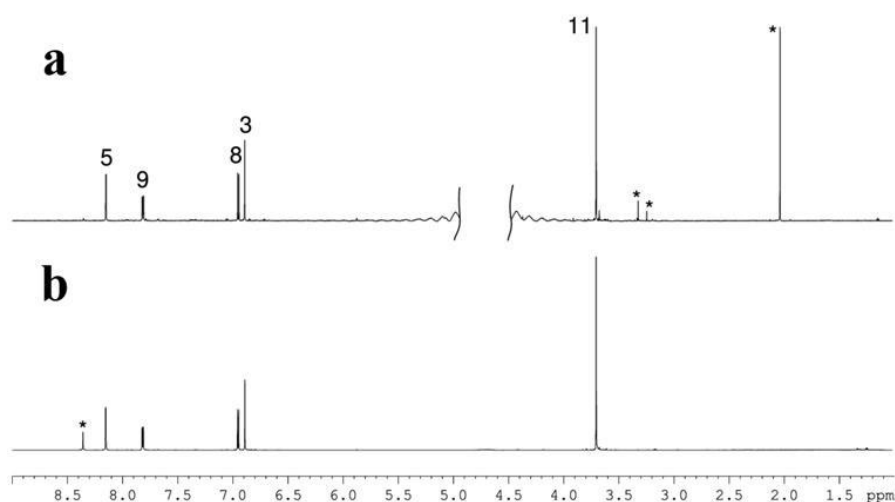


Рисунок 4.4. ^1H ЯМР спектры (а) синтетического *CompX* и (б) природного *CompX*. Нумерация атомов согласно рисунку 4.3б.

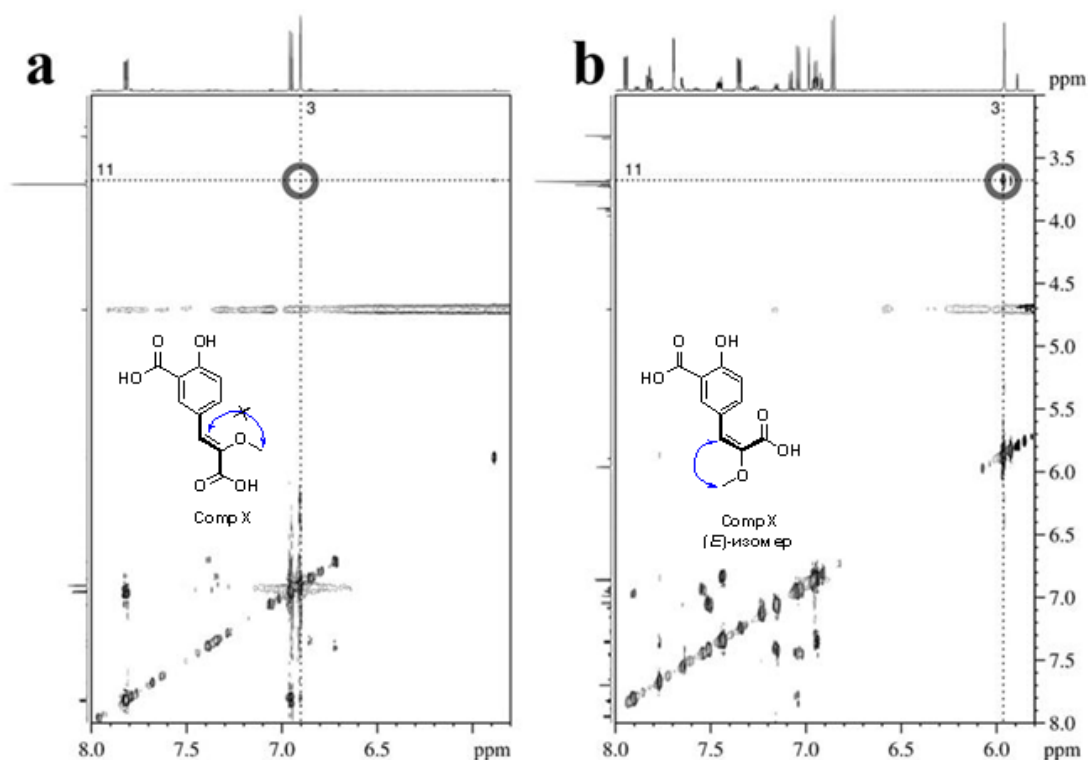


Рисунок 4.5. Сравнение спектров ROESY синтетического *CompX* (а) и (*E*)-изомера *CompX* (б). Положение наблюдаемого кросс-пика H3-H11 в спектре (*E*)-изомера *CompX* и его отсутствие в спектре (*Z*)-*CompX* обозначено серым кругом.

Установление структуры *AsLn2*.

В масс-спектрах высокого разрешения очищенного природного *AsLn2* наблюдался молекулярный ион с m/z 530.21296, соответствующий элементному составу $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_9^+$, (расчетное m/z 530.21385).

Для установления структуры *AsLn2* был применен ряд экспериментов ЯМР: ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC и ^1H - ^{15}N HMBC. Анализ спектра ЯМР ^1H выявил наличие в структуре соединения *AsLn2* алифатической цепи, состоящей из пяти звеньев ($\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), спиновой системы AMX, двух ароматических дублетов (2 протона каждый) и пяти сигналов, сходных с сигналами *CompX*. Данные

химических сдвигов протонного и углеродного спектров природного AsLn2 в сочетании с данными корреляционного 2D НМВС спектра позволили установить, что пятичленная алифатическая цепь является фрагментом лизина, в то время как спиновая система АМХ и ароматические дублеты принадлежат остатку тирозина. В двумерном спектре НМВС ^{15}N - ^1H наблюдались лишь два кросс-пика между протонами в положении С3'' и атомом азота фрагмента тирозина (химический сдвиг 121.24). Химический сдвиг сигнала ^{15}N однозначно свидетельствует о вовлеченности атома азота тирозина в пептидную связь. Атомы азота лизинового фрагмента в спектре не наблюдались в силу низкой чувствительности ^{15}N -ЯМР спектроскопии. Химические сдвиги видимых в спектрах ^1H и ^{13}C сигналов пяти протонов и десяти атомов углерода, не относящиеся к остаткам лизина и тирозина, были близки к химическим сдвигам CompX. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что замещенный CompX является фрагментом молекулы AsLn2, причем его карбоксильные группы вовлечены в образование пептидных связей с двумя другими фрагментами этого соединения: лизином и тирозином. Это предположение было подтверждено четырьмя протон-углеродными взаимодействиями через три связи в корреляционном спектре НМВС (рис. 4.6b). Мы предположили, что конфигурация двойной связи в молекуле AsLn2 аналогична конфигурации CompX по ряду причин. Во-первых, химический сдвиг винильного протона H3' составляет 6,74 м.д., тогда как химический сдвиг сигнала протона в *цис*-конфигурации находился бы в более сильнополюной области спектра (отличие на ~1 м.д). Во-вторых, AsLn2 обладает флуоресцентными свойствами, в то время как (*E*)-изомер CompX, а также его производные по карбоксильной группе (сложные эфиры и амиды) флуоресценцией не обладают (данные не показаны). Полученные данные ЯМР и масс-спектрометрии наилучшим образом соответствовали структуре (*Z*)-2-амино-6-(5-(3-((1-карбокси-2-(4-гидроксифенил)этил)амино)-2-метокси-3-оксипроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибенамидо)гексановой кислоты (3.4.2).

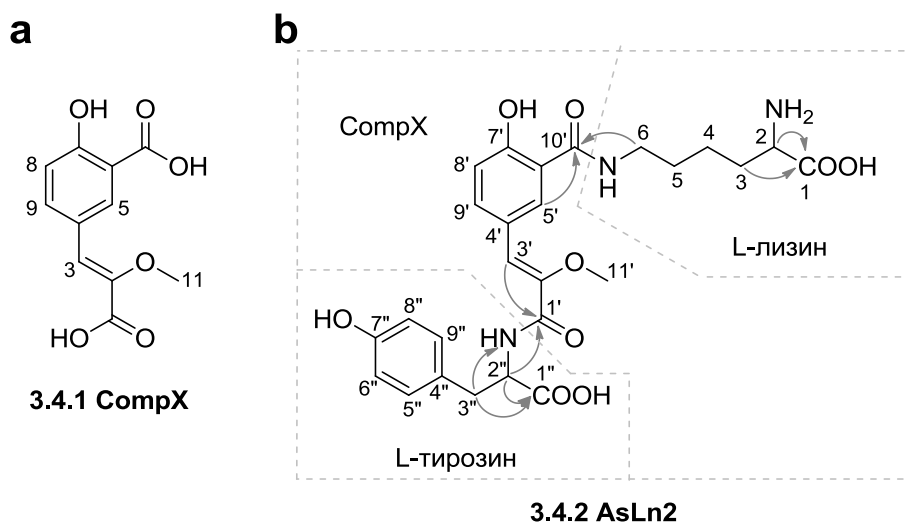


Рисунок 4.6. Сравнение структур CompX (a) и AsLn2 (b). В (b) Стрелки указывают важные корреляционные взаимодействия НМВС $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ и $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$, на основании которых была установлена структура AsLn2.

Для подтверждения структуры AsLn2, а также с целью установить относительную стереохимию этой молекулы нами осуществлен встречный синтез этого соединения. Для синтеза этого модифицированного трипептида в качестве предшественника был использован метиловый эфир CompX, полученный нами ранее

(схема 4.2). Последовательная конденсация CompX-OMe с лизином и тирозином и последующее двухэтапное удаление сложноэфирных защитных групп карбоксильных групп аминокислот и Boc-защиты аминогруппы лизина привели к получению искомого аналога люциферина AsLn2 **3.4.2**. Спектральные данные ЯМР продукта последней стадии синтеза оказались абсолютно идентичны природному образцу, что позволило предположить идентичность порядка химических связей и относительной стереохимии двух молекул.

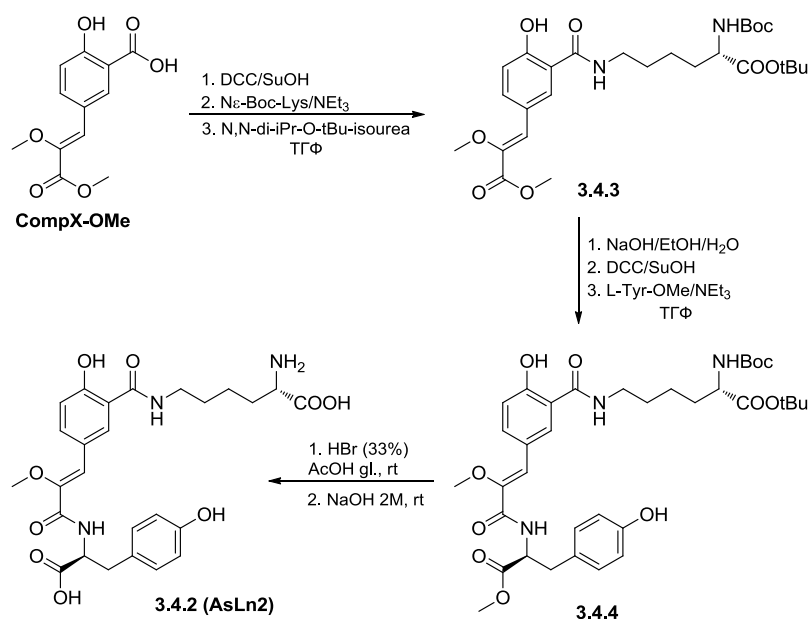


Схема 4.2. Синтез соединения AsLn2.

Полученные данные позволили установить L-конфигурацию обоих стереоцентров в молекуле AsLn2, и, таким образом, его структура была окончательно определена как (S)-2-амино-6-(5-((Z)-3-(((S)-1-карбокси-2-(4-гидроксифенил)этил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота.

5. Люциферин *Fridericia heliota*

Однозначное установление структур CompX и AsLn2 позволило перейти к основной задаче в исследовании биолюминесцентной системы червей – установлению структуры люциферина *Fridericia heliota*. Предварительный анализ спектров ЯМР обнаружил наличие характерного для CompX паттерна ароматических протонов в спектрах люциферина *F. heliota*, что свидетельствовало о том, что замещенный CompX является структурным фрагментом люциферина (рис. 5.1).

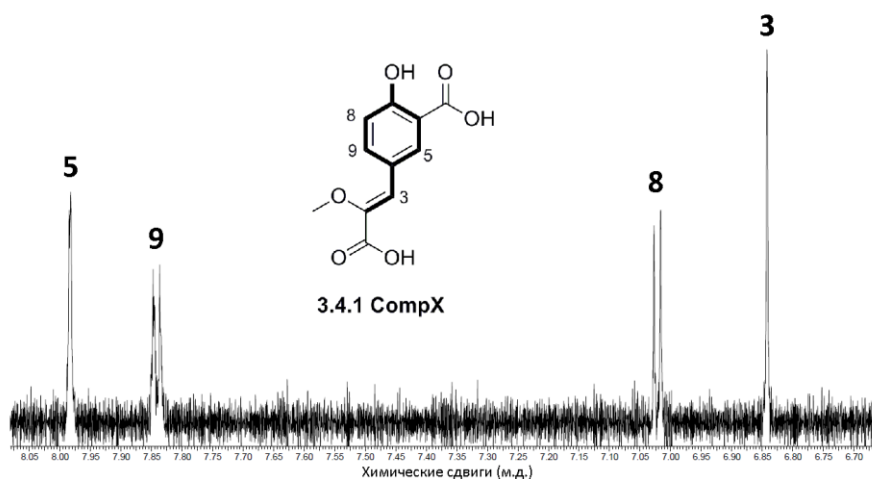


Рисунок 5.1. Спектр ЯМР ^1H (ароматическая область) природного люциферина *F. heliota* в D_2O . Структура предполагаемого фрагмента люциферина *Fridericia heliota* (жирн.) согласно предварительным данным спектров ЯМР ^1H .

Выделение и определение структуры люциферина *Fridericia heliota* было сильно затруднено малым количеством биомассы червя и низким содержанием люциферина (~ 0.1 мкг/г необработанной биомассы) [Petushkov, Rodionova, 2007]. Общее количество люциферина, выделенного из 90 г биомассы червя составило лишь 0.005 мг, что позволило нам получить только спектры ^1H , COSY и частичный ^{13}C -HSQC ЯМР. На основании полученных данных были предложены три фрагмента структуры люциферина: остаток CompX, а также остатки лизина и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) (рис. 5.2). Малое количество люциферина не позволило нам получить спектры 1D ^{13}C и НМВС, которые могли бы раскрыть сочленение этих фрагментов в молекуле и указать на наличие негидрогенизированных атомов углерода.

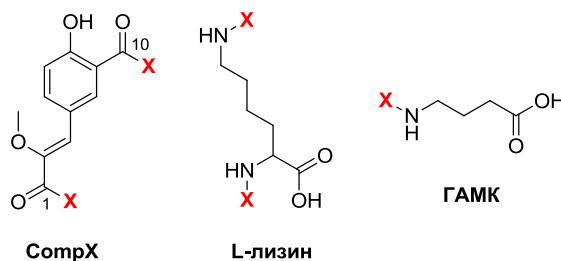


Рисунок 5.2. Фрагменты люциферина *F. heliota* согласно данным ^1H , COSY и частичных ^{13}C -HSQC ЯМР спектров.

Очевидно, что самый вероятный путь образования стабильного соединения тремя указанными фрагментами, не затрагивая ни одной из их С-Н связей – образование пептидных связей между четырьмя карбоксильными и тремя аминогруппами фрагментов. В связи с вышеизложенным, мы провели ^1H ЯМР-титрование люциферина в области рН 3.1 ÷ 7.5 с целью различить свободные карбоксильные группы и карбоксильные группы, образующие пептидные связи с аминогруппами лизина и ГАМК. рН-Зависимость химических сдвигов протонов, соседствующих с титруемыми карбоксилатами, указала на то, что карбоксильные группы лизина и ГАМК свободны, тогда как два карбоксилата CompX-фрагмента, вероятно, вовлечены в образование пептидных связей (рис. 5.3).

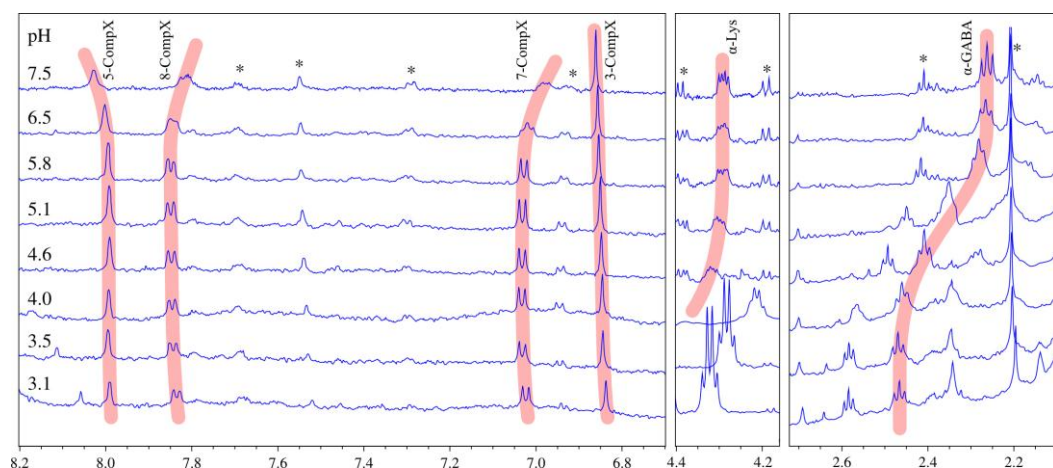


Рисунок 5.3. спектры ЯМР ^1H люциферина *Fridericia* (D_2O , 30°C) при различных значениях pH. Пики протонов люциферина обозначены кривыми (розовый), примеси обозначены звездочками. Изменения хим. сдвигов фрагмента CompX при pH 6.5 и 7.5 объясняются титрованием 7-ОН протонов CompX, свободные карбоксильные группы $\alpha\text{-Lys}$ и $\alpha\text{-ГАМК}$ отвечают за изменения химических сдвигов соседних протонов титрованию при кислых значениях pH.

Спектр HRMS люциферина выявил протонированный молекулярный ион с $m/z=524.1851$, соответствующей молекулярной формулой к которому является $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_{11}^+$. Разницей между этой формулой и суммой (CompX + лизин + ГАМК - $2\text{H}_2\text{O}$) является фрагмент $\text{C}_2\text{O}_3\text{H}$. В данном вычислении отщепление двух молекул воды предполагается в связи с образованием двух пептидных связей между тремя установленными фрагментами. Также, данные масс-спектров выявили два интенсивных пика, соответствующих отщеплению молекулы CO_2 или CO_2 и CO одновременно, но не CO отдельно. На основе всех вышеперечисленных данных мы предположили наличие монозамещенного остатка щавелевой кислоты как недостающего фрагмента люциферина (рис. 5.4).

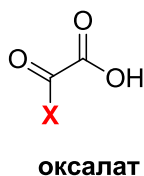


Рисунок 5.4. Оксалат – недостающий фрагмент люциферина, невидимый в спектрах ЯМР.

Четыре изомерных структуры **3.5.1-3.5.4** (рис. 5.5) соответствовали данным ЯМР и масс-спектров. Эти изомеры различались лишь порядком пептидных связей, соединяющих четыре остатка, являющихся структурными элементами люциферина *F. heliota*: CompX, лизин, ГАМК и оксалат.

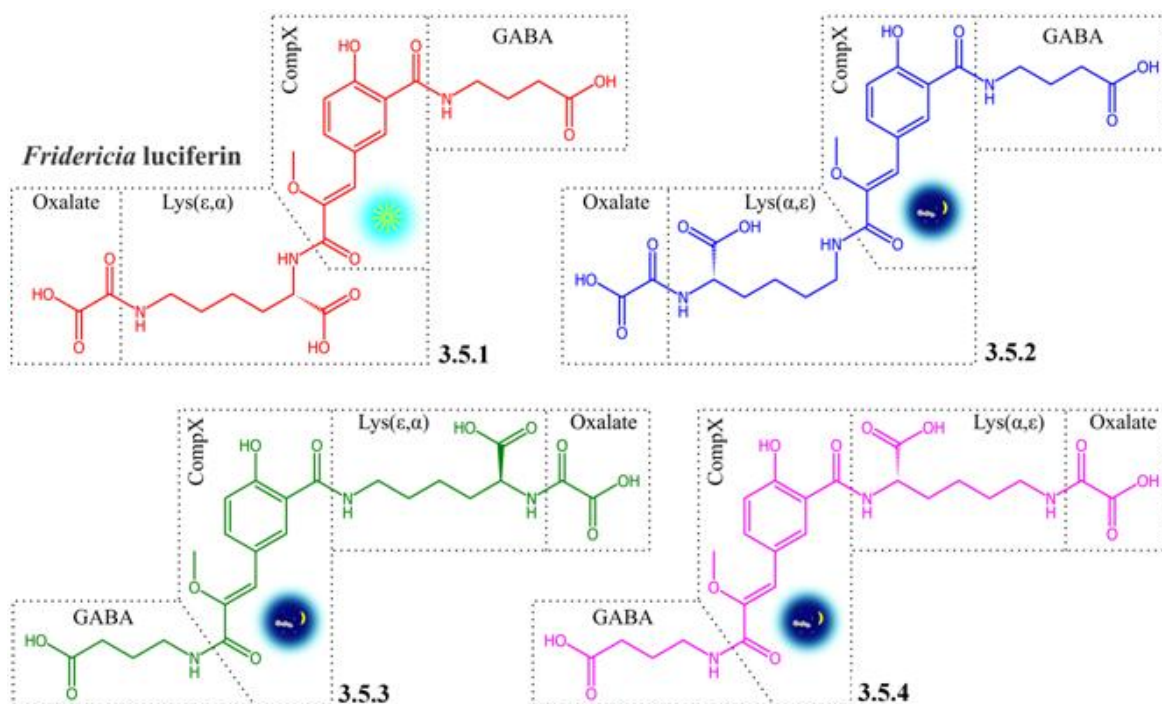


Рисунок 5.5. Четыре синтетических изомерных пептида **3.5.1-3.5.4**. Только соединение **3.5.1** испускает свет при смешении с люциферазой *Fridericia*.

Нами были синтезированы все четыре изомерных пептида **3.5.1-3.5.4**, спектры ЯМР которых сравнили со спектрами природного люциферина. Все полученные соединения обладали сходными спектральными характеристиками ЯМР в D₂O при pH 5.0. Однако только для соединения **3.5.1** наблюдались химические сдвиги ¹H и ¹³C, полностью соответствующие химическим сдвигам природного люциферина.

Нами также была исследована способность соединений **3.5.1-3.5.4** к испусканию света при добавлении к неочищенной люциферазе *F. heliota*, в присутствии АТФ и MgSO₄. В этих условиях люминесцентные свойства были обнаружены только у соединения **3.5.1**, спектр люминесценции и зависимость интенсивности свечения от концентрации которого оказались идентичными природному люциферину (рис. 5.6А, В).

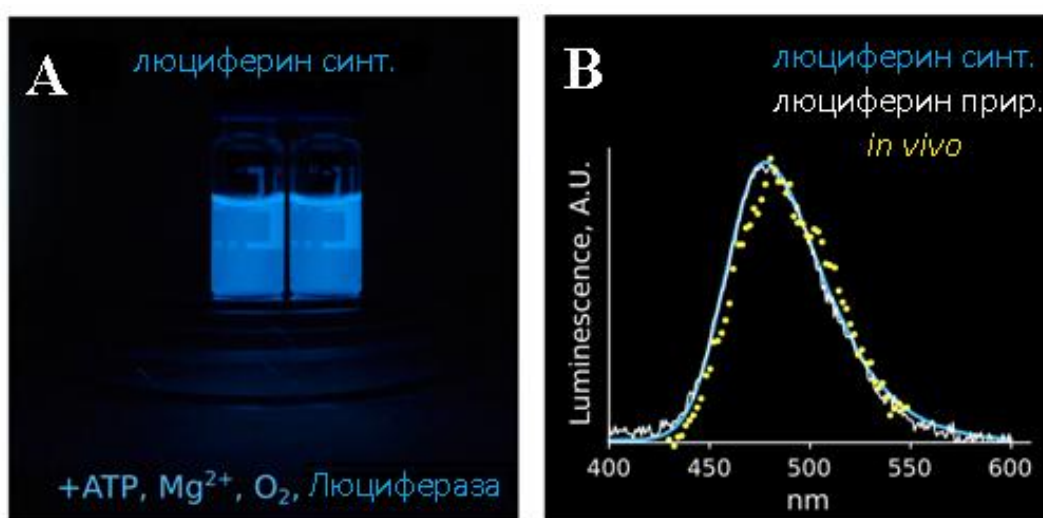


Рисунок 5.6. (А) Люминесценция синтетического люциферина *Fridericia*. (В) Сравнение спектров биолуминесценции червя *in vivo* и биолуминесценции природного и синтетического люцифериноров *in vitro*.

Таким образом, была установлена структура нового люциферина, являющегося ключевым компонентом новой АТФ-зависимой биолуминесцентной системы сибирского дождевого червя *Fridericia heliota*.

6. Механизм действия люциферина *Fridericia*

В связи с установлением структуры люциферина *Fridericia heliota* стала актуальной задача определения механизма его действия. Данная глава посвящена установлению структуры продукта окисления люциферина - оксилюциферина, что обеспечивает структурную основу для понимания нового механизма испускания света, лежащего в основе биолуминесценции *Fridericia*.

Оксилюциферин был получен путем смешивания 0.18 мг синтетического люциферина *F. heliota* с избытком АТФ и неочищенной люциферазой *F. heliota*, полученной после частичной очистки белкового экстракта из 40 г биомассы червя. Реакционная смесь испускала видимый свет, контроль за ходом реакции проводили с помощью ВЭЖХ-анализа аликвот (рис. 6.1), свидетельствующего об образовании основного продукта окисления люциферина со временем удерживания 18.2 мин. Через 25 часов, когда приблизительно 62% люциферина было израсходовано, реакция была остановлена добавлением муравьиной кислоты, а основной продукт реакции был выделен при помощи твердофазной экстракции с последующей ВЭЖХ, что позволило получить 0.8 оптических единиц оксилюциферина (длина волны поглощения λ_{abs} 310 нм).

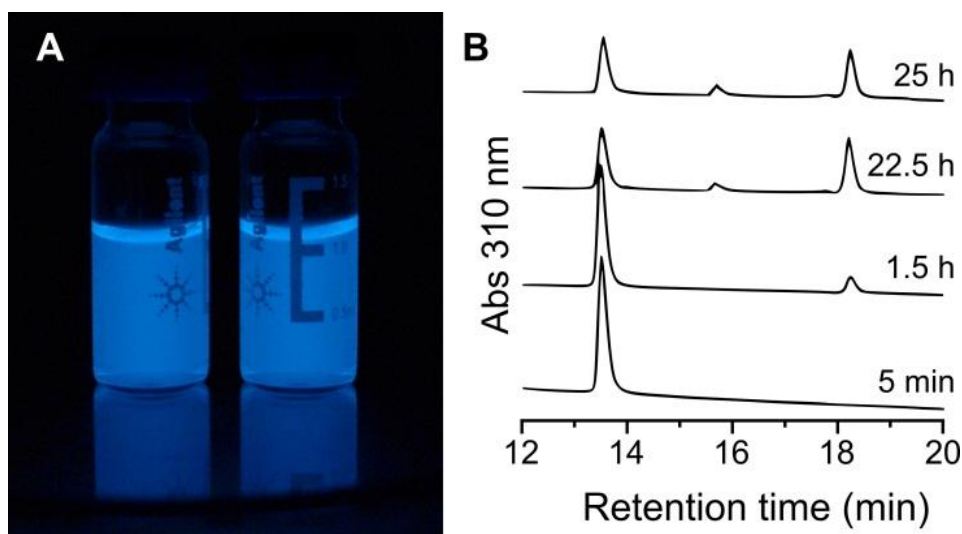


Рисунок 6.1. (а) Видимая люминесценция реакционной смеси. (б) Профили ВЭЖХ реакции биолуминесценции после 5 мин, 1.5 часов, 22.5 часов и 25 часов. Пики при 13.7 и 18.2 мин соответствуют люциферину и оксилюциферину.

Спектр ESI-HRMS оксилюциферина показал молекулярный ион с $m/z = 494.1769$, соответствующей молекулярной формулой к которому является $C_{22}H_{28}N_3O_{10}^+$. Эта формула соответствует отщеплению двух водородов, одного атома углерода и одного атома кислорода от молекулы люциферина *F. heliota*. Анализ данных ЯМР оксилюциферина (1H , COSY и HSQC) выявил исчезновение сигнала α -H лизина, а также существенные изменения химических сдвигов и мультиплетностей сигналов протонов β - CH_2 лизина по сравнению с люциферин (два мультиплета при 1.91 и 1.78 м.д. против триплета при 2,62 м.д.; рис. 6.2). Более того, наблюдался слабополюный сдвиг сигнала протона $CompX$ H-3 (~ 0.2 м.д.), в то время как все остальные сигналы протонов оставались неизменными. Все вышеперечисленные

данные однозначно подтверждали, что оксильюциферин *F. heliota* образуется путем окислительного декарбоксилирования лизинового остатка (схема 6.1), в отличие от нашей первоначальной гипотезы об участии карбоксильной группы фрагмента щавелевой кислоты в механизме биолюминесценции *F. heliota*.

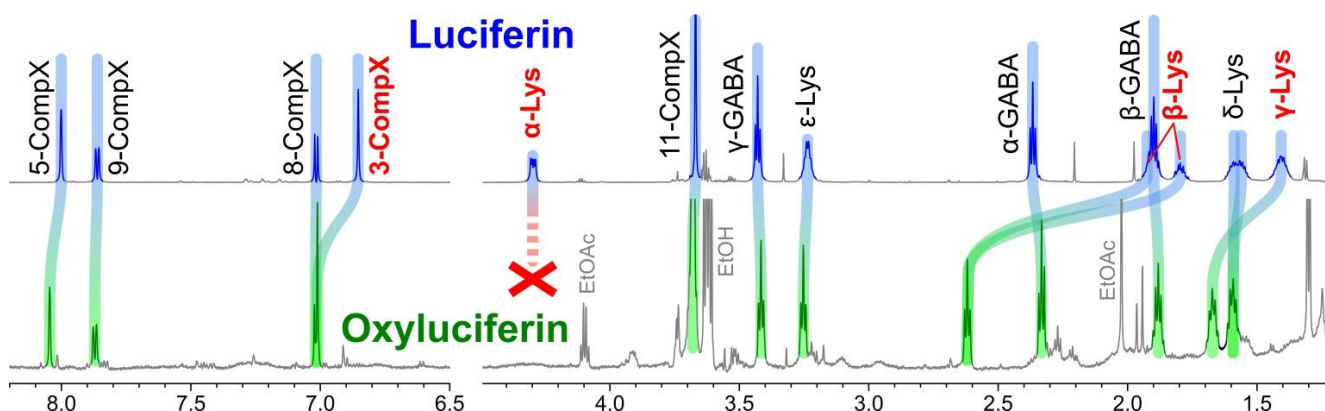


Рисунок 6.2. Сравнительный анализ спектров ЯМР ^1H люциферина *Fridericia* (синий, 800 МГц) и оксильюциферина (зеленый, 700 МГц) в D_2O при pH 5.0. Исчезновение α -H лизина и изменения химических сдвигов и мультиплетностей β - и γ - CH_2 протонов отмечены красным цветом. Соответствующие химические сдвиги обозначены синезелеными градиентными линиями. Примеси обозначены серым.

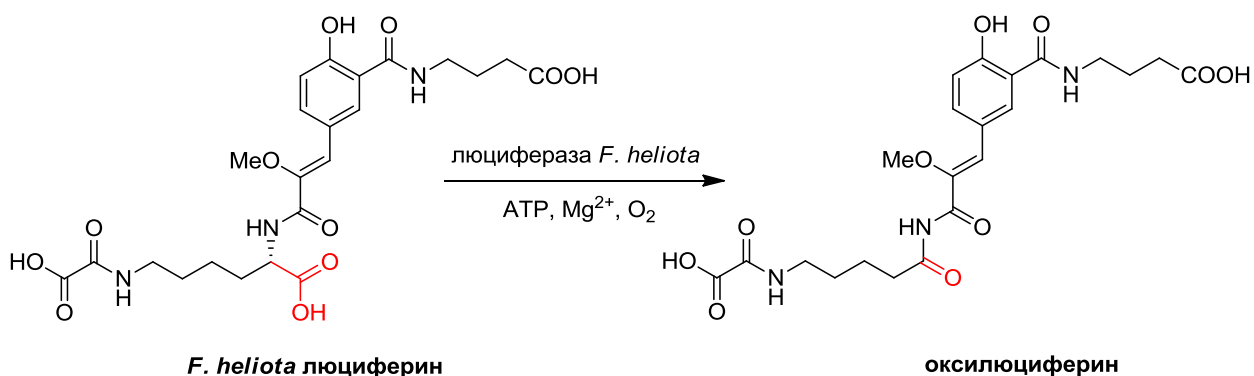


Схема 6.1. Реакция биолюминесценции *Fridericia heliota*. Структура оксильюциферина *F. heliota*.

Механизм реакции биолюминесценции червей *Fridericia*, вероятно, аналогичен хорошо изученному механизму биолюминесценции светлячков (схема 6.2). На первом этапе реакции люцифераза связывает люциферин и катализирует образование аденилата люциферина по карбоксильной группе лизина. Последующее депротонирование альфа-положения карбоксильной группы и присоединение молекулярного кислорода по образовавшемуся карбаниону приводят к образованию пероксид-аниона люциферина. Затем нуклеофильная атака пероксидной группы по аденилированному карбоксилу приводит к циклизации с образованием диоксетанона и отщеплению АМФ. Реакция завершается электроциклическим распадом диоксетанона с образованием CO_2 и оксильюциферина [Shimomura, 2006; Tsuji и др., 1977]. Однако, тогда как в механизме биолюминесценции светлячка вновь сформированная карбонильная группа становится частью сопряженной π -системы светоизлучающего фрагмента, в механизме *Fridericia* π -система люминофора (фрагмент CompX) остается неизменной в процессе окисления.

Роль фрагмента CompX в качестве люминофора подтверждается близким сходством спектров биолюминесценции и флуоресцентной эмиссии люциферина (λ_{max}

466 и 480нм соответственно), а также спектром флуоресценции оксилюциферина. Оксилюциферин обладает крайне низким квантовым выходом флуоресценции в воде при pH 5.7 (0.16%). Учитывая видимую невооруженным глазом яркую люминесценцию живых червей, квантовый выход биолюминесценции люциферина *Fridericia*, вероятно, гораздо выше, чем 0,16%. Это кажущееся противоречие, вероятно, объясняется резким увеличением квантового выхода флуоресценции (FQY) флуорофора при пространственной стабилизации (включая возможную фотоиндуцированную цис-транс изомеризацию двойной связи CompX) при связывании с активным центром люциферазы. Такое увеличение FQY лиганда, обусловленное специфичным связыванием с макромолекулой хорошо описаны для хромофора зеленого флуоресцентного белка (GFP) [Paige, Wu, Jaffrey, 2011].

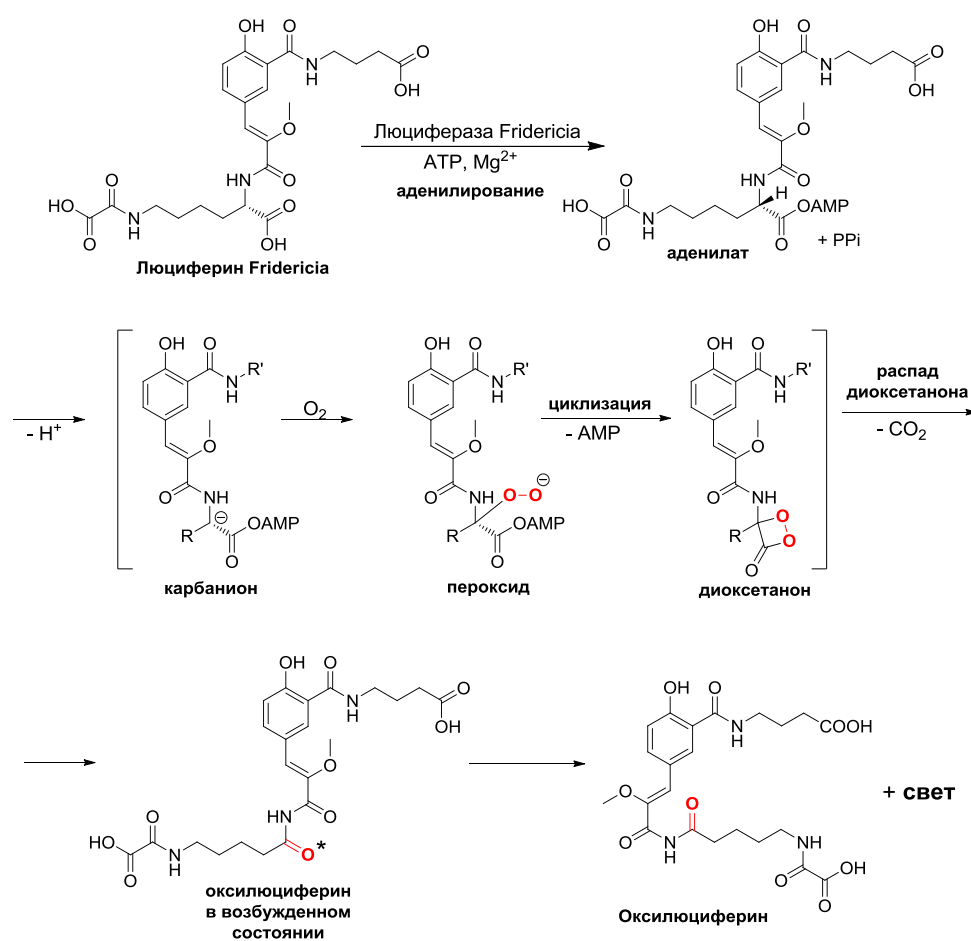


Схема 6.2. Предложенный механизм реакции биолюминесценции *Fridericia heliota*.

Для доказательства роли аденилата люциферина по карбоксильной группе лизина как промежуточного продукта в реакции биолюминесценции *Fridericia*, нами была предпринята попытка осуществить химический синтез аденилата из люциферина. Однако активация карбоксильной группы лизина любым известным способом (активированные сложные эфиры, смешанные ангидриды и т.д.), приводила к разложению субстрата. Возможно, наличие фрагмента CompX способствует отщеплению α -протона лизина, таким образом значительно снижая стабильность активированных производных люциферина (включая аденилат) по карбоксильной группе лизина. Этот вывод подтверждается наблюдаемой хемилюминесценцией при действии оснований на модельное соединение, содержащее *трет*-бутильный заместитель на карбокси-группе лизина (3.6.1, рис. 6.3).

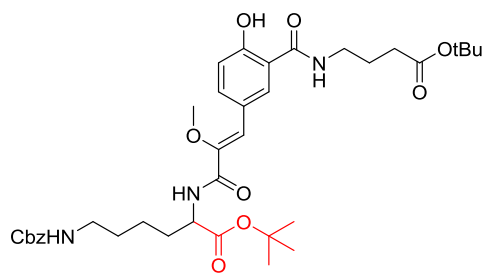


Рисунок 6.3. Структура **3.6.1** - модельного соединения аденилата люциферина *F. heliota*.

Характеристики реагентов и продуктов билюминесцентной реакции *Fridericia* подтверждают, что в ее основе лежит процесс декарбоксилирования, приводящий к образованию оксилуциферина.

Таким образом, на данном этапе работы по изучению билюминесцентной системы *Fridericia heliota* был выделен оксилуциферин *Fridericia*, структура которого была определена, что позволило нам получить представление о новом механизме билюминесценции в природе. Окислительное декарбоксилирование фрагмента лизина люциферина является источником энергии, необходимой для испускания света, в то время как флуоресцентный фрагмент CompX остается незатронутым и служит в качестве люминофора.

7. Новая пептидная химия у животных

В процессе выделения и очистки люциферина *Fridericia* мы столкнулись с рядом весьма необычных пептидных компонентов биомассы червя, обладающих схожей хроматографической подвижностью и УФ-спектральными свойствами с люциферинном. В предыдущей главе мы сообщали структуры двух таких компонентов, названных CompX и AsLn2. Данная глава посвящена установлению структур четырех новых аналогов люциферина: AsLn5, AsLn7, AsLn11 и AsLn12, раскрывающих беспрецедентную химию пептидов, когда-либо найденных в наземных животных (рис. 7.1).

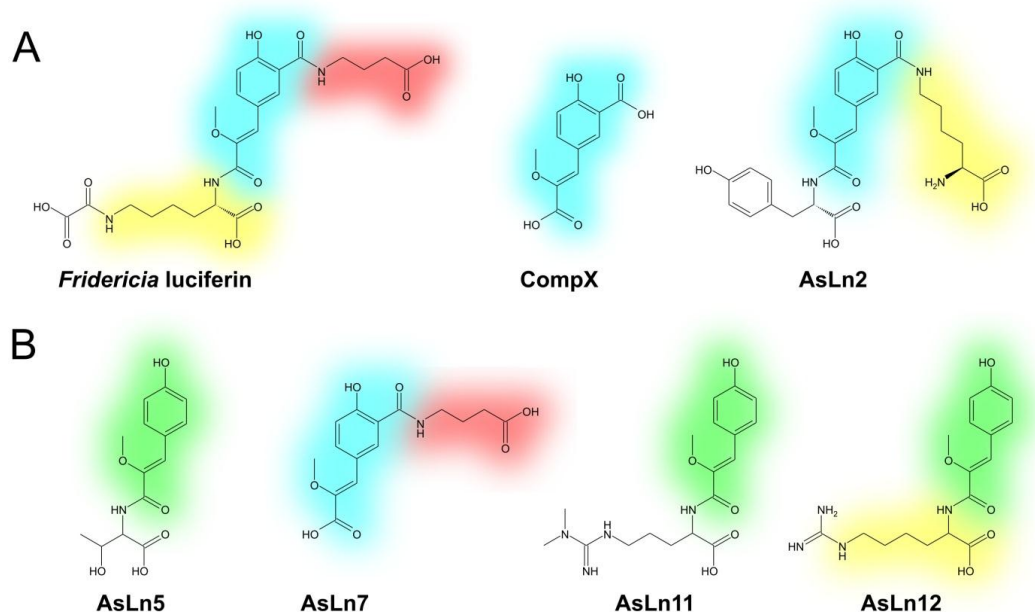


Рисунок 7.1. Структуры люциферина и его аналогов из червя *Fridericia heliota*: CompX, AsLn2, AsLn5, AsLn7, AsLn11 и AsLn12.

Анионообменная хроматография и обращенно-фазовая ВЭЖХ экстракта из 40 г замороженной гомогенизированной биомассы червя позволили выделить четыре новых индивидуальных соединения, названных AsLn5, AsLn7, AsLn11 и AsLn12 (~ 0.05, 0.04, 0.005 и 0.04 мг соответственно, рис. 7.1).

Все 4 соединения проявили хроматографическую подвижность и УФ-спектральные свойства, аналогичные люциферину. Однако наблюдались два различных спектральных типа: AsLn7 обладал идентичными люциферину УФ-спектрами поглощения, в то время как в спектрах AsLn5, AsLn11 и AsLn12 наблюдались более широкие пики поглощения и отличные спектральные кривые в коротковолновой области, что указывало на наличие отличного хромофора в этих молекулах (рис. 7.2).

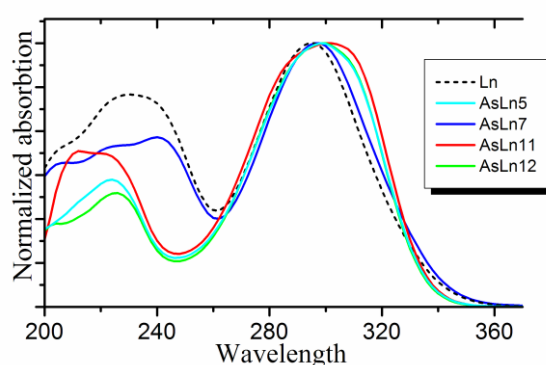


Рисунок 7.2. УФ-спектры поглощения AsLn5 (голубой), AsLn7 (синий), AsLn11 (красный) и AsLn12 (зеленый) в сравнении со спектром люциферина *Fridericia* (пунктирный черный) при pH 2.8 в воде.

Установление структуры AsLn7.

ESI-HRMS спектры AsLn7 выявили молекулярный ион $[M+H]^+$ с $m/z = 324.1068$, соответствующей молекулярной формулой к которому являлась $C_{15}H_{18}NO_7^+$ (расчетное $m/z = 324.1078$). Так как количество природного AsLn7 было низким (~ 40 мкг), удалось зарегистрировать только спектры ЯМР 1H , DQF-COSY и 1H , ^{13}C -HSQC в D_2O с использованием прибора с рабочей частотой 700 МГц, оснащенного криодатчиком. Анализ спектров ЯМР выявил наличие алифатической цепи ($CH_2-CH_2-CH_2$) с химическими сдвигами 1H и ^{13}C , характерными для гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), и четыре протона, химические сдвиги и мультиплетности которых были сходных с сигналами CompX. Полученные данные позволили нам предположить, что AsLn7 является пептидом, образованным аминокислотой ГАМК и одной из двух карбоксильных групп фрагмента CompX. Точное положение пептидной связи было определено с помощью ЯМР-титрования, в котором pH постепенно снижался с 5.0 до 3.0.

Эксперимент ЯМР-титрования показал, что протон H-3 обладает гораздо большей чувствительностью к изменениям pH, чем H-5 (Δм.д. 0.31 против 0.06 соответственно), что позволило предположить, что карбоксил C-1 свободен, в то время как карбоксильная группа C-10 вовлечена в образование пептидной связи с аминокислотой ГАМК. Для того чтобы проверить предполагаемую структуру AsLn7 и произвести полную характеристику этого вещества с помощью ЯМР, был предпринят синтез (схема 7.1). ЯМР-исследование синтетического образца (D_2O , pH 5.0) выявило полное совпадение его химических сдвигов и мультиплетностей с природным

образцом, таким образом полностью подтверждая предложенное строение AsLn7 (рис. 7.1).

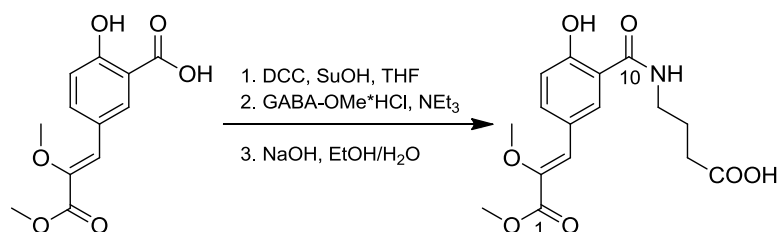


Схема 7.1. Синтез аналога люциферина AsLn7.

Установление структуры CompY – структурного фрагмента AsLn5, AsLn11 и AsLn12.

В спектрах ЯМР трех природных соединений AsLn5, AsLn11 и AsLn12 наблюдался одинаковый паттерн сигналов (рис. 7.3А-С): два ароматических дублета (δ_{H} 7.6 и 6.9, 2H каждый), один ароматический синглет (δ_{H} 6.8, 1H) и один метокси-синглет (δ_{H} 3.7, 3H). Структура фрагмента, соответствующего этим сигналам, была установлена при помощи полного набора спектров ЯМР (1D ^{13}C , 2D DQF-COSY, ^1H - ^{13}C HSQC и ^1H - ^{13}C HMBC), полученных для соединения AsLn12. Анализ кросс-пиков HMBC выявил, что наблюдаемые сигналы являются частью необычного производного тирозина, названного нами CompY (рис. 7.3F). Для установления конфигурации двойной связи в CompY были синтезированы оба (*E*)- и (*Z*)-изомеры, строение которых было подтверждено при помощи спектров ЯМР ROESY. Кросс-пик между метокси-группой и винильным синглетом наблюдался только для (*E*)-изомера (рис. 7.3F, G), аналогично установленному ранее соединению CompX. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что фрагменты CompX и CompY в аналогах люциферина имеют одинаковую (*Z*)-конфигурацию двойной связи.

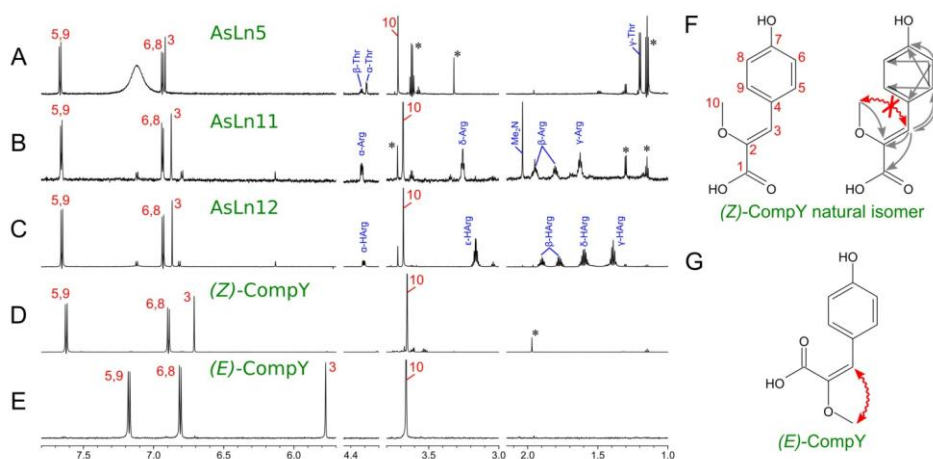


Рисунок 7.3. Спектры ЯМР ^1H природных и синтетических соединений, содержащих модифицированный остаток тирозина, CompY. Сигналы CompY отмечены красным цветом. Условия: 800 МГц (А, В, С), 700 МГц (D, E), D_2O , 30°C, pH 5.0. (A) AsLn5, дипептид Thr-CompY. (B) AsLn11, дипептид АДМА-CompY содержит асимметричный диметиларгинин. (C) AsLn12, дипептид HomoArg-CompY, содержит остаток гомоаргинина. (D) Синтетический CompY, химические сдвиги сигналов протонов двойной связи (*Z*)-изомера полностью совпадают с природным CompY

встречающимся в AsLn5, AsLn11 и AsLn12. (E) Наблюдаемые отличия химических сдвигов протонов в спектрах (E)-изомера CompY. (F) Нумерация атомов в структуре (Z)-CompY, показаны основные HMBC кросс-пики и отсутствие сигнала в спектре ROESY (красный). (G). ROESY сигнал, наблюдаемый в синтетическом (E)-изомере CompY.

Установление структуры AsLn5.

Спектры ESI-HRMS AsLn5 выявили $[M+H]^+$ молекулярный ион с $m/z = 296.1145$, соответствующей молекулярной формулой к которому являлась $C_{14}H_{18}NO_6^+$ (расчетное $m/z = 324.1078$) При вычитании фрагмента CompY ($C_{10}H_{10}O_4$) из полученной молекулярной формулы брутто-формула оставшегося фрагмента – $C_4H_7NO_2$ – позволяет предположить остаток треонина в качестве возможного структурного фрагмента AsLn5. Использование методов спектроскопии ЯМР позволило однозначно установить наличие остатка треонина в AsLn5 (рис. 7.3А). Наличие амидной связи треонин-CompY подтверждается химическими сдвигами α -H протона треонина ($\delta_H 4.287$) и карбонильной группы CompY ($\delta_C 166.43$), отличного на 5 м.д. от химического сдвига свободной карбонильной группы CompY ($\delta_C 171.66$ для синтетического CompY в тех же условиях).

Установление структуры AsLn11.

Анализ спектров ЯМР 1H и 2D HSQC AsLn11 выявил наличие алифатической цепи с химическими сдвигами 1H и ^{13}C и мультиплетностями сигналов характерными для остатка аргинина, а также дополнительный синглет возможного фрагмента $N(Me)_2$ ($\delta 2.954$, 6H), (рис. 7.3В). Остаток диметиларгинина существует в природе в двух формах, симметричного (СДМА) и несимметричного (АДМА) изомера, отличающихся MS/MS фрагментацией с отщеплением либо NH_2Me (СДМА) или $NHMe_2$ (АДМА) нейтральных фрагментов [Schwedhelm и др., 2007]. Анализ MS/MS фрагментации AsLn11 выявил отщепление фрагмента $NHMe_2$ (45 Да) от молекулярного иона 379.1931. Ближайшей молекулярной формулой для полученного молекулярного иона AsLn11 являлась $C_{18}H_{27}N_4O_5^+$ (расчетное $m/z = 379.1976$), соответствующая сумме АДМА + CompY – H_2O . Пептидная связь между альфа-аминогруппой АДМА и CompY подтверждается химическими сдвигами α -H протона АДМА ($\delta_H 4.321$).

Установление структуры AsLn12.

Следующие ЯМР-спектры были получены для AsLn12: 1D 1H и ^{13}C , 2D DQF-COSY, HSQC и HMBC. В дополнение к ранее установленному фрагменту CompY, сочетание корреляционных экспериментов COSY и HSQC позволило однозначно определить наличие остатка лизина в молекуле AsLn12. Анализ спектра HMBC обнаружил неожиданный кросс-пик между ϵ -Lys и атомом углерода с химическим сдвигом, характерным для гуанидина 156.82 м.д.. Наличие в составе AsLn12 гуанидинового фрагмента подтверждается спектром ESI-HRMS (молекулярный ион с $m/z = 365.1785$), соответствующей молекулярной формулой к которому являлась $C_{17}H_{25}O_5N_4^+$ (расчетное $m/z = 365.1819$).

Описанные структуры являются представителями новой беспрецедентной химии пептидов, когда-либо найденных в наземных животных. Все представленные пептиды включают в себя один из двух описанных производных тирозина: CompX или CompY,

отличающихся друг от друга наличием карбоксильной группы в ароматическом ядре. На данный момент CompX и его амиды были обнаружены в природе только в червях *F. heliota*, тогда как фрагмент CompY был ранее описан в составе природных пептидов, выделенных из асцидий [Henrich и др., 2009; Kehraus и др., 2004; McKay, Carroll, Quinn, 2005; Rao, Faulkner, 2004; Yin и др., 2010].

В связи с открытой нами новой пептидной химией червей *F. heliota* возникает интересный вопрос о биосинтетическом происхождении аналогов люциферина в организме червя. Происходит ли биосинтез всех соединений непосредственно в организме олигохет или же они получают некоторые ключевые компоненты, такие как CompX или CompY, с пищей или из каких-либо неизвестных симбиотических организмов? Этот вопрос тесно связан с проблемой биосинтеза люциферина *Fridericia*. Структуры предложенных соединений позволяют предположить два возможных пути биосинтеза люциферина *Fridericia*. Первый из них, возможно, протекает через последовательное связывание четырех фрагментов: ГАМК, CompX, L-лизина и щавелевой кислоты при участии специфичных или неспецифичных аминокислотных лигаз. Примером подобного фермента может служить карнозинсинтетаза, белок (100 кДа) встречающийся в геномах человека, устриц, мышей и кур [Drozak и др., 2010]. Аргументом в пользу этой гипотезы служит наличие в биомассе червя аналога люциферина AsLn7, включающего два из четырех пептидных фрагментов люциферина: ГАМК и CompX. С другой стороны, наличие модифицированного пептида AsLn12, HomoArg-CompY, в экстракте *F. heliota* предполагает другой возможный путь биосинтеза, в котором фрагмент CompY превращается в CompX в результате карбоксилирования в ароматическое кольцо с последующим связыванием продукта с ГАМК и заменой гуанидинового фрагмента в HomoArg на остаток щавелевой кислоты (рис. 7.4). В настоящий момент мы не можем однозначно подтвердить ни одну из этих гипотез, однако первая из них кажется более вероятной.

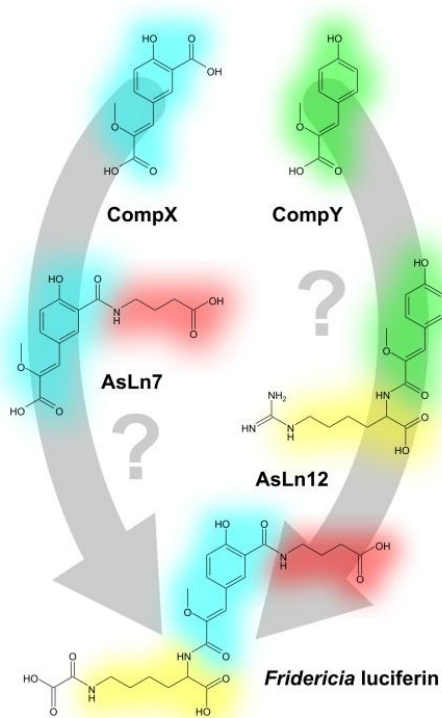


Рисунок 7.4. Два возможных пути биосинтеза люциферина *Fridericia heliota*, основанные на структурах новых пептидов обнаруженных в биомассе червя.

8. Люциферин грибов

О биолюминесценции высших грибов было известно по меньшей мере со времен древних греков [Harvey, 1957]. Плодовые тела множества видов испускают постоянный яркий свет, видимый невооруженным глазом. Свечение бесклеточных экстрактов светящихся грибов было показано Эртом и Макэлроем в 1959 году [Airth, McElroy, 1959] при добавлении НАДФН к смеси холодного и горячего водных экстрактов, приготовленных из мицелия грибов *Collybia velutipes* и *Armillaria mellea*. Эрт и Ферстер предположили, что реакция биолюминесценции грибов является двухступенчатым процессом (схема 8.1). На первом этапе предшественник люциферина (предлюциферин) восстанавливается НАД(Ф)Н-зависимым ферментом до люциферина. На втором этапе происходит катализируемое люциферазой окисление люциферина кислородом воздуха, сопровождаемое испусканием света (схема 8.1) [Airth, Foerster, 1962].

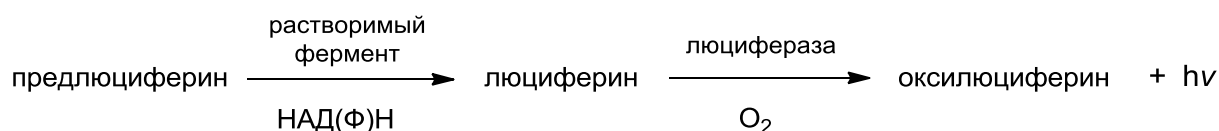


Схема 8.1. Двустадийная реакция биолюминесценции грибов, предложенная Эртом и Ферстером.

Несмотря на многочисленные попытки выделить и установить структуру люциферина грибов [Endo, Kajiwara, Nakanishi, 1970; Hayashi, Fukushima, Wada, 2012; Isobe, Uyakul, Goto, 1988] химические основы биолюминесценции оставались нераскрытыми в течение многих десятилетий. Основным препятствием в исследовании люциферинных грибов являлась трудность выделения чистых веществ, пригодных для структурных исследований, в связи с их низкой стабильностью и низким содержанием в биомассе. Испускание видимого света в перекрестных реакциях между холодными и горячими экстрактами различных видов грибов позволило установить, что в основе биолюминесценции всех высших грибов лежит единый механизм [Oliveira и др., 2012; Stevani и др., 2013].

Нами был опробован новый подход: исследование горячих экстрактов плодовых тел несветящихся видов грибов, собранных в лесах вокруг Красноярска, с помощью ферментативного биолюминесцентного анализа [Oliveira, Stevani, 2009] с использованием холодного экстракта из биолюминесцентного мицелия *Neonothopanus nambi*. Этот подход позволил установить наличие предлюциферина в плодовых телах пяти несветящихся видов. Кроме того, содержание предлюциферина в плодовых телах исследуемых нелюминесцентных грибов в 100 раз превышало его содержание в мицелии известных светящихся видов, таких как *N. nambi* и *M. citricolor* (рис. 8.1). В дальнейших исследованиях использовались плодовые тела *Pholiota squarrosa*, содержание предлюциферина в которых было наибольшим.

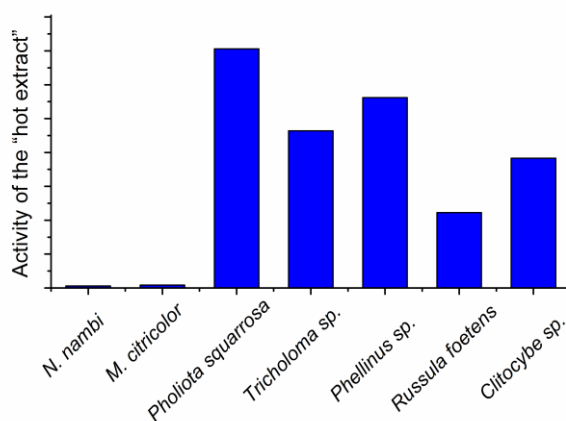


Рисунок 8.1. Активности горячих экстрактов люминесцентных и нелюминесцентных грибов в присутствии холодного экстракта *N. nambi*.

Использование препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ этилацетатного экстракта плодовых тел *Ph. squarrosa* позволило получить шесть различных соединений **3.8.1-3.8.6** (рис. 8.2).

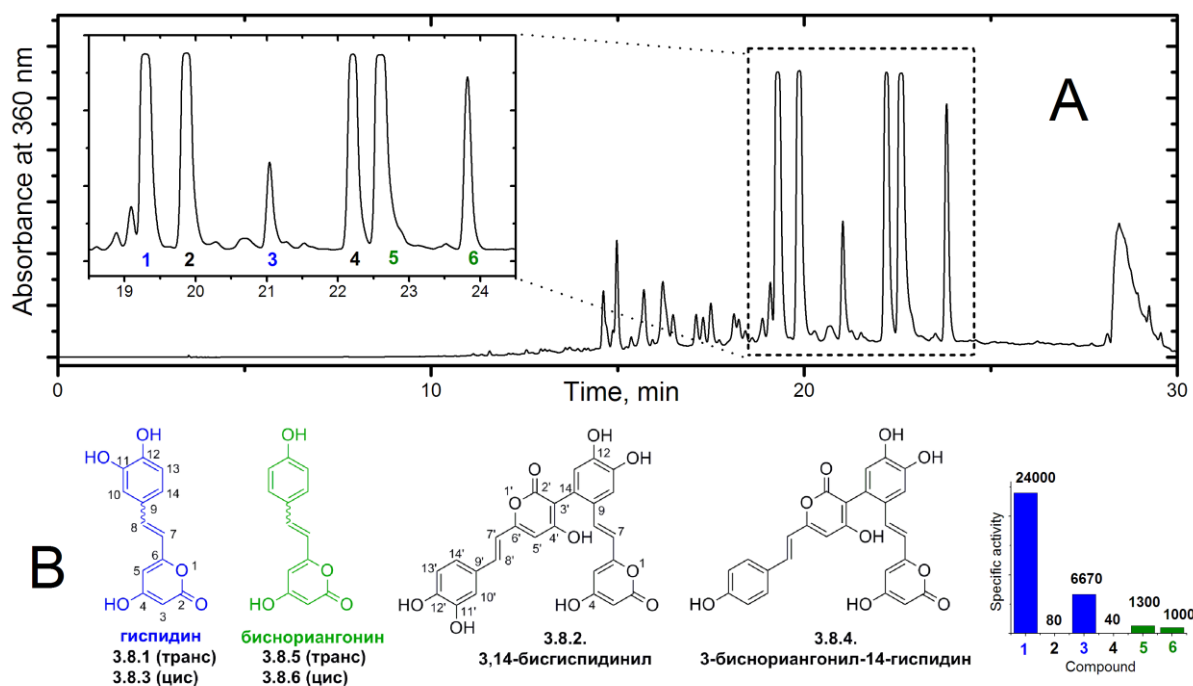


Рисунок 8.2. (А) Хроматограмма экстракта *Pholiota squarrosa*. (В) Структуры соединений, соответствующих наблюдаемым хроматографическим пикам. Люминесцентная активность соединений **3.8.1-3.8.6**.

Соединения **3.8.1-3.8.6** обладали выраженной биолюминесцентной активностью в ферментативном анализе биолюминесценции, описаном в работах Оливейра и Стевани [Oliveira, Stevani, 2009]. Люминесценция **3.8.1-3.8.6** составила 24000, 80, 6670, 40, 1300 и 1000 условных единиц соответственно. Кроме того, были обнаружены две пары пиков (**3.8.1**, **3.8.3**) и (**3.8.5**, **3.8.6**), подвергающиеся таутомеризации с образованием смеси двух таутомеров в процессе повторной хроматографии очищенных фракций.

После повторной хроматографии для всех шести соединений были зарегистрированы ЯМР спектры в ДМСО- d_6 или ацетоне- d_6 : 1H и 2D DQF-COSY, 1H - ^{13}C HSQC и 1H - ^{13}C HMBC. Анализ данных ЯМР-спектроскопии в сочетании с

данными HRMS-спектрометрии позволил установить их химические структуры: спектры **3.8.1**, **3.8.3** и **3.8.5**, **3.8.6**, были полностью идентичными между собой, и содержали два набора сигналов, соответствующих конформационным изомерам гиспидина (**3.8.1**, *транс*- и **3.8.3**, *цис*-) и биснориангонина (**3.8.5**, *транс*- и **3.8.6**, *цис*-). Соединение **3.8.2** являлось гомодимером гиспидина (3,14-бисгиспидинил), а соединение **3.8.4** гетеродимером гиспидина и биснориангонина (3-биснориангонил-14-гиспидин).

Гиспидин является хорошо известным представителем класса стирилпиронов, широко представленных среди грибных и растительных вторичных метаболитов [Beckert и др., 1997; Lee, Yun, 2011]. С целью подтвердить роль гиспидина как предлюциферина в грибах это соединение было выделено из люминесцентного мицелия *N. nambi*. Применение простой процедуры вымачивания мицелия в дистиллированной воде в течение ночи приводило к резкому увеличению активностей горячих и холодных экстрактов (в 250 и 140 раз соответственно). Экстракция этилацетатом горячего водного экстракта, полученного из вымоченного мицелия *N. nambi*, и последующая ВЭЖХ привели к выделению двух люминесцентных соединений с временами удерживания и УФ-спектральными данными, идентичными таковым гиспидина (**3.8.1**) и его *цис*-изомера (**3.8.3**) (рис. 8.3). Кроме того, два выделенных соединения обладали способностью к образованию таутомерных форм, биолюминесцентной активностью и спектрами HRMS, идентичными гиспидину и его изомеру. В целом 0.5 мкг смеси таутомеров **3.8.1** и **3.8.3** было выделено из 10 г вымоченного мицелия *N. nambi*.

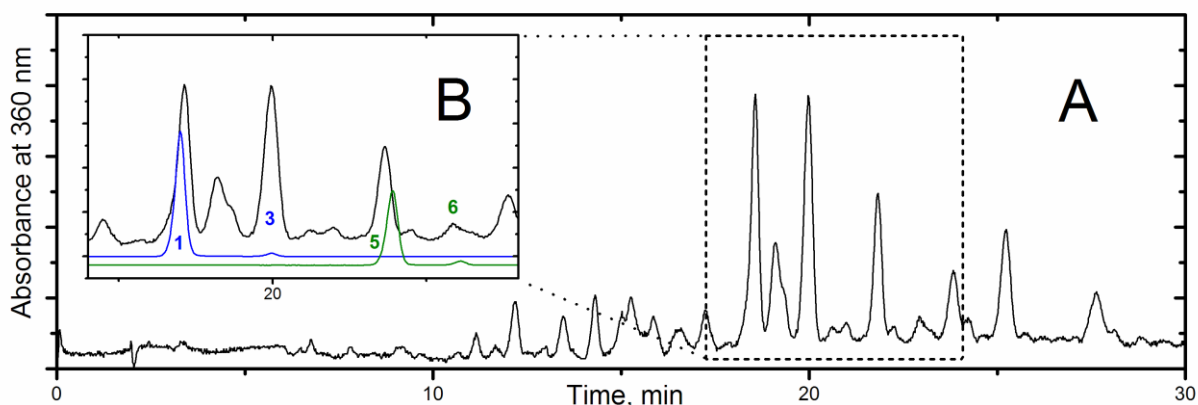


Рисунок 8.3. (А) ОФ-ВЭЖХ хроматограмма этилацетатного экстракта мицелия *Neonothopanus nambi*, вымоченного в дистиллированной воде. (В) Сравнение (А) с данными ВЭЖХ хроматограммы синтетического гиспидина (синий) и биснориангонина (зеленый) в тех же условиях хроматографии. Как гиспидин, так и биснориангонин представлены в виде смеси *цис*- и *транс*-изомеров.

Содержание предлюциферина - гиспидина - даже в вымоченных образцах *N. nambi* и других люминесцентных видах, таких как *M. citricolor* и *P. stipticus*, было во много раз ниже, чем в нелюминесцентных грибах, в частности *Ph. squarrosa*. Этот факт, вероятно, объясняет, почему все предыдущие попытки выделить и определить структуру субстрата биолюминесцентной реакции (гиспидина) грибов не увенчались успехом.

С целью проверить гипотезу Стевани о едином биохимическом механизме люминесцентной реакции грибов [Oliveira и др., 2012] нами были проанализированы три других биолюминесцентных вида с использованием методов ВЭЖХ в сочетании с ферментативным анализом, позволившим выявить присутствие гиспидина. Было

установлено, что все анализируемые образцы (*M. citricolor*, *P. stipticus* и *A. borealis*) содержат два изомера гиспидина, проявлявших люминесцентную активность при смешивании с холодными экстрактом *N. nambi*.

Коммерчески доступный гиспидин также был испытан на биолюминесцентную активность с холодными экстрактами, приготовленными из мицелия *N. nambi*, *M. citricolor*, *P. stipticus* и *A. borealis* при добавлении НАДФН. Во всех случаях наблюдалась дозозависимая биолюминесценция, что убедительно указывало на то, что гиспидин является общим предшественником люциферина для всех светящихся грибов. Для подтверждения этого вывода мы измерили люминесцентные характеристики холодного экстракта плодовых тел *Mycena chlorophos* при добавлении гиспидина и НАДФН. Интенсивность излучения смеси холодного экстракта *M. chlorophos* с гиспидином (6.1 мкМ) и НАДФН (0.18 мМ) легко видна невооруженным глазом и сравнима с интенсивностью испускания плодовых тел гриба (рис. 8.4А-С). Спектр люминесценции смеси *in vitro* обнаружил полное совпадение со спектром биолюминесценции плодовых тел *M. chlorophos in vivo*, а также со спектром флуоресценции гиспидина (рис. 8.4D).

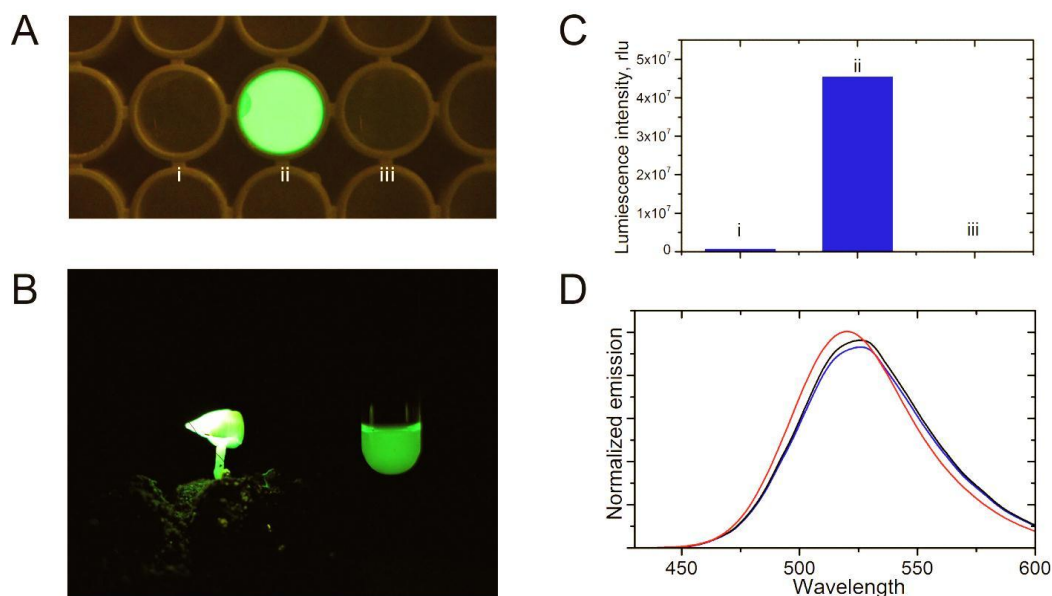


Рисунок 8.4. (А) Сравнение люминесценции холодного экстракта плодовых тел *M. chlorophos in vitro* при смешении с (i) горячим экстрактом того же гриба и НАДФН; (ii) гиспидином и НАДФН; (iii) НАДФН. (В) Биолюминесценция плодовых тел *M. chlorophos in vivo* в сравнении с люминесценцией холодного экстракта плодовых тел *M. chlorophos* с гиспидином и NADPH *in vitro*. (С) Интенсивность свечения смеси холодного экстракта плодовых тел *M. chlorophos in vitro* (тоже что в А) измеренная на люминометре Berthold Centro LB960 с выдержкой 10 мин. (i) 650000 у.е. (ii) 45000000 у.е. (iii) 43000 у.е. (D) Сравнение спектров флуоресценции гиспидина в метаноле (λ_{ex} 379 нм) (черный), биолюминесценции плодовых тел *M. chlorophos in vivo* (красный) и люминесценции смеси холодного экстракта плодовых тел *M. chlorophos* с гиспидином и НАДФН *in vitro* (синий).

Наши результаты показали, что для испускания света требовались два различных фермента в сочетании с гиспидином и НАДФН, что согласуется с результатами предыдущих исследований биолюминесценции грибов. Субстратами для первого фермента являются НАДФН и гиспидин, преобразуемый в люциферин, способный к люминесценции при смешивании со вторым ферментом - люциферазой. Никаких дополнительных кофакторов кроме молекулярного кислорода для реакции

люциферина с люциферазой не требовалось. Разделение двух ферментов, присутствующих в холодном экстракте, может быть достигнуто с помощью любого из двух независимых методов: ультрацентрифугирование или гель-фильтрация с использованием колонки Superdex 75.

Для подтверждения возможной роли гиспидина как предлюциферина грибов нами была проведена его ферментативная конверсия в люциферин. Коммерческий гиспидин инкубировали с частично очищенным водорастворимым НАДФН-зависимым ферментом, полученным с помощью гель-фильтрации холодного экстракта из мицелия *N. nambi* (~ 35 кДа, колонка Superdex 75) в присутствии НАДФН. ВЭЖХ-анализ реакционной смеси выявил постепенное накопление одного мажорного компонента со временем удерживания 17.2 мин, достигшего максимальной концентрации через 35 минут после начала реакции (рис. 8.5). В этот момент ход реакции был остановлен подкислением до pH 2.0, и основной продукт реакции выделен при помощи ВЭЖХ (выход 19 мкг продукта из 32 мкг гиспидина).

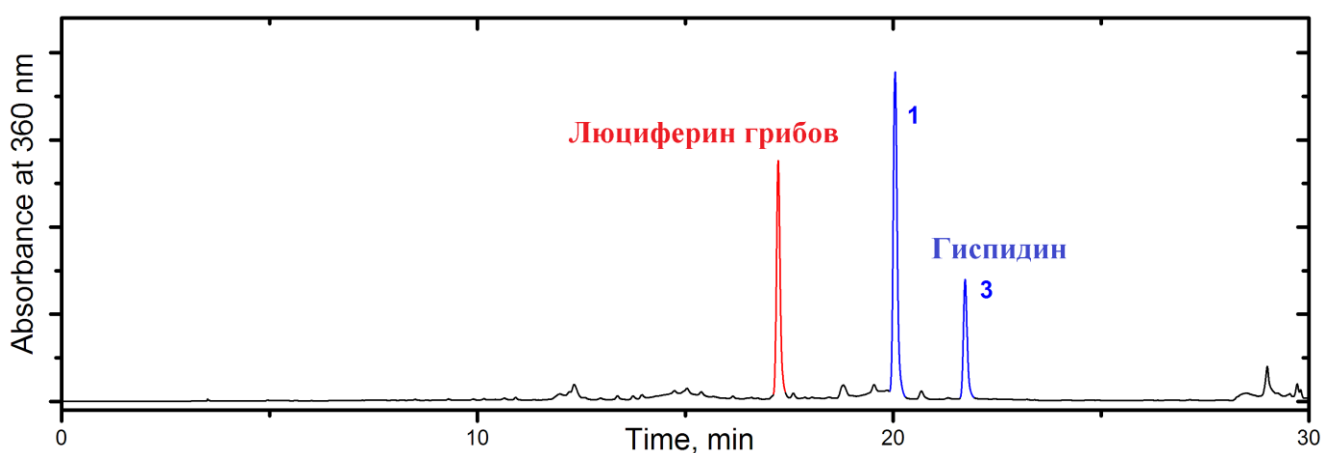


Рисунок 8.5. Ферментативный синтез люциферина грибов из гиспидина, катализируемый фракцией холодного экстракта ~35 кДа из мицелия *N. nambi* в присутствии НАДФН.

Новое соединение обладало яркой НАДФН-независимой люминесценцией при смешивании с холодным экстрактом *N. nambi*. Мы также обнаружили, что микросомальная фракция холодного экстракта отвечает за люминесценцию, что полностью согласуется с гипотезами Эрта и Стевани (схема 8.1) и подтверждает функциональную роль производного гиспидина как люциферина грибов.

УФ-спектры люциферина были аналогичны таковым гиспидина (рис. 8.6). В спектре ЯМР ^1H люциферина грибов наблюдался аналогичный гиспидину паттерн сигналов. Однако в спектре люциферина наблюдалось исчезновение одного сигнала протона, соответствующего H3 гиспидина (рис. 8.7). Спектры ESI-HRMS люциферина выявили $[\text{M}+\text{H}]^+$ молекулярный ион с $m/z = 263.0571$, соответствующей молекулярной формулой к которому являлась $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_6^+$ (расчетное $m/z = 263.0550$). Эта формула свидетельствует о наличии дополнительного атома кислорода в люциферине грибов по сравнению с гиспидином. Полученные данные ЯМР и масс-спектрометрии наилучшим образом соответствовали структуре 3-гидроксигиспидина: (E)-6-(3,4-дигидроксистирил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-она (рис. 8.7).

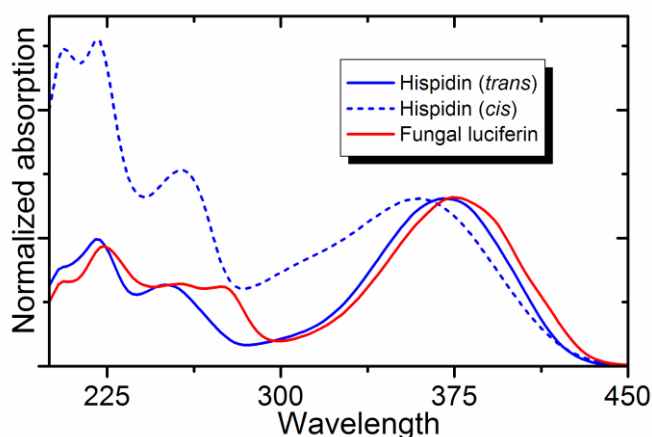


Рисунок 8.6. УФ-спектры гиспидина и люциферина грибов.

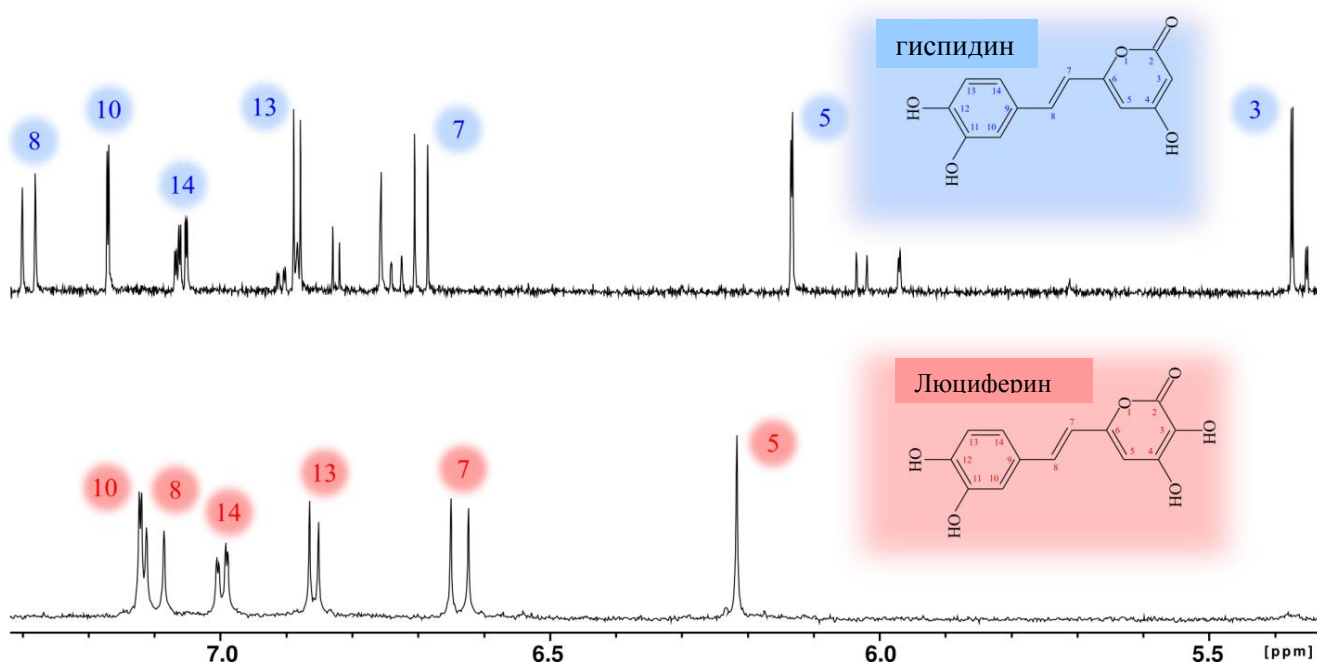


Рисунок 8.7. Сравнение спектров ЯМР ^1H предлюциферина – гиспидина (немаркированные пики соответствуют цис-изомеру) и люциферина грибов, полученного в результате ферментативного синтеза.

В противоположность существовавшей в течение 50 лет гипотезе о восстановительном характере действия НАДФН-зависимого фермента, ответственного за биосинтез люциферина, нами было показано, что этот фермент катализирует реакцию окислительного гидроксилирования предлюциферина. Действительно, многие кислород-зависимые гидроксилазы используют НАД(Ф)Н в качестве ко-субстрата, в связи с тем, что восстановление одной молекулы кислорода требуется 4 электрона, в то время как моногидроксилирование одной молекулы субстрата обеспечивает лишь 2 электрона [Ortiz de Montellano, 2010]. Полученные данные позволяют предположить механизм биолюминесценции грибов, приведенный на схеме 8.2.

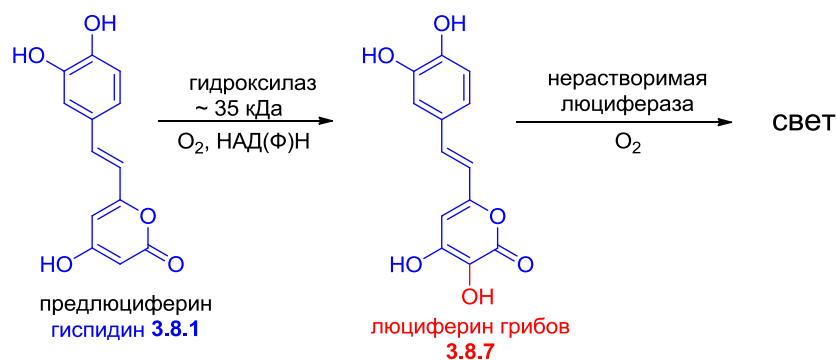


Схема 8.2. Предполагаемый механизм билюминесценции грибов.

Для независимого подтверждения структуры люциферина, а также с целью наработать синтетический субстрат для использования в дальнейших исследованиях билюминесцентной системы грибов, в настоящей работе соединение **3.8.7** было получено синтетическим путем. Ключевой стадией в синтезе люциферина **3.8.7** стало создание двойной связи путем конденсации двух фрагментов – 3,4-дигидроксibenзальдегида и дигидроксиметилпиранона.

Для синтеза дигидроксиметилпиранона в качестве предшественника была использована коммерчески доступная дегидрацетовая кислота, деацилирование, окисление по третьему положению [гидрокси(((+)-10-камфорсульфонил)оксо)иодо]бензолом и последующий щелочной гидролиз которой привели к получению искомого пиранона **3.8.8** с высоким выходом (схема 8.3) [Hatzigrigoriou, Varvoglis, Bakola-Christianopoulou, 1990; Soldi и др., 2012].

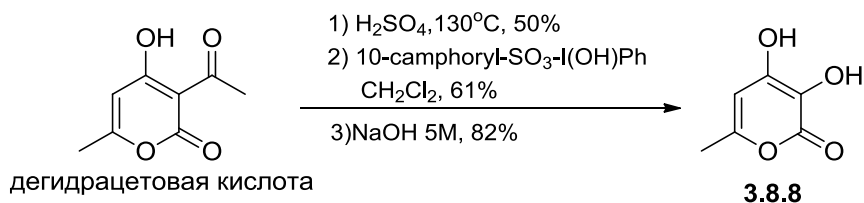


Схема 8.3. Синтез дигидроксиметилпиранона **3.8.8** из дегидрацетовой кислоты.

Несколько попыток ввести в реакцию конденсации незащищенные протокатехальдегид и дигидроксипиранон **3.8.8** не увенчались успехом, в связи с чем в дальнейшем мы перешли к варианту синтеза с защитой гидроксильных групп в обоих циклах люциферина. Для введения защитных групп на гидроксилы пиранонового цикла использовали реакцию метилирования **3.8.8** под действием диметилсульфата в ацетоне (схема 8.4). Конденсация полученного диметоксипиранона **3.8.9** с коммерчески доступным 3,4-метилendioксибензальдегидом в присутствии метилата магния в метаноле привела к получению транс-изомера **3.8.10**, все защитные группы в котором затем удаляли в одну стадию действием избытка триборида бора в дихлорметане (схема 8.4).

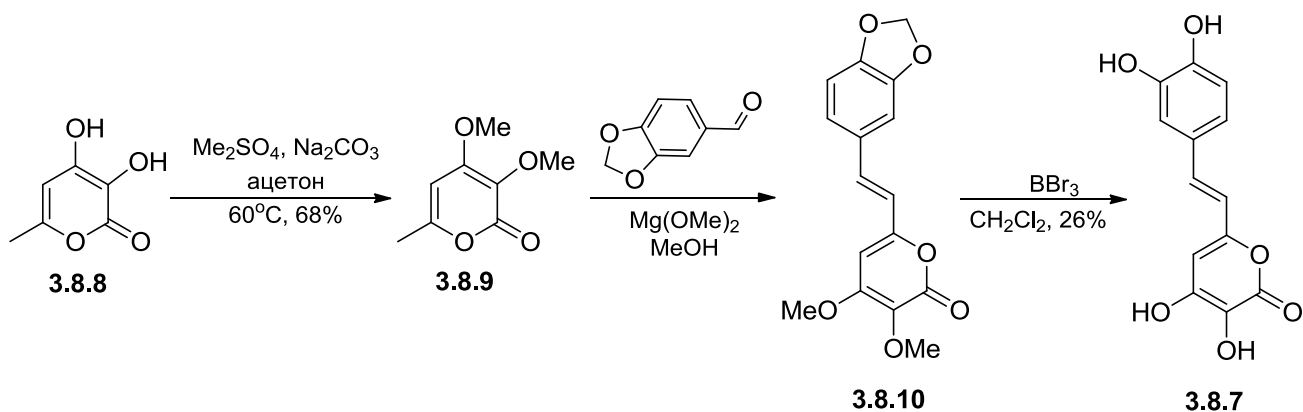


Схема 8.4. Синтез люциферина грибов.

Полученное соединение было идентично люциферину грибов по спектральным данным, а также по данным измерения биолюминесцентной активности. Таким образом, структура люциферина грибов **3.8.7**: (*E*)-6-(3,4-дигидрокстирил)-3,4-дигидрокси-2*H*-пиран-2-он, была однозначно подтверждена встречным синтезом.

Все полученные данные указывают на то, что широко распространенный в грибах и растениях вторичный метаболит, гиспидин, является предлюциферинном по меньшей мере в четырех эволюционно удаленных родах светящихся грибов. Способность люциферина – 3-гидроксигиспидина – вступать в реакцию биолюминесценции с люциферазами из 4 различных видов грибов позволяет предположить, что для большинства, если не для всех, светящихся высших грибов гиспидин выступает в качестве предшественника люциферина, в то время как 3-гидроксигиспидин является люциферинном. Еще одним следствием из полученных данных является то, что биолюминесценция грибов обусловлена наличием ферментов – гиспидин-3-гидроксилазы и люциферазы, а не способностью того или иного гриба к биосинтезу предлюциферина - гиспидина.

ВЫВОДЫ

1. Разработан новый подход к синтезу производных хромофора GFP, содержащих α -ациламиноалкильные заместители в положении 2 имидазольного ядра. Осуществлен синтез трех модельных соединений - биосинтетических предшественников хромофора красных флуоресцентных белков типа DsRed. Показана способность полученных GFP-подобных хромофоров к автоокислению в основной среде с образованием таутомера хромофора DsRed или его гидратированной формы. Изучено влияние аминокислотного остатка в составе хромофора и внешних условий на скорость и направление реакции автоокисления. Получен красный хромофор нового типа – продукт 4-электронного окисления GFP-подобного хромофора, не обнаруженный во флуоресцентных белках. Показана возможность его образования в условиях созревания красных хромофоров типа DsRed.
2. Разработан метод пространственной фиксации подвижного бензилиденового фрагмента в составе хромофора GFP путем введения дифторборильного заместителя. Полученное соединение p-NOBDI-BF2 является наиболее

близким синтетическим аналогом хромофора GFP, обладающим яркой флуоресценцией в растворе. Показано, что введение дифторборильной группы приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции хромофора GFP в растворе более, чем на 3 порядка за счет подавления фотоизомеризационной деактивации. Изучение фотофизических свойств р-НОВДИ-BF2 (рКа основного и возбужденного состояний, сольватохромизм, термодинамика и кинетика переноса протона) показало его выраженные фотокислотные свойства, аналогичные таковым флуоресцентных белков.

3. На модельном соединении хромофора флуоресцентного белка CFP показано, что NH-группа остатка триптофана в данном хромофоре обладает экстремально низким значением рКа 12.4. Показано, что депротонирование синтетического хромофора CFP приводит к батохромному сдвигу в спектрах поглощения на 60 нм. С помощью сайт-направленного и случайного мутагенеза получен флуоресцентный белок WasCFP, хромофор которого содержит депротонированный остаток триптофана. Показана обратимость процессов протонирования и депротонирования хромофора WasCFP. Таким образом, впервые показана возможность депротонирования индольного остатка триптофана в составе белка при физиологических условиях.
4. Из биомассы люминесцентного почвенного червя *Fridericia heliota* (Enchytraeidae) выделены представители нового класса природных соединений - производные (Z)-5-(2-карбокси-2-метоксивинил)-2-гидроксibenзойной кислоты, названные CompX и AsLn2. Их строение установлено спектральными методами и встречным синтезом. Показано, что CompX и AsLn2 являются структурными аналогами люциферина *Fridericia*.
5. Из биомассы люминесцентного червя *Fridericia heliota* выделен субстрат новой биолюминесцентной системы – люциферин *Fridericia*. Комбинацией методов ЯМР, масс-спектрометрии высокого разрешения и встречного синтеза установлено его химическое строение: (S,Z)-6-(карбоксиформаидо)-2-(3-(3-((3-карбоксипропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановая кислота. Показано, что физико-химические свойства и функциональная активность синтетического люциферина *Fridericia* совпадают с таковыми природного вещества.
6. Выделен продукт биолюминесцентной реакции *Fridericia* – оксилуциферин. Установлено его химическое строение: (Z)-4-(5-(3-(5-(карбоксиформаидо)пентанамидо)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксibenзамидо)бутановая кислота. Показано, что в ходе биолюминесцентной реакции происходит окислительное декарбоксилирование остатка лизина люциферина *Fridericia*. Механизм люминесцентной реакции включает активацию молекулы люциферина за счет АТФ-зависимого образования аденилата по карбоксильной группе остатка лизина.
7. Из биомассы люминесцентного червя *Fridericia heliota* выделены новые природные соединения – аналоги люциферина *Fridericia*, названные AsLn5, AsLn7, AsLn11 и AsLn12. Их химическое строение установлено спектральными методами. Показано, что данные соединения являются представителями нового, ранее не обнаруженного класса природных пептидов у наземных животных.

8. Выделен биосинтетический предшественник люциферина люминесцентных грибов. Установлено его химическое строение: (E)-6-(3,4-дигидроксистирил)-4-гидрокси-2H-пиран-2-он. Показано, что в люминесцентных грибах происходит НАД(Ф)-Н зависимая конверсия предшественника люциферина при катализе специфическим водорастворимым ферментом, приводящая к образованию люциферина грибов. Проведен энзиматический синтез люциферина грибов, установлено его химическое строение: (E)-6-(3,4-дигидроксистирил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он. Строение люциферина грибов доказано встречным синтезом.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Обзоры

1. Баранов М.С., Лукьянов К.А., Ямпольский И.В. Синтез хромофоров флуоресцентных белков и их аналогов. **Биоорганическая химия** 2013, 39 (3), 255-276.
2. Walker C.L., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V., Mishin A.S., Bommarius A.S., Duraj-Thatte A.M., Azizi B., Tolbert L.M., Solntsev K.M. Fluorescence imaging using synthetic GFP chromophores. **Current Opin. Chem. Biol.** 2015, 27, 64-74.

Статьи

- 3 Bulina M.E., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V., Chudakov D.M., Staroverov D.B., Shcheglov A.S., Gurskaya N.G., Lukyanov S. New class of blue animal pigments based on Frizzled and Kringle protein domains. **J. Biol. Chem.** 2004, 279, 43367-43370.
- 4 Evdokimov A.G., Pokross M.E., Egorov N.S., Zaraisky A.G., Yampolsky I.V., Merzlyak E.M., Shkoporov A.N., Sander I., Lukyanov K.A., Chudakov D.M. Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein. **EMBO Reports** 2006, 7, 1006-1012.
- 5 Mishin A.S., Subach F.V., Yampolsky I.V., King W., Lukyanov K.A., Verkhusha V.V. The first mutant of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein that forms a red chromophore. **Biochemistry** 2008, 47, 4666-4673.
- 6 Bogdanov A.M., Mishin A.S., Yampolsky I.V., Belousov V.V., Chudakov D.M., Subach F.V., Verkhusha V.V., Lukyanov S., Lukyanov K. Green fluorescent proteins are light-induced electron donors. **Nature Chem. Biol.** 2009, 5, 459-461.
- 7 Ivashkin P.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S., Yampolsky I.V. A Synthetic GFP-like Chromophore Undergoes Base-Catalyzed Autoxidation into Acylimine Red Form. **J. Org. Chem.** 2011, 76, 2782-2791.
- 8 Ивашкин П.Е., Лукьянов К.А., Ямпольский И.В. Синтез биосинтетических предшественников хромофоров красных флуоресцентных белков. **Биоорганическая химия** 2011, 37, 464-474.
- 9 Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L.V., Tolbert L.M., Yampolsky I.V., Solntsev K.M. Conformationally locked chromophores as a model of excited state proton transfer in fluorescent proteins. **J. Am. Chem. Soc.** 2012, 134, 6025-6032.

- 10 Sarkisyan K.S., **Yampolsky I.V.**, Solntsev K.M., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Tryptophan-based chromophore in fluorescent proteins can be anionic. **Scientific Reports** 2012, 2, Art. 608.
- 11 Baranov M.S., **Yampolsky I.V.**. Novel condensations of nitroacetic esters with aromatic aldehydes leading to 5-hydroxy-1,2-oxazin-6-ones. **Tetrahedron Lett.** 2013, 54 (7), 628-629.
- 12 Baranov M.S., Lukyanov K.A., Ivashkin P.E., **Yampolsky I.V.** An efficient synthetic approach to fluorescent oxazole-4-carboxylate derivatives. **Synth. Commun.** 2013, 43 (17), 2337-2342.
- 13 Baranov M.S., Solntsev K.M., Lukyanov K.A., **Yampolsky I.V.** Synthetic approach to GFP chromophore analogs from 3-azidocinnamates. Role of methyl rotors on the chromophore photophysics. **Chem. Commun.** 2013, 49 (51), 5778-5780.
- 14 Frizler M., **Yampolsky I.V.**, Baranov M.S., Stirnberg M., Gutschow M. Chemical introduction of the green fluorescence: imaging of cysteine cathepsins by an irreversibly locked GFP fluorophore. **Org. Biomol. Chem.** 2013, 11, 5913-5921.
- 15 Pletnev V.Z., Pletneva N.V., Lukyanov K.A., Souslova E.A., Fradkov A.F., Chudakov D.M., Chepurnykh T., **Yampolsky I.V.**, Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev S. Structure of the red fluorescent protein from a lancelet (*Branchiostoma lanceolatum*): a novel GYG chromophore covalently bound to a nearby tyrosine. **Acta Cryst.** 2013, D69, 1850-1860.
- 16 Petushkov V.N., Tsarkova A.S., Dubinnyi M.A., Rodionova N.S., Marques S.M., Esteves da Silva J. C.G., Shimomura O., **Yampolsky I.V.** CompX, a luciferin-related tyrosine derivative from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. Structure elucidation and total synthesis. **Tetrahedron Lett.** 2014, 55, 460-462.
- 17 Petushkov V.N., Dubinnyi M.A., Rodionova N.S., Nadezhdin K.D., Marques S.M., Esteves da Silva J. C.G., Shimomura O., **Yampolsky I.V.** AsLn2, a luciferin-related modified tripeptide from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. **Tetrahedron Lett.** 2014, 55, 463-465.
- 18 Baranov M.S., Fedyakina I.T., Shchelkanov M.Y., **Yampolsky I.V.** Ring-expanding rearrangement of 2-acyl-5-arylidene-3,5-dihydro-4H-imidazol-4-ones in synthesis of flutimide analogs. **Tetrahedron** 2014, 70, 3714-3719.
- 19 Petushkov V.N., Dubinnyi M.A., Tsarkova A.S., Rodionova N.S., Baranov M.S., Kublitski V.S., Shimomura O., **Yampolsky I.V.** A novel type of luciferin from Siberian luminous earthworm *Fridericia heliota*: structure elucidation by spectral studies and total synthesis. **Angew. Chem. Int. Ed.** 2014, 53 (22), 5566-5568.
- 20 Baranov M.S., Solntsev K.M., Baleeva N.S., Mishin A.S., Lukyanov K.A., **Yampolsky I.V.** Red-shifted fluorescent aminated derivatives of conformationally locked GFP chromophore. **Chem. Eur. J.** 2014, 20 (41), 13234-13241.
- 21 Dubinnyi M.A., Tsarkova A.S., Petushkov V.N., Kaskova Z.M., Rodionova N.S., Kovalchuk S.I., Ziganshin R.H., Baranov M.S., Mineev K.S., **Yampolsky I.V.** Novel Peptide Chemistry in Terrestrial Animals: Natural Luciferin Analogues from the Bioluminescent Earthworm *Fridericia heliota*. **Chem. Eur. J.** 2015, 21, 3942-3947.
- 22 Tsarkova A.S., Dubinnyi M.A., Baranov M.S., Petushkov V.N., Rodionova N.S., Zagudaylova M.B., **Yampolsky I.V.** Total synthesis of AsLn2 – a luciferin analogue from

the Siberian bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. **Mendeleev Commun.** 2015, 25, 99-100.

23 Dubinnyi M.A., Kaskova Z.M., Rodionova N.S., Baranov M.S., Gorokhovatsky A.Y., Kotlobay A., Solntsev K.M., Tsarkova A.S., Petushkov V.N., **Yampolsky I.V.** Novel mechanism of bioluminescence: oxidative decarboxylation of *Fridericia luciferin*. **Angew. Chem. Int. Ed.** 2015, 54, 7065-7067.

24 Purtov K.V., Petushkov V.N., Baranov M.S., Mineev K.S., Rodionova N.S., Kaskova Z.M., Tsarkova A.S., Petunin A.I., Bondar V.S., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E., Oba Y., Oba Y., Arseniev A.S., Lukyanov S., Gitelson J.I., **Yampolsky I.V.** The chemical basis of fungal bioluminescence. **Angew. Chem. Int. Ed.** 2015, 54, 8124-8128.

25 Baleeva N.S., Myannik K.A., **Yampolsky I.V.**, Mishin A.S. Bioinspired fluorescent dyes based on conformationally locked chromophore of fluorescent protein Kaede. **Eur. J. Org. Chem.** 2015, 26, 5716-5721.

26 Tsarkova A.S., Dubinnyi M.A., Baranov M.S., Oguienko A.D., **Yampolsky I.V.** Nambiscalarane, a novel sesterterpenoid comprising a furan ring, and other secondary metabolites from bioluminescent fungus *Neonothopanus nambi*. **Mendeleev Commun.** 2016, 26, 191-192.

27 Povarova N.V., Bozhanova N.G., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Baranov M.S., **Yampolsky I.V.**, Lukyanov K., Mishin A. S. Docking-guided identification of protein hosts for GFP chromophore-like ligands. **J. Mater. Chem. C** 2016, 4, 3036-3040.

Тезисы докладов на конференциях

28 **Yampolsky I.V.**, Ivashkin P.E. Synthetic GFP chromophore is air-oxidized to form DsRed chromophore. International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, August 21-25, 2011, St-Petersburg, Russia. Book of abstracts, P189.

29 Petushkov V., Dubinnyi M., Tsarkova A., Rodionova N., Baranov M., Shimomura O., **Yampolsky I.** A novel ATP-dependent bioluminescent system from the Siberian earthworm *Fridericia heliota*: structure elucidation of luciferin and its analogs (Oral presentation). 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 23-28 June 2014, Uppsala, Sweden. **Luminescence** 2014, Supplement 1 (Special Issue) Meeting Abstract O007529, pp. 54-55.

30 **Yampolsky I.V.** Novel mechanism of bioluminescence: Siberian earthworms (Oral presentation). International Scientific Conference "Science of the Future, Russian Federation, 17-20 September 2014, St-Petersburg, Russia. <http://www.p220conf.ru/abstracts/download/19-ylife/224-i-yampolsky>

31 **Yampolsky, I.** Novel Bioluminescence Mechanisms: Higher Fungi and Earthworm *Fridericia* (Invited lecture). 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, May 29 – June 2 2016, Tsukuba, Japan. http://isbc2016.com/programs/pdf/detail_program.pdf