

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 биолюминесценции (люциферинов) и хромофоров  
флуоресцентных белков**

специальность 02.00.10 - биоорганическая химия

Диссертация на соискание учёной степени  
доктора химических наук

**Научные консультанты:**

Академик РАН, доктор биологических наук

Лукьянов Сергей Анатольевич

Академик РАН, доктор медицинских наук

Гительзон Иосиф Исаевич

Москва 2016

## Содержание

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
1. ВВЕДЕНИЕ	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
2.1 Синтетические аналоги хромофоров флуоресцентных белков и их применение	5
2.2. Люциферины: строение, механизмы действия, синтез, применение	21
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	40
3.1. Автоокисление синтетического хромофора GFP с образованием DsRed-подобного красного хромофора	40
3.2. Конформационно-фиксированный хромофор GFP	54
3.3. Флуоресцентный белок WasCFP с ионизированным остатком триптофана в составе хромофора	67
3.4. CompX и AsLn2 – природные аналоги люциферина биолуминесцентного червя <i>Fridericia heliota</i>	76
3.5. Люциферин <i>Fridericia heliota</i>	93
3.6. Механизм действия люциферина <i>Fridericia</i>	107
3.7. Новая пептидная химия у животных	114
3.8. Люциферин грибов	128
4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	140
4.1. Автоокисление синтетического хромофора GFP с образованием DsRed-подобного красного хромофора	141
4.2. Конформационно-фиксированный хромофор GFP	151
4.3. Флуоресцентный белок WasCFP с ионизированным остатком триптофана в составе хромофора	154
4.4. CompX и AsLn2 – природные аналоги люциферина биолуминесцентного червя <i>Fridericia heliota</i>	156
4.5. Люциферин <i>Fridericia heliota</i>	161
4.6. Механизм действия люциферина <i>Fridericia</i>	177
4.7. Новая пептидная химия у животных	179

4.8. Люциферин грибов	184
5. ВЫВОДЫ	193
6. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	195
7. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	199
8. БЛАГОДАРНОСТИ	219

## Список сокращений

АТФ - аденозинтрифосфат

ДМФ, DMF - диметилформаид

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТБАФ, TBAF – фторид тетрабутиламония

ТГФ, THF - тетрагидрофуран

ТФУ - трифтороуксусная кислота

УФ - ультрафиолетовое излучение

АсОН - уксусная кислота

DCM - дихлорметан

DCC - N, N'-дициклогексилкарбодиимид

DTT - дитиотреитол

EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота

ESI-HRMS - масс-спектрометрия высокого разрешения с электрораспылительной ионизацией

ESPT - перенос протона в возбужденном состоянии

FQY - квантовый выход флуоресценции

EtOAc - этилацетат

EtOH - этанол

MeCN - ацетонитрил

NADPH - никотинамидадениндинуклеотидфосфат

PBS – натрий-фосфатный буфер

SuOH - N-гидроксисукцинимид



# 1. ВВЕДЕНИЕ

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.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Синтетические аналоги хромофоров флуоресцентных белков и их применение

#### Введение

Флуоресцентные белки (ФБ) широко применяются в различных областях для решения большого круга практических задач. Они используются для имиджинга клеточных структур, визуализации физиологических процессов и установления биосинтетических путей различных метаболитов в клетках. Наиболее эффективным флуоресцентным маркером является зеленый флуоресцентный белок (GFP), в котором испускание в зеленой области видимого спектра достигается благодаря переносу протона в возбужденном состоянии (ESPT), что является основой механизма флуоресценции.

Хромофором GFP является *n*-гидроксibenзилиденимидазолон (рис. 2.1.1), гидроксильная группа которого является донором протона в ESPT. При помощи случайного мутагенеза была разработана обширная цветовая палитра ФБ, однако не все из них нашли практическое применение в связи с ограничениями, обусловленными размером белка (27 kDa), а также небольшим количеством биологически доступных ароматических аминокислот, значительно сужающим многообразие результирующих белков. Эти наблюдения послужили толчком для изучения других хромофоров – производных арилиденимидазолонового ядра, с использованием биомиметических методов для придания конформационной жесткости хромофорам и возбуждения флуоресценции при помощи эффектов окружения. Подобные методы имеют большой потенциал не только для имиджинга живых объектов, но и для визуализации биосинтетических путей.

Существует несколько различных подходов к синтезу 5-арилиден-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов [Baranov, Lukyanov, Yampolsky, 2013] (Схема 2.1.1). Среди них наиболее универсальными являются циклизация *N*-ацилдегидроаминокислот **ii** [Baranov и др., 2014a; Chen, Lo, Sung, 2013; Dong и др., 2008; Han и др., 2013; Jia и др., 2010; Song и др., 2014; Wenge, Wagenknecht, 2011], которые, в свою очередь, получают путем нуклеофильного раскрытия соответствующих оксазолонов **i** (схема 2.1.1) [The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Volume 60, Oxazoles: Synthesis, Reactions, and Spectroscopy, Part B, 2004], а также конденсация альдегидов с насыщенными имидазолонами **iv** (получаемыми, главным образом, из соответствующие азидов **iii**) [Baldrige и др., 2010; Ortiz Barbosa, Hart, Magomedov, 2006; Shen и др., 2013; Takeuchi, Hagiwara, Eguchi, 1989; Wu, Burgess, 2008] и, наконец, циклоприсоединение имидатов **v** к альдимидам [Baldrige, Kowalik, Tolbert, 2010; Kerneur и др., 1997; Lerestif и др., 1995; Lerestif, Bazureau, Hamelin, 1993; Tou и др., 2014].

Использование имидатов **v** обеспечивает наиболее простой и надежный метод синтеза производных арилиденимидазолонового ядра: реакция протекает с высокими выходами при комнатной температуре. Ограничением данного подхода является невысокое разнообразие имидатов **v**, не допускающее введения сложных функционализированных заместителей в положение  $R_2$ . В то же время, подход, основанный на циклизации оксазолонов, позволяет получить широкий диапазон продуктов с различными заместителями во всех положениях ( $Ar$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ), однако выходы этой реакции зачастую невысоки, а условия реакции требуют оптимизации в каждом конкретном случае.

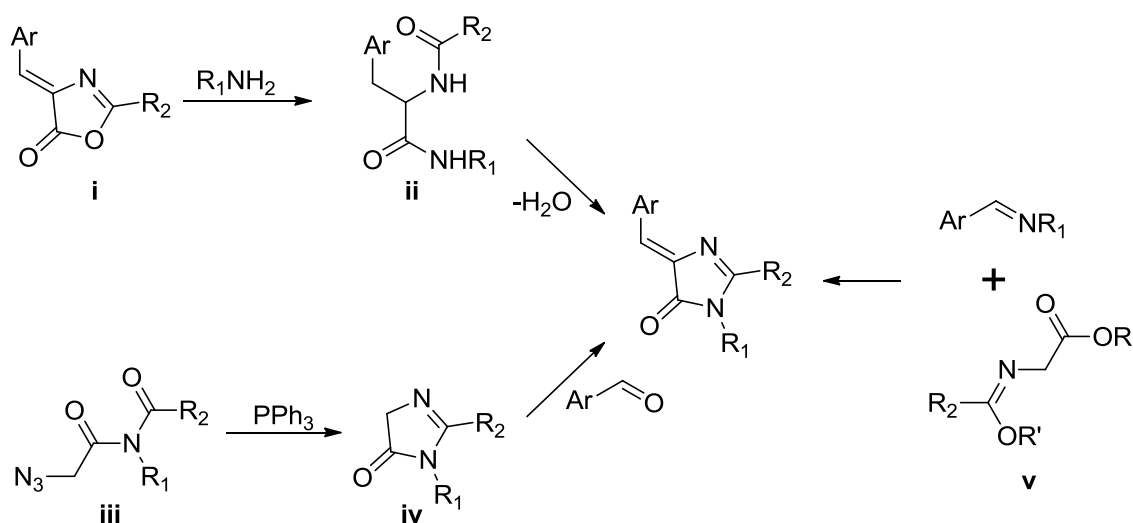


Схема 2.1.1. Три основных метода синтеза аналогов хромофоров ФБ.

В настоящее время в нашей и других группах ведется разработка новых хромофоров и новых методов придания конформационной жесткости, приводящих к возникновению флуоресценции в ответ на специфическое распознавание [Baranov, Lukyanov, Yampolsky, 2013; Tolbert и др., 2012], включающее в себя взаимодействие белок/хромофор, липид/хромофор и агрегацию хромофоров. Пространственные взаимодействия хромофора с окружением, таким образом, могут быть использованы для получения флуоресцентного ответа для обнаружения различных метаболитов.

Модификация скелетов хромофоров, приводящая к изменениям интенсивностях флуоресценции, длин волн испускания и других параметров флуоресценции широко известна [Christensen и др., 2012; Follenius-Wund и др., 2003; Katritzky и др., 2011; Petkova и др., 2010]. Для наших целей мы рассмотрим интенсивность флуоресценции (FI) в качестве основного индикатора фиксации геометрии хромофора. В данном обзоре мы рассмотрим применение синтетических хромофоров ФБ для флуоресцентного имиджинга, а также некоторые исследования флуоресценции синтетических хромофоров в растворах, которые потенциально

могут быть применимы для имиджинга. Известны многие классы различных флуорогенов, используемых для флуориметрического анализа [Datta и др., 2014; Xiang и др., 2012; Yan, Bruchez, 2015], однако флуорогены на основе хромофора GFP являются уникальными, так как этот класс соединений используется для обнаружения чрезвычайно обширного диапазона ионов и макромолекул. Ближайшими конкурентами флуорогенных красителей на основе хромофора GFP являются тетрафенилэтиленовые красители, эмиссия которых индуцируется агрегацией.

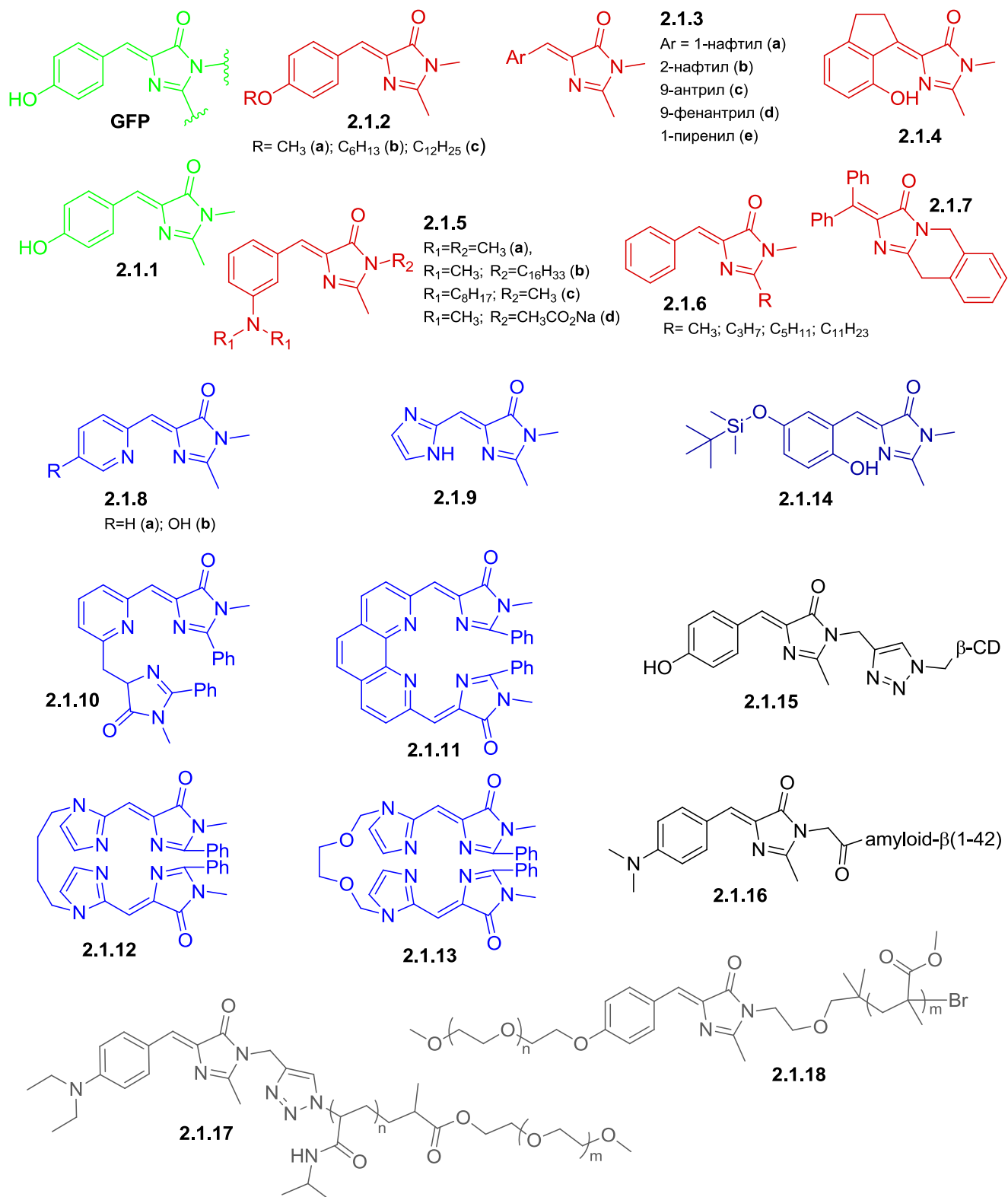


Рисунок 2.1.1. Структуры синтетических хромофоров ФБ. Цвета подгрупп хромофоров не отражают их реальных оптических свойств. **2.1.1**: нативный хромофор GFP; **2.1.2-7**: АЕ-активные хромофоров; **2.1.8-13**: металл-чувствительные лиганды на основе GFP; **2.1.14**: анион-чувствительный хромофор; **2.1.15-16**: Хромофоров, сочлененные с макромолекулами; **2.1.17-18**: полимеры на основе хромофора GFP.

### Агрегативно-индуцированная эмиссия (АИЕ)

Ингибирование изомеризации и конформационной подвижности молекулы может быть достигнуто путем уменьшения температуры или кристаллизацией. Оба этих фактора часто связаны с тушением флуоресценции. Относительно редкий эффект возникновения флуоресценции при кристаллизации называется агрегативно-индуцированной эмиссией (АИЕ) [Mei и др., 2014]. АИЕ стал незаменимым инструментом для молекулярного зондирования и имиджинга [Ding и др., 2013; Kwok и др., 2015; Liang, Tang, Liu, 2015] в связи с высокой устойчивостью хромофоров к фотообесцвечиванию и очень большим разгоранием флуоресценции. По счастливой случайности было установлено, что длинноцепочечные эфиры хромофора **2.1.1** способны к АИЕ (рис 2.1.2а). Цвет результирующей эмиссии флуоресценции соединений **2.1.2а-с** в твердом состоянии зависит от соотношения мономер/эксимер, которое, в свою очередь, определяется видом упаковки флуорофоров. Позже было показано, что наблюдаемое явление АИЕ может быть использовано для создания флуоресцентных микрокристаллов и нановолокон с использованием этих хромофоров [Fery-Forgues и др., 2013].

С момента открытия эффекта АИЕ в хромофорах GFP схожие свойства были обнаружены и у других аналогов нативного хромофора (**2.1.3-2.1.7**) [Hsu и др., 2014; Huang и др., 2012a; Ikejiri и др., 2012; Shen и др., 2013; Tou и др., 2014]. Любопытно, что, в отличие от длинноцепочечных эфиров (**2.1.2а-с**) и соединений с полициклическими ароматическими заместителями (**2.1.3а-е**) [Huang и др., 2012a], алкильные производные **2.1.6** [Shen и др., 2013] обнаруживают небольшое цветовое разнообразие в зависимости от размера алкильного заместителя. Интересно, что некоторые хромофоры (**2.1.5а-d**) проявляют АИЕ в клеточных мембранах не за счет ингибирования внутреннего вращения в молекулах, а за счет исключения образования водородных связей между растворителем и хромофором, ответственного за тушение флуоресценции согласно механизму, предложенному Хуангом [Huang и др., 2012b].

### Ионные сенсоры

Было показано, что сверхбыстрая фотоизомеризация в хромофорах GFP может быть подавлена с помощью комплексообразования с ионами металлов на примере аза-производного **2.1.8а**, в котором фенольный фрагмент нативного хромофора **2.1.1** замещен на 2-пиридил [Baldrige и др., 2010]. Наибольшее увеличение флуоресценции ( $FI = 150$ ) наблюдалось в присутствии ионов  $Zn^{2+}$  и  $Cd^{2+}$  (рис 2.1.2b), однако константа диссоциации комплекса  $Zn^{2+}$ -**2.1.8а** ( $K_d$  0,5 мМ) указывала на его умеренную стабильность. Бидентатный лиганд следующего поколения – синтетический аналог хромофора синего флуоресцентного белка **2.1.9** [Fang и др., 2014] обладал улучшенной способностью к комплексообразованию с металлами. В целях увеличения чувствительности лигандов на основе GFP к ионам металлов были разработаны

три- и тетрадентатные лиганды **2.1.10-2.1.13** [Fang и др., 2013; Li и др., 2011; Shi и др., 2012], обладающие колоссальной стабильностью ( $K_d < 30$  нМ). Эти соединения были использованы в качестве  $Zn^{2+}$ -сенсоров *in vitro* [Fang и др., 2013].

Единственным примером использования флуорофора GFP в качестве анионного сенсора является хромофор **2.1.14**, флуоресценция которого селективно затухает в присутствии ионов фтора при гидролизе связей Si-O [Liu и др., 2014b].

### **Конъюгаты хромофоров с макромолекулами и полимерами**

С целью имитировать окружение  $\beta$ -бочонка белка было предпринято несколько попыток получения конъюгатов GFP-подобных хромофоров с различными макромолекулами. Хромофор GFP, ковалентно связанный с  $\beta$ -циклодекстрином **2.1.15** [Cacciarini и др., 2012], оказался способным к образованию внутримолекулярного комплекса включения, однако при этом наблюдалось лишь двукратное возрастание FI. Двухфотонное поглощение (2РА) хромофора GFP было использовано для обнаружения агрегации  $\beta$ -амилоидных пептидов [Clark и др., 2011, 2014]. При очень низких концентрациях конъюгата краситель-пептид **2.1.16** флуоресцентной эмиссии не наблюдалось, однако в тех же условиях наблюдался впечатляющий коэффициент 2РА 540 GM против 32 GM свободного хромофора. Авторы утверждают, что наблюдаемый скачок 2РА может быть использован в диагностике нейродегенеративных заболеваний, а также может дать ответ на вопросы о пространственном строении  $\beta$ -амилоида(1-42).

Эlegantными примерами макромолекулярных водорастворимых полимеров на основе хромофора GFP стали недавно полученные Чжу и др. диблок-сополимер PEG-PNIPAM-хромофор **2.1.17** и амфифильный полимер PEG-хромофор-PMMA **2.1.18** с улучшенными флуоресцентными свойствами (FI = 24) [Deng и др., 2012; Zheng и др., 2014]. PEG-PNIPAM-хромофор **2.1.17** обнаружил температурную зависимость усиления флуоресценции, которая появлялась при температуре выше НКТП (низшая критическая температура растворения) (FI = 8) в связи с разрушением цепи PNIPAM. Это свойство **2.1.17** было использовано для обнаружения бактерий *Bacillus thermophilus* (рис 2.1.2с).

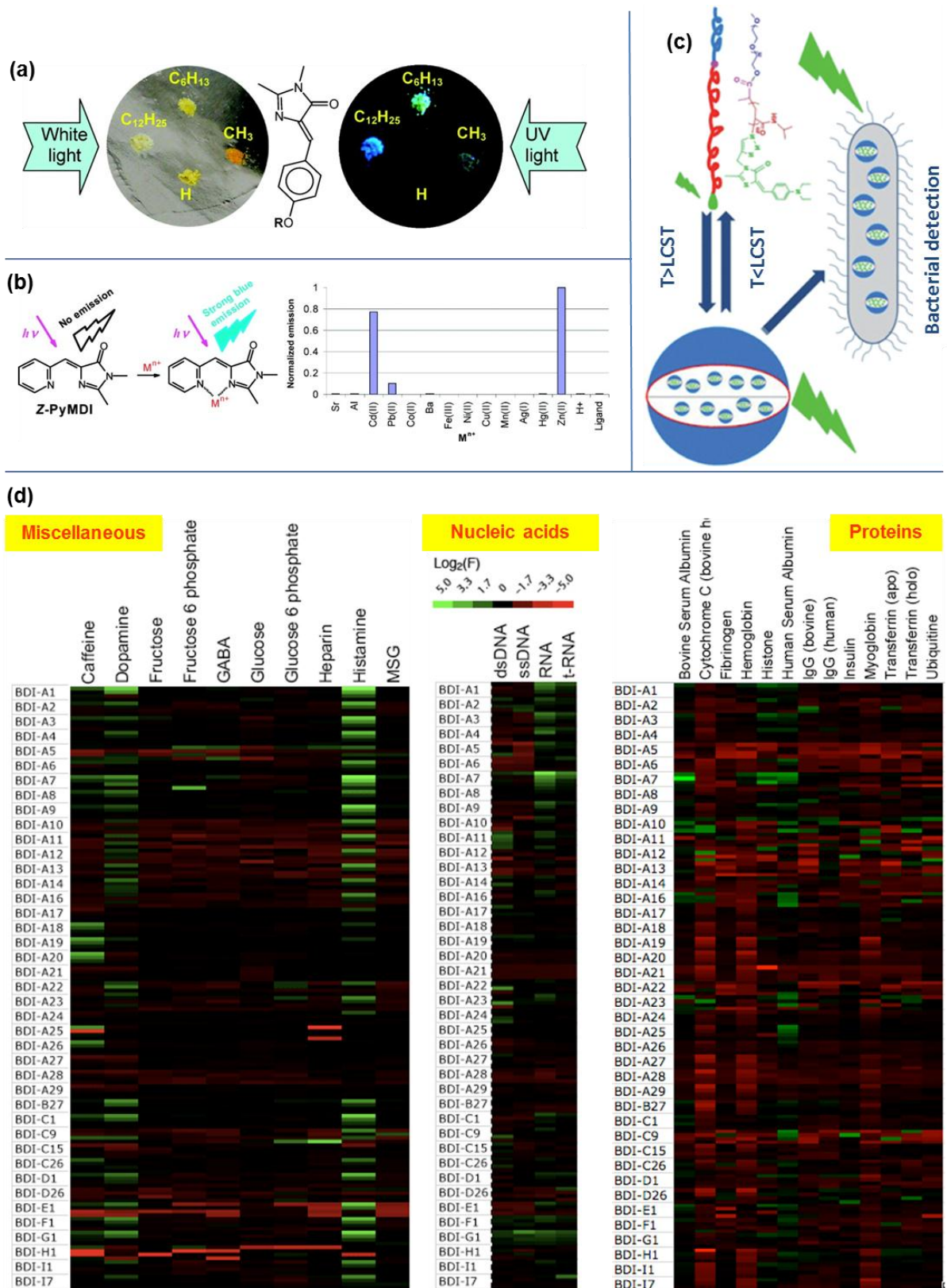


Рисунок 2.1.2. (a) Фотография в истинном цвете кристаллов **2.1.1** и **2.1.2a-c** при дневном и в УФ облучении. (b) Влияние комплексообразования с металлом на флуоресценцию **2.1.8a**. (c) Схематическое изображение полимера PNIPAM-Хромофор **2.1.17**, использованного для обнаружения бактерий. (d) Диаграмма интенсивностей флуоресцентной эмиссии при попарном смешивании хромофоров с различными классами аналитов. Зеленые полосы соответствуют



увеличению флуоресценции при смешивании. Рисунок воспроизводится по статье 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.

### **Хромофоры с фиксированной геометрией**

Введение дифторборильной группы в производные хромофора GFP оказалось важным методом создания соединений, обладающих интенсивной флуоресценцией в растворах [Baranov и др., 2012]. Аминированные конформационно-фиксированные GFP хромофоры обладают сильными сольватохромными свойствами, в то время как в их спектрах наблюдается значительный батохромный сдвиг. Так, например, для **2.1.19** (рис. 2.1.3) наблюдалось более чем 20-кратное увеличение FI между растворами в воде и в гидрофобных растворителях. Этот хромофор легко проникает в клетку, быстро окрашивает плазматическую мембрану и некоторые клеточные липидные органеллы в живых и фиксированных клетках без отмывания красителя. Как и в случае других флуорогенов, постоянный обмен красителя позволил добиться высокой кажущейся фотостабильности маркера. Дальнейшего батохромного сдвига в BF<sub>2</sub>-фиксированных GFP-хромофорах удалось достигнуть, предотвратив возможность вращения аминогруппы, и расширив систему сопряженных двойных связей, как в соединении **2.1.20** [Baranov и др., 2014b]. BF<sub>2</sub>-Фиксированный хромофор **2.1.21**, сочлененный с ингибитором катепсина, использовали как метку, основанную на активности и подходящую для визуализации человеческого катепсина в геле [Frizler и др., 2013].

### **Определение различных аналитов с применением синтетических хромофоров GFP.**

#### **Первые кандидаты**

Для систематического изучения связывания (комплексообразования) хромофоров GFP, а также изучения селективности флуоресцентных меток Ли и др. провели скрининг библиотеки, состоящей из 41 хромофора против 94 биологически релевантных случайных аналитов (рис. 2.1.2d) [Lee и др., 2011]. Этот высокопроизводительный скрининг позволил создать библиотеку флуоресцентных синтетических хромофоров. Было обнаружено, что флуоресценция большинства соединений неспецифична, т.е. эмиссия наблюдается в присутствии различных анализируемых молекул. Оптические свойства некоторых хромофоров были затем изучены более подробно в сочетании с такими простыми аналитами, как октакислоты [Baldrige и др., 2011a] и желчные кислоты [Baldrige, Amador, Tolbert, 2011]. Наибольший FI при связывании в обеих системах наблюдался для орто-замещенных производных **2.1.22** (FI = 38 с каликс[4]арен октакислотами) и **2.1.23** (FI= 212 с желчными кислотами). Структуры хромофоров **2.1.22** и **2.1.23** приведены на рис. 2.1.3.

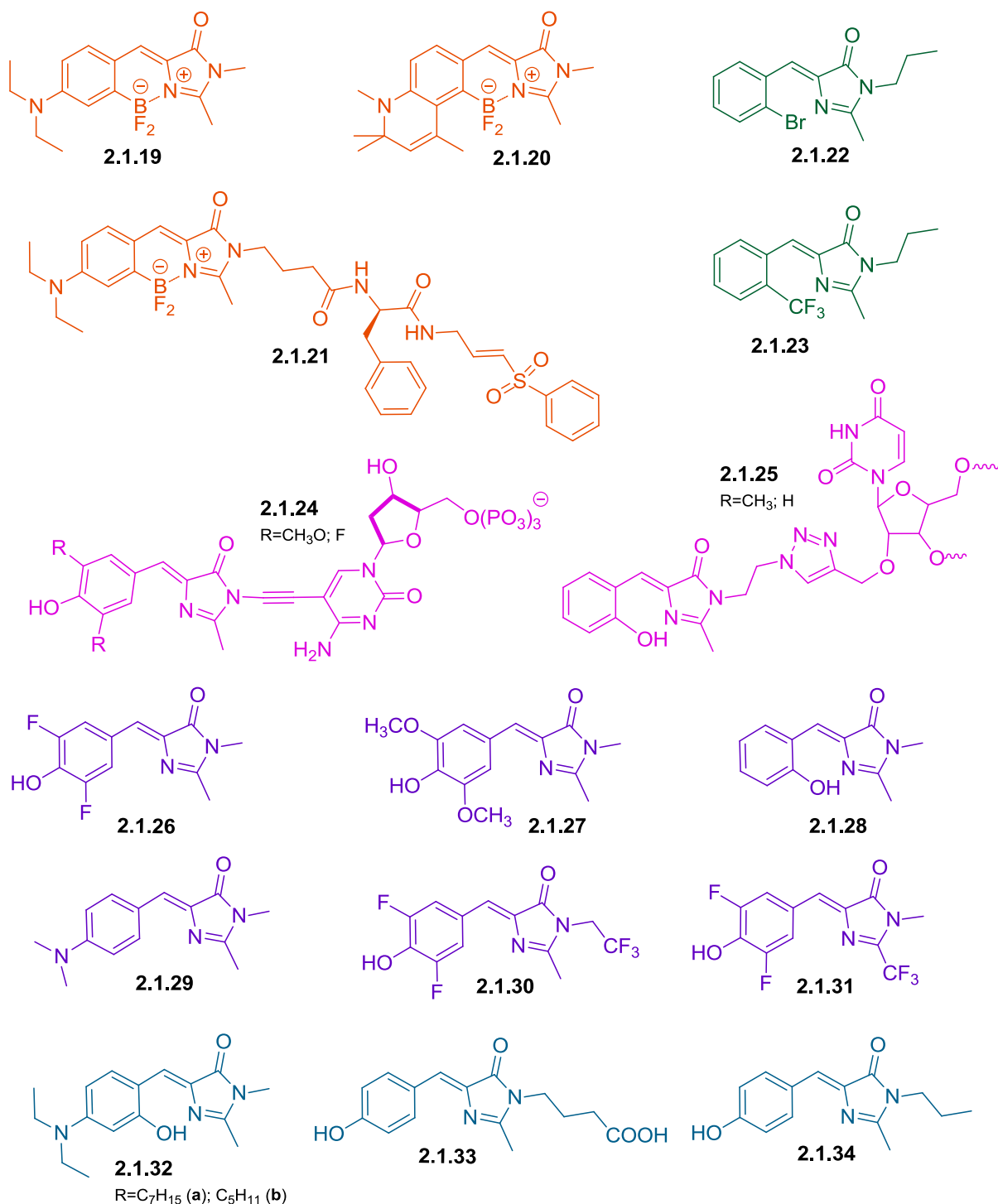


Рисунок 2.1.3. Структуры синтетических хромофоров ФБ. Цвета подгрупп хромофоров не отражают их реальных оптических свойств. **2.1.19-21**: хромофоры с фиксированной геометрией; **2.1.22-23**: хромофоры, связывающиеся с небольшими молекулами (каликс[4]арен окта-кислотами и желчными кислотами); **2.1.24-25**: хромофоры ковалентно связанные с олигонуклеотидами, применимые для ДНК-зондирования; **2.1.26-31**: хромофоры, связывающиеся с РНК-аптамерами; **2.1.32-34**: хромофоры для обнаружения ядерных рецепторов.

## Детекция нуклеиновых кислот. От модификаций ДНК до связывания с РНК-аптамерами

Известны два основных подхода к детекции нуклеиновых кислот с использованием GFP-хромофоров. Первый из них включает в себя ковалентное связывание хромофоров с олигонуклеотидами, в то время как второй основан на оптимизации взаимодействий хромофоров с ДНК (РНК). Соединение **2.1.24** (рис. 2.1.3), полученное Ридлом и др., [Riedl и др., 2012] было использовано в качестве ПЦР-праймера в ферментативном синтезе олигонуклеотидов или ДНК-зондов. После связывания с белком наблюдался умеренный рост флуоресценции (в 2-3.2 раза). Тем не менее, эта концепция была применена для сиквенс-специфичного связывания фактора транскрипции p53 с дцДНК и неспецифического связывания SSB-белка с олигонуклеотидом. Попытка ввести хромофор GFP в олигонуклеотиды напрямую с использованием пост-синтетических методов модификации (**2.1.25**) [Wenge, Wagenknecht, 2011] не увенчалась успехом, так как наблюдаемые квантовые выходы хромофора GFP были слишком малы для практического применения. Напротив, для полициклического производного хромофора GFP **2.1.7** [Кејірі и др., 2012] наблюдалось 500-кратное увеличение FI в присутствии двухцепочечной ДНК, что значительно превышало этот показатель для бромистого этидия (FI ~10), обычно используемого для детекции дцДНК. Соединение **2.1.7** также обладало АIE-активностью.

На сегодняшний день, наиболее развитым методом применения синтетических GFP-подобных хромофоров является введение меток в целевые РНК с использованием аптамеров, предложенное Жафре и его коллегами в 2011 году [Paige, Wu, Jaffrey, 2011]. В этой работе были получены РНК-аптамеры, специфично связывающиеся с некоторыми синтетическими хромофорами GFP. Было установлено, что эти аптамеры способны значительно (вплоть до 2000 раз) усиливать флуоресценцию хромофоров вследствие возникновения стерических затруднений, предотвращающих изомеризацию хромофора и обусловленных связыванием с аптамером. Самый яркий комплекс состоял из нековалентно связанных 98-нуклеотидного РНК-аптамера Spinach и хромофора DFHBI (**2.1.26**, рис 2.1.3), с  $K_d$  около 0,5 мкМ (рис. 2.1.4). Хромофор **2.1.26**, практически нефлуоресцентный в растворах, ярко флуоресцирует зеленым (квантовый выход 72%) в комплексе со Spinach. Введение двух атомов фтора в хромофор GFP привело к сильному снижению  $pK_a$ . Несколько других хромофоров различных цветов (**2.1.27-2.1.29**, рис. 2.1.3) обладали схожими свойствами, но более слабыми FI.

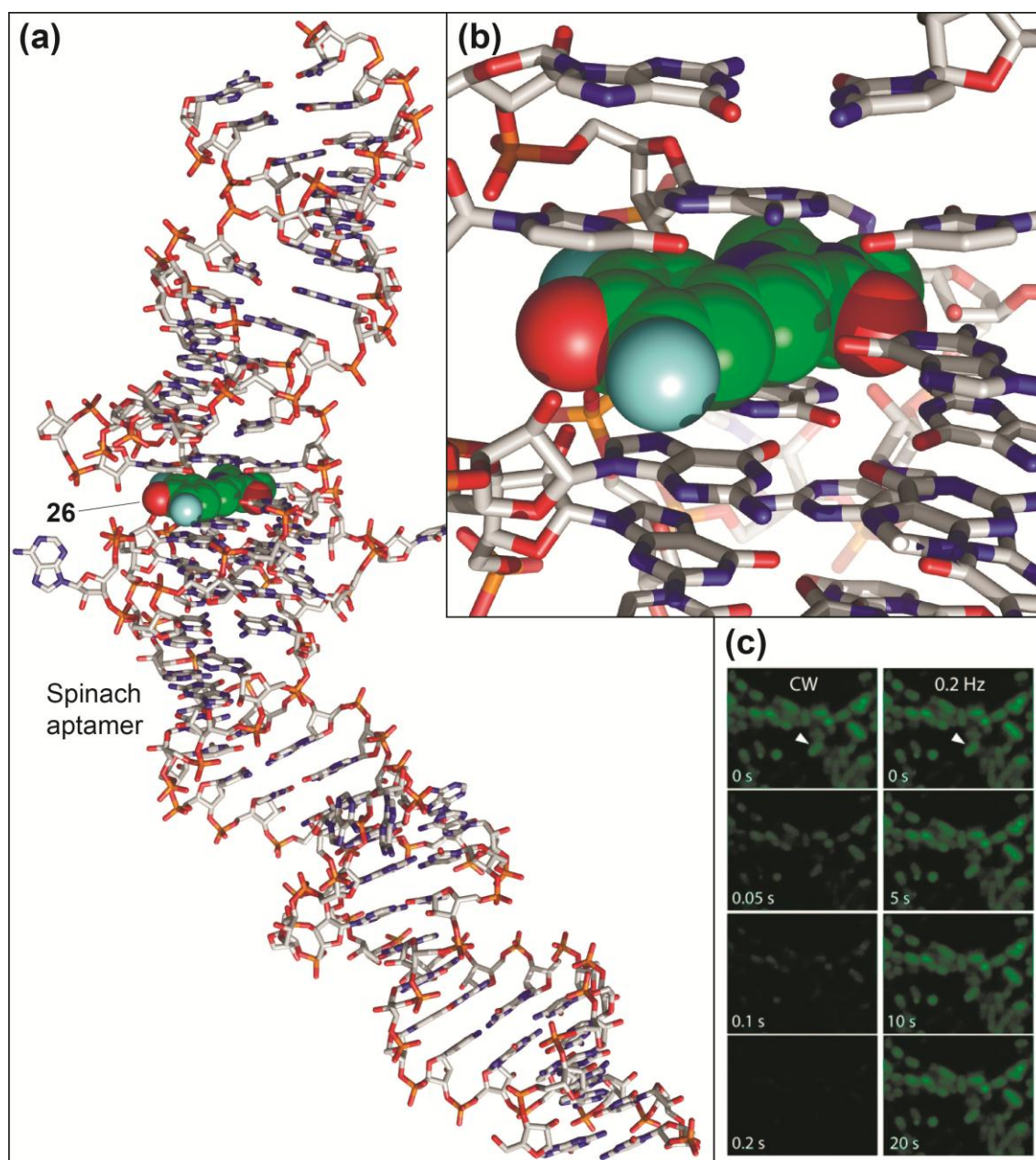


Рисунок 2.1.4. Структура комплекса РНК-аптамера с хромофором. (а) Кристаллическая структура РНК-аптамера Spinach, связанного с синтетическим хромофором GFP **2.1.26** (атомы углерода представлены зеленым цветом). (b) Сайт связывания с хромофором в увеличенном масштабе. (c) Покадровая широкоугольная флуоресцентная микроскопия бактерий с Spinach/**2.1.26** с постоянным (слева) или импульсным (справа) освещением. Обращает на себя внимание резкое улучшение фотостабильности в случае импульсного освещения. Рисунок воспроизводится по статье 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.

Кристаллографические исследования комплекса Spinach/**2.1.26** выявили структурную основу взаимодействия хромофора и аптамера [Huang и др., 2014; Warner и др., 2014]. Spinach

РНК образует изогнутую палочкообразную структуру длиной 11 нм (рис 2.1.4a), в которой G-квадруплекс играет основную роль в связывании с хромофором **2.1.26**. Совместно с четырьмя основаниями (U50, A53, U29 и неспаренным G28) G-квадруплекс формирует карман, в котором **2.1.26** принимает плоскую цис-конфигурацию, стабилизированную стэкинг-взаимодействиями с нуклеиновыми основаниями и водородными связями (рис. 2.1.4b).

Несмотря на практичность комплекса Spinach/**2.1.26** для решения определенных задач, он обладает несколькими серьезными недостатками, которые препятствуют его широкому применению:

1. низкая эффективность внутриклеточного фолдинга;
2. чувствительность к фланкирующим последовательностям РНК;
3. низкая термостабильность (температура плавления 34°C);
4. сильная зависимость от концентрации ионов  $Mg^{2+}$ ;
5. большой размер.

Эти проблемы были частично решены в последующих работах. Например, сайт-направленный мутагенез Spinach привел к получению Spinach2 с улучшенными фолдингом и термостабильностью (т. пл. 38°C), а также обладающим в несколько раз большей яркостью флуоресценции в живых клетках по сравнению с исходным Spinach [Strack, Disney, Jaffrey, 2013]. Было обнаружено, что флуоресценция аптамера (Spinach и Spinach2) значительно возрастает при введении его в тРНК, которая действует как жесткий каркас [Paige, Wu, Jaffrey, 2011; Strack, Disney, Jaffrey, 2013]. Кроме того, вдвое меньший вариант, названный Baby Spinach, был получен путем удаления несущественных частей РНК-аптамера Spinach [Warner и др., 2014]. Наконец, был разработан новый подход к подбору РНК-аптамеров на основе их способности активировать флуоресценцию **2.1.26** в живых бактериальных клетках [Filonov и др., 2014]. Этот метод позволил получить новый 49-нуклеотидный аптамер Broccoli. В отличие от производных Spinach, внутриклеточный фолдинг Broccoli эффективен и не требует наличия тРНК и ионов  $Mg^{2+}$ . Более того, Broccoli термостабилен (т. пл. 48°C) и не обладает чувствительностью к фланкирующим последовательностям РНК.

Другим направлением усовершенствования флуоресцентного комплекса аптамер/хромофор стал синтез аналогов хромофора **2.1.26** ( $\lambda_{ex/em}$  447/501 нм) с улучшенными оптическими свойствами [Song и др., 2014]. Были получены два таких аналога, обладавших большим сродством к Spinach2: зеленый DFHBI-1T (**2.1.30**,  $\lambda_{ex/em}$  482/505 нм) и желтый DFHBI-2T (**2.1.31**,  $\lambda_{ex/em}$  500/523 нм) (рис. 2.1.3).

Обратимое связывание **2.1.26** со Spinach с относительно низкой (мкМ) аффинностью является причиной необычного поведения комплекса на свету. Микроскопия с постоянным интенсивным освещением приводила к быстрому выгоранию комплекса, который, однако,

столь же быстро восстанавливался за счет обмена со свободными молекулами хромофора из раствора [Han и др., 2013; Wang и др., 2013]. Это свойство может быть использовано для достижения чрезвычайно высокой флоростабильности сигнала Spinach. Для этого следует использовать импульсную подсветку с низкой частотой повторения, обеспечивающую достаточное время для обмена хромофора и восстановления флуоресценции (рис. 2.1.4с) [Han и др., 2013].

Флуорогенные комплексы на основе РНК-аптамеров нашли практическое применение как флуоресцентные метки для исследуемых последовательностей РНК [Paige, Wu, Jaffrey, 2011]. Так, было показано, что Spinach/2.1.26 может быть использован для наблюдения за экспрессией генов на уровне одной бактериальной клетки (рис. 2.1.4с) и визуализации внутриклеточного распределения и динамики продуктов транскрипции РНК-полимеразы III (например, 5S рРНК) в живых клетках млекопитающих [Paige, Wu, Jaffrey, 2011; Pothoulakis и др., 2014]. В то же время обнаружение продуктов транскрипции РНК-полимеразы II (мРНК) оказалось затруднительным [Shin и др., 2014], хотя один такой пример был задокументирован для РНК-аптамера Spinach2 [Strack, Disney, Jaffrey, 2013]. Spinach оказался применим также для мониторинга транскрипции *in vitro* [Höfer, Langejürgen, Jäschke, 2013].

Spinach может также быть использован для создания флуоресцентных сенсоров для различных внутриклеточных метаболитов [Paige и др., 2012]. Для этого метаболит-связывающий РНК-аптамер вводится в структуру Spinach так, чтобы при связывании целевого метаболита флуоресценция Spinach/2.1.26 сильно возрастала [Kellenberger и др., 2013; Paige и др., 2012; Strack, Song, Jaffrey, 2013]. Аналогичным образом Spinach может быть связан с протеин-связывающим аптамером для наблюдения за экспрессией эндогенных целевых белков в живых бактериальных клетках [Song, Strack, Jaffrey, 2013].

Для выявления целевых последовательностей РНК недавно были разработаны варианты Spinach, активируемые гибридизацией с искомой последовательностью [Bhadra, Ellington, 2014]. Модифицированный РНК-аптамер Spinach.ST принимает неактивную конформацию, не способную связывать 2.1.26. После гибридизации со специфической последовательностью Spinach.ST принимает активную хромофор-связывающую конформацию, способную к флуоресценции. На сегодняшний день этот метод был испытан только *in vitro*, однако в случае успеха *in vivo* он имеет большой потенциал.

### **Визуализация белков и белковых комплексов. От ЧСА до ядерных рецепторов**

Диаграмма, приведенная на рисунке 2.1.2d, показывает ряд успешных селективных взаимодействий хромофор-белок, приводящих к появлению флуоресценции. Руководствуясь

первичными наблюдениями, было синтезировано соединение **2.1.32a** (рис. 2.1.3), обладающее специфичной чувствительностью к сывороточному альбумину человека ( $FI = 72$ ) [Baldrige и др., 2011b]. Еще одной важной группой исследуемых белков и белковых комплексов являются ядерные рецепторы (ЯР) - лиганд-активируемые факторы транскрипции, играющие ключевую роль в ряде важных биологических и физиологических процессов [Gronemeyer, Gustafsson, Laudet, 2004; Novac, Heinzl, 2004]. В последние годы разработка новых флуоресцентных зондов позволила локализовать и визуализировать взаимодействие ЯР с различными лигандами внутри клеток. В частности, использование гибридных белков GFP с конкретными ядерными рецепторами позволило выявить функции и установить подвижность различных ЯР *in vivo* [Htun и др., 1999]. Недостатком гибридных белков, в частности, белков слияния с лиганд-связывающим доменом, являются потенциальные помехи во взаимодействии лиганд-связывающего домена с белком-коактиватором, необходимым для регуляции транскрипции. За последние годы было опубликовано несколько работ, посвященных синтезу и исследованиям свойств различных конъюгатов флуоресцентных красителей с лигандами  $\alpha$ -эстрогеновых рецепторов человека (ЭРа), предназначенных для обнаружения ЭРа [Adamczyk, Reddy, Yu, 2002; Asai и др., 2007; Rickert и др., 2010]. Было установлено, что стерически затрудненные конъюгаты значительно снижают аффинность лигандов к рецептору [Christoph, Meyer-Almes, 2003]. Несмотря на их приемлемые оптические свойства, эти соединения не подходили в качестве потенциальных лигандов к исследуемым рецепторам из-за их низкой активирующей способности. Таким образом, использование потенциально флуоресцентных низкомолекулярных лигандов вместо стерически затрудненных гибридных белков GFP или небольших конъюгатов имеет двойное преимущество. Мало того, что эти низкомолекулярные соединения потенциально являются новым классом лигандов, обладают активирующими свойствами, схожими с активностью природных лигандов к исследуемым рецепторам, интенсивная флуоресценция этих молекул позволяет также избежать стерических помех, свойственных гибридным белкам.

В ходе предварительных исследований [Duraj-Thatte] было обнаружено, что некоторые ядерные рецепторы (различные варианты ЭРа и несколько других ЯР) могут быть активированы с помощью синтетических хромофоров GFP. Первоначальный поиск подходящего лиганда был основан на структурной аналогии между нефлуоресцентным агонистом и хромофором, подтвержденной результатами молекулярного докинга (рисунки 2.1.5a, на примере хромофора **2.1.33**). Для того чтобы подобрать наиболее активный синтетический агонист, ядерные рецепторы были активированы группами гомологов и изомеров хромофоров. В некоторых случаях аффинность хромофоров GFP достигала таковой природного лиганда (рис 2.1.5b). Активация и локализация ЯР в присутствии хромофоров GFP



была проведена на уровне клеток (рис. 2.1.5c) и в крупных микроорганизмах (рис. 2.1.5d) [Jones и др., 2015].

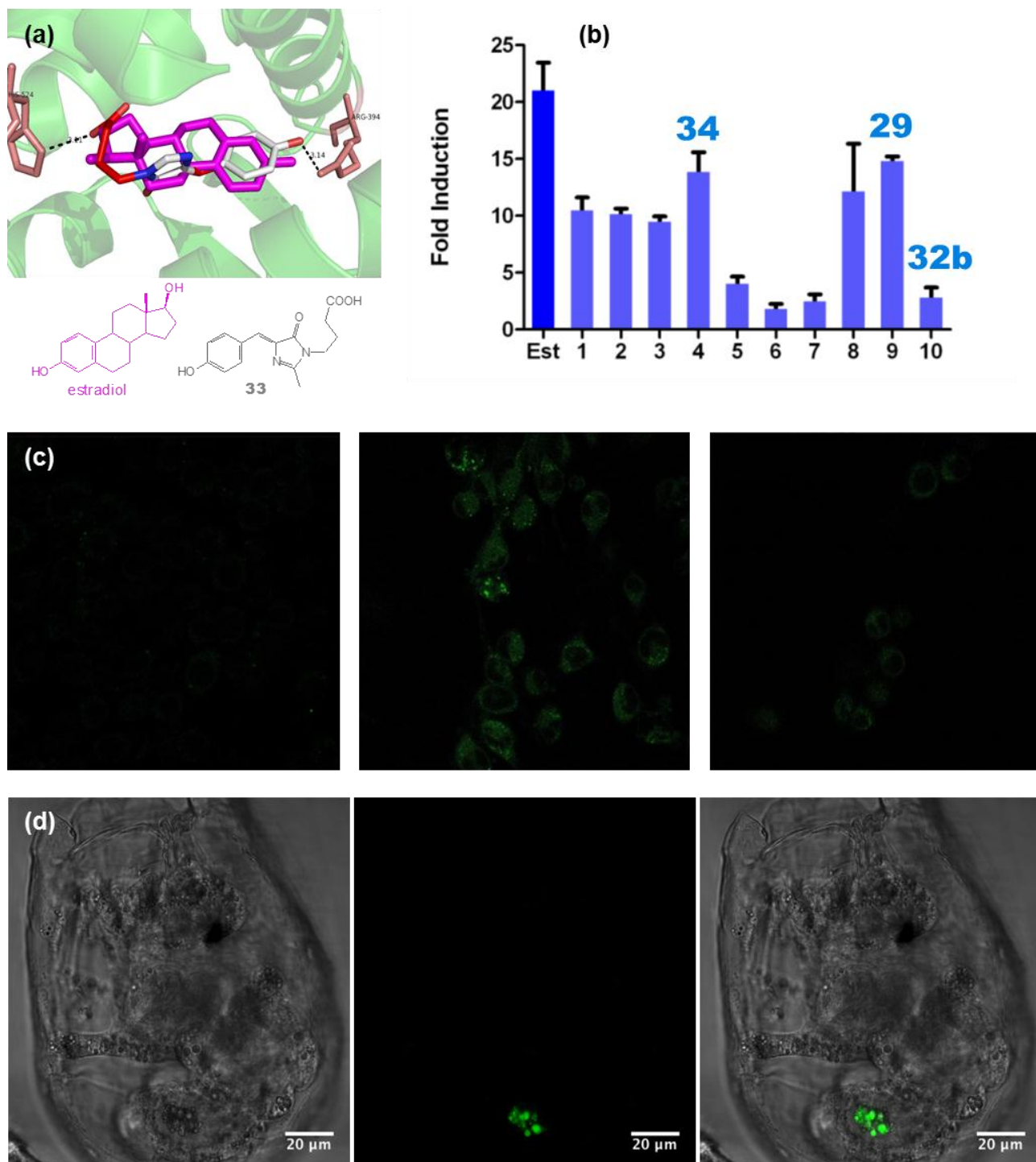


Рисунок 2.1.5. Синтетические хромофоры GFP в качестве флуоресцентных агонистов ядерных рецепторов. (a) Молекулярное моделирование хромофора **2.1.33** в связывающем кармане ЭРа с наложением эстрадиола (розовый). (b) Активность хромофоров в клетках млекопитающих (НЕК293Т), экспрессирующих ЭРа. (c) Визуализация клеток НИН 3Т3 с синтетическими хромофорами GFP. Клетки млекопитающих, экспрессирующие ЭРа (Gal4DBD:



ER $\alpha$ LBD), инкубировали с **2.1.32b** (в центре) и **2.1.34** (слева). Негативный контроль: клетки без рецептора ER $\alpha$  инкубировали с **2.1.32b** (справа). (d) Визуализация ядерного рецептора с хромофором **2.1.29** в колловратке. Рисунок воспроизводится по статье 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.

### **Заключение и перспективы**

В этой главе обзора литературы приведены многочисленные примеры применения нового класса флуорогенов - синтетических хромофоров флуоресцентных белков. Очевидно, что эти хромофоры имеют множество преимуществ, таких как простой метод синтеза, широкий спектральный диапазон, практически отсутствующая токсичность и высокая интенсивность флуоресценции при связывании с целевыми молекулами. В заключение можно отметить несколько перспективных направлений исследований в этой области. В первую очередь, более широкое использование "красных" хромофоров. На данный момент в большинстве существующих приложений используются синие, зеленые и желтые флуорофоры. Однако в будущем быстро расширяющаяся библиотека красных хромофоров позволит проводить имиджинг живых тканей, а также избегать высокоэнергетического облучения образцов. Хорошей альтернативой, разумеется, является использование двухфотонной спектроскопии, которая обсуждалась выше. Еще одной задачей на перспективу является структурная характеристика связывания хромофоров с различными партнерами. На сегодня единственной охарактеризованной структурой является комплекс Spinach-**2.1.26**. Понимание структурной основы связывания и возрастания флуоресценции позволит в будущем улучшить эти параметры и достичь лучших селективности и чувствительности. Наконец, продолжается поиск новых белков-мишеней и других объектов для визуализации.

## 2.2. Люциферины: строение, механизмы действия, синтез, применение

Альтернативным флуоресцентному имиджингу методом визуализации процессов, протекающих в живых системах, является имиджинг на основе биолюминесценции.

Биолюминесценция вызывается биохимической реакцией, в результате которой химическая энергия преобразуется в световую. Реакция биолюминесценции включает два основных компонента: субстрат, окисляемый молекулярным кислородом, и фермент, чаще всего называемый люциферазой, катализирующий реакцию, приводящую к образованию неактивного продукта и испусканию квантов света. Общий механизм реакции биолюминесценции представлен на схеме 2.2.1.

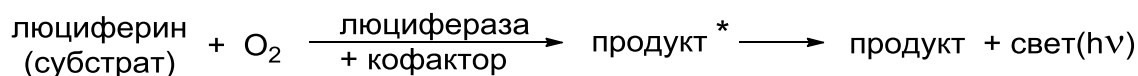


Схема 2.2.1. Общая форма реакции биолюминесценции.

Из тридцати существующих биолюминесцентных систем всего для семи удалось полностью охарактеризовать химические структуры субстратов - люциферинов, и лишь для части из них были секвенированы гены люцифераз. Среди семи описанных люциферин-люциферазных и фотопротеиновых систем широкое практическое применение на сегодняшний день нашли только три: светлячковая, бактериальная и целентеразиновая.

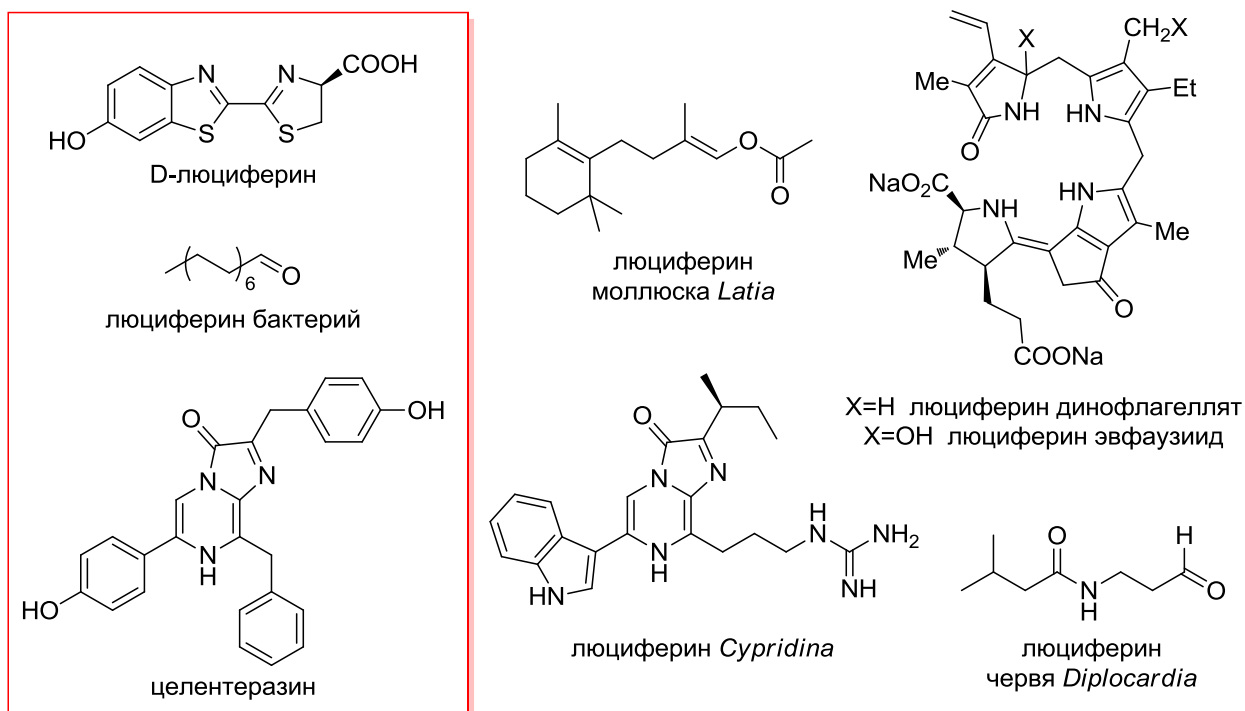


Рисунок 2.2.1. Семь охарактеризованных структур люциферинов.

### Билюминесцентная система D-люциферина светляка

Светящиеся жесткокрылые (*Coleoptera*) включают в себя около 2000 видов, в основном принадлежащих к трем семействам: *Lampyridae* (истинные светляки), *Phengodidae* (железнодорожные жуки) и *Elateridae* (жуки-щелкуны). Изучение билюминесцентной системы этих светящихся насекомых началось около 50 лет назад с новаторской работы Уильяма МакЭлроя, Эмиля Уайта и Говарда Селигера, исследовавших североамериканских светляков *Photinus pyralis*, испускающих желто-зеленый свет с длиной волны 560 нм [Seliger, McElroy, 1964; White и др., 1971]. Оказалось, что в основе этой системы лежит взаимодействие между природным субстратом D-люциферин ((S)-2-(6'-гидрокси-2'-бензотиазолил)тиазолин-4-карбоновой кислотой) и люциферазой светляка (рис. 2.2.2).

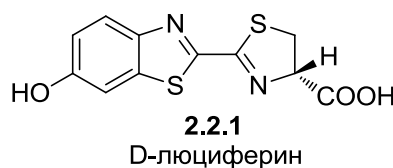


Рисунок 2.2.2. Структура D-люциферина светляка.

Реакция билюминесценции светляков является многоступенчатым процессом, протекающим только при участии ионов  $Mg^{2+}$  и молекулы АТФ. Кратко общепринятый механизм реакции представлен на схеме 2.2.2. На первом этапе люцифераза светляка преобразует D-люциферин в связанный с ферментом аденилат (стадия а). Последующие депротонирование альфа-положения аденилата (стадия b) и присоединение молекулярного кислорода к образовавшемуся карбаниону (стадия c) приводят к образованию пероксид-аниона люциферина. На финальном этапе оксилуциферин в возбужденном состоянии образуется при электроциклическом распаде (стадия e) диоксетанона, образовавшегося в результате циклизации пероксид-аниона люциферина (стадия d) [Hopkins и др., 1967; Koo, Schmidt, Schuster, 1978; Shimomura, Goto, Johnson, 1977; White и др., 1969, 1971].

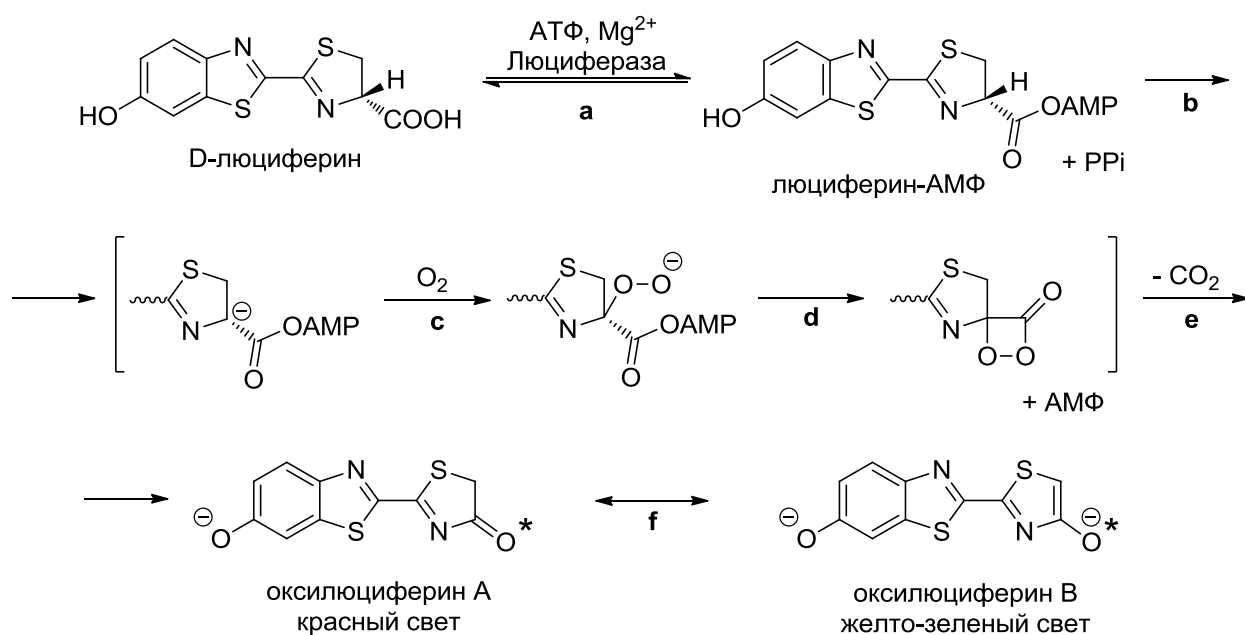


Схема 2.2.2. Механизм биолюминесценции D-люциферина

Вероятным механизмом хемовозбуждения D-люциферина является механизм, предложенный Шустером (схема 2.2.3) [Koo, Schmidt, Schuster, 1978; Schuster, 1979]. Этот процесс, известный как механизм химически инициируемой электронообменной люминесценции (CIEEL), включает в себя два последовательных этапа переноса электрона. На первом этапе хромофор отдает электрон пероксидному фрагменту диоксетанона, что приводит к расщеплению связи O-O и отщеплению CO<sub>2</sub>. На следующем этапе обратный перенос электрона приводит к образованию возбужденного люминофора.

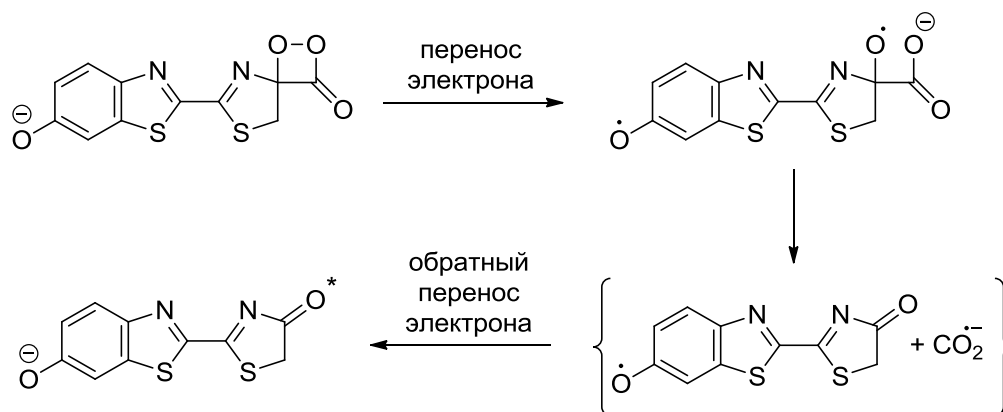


Схема 2.2.3. Механизм CIEEL, предложенный для D-люциферина.

Ключевым этапом в многочисленных описанных синтезах D-люциферина является конденсация D-цистеина с 2-циано-6-гидроксибензотиазолом **i** (схема 2.2.4), получаемым различными методами из *para*-анизидина **ii** [Seto, Ogura, Nishiyama, 1963; Toya и др., 1992;

White и др., 1961, 1965]. Современный метод синтеза цианобензотиазола **i** основан на конденсации соли Аппеля (хлорид дитиазолия) с *n*-анизидином с получением иминодитиазола **iii**, который затем легко расщепляется под действием нуклеофилов с получением тиокарбонильного производного **iv** [McCutcheon и др., 2012]. Циклизация последнего в цианобензотиазол и удаление метильной защитной группы с фенольного гидроксила приводят к получению искомого предшественника **i** с высоким выходом.

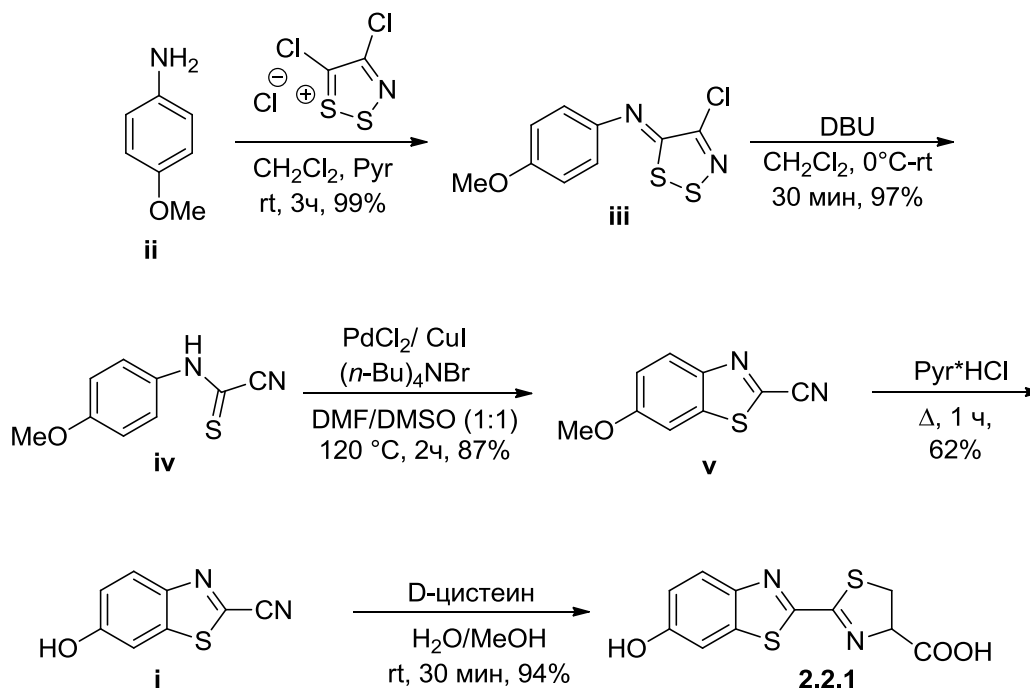


Схема 2.2.4. Современный метод синтеза D-люциферина.

Одним из наиболее подробно изученных ферментов, катализирующих реакцию биолюминесценции светляков, является люцифераза североамериканского светляка *Photinus pyralis*, кристалл которой был впервые получен еще в 1956 году [DeLuca, 1976; DeLuca, McElroy, 1978; Green, McElroy, 1956]. Люцифераза *P. pyralis* представляет собой белок с молекулярной массой около 62 кДа и максимумом эмиссии 557 нм. Со временем были выделены и секвенированы люциферазы других светящихся жесткокрылых, максимумы спектров биолюминесценции которых варьировались в диапазоне от зеленого (жук щелкун *Pyrophorus plagiophthalmus*, 546 нм [Wood, Lam, McElroy, 1989]) до красного (*Phrixothrix sp.*, 609-639 нм [Viviani, Vechara, Ohmiya, 1999]) в реакции с D-люциферинном.

Первая открытая люцифераза вида *Photinus pyralis* нашла самое широкое применение среди всех биолюминесцентных систем. Современные технологии позволяют количественно определять концентрации люциферазы на аттомолярном уровне, что сделало этот фермент привлекательным кандидатом для различных биоаналитических применений, требующих высокой чувствительности. Огромное разнообразие применений люциферазы *Photinus pyralis*

включает зонды для обнаружения бактерий и экотоксинов [Squirrell, Price, Murphy, 2002; Urata и др., 2009], биолюминесцентные пробы на основе BRET-пар для визуализации белок-белковых взаимодействий [Arai и др., 2002; Prinz, Diskar, Herberg, 2006], аналитические пробы для изучения экспрессии генов [Gould, Subramani, 1988; Leclerc и др., 2000; Paddison, Caudy, Hannon, 2002], а также цельноклеточные биосенсоры [Gu, Mitchell, Kim, 2004; Roda и др., 2004; Urban и др., 2007]. Люцифераза светляков также была экспрессирована в клетках млекопитающих для наблюдения за различными клеточными событиями, такими как рост опухоли и метастазирование [Rehemtulla и др., 2000; Yu и др., 2003] и регуляция генов [Contag, Bachmann, 2002].

Применение природных люцифераз сопряжено с рядом проблем, одной из которых является их низкая стабильность при повышенных температурах (более 30°C) и под действием различных реагентов. За последние десятилетия был совершен ряд попыток усовершенствовать биолюминесцентную систему *P. pyralis*, а также других природных люцифераз [Koksharov, Ugarova, 2012]. В результате на сегодняшний день для практического применения доступна обширная «многоцветная» библиотека естественных и мутантных люцифераз, обладающих улучшенными оптическими и физическими свойствами [Nakajima, Ohmiya, 2010]. Информация о некоторых из них приведена в таблице 2.2.1.

Таблица 2.2.1. Разнообразие природных люцифераз D-люциферина.

Название люциферазы	Вид	$\lambda_{\max}$ (нм)	Источник
Светляковые люциферазы ( <i>Firefly</i> ), Семейство <i>Lampyridae</i>	<i>Photinus pyralis</i>	560	гены <i>luc+</i> , <i>luc2</i> (Promega)
	<i>Luciola mingrelica</i>	570	[Devine и др., 1993]
	<i>Luciola lateralis</i>	552	[Tatsumi, Kajiyama, Nakano, 1992]
	<i>Luciola cruciata LcLuc1</i>	554	[Tatsumi и др.; Tsutomu, Hiroki, Eiichi, 1989]
	<i>Luciola cruciata LcLuc2</i>	543	[Oba и др., 2010]
	<i>Luciola italica</i>	566/614	[Branchini и др., 2006]
	Малазийская <i>Luciola</i> <sup>1</sup>	580	[Ogo, Akiyoshi, Suzuki, 2014]
	<i>Hotaria unimunsana</i>	-	[Choi и др., 2002]
	<i>Hotaria tsushimana</i>	-	[Choi и др., 2003]
	<i>Hotaria papariensis</i>	-	[Choi и др., 2003]
	<i>Hotaria parvula</i>	568	[Ohmiya и др., 1995]
	<i>Lampyris noctiluca</i>	550	[Sala-Newby, Thomson, Campbell, 1996]
	<i>Lampyris turkestanicus</i>	-	[Alipour и др., 2004]
	<i>Nyctophyla caucasica</i>	-	[Day и др., 2006]
	<i>Pyrocoelia rufa</i>	-	[Lee и др., 2001]
	<i>Pyrocoelia miyako</i>	550	[Ohmiya и др., 1995]
	<i>Diaphanes pectinealis</i>	-	[Xueyan, Shuang, Xingcai, 2006]
	<i>Cratomorphus distinctus</i>	550	[Viviani и др., 2004]
	<i>Photirus pennsylvanica</i>	-	Ген <i>Ppe</i> (LY) [Ye и др., 1997]
		Ген <i>Ppe</i> J19 [Ye и др., 1997]	
		Ген <i>Ppe</i> 1(KW) [Ye и др., 1997]	
		Ген <i>Ppe</i> 2(KW) [Ye и др., 1997]	
<i>Amydetes vivianii (fanestratus)</i> <sup>2</sup>	538	[Viviani и др., 2011]	
<i>Macrolampis sp</i>	569	[Viviani и др., 2007]	
Люцифераза жука-щелкуна ( <i>Click beetle</i> ), Семейство <i>Elateridae</i>	<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	537	ген ELuc (TOYOBO)
	<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>	540	ген CBG (Promega)
		615	ген CBR (Promega)
	<i>Pyrophorus plagiophthalmus (dYG)</i>	560	[Wood и др., 1989]
	<i>Pyrophorus plagiophthalmus (dGR)</i>	546	[Wood и др., 1989]
	<i>Pyrophorus plagiophthalmus (vOR)</i>	593	[Wood и др., 1989]
	<i>Pyrophorus plagiophthalmus (vYE)</i>	578	[Wood и др., 1989]
	<i>Pyrophorus plagiophthalmus (vYG)</i>	563	[Stolz и др., 2003]
	<i>Pyrophorus mellifluus (dGR)</i>	549	[Stolz и др., 2003]
	<i>Pyrophorus mellifluus (vGR)</i>	554	[Stolz и др., 2003]
	<i>Pyrophorus angustus (vYG)</i>	566	[Oba, Kumazaki, Inouye, 2010]
	<i>Pyrophorus angustus (vYG)</i>	536	[Oba, Kumazaki, Inouye, 2010]
<i>Fulgeochlizus bruchi</i>	540	[Amaral, Prado, Viviani, 2012]	
<i>Photophorus jansonii</i>	559	[Mitani и др., 2013]	
Люцифераза железнодорожного червя ( <i>Railroad worm</i> ), Семейство <i>Phengodidae</i>	<i>Rhagophthalmus ohbai</i>	550	ген SLG (TOYOBO)
		580	ген SLO (TOYOBO)
	<i>Phrixotrix hirtus</i>	630	ген SLR (TOYOBO)
	<i>Phrixotrix vivianii</i>	542	[Viviani, Ohmiya, 2007]
	<i>Diplocladon</i> <sup>3</sup>	557-562	[Akiyoshi, Ogo, Suzuki, 2014]

Также, широкое применение находят гомологи люциферазы жука-щелкуна *Pyrophorus plagiophthalmus*. Для белков этого ряда характерно разнообразие спектров биолюминесценции от зеленого (CBG, 546 нм) до оранжевого (CBR, 593 нм) [Wood, Lam, McElroy, 1989].

<sup>1</sup> Авторы патента не предоставили более точной информации по виду организма.

<sup>2</sup> Изначально вид организма ошибочно был определен авторами: [Viviani и др., 2015].

<sup>3</sup> Авторы патента не предоставили более точной информации по виду организма.

В литературе описаны примеры применения люциферазы жука-шелкуна *P. plagiophthalmus* в исследованиях различных опухолевых заболеваний, таких как почечная карцинома мышей [Kobayashi и др., 2010] и рак яичников [Salomonsson и др., 2013], а также в исследованиях различных возбудителей инфекционных заболеваний: бакуловирусов [Karp и др., 1992, 1996; Oker-Blom и др., 1993] и *Trypanosoma brucei* [Reet Van и др., 2014].

Пригодность билюминесцентного анализа для оценки эффективности антибактериальных препаратов с использованием люциферазы *P. plagiophthalmus*, была показана в статье [Virta, Karp, Vuorinen, 1994]. Похожая работа была проведена для исследования влияния мембранолитиков на проницаемость мембран бактериальных клеток [Virta и др., 1995, 1997]. Авторы использовали вариант люциферазы *lucGR*. Также ген люциферазы *P. plagiophthalmus*, наряду с генами *luxA* и *luxB* бактериальных люцифераз *Photobacterium luminescens* и *Vibrio harveyi* был использован для создания тест-системы для скрининга библиотек соединений в отношении ингибирования синтеза белка [Lampinen, Virta, Karp, 1995]. Люминесцентный биосенсор для определения токсичности на основе бактерий, содержащих ген *CBR*, описан в публикации [Roda и др., 2013].

Использование экспрессирующих люциферазу лактобактерий *Lactobacillus plantarum* и *Lactococcus lactis* для люминесцентного имиджинга ЖКТ мышей показано в работе [Daniel и др., 2013]. Авторы использовали сразу несколько люцифераз – *CBR*, *GLuc* и бактериальную *lux*. Бактерии заселяли в желудочно-кишечный тракт мышей перорально. Этим же коллективом был предложен одновременный двухцветный анализ с использованием лактобактерий, несущих гены *CBR* и *CBG* *in vivo* и *in vitro* [Daniel и др., 2015].

Разработка методов для исследования белок-белковых взаимодействий на основе двухцветной люциферазы жука-шелкуна описана в работе [Villalobos и др., 2010].

Для изучения активности каспаз авторами работы [Gammon и др., 2009] была сконструирована оптимальная (по данным расчетов) BRET-пара из люциферазы *CBG* и флуоресцентного белка *tdTomato*, соединенных гидролизуемым аминокислотным линкером. Данная конструкция позволяет оценивать активность протеаз по падению интенсивности сигнала BRET (580 нм при BRET и 540 нм от *CBG* при гидролизе линкера).

Угарова и соавт. сообщают о разработке метода оценки загрязнения питьевой воды бактериями с использованием люциферазы *Luciola mingrelica* [Frundzhyan, Ugarova, 2007]. В другой работе тех же авторов разработана BRET-пара на основе красного и зеленого мутантов *L. mingrelica* и красителя Alexa Fluor 610 [Smirnova, Samsonova, Ugarova, 2016] для анализа гормона прогестерона.

Метод контроля распределения одностенных нанотрубок по организму мыши был предложен в работе [El-Sayed и др., 2013]. Люминесцентный имиджинг позволяет проследить



распределение конъюгата одностенных нанотрубок и термостабильной мутантной люциферазы *Luciola cruciata*. Такие модифицированные нанотрубки могут быть использованы для целевой доставки лекарств: например, авторы показали, что загрузка противоопухолевого антибиотика доксорубина в нанотрубки не влияет на интенсивность биолюминесценции.

На основе люциферазы *P. pyralis* дикого типа и мутантной термостабильной красной люциферазы *L. italica* был разработан трехцветный люминесцентный анализ для мониторинга двух основных путей биосинтеза желчных кислот (по экспрессии 7- $\alpha$  гидролазы и 27-гидроксилазы) в клетках млекопитающих. Третья люцифераза *Gaussia princeps* была использована как внутренний контроль метаболической активности [Michelinì и др., 2008]. Это первый пример трехцветного анализа репортерных генов, использующий люциферазы с различной локализацией и требующие различных субстратов.

Путем оптимизации кодонов люциферазы *Luciola italica* был получен красный вариант (610 нм) для использования в клетках млекопитающих, подходящий для визуализации глубоких тканей [Maguire и др., 2012].

На основе N-концевого домена люциферазы *P. pyralis* (PpyWT) и C-концевого домена *Luciola italica* (LitWT) была создана химерная люцифераза PpyLit с увеличенным квантовым выходом биолюминесценции (в 1.4 раза) [Branchini и др., 2014]. На ее основе была разработана новая люцифераза PLG2 с улучшенными термо- и pH-стабильностью [Branchini и др., 2015]. PLG2 обладает в 3 раза большей чувствительностью в живых клетках по сравнению с широко распространенной *P. pyralis luc2* (Promega), при этом она дешевле и позволяет обнаруживать фемтомолярные количества АТФ.

Свойство некоторых люцифераз проявлять pH-зависимый батохромный сдвиг биолюминесценции было использовано авторами работы [Gabriel, Viviani, 2014]. Для люцифераз *Macrolampis sp2*, *Cratomorphus distinctus* была показана применимость для измерения внутриклеточного pH в бактериях. Таким образом, данные люциферазы перспективны для одновременного сразу двух важных параметров метаболизма живой клетки: концентрации протонов и АТФ.

Использование люцифераз *Pyrearinus termitilluminans* и *Macrolampis sp* в сенсорах на токсичность показано в статье [Gabriel, Lopes, Viviani, 2014].

Применение зеленой люциферазы *Pyrearinus termitilluminans* и красной люциферазы *Phrixotrix hirtus* для исследования циркадных ритмов в тканях надпочечников, щитовидной железы и легких трансгенных мышей было показано в работе [Noguchi и др., 2012].

На основе люцифераз *Gaussia princeps*, *P. pyralis*, и *P. termitilluminans* были созданы химерные белки с круговой перестановкой [Kim, Sato, Tao, 2008]. Метод круговой перестановки позволяет получить инженерные сенсорные белки для изучения различных

лиганд-белковых взаимодействий. При связывании лиганда происходит сближение С- и N-концевых фрагментов люциферазы и восстановление ее люминесцентной активности, что позволяет отслеживать связывание лиганда в режиме реального времени.

Авторы работы [Misawa и др., 2010] применили *P. termitilluminans* для изучения белок-белковых взаимодействий на примере связывания рецептора, сопряженного с G-белком RF (GPCR), и  $\beta$ -аррестина на поверхности плазматической мембраны. Были созданы клетки, экспрессирующие химерные белки, состоящие из  $\beta$ -аррестина, разделенных фрагментов люциферазы и GPCR. Сближение фрагментов люциферазы приводит к увеличению интенсивности люминесценции. Такой метод позволяет проводить анализы в высокопроизводительном формате и может быть применим для исследования других белок-белковых взаимодействий.

## Билюминесцентные системы на основе целентеразина, фотопротеины

Наиболее широко распространенные среди морских организмов билюминесцентные системы используют имидазопиразиновые люциферины: целентеразин и люциферин *Cypridina* [Campbell, Herring, 1990]. Целентеразин представляет собой модифицированный трипептид, состоящий из трех остатков модифицированных аминокислот: два остатка тирозина и один остаток фенилаланина (рис. 2.2.3).

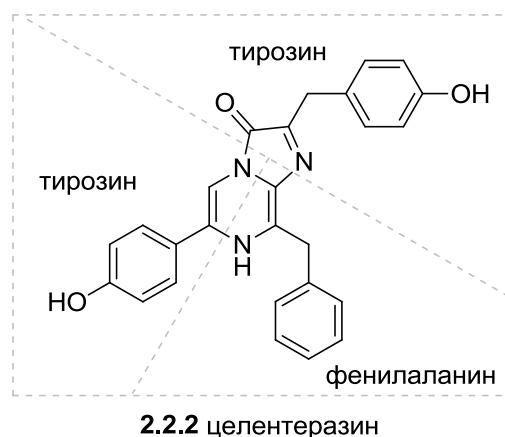


Рисунок 2.2.3. Структура целентеразина.

Целентеразин-зависимые билюминесцентные системы можно разделить на два типа: люциферазные и фотопротеиновые. В первом случае имеет место ферментативный катализ билюминесцентной реакции, в которой субстрат окисляется кислородом с образованием продукта (оксилюциферина) в возбужденном состоянии, переход которого в основное состояние сопровождается испусканием кванта света. В случае люциферазной реакции интенсивность и продолжительность испускания света зависит от количества субстрата. К этому типу относятся билюминесцентные системы мягких кораллов *Renilla* [Matthews, Hori, Cormier, 1977], морских копепод *Gaussia* [Inouye, Sahara, 2008] и *Metridia* [Markova и др., 2004; Markova, Burakova, Vysotski, 2012] и креветок *Oplophorus* [Inouye и др., 2000; Inouye, Sasaki, 2007].

Напротив, в фотопротеиновых билюминесцентных системах происходит образование стабильного фермент-субстратного комплекса между апопротеином и активированным целентеразином (2-гидропероксицелентеразин). Люминесценция фотопротеинов происходит при взаимодействии белка с ионами кальция и не требует участия молекулярного кислорода. Фотопротеинам свойственно кратковременное импульсное свечение, поскольку процесс восстановления фермент-субстратного комплекса занимает длительное время (около 1 часа). Наиболее изученными на данный момент  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемыми фотопротеинами являются

акворин, выделенный из медуз *Aequorea* [Shimomura, Johnson, Saiga, 1962], и обелин гидроидных полипов *Obelia* [Campbell, 1974].

Механизм окислительного декарбоксилирования, лежащий в основе испускания света целентеразин-зависимыми биолюминесцентными системами, был предложен Гото в 1968 году [Goto, 1968; Hori, Wampler, Cormier, 1973]. Первым этапом реакции биолюминесценции является катализируемое люциферазой депротонирование N7-атома азота имидазопиразинового кольца целентеразина, приводящее к образованию аниона люциферина (стадия а, схема 2.2.5). Последующий перенос электрона с аниона на молекулу кислорода приводит к формированию люциферин-радикала и супероксиданион-радикала  $O_2^{\bullet-}$  (стадия б), в результате рекомбинации которых формируется пероксид-анион целентеразина (стадия с). Дальнейшие циклизация пероксид-аниона (стадия д) и быстрое декарбоксилирование нестабильного диоксетанона (стадия е) приводят к формированию аниона целентерамида в возбужденном состоянии [Hori и др., 1973]. Переход амид-аниона целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается испусканием голубого света (стадия ф).

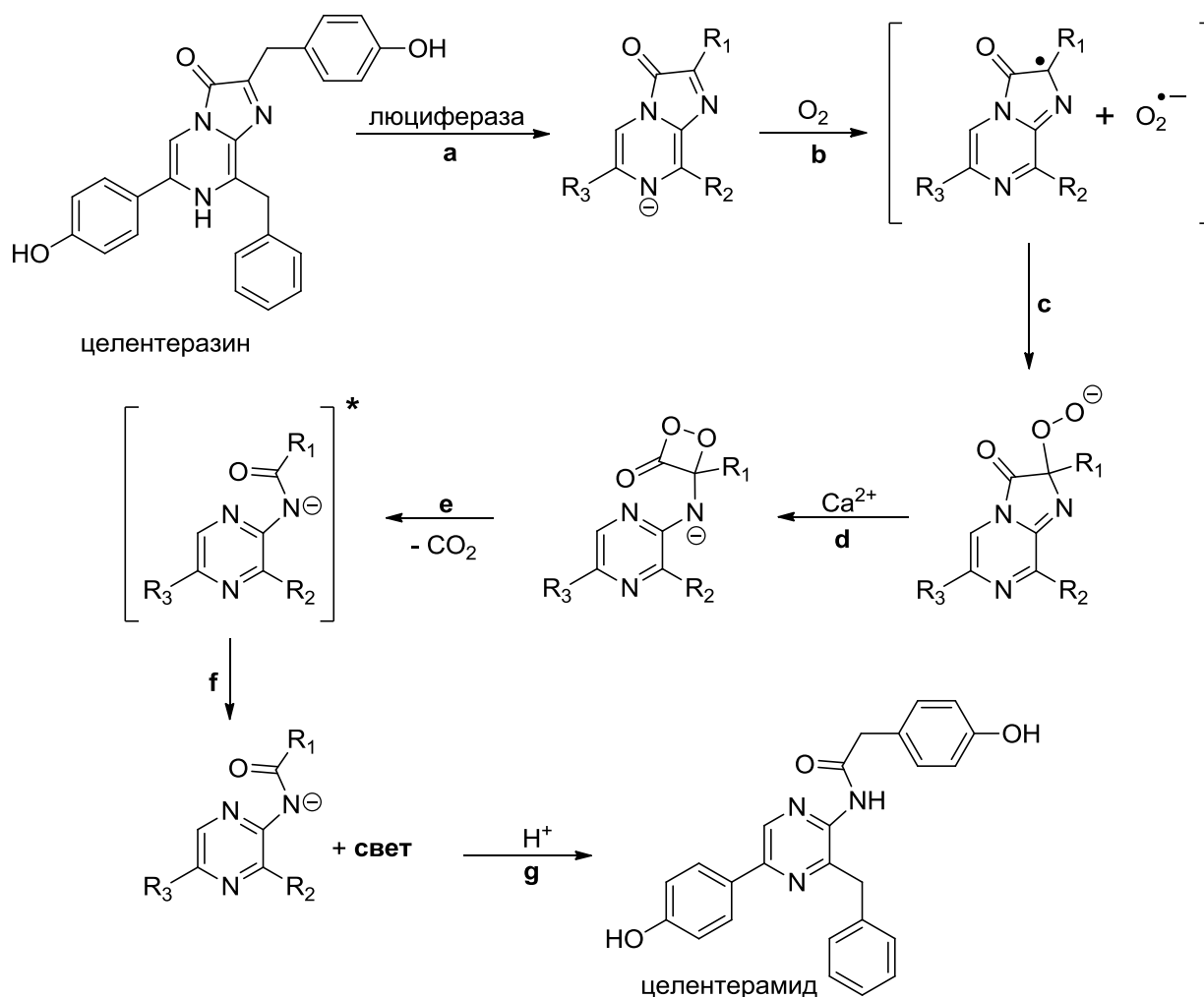


Схема 2.2.5. Механизм биолюминесценции целентеразина.

Ключевой стадией синтеза целентеразина **2.2.2** является получение его стабильного предшественника – целентерамина **i** (схема 2.2.6), который затем вводят в реакцию конденсации с *n*-ацетоксибензилглиоксалем **ii**, получаемым в две стадии из 2-(4-ацетоксифенил)уксусной кислоты [Inoue и др., 1975]. Долгое время для синтеза пиразинового кольца использовали циклизацию  $\alpha$ -оксиминокетона **iii** и  $\alpha$ -аминонитрила **iv** в пиридине в присутствии тетрахлорида титана, приводящую к получению пиразин N-оксида **v** [Karpetsky, White, 1973]. Дальнейшее каталитическое восстановление и удаление метильной защиты позволяло получать целевой целентерамин **i** с невысоким выходом.

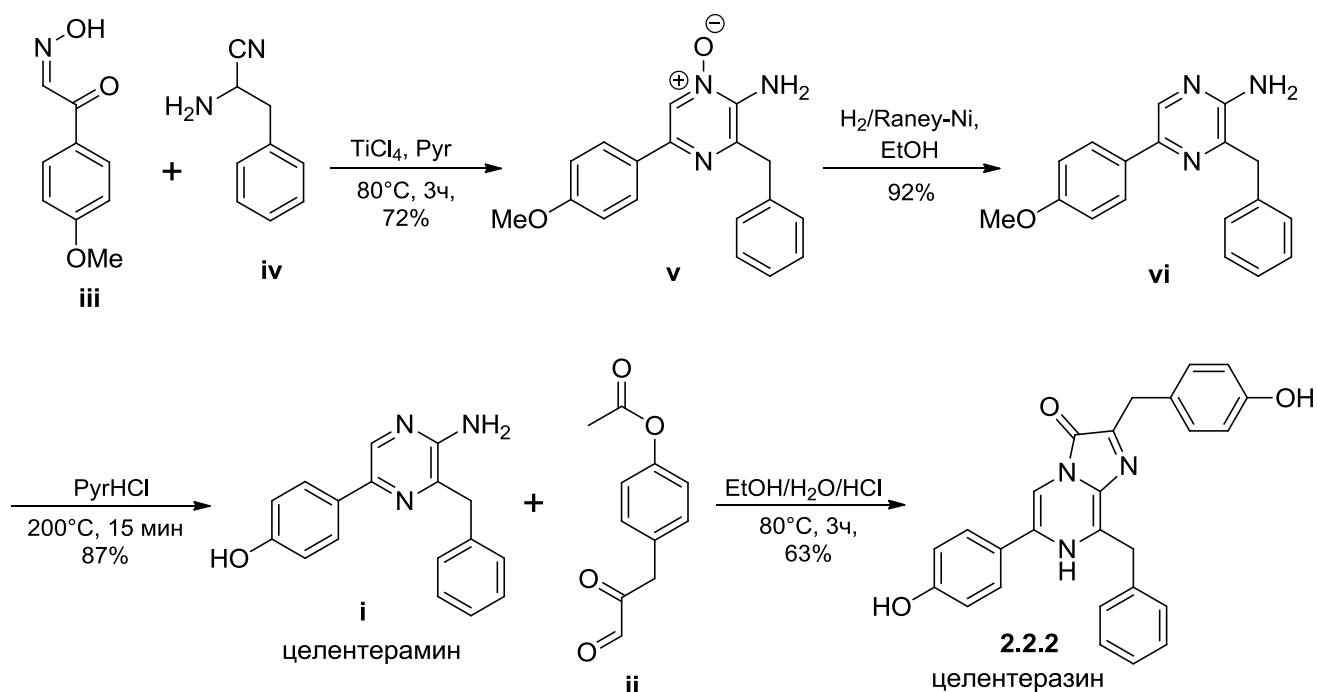
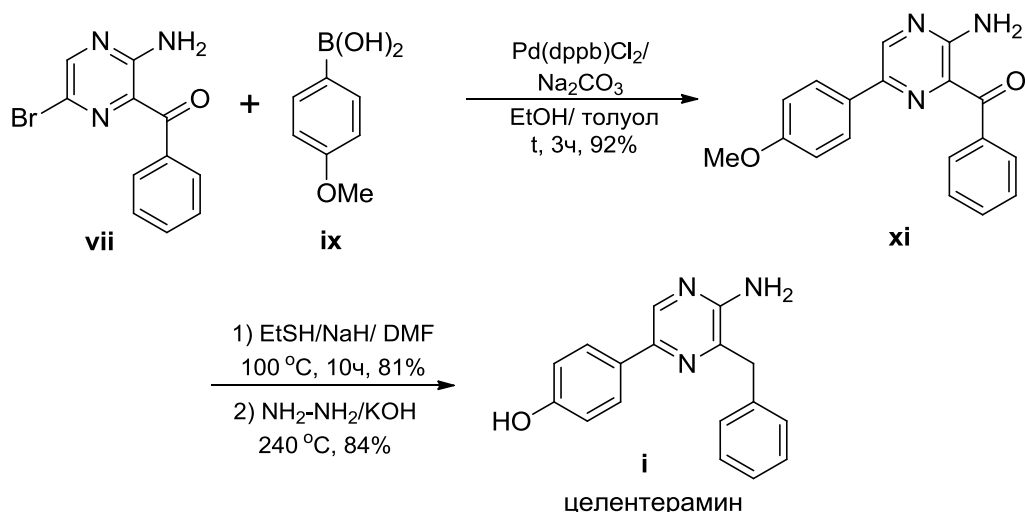


Схема 2.2.6. Оригинальный синтез целентеразина.

Позднее, развитие новых методов органического синтеза позволило разработать альтернативный подход к синтезу целентерамина. Катализируемые палладием реакции кросс-сочетания 2-амино-5-бромпиразинов (**vii**, **viii**; схема 2.2.7) с метоксифенилборной кислотой (**ix**, реакция Сузуки) [Jones, Keenan, Hibbert, 1996; Keenan, Jones, Hibbert, 1997; Jones, Hibbert, Keenan, 1999] и 4-метоксифенилстаннаном (**x**, реакция Стилле) [Nakamura, Takeuchi, Murai, 1995] позволяют получить соответствующие метокси-производные целентерамина с выходами, близкими к количественным. Использование палладиевого катализа позволило значительно сократить и усовершенствовать метод синтеза целентеразина, а также разработать подход к синтезу различных аналогов этого люциферина за счет варьирования используемых борных кислот и станнанов.

### Реакция Сузуки



### Реакция Стилле

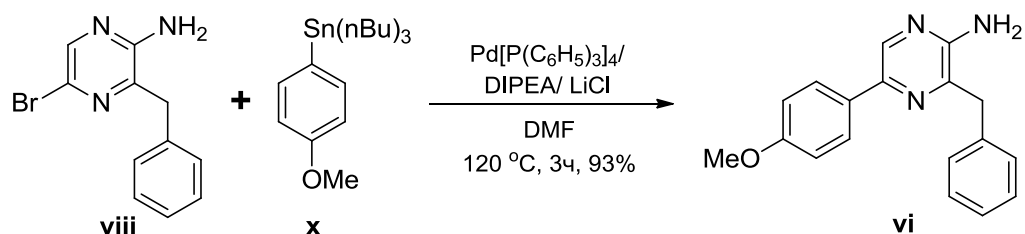


Схема 2.2.7. Применение палладиевого катализа для синтеза целентерамина.

Первым выделенным и изученным целентеразин-зависимым ферментом стала люцифераза глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris* [Shimomura и др., 1978], в состав которой входят четыре попарно одинаковые субъединицы (19 кДа и 35 кДа) [Inouye и др., 2000a]. Природная люцифераза *Oplophorus* обладает высокими квантовым выходом и интенсивностью свечения, что послужило основой для создания нового искусственного фермента NanoLuc<sup>®</sup> на основе меньшей из ее субъединиц (19 кДа) [Hall и др., 2012]. Люцифераза NanoLuc<sup>®</sup> обладает высокой субстратной специфичностью, проявляя биолюминесцентную активность лишь с синтетическим аналогом целентеразина - фуримазином (рис. 2.2.4). Как и родительская люцифераза *Oplophorus*, NanoLuc<sup>®</sup> является секретируемым ферментом, и как следствие, подходит как для самостоятельного биоимиджинга [Azevedo и др., 2014; Chen и др., 2014; Chen, Bagdasarian, Walker, 2015; Karlsson и др., 2015; Nishitsuji и др., 2015; Vinayak и др., 2015]), так и для применения в составе химерных белков [Demont и др., 2014; Deplus и др., 2013; He и др., 2014; Norisada и др., 2014; Picaud и др., 2015; Song и др., 2013; Vinayak и др., 2015; Wang и др., 2015a].

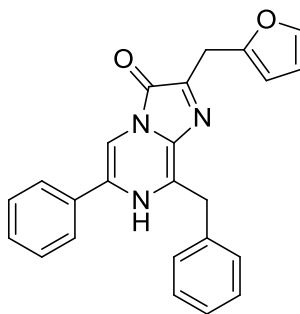


Рисунок 2.2.4. Структура фуримазина, субстрата для NanoLuc®

Оптические свойства NanoLuc®, максимум испускания которой лежит в синей области спектра (460 нм), позволяют применять ее для двойного имиджинга с другими люциферазами [Но и др., 2013]. Так, было описано использование пары NanoLuc®-FLuc для скрининга лекарств против болезни Паркинсона [Hasson и др., 2015] и для имиджинга опухолей [Germain-Genevois, Garandeau, Couillaud, 2015].

Небольшой размер и высокая яркость NanoLuc® делают этот белок оптимальным инструментом для биоимиджинга в тех случаях, когда размер люциферазы оказывается критичным для стабильности изучаемого микроорганизма, например при изучении жизненного цикла вирусов в животных моделях (грипп А, [Tran и др., 2013, 2015], альфавирус энцефалита [Sun и др., 2014]).

Использование NanoLuc® для имиджинга опухолей легких на мышинных моделях было показано Люкером [Stacer и др., 2013]. Благодаря небольшому размеру NanoLuc® популярна в имиджинге белков с помощью химерных конструкций. Группа Гуо разработала удобную методику сайт-специфичной химической конъюгации NanoLuc® по остатку цистеина, подходящую для модификации белков сложной структуры и других макромолекул [Zhang и др., 2013].

Описано использование NanoLuc® для анализа взаимодействий лигандов и рецепторов GCPR [Stoddart и др., 2015]. Созданы яркие BRET-пары LumiFluor: NanoLuc-EGFP (509 нм) и NanoLuc-LSSmOrange (572 нм) [Schaub и др., 2015]. Авторы статьи [Roberts и др., 2015] предлагают использовать NanoLuc® в качестве BRET-донора для исследования характеристик связывания между лекарственным препаратом и белком-мишенью: сама люцифераза конъюгирована с исследуемым белком, а флуоресцентный трейсер закреплен на молекуле субстрата. В статье [Mo и др., 2015] приводится скрининг белок-белковых взаимодействий на основе BRET-пары NanoLuc-Venus в 1536-луночном формате. Также недавно была разработана BRET-пара NanoLuc®-HaloTag [Machleidt и др., 2015], названная авторами NanoBRET. Авторы показали эффективность NanoBRET для визуализации белок-белковых взаимодействий.

Для исследования белковых взаимодействий была создана репортерная система NanoBiT [Dixon и др., 2015], в которой NanoLuc<sup>®</sup> разделяют на два полипептида 1.3 кДа и 18 кДа, каждый из которых затем присоединяют к одному из пары исследуемых белков. Система NanoBiT оказывает минимальное стерическое воздействие на изучаемую пару, будучи при этом очень яркой.

К настоящему времени выделены и секвенированы ряд природных целентеразиновых люцифераз (Таблица 2.2.1). Среди этого разнообразия практическое применение нашли только люциферазы *Renilla*, *Gaussia* и *Metridia longa*.

Таблица 2.2.1. Люциферазы биолюминесцентных систем целентеразина и фуримазина.

Группа люцифераз	Вид	$\lambda_{\max}$ (нм)	Источник
Субстрат – целентеразин	<i>Ophlophorus gracilinostris</i>	454	[Inouye и др., 2000a; Inouye, Sasaki, 2007b]
	<i>Renilla reniformis</i>	480	[Lorenz и др., 1991]
	<i>R. muelleri</i>	485/479	[Titushin и др., 2008]
	<i>Gaussia princeps</i>	473	[Verhaegent, Christopoulos, 2002]
	<i>Metridia longa</i>	480	[Markova и др., 2004]
	<i>M. pacifica</i>	485	[Takenaka и др., 2008]
	<i>M. curticauda</i>	492/493	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>M. okhotensis</i>	482/493	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>M. asymmetrica</i>	492/493	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>Pleuromamma scutullata</i>	491/492	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>P. xiphias</i>	492	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>P. abdominalis</i>	493/490	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>Lucicutia ovaliformis</i>	493	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>Heterorhabdus tanneri</i>	-	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>Heterostylites major</i>	-	[Takenaka и др., 2012]
Субстрат – фуримазин	NanoLuc <sup>®</sup>	460	[Hall и др., 2012]

Одной из первых была клонирована люцифераза мягкого коралла *Renilla* [Lorenz и др., 1991]. Она представляет собой белок ~36 кДа, максимум эмиссии 480 нм. На сегодня эта люцифераза является одной из наиболее популярных в практических приложениях. На основе природной RLuc разработаны мутантные люциферазы, обладающие повышенными стабильностью и яркостью [Markova, Vysotski, 2015].

Одна из самых маленьких люцифераз (19,9 кДа) – люцифераза из рачка *Gaussia princeps* – была клонирована в 2002 году [Verhaegent, Christopoulos, 2002]. GLuc находит применение в качестве белка-репортера, как инструмент неинвазивного биоимиджинга, для исследования вирусных инфекций и др. [Tannous, Teng, 2011]. GLuc также применяется в составе гибридных белков [Hwang и др., 2015; Lang и др., 2015], при изучении онкологических процессов [Luker и др., 2012; Niers и др., 2012; Subleski и др., 2015; Yamashita, Nguyen, Chung, 2014], вирусных заболеваний (ВИЧ [Suree и др., 2012], лихорадка Западного Нила [Zhang и др., 2016], вирус гриппа А [Eckert и др., 2014; Munier и др., 2013; Spronken и др., 2015], вирус гепатита С [Liu и др., 2015; Nawtaisong и др., 2015], вирус Эбола [Uebelhoefer и др., 2014], цитомегаловирус человека [Drouot, Piret, Boivin, 2013] и др. [Louber и др., 2014; Nie и др., 2014; Qu и др., 2014]) и



бактериальных инфекций (*Candida albicans* [Delarze и др., 2015; Kuchar'iková и др., 2015; Pietrella и др., 2012] и др. [Liu и др., 2014a]). Описано использование GLuc для высокопроизводительного скрининга [Hulleman и др., 2013; Mehraein-Ghomi и др., 2015; Wang и др., 2015b]. Ведется работа по получению мутантных форм Gluc с батохромным сдвигом эмиссии [Kim и др., 2011].

Клонированная в 2004 году люцифераза из рачка *Metridia longa*, [Markova и др., 2004], имеет массу около 24 кДа. Особенность MLuc заключается в высокой стабильности люминесцентного сигнала (в 10 раз более стабилен по сравнению с люциферазой *Gaussia*). MLuc сразу же нашла применение как репортерный белок для исследований *in vitro* и *in vivo* [Haugwitz и др., 2008; Hiramatsu и др., 2005; Huang и др., 2009; Kim, Kim, 2012; Lupold и др., 2012]. В работе [Mukherjee и др., 2014] описано ее применение в качестве теплового сенсора. Клеточная модель рака предстательной железы с использованием MLuc была создана для изучения влияния отдельных микроРНК на чувствительность к ионизирующему излучению [Natano и др., 2015]. Однако, несмотря на перспективные свойства MLuc, данная люцифераза пока недостаточно изучена [Markova, Vysotski, 2015]. В 2015 году была клонирована изоформа MLuc, являющаяся самой маленькой природной люциферазой на данный момент (16,5 кДа) [Markova и др., 2015].

На сегодняшний день использование фотопротеинов является одним из самых чувствительных методов мониторинга уровня ионов кальция в живых клетках, позволяющим измерять концентрацию  $Ca^{2+}$  в большом диапазоне (от  $10^{-3}$  до  $10^{-7}$ М), а также отслеживать внутриклеточное распределение ионов. Несмотря на то что за последние десятилетия были выделены и секвенированы более десятка фотопротеинов из различных морских организмов (таблица 2.2.3) самым популярным остается белок акворин (охарактеризованный еще 1962 году [Shimomura, Johnson, Saiga, 1962]).

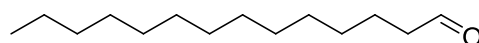
Таблица 2.2.2. Клонированные фотопротеины.

Название фотопротеина	Вид	$\lambda_{max}$ (нм)	Источник
Акворин	<i>Aequorea victoria</i>	470	[Inouye и др., 1985; Prasher и др., 1987; Prasher, McCann, Cormier, 1985]
Клитин	<i>Clytia gregaria</i>	470	[Inouye, 2008; Inouye, Tsuji, 1993; Markova и др., 2010]
Митрокомин	<i>Mitrocoma cellularia</i>	470	[Fagan и др., 1993]
Обелин	<i>Obelia longissima</i>	495	[Illarionov и др., 1995]
	<i>Obelia geniculata</i>	495	[Markova и др., 2002]
Беровин	<i>Beroe abyssicola</i>	491	[Markova и др., 2012]
Мнемиопсин	<i>Mnemiopsis leidyi</i>	485	[Aghamaali и др., 2011]
BfosPP	<i>Bathocyroe fosteri</i>	493	[Powers и др., 2013]

Конструирование гибридных белков на основе генов акворина и обелина позволило значительно расширить арсенал биолюминесцентных меток для иммуноферментного анализа и ДНК-зондирования [Brini, 2008; Namorsky и др., 2010; Malikova и др., 2014].

## Биолюминесцентная система бактерий

На сегодняшний день известно о семнадцати видах биолюминесцентных бактерий, принадлежащих к четырем родам (*Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* и *Photorhabdus*). Большинство из них обитают в морской воде или являются симбионтами различных морских организмов, обеспечивая их свечение [Dunlap, Kita-Tsukamoto, 2006]. В отличие от описанных ранее биолюминесцентных систем, субстратами в реакции люминесценции бактерий являются одновременно два вещества: флавиномононуклеотид (ФМН) и миристиновый альдегид (истинный люциферин, рис. 2.2.5), окисляющийся в процессе реакции, но не являющийся люминофором.



### 2.2.3

миристиновый альдегид  
(бактериальный люциферин)

Рисунок 2.2.5. Люциферин бактерий.

Причина столь необычного поведения люциферина бактерий кроется в особом механизме реакции. Биолюминесцентная система бактерий представляет собой электронтранспортную цепь (схема 2.2.8), осуществляющую перенос электронов от НАДН к кислороду [Hastings, Nealson, 1977].

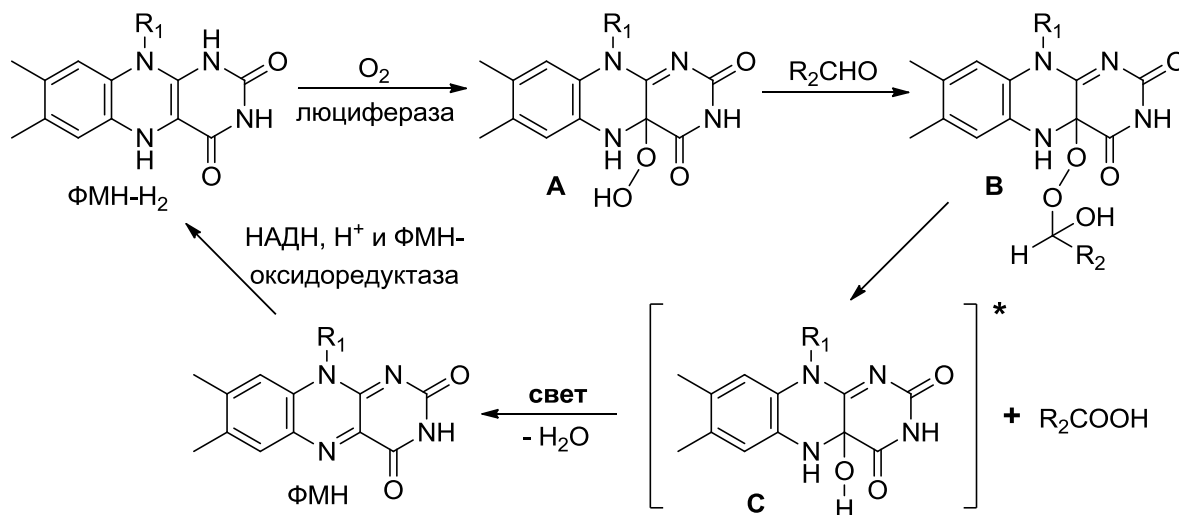


Схема 2.2.8. Механизм реакции биолюминесценции бактерий.

На первом участке цепи происходит восстановление ФМН, катализируемое НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой. Вторым этапом реакции является окисление ФМН-Н<sub>2</sub> кислородом, катализируемое люциферазой, с получением гидропероксида **A**, который, в свою очередь, реагирует с альдегидом, что приводит к образованию полуацетала **B**. В результате

перегруппировки последнего образуются миристиновая кислота и окисленная форма ФМН С в возбужденном состоянии. На финальном этапе переход флавина С в основное состояние сопровождается испусканием кванта света, образованием молекулы воды и молекулы ФМН, которая затем возвращается в биолюминесцентную реакционную цепь.

Преимуществом бактериальной биолюминесцентной системы является то, что все ее компоненты закодированы с помощью единого оперона *luxCDABE*, что позволяет легко переносить его в другие микроорганизмы или клетки млекопитающих [Gupta и др., 2003; Patterson и др., 2005]. Гены *luxA* и *luxB* кодируют люциферазы, в то время как гены *luxCDE* кодируют комплекс ферментов восстановления жирных кислот [Hamorsky и др., 2010].

Наиболее изученными являются биолюминесцентные системы бактерий *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, *Photobacterium luminescens*, *Photobacterium phosphoreum* и *Photobacterium leiognathi* [Marquette, Blum, 2010], испускающие свет в сине-зеленой области спектра (490 нм). Бактериальные люциферазы применяют, в основном, для наблюдения за развитием бактериальных заболеваний, имиджинга опухолей [Close и др., 2012; Gahan, 2012], в качестве генов-репортеров, а также для создания биосенсоров к различным токсикантам [Fernández-Piñas и др., 2014; Xu и др., 2014]. На сегодняшний день наиболее активно используется люцифераза *P. luminescens*, что объясняется ее повышенной термостабильностью (до 45°C) [Sztitner, Meighen, 1990].

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Автоокисление синтетического хромофора GFP с образованием DsRed-подобного красного хромофора

##### Обоснование исследования

Изучение свойств зеленого флуоресцентного белка (GFP) из медузы *Aequorea victoria*, а также ряда гомологичных белков из различных морских организмов вызывает большой интерес в связи с широким использованием генетически кодируемых флуоресцентных меток для исследования живых систем [Chudakov, Lukyanov, Lukyanov, 2005]. С химической точки зрения, одним из самых интересных свойств GFP-подобных белков является автокаталитическое образование их хромофоров. В ходе этого многоступенчатого процесса три аминокислоты белка (Ser65-Tyr66-Gly67 в случае GFP) подвергаются химическим изменениям, приводящим к образованию би- и трициклических структур с расширенной системой сопряженных двойных связей, способных поглощать и испускать видимый свет.

В белке GFP хромофор формируется путем циклизации основной цепи белка (карбонильная группа Ser65 взаимодействует с амидным азотом Gly67 с образованием пятичленного гетероцикла) и окисления связи C $\alpha$ -C $\beta$  Tyr66. Образование хромофора является автокаталитическим процессом, не требующим участия вспомогательных ферментов и кофакторов, помимо молекулярного кислорода. Реакция приводит к образованию GFP-подобного хромофора - 5-(4-гидроксибензилиден)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она (Схема 3.1.1).

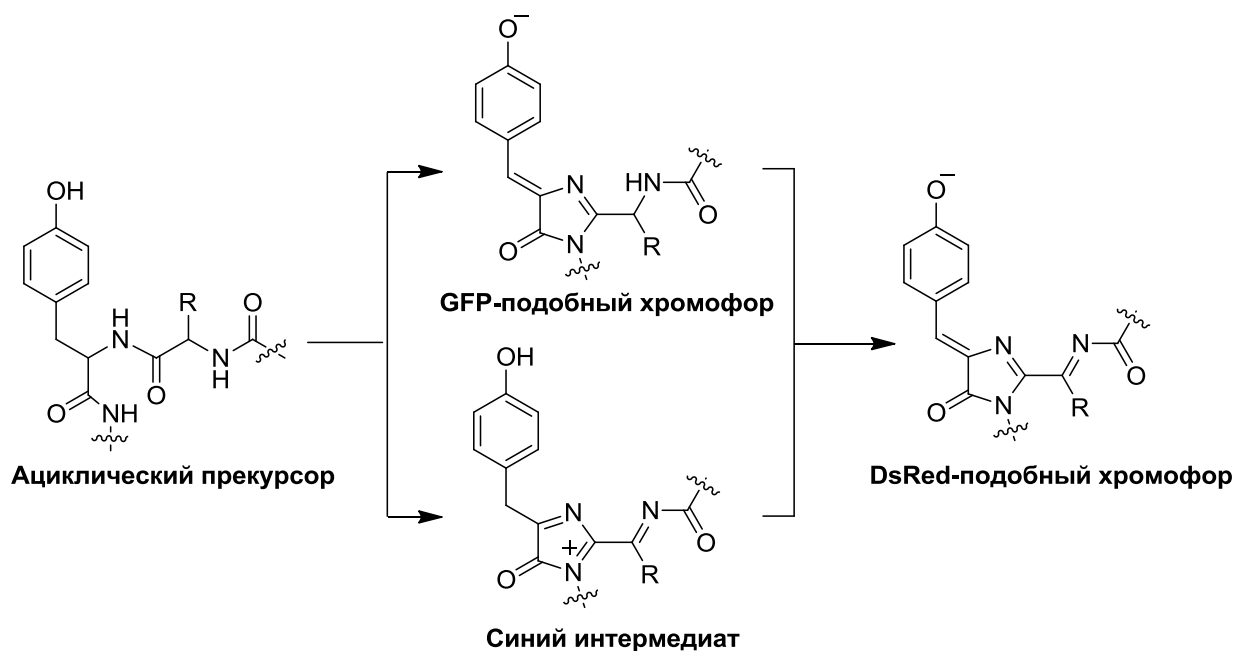


Схема 3.1.1. Два возможных пути формирования DsRed-подобных хромофоров.

Структурный анализ показал, что хромофорами всех известных природных белков, принадлежащих к группе зеленого флуоресцентного белка, служат аналоги хромофора GFP. В ряду флуоресцентных белков, испускающих в более длинноволновой области были обнаружены различные химические модификации GFP-подобного хромофора [Pakhomov, Martynov, 2008]. Большинство природных красных флуоресцентных белков и хромопротеинов содержат DsRed-подобные хромофоры, включающие ацилиминный фрагмент, образованный путем дегидрирования связи C-N аминокислотного остатка в положении 65 (здесь и далее нумерация соответствует таковой в GFP) с участием молекулярного кислорода [Gross и др., 2000; Yarbrough и др., 2001]. Ацилиминная группа DsRed-подобных хромофоров стабильна только в составе белка и легко гидролизуется в процессе его денатурации [Gross и др., 2000]. Более того, эта высокоактивная группа подвергается дальнейшим модификациям в составе некоторых белков с образованием дополнительных видов хромофоров (схема 3.1.2).

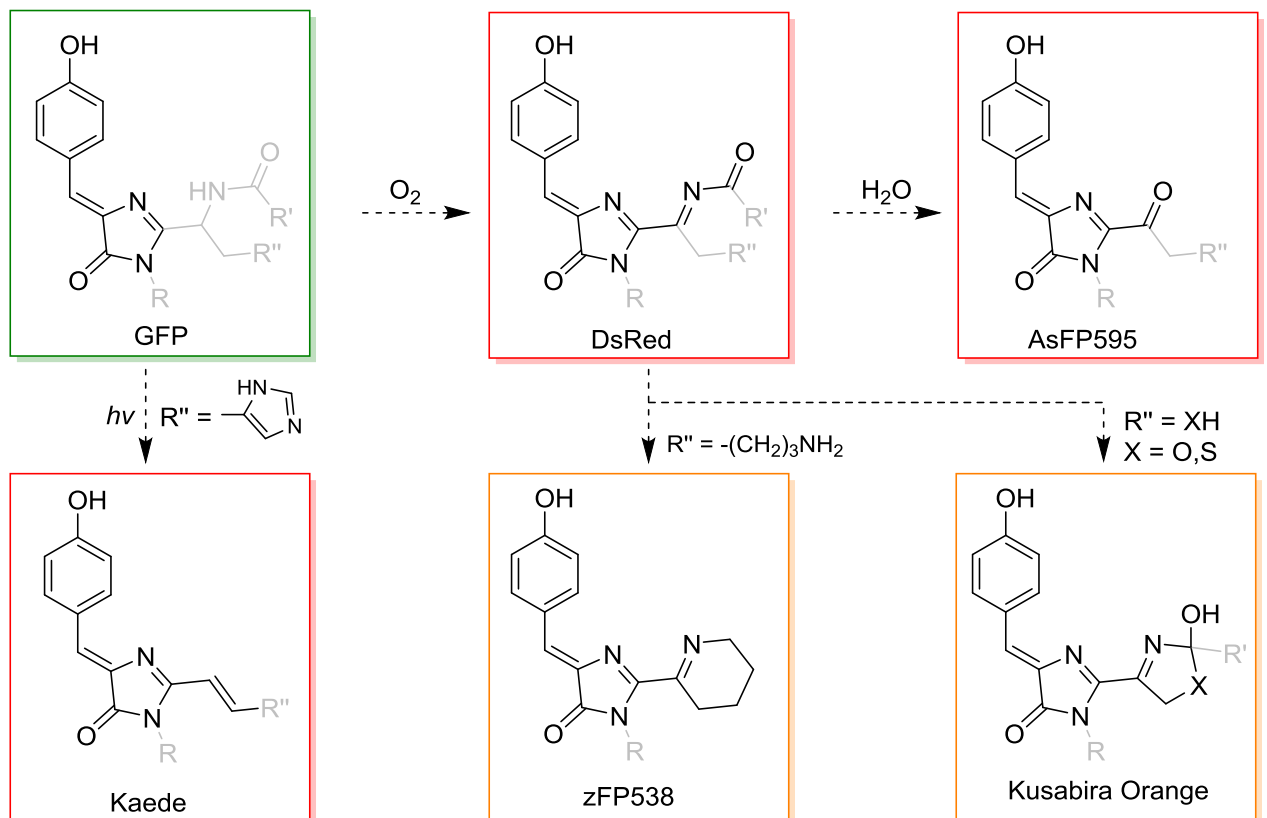


Схема 3.1.2. Структуры хромофоров красных флуоресцентных белков семейства GFP.

К примеру, хромопротеин asFP595, обнаруженный в актиниях *Anemonia sulcata*, содержит разрыв в основной цепи белка непосредственно перед хромофором, включающим карбонильную группу, сопряженную с GFP-подобным ядром [Quillin и др., 2005; Yampolsky и др., 2005]. Вероятно, такая структура образуется при гидролизе ацилиминной группы.

Биосинтетический путь образования GFP- и DsRed-подобных хромофоров является предметом существенных разногласий. Общепринятой моделью формирования DsRed-подобных белков долгое время считалось автоокисление GFP –подобных предшественников до DsRed-подобного хромофора (схема 3.1.1 верхний путь) [Yarbrough и др., 2001]. С другой стороны, в ходе недавних исследований Субача и др. [Subach и др., 2010] и Страка и др. [Strack и др., 2010] был обнаружен неожиданный синий интермедиат, содержащий N-ациламиногруппу и насыщенный атом C<sub>β</sub> в остатке Tyr66 (Схема 3.1.1 нижний путь). Эти исследования показали, что GFP-подобный хромофор является побочным продуктом, а не промежуточным соединением в биосинтезе хромофора красного флуоресцентного белка (RFP).

Существующие экспериментальные данные позволяют предположить, что оба пути созревания RFP независимо реализуются в природе в различных эволюционных ветвях флуоресцентных белков. Биосинтетический путь формирования хромофоров некоторых белков (DsRed, hcCP, cgCP, TagRFP и пр.) лежит через образование синего интермедиата [Strack и др., 2010; Subach и др., 2010], тогда как другие (z2FP574 и asFP595) созревают из GFP-подобного промежуточного соединения [Pakhomov, Martynov, 2007; Pakhomov, Tretyakova, Martynov, 2010].

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.

## Результаты

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

N-Ацилирование общего O-бензилированного предшественника **3.1.1** ацетиламинокислотой (Gly, Phe, <sup>t</sup>Leu) с использованием стандартных методов пептидного синтеза (DCC/NOBt) и последующая реакция с избытком метиламина привели к получению желаемого производного β-гидрокситирозина **3.1.2** с высоким выходом (схема 3.1.3). 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.

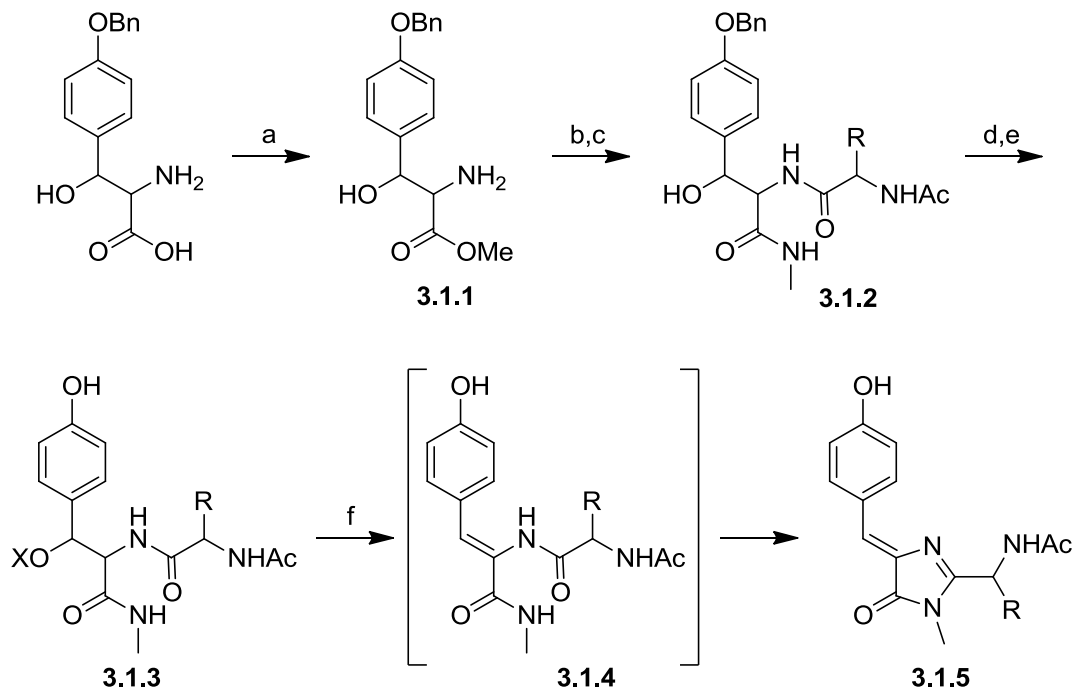


Схема 3.1.3. Синтез модельных GFP-подобных хромофоров **3.1.5a-c**.

*Автоокисление  $\alpha$ -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/ $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ), 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 3.1.4), 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**.

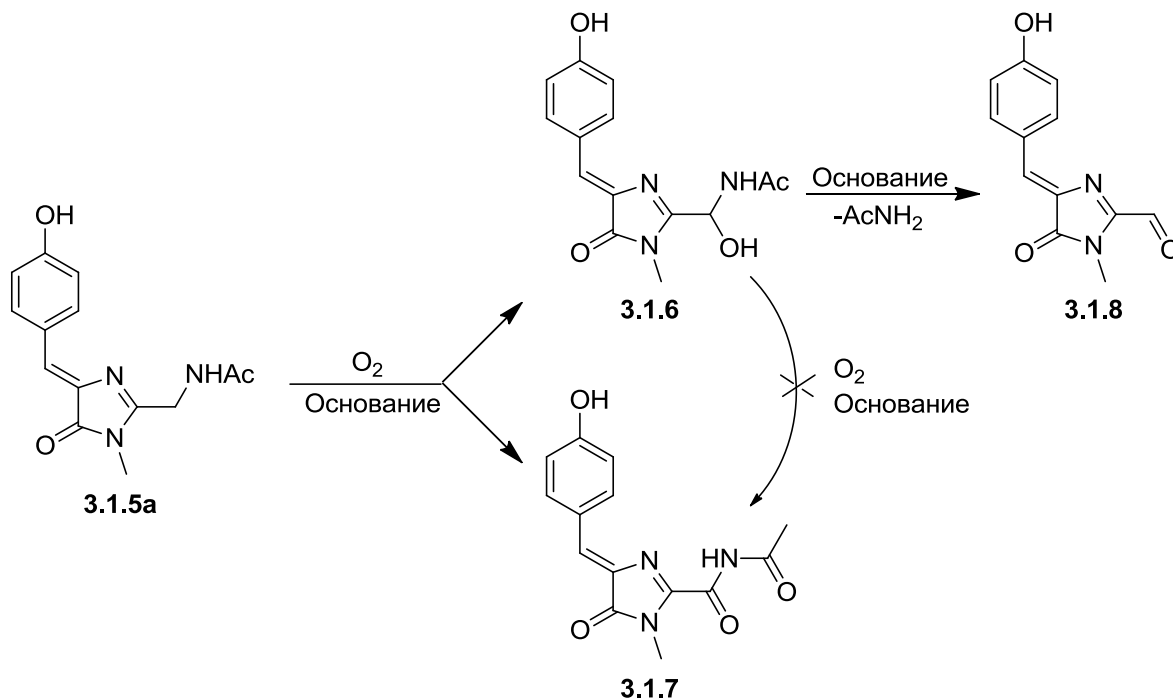


Схема 3.1.4. Автоокисление глицинового производного GFP-подобного хромофора **3.1.5a**

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 3.1.4). 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 3.1.5). *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  $Cs_2CO_3$ ).

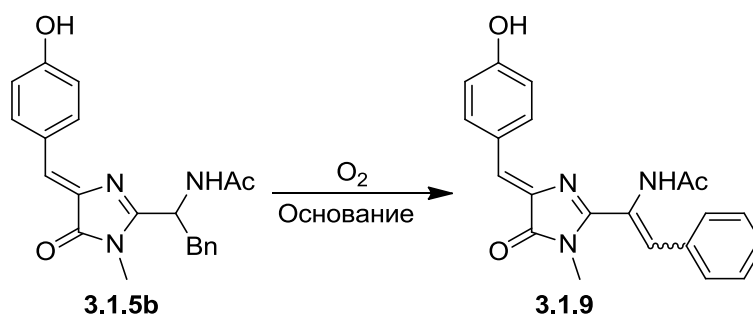


Схема 3.1.5. Автоокисление GFP-подобного хромофора производного фенилаланина **3.1.5b**.

Исследование способности хромофора **3.1.10** [Yampolsky и др., 2005] к автоокислению проводили в тех же условиях. Скорость автоокисления была крайне низкой (ВП ~6 ч, при 100°C в ДМФ/Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). В результате были выделены два основных продукта реакции: оксопроизводное **3.1.11** и гидантоин **3.1.12** (схема 3.1.6).

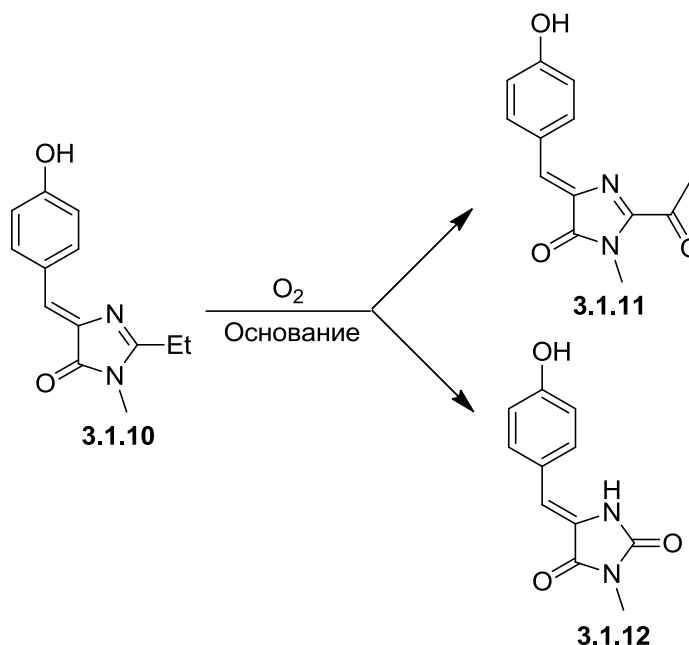


Схема 3.1.6. Автоокисление этил-замещенного хромофора **3.1.10**.

#### *Спектральные характеристики хромофоров 3.1.5a-c, 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 [Kojima и др., 1998] (таблица 3.1.1). 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 3.1.1 и рис. 3.1.1). Интересно заметить, что максимум поглощения хромофора **3.1.9** (514нм в основном ДМФ) обладал значительным гипсохромным сдвигом по сравнению с соответствующим Kaede-подобным хромофором [Yampolsky и др., 2008], 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 (рис. 3.1.1В). 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 [Bulina и др., 2002].

Таблица 3.1.1. Спектральные свойства хромофоров **3.1.5а-с**, **3.1.6**, **3.1.7** и **3.1.9**.

	Neutral form <sup>a</sup>	Anionic form <sup>b</sup>	
	Abs. max., nm ( $\epsilon$ , M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Abs. max., nm ( $\epsilon$ , M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Em. max., nm
<b>5, 6</b>	376	492	n.d.
<b>7</b>	419 (48000)	577 (77000)	603
<b>9</b>	400 (25000)	514 (46000)	618

<sup>a</sup> измеряли в 10mM AcOH в ДМФ

<sup>b</sup> измеряли в 5mM Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в ДМФ

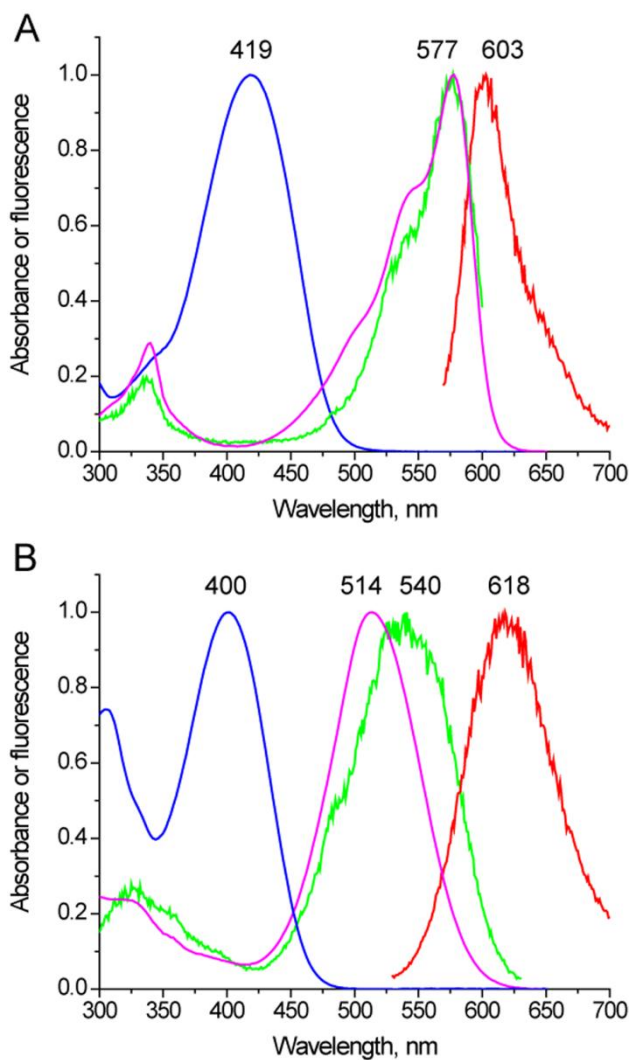


Рисунок 3.1.1. Спектры абсорбции и флуоресценции хромофоров **3.1.7** (A) и **3.1.9** (B). Нормализованная абсорбция протонированных (синий) и депротонированных (розовый) форм хромофоров в ДМФ, возбуждение (зеленый) и испускание (красный) депротонированных форм хромофоров в ДМФ.

## Обсуждение

### *Синтез GFP-подобных субстратов реакции автоокисления*

Известные на сегодняшний день методы синтеза имидазолонов [Ivashkin, Yampolsky, Lukyanov, 2009] включают основно-катализируемую циклизацию производных дегидротирозина [Kojima и др., 1998], конденсации амидинов [Devasia, 1976; Ekeley, Ronzio, 1935] или имидатов [Kidwai, Devasia, 1962] с подходящими 1,2-диэлектрофилами, внутримолекулярную циклизацию аза-Виттига  $\alpha$ -азидоимидов [Wu, Burgess, 2008] и кросс-сочетание бороновых кислот с тиюимидазолоном [Oumouch и др., 2005]. Мы разработали подход к синтезу ранее неизвестных  $\alpha$ -ацетиламино-замещенных GFP-подобных хромофоров **3.1.5**, основанный на циклизации производных дегидротирозина **3.1.4** (схема 3.1.3). Мы обнаружили, что реакция Эрленмейера (азлактонизация), часто применяемая для получения производных дегидротирозина, не совместима с наличием  $\alpha$ -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** [Bolhofer, 1954]. 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  $\beta$ -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 скоростью-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 3.1.6).

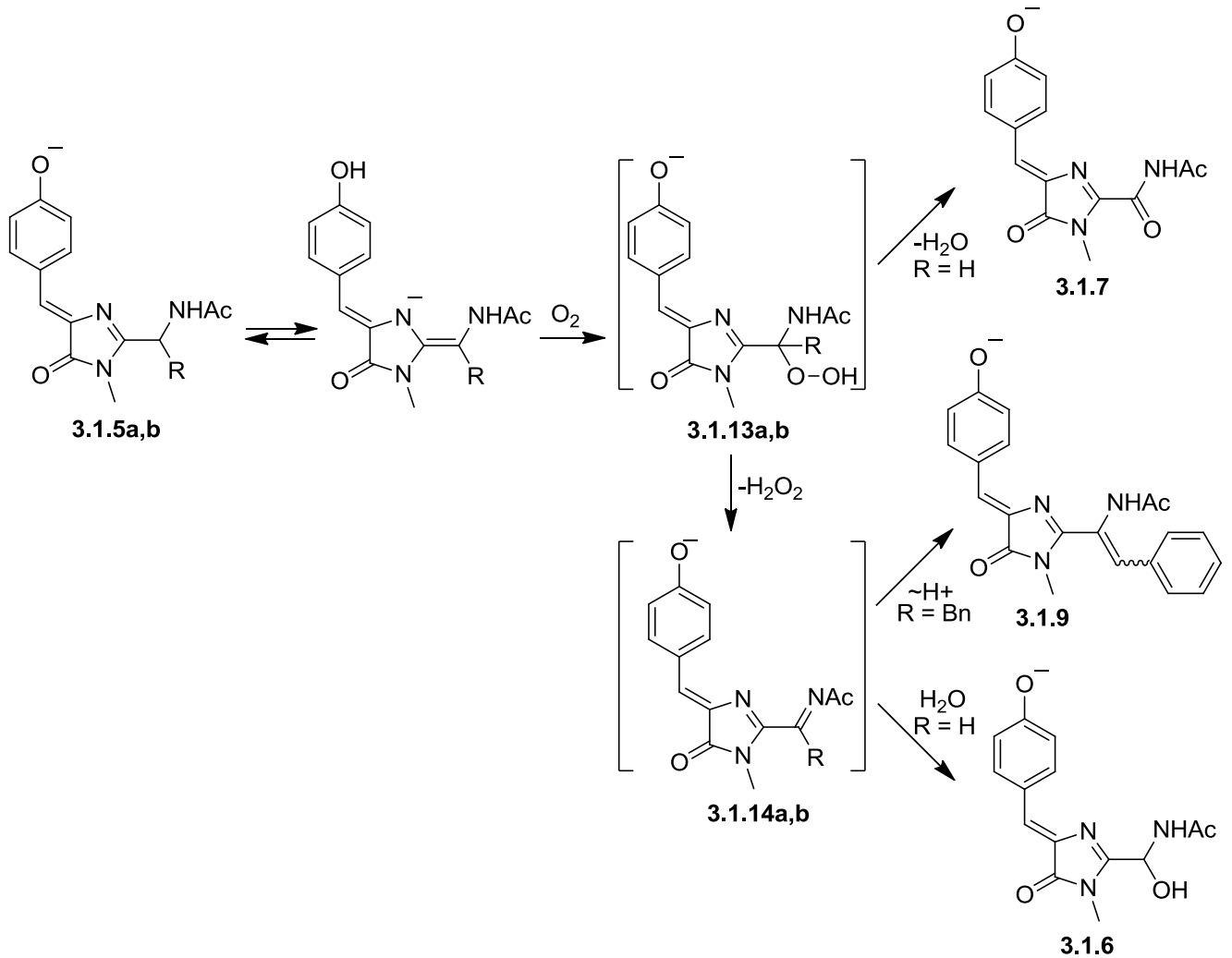


Схема 3.1.6. Предположительный механизм автоокисления GFP-подобных хромофоров **3.1.5a** и **3.1.5b**, приводящего к получению стабильных форм DsRed-подобных ацилиминов **3.1.6** и **3.1.9**, а также имиду **3.1.7**.

На основании приведенных выше данных мы предположили, что  $\alpha$ -гидропероксид **3.1.13** (впервые предложенный в механизме созревания хромофора DsRed [Yarbrough и др., 2001]) является промежуточным соединением всех наблюдаемых реакций автоокисления (схема 3.1.7). 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 3.1.7).

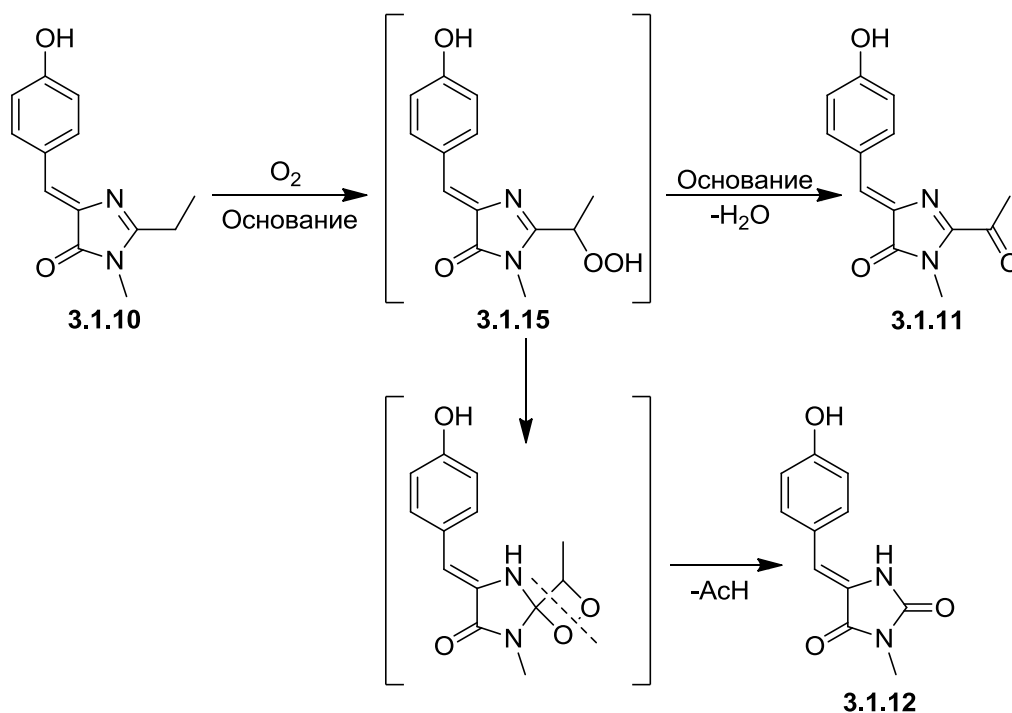


Схема 3.1.7. Механизм автоокисления 2-этил-замещенного хромофора **3.1.10**.

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 **3.1.5c** 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- $\alpha$ , 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-Tyr66-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 Са. Таким образом, мы предполагаем, что депротонированная карбоксильная группа боковой цепи Asp65 может являться основанием, способствующим отщеплению протона в положении 65С- $\alpha$  (схема 3.1.8). Дальнейшее окисление приводит к образованию  $\beta$ -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».

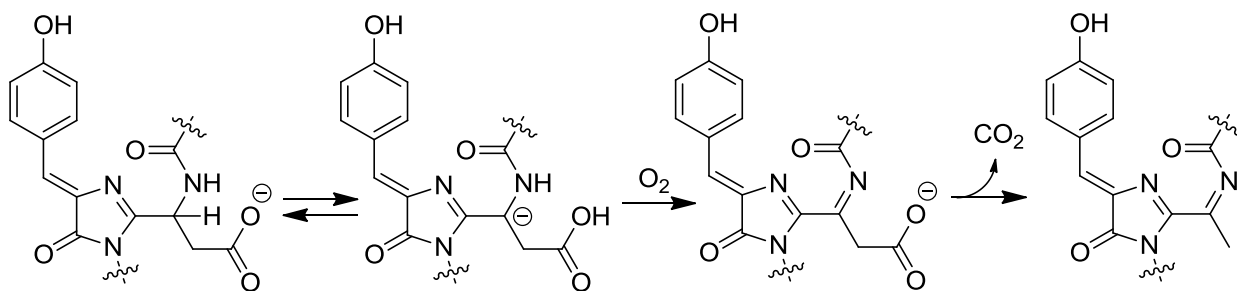


Схема 3.1.8. Вероятный механизм созревания хромофора z2FP574

В литературе существует несколько примеров, показывающих, что введение карбоксилат-аниона (способного выступать в качестве основания) в непосредственной близости от 65С- $\alpha$  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  $\pi$ -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 [Mizuno и др., 2003; Yampolsky и др., 2005]. 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 [Bomati, 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.

### 3.2. Конформационно-фиксированный хромофор GFP

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Михаилом Барановым, Кириллом Солнцевым и коллегами: 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, а также диссертационной работы Михаила Баранова («Физико-химические свойства хромофора GFP и флуоресцентные красители на его основе», Москва, Институт биоорганической химии РАН, 2013), выполненной под руководством автора.

#### Обоснование исследования

Белки семейства GFP на сегодняшний день нашли широкое применение в прикладной биологии в качестве генетически кодируемых флуоресцентных маркеров. В отличие от большинства природных красителей, для биосинтеза которых требуется участие нескольких ферментов и кофакторов, в GFP-подобных белках формирование хромофора происходит путем модификации остатков трех аминокислот основной цепи белка. Эти модификации, как было описано ранее, полностью катализируются самим флуоресцентным белком и не требуют воздействия внешних агентов, за исключением кислорода. Уникальная способность к автоформированию хромофора основана на пространственной структуре флуоресцентных белков. Все GFP-подобные белки имеют схожее строение, состоящее из 11  $\beta$ -листов, образующих полый цилиндр с диаметром около 30 Å, внутри которого проходит сильно деформированная  $\alpha$ -спираль. Сформированный из остатков трех аминокислот  $\alpha$ -спирали хромофор расположен в геометрическом центре  $\beta$ -бочки. Аминокислоты, окружающие хромофор, катализируют его формирование и отвечают за тонкую настройку его спектральных свойств.

Как уже было сказано, в зеленом флуоресцентном белке хромофор формируется путем циклизации основной цепи белка (карбонильная группа Ser65 взаимодействует с амидным азотом Gly67 с образованием пятичленного гетероцикла) и окисления связи C $\alpha$ -C $\beta$  Tyr66. Было установлено, что остаток Tyr66 может быть искусственно замещен аминокислотой с другим ароматическим остатком с образованием хромофоров, максимум испускания которых смещен в синюю область [Heim, Prasher, Tsien, 1994]. В частности, голубой и синий мутанты GFP (CFP и BFP) несут Trp66 и His66 соответственно. Наибольший гипсохромный сдвиг спектра флуоресценции наблюдался для Phe66-содержащего белка Sirius, длина волны возбуждения которого – 355 нм, а эмиссии 424 нм [Tomosugi и др., 2009]. Дальнейшие химические модификации ядра хромофора GFP в 65 положении расширяют систему сопряженных двойных связей, в результате чего наблюдается красное смещение спектров испускания для желтых,

оранжевых и красных флуоресцентных белков и фиолетово-синих хромопротеинов [Chudakov и др., 2010].

Важно отметить, что ионизация фенольного гидроксила остатка Тугб6 сильно влияет на спектральные свойства хромофора. Флуоресцентные белки с протонированным (нейтральным) зеленым хромофором имеют пик поглощения около 400 нм, в то время как депротонирование хромофора приводит к 80-90 нм батохромному сдвигу поглощения. Аналогичная зависимость наблюдается для хромофоров красных флуоресцентных белков, для которых максимумы длин волн поглощения лежат в области 450 нм и 550-600 нм для протонированных и депротонированных форм соответственно. Протонированные хромофоры обладают коротковолновой эмиссией (в синей области спектра для зеленых флуоресцентных белков и зеленой области для красных), однако, как правило, они подвергаются сверхбыстрому переносу протона в возбужденном состоянии (excited state proton transfer, ESPT) и, как следствие, излучают в более длинноволновой области, подобно испусканию соответствующих анионных форм хромофора [Chattoraj и др., 1996; Henderson и др., 2009; Kogure и др., 2006; Piatkevich и др., 2010]. Наиболее изученным примером ESPT в GFP-подобных белках является GFP дикого типа из *A. victoria*. Спектр поглощения этого белка имеет основной пик при 398 нм (протонированная форма) и минорный пики при 478 нм (депротонированная форма) [Ward, Vokman, 1982]. Следует отметить, что благодаря быстрому переносу протона в возбужденном состоянии возбуждение GFP дикого типа в любой из этих областей приводит к флуоресцентной эмиссии в зеленой области спектра с небольшим различием максимумов испускания (508 и 503 нм при возбуждении длинами волн 398 и 482 нм соответственно). Спектроскопия с временным разрешением показала, что при длине волны возбуждения 398 нм наблюдается кратковременная эмиссия в голубой области спектра (~460 нм), которая переходит в зеленую эмиссию за пикосекунды. Был предложен путь миграции протонов внутри  $\beta$ -бочонка GFP, включающий в себя молекулу воды и остатки Ser205 и Glu222 [Brejcs и др., 1997; Palm и др., 1997]. Согласно альтернативной модели, протон из возбужденного хромофора может выйти на поверхность белка через остаток Thr203, в то время как повторное протонирование хромофора происходит по длинному пути, включающему Glu5 на поверхности белка и несколько молекул воды и аминокислотных остатков, включая Glu222 и Ser205 [Agmon, 2005].

Химические и физические принципы формирования и функционирования хромофоров в GFP-подобных белках привлекают большой интерес. Для изучения этих проблем был привлечен ряд различных подходов, в том числе кристаллография, биохимические исследования нативных и гидролизованных флуоресцентных белков, методы направленного и случайного мутагенеза, а также спектроскопия с временным разрешением. Помимо прочих подходов, химический синтез модельных хромофоров оказался полезным методом для

подтверждения или опровержения структур, предложенных структурными исследованиями, а также для установления химического и спектрального поведения хромофоров флуоресцентных белков [Bell и др., 2000; Niwa и др., 1996; Voityuk и др., 2001; Yampolsky и др., 2005]. Были созданы и изучены расширенные библиотеки синтетических хромофоров зеленых и красных флуоресцентных белков [Ivashkin, Yampolsky, Lukyanov, 2009; Tolbert и др., 2012]. Простейшим соединением, идентичным нативному хромофору GFP, является 4-(4-гидроксипензилиден)-1,2-диметил-1*H*-имидазол-5-(4*H*)-он (*p*-HOBDI, схема 3.2.1).

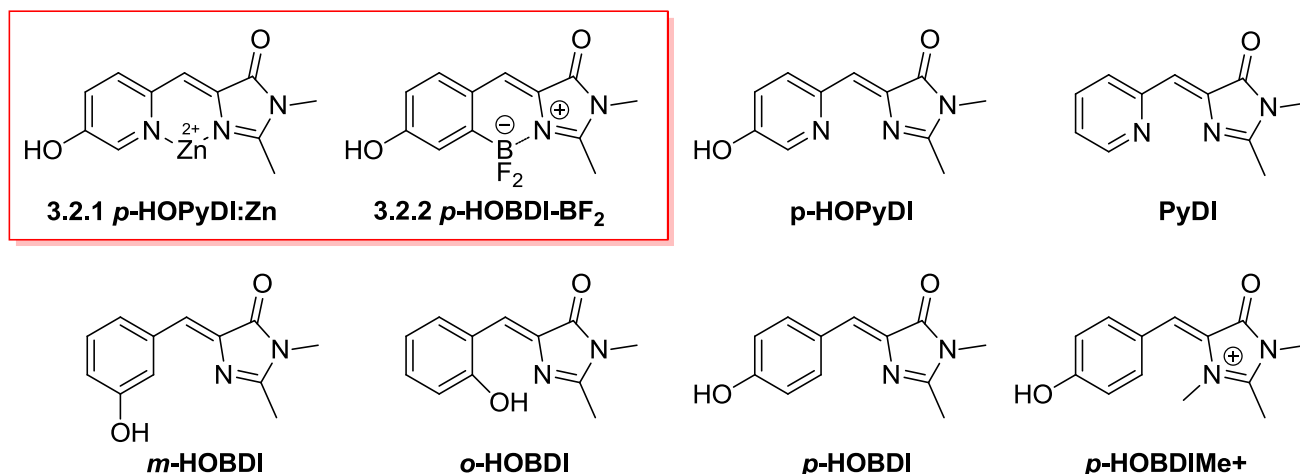


Схема 3.2.1. Синтетические аналоги хромофора GFP с фиксированной (выделены) и нефиксированной пространственной структурой.

Флуоресцентные свойства этого модельного хромофора разительно отличаются от спектральных свойств зеленого флуоресцентного белка дикого типа. В отличие от GFP дикого типа, модельный хромофор практически не флуоресцирует (квантовый выход флуоресценции (FQY) меньше  $10^{-4}$ ), а время жизни флуоресценции модельного хромофора в большинстве растворителей меньше 1 пикосекунды [Mandal, Tahara, Meech, 2004]. В результате для модельного хромофора *p*-HOBDI никогда не наблюдалось эффекта переноса протона в возбужденном состоянии ни в одном из изученных растворителей. Другие модельные хромофоры, имеющие различные заместители или искусственно измененный скелет, были схожи, но не идентичны, с хромофорами нативных флуоресцентных белков. Использование модельных соединений позволило исследовать многие ключевые характеристики хромофоров, в том числе спектральные свойства заряженных и нейтральных (протонированной/депротонированной) форм хромофоров, влияние растворителей и различных заместителей на спектральные свойства [He, Bell, Tonge, 2002; Kojima и др., 1998; Yampolsky и др., 2005, 2008; Yampolsky, Balashova, Lukyanov, 2009], зависимость квантового выхода от

пространственного строения хромофора [Baldrige и др., 2010; Conyard и др., 2011; Wu, Burgess, 2008], и формирование зрелого хромофора из биомиметических предшественников [Ivashkin и др., 2011; Kojima и др., 1997]. До настоящего времени никаких исследований ESPT на GFP-подобных синтетических хромофорах не проводилось, так как они не обладали флуоресцентными свойствами или не имели способной к ионизации ОН-группы.

Командой исследователей из Технологического института Джорджии (США) было проведено исследование межмолекулярного эффекта ESPT модельного хромофора *m*-HOBDI в различных протонированных состояниях [Dong и др., 2007; Solntsev и др., 2008]. В зависимости от pH раствора наблюдались фотоиндуцируемое депротонирование гидроксильной группы и протонирование имидазолон, однако большинство этапов ESPT были диабатическими и не приводили к образованию флуоресцентных продуктов.

С целью исследовать фотофизическое поведение хромофоров флуоресцентных белков, включающее межмолекулярный ESPT, нами в сотрудничестве с группами Солнцева и Балдриджа (технологический университет Джорджии, США) были синтезированы два высокофлуоресцентных аналога хромофора GFP. Первым из них является аналог *p*-HOBDI, 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: ((5*Z*)-5-[(2-дифторметил-4-гидроксифенил)-метилен]-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он, *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub>, схема 3.2.1). *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> является наиболее близким к нативному хромофору GFP из всех известных аналогов. Вторым модельным хромофором является гидроксипроизводное флуорофора PyDI ([(*Z*)-1,2-диметил-4-(пиридин-2-илметил)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-он, *p*-HOPyDI схема 3.2.1), конфигурация которого фиксируется обратимо при связывании ионов с Zn<sup>2+</sup> или Cd<sup>2+</sup>.

## Результаты

### *Синтез борированного аналога хромофора GFP*

Для синтеза *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> 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 3.2.2.

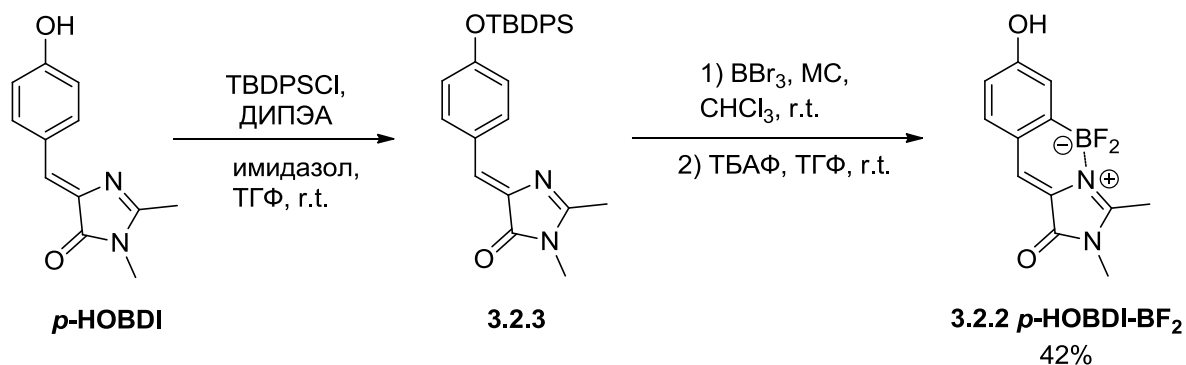


Схема 3.2.2. Синтез *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> с использованием молекулярных сит.

Строение пространственно-фиксированного хромофора *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> было подтверждено методами ЯМР, а также масс-спектрометрии высокого разрешения и рентгеноструктурным анализом, что не оставляет сомнений по поводу его структуры (рис. 3.2.1). Согласно данным РСА молекула *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> имеет планарную структуру: все атомы кроме фтора и атомов водорода метильных групп занимают инвариантные позиции в плоскости зеркала. Определенная степень делокализации проявляется в длинах связей C-C, например C(4)-C(5) и C(3)-C(4) длины связей (1,439 (3) и 1,355 (3) Å, соответственно) отклоняются как от классических одинарной (1,48 Å) и двойной (1,34 Å) длин связей. Молекулы *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> в кристалле связаны в цепи относительно сильными O(16)-H(16)···O(15) водородными связями (расстояние O···O 2,693(3) Å, угол O-H···O 175 °). В свою очередь, эти цепи организованы в стопки, что обусловлено сильным стэкинговым взаимодействием (π···π расстояние около 3,3 Å). В рамках совместной работы группой Балдриджа был также синтезирован и описан хромофор *p*-HOPyDI [Lee и др., 2011].

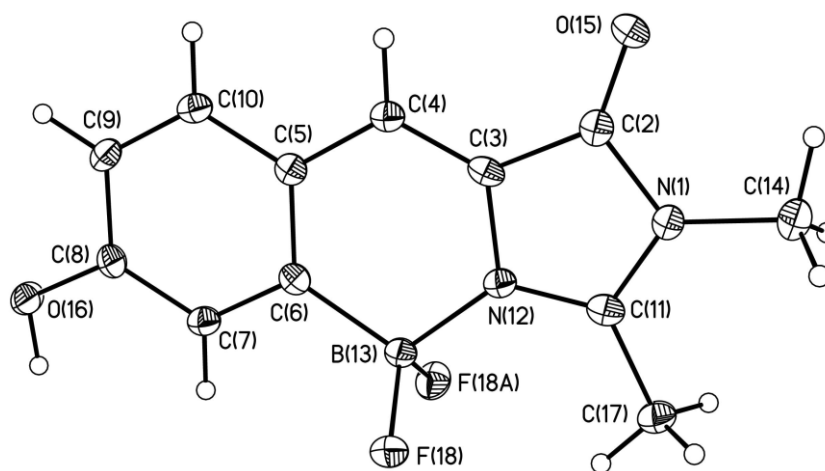


Рисунок 3.2.1. Общий вид одного из соединений *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> в тепловых эллипсоидах с 50% вероятностью

*Свойства p-HOBDI-BF<sub>2</sub>*

Максимумы спектров поглощения и испускания *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> в различных растворителях оказались близки к аналогичным параметрам *p*-HOBDI и имели лишь незначительный (30-40 нм) батохромный сдвиг (таблица 3.2.1). Одной из отличительных черт полученного нами хромофора *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> 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].

Таблица 3.2.1. Максимумы поглощения и испускания (нм) нейтральной и депротонированной (Ан.) форм *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> в различных растворителях.

#	Раств. <sup>а</sup>	$\pi^*$	$\beta$	$\alpha$	Абс. (Нейтр.)	Эм. (Нейтр.)	Абс. (Ан.)	Эм. (Ан.)
1	Et <sub>2</sub> O	0.24	0.47	0	417	466	539	543
2	EtOAc	0.45	0.45	0	410	465	533	543
3	EtOH	0.54	0.77	0.83	416	483	512	532
4	MeOH	0.60	0.62	0.93	411	479	498	531
5	MeCN	0.66	0.31	0.19	402	469	533	540
6	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.73	0	0.3	414	476	536	551
7	ДМФ	0.88	0.69	0	422	487	543	550
8	ДМСО	1.00	0.76	0	413	480	538	545
9	Вода	1.09	0.4	1.17	404	485	485	520
10	Ацетон	0.62	0.48	0.08	407	467	531	552
11	ТГФ	0.55	0.55	0	413	466	536	544
12	Пиридин	0.87	0.64	0	421	490	543	551
13	Толуол	0.49	0.11	0	423	469	535	543
14	Диоксан	0.49	0.37	0	414	464	529	541

<sup>а</sup> Параметры растворителей  $\pi^*$ ,  $\alpha$  и  $\beta$  взяты из [Kamlet и др., 1983]

Изучение спектров абсорбции и эмиссии соединения *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> в различных растворителях позволило исследовать его сольватохромные свойства, применив подход Камлета-Тафта [Kamlet и др., 1983].

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



Это уравнение описывает зависимость спектрального сдвига растворенного вещества ( $\nu$ ) от сольватохромных параметров растворителя:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\pi^*$ , характеризующих соответственно электроноакцепторные, электронодонорные свойства среды, а также ее способность к неспецифическим взаимодействиям (полярность/поляризуемость). Таким образом, предложенный подход позволяет легко определить специфическое и неспецифическое сольватирование веществ. Этот подход был ранее с успехом использован для различных гидроксикарбоновых соединений, в том числе *p*-HOBDI.

Из полученных ранее данных [Dong, Solntsev, Tolbert, 2006] был сделан вывод о сильной зависимости спектров абсорбции соединения *p*-HOBDI и аналогов от их сольватохромного поведения, влияние на которое одновременно оказывают как кислотно-основные характеристики, так и поляризуемость растворителя. Значения сольватохромных коэффициентов  $\rho$ ,  $A$  и  $B$ , в свою очередь, связаны со строением растворенных соединений и отражают их чувствительность к сольватохромным параметрам растворителей.

Величины и направления сольватохромных сдвигов сильно зависели от ионизации хромофоров. Полученные нами данные четко демонстрируют увеличение дипольного момента *p*-HOBDI при ионизации, а также его амфотерные свойства. Исключительно сильная флуоресценция *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> позволила нам провести исследование сольватохромного поведения его спектров поглощения и эмиссии.

Подобно спектрам *p*-HOBDI, для спектров абсорбции нейтральной формы *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> наблюдалась низкая зависимость от свойств растворителя, однако при анализе линейной регрессии Камлета-Тафта для нее был получен крайне низкий фактор сходимости ( $R < 0.5$ ). Напротив, анализ спектров абсорбции и эмиссии депротонированной формы хромофора *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> выявил хорошее соответствие расчетным данным (таблица 3.2.2).

Таблица 3.2.2. Сольватохромные коэффициенты (в  $10^3/\text{см}$ ), нейтральной и анионной форм *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> и *p*-HOBDI (поглощение анионной формы) в соответствии с уравнением 1.

Band	$\square_0$	$\rho$	$A$	$B$	$R^a$
Абс. Ан	18.7	-0.1	1.5	0	0.95
<i>p</i> -HOBDI <sup>b</sup>	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

<sup>a</sup> Коэффициент корреляции. <sup>b</sup> [Dong, Solntsev, Tolbert, 2006]

Сдвиг в спектре поглощения депротонированной формы *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> 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, Huppert, Agmon, 1998].

В отличие от *p*-HOBDI, хромофор *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> легко растворим в воде. Максимум спектра поглощения *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> в нейтральной и основной средах смещен в длинноволновую область по сравнению с *p*-HOBDI и гораздо ближе к максимумам поглощения *p*-HOBDIME<sup>+</sup> 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. 3.2.2а). На спектрах наблюдается изобестическая точка при 425 нм и рКа 6.4.

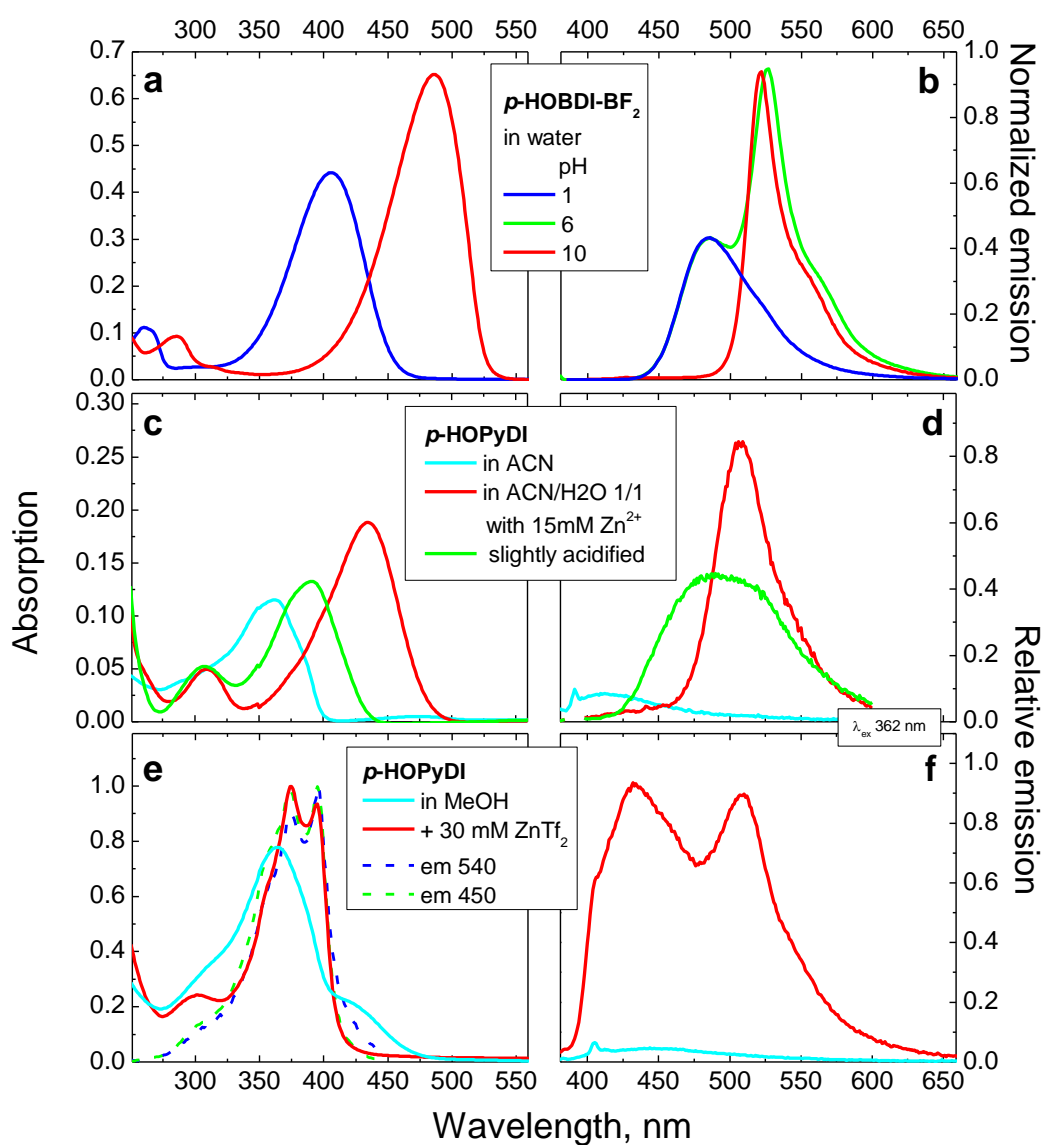


Рисунок 3.2.2. Спектры поглощения и эмиссии *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> и *p*-HOPyDI в различных растворителях. Спектры поглощения *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> в воде при pH 1 и 6 идентичны. Рисунок воспроизводится по статье Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D.,

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-BF<sub>2</sub> 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. 3.2.2b), 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  $pK_a^*$  2.1 (рис. 3.2.3).

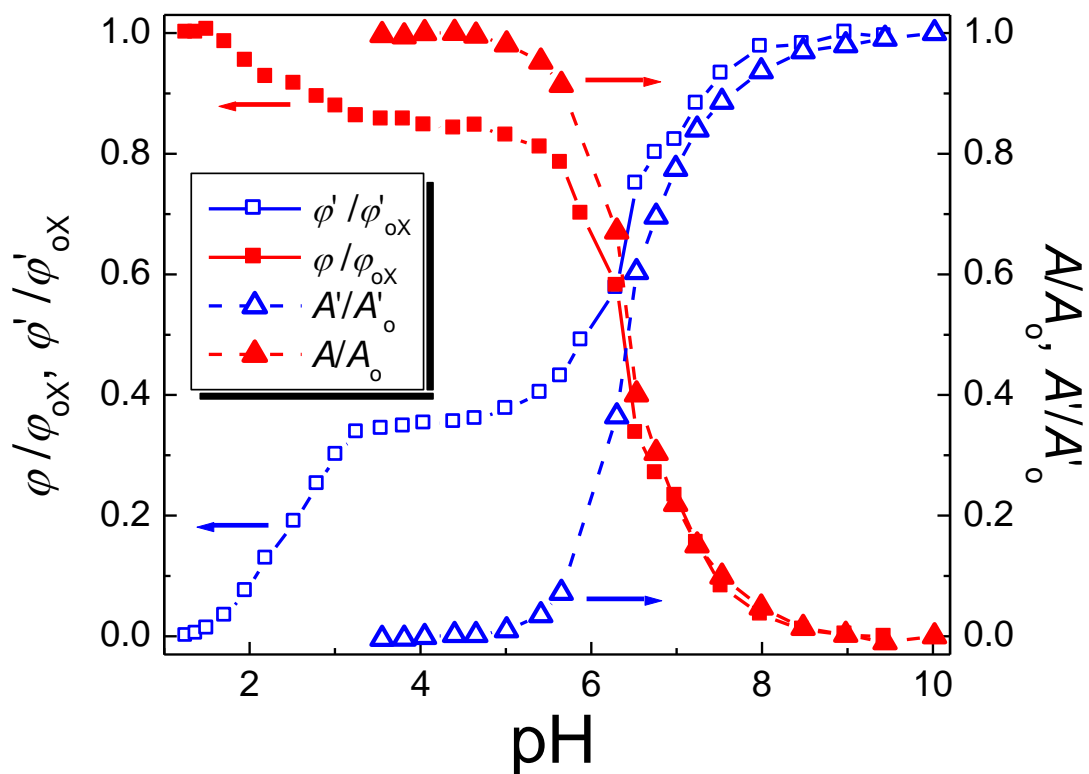


Рисунок 3.2.3. Кривые pH-титрования флуоресценции и поглощения  $p$ -HOBDI-BF<sub>2</sub> в воде.  $\phi/\phi_o$  ( $A/A_o$ ) и  $\phi'/\phi'_{ox}$  ( $A'/A'_o$ ) - нормализованные интенсивности флуоресценции (поглощения)  $R^*OH$  ( $ROH$ ) и  $R^*O^-$  ( $RO^-$ ). Следует отметить, что интенсивности  $R^*OH$  ( $\phi_{ox}$ ) и  $R^*O^-$  ( $\phi'_{ox}$ ), измеренные на концах кривых титрования, не отражают реальные данные, так как наблюдается гидролиз  $p$ -HOBDI-BF<sub>2</sub>. 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.

Разница между  $pK_a^*$  возбужденного состояния и  $pK_a$  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 из таблицы 3.2.1 (для воды), получили  $\Delta pK_a = 5.8$ . С учетом значения  $pK_a$  основного состояния 6.4 получили значение  $pK_a^* = 0.6$ , что очень близко к значению, полученному с помощью рН-титрования флуоресценции (рис. 3.2.3).

Анализ кривых затухания флуоресценции протонированной и депротонированной форм хромофора *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> в воде позволил рассчитать константу скорости переноса протона в возбужденном состоянии:  $k_{ESPT} = 0.45 \text{ нс}^{-1}$ . Полученная величина  $k_{ESPT}$  для *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> отлично коррелировала с выявленной ранее [Solntsev и др., 2004] зависимостью между кинетическими и термодинамическими параметрами переноса протона в возбужденном состоянии для различных гидроксильных ароматических соединений в основном и в возбужденных состояниях (рис. 3.2.4). Таким образом, можно сделать вывод о том, что *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> является фотокислотой умеренной силы.

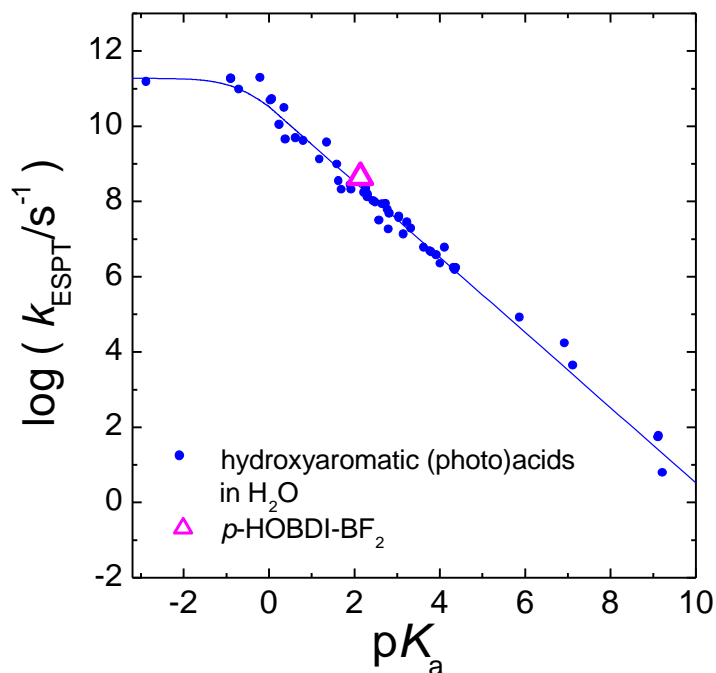


Рисунок 3.2.4. Зависимость скорости протолитической диссоциации и  $\text{p}K_a$  для различных фенолов в воде. Рисунок воспроизводится по статье Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L.V., Tolbert L.M., **Yampolsky I.V.**, Solntsev K.M. Conformationally locked chromophores as a model of excited state proton transfer in fluorescent proteins. **J. Am. Chem. Soc.** 2012, 134, 6025-6032.

Фотокислотные свойства возбужденного состояния *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> были исследованы в водных растворах метанола при добавлении оснований. Как и ожидалось, в чистом метаноле переноса протона в возбужденном состоянии не наблюдалось. При добавлении воды на спектре эмиссии появлялась полоса, соответствующая образованию продукта ESPT (рис. 3.2.5a). При этом константа скорости ESPT имела квадратичную зависимость от концентрации воды (рис. 3.2.5b), что соответствовало свойствам фотокислот с  $\text{p}K_a^* > 0$  [Solntsev и др., 2000]. Добавление основания (ацетат-ион) к водному раствору *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> значительно ускоряло процесс переноса протона (рис. 3.2.5c). Анализ спектральных данных флуоресцентной эмиссии с использованием модифицированного уравнения Штерна-Фольмера (рис. 3.2.5d) показывает кажущийся бимолекулярный порядок  $3,8 \text{ M}^{-1}\text{нс}^{-1}$ . Подобный ограниченный диффузией экзэргонический перенос протона от возбужденного хромофора GFP на карбоксилат сверхбыстро протекает в белках, где диффузия реагентов отсутствует, а короткая цепь переноса протона способствует его согласованному переносу.

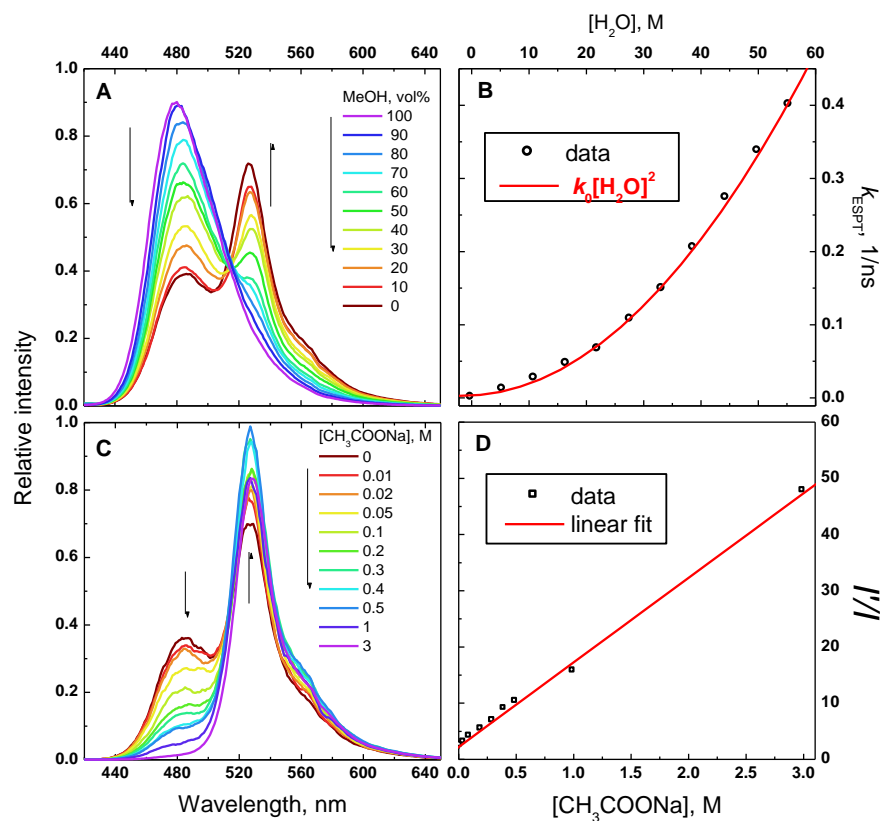


Рисунок 3.2.5. Кинетика ESPT *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> в различных условиях. (А)Спектры флуоресценции *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> в смеси метанол/вода, (С) и в водных растворах с различными концентрациями ацетата натрия. Зависимость константы скорости ESPT от концентрации H<sub>2</sub>O (В) и основания (D). 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 K.M. Conformationally locked chromophores as a model of excited state proton transfer in fluorescent proteins. **J. Am. Chem. Soc.** 2012, 134, 6025-6032.

Интересно провести параллель между спектрами флуоресценции *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> в 3М растворе ацетата натрия и спектрами эмиссии мутанта GFP дикого типа H148D/S65T [Leiderman и др., 2007; Stoner-Ma 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.

### Заключение

Разработан метод пространственной фиксации подвижного бензилиденового фрагмента в составе хромофора GFP путем введения дифторборильного заместителя. Полученное соединение *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> 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.

### 3.3. Флуоресцентный белок WasCFP с ионизированным остатком триптофана в составе хромофора

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Кареном Саркисяном и коллегами: 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.

Флуоресцентные белки (ФБ) семейства GFP представляют собой мощный инструмент для визуализации структуры и динамических процессов в живых системах [Chudakov и др., 2010]. Все известные природные ФБ различных цветов имеют Trp66 в качестве основного хромофор-образующего аминокислотного остатка. Важнейшей особенностью остатка Trp66 хромофоров является его способность существовать в нейтральной (протонированной) или анионной (депротонированной) формах, в зависимости от системы водородных связей вокруг фенольного кислорода. Как было описано ранее, соответствующие нейтральные и анионные хромофоры обладают совершенно различными спектральными свойствами. Депротонированный GFP-подобный хромофор поглощает синий свет при 480 нм и испускает зеленый свет при 510 нм. Напротив, нейтральный GFP-подобный хромофор поглощает фиолетовый свет при 400 нм и может излучать синий свет при 450 нм, однако эффект сверхбыстрого переноса протона в возбужденном состоянии приводит к переходу хромофора в анионную форму с зеленым излучением при 510 нм. Подобное поведение также было описано для красных флуоресцентных белков [Piatkevich и др., 2010]. Взаимопревращения между нейтральными и анионными состояниями хромофоров флуоресцентных белков содержащих Trp66 представляют собой структурную основу для функционирования целого ряда флуоресцентных сенсоров, а также фотоактивируемых флуоресцентных белков, широко используемых для мониторинга клеточных событий в режиме реального времени.

Было установлено, что остаток Trp66 может быть искусственно замещен другой ароматической аминокислотой с образованием голубых и синих мутантов GFP, которые успешно используются для многоцветного мечения белков и FRET-имиджинга. Недавно были созданы значительно улучшенные варианты этих белков, а именно Cerulean, Cerulean3, mTurquoise и mTurquoise2 [Goedhart и др., 2010, 2012; Markwardt и др., 2011; Rizzo и др., 2004].

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.



## Результаты

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.

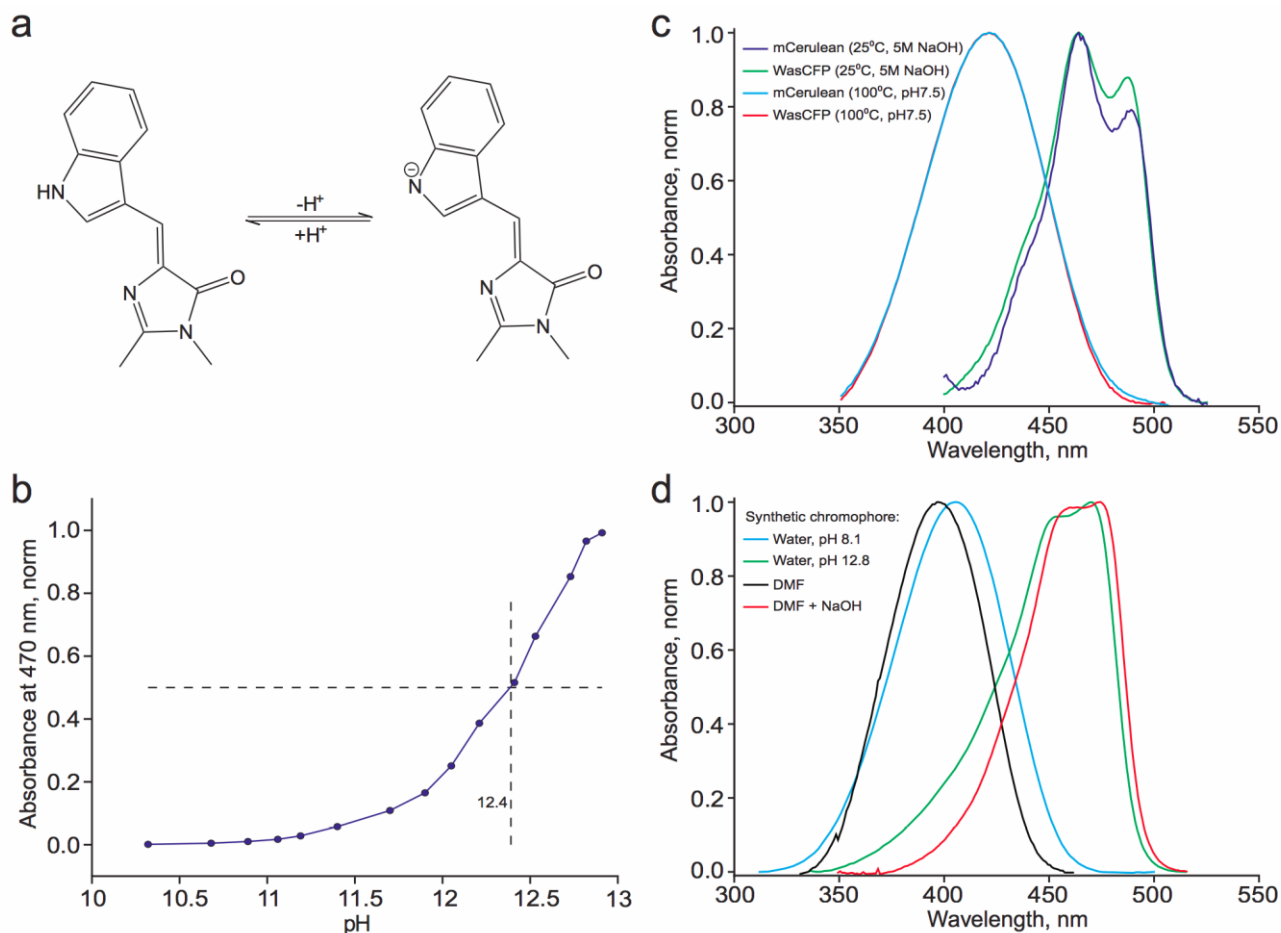


Рисунок 3.3.1. Ионизация синтетического CFP-хромофора, а также CFP-хромофора во флуоресцентном белке. (a) Структуры синтетического CFP-хромофора в нейтральном и анионном состояниях. (b) рН-титрование синтетического CFP-хромофора. (c) Нормализованные спектры поглощения WasCFP и mCerulean, денатурированных 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.

Действительно, мы заметили, что в сильно основных условиях в спектрах синтетического хромофора синего ФБ ((5Z)-5-(1H-индол-3-илметилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он) [Kojima и др., 1998] наблюдается батохромный сдвиг около 60 нм с рКа 12.4

(рис. 3.3.1). 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.

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. 3.3.2). Далее случайный мутагенез был использован для повышения относительной интенсивности зеленой флуоресценции и общей яркости испускания.

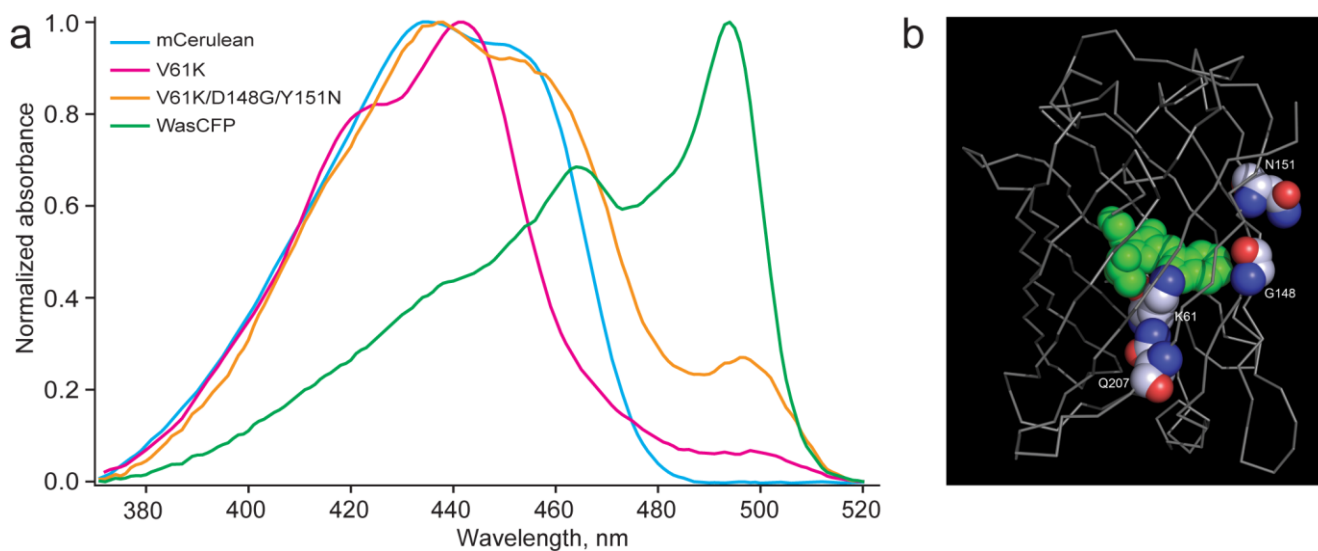


Рисунок 3.3.2. Сайт-специфический и случайный мутагенез mCerulean. (a) Нормализованные спектры поглощения mCerulean и его мутантных аналогов после нескольких последовательных раундов мутагенеза. Все спектры были измерены при pH 7,4 и 4°C. Cerulean - голубой, V61K - розовый, V61K /D148G /Y151N – желтый, 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. 3.3.2). 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. 3.3.3). 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. 3.3.1d). Из полученных данных нами был сделан вывод о том, что зеленая форма WasCFP имеет Trp66 в анионном состоянии (рис. 3.3.3с).

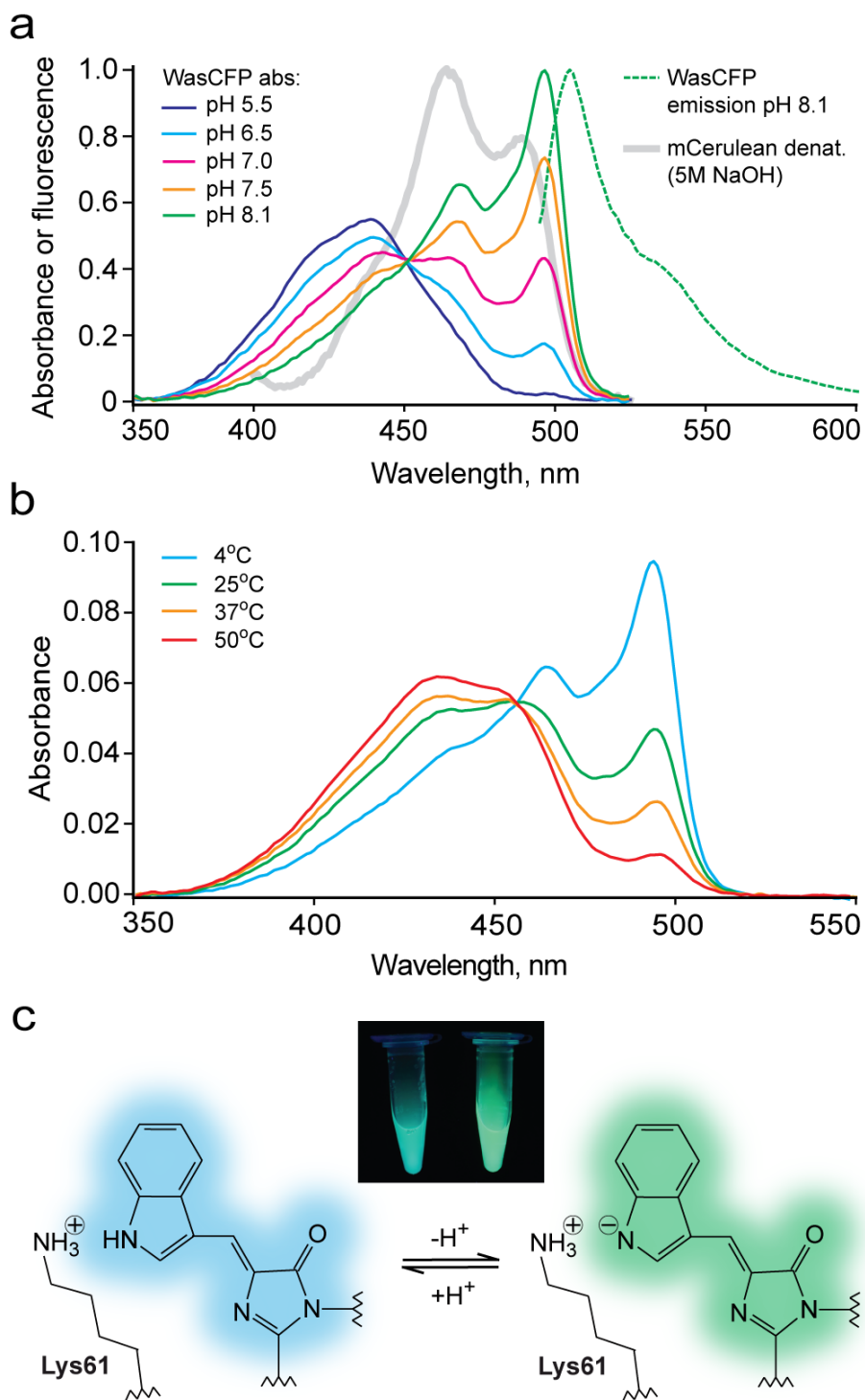


Рисунок 3.3.3. Спектральные свойства WasCFP. (a) Спектры поглощения WasCFP при различных pH (сплошные цветные линии) при 4°C. Пунктирная зеленая линия – эмиссия WasCFP при pH 8.1. Серая линия – спектр поглощения mCerulean, денатурированного в щелочи. (b) Температурная зависимость спектра поглощения WasCFP 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 0,25M раствора мочевины (Рисунок 3.3.4). 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).

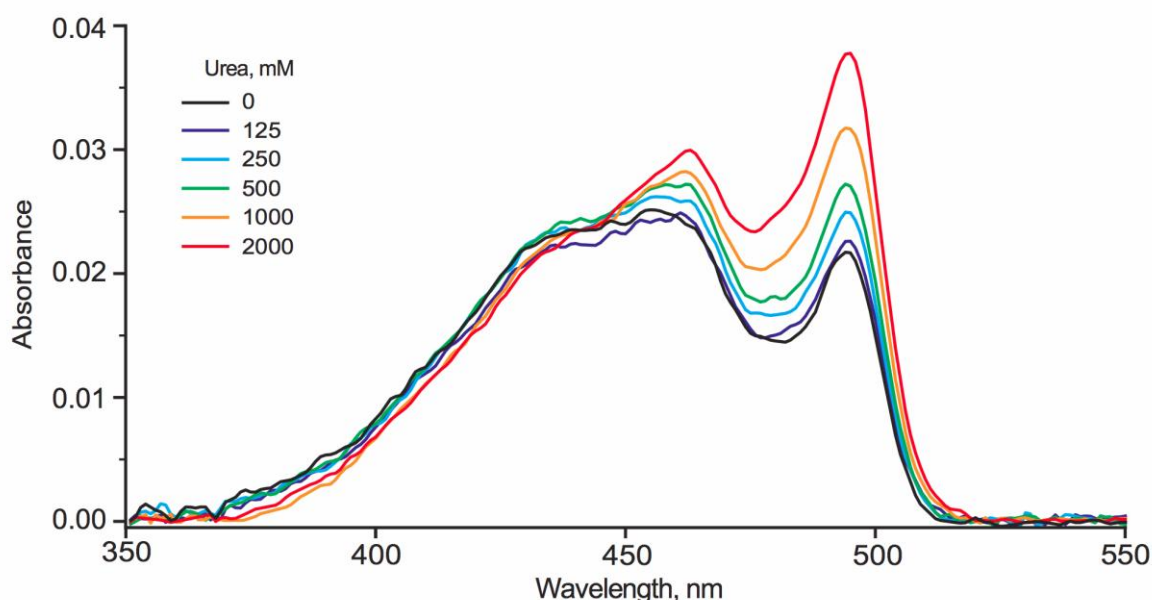


Рисунок 3.3.4. Спектры поглощения WasCFP при различных концентрациях мочевины. Рисунок воспроизводится по статье Sarkisyan K.S., **Yampolsky I.V.**, Solntsev K.M., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Tryptophan-based chromophore in fluorescent proteins can be anionic. **Scientific Reports** 2012, 2, Art. 608.

### Обсуждение

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 (рис. 3.3.5), 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 pH- и температурно-зависимой конверсии голубой и зеленой форм в WasCFP.

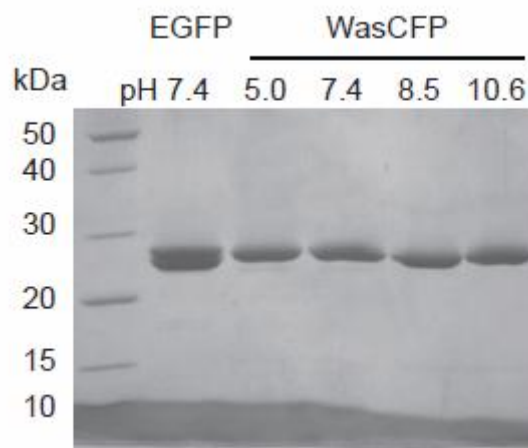


Рисунок 3.3.5. Отсутствие фрагментации белковой цепи WasCFP.

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-заимодействии 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 pH-стабильностью и не претерпевал практически никаких изменений в спектре поглощения в диапазоне pH 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.



### 3.4. CompX и AsLn2 – природные аналоги люциферина биолюминесцентного червя *F. heliota*

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Валентином Петушковым, Александрой Царьковой, Зинаидой Осиповой, Максимом Дубинным и коллегами, а также диссертационных работ Александры Царьковой и Зинаиды Осиповой под руководством автора.

Биолюминесценция - испускание "холодного света" живыми организмами - как правило, происходит в результате катализируемой люциферазой реакции окисления люциферина молекулярным кислородом.

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*, *Diploptrema*, *Fletcherodrilus*, *Octochaetus*, *Pontodrilus*, и *Spenceriella*) секретировали люминесцентную слизь. Характерной чертой их биолюминесцентных реакций являлось участие перекиси водорода, более того, люциферин вида *Diplocardia longa* – N-изовалерил-3-амино-1-пропаналь – проявлял биолюминесцентную 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 биолюминесцентных олигохет *Fridericia heliota* Zalesskaja, 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 ( $\lambda_{\text{max}}$  люминесценции 478 нм) при механической стимуляции. Люминесценция *Fridericia heliota* локализована в эпидермальных клетках (рис 3.4.1).[Rota и др., 2003].

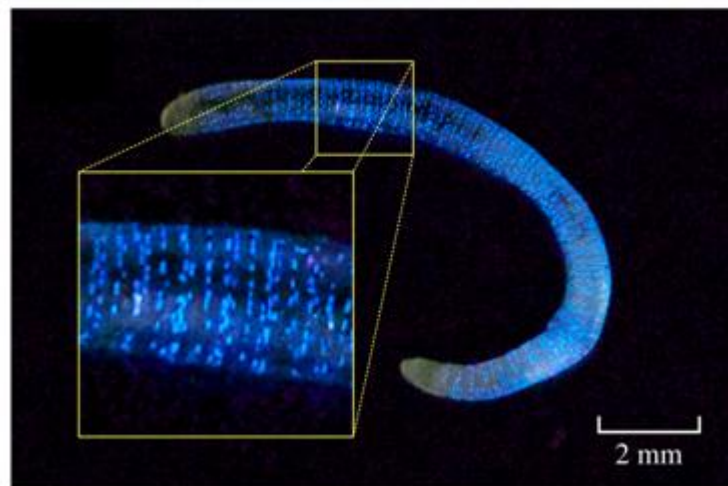


Рисунок 3.4.1. Биолюминесценция почвенных червей *Fridericia heliota*.

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 биолюминесцентной реакции. Было установлено, что новая система включает в себя пять компонентов, необходимых для испускания видимого света  $\lambda_{\max}$  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 биолюминесцентная система проявляла рН- и температурную зависимость, с максимальным светоиспусканием наблюдаемым при рН 8.2 и 33°C соответственно [Petushkov, Rodionova, 2005]. Также было установлено, что неионогенные детергенты, такие как Triton X-100, способствуют протеканию реакции биолюминесценции, в то время как анионные детергенты и различные анионы обладают ингибирующими свойствами [Rodionova, Petushkov, 2006]. Более того, было установлено, что биолюминесцентная 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].<sup>5</sup> Низкомолекулярная фракция экстракта червей содержала соединения неустановленного 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. 3.4.1) выявили рН-зависимость в области 2.8-5.0. При рН 2.8 наблюдаются максимумы при 234 нм (локальный максимум) и при 296 нм, тогда как при рН 4.0  $\lambda_{\max}$  при 230 нм (локальный максимум) и 294 нм, а при рН 5.0  $\lambda_{\max}$  при 228 нм (локальный максимум) и 288 нм, что позволило предположить наличие ионогенных групп с  $pK_a$  около 4.

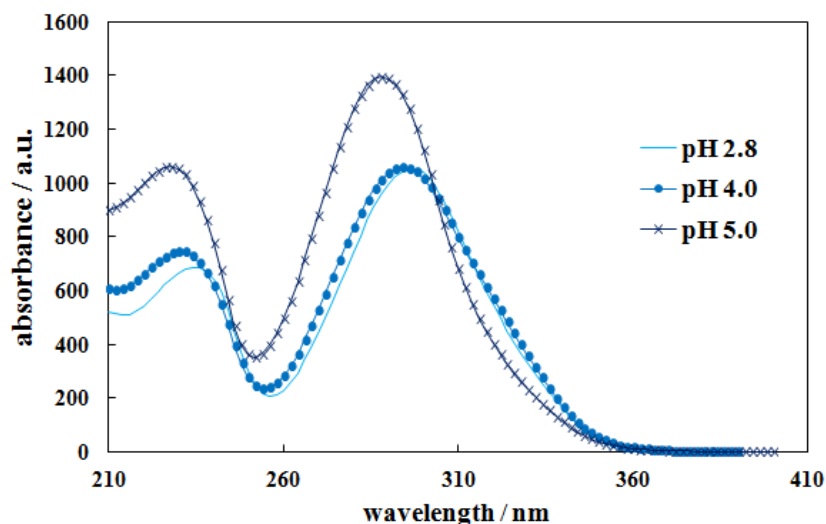


Рисунок 3.4.1. Спектры поглощения CompX при различных pH. Измерения проводились в 0.1% формиате аммония при значениях pH 2.8 (тонкая линия), 4.0 (пунктирная линия) и 5.0 (линия с астерисками). Рисунок воспроизводится по статье Petushkov V.N., Tsarkova A.S., Dubinnyi M.A., Rodionova N.S., Marques S.M., 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.

Исследуемые соединения CompX и AsLn2 обладали способностью к флуоресценции, схожей с таковой люциферина (рис. 3.4.2b), с длинами волн максимальной эмиссии ( $\lambda_{em}$ ), лежащими в синей области видимого спектра. Спектр флуоресценции CompX показал  $\lambda_{em}=460$  нм в кислом водном растворе и  $\lambda_{em}=457$  нм в щелочном водном растворе (таблица 3.4.1). Стоксов сдвиг CompX был достаточно велик как в кислой (150 нм), так и в щелочной (167 нм) средах, что позволило предположить сильную делокализацию электронов.

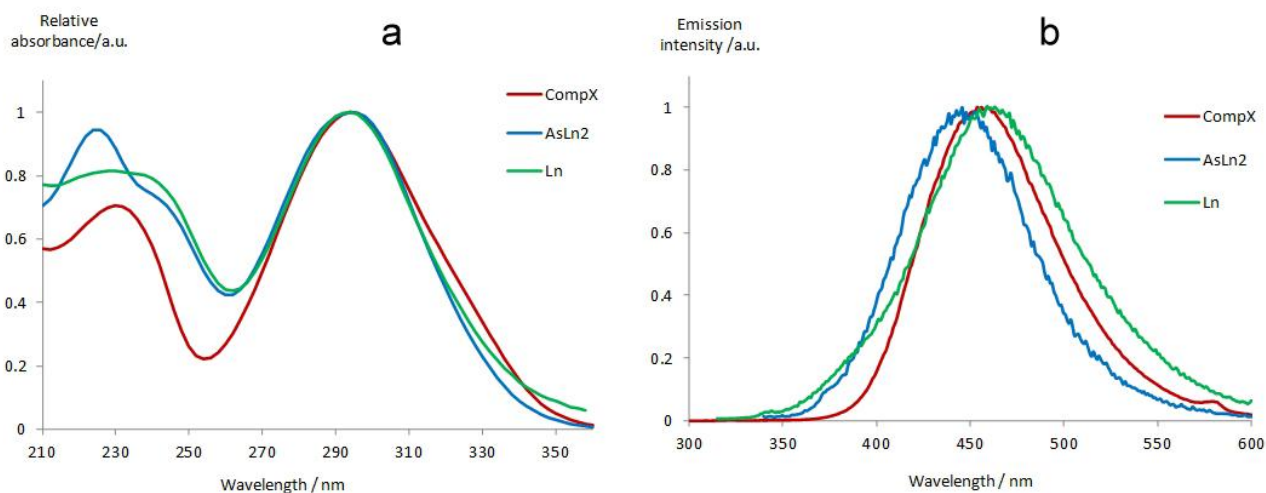


Рисунок 3.4.2. Спектры поглощения (a) и флуоресцентной эмиссии (b) люциферина *Fridericia heliota* (зеленый), AsLn2 (синий) и CompX (красный) при pH 4.0 в воде. Рисунок воспроизводится по статье Petushkov V.N., Tsarkova A.S., Dubinnyi M.A., Rodionova N.S.,

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 и total synthesis. **Tetrahedron Lett.** 2014, 55, 460-462.

Таблица 3.4.1. Максимумы поглощения и флуоресцентной эмиссии CompX, AsLn2 и люциферина *Fridericia Heliota* при различных значениях pH.

соединение	поглощение		флуоресценция	
	$\lambda_{\text{max}}$ , нм (локальный)	$\lambda_{\text{max}}$ , нм	$\lambda_{\text{excitation}}$ , нм	$\lambda_{\text{emission}}$ , нм
Luciferin pH 7.0	228	294	290	466
AsLn2 pH 4.0	226	294	330	446
AsLn2 pH 2.8	226	294	290	464
CompX pH 2.8	234	296	310	460
CompX pH > 8.0	-	-	290	457

### 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 (таблица 3.4.1): 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) (таблица 3.4.1). Таким образом, в спектре ПМР наблюдались 7 из 10 протонов.  $^1H$  ЯМР спектры CompX проявляли сильную pH-зависимость, что позволило предположить наличие одной или нескольких ионизуемых групп. Все одиннадцать атомов углерода давали сигналы в спектрах 2D HSQC и 2D HMBC: 8 сигналов в слабом поле, 2 карбоксильных углерода и 1 сигнал метокси-группы. Анализ кросс-пиков двухмерного спектра HMBC позволил установить, что метокси-группа связана с атомом углерода C2. Для того же углерода наблюдался кросс-пик HMBC с винильным протоном H3, который, в свою очередь, коррелировал с атомами углерода 1, 2, 5 и 9 (рис. 3.2.3а). Для карбоксильной группы C10 наблюдался кросс-пик только с дублетом H-5. Принимая во внимание тот факт, что в спектрах HMBC, за редким исключением [Dubinnyi и др., 2012], невозможно различить взаимодействия более чем через три связи,

единственной структурой, которая согласуется с полученными данными ЯМР и масс-спектрометрии, является 5-(2-карбокси-2-метоксивинил)-2-гидроксибензойная кислота (рис. 3.2.3b,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.

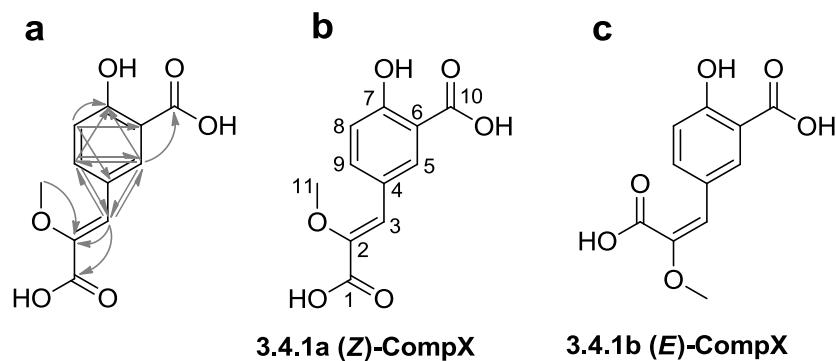


Рисунок 3.4.3. Структуры CompX и CompX (*E*)-изомера. (а) Наблюдаемые кросс-пики в спектрах НМВС природного CompX. (b) Нумерация углеродов в CompX согласно таблице 3.4.1. (с) Синтетический (*E*)-изомер CompX с противоположной конфигурацией C2-C3 двойной связи.

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 3.4.1). Согласно спектрам поглощения и флуоресцентной эмиссии, а также данным ряда 1D и 2D ЯМР спектров, основной *Z*-изомер был идентичен природному образцу (рис. 3.4.4, 3.4.6), тогда как минорный *E*-изомер отличался наличием кросс-пика в спектре ROESY между метокси-группой H11 и винильным протоном H3 (рис. 3.4.5). Наиболее существенными отличиями изомеров были химические сдвиги углерода C3 и соответствующего протона ( $\Delta$  18.2 и 0.93 м.д. соответственно, таблица 3.4.2), а также отсутствие у *E*-изомера CompX флуоресцентных свойств.

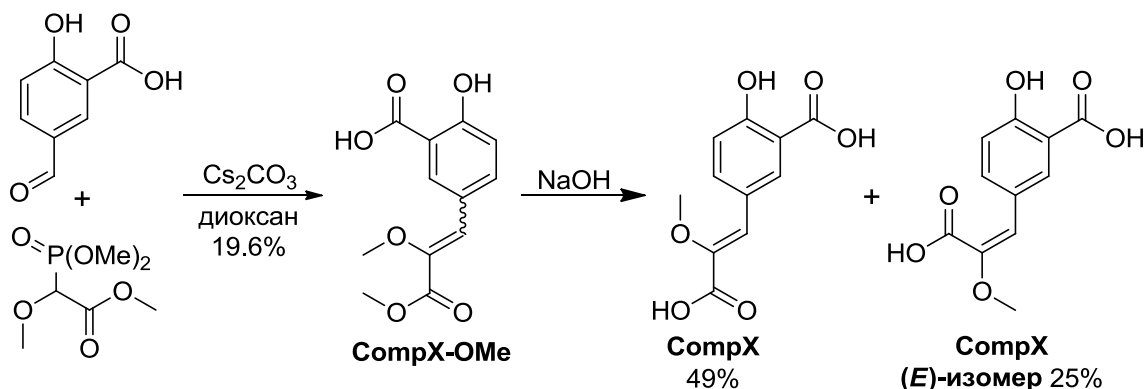


Схема 3.4.1. Синтез двух пространственных изомеров CompX (*E*- и *Z*-).

Таблица 3.4.2. Химические сдвиги  $^1\text{H}$  (800 МГц) и  $^{13}\text{C}$  (200 МГц) и мультиплетности сигналов протонов  $\text{CompX}$  и его синтетического аналога ( $E$ )-изомера  $\text{CompX}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , pH 4.2).

№ атома углерода	$\text{CompX}$		$\text{CompX}$ ( $E$ )-изомер	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	170.4	-	171.0
2	-	146.5	-	151.1
3	6.89 (с)	122.1	5.96 (с)	103.9
4	-	117.8	-	116.1
5	8.15 (д, 2.2 Гц)	132.3	7.70 (д, 2.4 Гц)	129.9
6	-	124.7	-	126.5
7	-	160.4	-	158.4
8	6.95 (д, 8.5 Гц)	116.9	6.86 (д, 8.5 Гц)	116.4
9	7.82 (дд, 2.2 и 8.5 Гц)	135.4	7.35 (дд, 2.4 и 8.5 Гц)	134.0
10	-	174.9	-	174.3
11	3.71 (с)	58.6	3.69 (с)	55.6

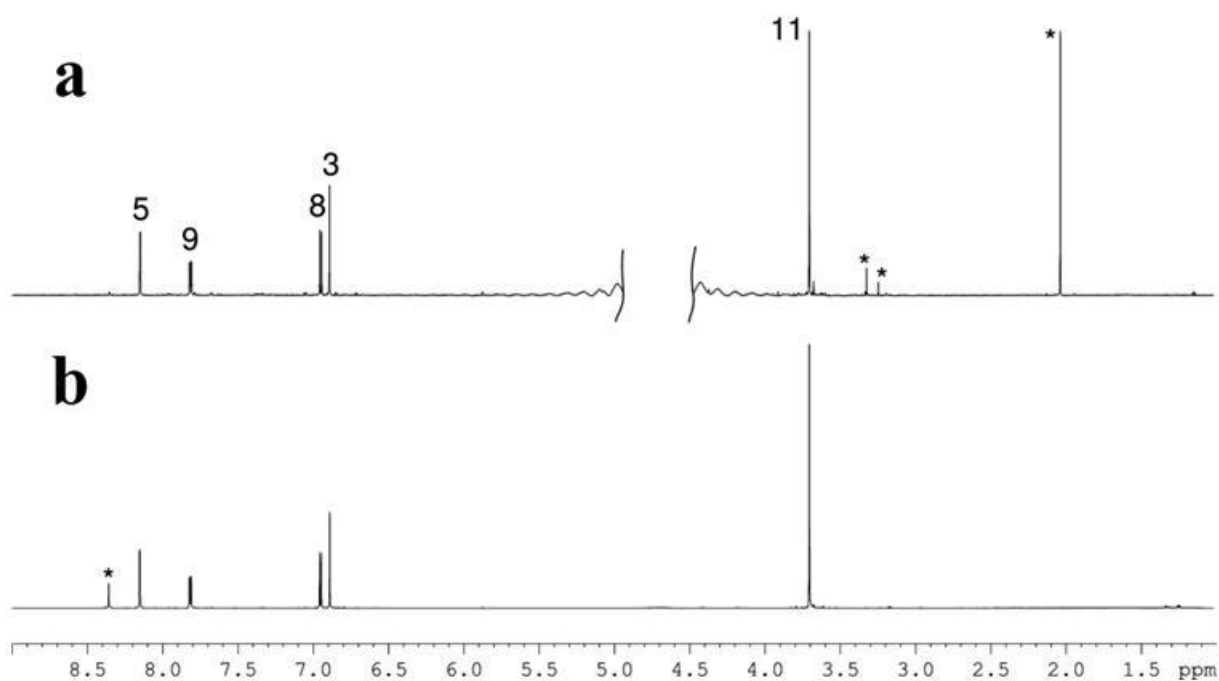


Рисунок 3.4.4.  $^1\text{H}$  ЯМР спектры (а) синтетического  $\text{CompX}$  и (б) природного  $\text{CompX}$ . Нумерация атомов согласно таблице 3.4.2 и рисунку 3.4.3б.

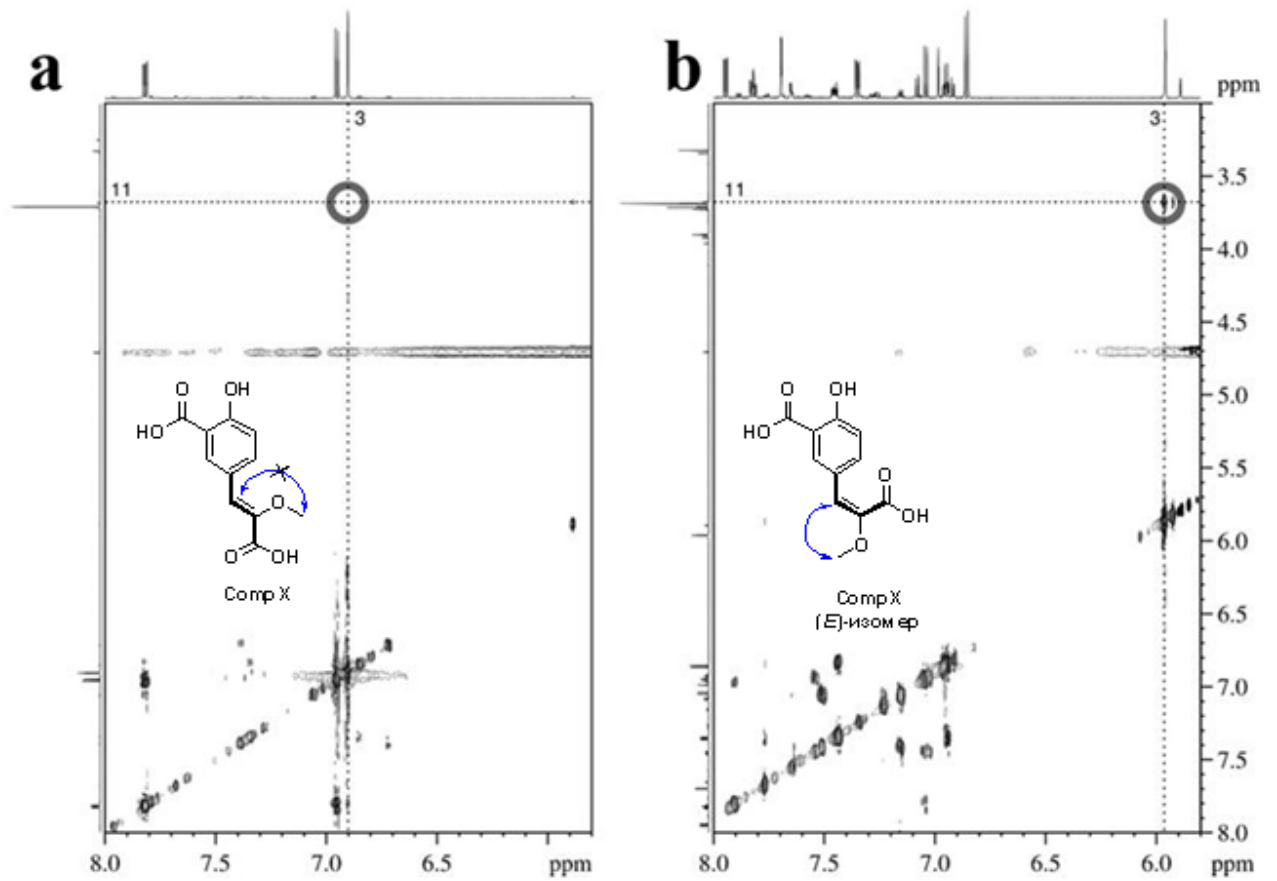


Рисунок 3.4.5. Сравнение спектров ROESY синтетического CompX (a) и (*E*)-изомера CompX (b). Положение наблюдаемого кросс-пика H3-H11 в спектре (*E*)-изомера CompX и его отсутствие в спектре (*Z*)-CompX обозначено серым кругом.

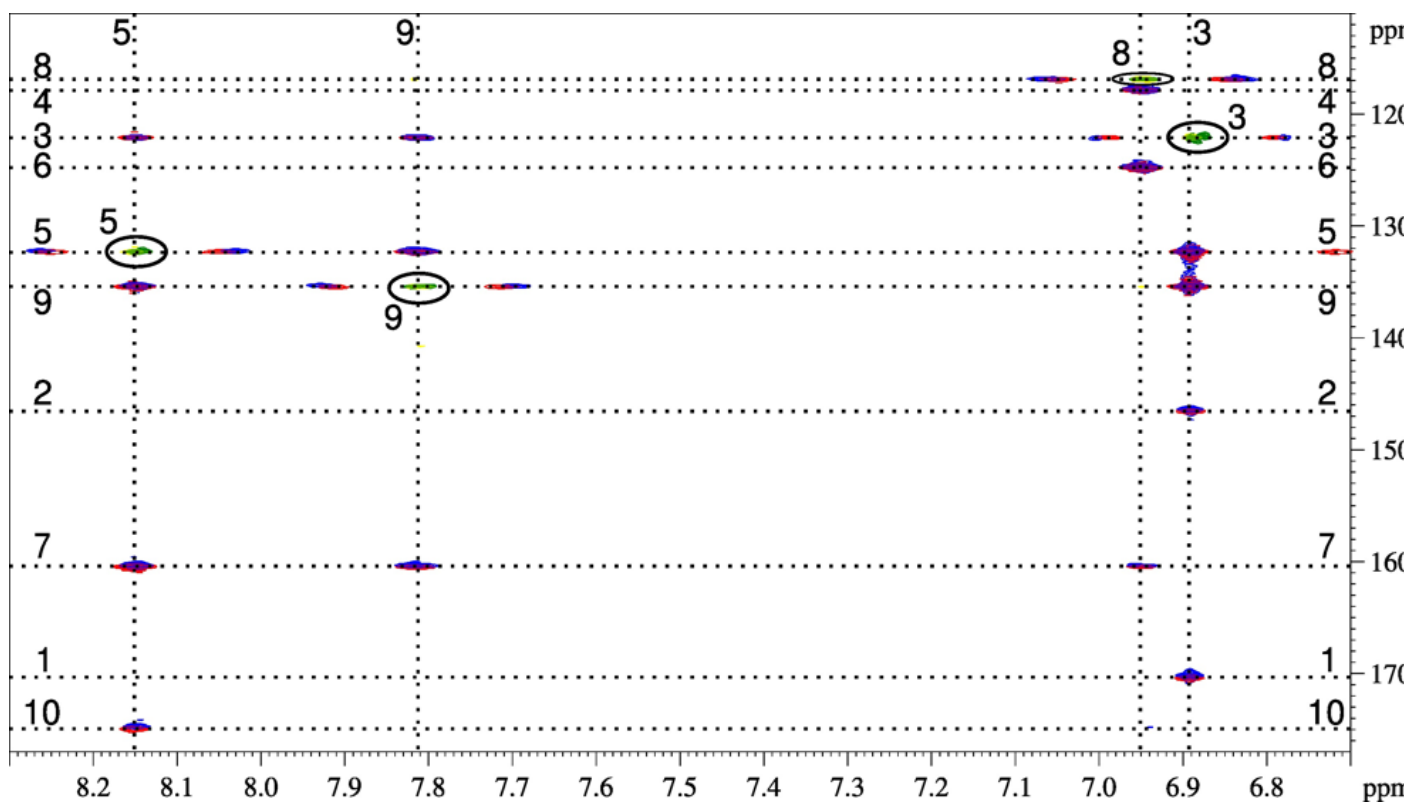


Рисунок 3.4.6. Сравнение ароматической области спектров 2D природного *CompX* и синтетического *CompX*. Нумерация атомов углерода и соответствующих протонов согласно рис. 3.4.3b и таблице 3.4.2. Спектры HSQC природного *CompX* (желтый); HSQC синтетического *CompX* (зеленый); HMBSC природного *CompX* (красный); HMBSC синтетического *CompX* (синий).



### Установление структуры AsLn2.

В масс-спектрах высокого разрешения очищенного природного AsLn2 наблюдался молекулярный ион с  $m/z$  530.21296, соответствующий элементному составу  $C_{26}H_{32}N_3O_9^+$ , (расчетное  $m/z$  530.21385).

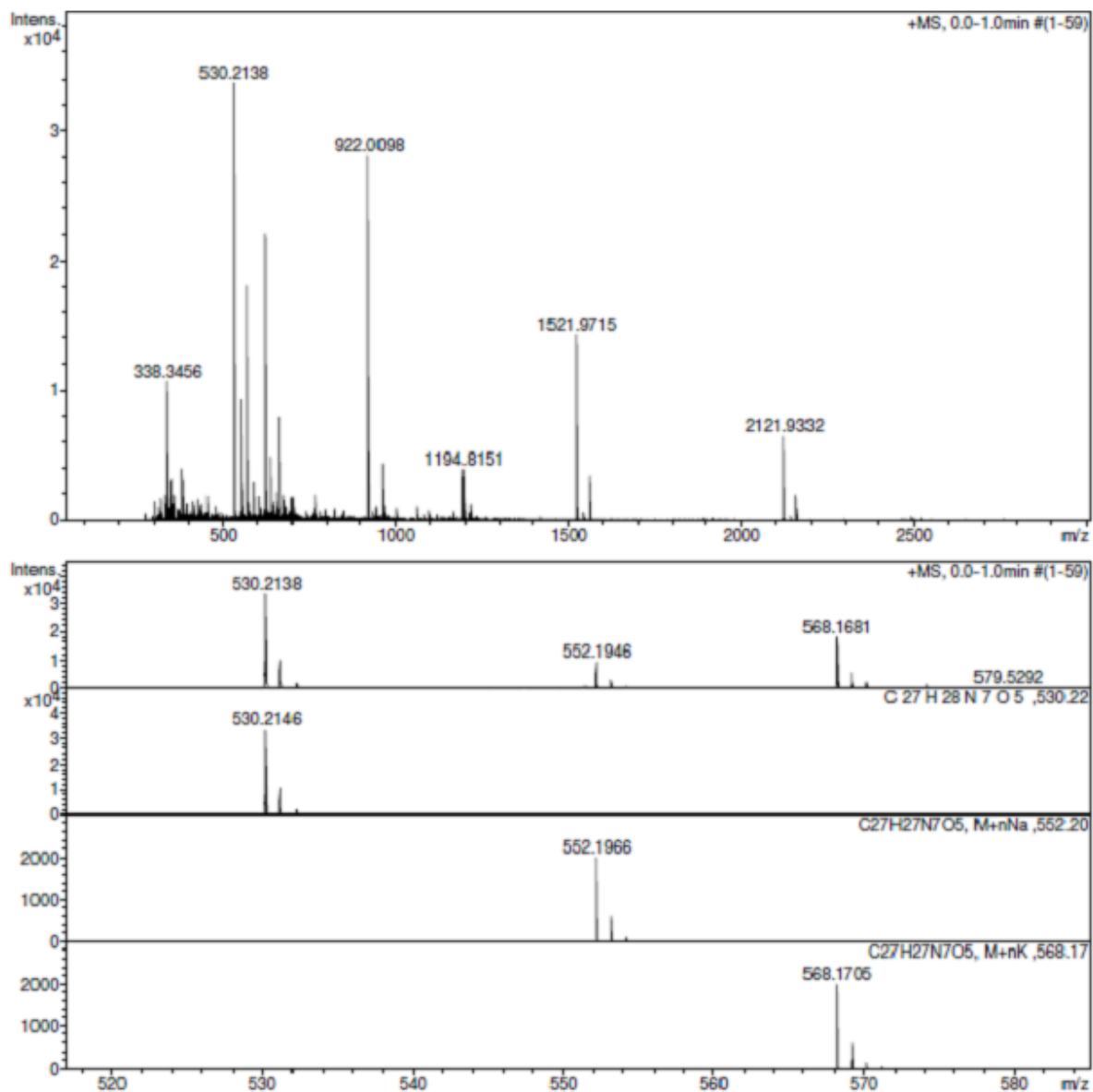


Рисунок 3.4.7. Спектр HRMS природного AsLn2 в режиме детекции положительных ионов.

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  $^1H$  ЯМР спектра (рис. 3.4.8.) выявил наличие в структуре соединения AsLn2 алифатической цепи, состоящей из пяти звеньев ( $CH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2$ ), спиновой системы AMX, двух ароматических дублетов (2 протона

каждый) и пяти сигналов, сходных с сигналами CompX (рис. 3.4.10a). Данные химических сдвигов протонного и углеродного спектров природного AsLn2 (рис. 3.4.8, 3.4.9) в сочетании с данными корреляционного 2D НМВС спектра (рис. 3.4.10b) позволили установить, что пятичленная алифатическая цепь является фрагментом лизина, в то время как спиновая система АМХ и ароматические дублеты принадлежат остатку тирозина (таблица 3.4.3). В двумерном спектре НМВС  $^{15}\text{N}$  -  $^1\text{H}$  наблюдались лишь два кросс-пика между протонами в положении СЗ'' и атомом азота тирозинового фрагмента (химический сдвиг 121.24, таблица 3.4.3). Химический сдвиг сигнала  $^{15}\text{N}$  однозначно свидетельствует о вовлеченности атома азота тирозина в пептидную связь. Атомы азота лизинового фрагмента в спектре не наблюдались в силу низкой чувствительности  $^{15}\text{N}$ -ЯМР спектроскопии. Химические сдвиги видимых в спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  сигналов пяти протонов (рис. 3.4.8, 3.4.9; таблица 3.4.3) и десяти углеродов, 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. 3.4.10b). Мы предположили, что конфигурация двойной связи в молекуле AsLn2 аналогична конфигурации CompX по ряду причин. Во-первых, химический сдвиг винильного протона НЗ' составляет 6,74 м.д. (таблица 3.4.3), тогда как химический сдвиг сигнала протона в *цис*-конфигурации находился бы в более сильнополюсной области спектра (~ 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-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибенамидо)гексановой кислоты (3.4.2).

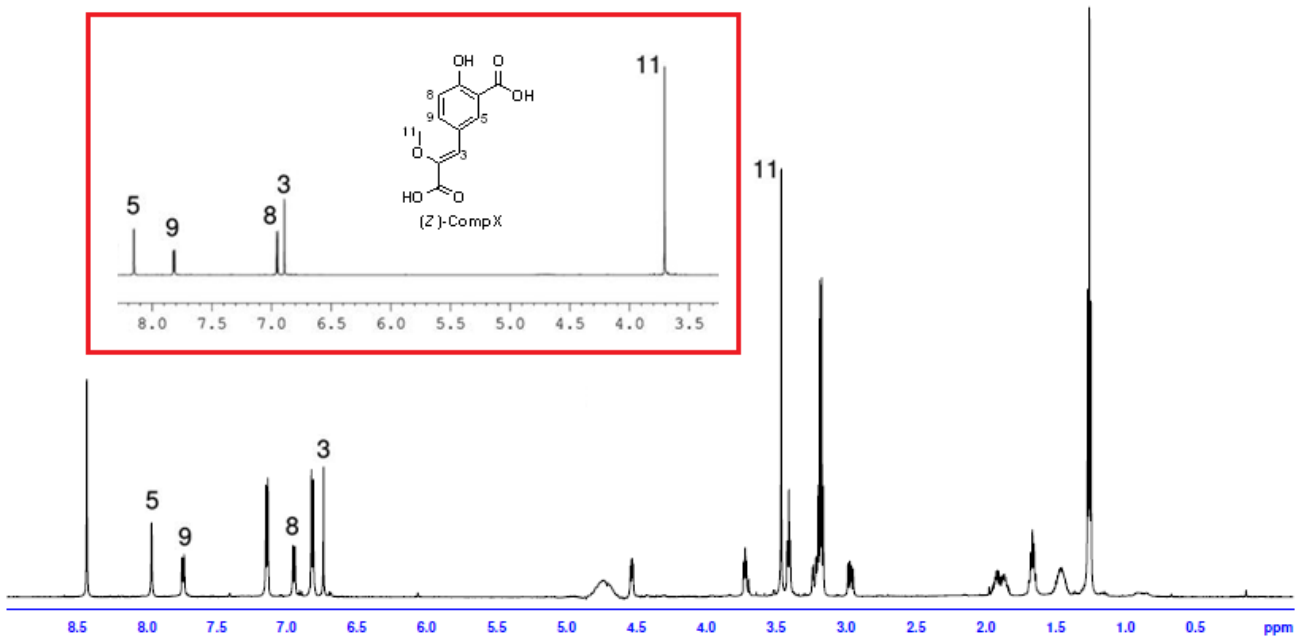


Рисунок 3.4.8.  $^1\text{H}$  ЯМР спектр природного AsLn2 в  $\text{D}_2\text{O}$  при pH 7.0 и 30°C.

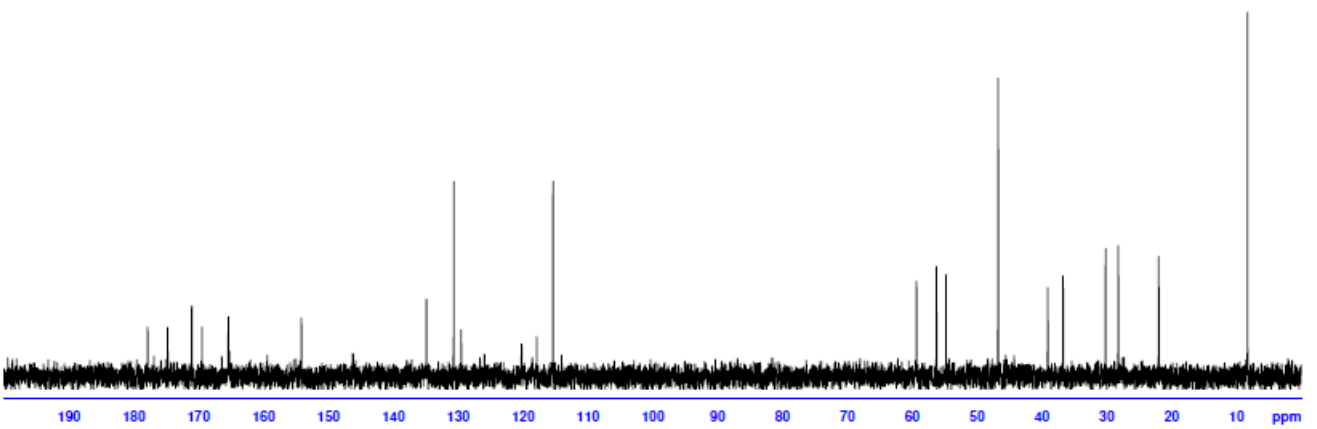


Рисунок 3.4.9.  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр природного AsLn2 в  $\text{D}_2\text{O}$  при pH 7.0 и 30°C.

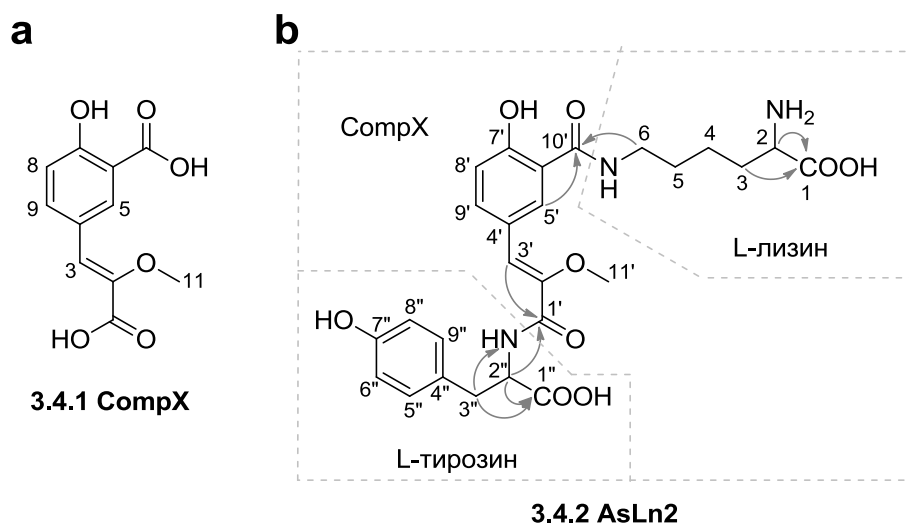


Рисунок 3.4.10. Сравнение структур CompX (a) и AsLn2 (b) с нумерацией атомов углерода согласно Таблице 2.3. В (b) Стрелки указывают важные корреляционные взаимодействия НМВС  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$ , на основании которых была установлена структура 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 3.4.2). 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 (рис. 3.4.11, 3.4.12), что позволило предположить идентичность порядка химических связей и относительной стереохимии двух молекул.

Таблица 3.4.3. Химические сдвиги  $^1\text{H}$  (600 МГц) и  $^{13}\text{C}$  (150 МГц) и мультиплетности сигналов протонов природного AsLn2 в  $\text{D}_2\text{O}$  при pH 7.0 и 30 °C.

Фрагмент и № атома углерода		$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
Лизин	1	-	174.70
	2	3.724 дд (5.6, 6.8 Гц)	54.77
	3	1.928 м, 1.875 м	30.19
	4	1.463 м	22.02
	5	1.666 квинт (7.2 Гц)	28.21
	6	3.411 т (7.0 Гц)	39.09
СомрХ	1'	-	165.40
	2'	-	146.09
	3'	6.744 с	120.19
	4'	-	117.81
	5'	7.970 д (1.7 Гц)	130.66
	6'	-	123.41
	7'	-	<sup>a</sup>
	8'	6.951 д (8.7 Гц)	118.54
	9'	7.743 дд (1.7, 8.7 Гц)	134.77
	10'	-	169.41
	11'	3.467 с	59.27
Тирозин	1''	-	177.79
	NH	<sup>a</sup>	<sup>15</sup> N: 121.24
	2''	4.533 дд (5.1, 8.2 Гц)	56.24
	3''	3.228 дд (5.1, 14.1 Гц) 2.973 дд (8.2, 14.1 Гц)	36.72
	4''	-	129.49
	5'', 9''	7.144 д (8.4 Гц)	130.59
	6'', 8''	6.824 д (8.4 Гц)	115.30
	7''	-	154.12

<sup>a</sup> Не наблюдается

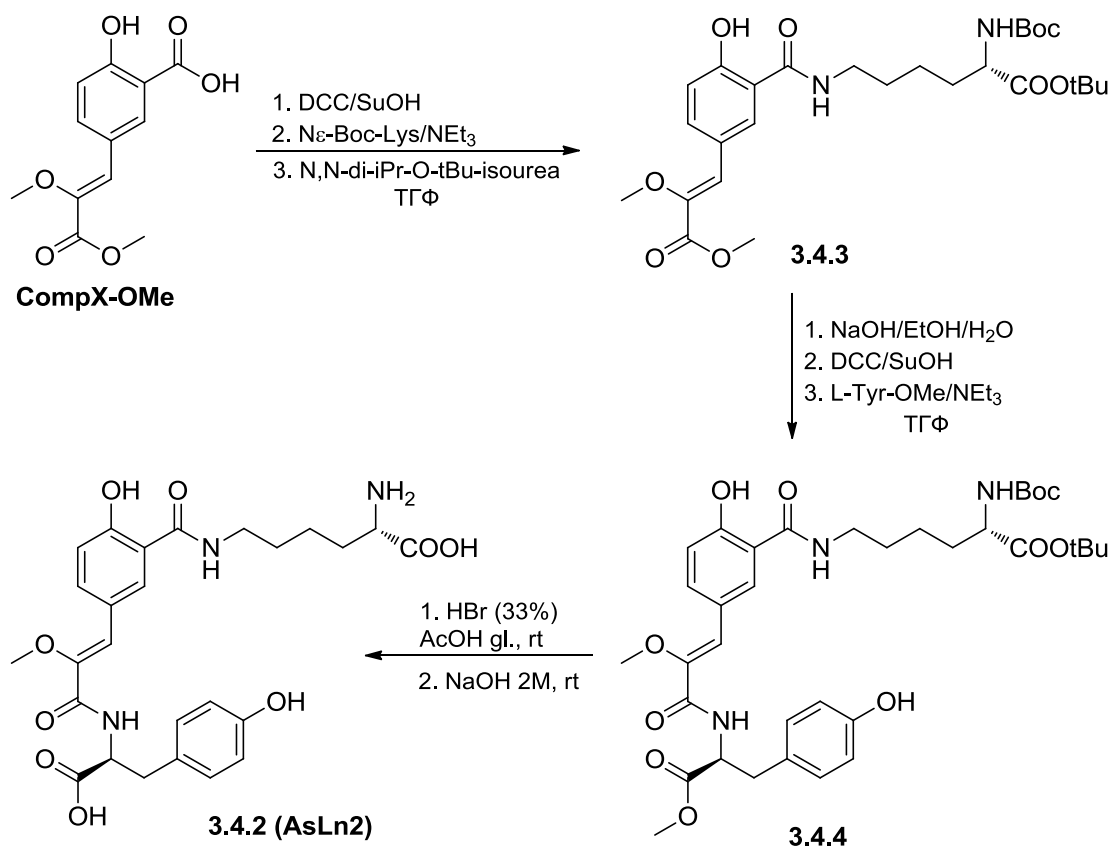


Схема 3.4.2. Синтез соединения AsLn2.

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-оксипроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота.

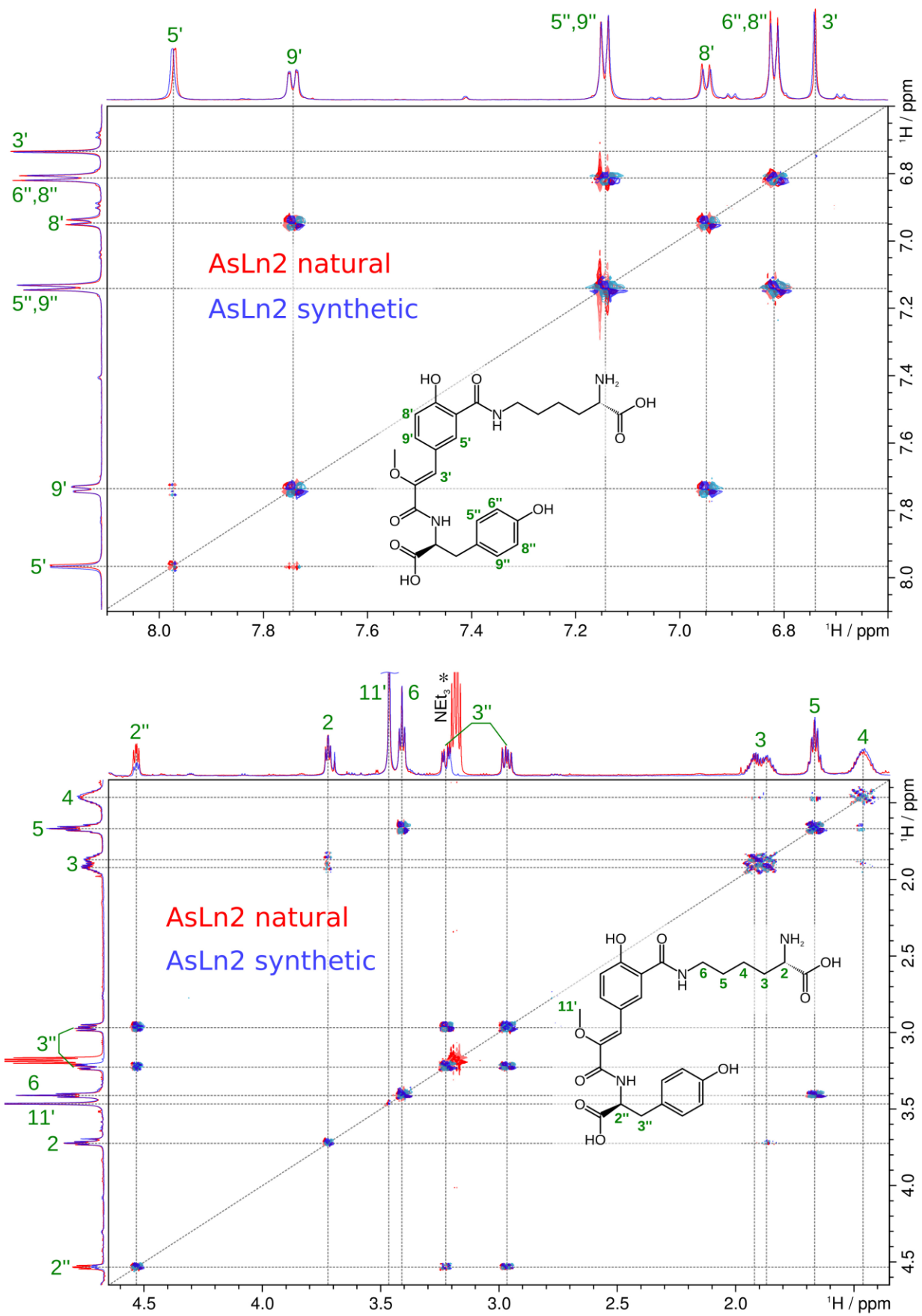


Рисунок 3.4.11. Сравнение ароматической (верх) и алифатической (низ) областей спектров 2D COSY природного (красный) и синтетического (синий) AsLn2 ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C, pH 7.0).

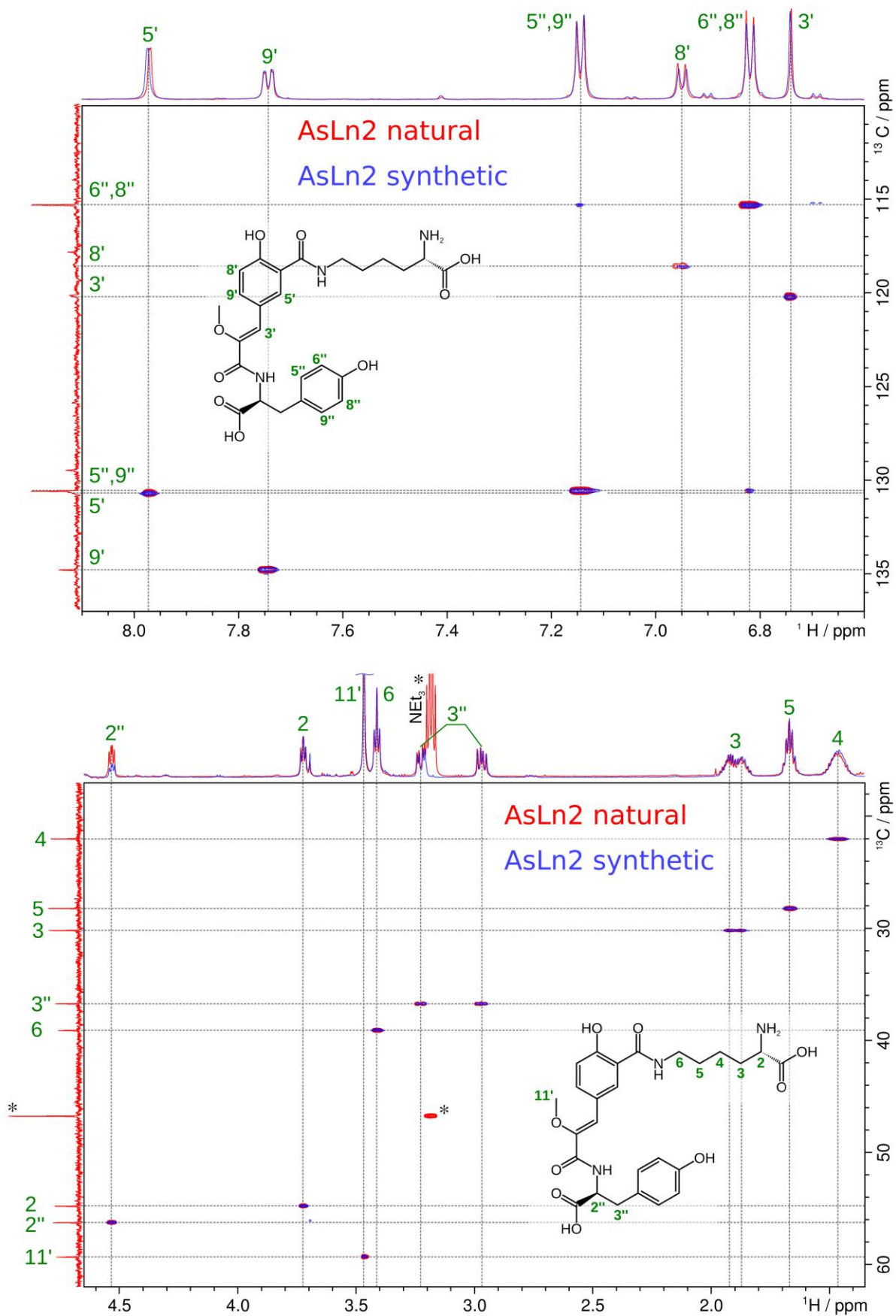


Рисунок 3.4.12. Сравнение ароматической (верх) и алифатической (низ) областей спектров 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC природного (красный) и синтетического (синий) AsLn2 ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C, pH 7.0).



### **Заключение**

Предварительные эксперименты ЯМР с люциферинном *Fridericia heliota* выявили, что замещенный ComrX является структурным компонентом люциферина (см. следующую главу). Однако ни ComrX, ни AsLn2 не проявляют способности к биолюминесценции. Эти факты позволили предположить, что эти соединения могут являться неактивными аналогами люциферина – его предшественниками или продуктами деградации.

### 3.5. Люциферин *Fridericia heliota*

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Валентином Петушковым, Александрой Царьковой, Зинаидой Осиповой, Максимом Дубинным и коллегами, а также диссертационных работ Александры Царьковой и Зинаиды Осиповой под руководством автора.

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. 3.5.1, 3.4.13).

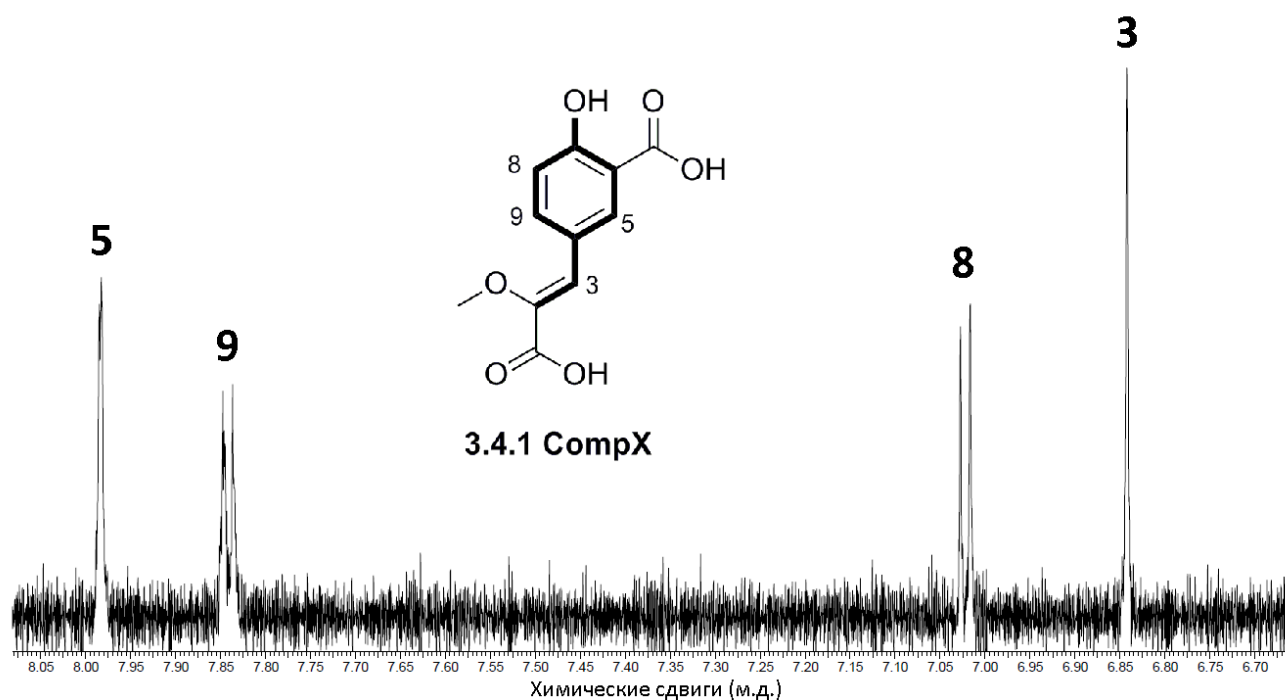


Рисунок 3.5.1. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ароматическая область) природного люциферина *F. heliota* в  $\text{D}_2\text{O}$ . Структура предполагаемого фрагмента люциферина *Fridericia heliota* (жирн.) согласно предварительным данным спектров ЯМР  $^1\text{H}$ .

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  $^1\text{H}$ , COSY и частичный  $^{13}\text{C}$ -HSQC ЯМР (рис. 3.5.3-3.5.4). На основании полученных данных были предложены три фрагмента структуры люциферина: остаток CompX,

а также остатки лизина и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) (рис.3.5.2). Малое количество люциферина не позволило нам получить спектры 1D  $^{13}\text{C}$  и НМВС, которые могли бы раскрыть сочленение этих фрагментов в молекуле и указать на наличие негидрогенизированных атомов углерода.

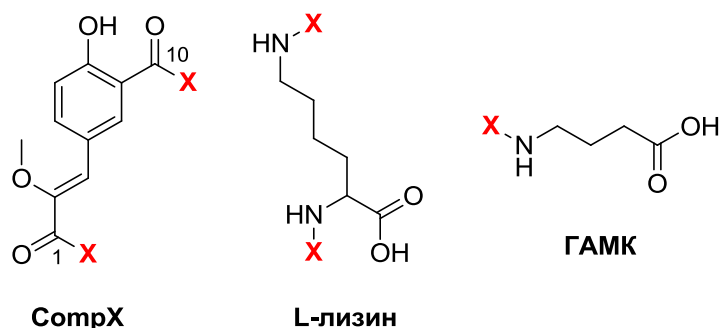


Рисунок 3.5.2. Фрагменты люциферина *F. heliota* согласно данным  $^1\text{H}$ , COSY и частичных  $^{13}\text{C}$ -HSQC ЯМР спектров.

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  $^1\text{H}$  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. 3.5.5).

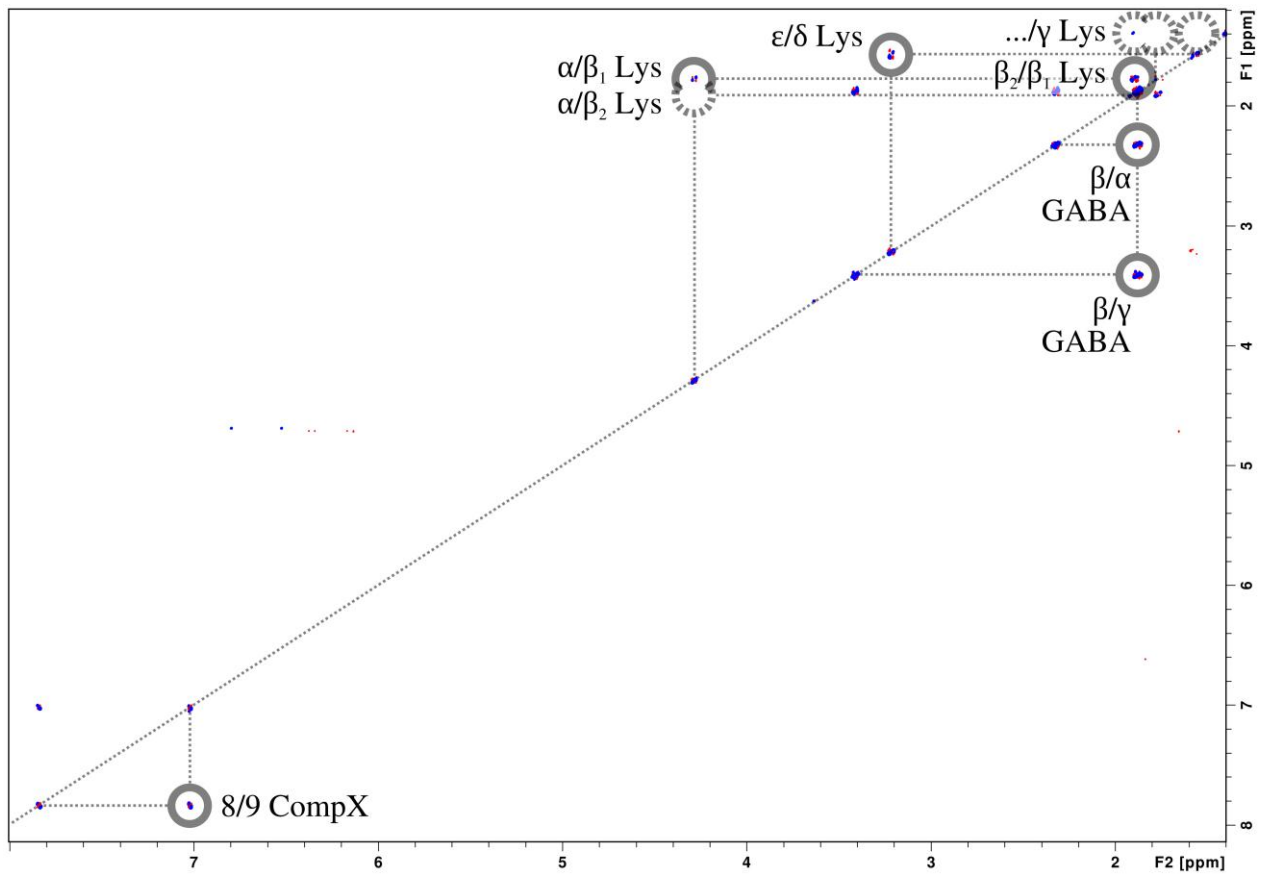


Рисунок 3.5.3. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY люциферина ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , pH 5.0). Кросс-пики выделены серым. Некоторые ожидаемые сигналы не видны в COSY спектре (выделены пунктирной линией), а именно 5-9 CompX,  $\beta$ - $\gamma$  и  $\gamma$ - $\delta$  лизина.

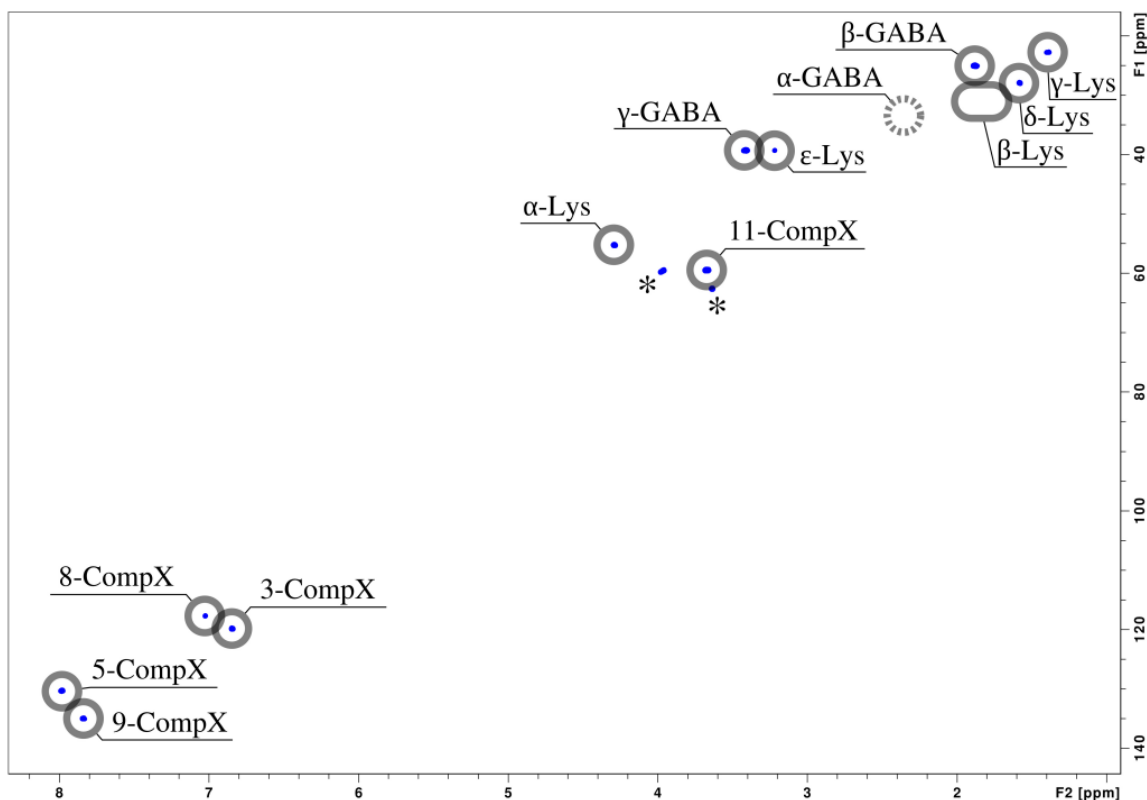


Рисунок 3.5.4. Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$ -HSQC люциферина ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , pH 5.0). Кросс-пики выделены серым. Один ожидаемый кросс-пик не наблюдается в спектре HSQC, а именно  $\alpha$ -ГАМК (см. таблицу 3.5.1), два слабых сигнала  $\beta$ -протонов лизина также не наблюдаются.

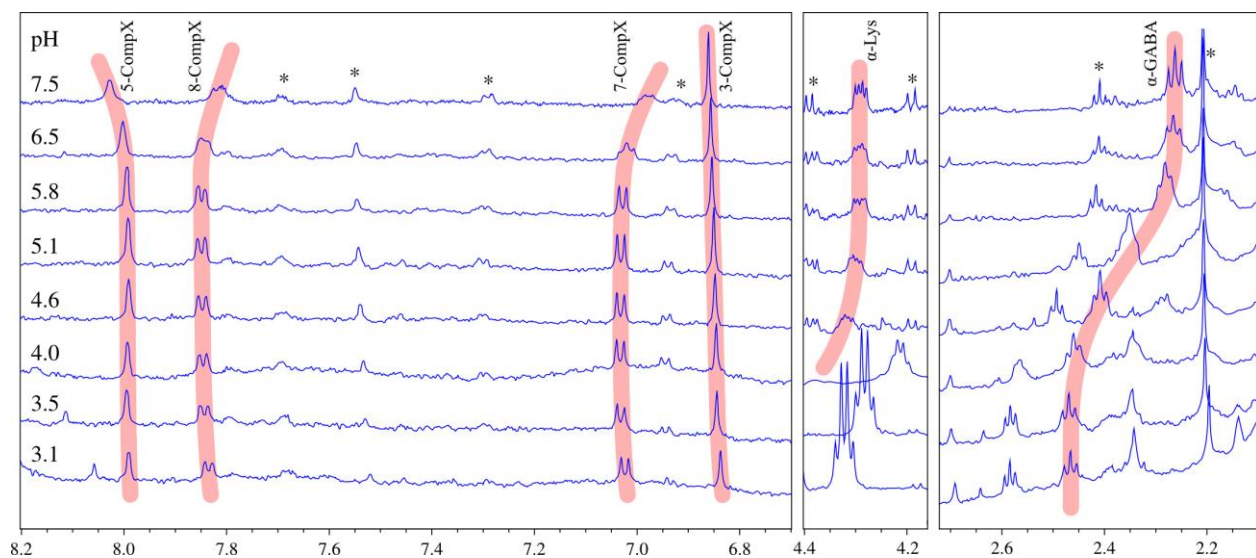
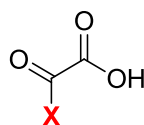


Рисунок 3.5.5. спектры ЯМР  $^1\text{H}$  люциферина *Fridericia* ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ) при различных значениях pH. Пики протонов люциферина обозначены кривыми (розовый), примеси обозначены звездочками. Изменения хим. сдвигов фрагмента CompX при pH 6.5 и 7.5 объясняются титрованием 7-ОН протонов CompX, свободные карбоксильные группы  $\alpha$ -Lys и  $\alpha$ -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  $C_{23}H_{30}N_3O_{11}^+$ . Разницей между этой формулой и суммой (CompX + лизин + ГАМК -  $2H_2O$ ) является фрагмент  $C_2O_3H$ . 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 (рис. 3.5.7). На основе всех вышеперечисленных данных мы предположили наличие монозамещенного остатка щавелевой кислоты как недостающего фрагмента люциферина (рис. 3.5.6).



оксалат

Рисунок 3.5.6. Оксалат – недостающий фрагмент люциферина, невидимый в спектрах ЯМР.

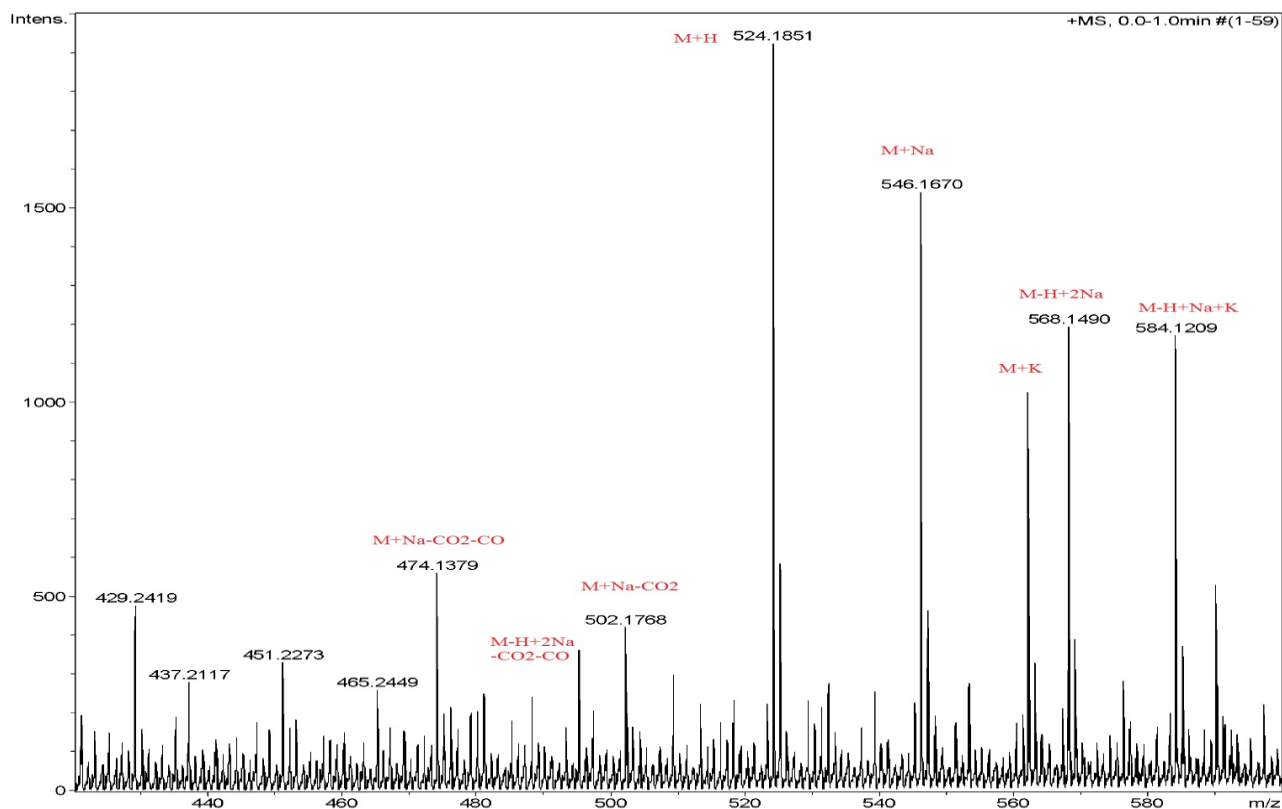


Рисунок 3.5.7. Масс-спектр высокого разрешения люциферина *Fridericia*.

Четыре изомерных структуры **3.5.1-3.5.4** (рис. 3.5.8) 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.

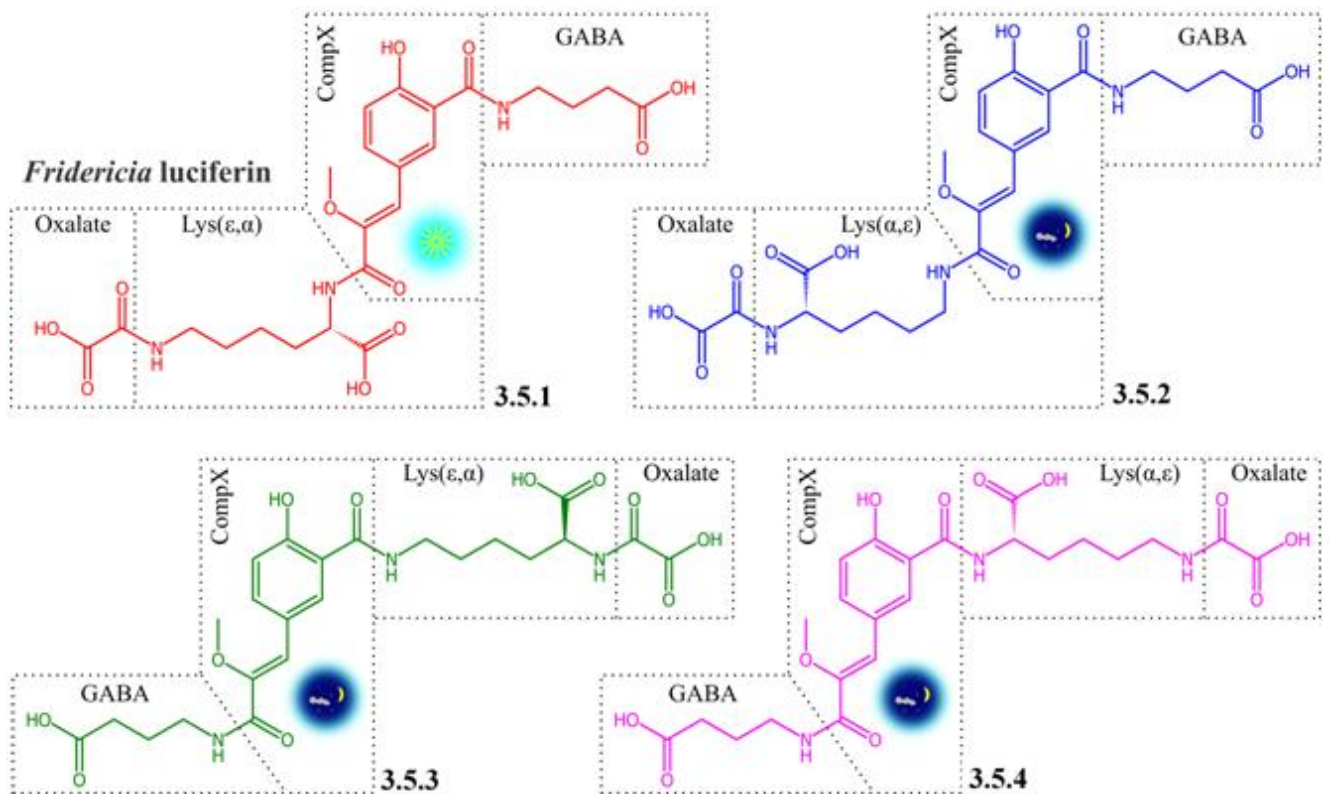


Рисунок 3.5.8. Четыре синтетических изомерных пептида **3.5.1-3.5.4**. Только соединение **3.5.1** испускает свет при смешении с люциферазой *Fridericia*.

Нами были синтезированы все четыре изомерных пептида **3.5.1-3.5.4**, спектры ЯМР которых сравнили со спектрами природного люциферина. Синтез начинали с метилового эфира CompX (схемы 3.5.1-3.5.5). Все полученные соединения обладали сходными спектральными характеристиками ЯМР в D<sub>2</sub>O при pH 5.0. Однако только для соединения **3.5.1** наблюдались химические сдвиги <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C, полностью соответствующие химическим сдвигам природного люциферина (рис. 3.5.9, 3.5.10; таблица 3.5.1).

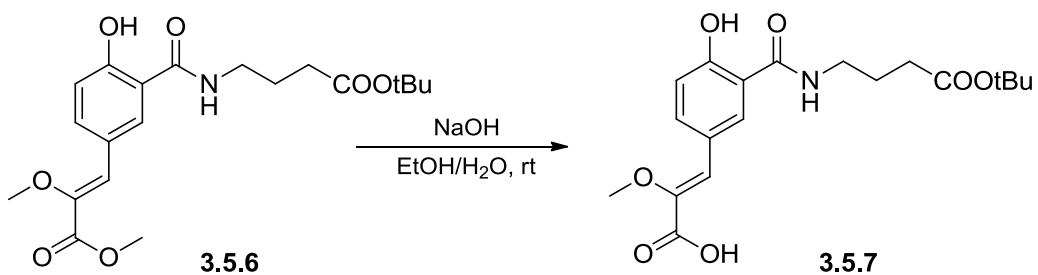
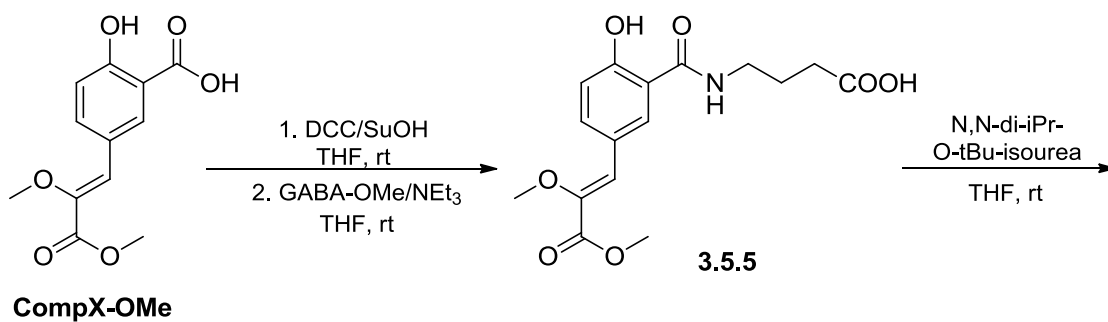


Схема 3.5.1. Синтез дипептида CompX-ГАМК - общего предшественника люциферинов **3.5.1** и **3.5.2**

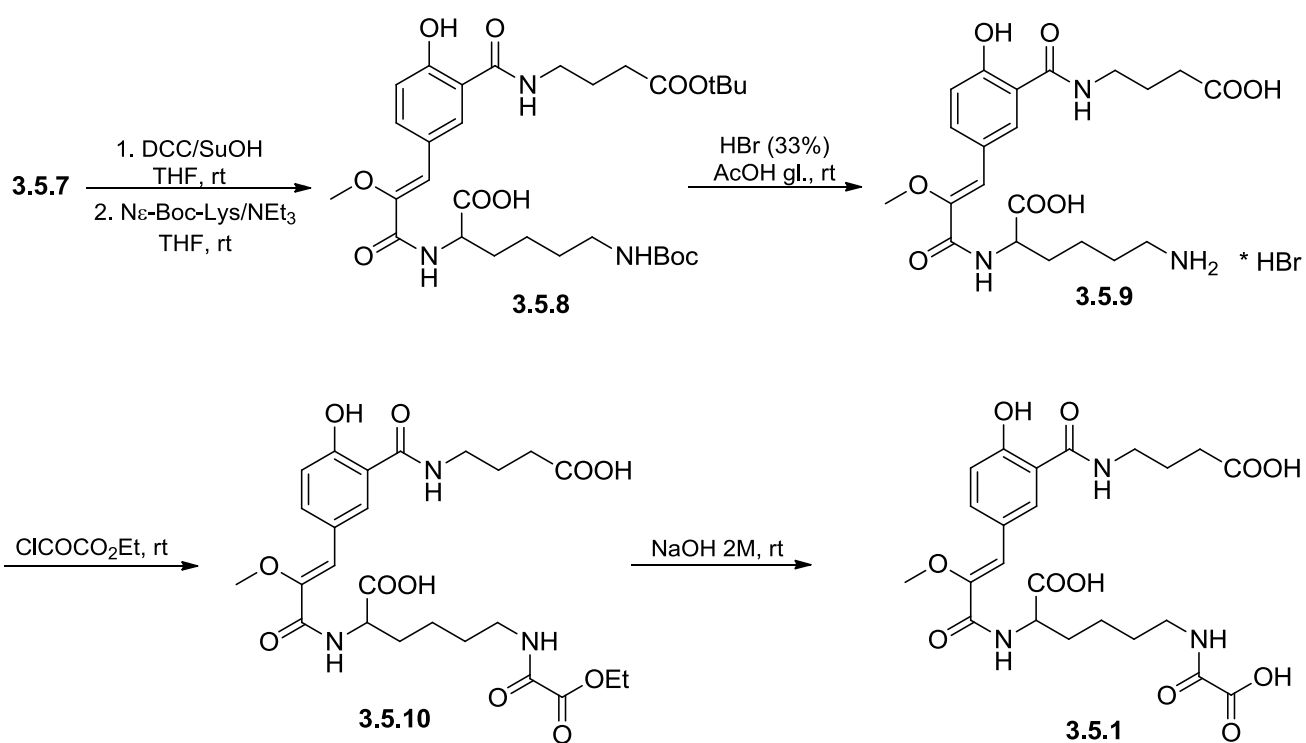


Схема 3.5.2. Синтез люциферина **3.5.1**.



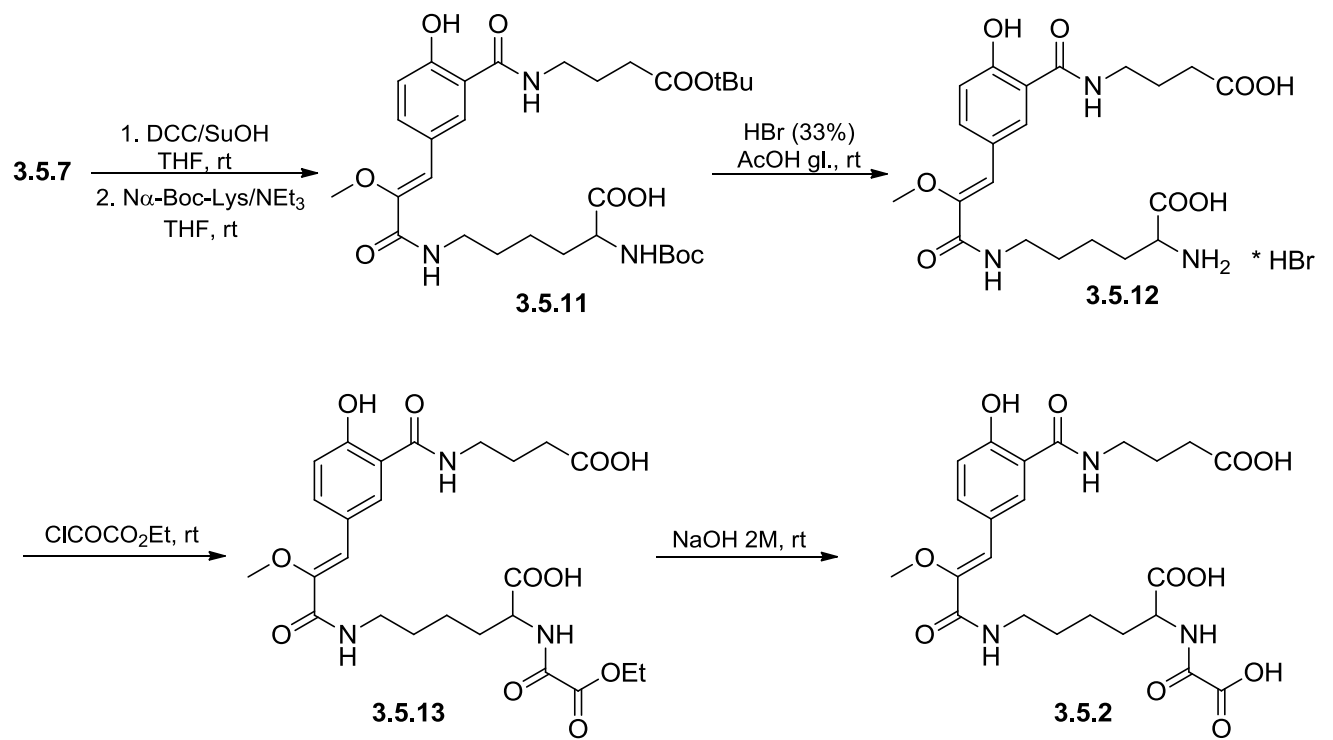


Схема 3.5.3. Синтез аналога люциферина 3.5.2.

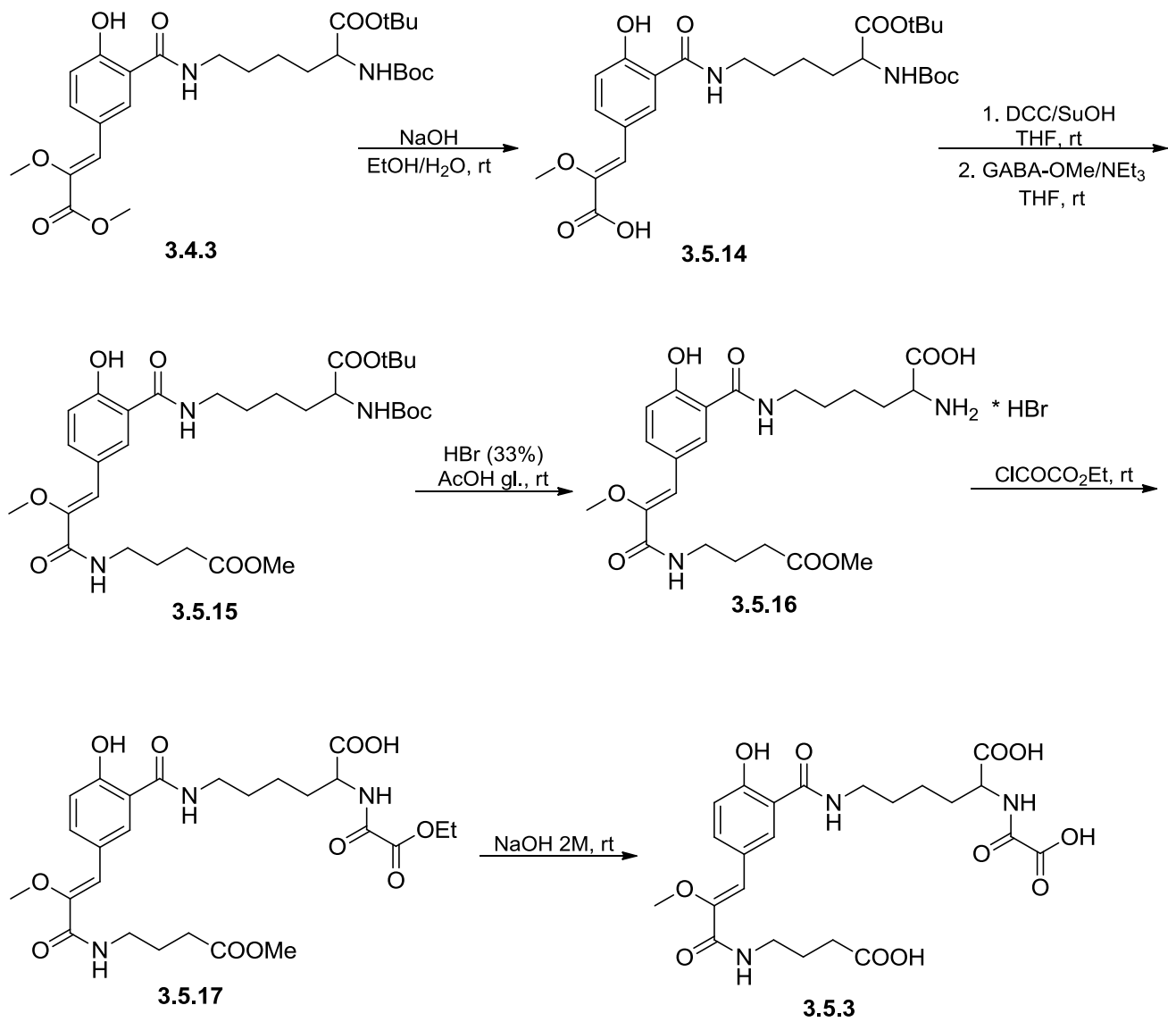


Схема 3.5.4. Синтез аналога люциферина **3.5.3**.

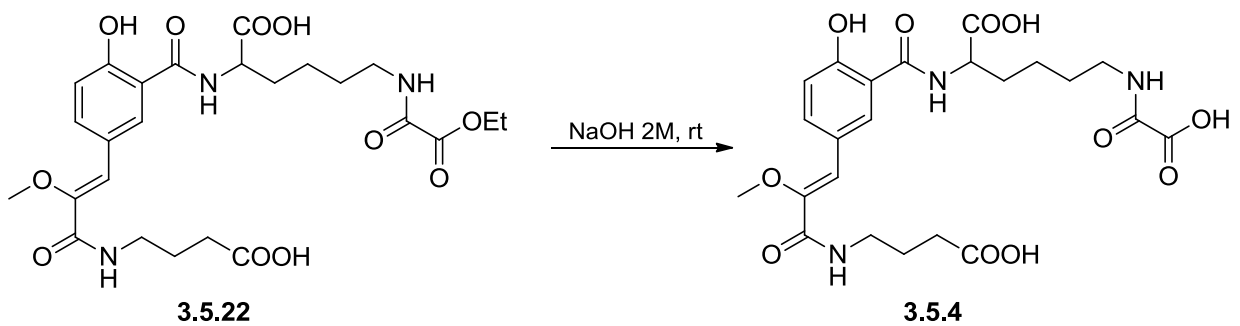
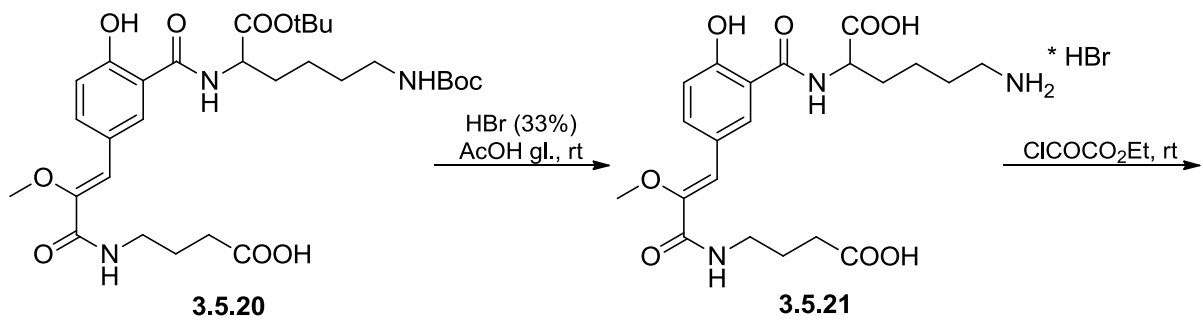
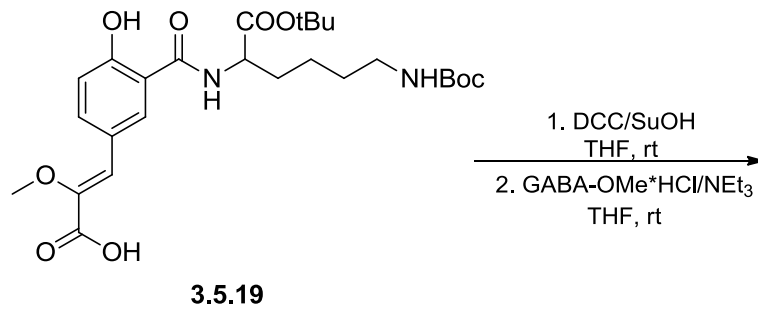
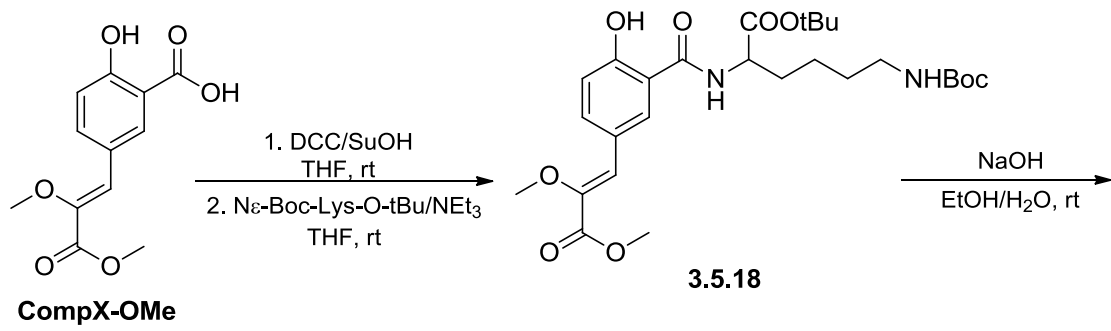


Схема 3.5.5. Синтез аналога люциферина **3.5.4**.

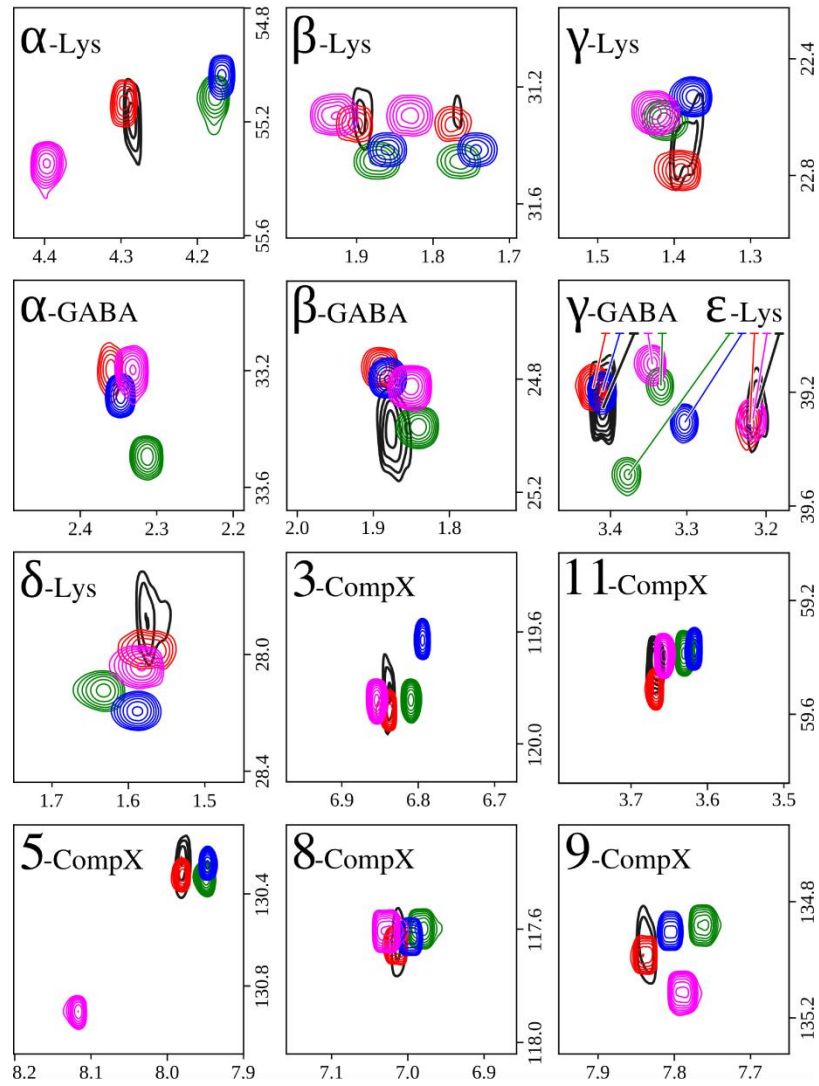


Рисунок 3.5.9. Сравнение избранных фрагментов спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$ -HSQC природного люциферина червя *F. heliota* и соединений **3.5.1-3.5.4** ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , pH 5.0). Цвета пиков синтетических соединений совпадают с цветами структур на рис. 3.5.8, пики природного люциферина отображены черным.

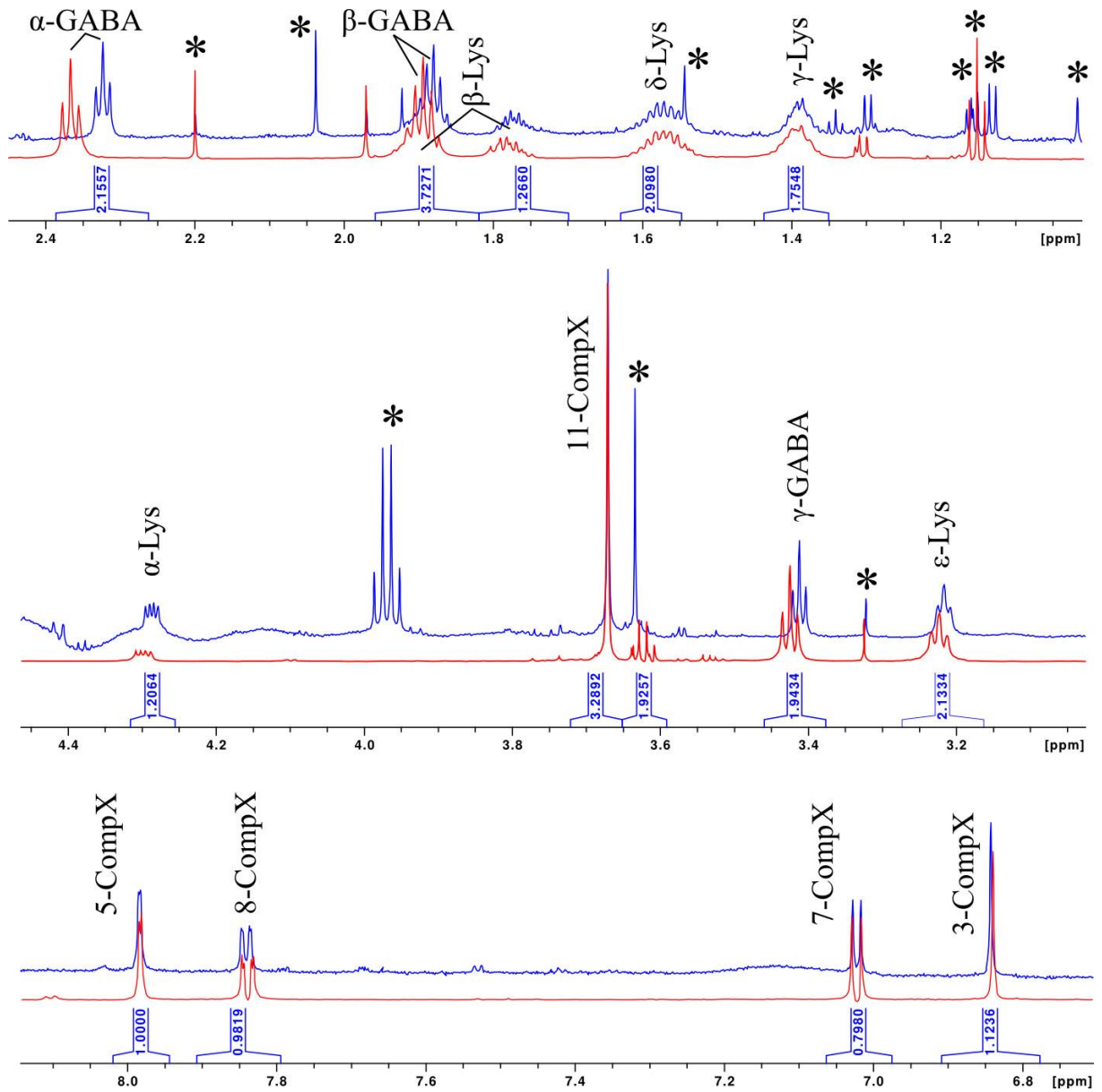


Рисунок 3.5.10. Совпадение химических сдвигов протонов в ЯМР  $^1\text{H}$  спектрах природного (синий) и синтетического (красный) люциферин в  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$  при pH 5.0. Примеси отмечены звездочками.

Таблица 3.5.1. Химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}$  5,0) природного люциферина *Fridericia* и соединений 3.5.1-3.5.4

Фрагмент и № атома углерода		Люциферин <i>Fridericia</i>		3.5.1		3.5.2		3.5.3		3.5.4	
		$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
ГАМК	CO		-		180.50		180.64		180.85		180.48
	$\alpha$	2.324	-	2.361	33.19	2.350	33.28	2.312	33.49	2.330	33.20
	$\beta$	1.879	24.93	1.890	24.75	1.884	24.97	1.841	24.96	1.850	24.83
	$\gamma$	3.410	39.18	3.422	39.17	3.413	39.19	3.334	39.17	3.346	39.10
СompX	1		-		165.89		166.23		166.35		166.40
	2		146.97		146.97		147.11		146.96		147.00
	3	6.844	119.82	6.840	119.88	6.796	119.62	6.811	119.84	6.857	119.85
	4		-		117.54		117.51		117.79		117.76
	5	7.983	130.29	7.981	130.31	7.950	130.27	7.950	130.33	8.116	130.92
	6		-		124.94		124.93		124.85		124.98
	7		-		157.61		157.54		157.39		157.21
	8	7.022	117.58	7.022	117.65	7.006	117.64	6.992	117.60	7.070	117.61
	9	7.841	134.92	7.838	134.97	7.807	134.91	7.766	134.88	7.792	135.12
	10		-		169.57		169.52		169.20		168.28
	11	3.671	59.39	3.670	59.50	3.620	59.37	3.633	59.38	3.660	59.41
лизин	CO		-		175.80		178.52		178.55		178.90
	$\alpha$	4.288	55.13	4.297	55.12	4.171	55.03	4.176	55.10	4.399	55.35
	$\beta$	1.895 1.769	31.30	1.901 1.776	31.31	1.861 1.746	31.41	1.874 1.767	31.45	1.930 1.831	31.29
	$\gamma$	1.388	22.66	1.390	22.78	1.376	22.52	1.415	22.60	1.425	22.59
	$\delta$	1.566	27.83	1.572	27.97	1.587	28.19	1.631	28.12	1.587	28.04
	$\epsilon$	3.217	39.25	3.222	39.30	3.308	39.30	3.377	39.48	3.215	39.30
оксалаат	CO		-		-		164.29		164.33		165.08
	CO <sub>2</sub> H		-		-		170.82		170.82		170.77

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 MgSO<sub>4</sub>. 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. 3.5.11 А, В).

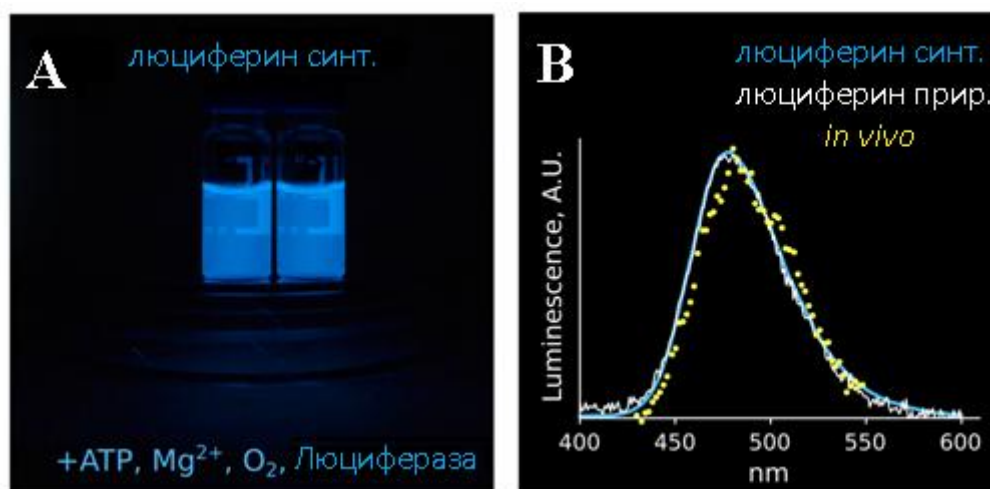


Рисунок 3.5.11. (А) Люминесценция синтетического люциферина *Fridericia*. (В) Сравнение спектров биолюминесценции червя *in vivo* и биолюминесценции природного и синтетического люциферинов *in vitro*.

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

### 3.6. Механизм действия люциферина *Fridericia*

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Валентином Петушковым, Александрой Царьковой, Зинаидой Осиповой, Максимом Дубинным и коллегами, а также диссертационных работ Александры Царьковой и Зинаиды Осиповой под руководством автора.

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 биолюминесценции *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 40г биомассы червя. Реакционная смесь испускала видимый свет, контроль за ходом реакции проводили с помощью ВЭЖХ-анализа аликвот (рис. 3.6.1), 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  $\lambda_{\text{abs}}$  310 нм).

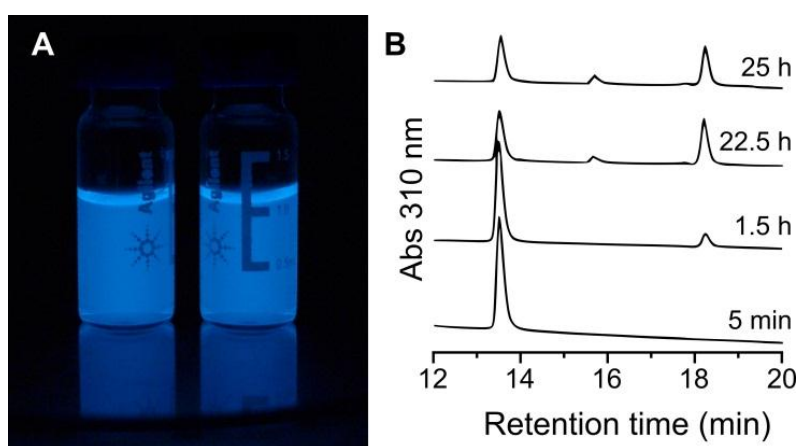


Рисунок 3.6.1. (а) Видимая люминесценция реакционной смеси. (б) Профили ВЭЖХ реакции биолюминесценции после 5 мин, 1.5 часов, 22.5 часов и 25 часов. Пики при 13.7 и 18.2 мин соответствуют люциферину и оксилюциферину.



Спектр ESI-HRMS оксильюциферина 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 оксильюциферина ( $^1H$ , COSY и HSQC) выявил исчезновение сигнала  $\alpha$ -H лизина, а также существенные изменения химических сдвигов и мультиплетностей сигналов протонов  $\beta$ - $CH_2$  лизина по сравнению с люциферинном (два мультиплета при 1.91 и 1.78 м.д. против триплета при 2,62 м.д.; рис. 3.6.2, 3.6.3 и табл.3.6.1). Более того, наблюдался слабый сдвиг сигнала протона CompX Н-3 (~ 0,2 м.д.), в то время как все остальные сигналы протонов оставались неподвижными. Все вышеперечисленные данные однозначно подтверждали, что оксильюциферин *F. heliota* образуется путем окислительного декарбоксилирования лизинового остатка, в отличие от нашей первоначальной гипотезы об участии карбоксильной группы фрагмента щавелевой кислоты в механизме биолюминесценции *F. heliota*.

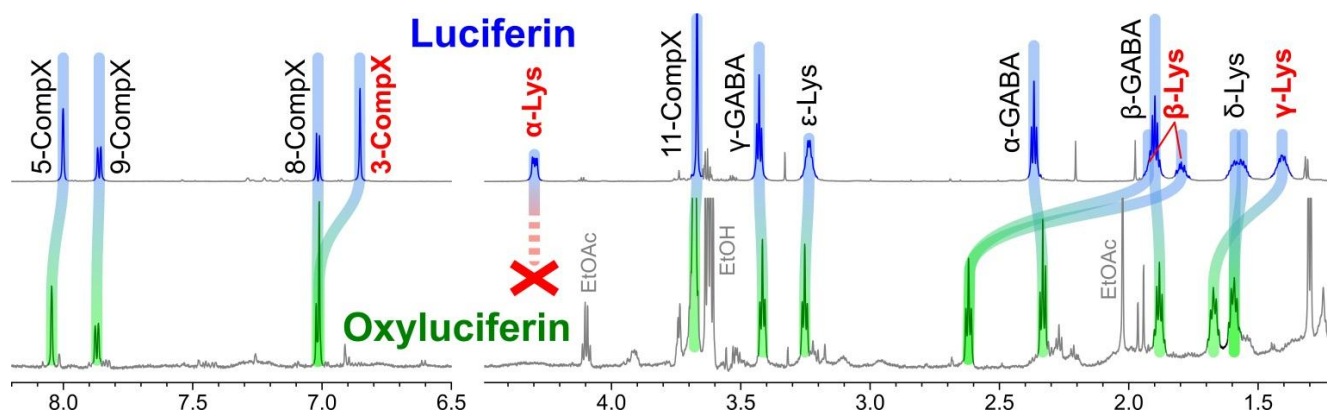


Рисунок 3.6.2. Сравнительный анализ спектров ЯМР  $^1H$  люциферина *Fridericia* (синий, 800 МГц) и оксильюциферина (зеленый, 700 МГц) в  $D_2O$  при pH 5.0. Исчезновение  $\alpha$ -H лизина и изменения химических сдвигов и мультиплетностей  $\beta$ - и  $\gamma$ - $CH_2$  протонов отмечены красным цветом. Соответствующие химические сдвиги обозначены сине-зелеными градиентными линиями. Примеси обозначены серым.

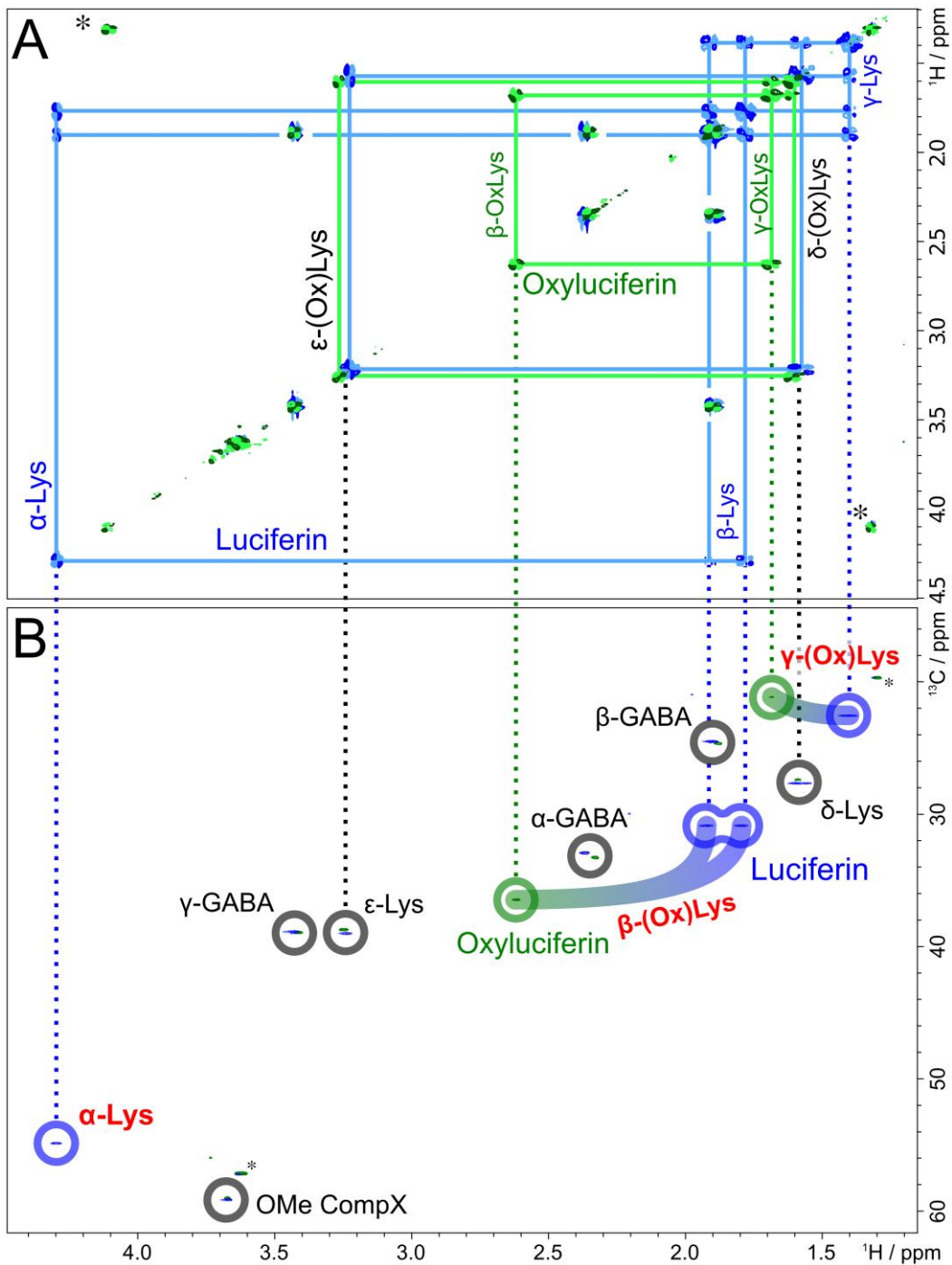


Рисунок 3.6.3. Сравнительный анализ спектров ЯМР 2D COSY (A) и 2D  $^{13}\text{C}$ -HSQC (B) люциферина (синий) и оксилуциферина *Fridericia* (зеленый). А. Корреляция кросс-пиков COSY фрагмента лизина люциферина и декарбоксилированного лизина (OxLys) оксилуциферина обозначены сплошными линиями. В. Отнесенные (Ox)Lys  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ - $\text{CH}_2$  группы отмечены красным цветом, соответствующие химические сдвиги обозначены сине-зелеными градиентными линиями и кругами. Сигналы, оставшиеся без изменений, обозначены серыми кругами.

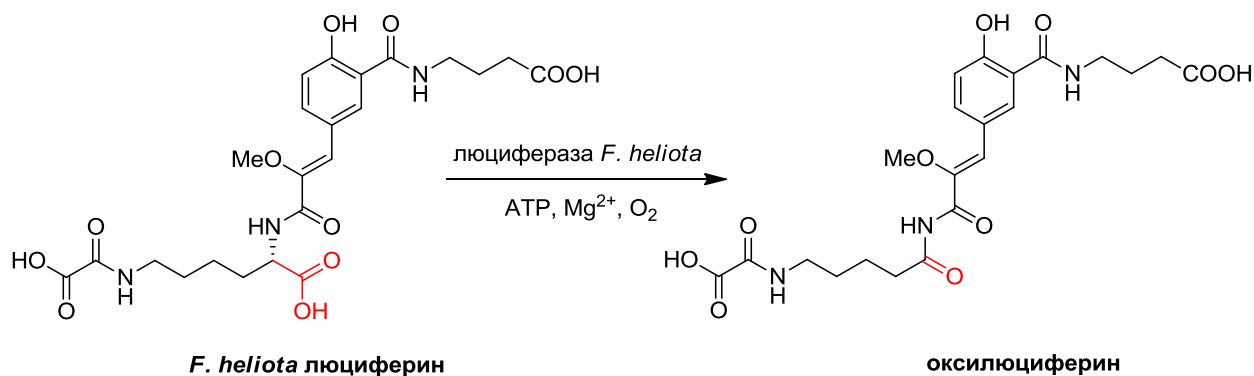


Схема 3.6.1. Реакция биолуминесценции *Fridericia heliota*. Структура оксилуциферина *F. heliota*.

Таблица 3.6.1. Химические сдвиги  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  и мультиплетности сигналов протонов люциферина и оксилуциферина *Fridericia* в  $\text{D}_2\text{O}$  при pH 5.0 и  $5^\circ\text{C}$ . Нумерация атомов согласно схеме 3.6.1.

№ атома углерода		Люциферин		Оксилуциферин	
		$\delta_{\text{H}}$ , мульт.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , мульт.	$\delta_{\text{C}}$
ГАМК	$\alpha$	2.35 т (7.6 Гц)	32.77	2.33 т (7.6 Гц)	33.15
	$\beta$	1.89 м	24.36	1.88 м	24.53
	$\gamma$	3.42 т (7.2 Гц)	38.71	3.42 т (6.9 Гц)	38.81
CompX	3	6.84 с	119.93	7.01 с	123.38
	5	7.99 д (1.8 Гц)	130.29	8.05 д (1.8 Гц)	130.88
	8	7.01 д (9.0 Гц)	117.20	7.02 д (9.0 Гц)	117.14
	9	7.85 дд (9.0, 1.8 Гц)	134.70	7.87 дд (9.0, 1.8 Гц)	134.93
	11	3.66 с	58.98	3.67 с	58.90
Lys/OxLys	$\alpha$	4.29 дд (4.4, 9.5 Гц)	54.73	—	—
	$\beta$	1.91 м 1.78 м	30.71	2.62 т (7.2 Гц)	36.34
	$\gamma$	1.39 м	22.40	1.67 м	21.02
	$\delta$	1.56 м 1.59 м	27.52	1.59 м	27.28
	$\epsilon$	3.23 т (7.0 Гц)	38.86	3.25 т (6.8 Гц)	38.60

Механизм реакции биолуминесценции червей *Fridericia*, вероятно, аналогичен хорошо изученному механизму биолуминесценции светлячков (схема 3.6.2). 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  $\text{CO}_2$  и оксилюциферина [Shimomura, 2006; Tsuji и др., 1977]. Однако, тогда как в механизме биолюминесценции светлячка вновь сформированная карбонильная группа становится частью сопряженной  $\pi$ -системы светоизлучающего фрагмента, в механизме *Fridericia*  $\pi$ -система люминофора (фрагмент CompX) остается неизменной в процессе окисления.

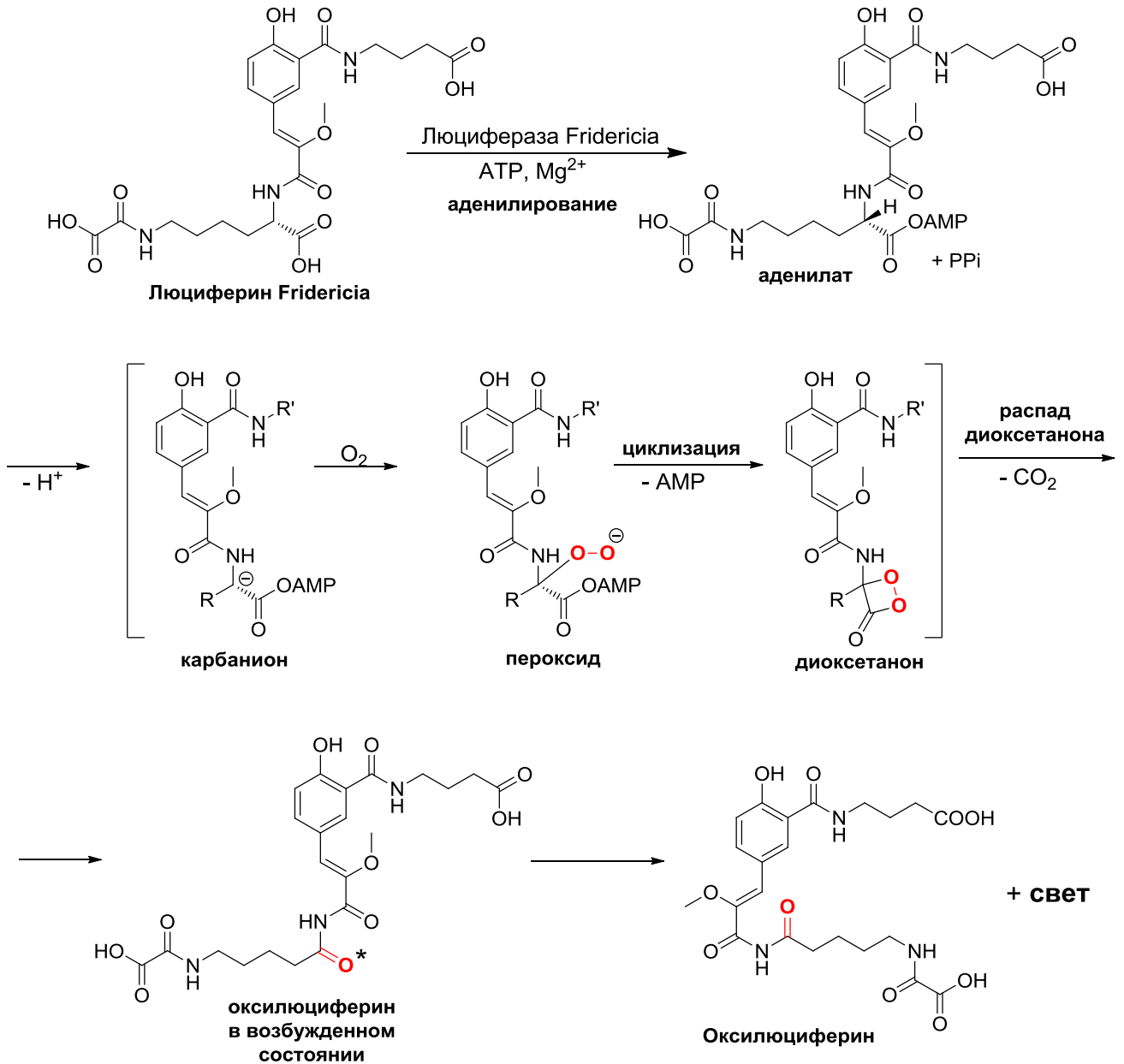


Схема 3.6.2. Предложенный механизм реакции биолюминесценции *Fridericia heliota*.

Роль фрагмента CompX в качестве люминофора подтверждается близким сходством спектров биолюминесценции и флуоресцентной эмиссии люциферина ( $\lambda_{\text{max}}$  466 и 480 нм соответственно), а также спектром флуоресценции оксилюциферина (рис. 3.6.4).

Оксилуциферин обладает крайне низким квантовым выходом флуоресценции в воде при pH 5.7 (QY 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].

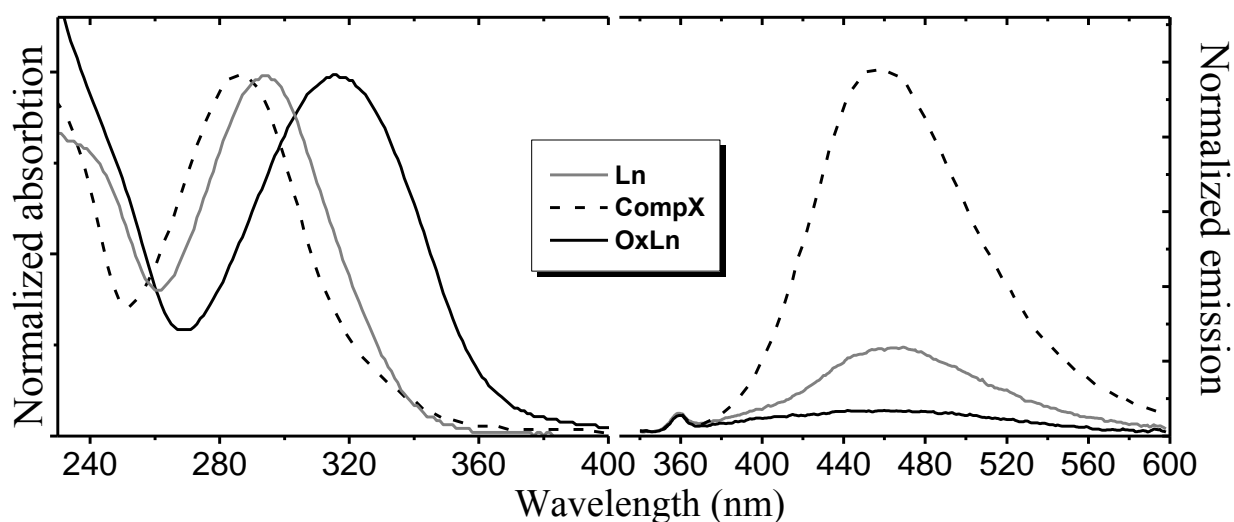


Рисунок 3.6.4. Спектры поглощения и флуоресцентной эмиссии CompX, люциферина и оксилуциферина *Fridericia* в воде при pH 5.7 (возбуждение при 320 нм).

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  $\alpha$ -H протона лизина, таким образом значительно снижая стабильность активированных производных люциферина (включая аденилат) по карбоксилу лизина. Этот вывод подтверждается наблюдаемой хемилюминесценцией при действии оснований на модельное соединение, содержащее *трет*-бутильный заместитель на карбокси-группе лизина (3.6.1, рис. 3.6.5).

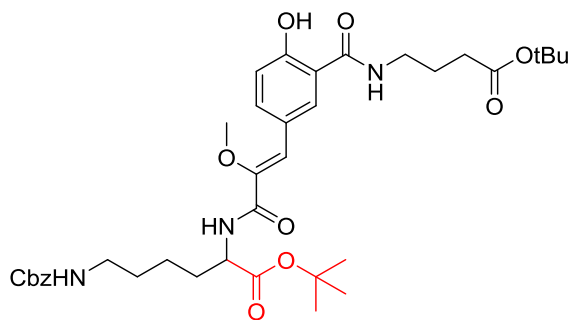


Рисунок 3.6.5. Структура **3.6.1** - модельного соединения аденилата люциферина *F. heliota*.

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  $\text{CompX}$  остается незатронутым и служит в качестве люминофора.

### 3.7. Новая пептидная химия у животных

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Валентином Петушковым, Александрой Царьковой, Зинаидой Осиповой, Максимом Дубинным и коллегами, а также диссертационных работ Александры Царьковой и Зинаиды Осиповой под руководством автора.

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 (рис. 3.7.1). Данная глава посвящена установлению структур четырех новых аналогов люциферин: AsLn5, AsLn7, AsLn11 и AsLn12, раскрывающих беспрецедентную химию пептидов, когда-либо найденных в наземных животных (рис. 3.7.1).

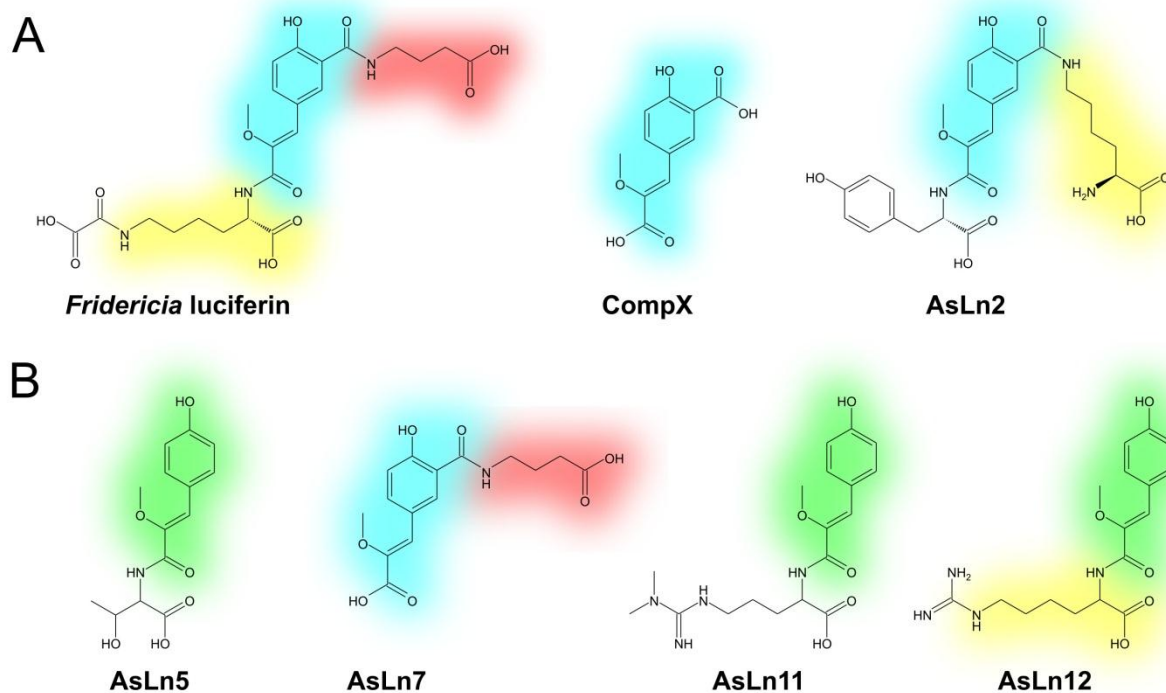


Рисунок 3.7.1. Структуры люциферина и его аналогов из червя *Fridericia heliota*: CompX, AsLn2, AsLn5, AsLn7, AsLn11 и AsLn12.

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. 3.7.1).

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. 3.7.2).

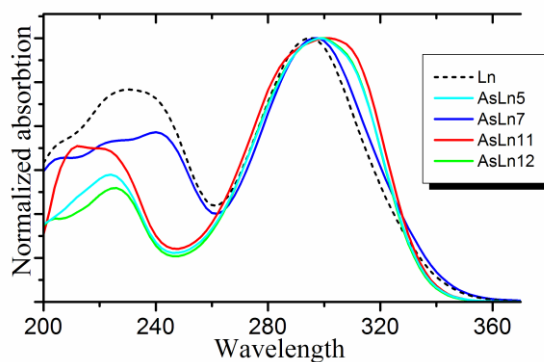


Рисунок 3.7.2. УФ-спектры поглощения AsLn5 (голубой), AsLn7 (синий), AsLn11 (красный) и AsLn12 (зеленый) в сравнении со спектром люциферина *Fridericia* (пунктирный черный) при pH 2.8 в воде.

#### 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  $m/z = 324.1078$ ) (рис. 3.7.3). Так как количество природного AsLn7 было низким ( $\sim 40$  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 (рис. 3.7.4А) 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 (рис. 3.7.4В).



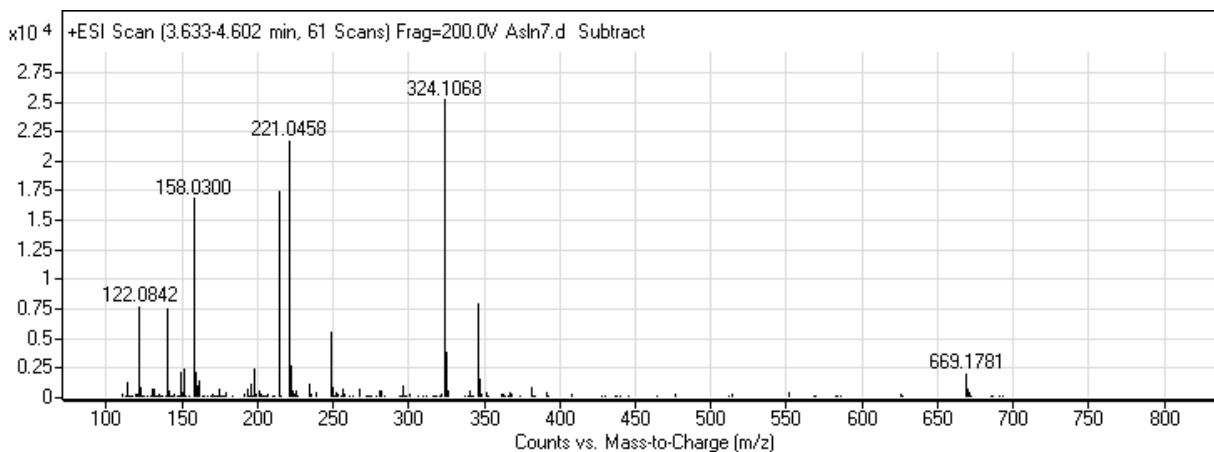


Рисунок 3.7.3. Спектр ESI-HRMS природного AsLn7.

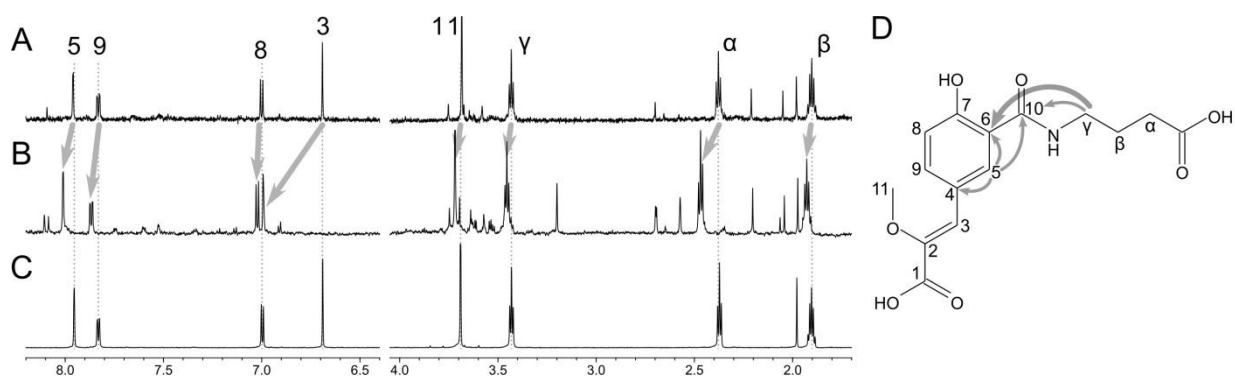


Рисунок 3.7.4. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  природного AsLn7 (A) в  $\text{D}_2\text{O}$  при pH 5.0, 30°C. (B) в  $\text{D}_2\text{O}$  при pH 3.0 (C) Спектр синтетического AsLn7 в  $\text{D}_2\text{O}$  при pH 5.0, 30°C. (D) Основные кросс-пики НМВС в синтетическом AsLn7.

Эксперимент ЯМР-титрования показал, что протон Н-3 обладает гораздо большей чувствительностью к изменениям pH, чем Н-5 ( $\Delta\text{м.д.}$  0.31 против 0.06 соответственно), что позволило предположить, что карбоксил С-1 свободен, в то время как карбоксильная группа С-10 вовлечена в образование пептидной связи с аминогруппой ГАМК. Для того чтобы проверить предполагаемую структуру AsLn7 и произвести полную характеристику этого вещества с помощью ЯМР, был предпринят синтез (схема 3.7.1). ЯМР-исследование синтетического образца ( $\text{D}_2\text{O}$ , pH 5.0) выявило полное совпадение его химических сдвигов и мультиплетностей с природным образцом, таким образом полностью подтверждая предложенное строение AsLn7 (рис. 3.7.5). Полные данные ЯМР синтетического AsLn7 приведены в таблице 3.7.1 и на рисунках 3.7.6 и 3.7.7, основные НМВС кросс-пики в синтетическом AsLn7 показаны на рис 3.7.4D.

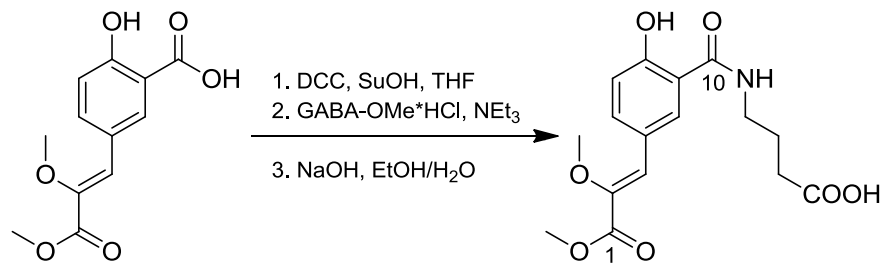


Схема 3.7.1. Синтез аналога люциферина AsLn7.

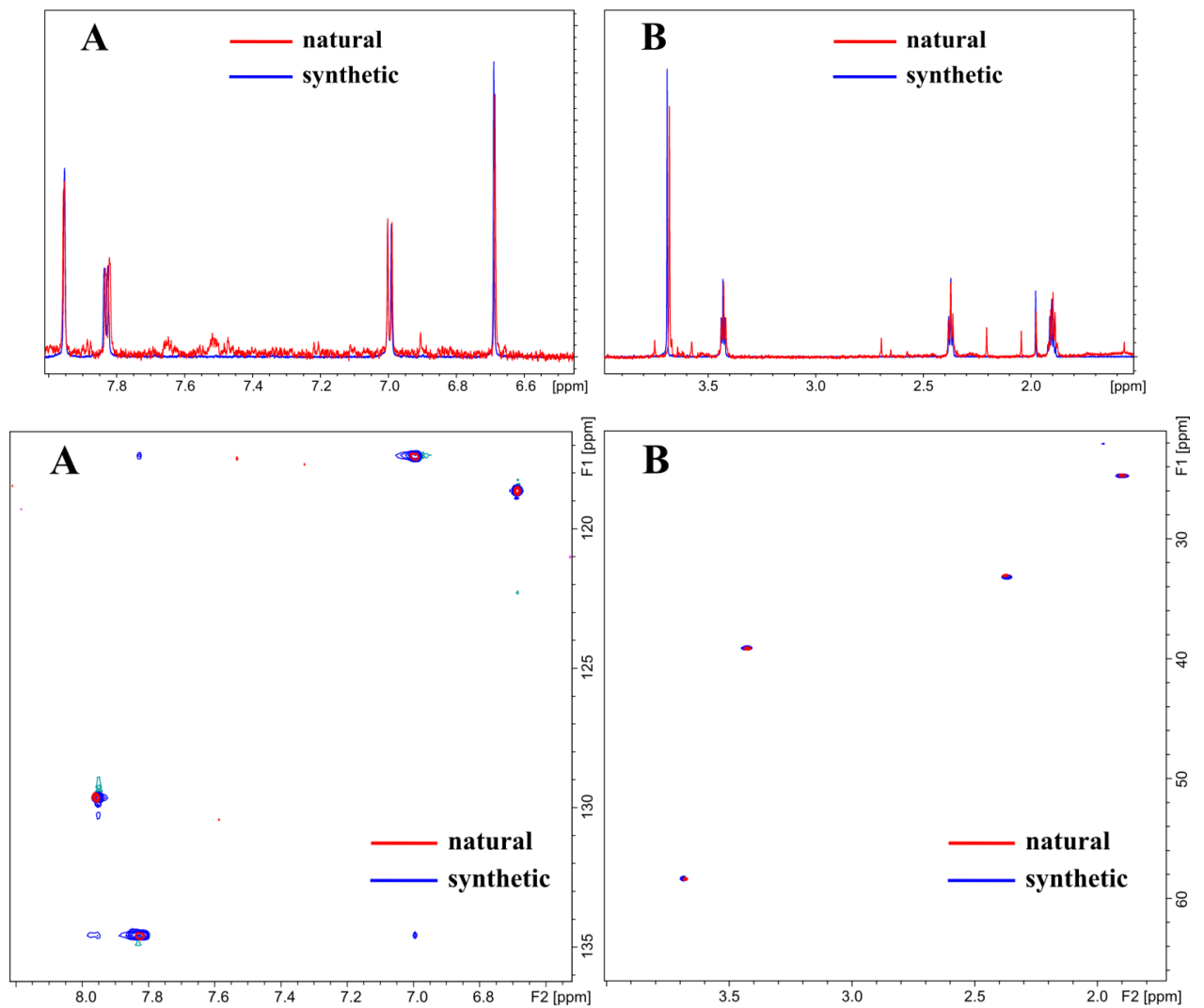


Рисунок 3.7.5. Совпадение химических сдвигов протонов в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  и  $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ -HSQC природного (красный) и синтетического (синий) AsLn7 в  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$  при pH 5.0.

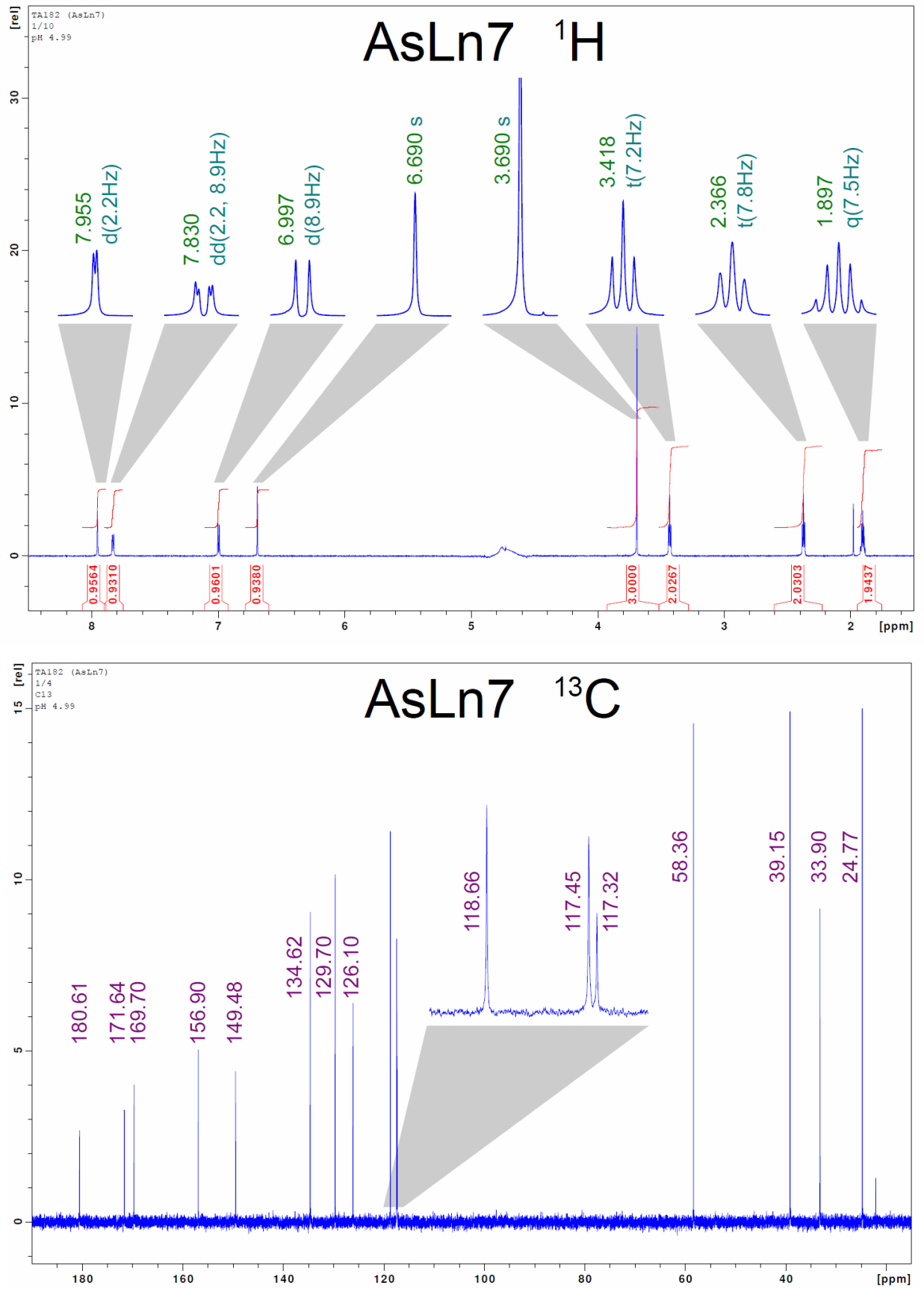


Рисунок 3.7.6. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  синтетического AsLn7 в  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$  при pH 5.0.



Рисунок 3.7.7. Наложение спектров ЯМР  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC синтетического AsLn7 ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , pH 5.0).

Таблица 3.7.1.  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  химические сдвиги и мультиплетности протонов синтетического AsLn7 (700 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , pH 5.0). Нумерация атомов согласно рис 3.7.4Д.

Номер атома	$\delta_{\text{H}}$ , мульт. ( $J$ , Гц)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	171.6
2	-	149.5
3	6.69, с	118.7
4	-	126.1
5	7.96, д (2.2 Гц)	129.7
6	-	117.3
7	-	156.9
8	7.00, д (8.5 Гц)	117.5
9	7.83, дд (8.5, 2.2 Гц)	134.6
10	-	169.7
11	3.69, с	58.4
$\gamma$ -ГАМК	3.42, т (7.2 Гц)	39.2
$\beta$ -ГАМК	1.90, квинт (7.5 Гц)	24.8
$\alpha$ -ГАМК	2.37, т (7.8 Гц)	33.1
1-ГАМК	-	180.6

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

В спектрах ЯМР трех природных соединений AsLn5, AsLn11 и AsLn12 наблюдался одинаковый паттерн сигналов (рис. 3.7.8А-С): два ароматических дублета ( $\delta_{\text{H}}$  7.6 и 6.9, 2H каждый), один ароматический синглет ( $\delta_{\text{H}}$  6.8, 1H) и один метокси-синглет ( $\delta_{\text{H}}$  3.7, 3H) (рис. 3.7.9-3.7.11). Структура фрагмента, соответствующего этим сигналам, была установлена при помощи полного набора спектров ЯМР (1D  $^{13}\text{C}$ , 2D DQF-COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC), полученных для соединения AsLn12. Анализ кросс-пиков HMBC выявил, что наблюдаемые сигналы являются частью необычного производного тирозина, названного нами CompY (рис. 3.7.8F). 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. 3.7.8F, 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.

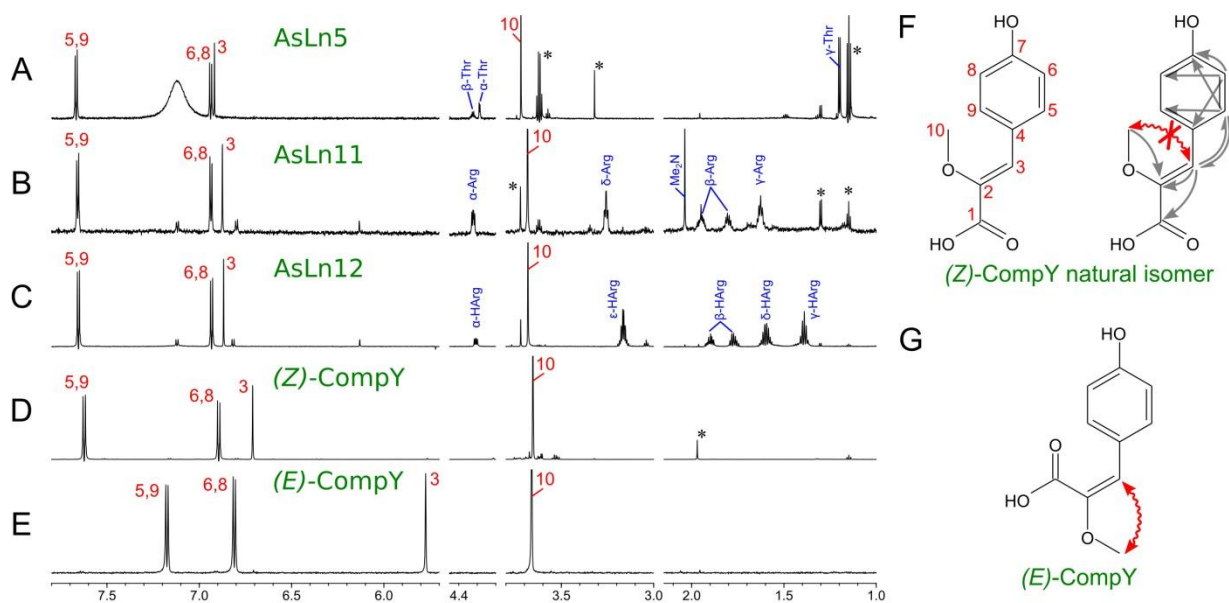


Рисунок 3.7.8. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  природных и синтетических соединений, содержащих модифицированный остаток тирозина, CompY. Сигналы CompY отмечены красным цветом. Условия: 800 МГц (A, B, C), 700 МГц (D, E),  $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C, pH 5.0. Химические сдвиги A-C приведены в таблице 3.7.2. (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.

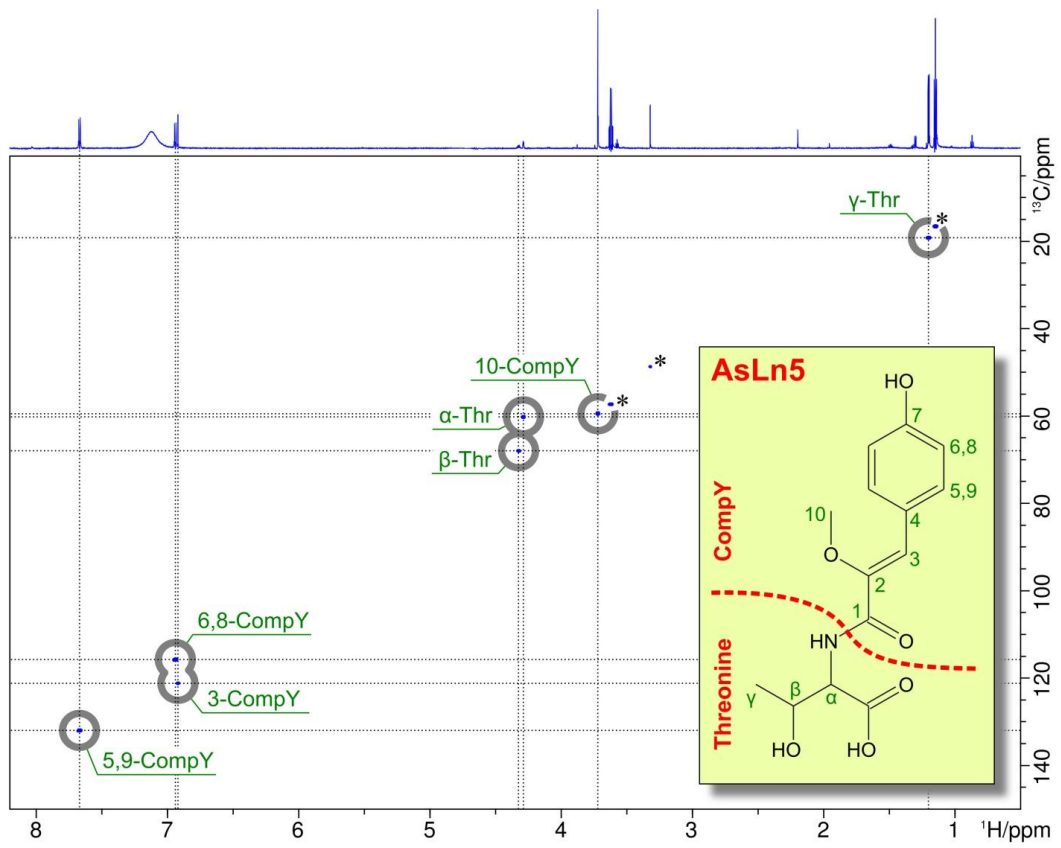


Рисунок 3.7.9. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC AsLn5. (800МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C, pH 5.0)

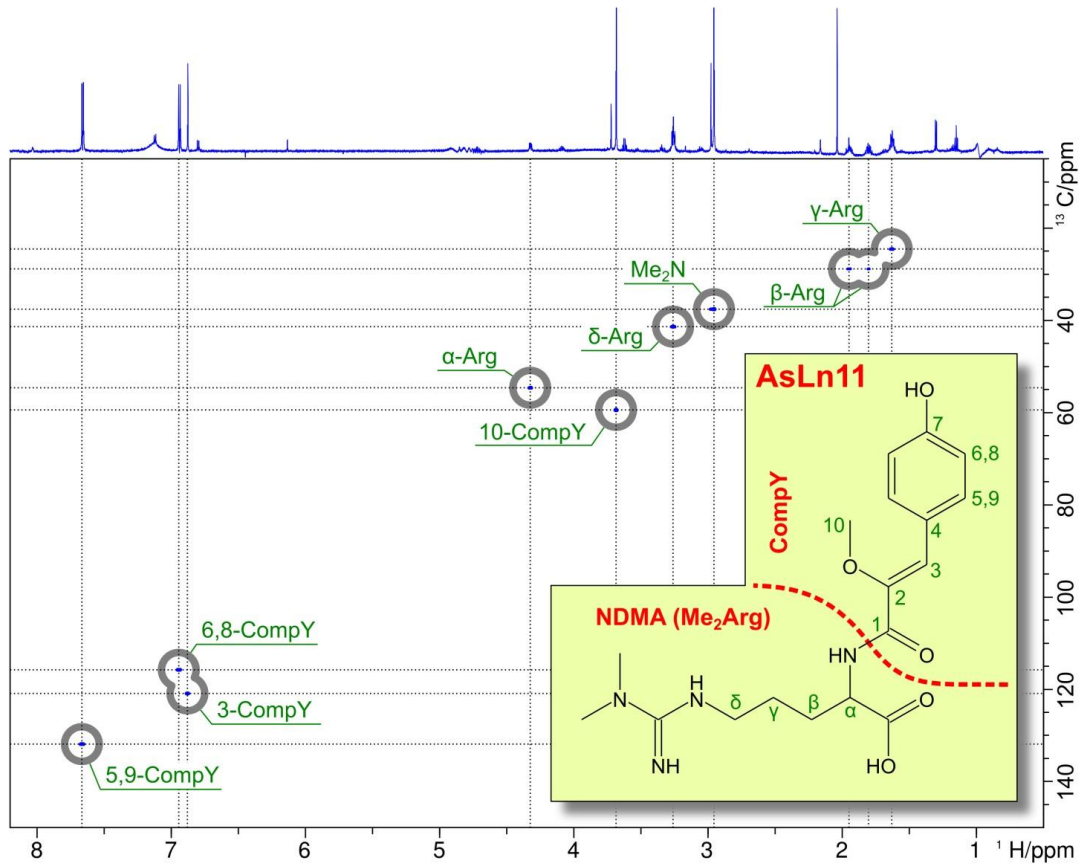


Рисунок 3.7.10. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC AsLn11. (800МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C, pH 5.0)

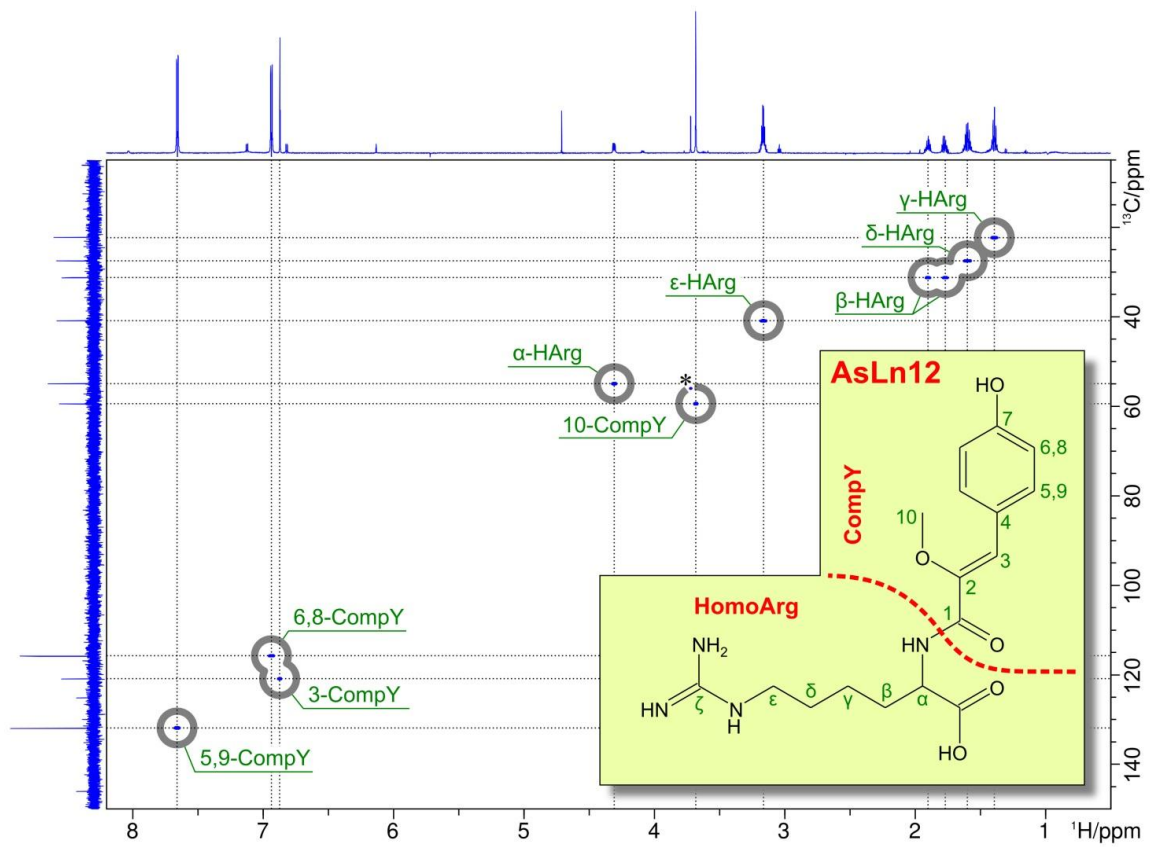


Рисунок 3.7.11. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC AsLn12. (800МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C, pH 5.0)



Таблица 3.7.2.  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  химические сдвиги и мультиплетности протонов AsLn5, AsLn11 и AsLn12.

Фрагмент	№ атома	AsLn5 Thr-CompY		AsLn11 NDMA-CompY		AsLn12 homoArg-CompY	
		$\delta_{\text{H}} (J, \text{Гц})$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}} (J, \text{Гц})$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}} (J, \text{Гц})$	$\delta_{\text{C}}$
CompY	1	—	166.4	—	n.o.	—	165.9
	2	—	146.0	—	n.o.	—	146.1
	3	6.92 с	121.2	6.88 с	120.9	6.87 с	120.9
	4	—	125.1	—	n.o.	—	125.16
	5,9	7.67 д (9.0 Гц)	132.0	7.66 д (9.0 Гц)	131.9	7.66 д (9.0 Гц)	131.9
	6,8	6.94 д (9.0 Гц)	115.9	6.94 д (9.0 Гц)	115.8	6.93 д (9.0 Гц)	115.8
	7	—	156.6	—	n.o.	—	156.6
	10	3.72 с	59.5	3.68 с	59.5	3.68 с	58.5
Аминокислота	$\alpha$	4.29 д (3.7 Гц)	60.3	4.32 дд (5.2, 8.1 Гц)	54.7	4.31 дд (4.8, 8.7 Гц)	55.0
	$\beta$	4.32 м	68.0	1.95 м 1.80 м	28.8	1.90 м 1.77 м	31.3
	$\gamma$	1.20 д (6.5 Гц)	19.2	1.63 м	24.6	1.39 м	22.3
	$\delta$			3.26 дт (7.0, 2.4 Гц)	41.4	1.60 м	27.5
	$\epsilon$			2.95 с NMe <sub>2</sub>	37.6	3.17 м	40.9
	$\zeta$					—	156.8

### Установление структуры AsLn5.

Спектры ESI-HRMS AsLn5 выявили  $[\text{M}+\text{H}]^+$  молекулярный ион с  $m/z = 296.1145$ , соответствующей молекулярной формулой к которому являлась  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_6^+$  (расчетное  $m/z = 324.1078$ ) При вычитании фрагмента CompY ( $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ ) из полученной молекулярной формулы брутто-формула оставшегося фрагмента –  $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2$  – позволяет предположить остаток треонина в качестве возможного структурного фрагмента AsLn5. Использование методов ЯМР-спектроскопии позволило однозначно установить наличие остатка треонина в AsLn5 (рис. 3.7.8А, 3.7.9). Наличие амидной связи треонин-CompY подтверждается химическими сдвигами  $\alpha$ -Н протона треонина ( $\delta_{\text{H}} 4.287$ , таблица 3.7.2) и карбонильной группы CompY ( $\delta_{\text{C}} 166.43$ ),

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  $^1\text{H}$  и 2D HSQC AsLn11 выявил наличие алифатической цепи с химическими сдвигами  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  и мультиплетностями сигналов характерными для остатка аргинина, а также дополнительный синглет возможного фрагмента  $\text{N}(\text{Me})_2$  ( $\delta$  2.954, 6H), (рис. 3.7.8В, 3.7.10, таблица 3.7.2). Остаток диметиларгинина существует в природе в двух формах, симметричного (СДМА) и несимметричного (АДМА) изомера, отличающихся MS/MS фрагментацией с отщеплением либо  $\text{NH}_2\text{Me}$  (СДМА) или  $\text{NHMe}_2$  (АДМА) нейтральных фрагментов [Schwedhelm и др., 2007]. Анализ MS/MS фрагментации AsLn11 выявил отщепление фрагмента  $\text{NHMe}_2$  (45 Да) от молекулярного иона 379.1931 (рис. 3.7.12). Ближайшей молекулярной формулой для полученного молекулярного иона AsLn11 являлась  $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_5^+$  (расчетное  $m/z = 379.1976$ ), соответствующая сумме АДМА + CompY –  $\text{H}_2\text{O}$ . Пептидная связь между альфа-аминогруппой АДМА и CompY подтверждается химическими сдвигами  $\alpha\text{-H}$  протона АДМА ( $\delta_H$  4.321).

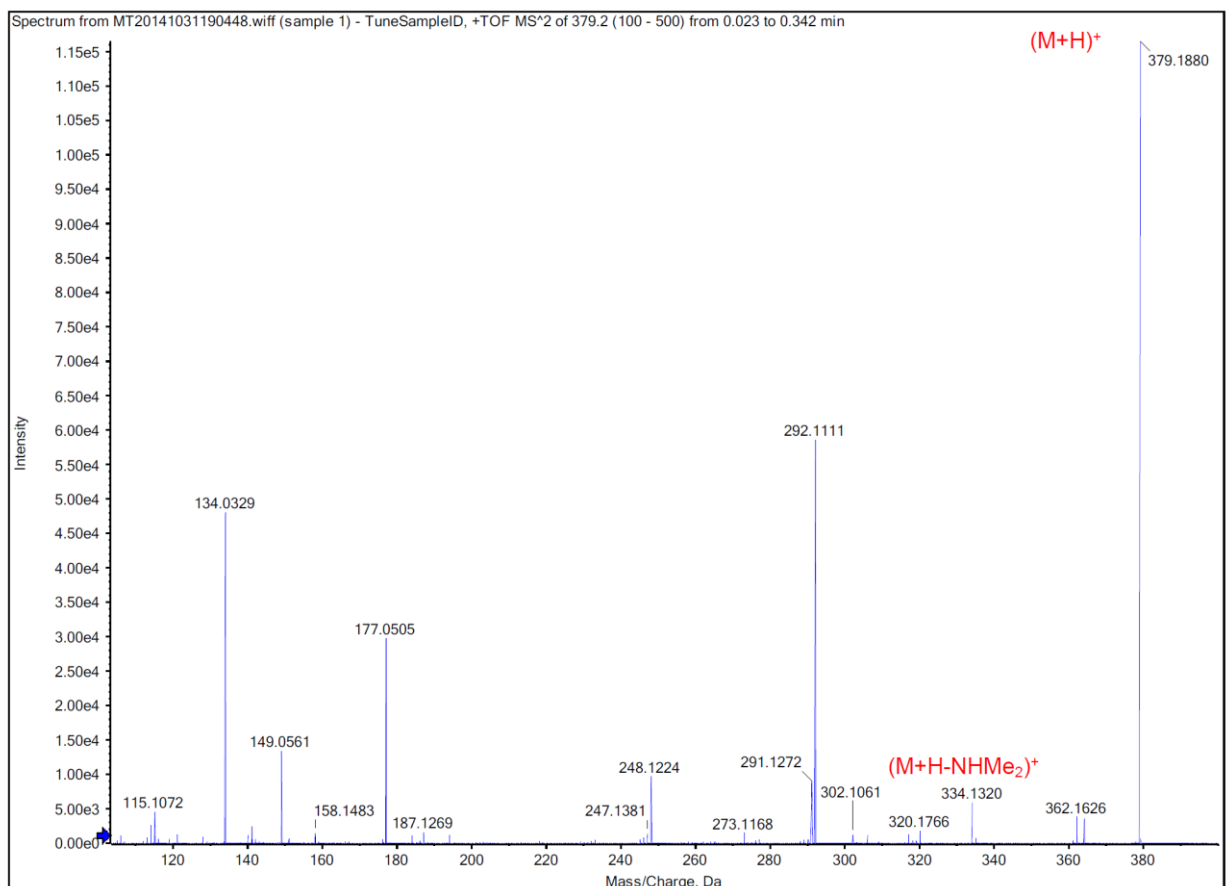


Рисунок 3.7.12. MS/MS спектр AsLn11. Отщепление  $\text{NHMe}_2$  указывает на наличие асимметричного диметиларгинина в AsLn11.

### Установление структуры AsLn12.

Следующие ЯМР-спектры были получены для AsLn12: 1D  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , 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 (рис. 3.7.11). Анализ спектра HMBC обнаружил неожиданный кросс-пик между  $\epsilon$ -Lys и атомом углерода с химическим сдвигом, характерным для гуанидина 156.82 м.д. (таблица 3.7.2). Наличие в составе AsLn12 гуанидинового фрагмента подтверждается спектром ESI-HRMS (молекулярный ион с  $m/z = 365.1785$ ), соответствующей молекулярной формулой к которому являлась  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{N}_4^+$  (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].

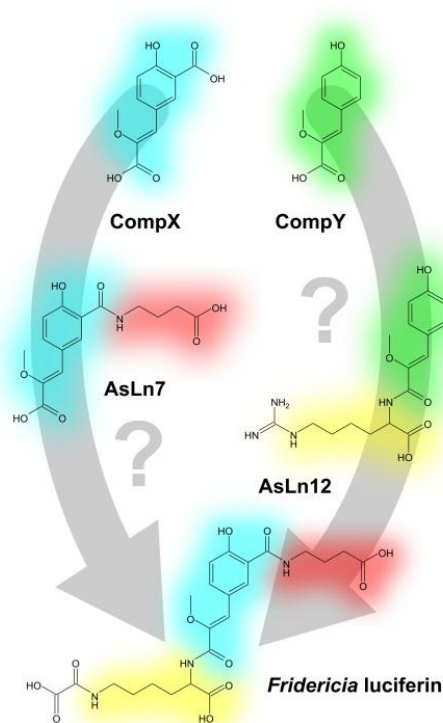


Рисунок 3.7.13. Два возможных пути биосинтеза люциферина *Fridericia heliota*, основанных на структурах новых пептидов обнаруженных в биомассе червя.

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* (рис. 3.7.13). 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 карнозин-синтетаза, 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. 3.7.13). В настоящий момент мы не можем однозначно подтвердить ни одну из этих гипотез, однако первая из них кажется более вероятной.

### 3.8. Люциферин грибов

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Константином Пуртовым, Валентином Петушковым, Александрой Царьковой, Зинаидой Осиповой, Константином Минеевым и коллегами, а также диссертационных работ Александры Царьковой и Зинаиды Осиповой под руководством автора.

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. 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 3.8.1) [Airth, Foerster, 1962].

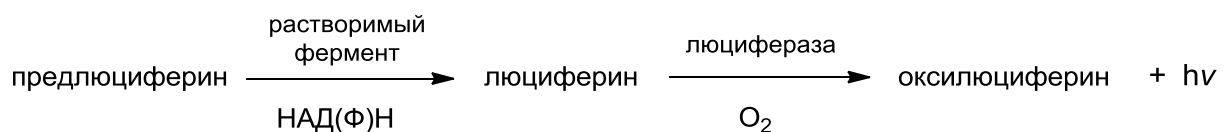


Схема 3.8.1. Двухступенчатая реакция биолюминесценции грибов, предложенная Эртом и Ферстером.

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. 3.8.1). В дальнейших исследованиях использовались плодовые тела *Pholiota squarrosa*, содержание предлюциферина в которых было наибольшим.

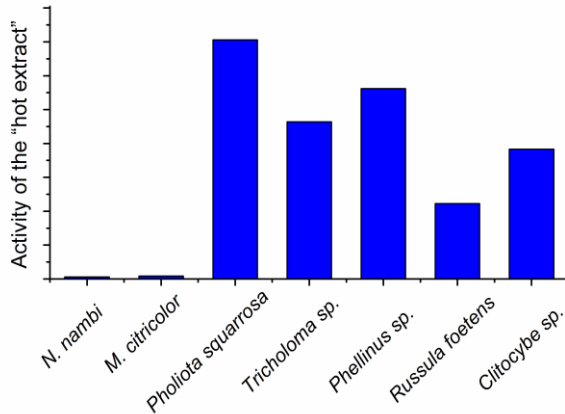


Рисунок 3.8.1. Активности горячих экстрактов люминесцентных и нелюминесцентных грибов в присутствии холодного экстракта *N. nambi*.

Использование препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ этилацетатного экстракта плодовых тел *Ph. squarrosa* позволило получить шесть различных соединений **3.8.1-3.8.6** (рис. 3.8.2).

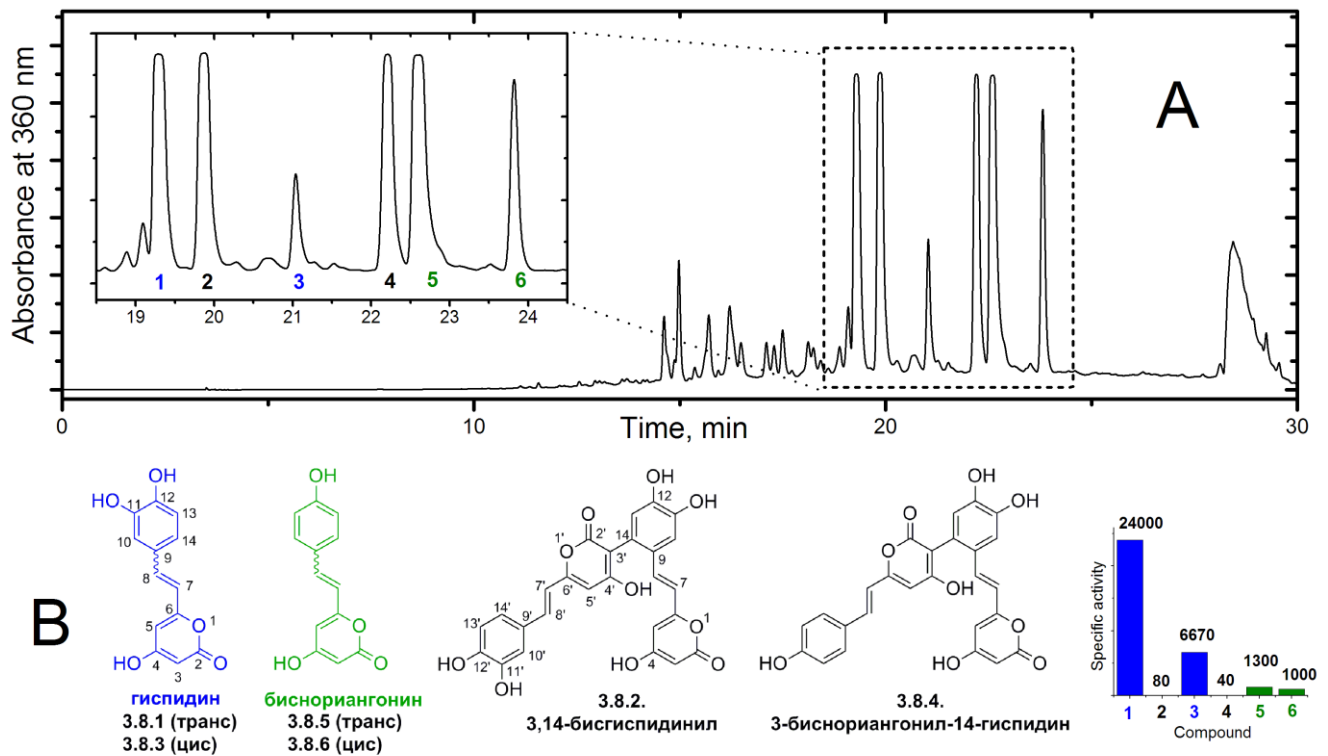


Рисунок 3.8.2. (А) Хроматограмма экстракта *Pholiota squarrosa*. (В) Структуры соединений, соответствующих наблюдаемым хроматографическим пикам. Люминесцентная активность соединений **3.8.1-3.8.6**.

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<sub>6</sub> или ацетоне-d<sub>6</sub>: <sup>1</sup>H и 2D DQF-COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC и <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC (см. таблицы 3.8.1, 3.8.2). 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 биснориангоина (**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 биснориангоина (3-биснориангонил-14-гиспидин).

Таблица 3.8.1. Химические сдвиги соединений **3.8.1**, **3.8.3** в DMSO-d<sub>6</sub> и **3.8.5**, **3.8.6** (в ацетоне-d<sub>6</sub>). Нумерация атомов согласно рис. 3.8.2.

№ атома	<i>транс</i> -гиспидин <b>(3.8.1)</b>		<i>цис</i> -гиспидин <b>(3.8.3)</b>		<i>транс</i> -биснориангонин <b>(3.8.5)</b>		<i>цис</i> -биснориангонин <b>(3.8.6)</b>	
	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$
2		162.82		162.82		162.85		162.85
3	5.23 (с)	89.50	5.22 (с)	88.69	5.38 (д, 1.9 Гц)	89.83	5.37 (д, 1.9 Гц)	90.2
4		169.85		169.56		169.92		169.50
5	6.13 (с)	101.3	6.07 (с)	102.64	6.14 (д, 1.9 Гц)	100.11	6.11 (д, 1.9 Гц)	101.52
6		160.35		160.35		160.32		160.32
7	6.67 (д, 16 Гц)	116.91	5.98 (д, 12 Гц)	118.33	6.75 (д, 16 Гц)	116.67	6.045 (д, 12 Гц)	118.38
8	7.12 (д, 16 Гц)	134.81	6.63 (д, 12 Гц)	137.13	7.35 (д, 16 Гц)	134.64	6.76 (д, 12 Гц)	136.67
9		127.26		127.07		127.28		127.09
10	7.03 (д, 2.0 Гц)	114.47	6.87 (д, 2.0 Гц)	116.93	7.55 (д, 8.6 Гц)	129.22	7.43 (д, 8.6 Гц)	131.25
11		145.95		145.20	6.91 (д, 8.6 Гц)	115.83	6.84 (д, 8.6 Гц)	115.04
12		147.88		146.63		158.95		158.14
13	6.77 (д, 8.1 Гц)	116.16	6.70 (д, 8.1 Гц)	115.64	6.91 (д, 8.6 Гц)	115.83	6.84 (д, 8.6 Гц)	115.04
14	6.95 (дд, 8.1;2.0 Гц)	120.73	6.78 (дд, 8.1;2.0 Гц)	121.82	7.55 (д, 8.6 Гц)	129.22	7.43 (д, 8.6 Гц)	131.25



Таблица 3.8.2. Химические сдвиги соединений **3.8.2**, **3.8.4** в ацетоне-d<sub>6</sub>. Нумерация атомов согласно рис. 3.8.2.

№ атома	3,14-бисгиспидинил ( <b>3.8.2</b> )		3-биснориангонил-14-гиспидин ( <b>3.8.4</b> )	
	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$
2		162.62		162.63
3	5.31 (д, 1.9 Гц)	89.96	5.32 (д, 1.9 Гц)	89.89
4		169.54		169.61
5	6.12 (д, 1.9 Гц)	100.09	6.13 (д, 1.9 Гц)	100.12
6		160.49		160.49
7	6.46 (д, 15.9 Гц)	117.57	6.65 (д, 15.9 Гц)	117.65
8	7.28 (д, 15.9 Гц)	132.88	7.28 (д, 15.9 Гц)	132.87
9		127.90		127.91
10	7.30 (с)	111.97	7.30 (с)	111.99
11		145.55		145.54
12		146.55		146.65
13	6.79 (с)	118.65	6.79 (с)	118.65
14		125.08		125.08
2'		162.31		162.40
3'		102.55		102.60
4'		165.37		165.35
5'	6.31 (с)	100.21	6.31 (с)	100.23
6'		159.05		159.07
7'	6.75 (д, 15.9 Гц)	116.62	6.82 (д, 15.9 Гц)	116.52
8'	7.34 (д, 15.9 Гц)	134.9	7.41 (д, 15.9 Гц)	134.59
9'		128.12		127.44
10'	7.19 (д, 2.0 Гц)	113.86	7.58 (д, 8.1 Гц)	129.19
11'		145.42	6.92 (д, 8.1 Гц)	115.77
12'		146.98		158.90
13'	6.89 (д, 8.1 Гц)	115.48	6.92 (д, 8.1 Гц)	115.77
14'	7.09 (дд, 8.1;2.0 Гц)	120.70	7.58 (д, 8.1 Гц)	129.19

Гиспидин является хорошо известным представителем класса стирилпиранов, 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. 3.8.3). 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*.

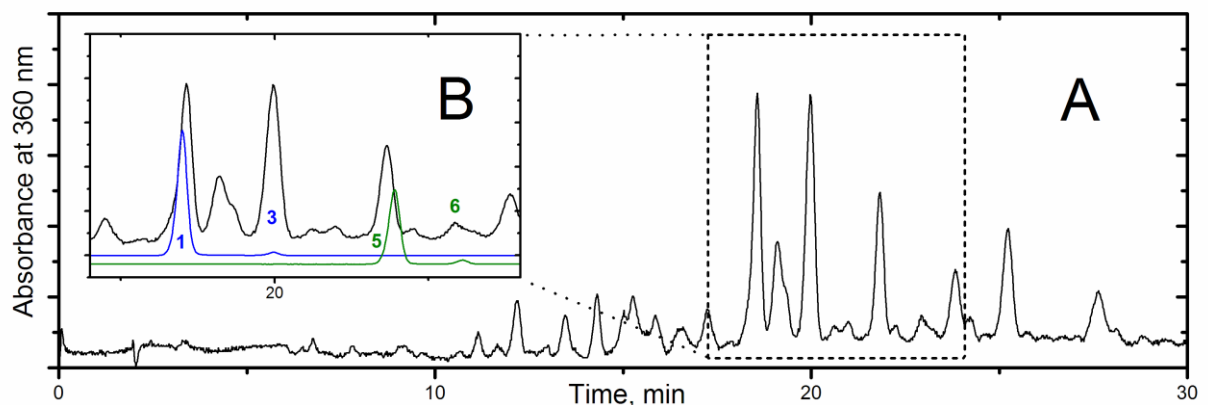


Рисунок 3.8.3. (А) ОФ-ВЭЖХ хроматограмма этилацетатного экстракта мицелия *Neothopanus nambi*, вымоченного в дистиллированной воде. (В) Сравнение (А) с данными ВЭЖХ хроматограммы синтетического гиспидина (синий) и биснориангонина (зеленый) в тех же условиях хроматографии. Как гиспидин, так и биснориангонин 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. 3.8.4А-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. 3.8.4D).

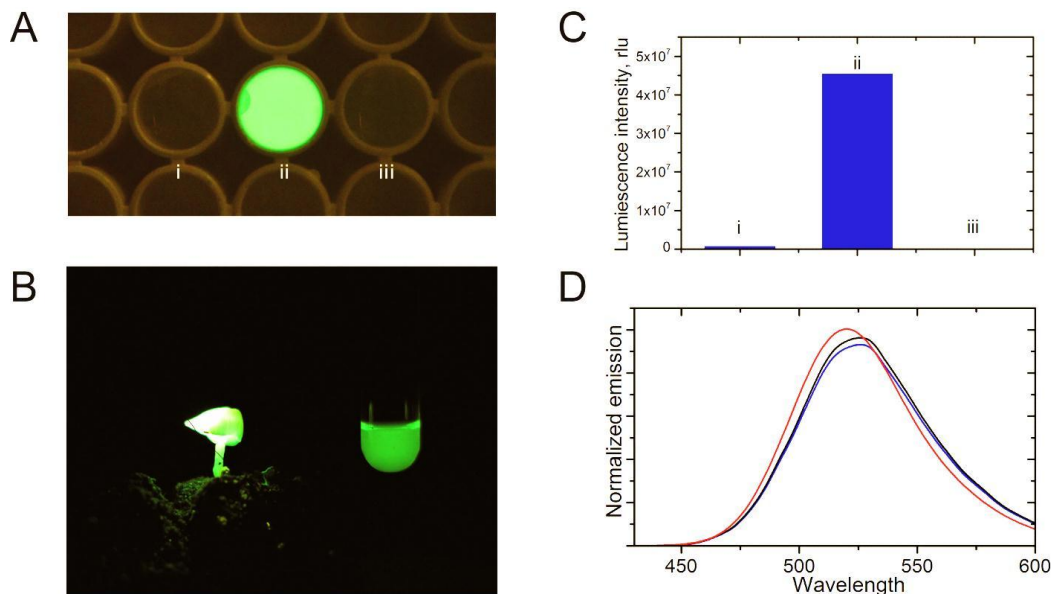


Рисунок 3.8.4. (А) Сравнение люминесценции холодного экстракта плодовых тел *M. chlorophos in vitro* при смешении с (i) горячим экстрактом того же гриба и НАДФН; (ii) гиспидином и НАДФН; (iii) НАДФН. (В) Биолюминесценция плодовых тел *M. chlorophos in vivo* в сравнении с люминесценцией холодного экстракта 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 ( $\lambda_{ex}$  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 было 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. 3.8.5). 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).

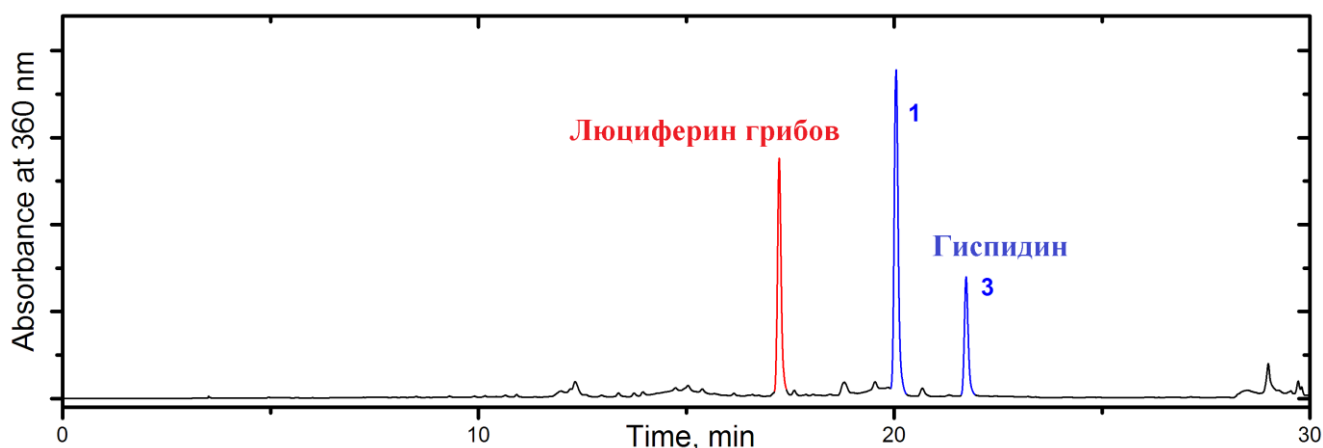


Рисунок 3.8.5. Ферментативный синтез люциферина грибов из гиспидина, катализируемый фракцией холодного экстракта ~35 кДа из мицелия *N. nambi* в присутствии НАДФН.

Новое соединение обладало яркой НАДФН-независимой люминесценцией при смешивании с холодным экстрактом *N. nambi* (рис. 3.8.6). Мы также обнаружили, что

микросомальная фракция холодного экстракта отвечает за люминесценцию, что полностью согласуется с гипотезами Эрта и Стевани (схема 3.8.1) и подтверждает функциональную роль производного гиспидина как люциферина грибов.

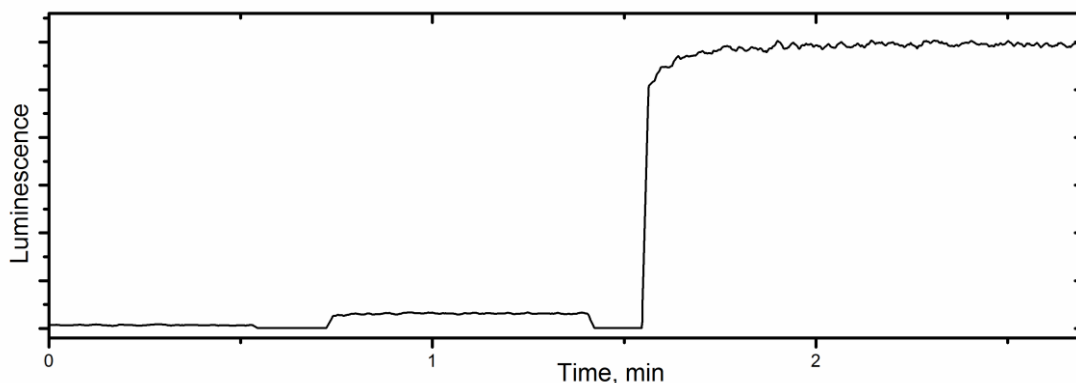


Рисунок 3.8.6. НАДФН-независимая люминесценция люциферина грибов, полученного в результате ферментативного синтеза, при смешивании с люциферазной фракцией холодного экстракта из мицелия *N. nambi*. 0-0.5 мин: реакционная смесь до добавления люциферина; 0.7 – 1.4 мин: добавление 6 пг люциферина; 1.6-3.0 мин: добавление 150 пг люциферина.

УФ-спектры люциферина были аналогичны таковым гиспидина (рис. 3.8.7). В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  люциферина грибов наблюдался аналогичный гиспидину паттерн сигналов. Однако в спектре люциферина наблюдалось исчезновение одного сигнала протона, соответствующего H3 гиспидина (рис. 3.8.8). 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-2*H*-пиран-2-она (рис. 3.8.8; таблица 3.8.3).

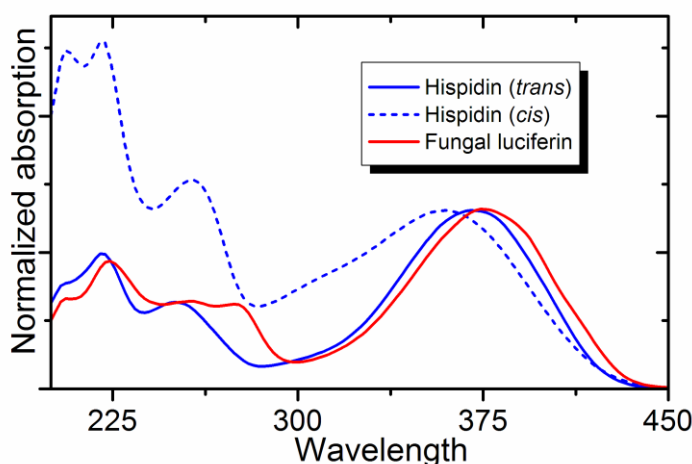


Рисунок 3.8.7. УФ-спектры гиспидина и люциферина грибов.

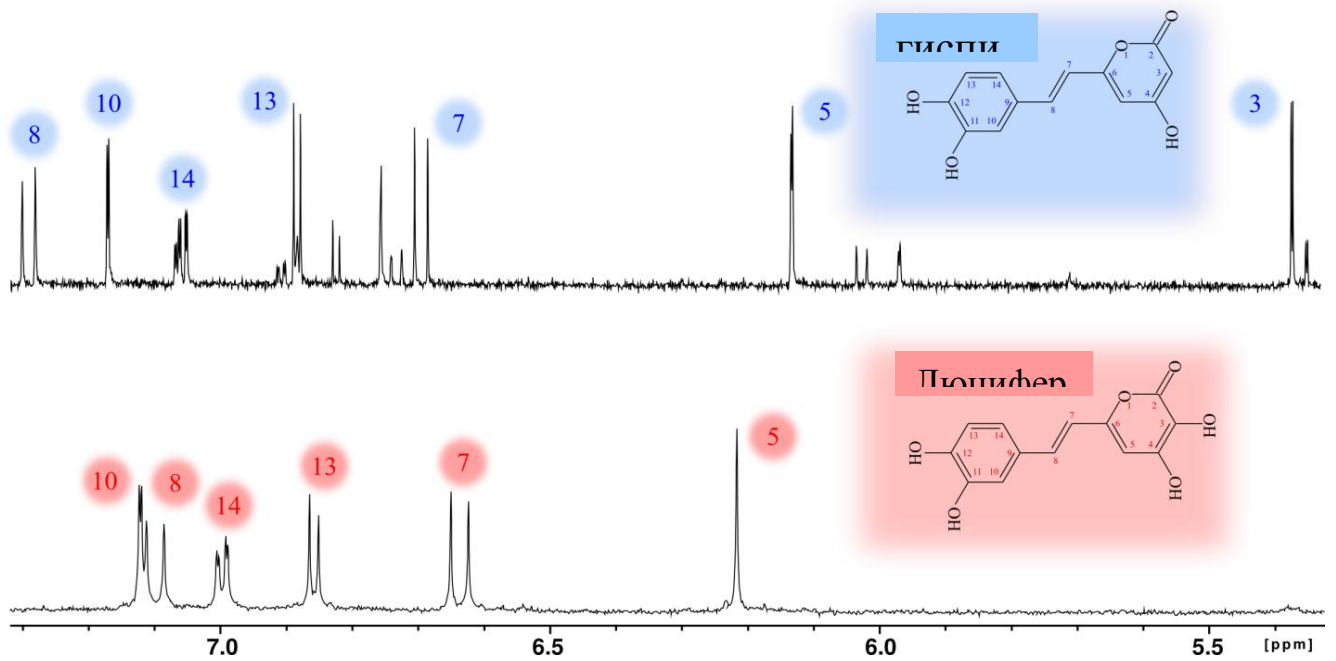


Рисунок 3.8.8. Сравнение спектров ЯМР <sup>1</sup>H предлюциферина – гиспидина (немаркированные пики соответствуют цис-изомеру) и люциферина грибов, полученного в результате ферментативного синтеза.

Таблица 3.8.3. Химические сдвиги люциферина грибов в ацетоне-d<sub>6</sub>

№ атома	3-гидроксигиспидин	
	$\delta_H$	$\delta_C$
2		-
3		-
4		-
5	6.21 (с)	101.53
6		151.46
7	6.64 (д, 16 Гц)	116.56
8	7.10 (д, 16 Гц)	131.79
9		128.41
10	7.12 (д, 2.0 Гц)	113.37
11		145.36
12		146.35
13	6.86 (д, 8.2 Гц)	115.46
14	6.99 (дд, 8.2;2.0 Гц)	120.05

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 гидроксирования 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 моногидроксирование одной молекулы субстрата обеспечивает лишь 2 электрона [Ortiz de Montellano, 2010]. Полученные данные позволяют предположить механизм билюминесценции грибов, приведенный на схеме 3.8.2.

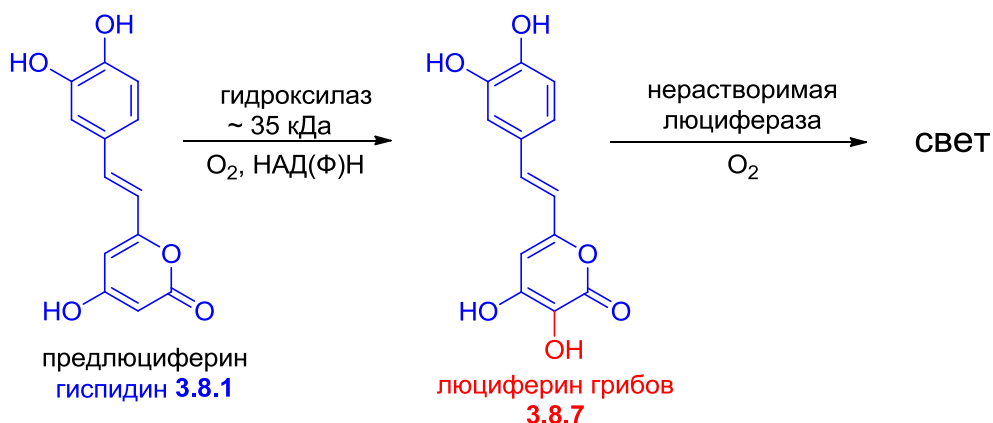


Схема 3.8.2. Предполагаемый механизм билюминесценции грибов.

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-дигидроксибензальдегида и дигидрокси-метилпиранона.

Для синтеза дигидрокси-метилпиранона 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 3.8.3) [Hatzigrigoriou, Varvoglis, Bakola-Christianopoulou, 1990; Soldi и др., 2012].

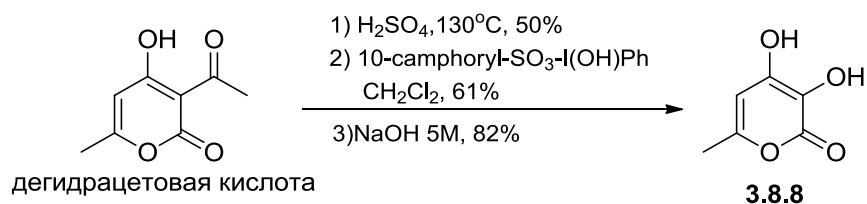


Схема 3.8.3. Синтез дигидрокси-метилпиранона **3.8.8** из дегидрацетовой кислоты.

Несколько попыток ввести в реакцию конденсации незащищенные протокатехальдегид и дигидрокси-метилпиранон **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 3.8.4). Конденсация полученного диметоксипиранона **3.8.9** с коммерчески доступным 3,4-метилendioксибенальдегидом 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 трибромида бора в дихлорметане (схема 3.8.4).

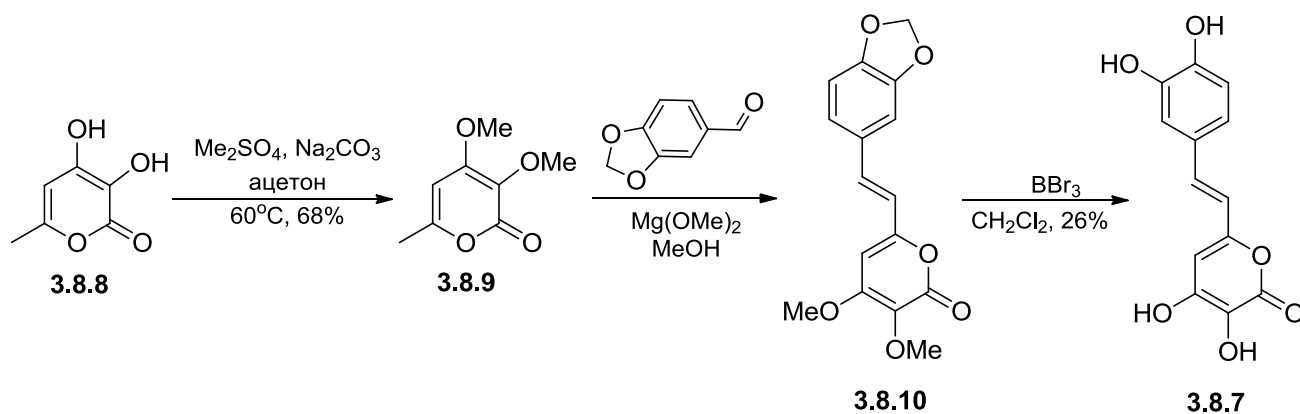


Схема 3.8.4. Синтез люциферина грибов.

Таким образом, структура люциферина грибов **3.8.7**: (*E*)-6-(3,4-дигидрокстирил)-3,4-дигидрокси-2*H*-пиран-2-он, была однозначно подтверждена.

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.



## 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы, оборудование, программное обеспечение

Спектры ЯМР регистрировали на приборах Bruker Avance III 800 (снабжен 5-мм СРТХІ криодатчиком), Bruker Avance III 700, Bruker Avance III 600 и Bruker Fourier 300 при 300К в D<sub>2</sub>O, ДМСО-d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD и ацетоне-d<sub>6</sub> внутренний стандарт - тетраметилсилан.

Спектры поглощения в УФ и видимом диапазонах регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 *Bio*. Спектры флуоресценции (возбуждения и эмиссии) и биолюминесценции были получены на спектрофлуориметре Agilent 1260 Infinity LC при использовании программного обеспечения Agilent Cary Eclipse, а.е. – условные единицы. Температуры плавления определены на приборе SMP30.

Масс-спектры высокого разрешения зарегистрированы на приборе Agilent 6224 TOF LC/MS System методом электрораспылительной ионизации (ESI), анализ масс-спектров проводили в программе MassHunter Workstation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Рентгеноструктурный анализ проводился на дифрактометре Bruker SMART APEX<sub>2</sub>, расчеты проведены с помощью комплекса программ SHELXTL PLUS 5.0.

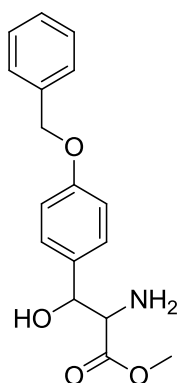
Аналитическую и препаративную тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Merck (Германия) с флуоресцентным индикатором UV-254, визуализацию осуществляли УФ (254 и 312 нм) или окрашиванием стандартным раствором нингидрина, фосфорномолибденовой кислоты, KMnO<sub>4</sub> или выдерживанием в парах насыщенного раствора аммиака. Последний способ позволяет наблюдать специфическое изменение окраски хромофоров, содержащих свободную фенольную группу за счет депротонирования последней

Для колоночной хроматографии использовали силикагель фирмы Merck (Kieselgel 60, 70-230 mesh) или оксид алюминия фирмы Aldrich (CAMAG-A-1, 150 mesh, basic, Brockman activity I). Реактивы Acros Organics и SigmaAldrich применяли без дополнительной очистки. Для проведения реакций использовали свежеперегнаные растворители фирмы Химмед.

#### 4.1. Автоокисление синтетического хромофора GFP с образованием DsRed-подобного красного хромофора

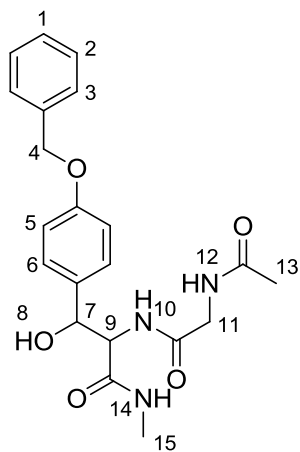
2-Амино-3-(4-(бензилокси)фенил)-3-гидроксипропановая кислота [Bolhofer, 1954], 3,3-диметил-2-(N-ацетиламино)-бутановая кислота [Jaeger, Broadhurst, Cram, 1979], 3-метил-2-этил-5-(4-гидроксипропилен)-дигидроимидазол-5-он (**3.1.10**) [Yampolsky и др., 2005] получены согласно описанным методикам.

Хромофоры **3.1.8** и **3.1.11** были идентичны соединениям, полученным ранее по описанным методикам [Yampolsky и др., 2005, 2008], согласно данным ТСХ ( $R_f$ ), УФ и  $^1\text{H}$  ЯМР спектров.



##### Метил 2-амино-3-(4-(бензилокси)фенил)-3-гидроксипропаноат (**3.1.1**)

$\text{SOCl}_2$  (0.1 моль, 7.8 мл) добавляли по каплям к суспензии 2-амино-3-(4-(бензилокси)фенил)-3-гидроксипропановой кислоты (47.3 ммоль, 13.6 г) в 80 мл MeOH при перемешивании при  $-10^\circ\text{C}$ . Полученный раствор кипятили 2 ч. Растворитель упарили, остаток суспендировали в 200 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и промыли EtOAc до исчезновения окраски. Остаток суспендировали в 150 мл EtOAc и добавляли 100 мл 10% водного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  при перемешивании. Водную фазу дважды экстрагировали 60 мл EtOAc. Объединенные экстракты промывали насыщенным раствором NaCl, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Остаток разделяли колоночной хроматографией ( $\text{CHCl}_3$ -EtOH 10:1) и получали **3.1.1** (11.1 г, 78%, 3.2:1 смеси *rel*-(2S,3R) и *rel*-(2S,3S) изомеров по данным ЯМР). Аналитические данные соответствовали литературным [Boger и др., 1997]. Смесь изомеров вводили в следующую стадию без разделения.

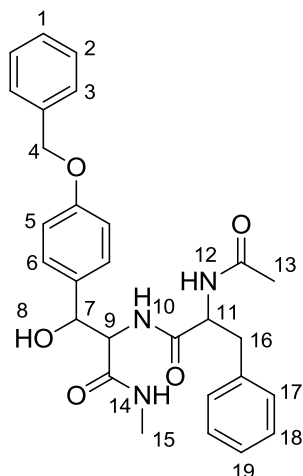


**2-(2-ацетидацетида)-3-(4-(бензилокси)фенил)-3-гидрокси-N-метилпропанамида  
(3.1.2a)**

1M раствор DCC в THF (12 ммоль, 12 мл) добавляли при 0°C к раствору ацетилглицина (12 ммоль, 1.40 г), NEt<sub>3</sub> (12 ммоль, 2.09 мл) и HOBT (12 ммоль, 1.62 г) в 30 мл DMF при перемешивании. После 1 часа перемешивания при комнатной температуре добавляли раствор **3.1.1** (11 ммоль, 3.31 г) в 10 мл DMF и оставляли смесь на ночь. После добавления 1 мл AcOH смесь перемешивали 20 мин, фильтровали и фильтрат упаривали *in vacuo*. Остаток растворяли в 120 мл EtOAc, промывали водой, затем 0.5M HCl, насыщенным NaHCO<sub>3</sub>, насыщенным NaCl, и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После упаривания EtOAc неочищенный метиловый эфир перерастворяли в MeCN (60 мл) и добавляли водный MeNH<sub>2</sub> (40%, 60 ммоль, 5.17 мл). Смесь нагревали до 40°C до окончания реакции по ТСХ (около 3 ч). Наблюдали образование осадка чистого **3.1.2a** (3.03 г, выход 69% на две стадии). Маточный раствор упаривали, остаток разделяли колоночной хроматографией (EtOAc-EtOH 3:1) и получали дополнительно 0.76 г (19%) **3.1.2a**. Общий выход 3.79 г (88% на две стадии).

<sup>1</sup>H ЯМР (800МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, основной изомер/ротамер): δ 1.84 (с, 3H, H<sup>13</sup>), 2.58 (3H, д, J = 4.7 Гц, H<sup>15</sup>), 3.60 (1H, дд, J = 5.6 и 16.4 Гц, H<sup>11</sup>), 3.77 (1H, дд, J = 5.6 и 16.4 Гц, H<sup>11</sup>), 4.27 (1H, дд, J = 3.2 и 8.8 Гц, H<sup>9</sup>), 5.02 (1H, т, J = 3.2 и 4.6 Гц, H<sup>7</sup>), 5.06 (2H, с, H<sup>4</sup>), 5.60 (1H, д, J = 4.6 Гц, H<sup>8</sup>), 6.91 (2H, д, J = 8.6 Гц, H<sup>5</sup>), 7.25 (2H, д, 8.6 Гц, H<sup>6</sup>), 7.31-7.44 (5H, 3m, H<sup>1</sup>, H<sup>2</sup>, H<sup>3</sup>), 7.67 (1H, квадрат, J = 4.6 Гц, H<sup>14</sup>), 7.74 (1H, д, J = 8.8 Гц, H<sup>10</sup>), 8.07 (1H, т, J = 5.6 Гц, H<sup>12</sup>).

HRMS (ESI) вычислено для C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, 400.1873; Найдено, 400.1844.

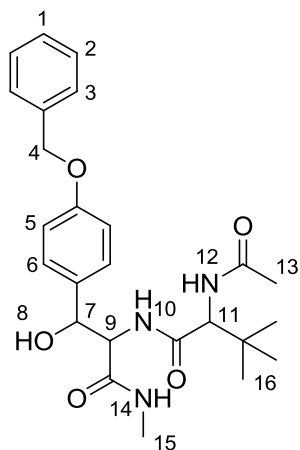


**2-(2-ацетамидо-3-фенилпропанамидо)-3-(4-(бензилокси)фенил)-3-гидрокси-N-метилпропанамида (3.1.2b)**

Получен аналогично **3.1.2a**. Очищен колоночной хроматографией (CHCl<sub>3</sub>-EtOH 85:15). Выход: 68% (2 стадии).

<sup>1</sup>H ЯМР (700МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, основной изомер/ротамер): δ 1.72 (3H, с, H<sup>13</sup>), 2.56 (3H, д, J = 4.7 Гц, H<sup>15</sup>), 2.66 (1H, дд, J = 10.3 и 13.9 Гц, H<sup>16</sup>), 2.87 (1H, дд, J = 4.9 и 13.9 Гц, H<sup>16</sup>), 4.24 (1H, дд, J = 2.3 и 8.6 Гц, H<sup>9</sup>), 4.59 (1H, м, H<sup>11</sup>), 5.05 (3H, м, H<sup>4</sup> и H<sup>7</sup>), 5.61 (1H, д, J = 4.4 Гц, H<sup>8</sup>), 6.89 (2H, д, J = 8.8 Гц, H<sup>5</sup>), 7.05 (1H, д, J = 7.1 Гц, H), 7.18-7.41 (5H, м, H<sup>1</sup>, H<sup>2</sup> и H<sup>3</sup>), 7.22 (2H, д, J = 8.8 Гц, H<sup>6</sup>), 7.53 (1H, квадрат, J = 4.7 Гц, H<sup>14</sup>), 7.65 (1H, д, J = 8.6 Гц, H<sup>10</sup>), 8.09 (1H, д, J = 8.3 Гц, H<sup>12</sup>).

HRMS (ESI) вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, 490.2342; Найдено, 490.2325.



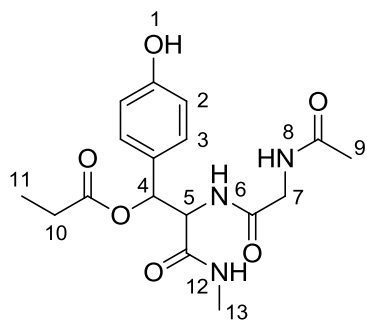
**2-ацетамидо-N-(1-(4-(бензилокси)фенил)-1-гидрокси-3-(метиламино)-3-оксопропан-2-ил)-3,3-диметилбутанамида (3.1.2c)**

Получен аналогично **3.1.2a**,. Очищен колоночной хроматографией (CHCl<sub>3</sub>-EtOH 10:1). Выход: 73% (на две стадии, смесь изомеров).

<sup>1</sup>H ЯМР (700МГц, CDCl<sub>3</sub>, основной изомер/ротамер): δ 0.67 (9H, с, H<sup>16</sup>), 1.89 (3H, с, H<sup>13</sup>), 2.58 (3H, д, J = 4.6 Гц, H<sup>15</sup>), 4.05 (1H, д, J = 6.8 Гц, H<sup>11</sup>), 4.30 (1H, дд, J = 2.9 и 8.8 Гц, H<sup>9</sup>), 5.07 (2H, м, H<sup>4</sup>), 5.16 (1H, дд, J = 2.9 и 5.3 Гц, H<sup>7</sup>), 5.51 (1H, д, J = 5.3 Гц, H<sup>8</sup>), 6.87 (2H, д, J = 8.6 Гц, H<sup>5</sup>),

7.21 (1H, квадр,  $J = 4.6$  Гц,  $H^{14}$ ), 7.27 (2H, д,  $J = 8.6$  Гц,  $H^6$ ), 7.30-7.43 (5H, м,  $H^1, H^2, H^3$ ), 7.73 (1H, д,  $J = 6.8$  Гц,  $H^{12}$ ), 7.87 (1H, д,  $J = 8.8$  Гц,  $H^{10}$ ).

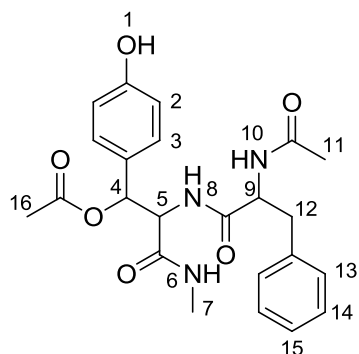
HRMS (ESI) Вычислено для  $C_{25}H_{34}N_3O_5$ , 456.2499; Найдено, 456.2475.



### 2-(2-ацетаминоацетамино)-1-(4-гидроксифенил)-3-(метиламино)-3-оксопропил пропионат (3.1.3a)

Смесь **3.1.2a** (3.45 ммоль, 1.38 г, смесь изомеров), пропионового ангидрида (15 мл) и  $ZnCl_2$  (1 ммоль, 136 мг) нагревали до  $90^\circ C$  при перемешивании до окончания реакции по ТСХ (около 4 ч). Избыток пропионового ангидрида и пропионовой кислоты *упаривали в вакууме* при  $70^\circ C$ , остаток растворяли в 50 мл EtOH и фильтровали через слой  $SiO_2$ . К фильтрату добавляли 10% Pd/C (200 мг) и AcOH (5 мл) и смесь гидрировали при комнатной температуре и атмосферном давлении в течение нескольких часов. После окончания реакции по ТСХ (около 4 ч) смесь фильтровали и упаривали. Продукт очищали колоночной хроматографией ( $CHCl_3$ -EtOH 85:15). Выход 0.91 г of **3.1.3a** (72% на две стадии).

$^1H$  ЯМР (700МГц,  $D_2O$ , основной изомер/ротамер):  $\delta$  1.24 (3H, т,  $J = 7.13$  Гц,  $H^{11}$ ), 2.18 (3H, с,  $H^9$ ), 3.08 (3H, с,  $H^{13}$ ), 3.71 (2H, квадр,  $J = 7.13$  Гц,  $H^{10}$ ), 4.34 (2H, с,  $H^7$ ), 6.92 (2H, д,  $J = 8.7$  Гц,  $H^2$ ), 6.95 (1H, с,  $H^4$ ), 7.86 (2H, д,  $J = 8.7$  Гц,  $H^3$ ).

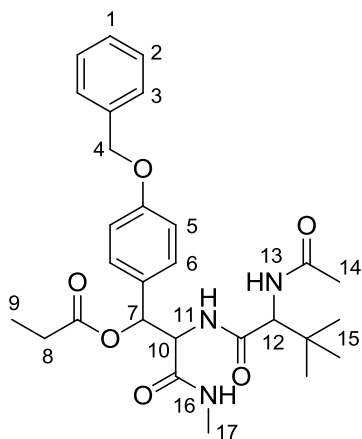


### 2-(2-ацетамино-3-фенилпропанамида)-1-(4-гидроксифенил)-3-(метиламино)-3-оксопропил пропионат (3.1.3b)

Раствор AcBr (2.0 ммоль, 0.15 мл в 1.5 мл  $Ac_2O$ ) добавляли к раствору **3.1.2b** (2.0 ммоль, 1.0 г) в  $CH_2Cl_2$  (10 мл). После 1 ч (100% конверсия по ТСХ  $CHCl_3$ -EtOH 9:1) реакционную смесь вылили в EtOAc (50 мл), промыли насыщенным  $NaHCO_3$ , NaCl и сушили над  $Na_2SO_4$ .

После упаривания остаток ресуспендировали в 30 мл MeOH, добавляли 150 мг Pd/C, и 100  $\mu$ L. Смесь гидрировали при атмосферном давлении до достижения 100% конверсии по ТСХ (CHCl<sub>3</sub>-EtOH 7:1). Раствор фильтровали и упаривали. Продукт очищали колоночной хроматографией (CHCl<sub>3</sub>-EtOH 8:1). Выход 0.65 г (74% на две стадии).

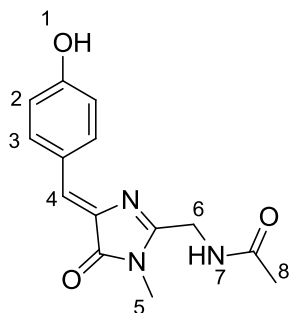
<sup>1</sup>H ЯМР (800МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, основной изомер/ротамер):  $\delta$  1.91 и 2.05 (6H, 2с, H<sup>11</sup> и H<sup>16</sup>), 2.63 (3H, д, J = 4.9 Гц, H<sup>7</sup>), 2.85 и 3.00 (2H, 2 м, H<sup>12</sup>), 4.63 (m, H<sup>9</sup>), 4.74 (1H, дд, J = 6.1 и 8.8 Гц, H<sup>5</sup>), 6.15 (1H, д, J = 6.1 Гц, H<sup>4</sup>), 6.71-7.26 (8H, м, H<sup>3</sup>, H<sup>10</sup>, H<sup>13</sup>, H<sup>14</sup> и H<sup>15</sup>), 6.74 (2H, д, J = 8.6 Гц, H<sup>2</sup>), 6.84 (1H, квадр, J = 4.9 Гц, H<sup>6</sup>), 7.09 (1H, д, J = 8.8 Гц, H<sup>8</sup>).



**2-(2-ацетамидо-3,3-диметилбутанамидо)-1-(4-(бензилокси)фенил)-3-(метиламино)-3-оксопропил пропионат (3.1.3с)**

<sup>1</sup>H ЯМР (700МГц, CDCl<sub>3</sub>, основной изомер/ротамер):  $\delta$  0.86 (9H, с, H<sup>15</sup>), 0.98 (3H, т, J = 7.5 Гц, H<sup>9</sup>), 1.87 (3H, с, H<sup>14</sup>), 2.27 (2H, dq, J = 2.4 и 7.5 Гц, H<sup>8</sup>), 2.42 (3H, д, J = 4.7 Гц, H<sup>17</sup>), 4.33 (1H, д, J = 9.5 Гц, H<sup>12</sup>), 4.70 (1H, дд, J = 6.9 и 8.8 Гц, H<sup>10</sup>), 5.06 (2H, с, H<sup>4</sup>), 6.85 (1H, д, J = 6.9 Гц, H<sup>7</sup>), 6.92 (2H, д, J = 8.8 Гц, H<sup>5</sup>), 7.19 (2H, д, J = 8.8 Гц, H<sup>6</sup>), 7.33-7.43 (5H, м, H<sup>1</sup>, H<sup>2</sup>, H<sup>3</sup>), 7.73 (1H, д, J = 9.5 Гц, H<sup>13</sup>), 7.78 (1H, квадр, J = 4.7 Гц, H<sup>16</sup>), 8.07 (1H, д, J = 8.8 Гц, H<sup>11</sup>).

ESI-MS: m/z = 512 ([M+H]<sup>+</sup>), 438 ([M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>CO<sub>2</sub>H+H]<sup>+</sup>), 534 ([M+Na]<sup>+</sup>).



**N-((4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)метил)ацетамид (3.1.5a)**

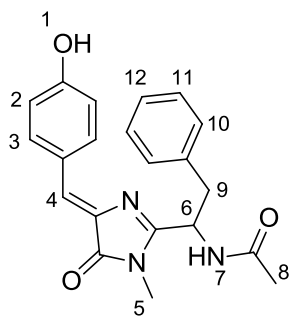
**3.1.4a** (0.60 ммоль, 220 мг),  $K_2CO_3$  (1.28 ммоль, 176 мг) и DMF (20 мл) помещали в колбу с магнитной мешалкой и септой. Продували аргон в течение 20 мин. Смесь нагревали до  $110^\circ C$  и и перемешивали 40 мин. После охлаждения добавляли  $NH_4Cl$  (1.5 ммоль, 80 мг, 5 мл  $H_2O$ ) и раствор упаривали в вакууме при  $60^\circ C$ . Остаток экстрагировали EtOAc-EtOH (20:1) и экстракт разделяли колоночной хроматографией (EtOAc-EtOH 15:1). Выход 121 мг (74%).

$^1H$  ЯМР (800МГц,  $DMSO-d_6$ , Z-isomer):  $\delta$  1.94 (3H, с,  $H^8$ ), 3.08 (3H, с,  $H^5$ ), 4.32 (2H, д,  $J = 5.6$  Гц,  $H^6$ ), 6.85 (2H, д,  $J = 8.8$  Гц,  $H^2$ ), 6.99 (1H, с,  $H^4$ ), 8.11 (2H, д,  $J = 8.8$  Гц,  $H^3$ ), 8.41 (1H, т,  $J = 5.6$  Гц,  $H^7$ ), 10.16 (1H, br,  $H^1$ ).

HSQC  $^1H$ - $^{13}C$  (800МГц,  $DMSO-d_6$ ): 23.4 ( $H^8$ ), 26.5 ( $H^5$ ), 37.5 ( $H^6$ ), 116.0 ( $H^2$ ), 127.3 ( $H^4$ ), 134.7 ( $H^3$ ).

HSQC  $^1H$ - $^{15}N$  (800МГц,  $DMSO-d_6$ ): кросс-пик при 8.41 ( $H^7$ ).

HRMS (ESI) Вычислено для  $C_{14}H_{16}N_3O_3$ , 274.1192; Найдено, 274.1167.

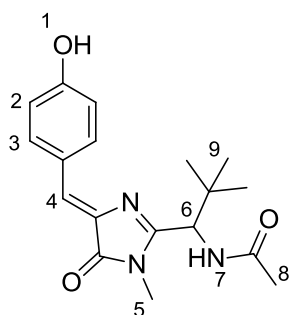


**(Z)-N-(1-(4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)-2-фенилэтил)ацетамид (3.1.5b)**

$^1H$  ЯМР (700МГц,  $DMSO-d_6$ , Z-изомер):  $\delta$  1.78 (3H, с,  $H^8$ ), 2.97 (3H, с,  $H^5$ ), 3.07 (1H, дд,  $J = 8.6$  и  $13.7$  Гц,  $H^9$ ), 3.29 (1H, дд,  $J = 6.4$  и  $13.9$  Гц,  $H^9$ ), 5.09 (1H, ddd,  $J = 6.4$ ,  $8.3$  и  $8.6$  Гц,  $H^6$ ), 6.86 (2H, д,  $J = 8.8$  Гц,  $H^2$ ), 7.00 (1H, с,  $H^4$ ), 7.19-7.31 (5H, м,  $H^{10}$ ,  $H^{11}$  и  $H^{12}$ ), 8.13 (2H, д,  $J = 8.8$  Гц,  $H^3$ ), 8.53 (1H, д,  $J = 8.6$  Гц,  $H^7$ ), 10.17 (1H, с,  $H^1$ ).

HSQC  $^1H$ - $^{13}C$  (800МГц,  $DMSO-d_6$ , Z-изомер): 22.7 ( $H^8$ ), 26.8 ( $H^5$ ), 37.7 ( $H^9$ ), 48.0 ( $H^6$ ), 116.1 ( $H^2$ ), 126.6 ( $H^{12}$ ), 127.8 ( $H^4$ ), 128.4 и 129.7 ( $H^{11}$  и  $H^{12}$ ), 135.0 ( $H^3$ ).

HRMS (ESI) Вычислено для  $C_{21}H_{22}N_3O_3$ , 364.1661; Найдено, 364.1683.



**(Z)-N-(1-(4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)-2,2-диметилпропил)ацетамид (3.1.5c)**

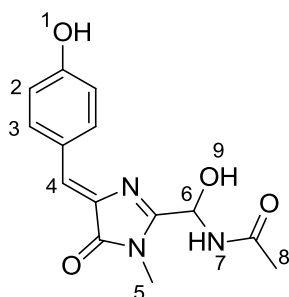
Получен аналогично **3.1.5a**, при температуре 140°C.

$^1H$  ЯМР (700МГц,  $CDCl_3$ , Z-изомер):  $\delta$  1.10 (9H, с,  $H^9$ ), 2.08 (3H, с,  $H^8$ ), 3.26 (3H, с,  $H^5$ ), 4.94 (1H, д,  $J = 9.25$  Гц,  $H^6$ ), 6.66 (1H, д,  $J = 9.25$  Гц,  $H^7$ ), 6.86 (2H, д,  $J = 8.6$  Гц,  $H^2$ ), 7.12 (1H, с,  $H^4$ ), 7.99 (2H,  $J = 8.6$  Гц,  $H^3$ ), 8.26 (1H, br,  $H^1$ ).

HRMS (ESI) Вычислено для  $C_{18}H_{24}N_3O_3$ , 330.1818; Найдено, 330.1826.

**Общая методика для автоокисления 3.1.5a-c**

Основание (триэтиламин, DBU,  $AcONa$  или  $Cs_2CO_3$ ) добавляли к 0.1M раствору **3.1.5a-c** в  $CH_2Cl_2$ , THF или DMF и пробулькивали газообразный кислород при постоянной температуре. Образование продуктов контролировали с помощью УФ- и ЯМР-спектроскопии и ТСХ.



**N-(гидрокси(4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)метил)ацетамид (3.1.6)**

Раствор **3.1.5a** в ТГФ содержащем 10 mM  $NEt_3$  и влагу оксигенировали при 30°C в течение 45 мин. При достижении около 90% конверсии **3.1.5a** по ТСХ смесь упаривали в вакууме и разделяли колоночной хроматографией ( $EtOAc-EtOH$  10:1). Гидроксиамид **3.1.6** и имид **3.1.7** в этих условиях образуются с выходами около 40% и 25% соответственно.

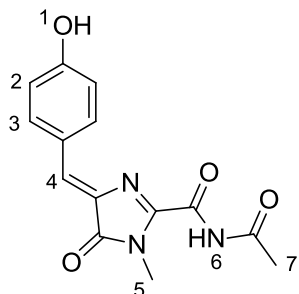
$^1H$  ЯМР (800МГц,  $DMSO-d_6$ , Z-изомер):  $\delta$  1.95 (3H, с,  $H^8$ ), 3.14 (3H, с,  $H^5$ ), 6.19 (1H, дд,  $J = 6.1$  и  $8.6$  Гц,  $H^6$ ), 6.78 (1H, д,  $6.1$  Гц,  $H^9$ ), 6.84 (2H, д,  $J = 8.8$  Гц,  $H^2$ ), 7.06 (1H, с,  $H^4$ ), 8.15 (2H, д,  $J = 8.8$  Гц,  $H^3$ ), 8.81 (1H, д,  $J = 8.6$  Гц,  $H^7$ ), 10.19 (1H, br,  $H^1$ ).



HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (800МГц, DMSO- $d_6$ ): 23.4 ( $\text{H}^8$ ), 27.3 ( $\text{H}^5$ ), 68.9 ( $\text{H}^6$ ), 116.0 ( $\text{H}^2$ ), 128.7 ( $\text{H}^4$ ), 135.2 ( $\text{H}^3$ ).

HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (800МГц, DMSO- $d_6$ ): кросс-пик при 8.82 ( $\text{H}^7$ ).

HRMS (ESI) Вычислено для  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4$ , 290.1141; Найдено, 290.1125.



**N-ацетил-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-2-карбоксамид (3.1.7)**

Имид **3.1.7** образуется наряду с гидроксиамидом **3.1.6** при автоокислении **3.1.5a** с выходом 25%.

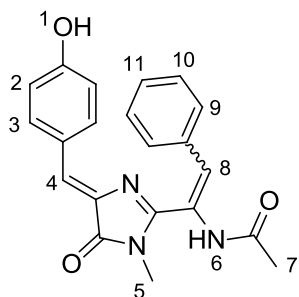
Также, имид **3.1.7** может быть получен окислением **3.1.5a** или **3.1.6** диоксидом селена по следующей методике: диоксид селена (0.6 ммоль, 67 мг) добавляли раствору **3.1.5a** или **3.1.6** (0.40 ммоль) в диоксане (4 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 40 мин растворитель упарили и продукт очищали колоночной хроматографией (EtOAc). Выходы 75% и 60% из **3.1.5a** и **3.1.6** соответственно.

$^1\text{H}$  ЯМР (700МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.61 (3H, с,  $\text{H}^7$ ), 3.56 (3H, с,  $\text{H}^5$ ), 6.96 (2H, д,  $J = 8.7$  Гц,  $\text{H}^2$ ), 7.45 (1H, с,  $\text{H}^4$ ), 8.09 (2H,  $J = 8.7$  Гц,  $\text{H}^3$ ), 9.67 (1H, br,  $\text{H}^1$ ).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (200МГц, DMSO- $d_6$ ): 25.9, 28.6, 116.7, 125.2, 134.4, 134.8, 136.6, 152.0, 158.7, 162.0, 169.9, 171.5.

HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (700МГц, DMSO- $d_6$ ): 25.9 ( $\text{H}^7$ ), 28.6 ( $\text{H}^5$ ), 116.7 ( $\text{H}^2$ ), 134.8 ( $\text{H}^4$ ), 136.7 ( $\text{H}^3$ ).

HRMS (ESI) Вычислено для  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_4$ , 288.0984; Найдено, 288.0983.



**N-(1-(4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)-2-фенилвинил)ацетамид (3.1.9)**

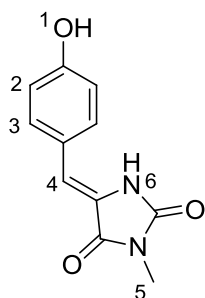
Сухой кислород пропускали через смесь **3.1.5b** (0.30 ммоль, 110 мг),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (0.2 ммоль, 65 мг) и DMF (5 мл) при  $115^\circ\text{C}$  в течение 45 мин (до полной конверсии **3.1.5b**). Смесь выливали в EtOAc – 0.1M HCl, водный слой экстрагировали EtOAc. Объединенные экстракты промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . После упаривания единственный окрашенный продукт очищали колоночной хроматографией (hexane-EtOAc 1:3), а затем препаративной ТСХ (чистый EtOAc). Выход 21 мг (20%) смеси трудноразделимых изомеров.

$^1\text{H}$  ЯМР (800МГц, DMSO- $d_6$ , основной изомер): 2.06 (3 H, с,  $\text{H}^7$ ), 3.07 (3H, с,  $\text{H}^5$ ), 6.84 (2H, д,  $J = 8.8$  Гц,  $\text{H}^2$ ), 6.90 (1H, с,  $\text{H}^8$ ), 7.01 (1H, с,  $\text{H}^4$ ), 7.40-7.66 (5H, м,  $\text{H}^9$ ,  $\text{H}^{10}$  и  $\text{H}^{11}$ ), 8.10 (2H, д,  $J = 8.8$  Гц,  $\text{H}^3$ ), 10.06 (1H, уш,  $\text{H}^1$ ).

Характеристические кросс-пики HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ : 2.06 – 22.8, 3.07 – 28.1, 6.90 – 127.2, 6.84 – 116.2, 7.01 – 127.4, 8.10 – 134.8.

Характеристические кросс-пики HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ : 2.06 – 169.7; 3.07 – 160.5 и 170.4; 6.90 – 130.0 и 160.5; 8.10 – 116.2, 127.4, 134.7 и 160.1.

HRMS (ESI) Вычислено для  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4$ , 362.1505; Найдено, 362.1492.



**5-(4-гидроксибензилиден)-3-метилимидазолидин-2,4-дион (3.1.12)**

Хромофор **3.1.10** добавляли к насыщенному раствору  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  в DMF и полученную смесь оксигенировали при  $80^\circ\text{C}$  в течение 3 ч. Смесь выливали в двухфазную систему EtOAc - 0.1M HCl, водный слой дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные экстракты промывали водой, насыщенным раствором NaCl, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Колоночной хроматографией ( $\text{CHCl}_3$ -EtOH 10:1) получены **3.1.11** [Gross и др., 2000] (21%) и **3.1.12** (48%).

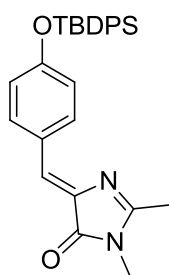
$^1\text{H}$  ЯМР (700МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.96 (3H, с,  $\text{H}^5$ ), 6.47 (1H, с,  $\text{H}^4$ ), 6.81 (2H, д,  $J = 8.5$  Гц,  $\text{H}^2$ ), 7.50 (2H, д,  $J = 8.5$  Гц,  $\text{H}^3$ ), 9.86 (1H, с,  $\text{H}^6$ ), 10.52 (1H, br,  $\text{H}^1$ ).

HRMS (ESI) Вычислено для  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$ , 219.0770; Найдено, 219.0756.

## 4.2. Конформационно-фиксированный хромофор GFP

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Михаилом Барановым, Кириллом Солнцевым и коллегами 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, а также диссертационной работы Михаила Баранова («Физико-химические свойства хромофора GFP и флуоресцентные красители на его основе», Москва, Институт биоорганической химии РАН, 2013), выполненной под руководством автора.

Выращенные из MeCN кристаллы *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> (C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, M = 263.03). светло-желтые, орторомбические, пространственная группа Pnma. Данные рентгеновской дифракции получали на дифрактометре “Bruker SMART APEX<sub>2</sub>” снабженном детектором CCD ( $\lambda(\text{MoK}\alpha) = 0.71073\text{\AA}$ , графитовый монохроматор) при 100(2) К: a = 17.743(5), b = 6.6328(17), c = 9.856(3) Å. Измерены интенсивности 11350 отражений и 1378 независимых отражений [R<sub>int</sub> = 0.0757] использовали для дальнейшего уточнения. Структура расшифрована прямым методом и уточнена МНК в полноматричном анизотропно-изотропном приближении с помощью комплекса программ SHELXTL PLUS 5.0. Уточнения удовлетворяли wR<sub>2</sub> = 0.0977 и GOF = 1.000 для всех независимых отражений (R<sub>1</sub> = 0.0397 рассчитан для г 928 наблюдаемых отражений с I > 2σ(I)). Полная кристаллографическая информация депонирована в Кембриджском банке структурных данных (депонент CCDC 829645).

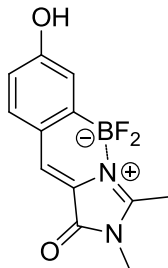


**(Z)-4-(4-((*tert*-бутилдифенилсилил)окси)бензильден)-1,2-диметил-1H-имидазол-5(4H)-он (3.2.3).** Раствор *p*-HOBDI (4.3 г, 20.0 ммоль), дифенилтрет-бутилхлорсилана (7.2 г, 26.2 ммоль), ДИПЭА (3.9 г, 30.2 ммоль) и имидазола (140 мг, 2.1 ммоль) в сухом THF (200 мл) перемешивали 30 ч. Смесь упаривали и добавляли 300 мл хлороформа. Раствор промывали водным HCl (5%, 100 мл), водой (2x100 мл) и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель упаривали, продукт очищали колоночной хроматографией силикагель, CHCl<sub>3</sub>) и получали 7.65 г (84%) **3.2.3.** Желтый порошок, т.пл. 150-152°C.

<sup>1</sup>H ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.00 (d, 2H, J=8.76 Гц), 7.67 (d, 4H, J=6.72 Гц), 7.49 (t, 2H, J=7.48 Гц), 7.44 (d, 4H, J=7.48 Гц), 6.85 (c, 1H), 6.78 (d, 2H, J=8.76 Гц), 3.06 (c, 3H), 2.30 (c, 3H), 1.05 (c, 9H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  15.72 ( $\text{CH}_3$ ), 19.41, 26.66 ( $\text{CH}_3$ ), 26.75 ( $3^*\text{CH}_3$ ), 120.17 ( $2^*\text{CH}$ ), 124.85, 128.16, 128.59 ( $4^*\text{CH}$ ), 130.82 ( $2^*\text{CH}$ ), 132.22 ( $\text{CH}$ ), 134.06 ( $2^*\text{CH}$ ), 135.49 ( $4^*\text{CH}$ ), 137.91, 157.08, 163.79, 170.24.

HRMS (ESI) Вычислено для  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2\text{Si}$  454,2077, найдено 454.2052.



**(Z)-4-(2-(дифтороборил)-4-гидроксибензилиден)-1,2диметил-1H-имидазол-5(4H)-он (p-НОВДИ-BF<sub>2</sub>, 3.2.2)**

**3.2.3** (1.36 г, 3.0 ммоль) растворяли в сухом дихлорметане (50 мл), добавляли молекулярные сита 4А (2 г) и раствор трибромида бора в дихлорметане (1М, 12 мл). Реакционную смесь перемешивали 120 ч при комнатной температуре. Смесь разбавляли 150 мл дихлорметана, промывали насыщенным  $\text{NaHCO}_3$  (50 мл) и водой (2x100 мл) и сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворитель упаривали в вакууме и добавляли 200 мл раствора тригидрата ТВАФ (3.2 г, 10 ммоль) в этилацетате. Смесь перемешивали 10 минут при комнатной температуре, нейтрализовали 1 мл уксусной кислоты, промывали водой (2x50 мл) и насыщенным раствором  $\text{NaCl}$  (2x50 мл) и сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворитель упаривали и очищали продукт колоночной хроматографией (этилацетат-гексан 4:1, нейтральный оксид алюминия). Выход **3.2.2** 330 мг, 42%. Желтый порошок, т.пл.  $\sim 250^\circ\text{C}$  с разложением.

$^1\text{H}$  ЯМР (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.2 (с, 1H, OH), 7.56 (с, 1H), 7.48 (д, 1H,  $J=8.31$  Гц), 7.00 (д, 1H,  $J=2.20$  Гц), 6.74 (дд, 1H,  $J_1=8.31$  Гц,  $J_2=2.45$  Гц), 3.22 (с, 3H), 2.71 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.38 ( $\text{CH}_3$ ), 26.96 ( $\text{CH}_3$ ), 115.63 ( $\text{CH}$ ), 118.98 ( $\text{CH}$ ), 124.50, 125.36, 129.72 ( $\text{CH}$ ), 134.79 ( $\text{CH}$ ), 161.92, 163.27, 165.25.

HRMS (ESI) Вычислено для  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$  264,0882, найдено 264.0905.

**pH-титрование p-НОВДИ-BF<sub>2</sub>**

Спектры поглощения и эмиссии p-НОВДИ-BF<sub>2</sub> в воде при разных pH показаны на рис. 4.2.1. По аналогии с другими гидроксисароматическими фотокислотами, в спектрах поглощения и эмиссии наблюдался переход из нейтральной (406 нм) и анионной (486 nm) формами при pH 6.4 и 2.3 соответственно, что указывает на  $pK_a$  основного и возбужденного состояний. Последнее может быть уточнено следующим образом

$$pK_a^* = \text{pH} - \log\left(\frac{\tau_0}{\tau_0'} - \frac{1}{k_{\text{ESPT}}\tau_0'}\right)$$

что приводит к уточненному значению  $pK_a^*$  2.1.

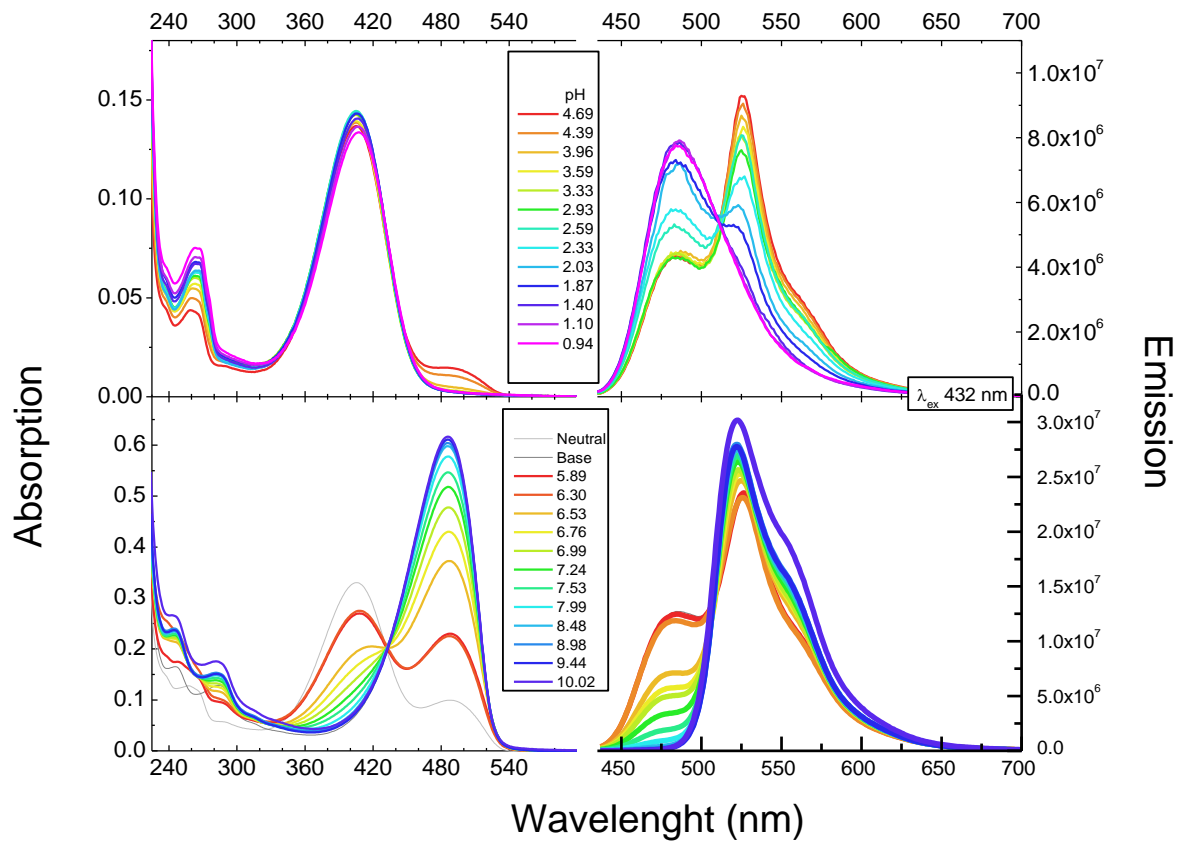
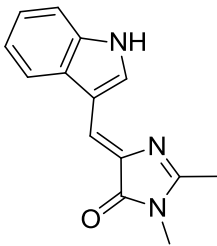


Рисунок 4.2.1. Спектры поглощения и эмиссии *p*-HOBDI-BF2 в воде при различных pH.

### 4.3. Флуоресцентный белок WasCFP с ионизированным остатком триптофана в составе хромофора

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Кареном Саркисяном и коллегами 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.

#### Синтез хромофора CFP



#### (5Z)-5-(1H-индол-3-илметилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он

Аналог хромофора CFP синтезировали согласно описанной методике [Kojima и др., 1998].

#### Мутагенез

Набор возможных позиций для замен на Lys и Arg в пространственной близости к хромофору анализировали с помощью виртуального мутагенеза кристаллической структуры Cerulean (PDB: 2WSO) в программе PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 0.99, Schrödinger, LLC). Были выбраны позиции, для которых наблюдался контакт между остатками Lys или Arg и хромофором как минимум в одной из конформаций, предсказанных PyMol.

Синтетические олигонуклеотиды для мутагенеза были изготовлены компанией Evrogen. ПЦР проводили с использованием амплификатора PTC-100 (MJ Research). Очистку продуктов ПЦР проводили гель-электрофорезом и экстракцией при помощи набора QIAquick (Qiagen). Плазмидную ДНК очищали с помощью набора QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Сайт-направленный мутагенез проводили с помощью ПЦР по методу из работы [Higuchi, Krummel, Saiki, 1988]. Случайный мутагенез проводили, используя набор Diversity PCR Random Mutagenesis kit (Clontech). Для экспрессии в бактериях ген флуоресцентного белка клонировали в вектор pQE-30 (Qiagen) по сайтам рестрикции BamHI и HindIII. Использовали эндонуклеазы рестрикции фирмы New England Biolabs.

Отбор клонов проводили визуальным скринингом колоний *E. coli*, экспрессирующих мутантные белки, с использованием флуоресцентного бинокулярного микроскопа Olympus SZX12.

### **Очистка и изучение свойств флуоресцентных белков *in vitro***

Флуоресцентные белки экспрессировали в штамме *E. coli* XL1 Blue strain (Invitrogen) в среде LB, центрифугировали, подвергали обработке ультразвуком в буфере PBS (pH 7.4), затем очищали с помощью металлоафинной смолы Talon (Clontech). Спектрофотометры Cary 100 UV/VIS и Varian Cary Eclipse Fluorescence использовали для измерения спектров поглощения, возбуждения и испускания. Стандартом для измерения квантовых выходов служили белки EGFP и mCerulean.

Коэффициенты экстинкции зеленой и циановой форм белка WasCFP измеряли следующим образом: синтетический хромофор CFP в щелочном растворе ДМФ демонстрирует двухпиковое поглощение с близкими максимумами при 460 и 473 нм и молярной экстинкцией  $46000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для обоих значений длин волн. Это значение было использовано для измерения концентрации зрелой формы белка в растворе WasCFP, денатурированного щелочью (в спектре абсорбции также 2 максимума при 464 и 487 нм). Нативный WasCFP представляет собой смесь циановой и зеленой форм, находящихся в динамическом равновесии. Мы измерили молярную экстинкцию обеих форм с использованием WasCFP с подавляющим преобладанием одной из форм (pH 5.5 и 8.1 при 4°C).

Для измерения pH-зависимости спектров использовали буферы в диапазоне pH от 5 до 11. Аликвоту очищенного белка растворяли в соответствующем буфере и измеряли спектры при комнатной температуре (25°C) или при 4°C через 15 минут инкубации. Конечное значение pH раствора измеряли с помощью микроэлектрода Sartorius.

Для измерения температурной зависимости спектров использовали спектрофотометр Cary 100 UV/VIS, оборудованный контроллером температуры. Спектры измеряли после выдерживания в течение 5 мин при соответствующей температуре.

Для измерения зависимости спектров от концентрации мочевины был изготовлен набор фосфатных буферов, содержащих от 0.125 М до 10 М мочевины. После добавления белка наблюдали небольшие изменения pH в диапазоне 7.9-8.2. Поглощение измеряли после инкубации в течение 15 мин при температуре 25°C.



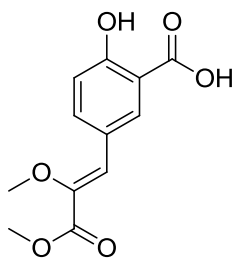
#### **4.4. CompX и AsLn2 – природные аналоги люциферина биолюминесцентного червя *F. heliota***

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Валентином Петушковым, Александрой Царьковой, Зинаидой Осиповой, Максимом Дубинным и коллегами, а также диссертационных работ Александры Царьковой и Зинаиды Осиповой под руководством автора.

##### **Сбор биологического материала, выделение и очистка CompX и AsLn2**

Индивидуумы *Fridericia heliota* отбирали вручную в отсутствие света из почвы в лесах в окрестностях г. Красноярск (Россия) с июня по ноябрь 2012 г. Общая масса червей составила ~90 г, что соответствует более 100,000 червей. Перед экстракцией промытые влажные черви были заморожены при -20 °C. Бесклеточный экстракт *F. heliota* из 20 г биомассы наносили на колонку (16 мм x 200 мм), заполненную сорбентом DEAE Sepharose™ Fast Flow (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), присоединенную к хроматографической системе BioLogic™ LP (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA). Колонку уравнивали буфером на основе 15 мМ гидрохлорида трис(гидроксиметил)-амонметана (Tris-HCl), pH 8.1 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Элюцию проводили линейным градиентом хлорида натрия 0-1 М. Основную фракцию (~ 18 мл) концентрировали твердофазной экстракцией: раствор подкисляли до pH 3 соляной кислотой и наносили на картридж 3-mL C<sub>16</sub> (Diapack-C<sub>16</sub>, BioChemMak S&T, Moscow, Russia). Дальнейшую очистку проводили на полупрепаративной колонке (9.4 mm x 250 mm), ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (Agilent Technologies) соединенной с хроматографом Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies). Элюцию проводили с использованием градиентной программы: буфер А 0.1% водный формиат аммония, pH 5 и буфер В ацетонитрил, градиент 5-40% В в течение 20 мин при 25 °C, и скорости потока 3 мл/мин. Поглощение наблюдали при 210, 230, 250, 270, 290, 310, 330 и 360 нм. Каждую фракцию повторно хроматографировали в той же системе с буфером А 0.1% водная муравьиная кислота pH 2.8, 4.0 и 7.0. При необходимости, pH корректировали добавлением гидроксида аммония. Для оценки содержания целевого вещества во фракциях 10 мкл каждой фракции хроматографировали на колонке ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 3.0 мм x 150 мм в той же системе растворителей при детекции поглощения при  $\lambda = 290$  нм.

## Синтез CompX



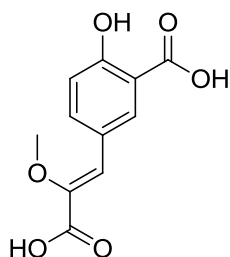
### (*E/Z*) 5-(2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензойная кислота (CompX-OMe)

Раствор метил 2-(диметоксифосфорил)-2-метоксиацетата (19.5 г, 92 ммоль) [Lowell и др., 2010], 5-формил-2-гидроксибензойной кислоты (13 г, 78 ммоль) и  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (76.6 г, 235 ммоль) в диоксане (100 мл) перемешивали в течение 44 часов при 60°C. Затем добавляли соляную кислоту до pH 3.0, экстрагировали EtOAc (3x150 мл). Экстракты промывали насыщенным раствором NaCl (2x100 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали в вакууме, полученный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 93:5:2$ ): бцв. крист. **CompX-OMe** (3.84 г, 19.6%), смесь (*E*) и (*Z*) изомеров 1:2 (по данным ЯМР).

(*E*)  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{DMSO-d}^6$ )  $\delta$  8.19 (д,  $J = 2.1$  Гц, 1H, ArH), 7.83 (дд,  $J = 8.7, 2.2$  Гц, 1H, ArH), 6.91 (д,  $J = 8.7$  Гц, 1H, ArH), 6.87 (с, 1H, CH), 3.70 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.66 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

(*Z*)  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{DMSO-d}^6$ )  $\delta$  7.58 (д,  $J = 2.2$  Гц, 1H, ArH), 7.27 (дд,  $J = 8.6, 2.3$  Гц, 1H, ArH), 6.83 (д,  $J = 8.6$  Гц, 1H, ArH), 6.14 (с, 1H, CH). 3.61 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.57 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

HRMS (ESI)  $m/z$ : 253.0721 найдено (рассчитано для  $\text{C}_{12}\text{O}_6 \text{H}_{13}^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  253.0707).



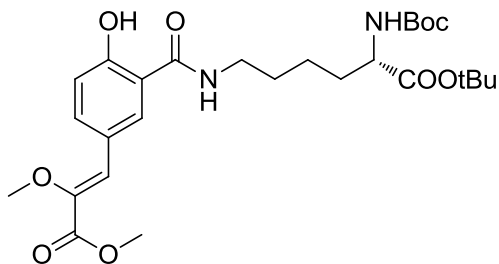
### (*Z*)-5-(2-карбоксивинил)-2-гидроксибензойная кислота (3.4.1a) и (*E*)-5-(2-карбоксивинил)-2-гидроксибензойная кислота (3.4.1b)

К **CompX-OMe** (30 мг, 0.12 ммоль) добавляли раствор гидроксида натрия (2М, 5мл) и перемешивали взвесь при 50°C в течение 2 ч. По окончании гидролиза (контроль: ТСХ) реакционную смесь подкисляли соляной кислотой до pH 3.0, экстрагировали EtOAc (2x15 мл) промывали насыщенным водным NaCl (2x10 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали. Полученную смесь изомеров разделяли колоночной хроматографией ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 97:2:1$ , Rf 0.60; 0.45): бцв. крист., **CompX (3.4.1a)** (14 мг, 49%) и **CompX (*E*)-изомер (3.4.1b)** (7 мг, 25%).

Данные спектров ЯМР **3.4.1a** и **3.4.1b** приведены в главе 3.4.

HRMS (ESI) найдено  $m/z$ : 239.0598 (рассчитано для  $C_{11}O_6H_{11}^+$ ,  $[M+H]^+$  239.0550).

### Синтез AsLn2



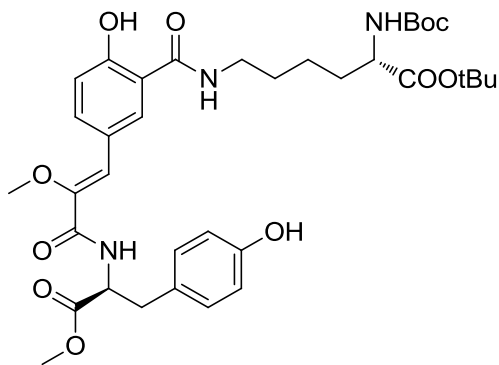
#### **(S,Z)-*tert*-бутил 2-((*tert*-бутоксикарбонил)амино)-6-(5-(2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксibenзамидо)гексаноат (3.4.3)**

Смесь **CompX-OMe** (0.50 г, 2.0 ммоль), DCC (0.70 г, 3.4 ммоль) и SuOH (0.46 г, 4.0 ммоль) в 30 мл ТГФ перемешивали 3 ч при комнатной температуре. После завершения реакции (контроль: ТСХ) добавляли *N*- $\alpha$ -Boc-L-лизина (1.25 г, 5.0 ммоль) и триэтиламин (1 г, 10 ммоль), после чего перемешивали 12 ч при комнатной температуре. Смесь подкисляли соляной кислотой до pH 3.0, экстрагировали этилацетатом (3x150 мл), экстракты промывали насыщенным NaCl (2x100 мл), сушили над  $Na_2SO_4$  и концентрировали в вакууме. Продукт (((S,Z)-2-((*tert*-бутоксикарбонил)амино)-6-(5-(2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксibenзамидо)гексановая кислота) выделяли колоночной хроматографией ( $CHCl_3/MeOH/AcOH = 97:2:1$ , Rf 0.45). Бцв. жидк. (1.0 г, 53%). Полученную кислоту (0.81 г, 1.7 ммоль) растворяли в ТГФ (10 мл), добавляли *N,N'*-диизопропил-*O-tert*-бутилизоуреину (1.7 г, 8.5 ммоль), полученный раствор перемешивали 14 ч при 25°C. Осадок диалкилмочевины фильтровали, фильтрат сушили над безводным  $Na_2SO_4$ , упаривали, и продукт очищали с помощью колоночной хроматографии ( $CHCl_3/MeOH/AcOH = 97:2:1$ , Rf 0.60): бцв. масло. **3.4.3** (0.7 г, 78%).

$^1H$  ЯМР (700 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  12.62 (с, 1H), 7.83 (дд,  $J = 8.7, 1.9$  Гц, 1H), 7.81 (д,  $J = 1.9$  Гц, 2H), 6.98 (д,  $J = 8.7$  Гц, 1H), 6.91 (с, 1H), 6.61 (уш. с, 1H), 5.09 (уш. с, 1H), 4.14-4.19 (м, 1H), 3.84 (с, 3H), 3.77 (с, 3H), 3.49-3.43 (м, 2H), 1.86-1.80 (м, 1H), 1.72-1.63 (м, 3H), 1.51-1.46 (м, 2H), 1.45(с, 9H), 1.42(с, 9H);

$^{13}C$  ЯМР (176 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  171.8, 169.8, 164.8, 162.3, 155.5, 144.2, 135.7, 127.7, 124.2, 123.3, 118.9, 114.4, 82.0, 79.8, 59.2, 53.8, 52.1, 39.5, 32.8, 28.9, 28.3, 28.0, 22.7.

HRMS (ESI) найдено  $m/z$ : 537.2826 (рассчитано для  $C_{27}N_2O_9H_{41}^+$ ,  $[M+H]^+$  537.2807).



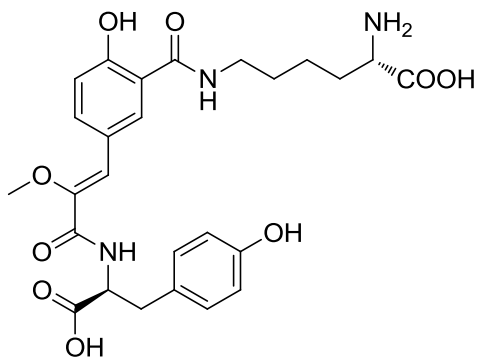
**(S)-*терт*-бутил 2-((*терт*-бутоксикарбонил)амино)-6-(2-гидрокси-5-((Z)3-(((S)3-(4-гидроксифенил)-1-метокси-1-оксопропан-2-ил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамидо)гексаноат (3.4.4)**

К **3.4.3** (175 мг, 0.33 ммоль) добавили раствор NaOH (33 мг, 0.83 ммоль) в 5 мл смеси H<sub>2</sub>O/EtOH (3:1) и перемешивали 3 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь подкисляли водным раствором AcOH до pH 4.0, экстрагировали этилацетатом (4x50 мл)? экстракты промывали насыщенным раствором хлорида натрия (2x50 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали в вакууме. Остаток подвергали колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 94:5:1, R<sub>f</sub> 0.55). Полученную (S,Z)-3-(3-((6-*терт*-бутокси)-5-((*терт*-бутоксикарбонил)амино)-6-оксогексил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловую кислоту – бцв. крист. (150 мг, 88%), вводили в следующую стадию. К раствору 100 мг (0.2 ммоль) кислоты в 3 мл ТГФ, добавляли DCC (70 мг, 0.34 ммоль) и SuOH (46 мг, 0.4 ммоль), после чего 3 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали ТСХ. По достижении полной конверсии исходного вещества добавляли L-тирозин (116 мг, 0.5 ммоль) и триэтиламин (100 мг, 1 ммоль), перемешивали 12 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь подкисляли соляной кислотой до pH 3.0, экстрагировали EtOAc (3x15 мл), экстракты сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали в вакууме, остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH, = 97:2:1, R<sub>f</sub> 0.55): бцв. масло. **3.4.4** (80 мг, 60%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.59 (с, 1H), 7.69 (с, 2H), 7.00 (д, J = 8.5 Гц, 2H), 6.96 (д, J = 8.9 Гц, 1H), 6.88 (д, J = 8.2 Гц, 1H), 6.80 (д, J = 8.5 Гц, 2H), 6.75 (с, 1H), 6.68 (уш. с, 1H), 5.11 (д, J = 7.1 Гц, 1H), 4.91 (дд, J = 13.8, 6.0 Гц, 1H), 4.17 (д, J = 6.0 Гц, 1H), 3.78 (с, 3H), 3.58 – 3.50 (м, 1H), 3.52 (с, 3H), 3.45 – 3.38 (м, 1H), 3.20 (дд, J = 14.2, 5.8 Гц, 1H), 3.09 (дд, J = 14.2, 6.2 Гц, 1H), 1.86 – 1.80 (м, 1H), 1.74 – 1.63 (м, 3H), 1.51 – 1.42 (м, 20H).

<sup>13</sup>C ЯМР (201 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 175.3, 172.0, 169.8, 163.6, 161.9, 155.8, 155.3, 147.1, 135.4, 130.5, 127.4, 127.2, 124.0, 119.4, 118.9, 115.7, 114.5, 82.3, 80.2, 59.2, 53.9, 53.1, 52.5, 39.4, 36.9, 32.7, 29.7, 28.6, 28.3, 28.0, 22.8, 20.4.

HRMS (ESI) найдено m/z: 700.3519 (рассчитано для C<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>H<sub>50</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup> 700.3440).



**(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 (3.4.2)**

К раствору **3.4.4** (80 мг, 0.11 ммоль) в ледяной АсОН (3 мл) добавляли 1 мл 33% раствора НВг в ледяной уксусной кислоте и перемешивали в течение 6 мин, затем смесь разбавляли диэтиловым эфиром (30 мл), выпавший осадок фильтровали, промывали диэтиловым эфиром (5x30 мл), сушили в вакууме. К остатку (бцв. крист., 65 мг, 91%). добавляли водный NaOH (2М, 4 мл) и перемешивали в течение 5 минут, после чего смесь подкисляли до рН 5.0, экстрагировали этилацетатом (5x25 мл), экстракт сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Продукт очищали ВЭЖХ: бцв. крист. **3.4.2** (40 мг, 72%).

Спектральные данные ЯМР **3.4.2** приведены в Таблице 3.4.3 в Главе 3 - Результаты и Обсуждение.

HRMS (ESI) найдено m/z: 530.2098 (рассчитано для C<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>H<sub>32</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup> 530.2133).

#### **4.5. Люциферин *Fridericia heliota***

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Валентином Петушковым, Александрой Царьковой, Зинаидой Осиповой, Максимом Дубинным и коллегами, а также диссертационных работ Александры Царьковой и Зинаиды Осиповой под руководством автора.

##### **Выделение и очистка люциферазы и люциферина**

Сбор биомассы червей *Fridericia heliota* описан в предыдущем разделе. Замороженную биомассу гомогенизировали с добавлением воды (5 мл на 1 г биомассы), гомогенат замораживали при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , затем размораживали и инкубировали 30 мин для полной экстракции ферментов, после чего центрифугировали при 16,000g в течение 5 мин.

Разделение люциферина и люциферазы проводили согласно методике, разработанной Петушковым и коллегами [Marques и др., 2011]. Объединенные фракции, содержащие люциферин, подкисляли до pH 3 соляной кислотой и концентрировали до 1 мл с помощью картриджа твердофазной экстракции (Diapack-C16, BioChemMak S&T, Moscow, Russia), предварительно уравновешенного 10 мМ соляной кислотой в 3% ацетонитриле.

##### **Хроматографическая очистка люциферина**

Дальнейшая очистка люциферина проводилась с использованием полупрепаративной колонки ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 9.4 мм x 250 мм, (Agilent Technologies), соединенной с хроматографом Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies). Элюцию проводили градиентным методом: буфер А 0.1% водный формиат аммония, pH 5 и буфер В ацетонитрил, градиент 5-30% В в течение 20 мин при скорости потока 3 мл/мин. Регистрировали поглощение при 210, 230, 250, 270, 290, 310, 330 и 360 нм. Фракции, содержащие люциферин (измерение активности люциферина см. ниже) упаривали и проводили повторную хроматографию в той же системе, но с использованием в качестве буфера А 0.1% водной муравьиной кислоты pH 4.0. Финальная очистка проводилась на колонке -ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 3.0 мм x 150 мм с использованием вышеописанной программы при pH 7. Выход 5.4 мкг чистого люциферина (рис. 4.5.1).

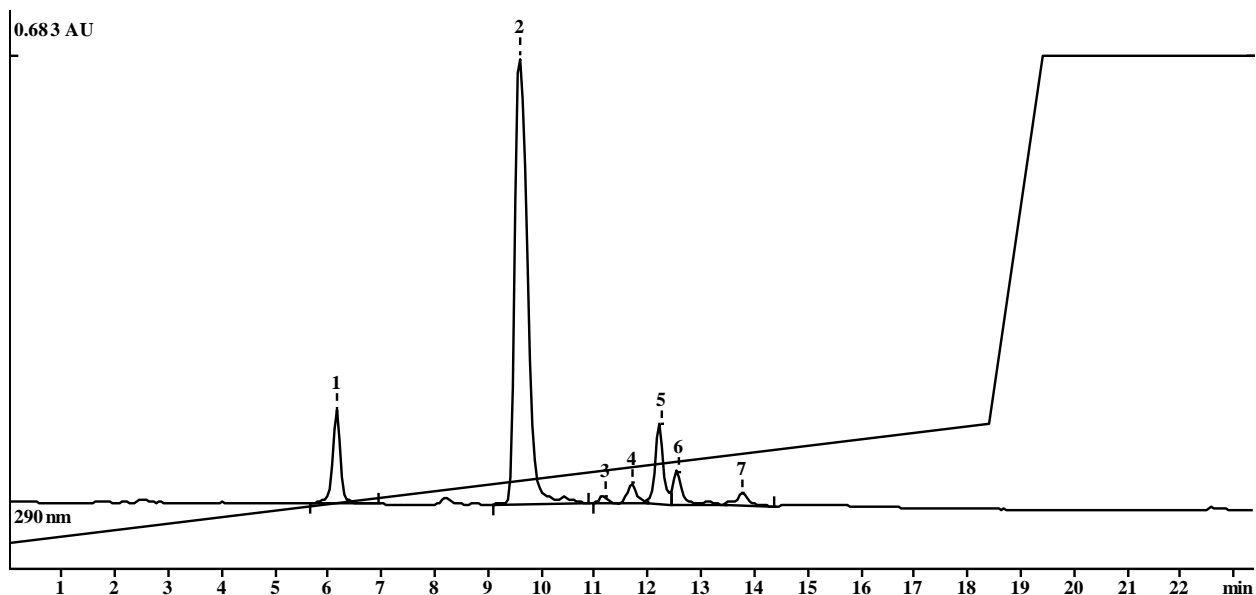


Рисунок 4.5.1. Хроматограмма ВЭЖХ последней стадии очистки люциферина время удержания ~ 9.6 мин, пик 2).

### Измерение активности люциферина

Оценка количества люциферина в образцах проводилось на основе его активности в ферментативной реакции с люциферазой. Состав реакционной смеси для измерения люминесцентной активности: к смеси растворов 10 мМ АТФ (2.5 мкл), 100 мМ хлорид магния (2.5 мкл), 10% Triton<sup>®</sup> X-100 (10 мкл) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 20 мМ Tris-HCl pH 8.1 (180 мкл) и белкового экстракта червя *F. heliota* образца добавляли 10 мкл анализируемого образца. Реакционную смесь в прозрачной пробирке помещали в люминометр (Oberon, Krasnoyarsk, Russia) и регистрировали интенсивность люминесцентного сигнала в течение 20 секунд.

### Измерение константы Михаэлиса в реакции люциферина с люциферазой

Реакционную смесь для измерения люминесценции получали смешением следующих растворов: 200 мкл буфера ТМХ, 2 мкл 10 мМ АТФ и 1 мкл грубого препарата люциферазы. Добавляли 1 раствора люциферина в диапазоне концентраций от 0.7 нМ. до 0.16 мМ. Константу Михаэлиса вычисляли по описанному методу [Oestreicher, Pinto, 1983], значение составило  $K_m = 0.16 \text{ мкМ} \pm 0.025$  (рис. 4.5.2).

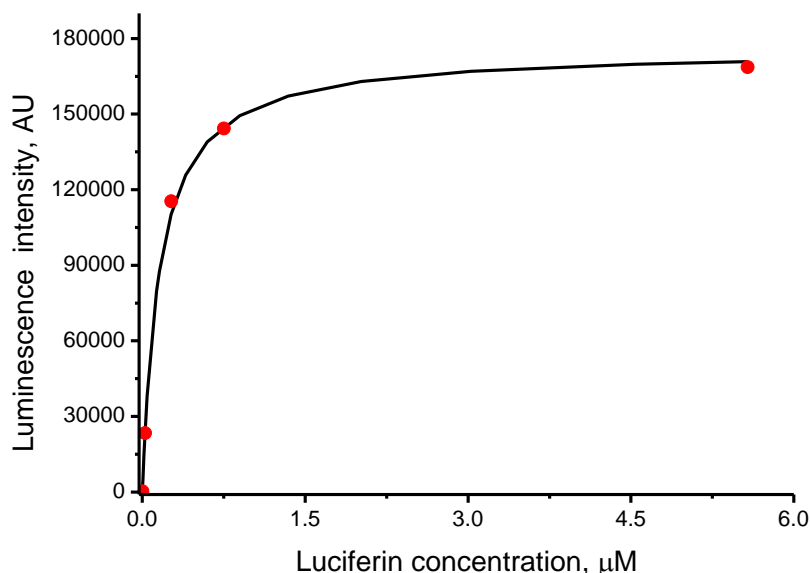


Рисунок 4.5.2. Зависимость интенсивности люминесценции в люциферин-люциферазной реакции *F. heliota* от концентрации люциферина.

### Расшифровка химического строения люциферина

Следующие спектры ЯМР были зарегистрированы для образца природного люциферина с использованием ампулы Shigemi ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , pH 5.0):  $^1\text{H}$  (2.5 ч),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (23 ч),  $^{13}\text{C}$ -HSQC (46 ч) и  $^{13}\text{C}$ -HMBC (72 ч).

Спектры ЯМР для синтетических соединений были получены на приборах 800 (3.5.1, 3.5.2) и 700 (3.5.3, 3.5.4) МГц Bruker Avance, оборудованных криогенно-охлаждаемыми датчиками. Для соединений 3.5.1-3.5.4 были получены следующие спектры:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D COSY, 2D  $^{13}\text{C}$ -HSQC, 2D  $^{13}\text{C}$ -HMBC ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , pH 5.0), дополнительно, для 3.5.1 тот же набор спектров был получен в присутствии 60 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 2.0. Структуры 3.5.1-3.5.4 были подтверждены набором сигналов HMBC. В таблице 3.5.1 приведены отнесения сигналов  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  3.5.1-3.5.4 и их сравнение с таковыми для люциферина.

### Синтез люциферина 3.5.1 и его аналогов 3.5.2-3.5.4

#### Общий метод А: Пептидное сочетание

Смесь карбоновой кислоты (1 ммоль), DCC (1.7 ммоль) и SuOH (1.8 ммоль) в 20 мл ТГФ перемешивали 12 ч при комнатной температуре. По достижении конверсии кислоты (контроль по ТСХ) добавляли 2.5 ммоль соответствующей аминокислоты и 5 ммоль триэтиламина, и продолжали перемешивание 18 ч. Затем смесь подкисляли 5% соляной кислотой до pH 3.0, экстрагировали EtOAc (3x150 мл), экстракты последовательно промывали насыщенным водным NaCl (2x100 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали в вакууме, и продукт реакции выделяли колоночной хроматографией.



**Общий метод В:** Защита карбоксильной группы *трет*-бутиловым эфиром

К раствору карбоновой кислоты (1 ммоль) в ТГФ 10мл добавляли *N,N'*-диизопропил-*O*-*трет*-бутилизомочевину (6 ммоль), смесь перемешивали 14 ч при комнатной температуре. Осадок диалкилмочевины отделяли фильтрованием, фильтрат сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали в вакууме, продукт выделяли колоночной хроматографией.

**Общий метод С:** Гидролиз метилового эфира

К раствору 1 ммоль метилового эфира карбоновой кислоты в 5 мл смеси  $\text{H}_2\text{O}$ - $\text{EtOH}$  (3:1) добавляли водный  $\text{NaOH}$  (2.5 ммоль), смесь перемешивали 3 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали ТСХ. По окончании гидролиза добавляли уксусную кислоту до pH 4.0, продукт экстрагировали этилацетатом (4x50 мл), экстракты промывали насыщенным водным  $\text{NaCl}$  (2x50 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали в вакууме, продукт выделяли колоночной хроматографией.

**Общий метод D:** Удаление кислотоллабильных защитных групп *N*-Вос и *O*-*t*-Bu

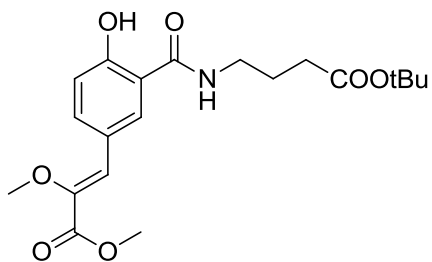
К раствору *N*-Вос-*O*-*t*-бутил-защищенного пептида (0.1 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (3 мл) добавляли 1 мл 33% раствора  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в ледяной уксусной кислоте, смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 минут, затем разбавляли диэтиловым эфиром (30 мл). Осадок фильтровали, промывали диэтиловым эфиром (5x30 мл), сушили в вакууме при комнатной температуре.

**Общий метод E:** Ацилирование свободной аминогруппы остатком щавелевой кислоты

Водный раствор пептида со свободной аминогруппой (0.1 ммоль), содержащий 4М  $\text{K}_2\text{CO}_3$  охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ , и при интенсивном перемешивании медленно прикапывали этилоксалилхлорид (4 ммоль). Смесь перемешивали в течение 5 минут, затем подкисляли водным  $\text{HCl}$  (10%) до pH 1.0, экстрагировали  $\text{EtOAc}$  (5x30 мл) и экстракт упаривали в вакууме.

**Общий метод F:** Удаление этилового эфира с карбоксильной группы остатка щавелевой кислоты

К 0.1 ммоль этилоксаламида добавляли водный  $\text{NaOH}$  (2М, 4 мл), перемешивали 5 мин при комнатной температуре. Затем реакционную смесь подкисляли 10% соляной кислотой до pH 1.0, экстрагировали этилацетатом (5x25 мл), экстракт сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали в вакууме. Выделение продукта проводили с помощью ВЭЖХ.



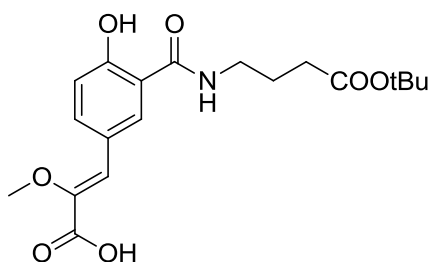
**(Z)-*tert*-бутил 4-(5-(2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)бутаноат (3.5.6)**

Получали следуя общим методам А и В из **CompX-OMe** (4 г) и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (4 г) выделяли колоночной хроматографией ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 97:2:1$ ,  $R_f$  0.40): бцв. масло, 0.9 г, (выход 14%).

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.74 (с, 1H), 7.86 (дд,  $J = 8.7, 2.0$  Гц, 1H), 7.83 (д,  $J = 2.0$  Гц, 1H), 7.24 (уш. с,  $J = 2.0$  Гц, 1H), 6.97 (д,  $J = 8.7$  Гц, 1H), 6.90 (с, 1H), 3.84 (с, 3H), 3.78 (с, 3H), 3.51-3.49 (м, 2H), 2.40 (т,  $J = 6.7$ , 2H), 1.96-1.93 (м, 2H), 1.45 (с, 9H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.6, 169.9, 164.9, 162.3, 144.2, 135.6, 128.0, 124.3, 123.3, 118.8, 114.4, 81.2, 59.2, 52.1, 39.8, 33.4, 28.1, 23.8;

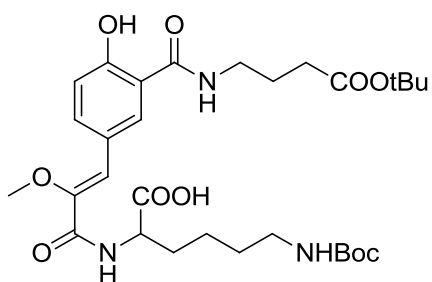
HRMS ( $m/z$ ): рассчитано для  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NO}_7$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 394.1866, найдено 394.1869.



**(Z)-3-(3-((4-*tert*-бутокси)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота (3.5.7)**

Получали следуя методу С из 550 мг **3.5.6**, в выделяли колоночной хроматографией ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 94:5:1$ ,  $R_f$  0.50): бцв. масло, 200 мг, (выход 38%).

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.84 (с, 1H), 7.89-7.86 (м, 2H), 7.30 (уш. с, 1H), 7.07 (с, 1H), 7.00 (д,  $J = 8.6$  Гц, 1H), 3.81 (с, 3H), 3.53-3.50 (м, 2H), 2.42 (т,  $J = 6.5$ , 2H), 1.98-1.93 (м, 2H), 1.45 (с, 9H).



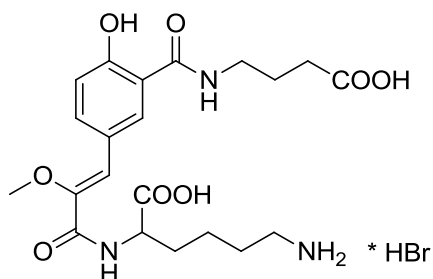
**(*S,Z*)-2-(3-(3-((4-(*трет*-бутокси)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-6-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)гексановая кислота (3.5.8)**

Получали следуя методу А из 100 мг **3.5.7**, выделяли колоночной хроматографией (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 94:5:1, R<sub>f</sub> 0.55): бцв. масло, 80 мг, (выход 50%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО): δ 12.74 (с, 1H), 8.79 (т, *J* = 3.8 Гц, 1H), 8.18 (д, *J* = 8.0 Гц, 1H), 8.18 (д, *J* = 2.0 Гц, 1H), 7.90 (дд, *J* = 8.7, 2.0 Гц, 1H), 6.96 (д, *J* = 8.7 Гц, 1H), 6.75 (т, *J* = 5.5 Гц, 1H), 6.97 (с, 1H), 4.29-4.26 (м, 1H), 3.62 (с, 3H), 3.33-3.27 (м, 2H), 2.92-2.86 (м, 2H), 2.27 (т, *J* = 7.3, 2H), 1.80-1.73 (м, 4H), 1.39-1.24 (м, 22H);

<sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.5, 171.9, 168.6, 163.3, 159.9, 155.5, 147.9, 133.8, 129.8, 124.2, 117.8, 117.3, 115.4, 79.6, 77.3, 58.8, 52.1, 39.9, 38.3, 32.2, 30.2, 29.0, 28.2, 27.7, 24.3, 23.0;

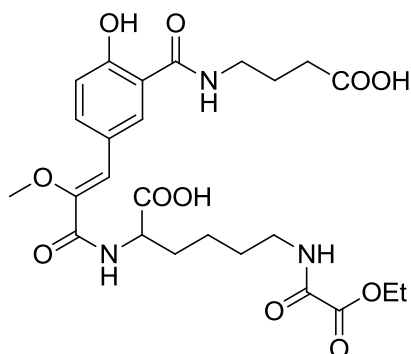
HRMS (m/z): рассчитано для C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 608.3183, найдено 608.3205.



**(*S,Z*)-6-амино-2-(3-(3-((3-карбокسيпропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановая кислота (3.5.9)**

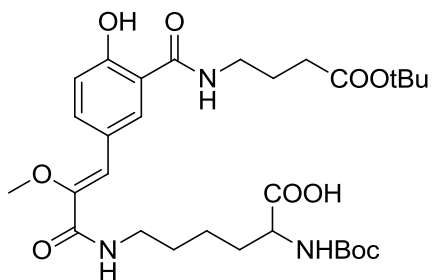
Получали следуя методу D из 80 мг **3.5.8**: бцв. крист., 69 мг, (выход 98%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, D<sub>2</sub>O): δ 8.01 (д, *J* = 1.8 Гц, 1H), 7.84 (дд, *J* = 8.5, 1.8 Гц, 1H), 7.05 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H), 6.88 (с, 1H), 4.50-4.46 (м, 1H), 3.70 (с, 3H), 3.48-3.43 (м, 4H), 2.48 (т, *J* = 7.3, 2H), 2.05-1.86 (м, 4H), 1.75-1.69 (м, 2H), 1.54-1.45 (м, 2H).



**(*S,Z*)-2-(3-(3-((3-карбокسيпропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-6-(2-этокси-2-оксоацетидамино)гексановая кислота (3.5.10)**

Получали следуя методу E из 69 мг **3.5.9**: бцв. масло., вводили в следующую стадию без выделения.



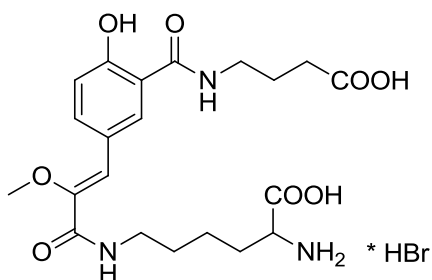
**(S,Z)-6-(3-(3-((4-(*трет*-бутокси)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-2-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)гексановая кислота (3.5.11)**

Получали следуя методу А из 100 мг **3.5.7**, выделяли колоночной хроматографией (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 94:5:1, Rf 0.55): бцв. масло., 93 мг, (выход 58%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 12.75 (с, 1H), 7.78 (дд, *J* = 8.7, 1.6 Гц, 1H), 7.71 (д, *J* = 1.6 Гц, 1H), 7.36 (уш. с, 1H), 6.98 (д, *J* = 8.7 Гц, 1H), 6.97 (с, 1H), 6.78 (уш. с, 1H), 5.27 (уш. с, 1H), 4.32-4.28 (м, 1H), 3.62 (с, 3H), 3.53-3.47 (м, 2H), 3.41-3.37 (м, 2H), 2.39 (т, *J* = 6.8, 2H), 1.97-1.89 (м, 3H), 1.78-1.73 (м, 1H), 1.65-1.59 (м, 2H), 1.52-1.44 (м, 2H), 1.44 (с, 9H), 1.42 (с, 9H);

<sup>13</sup>C ЯМР (201 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 176.3, 173.7, 169.9, 164.5, 162.0, 155.9, 147.1, 134.9, 128.1, 124.0, 119.7, 119.9, 114.5, 81.3, 80.2, 59.4, 53.4, 39.6, 39.1, 33.3, 31.8, 29.1, 28.3, 28.1, 24.1, 22.5;

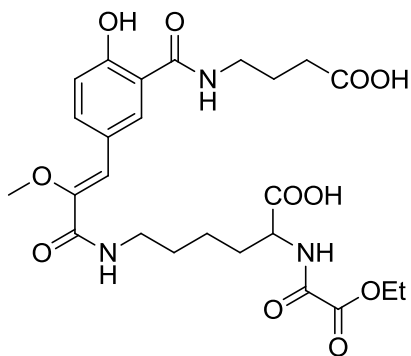
HRMS (*m/z*): рассчитано для C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 608.3183, найдено 608.3226.



**(S,Z)-2-амино-6-(3-(3-((3-карбоксипропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановая кислота (3.5.12)**

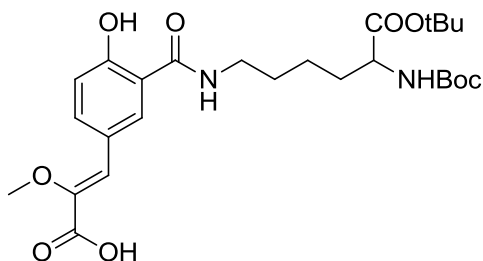
Получали следуя методу D из 90 мг **3.5.11**: бцв. крист., 76 мг, (выход 96%), вводили в следующую стадию без выделения.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, D<sub>2</sub>O): δ 7.99 (д, *J* = 2.0 Гц, 1H), 7.82 (дд, *J* = 8.5, 2.0 Гц, 1H), 7.04 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H), 6.85 (с, 1H), 3.91-4.78 (м, 1H), 3.66 (с, 3H), 3.48-3.43 (м, 2H), 3.37-3.33 (м, 2H), 2.48 (т, *J* = 7.3, 2H), 1.98-1.86 (м, 4H), 1.67-1.61 (м, 2H), 1.51-1.40 (м, 2H).



**(*S,Z*)-6-(3-(3-((3-карбоксивпропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-2-(2-этокси-2-оксоацетидамино)гексановая кислота (3.5.13)**

Получали следуя методу E из 76 мг **3.5.12**: бцв. масло, вводили в следующую стадию без выделения.



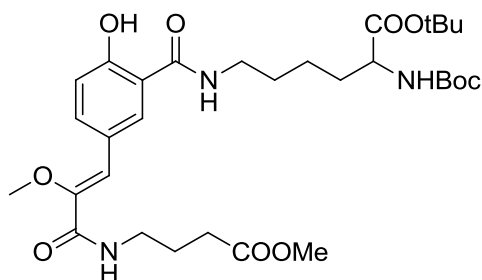
**(*S,Z*)-3-(3-((6-(*трет*-бутоксид)-5-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-6-оксогексил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота (3.5.14)**

Получали следуя методу C из 175 мг **3.4.3**, выделяли колоночной хроматографией (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 94:5:1, R<sub>f</sub> 0.40): бцв. крист., 150 мг, (выход 88%), т.пл. = 81-85°C.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО): δ 12.84 (уш.с, 1H), 8.75 (т, J 5.4 Гц, 1H), 8.08 (д, J = 1.8 Гц, 1H), 7.96 (дд, J = 8.7, 1.8 Гц, 1H), 7.05 (уш.д., J 7.6 Гц, 1H), 6.94 (д, J = 8.7 Гц, 1H), 6.85 (с, 1H), 3.78-3.74 (м, 1H), 3.70 (с, 3H), 3.32-3.25 (м, 2H), 1.67-1.61 (м, 1H), 1.60-1.49 (м, 3H), 1.40-1.33 (м, 20H);

<sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО): 171.8, 168.5, 164.9, 160.4, 155.5, 144.5, 134.1, 130.1, 124.1, 121.6, 117.8, 115.3, 80.1, 77.9, 58.5, 54.2, 38.7, 30.4, 28.3, 28.1, 27.6, 22.9;

HRMS (m/z): рассчитано для C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 523.2656, найдено 523.2685.



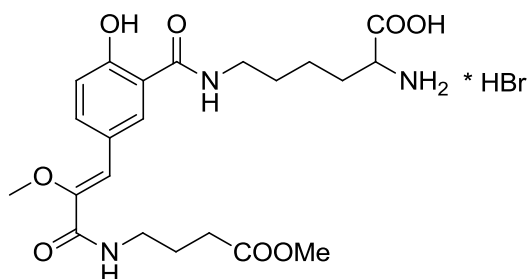
**(S,Z)-*терт*-бутил 2((*терт*-бутоксикарбонил)амино)-6-(2-гидрокси-5-(2-метокси-3-((4-метокси-4-оксобутил)амино)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамидо)гексаноат (3.5.15)**

Получали следуя методу А из 150 мг **3.5.14**, выделяли колоночной хроматографией (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 94:5:1, Rf 0.55): бцв. масло, 140 мг, (выход 79%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО): δ 12.76 (уш. с, 1H), 8.81 (уш. с, 1H), 8.22 (т, *J* 5.6 Гц, 1H), 8.03 (д, *J* = 1.6 Гц, 1H), 7.86 (дд, *J* = 8.7, 1.6 Гц, 1H), 7.06 (д, *J* 7.5 Гц, 1H), 6.93 (д, *J* = 8.7 Гц, 1H), 6.68 (с, 1H), 3.78-3.74 (м, 1H), 3.59 (с, 3H), 3.57 (с, 3H), 3.30-3.25 (м, 2H), 3.22-3.17 (м, 2H), 2.34 (т, *J* = 7.5, 2H), 1.77-1.73 (м, 2H), 1.66-1.49 (м, 4H), 1.40-1.33 (м, 20H);

<sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО): 173.0, 171.8, 168.5, 163.1, 159.9, 155.5, 148.2, 133.7, 129.6, 124.2, 117.8, 116.9, 115.3, 80.1, 77.9, 58.8, 54.2, 51.2, 38.2, 38.1, 30.7, 30.4, 28.3, 28.1, 27.6, 24.4, 22.9;

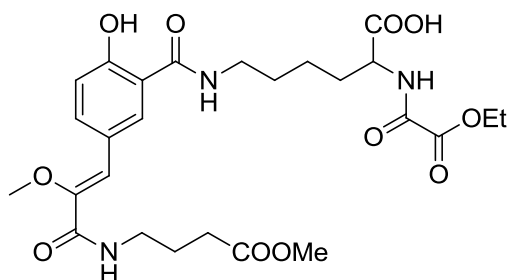
HRMS (m/z): рассчитано для C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 622.3334, найдено 622.3381.



**(S,Z)-2-амино-6-(2-гидрокси-5-(2-метокси-3-((4-метокси-4-оксобутил)амино)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамидо)гексановая кислота (3.5.16)**

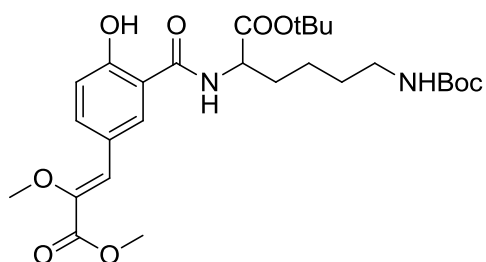
Получали следуя методу D из 70 мг соединения **3.5.15**, бцв. крист., 52 мг, (выход 84%), вводили в следующую стадию без выделения.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, D<sub>2</sub>O): δ 8.60 (т, *J* = 5.2 Гц, 1H), 8.42 (т, *J* = 6.3 Гц, 1H), 7.97 (д, *J* = 2.0 Гц, 1H), 7.82 (дд, *J* = 8.7, 2.0 Гц, 1H), 7.03 (д, *J* 7.5 Гц, 1H), 6.64 (с, 1H), 3.95 (т, *J* = 6.1 Гц, 1H), 3.68 (с, 3H), 3.65 (с, 3H), 3.45-3.35 (м, 4H), 2.46 (т, *J* = 7.4, 2H), 2.02-1.88 (м, 4H), 1.71-1.66 (м, 2H), 1.55-1.46 (м, 2H).



**(*S,Z*)-2-(2-этокси-2-оксоацетидамино)-6-(2-гидрокси-5-(2-метокси-3-((4-метокси-4-оксобутил)амино)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамидо)гексановая кислота (3.5.17)**

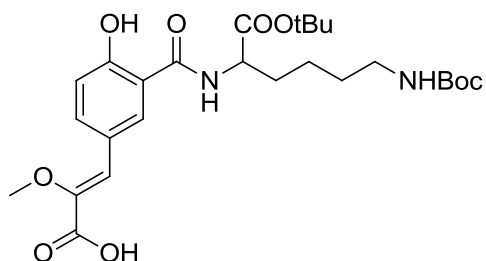
Получали следуя методу E из 52 мг **3.5.16**: бцв. масло, вводили в следующую стадию без выделения.



**(*S,Z*)-трет-бутил 6-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-(5-(2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексаноат (3.5.18)**

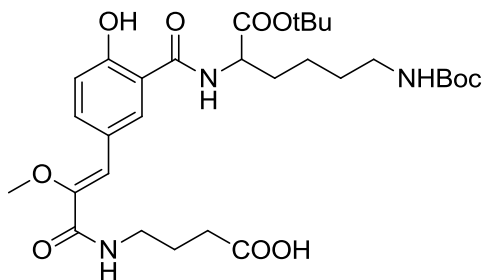
Получали следуя методу A из **CompX-OMe** (630 мг) и гидрохлорида трет-бутилового эфира Nε-Вос-лизина (2.10 г), выделяли колоночной хроматографией (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 94:5:1, R<sub>f</sub> 0.55): бцв. масло, 200 мг, (выход 15%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 12.34 (с, 1H), 7.92 (д, *J* = 1.6 Гц, 1H), 7.85 (дд, *J* = 8.5, 1.6 Гц, 1H), 7.36 (уш. с, *J* = 7.1 Гц, 1H), 6.99 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H), 6.94 (с, 1H), 4.64-4.61 (м, 1H), 4.56-4.51 (м, 1H), 3.87 (с, 3H), 3.82 (с, 3H), 3.15-3.08 (м, 2H), 2.00-1.95 (м, 1H), 1.84-1.78 (м, 1H), 1.51-1.38 (м, 22H).



**(*S,Z*)-3-(3-((1-(трет-бутокси)-6-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-оксогексан-2-ил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота (3.5.19)**

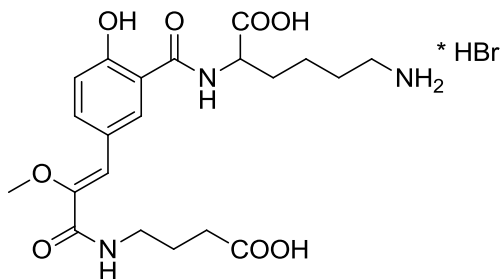
Получали следуя методу C из 190 мг **3.5.18**, выделяли колоночной хроматографией (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 94:5:1, R<sub>f</sub> 0.40): бцв. масло, 160 мг, (выход 86%).



**(S,Z)-4-(3-(3-((1-(*tert*-бутоксид)-6-((*tert*-бутоксикарбонил)амино)-1-оксогексан-2-ил)карбамил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)бутановая кислота (3.5.20)**

Получали следуя методу А из 160 мг **3.5.19**, выделяли колоночной хроматографией (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 97:2:1, Rf 0.50): бцв. масло, 60 мг, (выход 32%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО): δ 12.0 (уш. с, 1H), 9.0 (уш. с, 1H), 8.21 (т, *J* = 5.8 Гц, 1H), 8.17 (д, *J* = 1.9 Гц, 1H), 7.81 (дд, *J* = 8.5, 1.9 Гц, 1H), 6.94 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H), 6.74 (т, *J* = 5.4 Гц, 1H), 6.69 (с, 1H), 4.38-4.33 (м, 1H), 3.58 (с, 3H), 3.22-3.18 (м, 2H), 2.92-2.88 (м, 2H), 2.24 (т, *J* = 7.3, 2H), 1.83-1.70 (м, 4H), 1.43-1.32 (м, 22H).



**(S,Z)-6-амино-2-(5-(3-((3-карбоксипропил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота (3.5.21)**

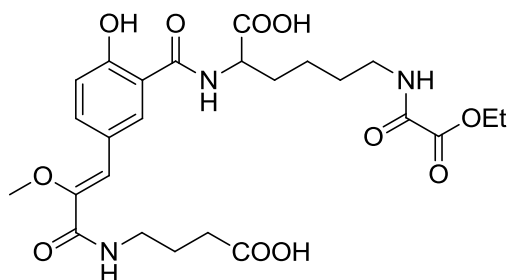
Получали следуя методу D из 50 мг **3.5.20**, бцв. крист., 43 мг, (выход 98%), т.пл. = 162-165 °С.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, D<sub>2</sub>O): δ 7.88 (д, *J* = 2.0 Гц, 1H), 7.66 (дд, *J* = 8.7, 2.0 Гц, 1H), 6.90 (д, *J* = 8.7 Гц, 1H), 6.66 (с, 1H), 4.55-4.52 (м, 1H), 3.57 (с, 3H), 3.34-3.31 (м, 2H), 3.05-3.01 (м, 2H), 2.44 (т, *J* = 7.3, 2H), 2.03-1.98 (м, 1H), 1.93-1.84 (м, 3H), 1.77-1.71 (м, 2H), 1.54-1.50 (м, 2H);

<sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, D<sub>2</sub>O): δ 177.9, 175.6, 168.5, 165.9, 157.5, 146.8, 135.2, 131.0, 124.8, 119.7, 117.5, 116.5, 59.3, 52.9, 39.3, 38.8, 31.2, 30.3, 26.4, 24.0, 22.2;

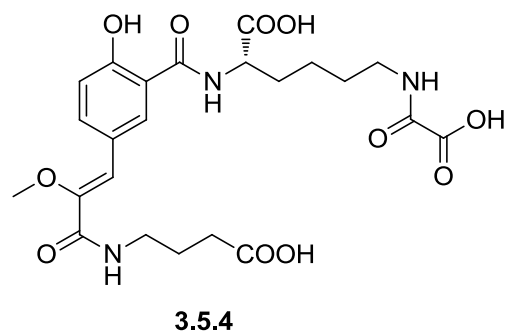
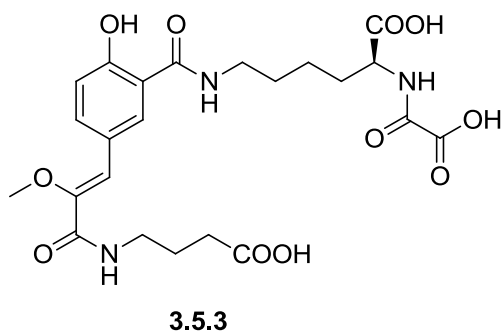
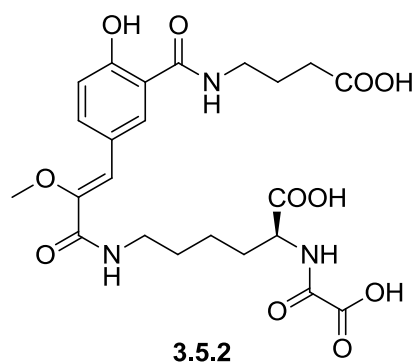
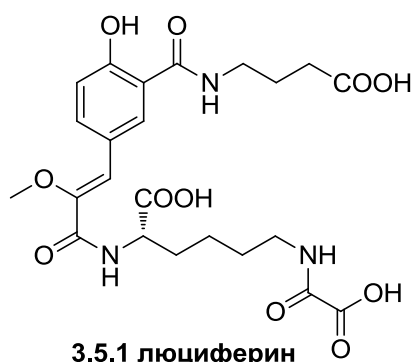
HRMS (m/z): рассчитано для C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 452.2027, найдено 452.2053.





**(S,Z)-2-(5-(3-((3-карбоксивпропил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)-6-(2-этокси-2-оксоацетидамино)гексановая кислота (3.5.22)**

Получали следуя методу Е из 52 мг **3.5.21**: бцв. масло, использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.



**(S,Z)-6-(карбоксивпропиламино)-2-(3-(3-((3-карбоксивпропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидамино)гексановая кислота (3.5.1);**

**(S,Z)-2-(карбоксивпропиламино)-6-(3-(3-((3-карбоксивпропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидамино)гексановая кислота (3.5.2);**

**(S,Z)-2-(карбоксивпропиламино)-6-(5-(3-((3-карбоксивпропил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота (3.5.3) и**

**(S,Z)-6-(карбоксивпропиламино)-2-(5-(3-((3-карбоксивпропил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота (3.5.4).**

Соединения **3.5.1**, **3.5.2**, **3.5.3** и **3.5.4** были получены по методу F из соединений **3.5.10**, **3.5.13**, **3.5.17** и **3.5.22** соответственно, выделены ВЭЖХ (см ниже рис. 4.5.3 – 4.5.7):

**3.5.1** бцв.крист., 22 мг, (выход 90%);

**3.5.2** бцв.крист., 31 мг, (выход 88%).

**3.5.3** бцв.крист., 18 мг, (выход 87%);

**3.5.4** бцв.крист., 30 мг, (выход 92%);

Химические сдвиги и мультиплетности сигналов ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  соединений **3.5.1 - 3.5.4** приведены в Таблице 3.5.1 в Главе 3 - Результаты и Обсуждение.

### Выделение аналогов люциферина 3.5.1 - 3.5.4 с помощью ВЭЖХ

Соединения **3.5.1 - 3.5.4** очищали с использованием колонки ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>. (9.4 мм x 250 мм), уравновешенной водной 0.1% муравьиной кислотой. Навеску вещества (30 мг) растворяли в 3 мл деионизованной воды и фильтровали через фильтр 0.45 мкм, наносили на колонку и элюировали градиентом ацетонитрила 5 – 42.5 % в течение 30 мин.

Чистоту выделенных **3.5.1 - 3.5.4** анализировали ВЭЖХ на колонке Prontosil 120-5-C18 (2 мм x 75 мм), в тех же условиях. Времена удерживания **3.5.1 - 3.5.4** и природного люциферина приведены в Таблица 4.5.1, профили хроматограмм приведены на рис. 4.5.3-4.5.7.

Таблица 4.5.1. Времена удерживания **3.5.1 - 3.5.4** и природного люциферина.

Соединение	Природный люциферин	3.5.1	3.5.2	3.5.3	3.5.4
Время удерж., мин.	20.9	20.9	21.2	20.9	19.5

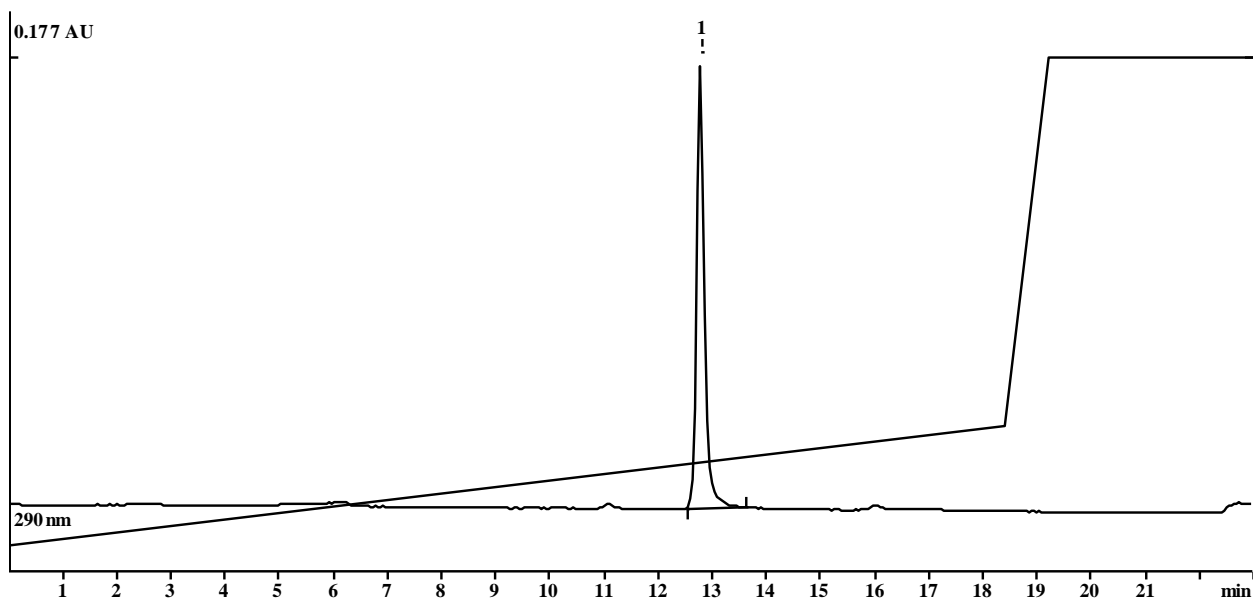


Рисунок 4.5.3. Хроматограмма очищенного **3.5.1**. Буфер А - 0.1% формиат аммония, рН 5.07; буфер В - ацетонитрил. Градиент В 5-28% в течение 18.4 мин.

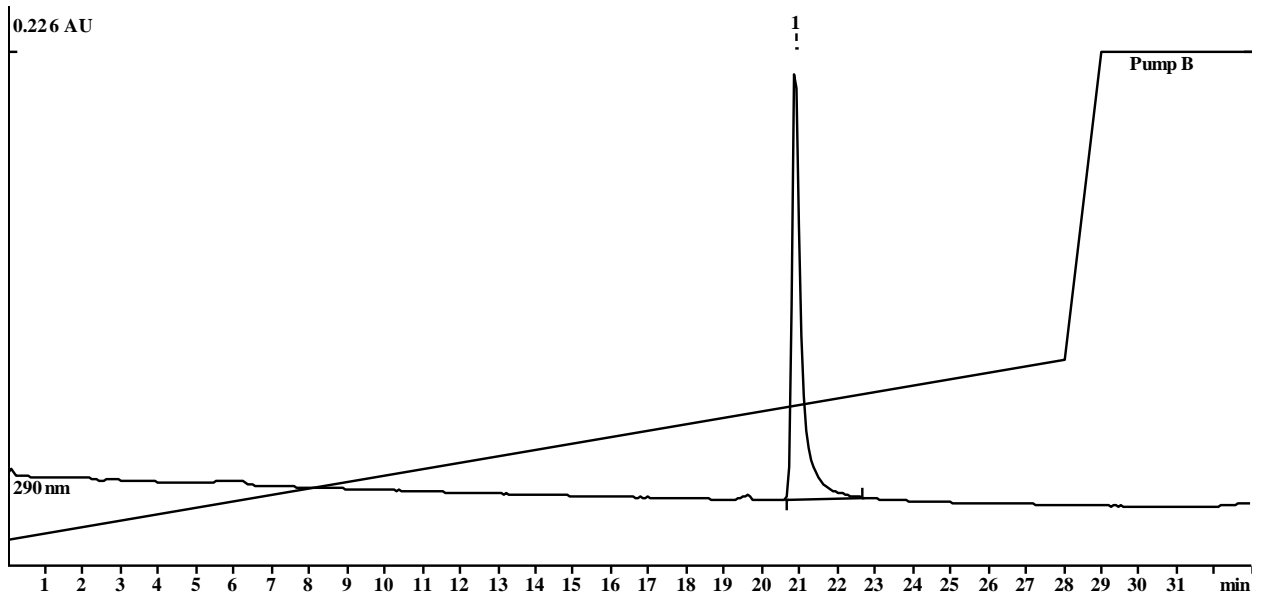


Рисунок 4.5.4. Хроматограмма очищенного **3.5.2**. Буфер А - 0.1% -муравьиная кислота, рН 2.7; буфер В - ацетонитрил. Градиент В 5-40% в течение 28 мин.

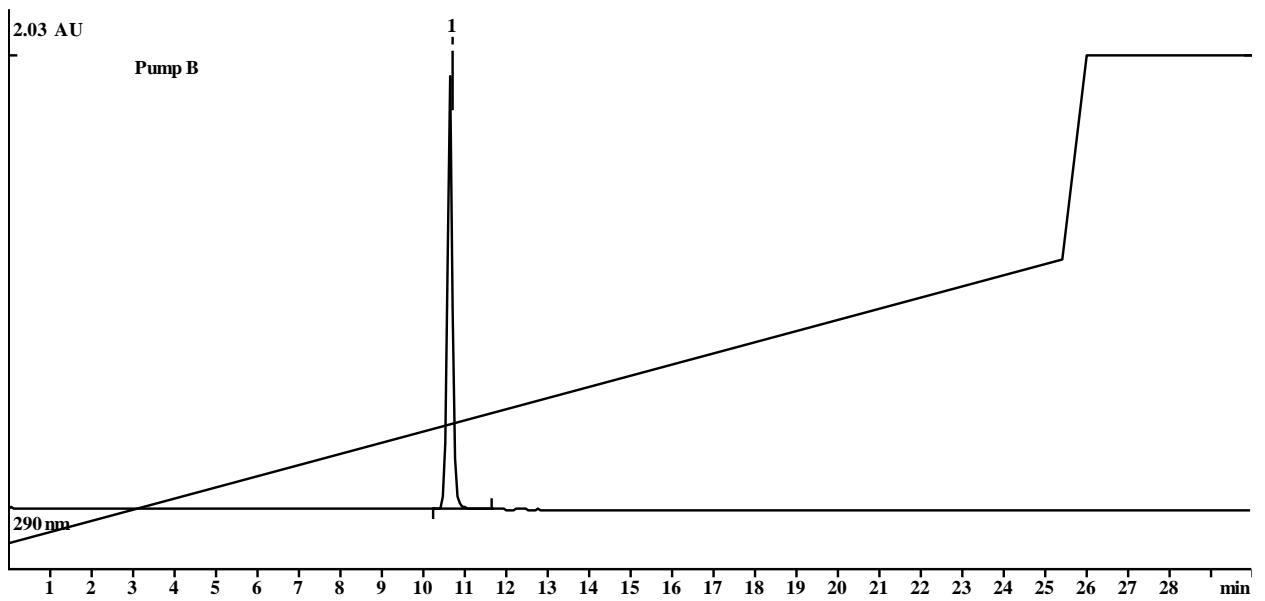


Рисунок 4.5.5. Хроматограмма очищенного **3.5.2**. Буфер А - 0.1% формиат аммония, рН 5.07; буфер В - ацетонитрил. Градиент В 5-60% в течение 25.4 мин.

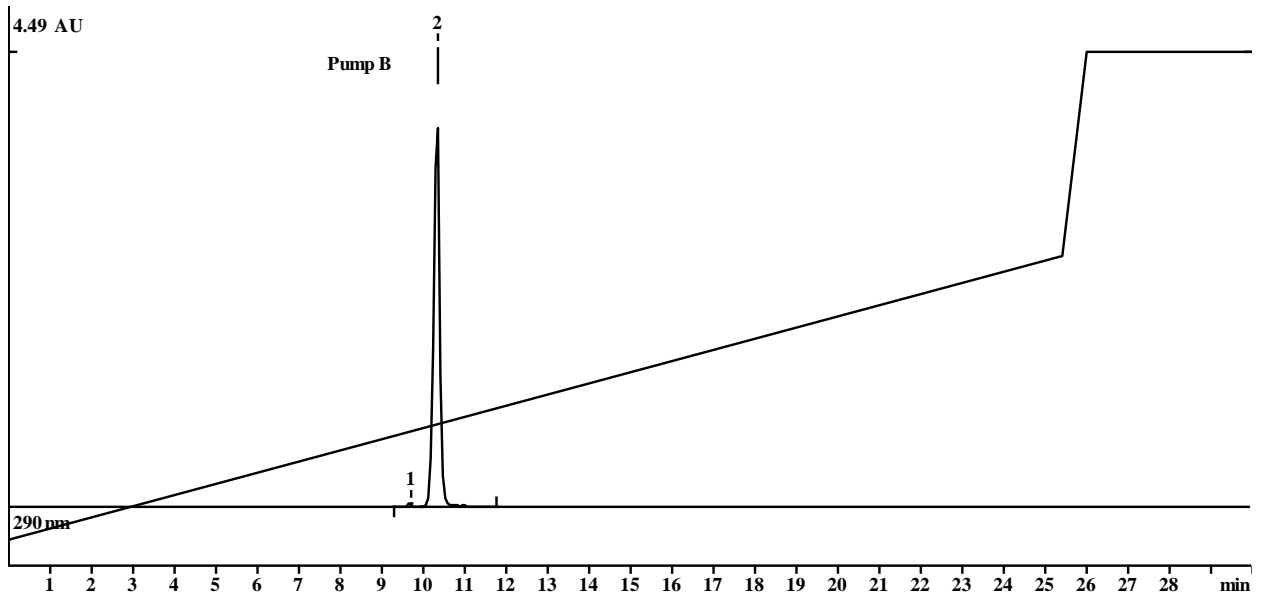


Рисунок 4.5.6. Хроматограмма очищенного **3.5.3**. Буфер А - 0.1% формиат аммония, рН 5.07; буфер В - ацетонитрил. Градиент В 5-60% в течение 25.4 мин.

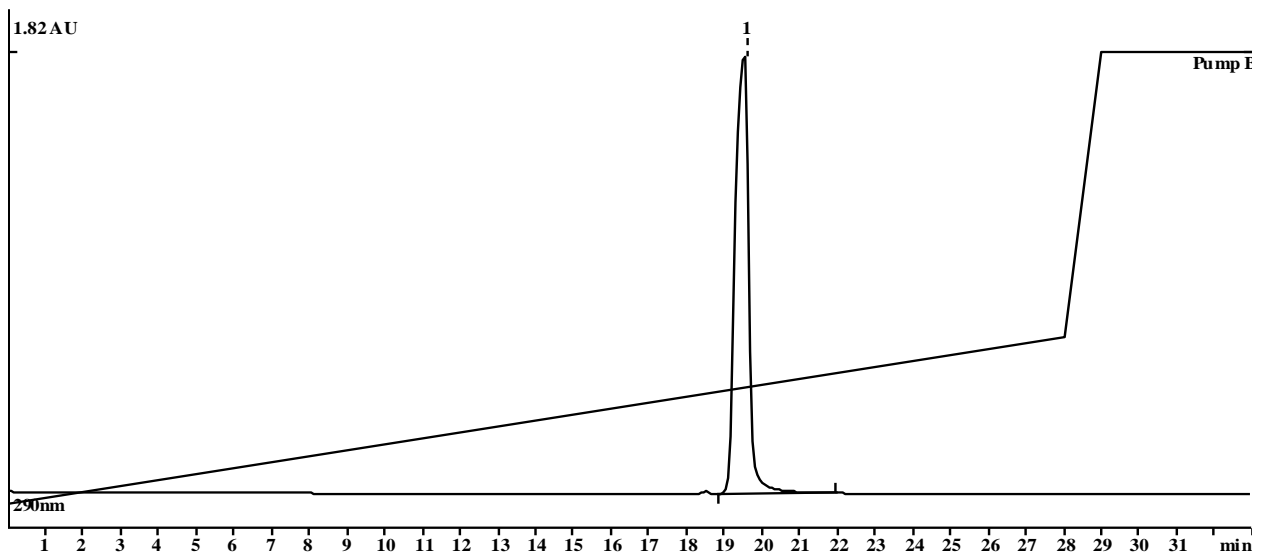


Рисунок 4.5.7. Хроматограмма очищенного **3.5.4**. Буфер А 0.1% -муравьиная кислота, рН 2.7; буфер В - ацетонитрил. Градиент В 5-40% в течение 28 мин.

#### 4.6. Механизм действия люциферина *Fridericia*

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Валентином Петушковым, Александрой Царьковой, Зинаидой Осиповой, Максимом Дубинным и коллегами, а также диссертационных работ Александры Царьковой и Зинаиды Осиповой под руководством автора.

##### Синтез и очистка оксилуциферина *Fridericia*

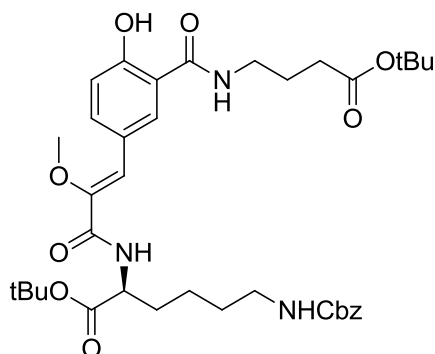
Выделение люциферазы *F. heliota* проводили по методу, описанному Петушковым и соавт [Marques и др., 2011].

Смесь для синтеза оксилуциферина готовили смешением 15 мл буфера 20 mM Tris-HCl, pH 8.1 содержащего 0.1 mM MgSO<sub>4</sub> с 0.5 мл 10 mM раствора АТФ, 0.4 мл раствора люциферазы и 0.18 мг синтетического люциферина *Fridericia*. Для контроля за ходом реакции отбирали аликвоты 20 мкл, добавляли к ним муравьиную кислоту (0.5 мкл), центрифугировали, и анализировали 4 мкл супернатанта методом ВЭЖХ с использованием градиента от 5 до 28% MeCN, содержащего 0.1% формиат-аммонийного буфера pH 4.95 на приборе MilliChrom A-02 (EcoNova, Novosibirsk, Russia), оборудованном колонкой ProntoSil C18 2x75 мм (EcoNova Novosibirsk, Russia) при скорости потока 0.1 мл/мин. Детектировали поглощение при 210, 230, 250, 270, 290, 310, 330 и 360 нм.

По истечении 25 ч реакцию останавливали добавлением 0.4 мл муравьиной кислоты. Белковый осадок удаляли центрифугированием, супернатант концентрировали на картриджах ТФЭ (Diapack-C16, BioChemMak S&T, Moscow, Russia), предварительно уравновешенных 15 mM раствором муравьиной кислоты в 3% ацетонитриле. Оксилуциферин экстрагировали 4 мл 70% MeCN и концентрировали в вакууме до 0.2 мл. Дальнейшую очистку проводили на колонке ZORBAX Eclipse XDB-C18 9.4 мм x 250 мм (Agilent Technologies, Moscow, Russia) присоединенной к хроматографу Agilent 1260 Infinity. Элюцию вели градиентным методом: буфер А - 0.1% водная муравьиная кислота и буфер В ацетонитрил, градиент 5-30% В в течение 30 мин при скорости потока 3 мл/мин. Детектировали поглощение при 210, 230, 250, 270, 290, 310, 330 и 360 нм.

Для очищенного оксилуциферина получали спектры ЯМР 1D 1H, 2D COSY и 2D 13C-<sup>1</sup>H-SQC.

**Синтез и хемилюминесценция модельного соединения аденилата люциферина  
*Fridericia***



**(*S,Z*)-*tert*-бутил 6-(((бензилокси)карбонил)амино)-2-(3-(3-((4-*tert*-бутокси)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексаноат (3.6.1)**

К раствору (*Z*)-3-(3-((4-*tert*-бутокси)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловой кислоты **3.5.7** (504 мг, 1.33 ммоль) в ТГФ (5 мл) добавляли раствор DCC в ТГФ (2М, 0.8 мл, 1.59 ммоль) и SuOH (183 мг, 1.59 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2.5 ч, осадок удаляли фильтрованием, фильтрат упаривали. Полученный активированный эфир выделяли колоночной хроматографией (гексан-этилацетат 75:25 – 50:50)– бцв. крист. (544 мг), вводили в дальнейший синтез. Раствор активированного эфира (20 мг, 0.042 ммоль) в диоксане (3 мл) добавляли к смеси Lys(Cbz)-O-tBu\*HCl (50 мг, 0.13 ммоль) и *N*-этилдизопропиламина (88 мкл, 0.51 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, подкисляли AcOH до pH=6, далее разбавляли этилацетатом (25 мл), промывали водой (20 мл), насыщенным раствором NaCl (20 мл), осушали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Продукт выделяли колоночной хроматографией (CHCl<sub>3</sub>/EtOH/AcOH = 98:2:1): бцв. крист. **3.6.1** (23 мг, 68%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>) 12.72 (с, 1H), 7.74 (д, *J* = 8.4 Гц, 1H), 7.71 (с, 1H), 7.35-7.27 (м, 5H), 7.14 (м, 2H), 6.97 (м, 2H), 5.12 – 5.04 (м, 2H), 4.85 (уш.с., 1H), 4.60 (тд, *J* = 8.0, 5.1 Гц, 1H), 3.67 (с, 3H), 3.52 – 3.43 (м, 2H), 3.20 (м, 2H), 2.39 (т, *J* = 6.7 Гц, 2H), 1.94 (м, 2H), 1.78 – 1.65 (м, 2H), 1.64 – 1.51 (м, 4H), 1.48 (с, 9H), 1.45 (с, 9H).

<sup>13</sup>C-ЯМР (176 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.6, 171.5, 170.0, 163.8, 162.2, 156.6, 147.4, 136.8, 135.5, 128.6, 128.2, 128.2, 127.6, 124.2, 119.7, 119.0, 114.5, 82.5, 81.4, 66.7, 59.6, 40.9, 39.9, 34.1, 33.5, 32.7, 29.5, 28.2, 28.2, 25.8, 25.1, 24.0, 22.5.

HRMS (ESI) *m/z*: вычислено для C<sub>37</sub>H<sub>52</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 698.3647, найдено 698.3647.

#### 4.7. Новая пептидная химия у животных

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Валентином Петушковым, Александрой Царьковой, Зинаидой Осиповой, Максимом Дубинным и коллегами, а также диссертационных работ Александры Царьковой и Зинаиды Осиповой под руководством автора.

##### Выделение аналогов люциферина *Fridericia*

AsLn5, 7, 11 и 12 получали из 40 г биомассы *Fridericia heliota*. Биомассу гомогенизировали как описано выше (см. раздел 4.4), гомогенат замораживали при -20 °С. Полученный бесклеточный экстракт *F. heliota* наносили на колонку DEAE Sepharose™ Fast Flow 16 мм x 200 мм (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), соединенную с прибором BioLogic™ LP (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA). Колонку предварительно уравнивали буфером 15 mM Tris-HCl, pH 8.1 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Элюцию проводили градиентом концентрации хлорида натрия 0-1 М.

Фракцию (~ 70 мл), содержащую люциферин и его аналоги подкисляли соляной кислотой до pH 3 и наносили на картридж ТФЭ (Diapak-C<sub>16</sub>, BioChemMak S&T, Moscow, Russia). Картридж промывали 10 mM раствором HCl, содержащим 3% MeCN (10 мл), затем элюировали целевые соединения 75% водным MeCN. Элюат концентрировали в вакууме до объема 3.2 мл. Полученный раствор подвергали двухстадийной ВЭЖХ на колонке ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 9.4 мм x 250 мм. Данные первого этапа ВЭЖХ приведены на рис. рис. 4.7.1. Отбирали фракции, содержащие целевые соединения, упаривали в вакууме и проводили окончательную очистку каждого соединения повторной ВЭЖХ в тех же условиях: буфер А 0.1% водная муравьиная кислота pH 2.8 и буфер В ацетонитрил, градиент 5-40% В в течение 30 мин при скорости потока 3 мл/мин.



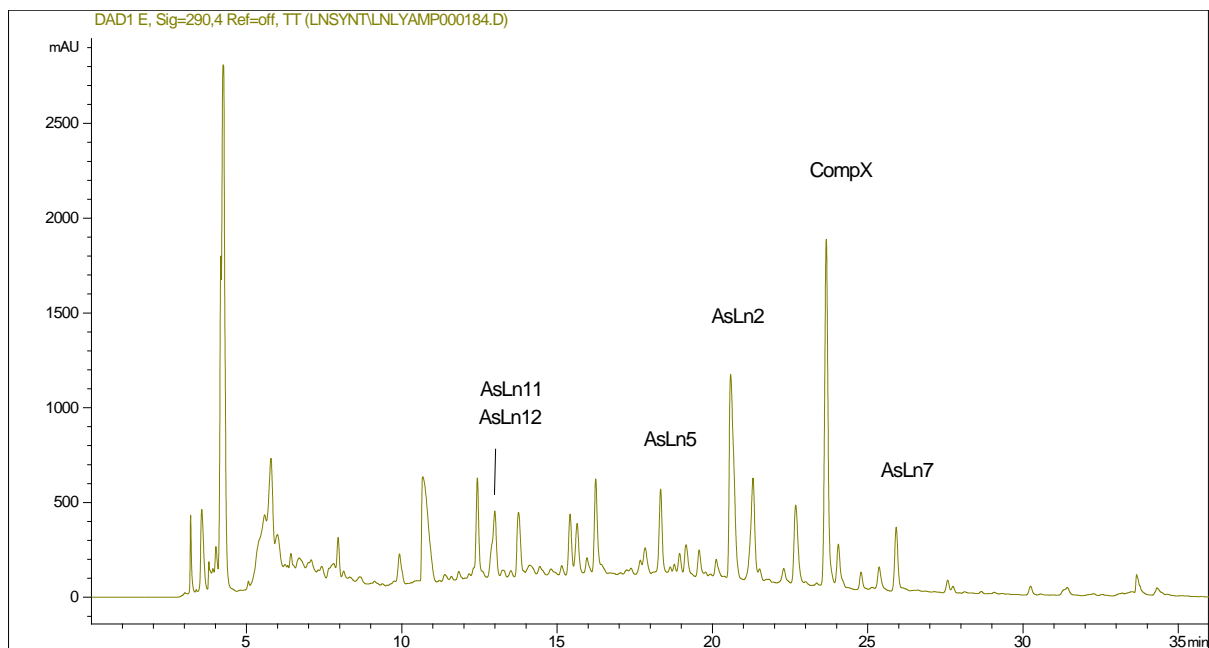
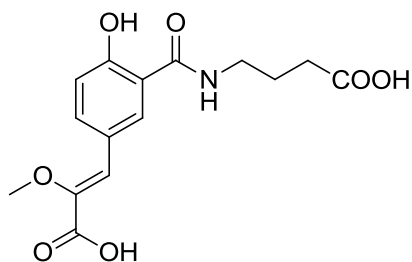


Рисунок 4.7.1. Хроматограмма фракции, содержащей смесь **AsLn5, 7, 11, 12** и других аналогов люциферина неустановленной структуры.

### Синтез **AsLn7**



**(Z)-4-(5-(2-карбоксивинил)-2-гидроксибензамидо)бутановая кислота (AsLn7)**

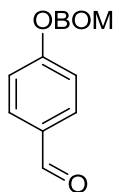
Синтез защищенного **AsLn7** см. раздел. 4.5, соединение **3.5.6**. Удаление защитной группы см. метод D в том же разделе. Выделяли колоночной хроматографией ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 94:5:1$ , Rf 0.20): б.кв. крист. **AsLn7** (85 мг, 77%), т.пл. = 155-158°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (800 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 5.0):  $\delta$  7.96 (д,  $J = 2.2$  Гц, 1H), 7.80 (дд,  $J = 8.9, 2.2$  Гц, 1H), 7.00 (д,  $J = 8.9$  Гц, 1H), 6.69 (с, 1H), 3.69 (с, 3H), 3.42 (т,  $J = 7.2$  Гц, 2H), 2.37 (т,  $J = 7.8$  Гц, 2H), 1.90 (м,  $J = 7.5$  Гц, 2H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (200 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 5.0)  $\delta$  180.6, 171.6, 169.7, 156.9, 149.5, 134.6, 129.7, 118.7, 117.5, 117.3, 58.4, 39.2, 33.9, 24.8.

HRMS (m/z): рассчитано для  $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_7$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 324.1083, найдено 324.1065.

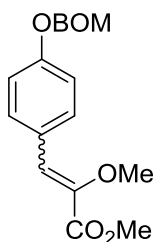
### Синтез (Z)-СомрУ (природный изомер) и (E)-СомрУ



#### 4-((бензилокси)метокси)бензальдегид (4.7.1)

Гидрид натрия 60% (98 мг, 2.457 ммоль, 1.5) добавляли при перемешивании к раствору 4-гидроксibenзальдегида (200 мг, 1.638 ммоль) в сухом DMF (5 мл) при 0°C. Через 15 мин прикапывали BOMCl (0.35 мл, 2.457 ммоль), а затем добавляли иодид тетрабутиламмония (60 мг, 0.164 ммоль). Продолжали перемешивание в течение 1.5 ч. Затем разбавляли реакционную смесь этилацетатом (25 млх2), промывали водой (25 мл), промывали насыщенным водным NaCl (25 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и упаривали. Продукт выделяли хроматографией гексан-EtOAc (95:5), получали 347 мг (88%) **4.7.1**, бцв. масло.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.89 (с, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.5 Гц, 2H), 7.33-7.27 (м, 5H), 7.17 (d, *J* = 8.7 Гц, 2H), 5.35 (с, 2H), 4.71 (с, 2H).



#### (Z,E)-метил 3-(4-((бензилокси)метокси)фенил)-2-метоксиакрилат (4.7.2a, 4.7.2b)

60% NaH (40 мг, 0.908 ммоль, 4 eq) добавляли к раствору альдегида **4.7.1** (55 мг, 0.227 ммоль) и метил 2-(диметоксифосфорил)-2-метоксиацетата (150 мг, 1.362 ммоль) в диоксане (2 мл). Перемешивали 24 ч при 60°C. После охлаждения до комнатной температуры смесь разбавляли этилацетатом (15 мл), промывали водой (15 мл), насыщенным NaCl (15 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и упаривали в вакууме. Продукт выделяли колоночной хроматографией гексан-EtOAc (95:5), получали 33 мг (44%) (*Z*)-изомера **4.7.2a** и 19 мг (25%) (*E*)-изомера **4.7.2b**; *Z*:*E* = 1.8:1.

#### (Z)-изомер 4.7.2a

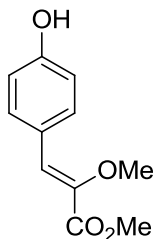
<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.83 (д, *J* = 8.7 Гц, 2H), 7.36-7.33 (м, 5H), 7.10 (д, *J* = 8.7 Гц, 2H), 6.98 (с, 1H), 5.32 (с, 2H), 4.73 (с, 2H), 3.85 (с, 3H), 3.77 (с, 3H).

<sup>13</sup>C ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.2, 158.0, 144.3, 137.3, 131.9, 128.6, 128.2, 128.1, 127.4, 124.1, 116.4, 92.3, 70.3, 59.3, 52.2.

**(E)-изомер 4.7.2b**

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.36-7.33 (м, 5H), 7.17 (д,  $J = 8.7$  Гц, 2H), 7.04 (д,  $J = 8.5$  Гц, 2H), 6.11 (с, 1H), 5.30 (с, 2H), 4.73 (с, 2H), 3.75 (с, 3H), 3.72 (с, 3H).

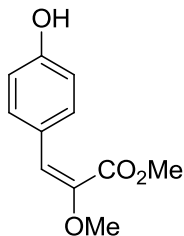
$^{13}\text{C}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.7, 156.6, 146.9, 137.4, 129.9, 128.6, 128.2, 128.2, 128.0, 116.1, 109.8, 92.5, 70.2, 56.1, 52.2.

**(Z)-метил 3-(4-гидроксифенил)-2-метоксиакрилат (4.7.3a)**

Ацетилхлорид (0.2 мл) добавляли к метанолу (1.8 мл) при охлаждении, полученный раствор добавляли к раствору **4.7.2a** (127 мг, 0.386 ммоль) в диэтиловом эфире (3 мл). После завершения реакции (контроль ТСХ) растворители упаривали, и остаток очищали флеш-хроматографией гексан-EtOAc (75:25)/ Получено 69 мг (81%) **4.7.3a** в виде бесцветного масла.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.65 (д,  $J = 8.7$  Гц, 2H), 6.86 (д,  $J = 8.5$  Гц, 2H), 6.97 (с, 1H), 5.88 (br. с, 1H), 3.85 (с, 3H), 3.75 (с, 3H).

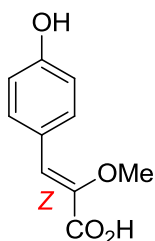
$^{13}\text{C}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.7, 156.9, 143.8, 132.2, 126.1, 124.8, 115.8, 59.3, 52.3.

**(E)-метил 3-(4-гидроксифенил)-2-метоксиакрилат (4.7.3b)**

Получен из **4.7.2b** (110 мг, 0.335 ммоль) аналогично **4.7.3a** (50 мг, 73%).

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.10 (д,  $J = 8.24$  Гц, 2H), 6.74 (д,  $J = 8.45$  Гц, 2H), 6.12 (с, 1H), 5.50 (уш.с, 1H), 3.73 (с, 3H), 3.71 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.1, 155.1, 146.4, 130.0, 126.8, 115.3, 110.5, 56.2, 52.3.



**(Z)-3-(4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота (СompY)**

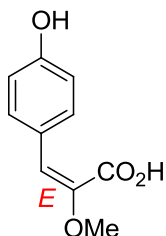
Соединение **4.7.3a** (56 мг, 0.269 ммоль) растворяли в H<sub>2</sub>O-МеОН (0.4 мл: 0.1 мл) и добавляли NaOH (33 мг, 0.825 ммоль). Смесь перемешивали 2 ч, затем нейтрализовали AcOH до pH 6.0, разбавляли EtOAc (15 мл) и промывали водой (20 мл). Органическую фазу промывали насыщенным NaCl (20 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и упаривали в вакууме. Продукт выделяли колоночной хроматографией CHCl<sub>3</sub>-EtOH-AcOH (97:3:1), получали 34 мг (63%) **СompY**.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.60 (д, *J* = 8.7 Гц, 2H), 6.78 (д, *J* = 8.5 Гц, 2H), 6.71 (с, 1H), 3.65 (с, 3H).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, D<sub>2</sub>O, pH=4.98) δ 7.63 (д, *J* = 9.0 Гц, 2H), 6.90 (д, *J* = 9.0 Гц, 2H), 6.83 (с, 1H), 3.66 (с, 3H).

<sup>13</sup>C ЯМР (700 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 165.4, 158.2, 143.8, 131.6, 124.4, 122.7, 115.5, 58.3.

<sup>13</sup>C ЯМР (700 МГц, D<sub>2</sub>O, pH=4.98) δ 171.8, 155.8, 148.5, 131.4, 126.4, 120.1, 115.7, 58.4.



**(E)-3-(4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота (СompY, (E)-изомер)**

Аналогично предыдущей методике из **4.7.3b** (50 мг, 0.240 ммоль) получен **СompY, (E)-изомер** (30 мг, 65%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.36 (с, 1H), 7.08 (д, *J* = 8.6 Гц, 2H), 6.67 (д, *J* = 8.6 Гц, 2H), 5.95 (с, 1H), 3.62 (с, 3H).

<sup>13</sup>C ЯМР (700 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 165.6, 156.1, 147.3, 129.3, 125.1, 114.9, 106.3, 55.5.

## 4.8. Люциферин грибов

Данная глава написана по результатам совместной работы автора с Константином Пуртовым, Валентином Петушковым, Александрой Царьковой, Зинаидой Осиповой, Константином Минеевым и коллегами, а также диссертационных работ Александры Царьковой и Зинаиды Осиповой под руководством автора.

### Биомасса грибов

В данной работе использовали культуры мицелия следующих видов: *Neonothopanus nambi* собран в лесах южного Вьетнама [Vydryakova и др., 2012], *Mycena citricolor* получена из коллекции ATCC #12578, *Panellus stipticus* собран в 2010 г. Г. Выдряковой в окрестностях г. Оттава (Канада) и *Armillaria borealis* собран в 2012 г. В окрестностях г. Красноярск (Россия). Культуры мицелия выращивали на картофельно-сахарозной (PS) или картофельно-глюкозной (PG) средах: картофельный экстракт 200 г/л, сахароза 20 г/л или картофельный экстракт 200 г/л, глюкоза 20 г/л, соответственно. Культивацию вели 3-5 дней при перемешивании 160-180 об/мин.

Плодовые тела *Pholiota squarrosa*, *Tricholoma sp.*, *Phellinus sp.*, *Russula foetens* и *Clitocybe sp* собирали в окрестностях г. Красноярск и хранили замороженными при -80°C.

### Экстракция ферментов, участвующих в билюминесцентной реакции (“холодный экстракт”)

Биомассу мицелия отмывали от культивационной среды и вымачивали в избытке дистиллированной воды (1:100 – 1:200 по массе) в течение ночи при 26°C. Мицелий отделяли центрифугированием или фильтрованием и гомогенизировали механическим гомогенизатором в 0.2 М фосфатном буфере (pH 7.5, 0°C, 1:10 по массе), содержащем стандартную смесь ингибиторов протеаз. Гомогенат обрабатывали ультразвуком при 0°C в течение 10 мин. Затем полученную смесь центрифугировали при 30000 g в течение 20 мин при 4°C. Супернатант, содержащий целевые ферменты замораживали при -20°C до использования.

Разделение активностей гиспидин-3-гидроксилазы и люциферазы проводили гелефильтрацией на колонке Superdex 75. Активность, соответствующая гиспидин-3-гидроксилазы наблюдалась во фракции ~35 кДа, в то время как активность люциферазы регистрировали в свободном объеме.

### Выделение предшественника люциферина грибов (“горячий экстракт”)

К биомассе грибов (плодовые тела или мицелий, 10 г) добавляли 30 мл дистиллированной воды, гомогенизировали и нагревали до кипения в микроволновой печи, затем быстро

охлаждали на ледяной бане и центрифугировали (20000 g, 20 мин, 4°C). Супернатант экстрагировали этилацетатом (40 мл), экстракт концентрировали на роторном испарителе и растворяли в 200 мкл 30% водного DMSO, содержащего 0.1% муравьиной кислоты. Полученный раствор использовали непосредственно в биолюминесцентном анализе или же разделяли ВЭЖХ.

### Ферментативный биолюминесцентный анализ

Реакционную смесь (500 мкл) готовили смешением 25 мкл “холодного экстракта”, 2 мкл раствора субстрата (“горячий экстракт”), 442 мкл 0.2 М фосфатного буфера, 1 мкл 1М раствора DTT и 10 мкл 1% Triton X-100. Реакцию инициировали добавлением 20 мкл 20 мМ раствора NADPH. Для измерения люминесценции смесь в прозрачной пробирке помещали в камеру люминометра Glomax 20/20 (Promega, USA), сигнал интегрировали в течение 1с.

### Выделение соединений 3.8.1-3.8.6 из “горячего экстракта” плодовых тел *Pholiota squarrosa* с помощью ВЭЖХ

“Горячий экстракт”, полученный из 100 г плодовых тел *Ph. squarrosa* наносили на колонку ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 9.4 x 250 мм (Agilent Technologies) соединенную с хроматографом Agilent 1260 Infinity. Элюцию проводили градиентным методом: буфер А 0.1% водная муравьиная кислота и буфер В ацетонитрил, градиент 5-40% В в течение 25 мин, скорость потока 3 мл/мин. Детектировали поглощение при 210, 230, 250, 270, 290, 310, 330 и 360 нм. Фракции, соответствующие пикам 1-6 собирали, упаривали в вакууме и анализировали методами ЯМР и HRMS. Оптическая плотность выделенных соединений 3.8.1-3.8.6 составляла 12.7, 16.5, 3.7, 9.2, 10.8 и 4.9 о.е. при 360 нм, соответственно.

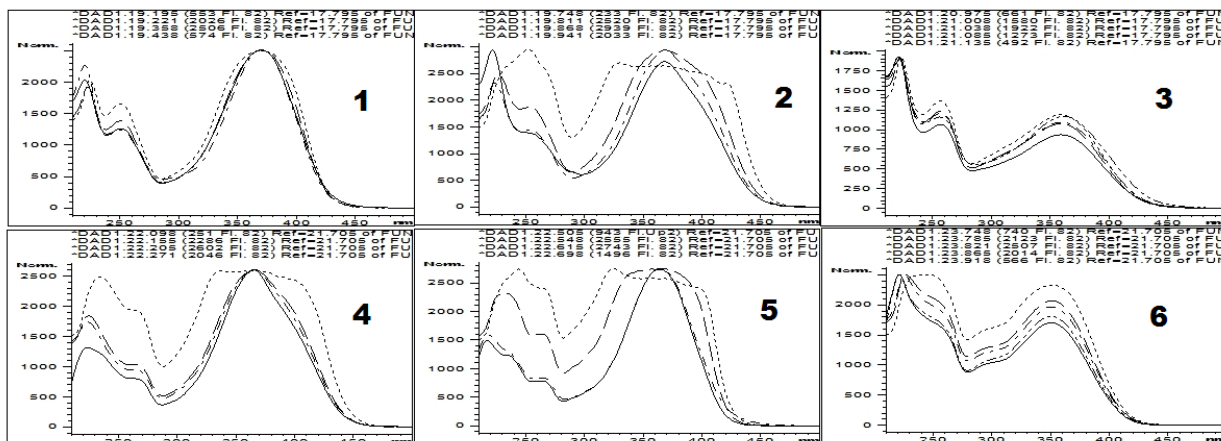


Рисунок 4.8.1. УФ спектры соединений 3.8.1-3.8.6.

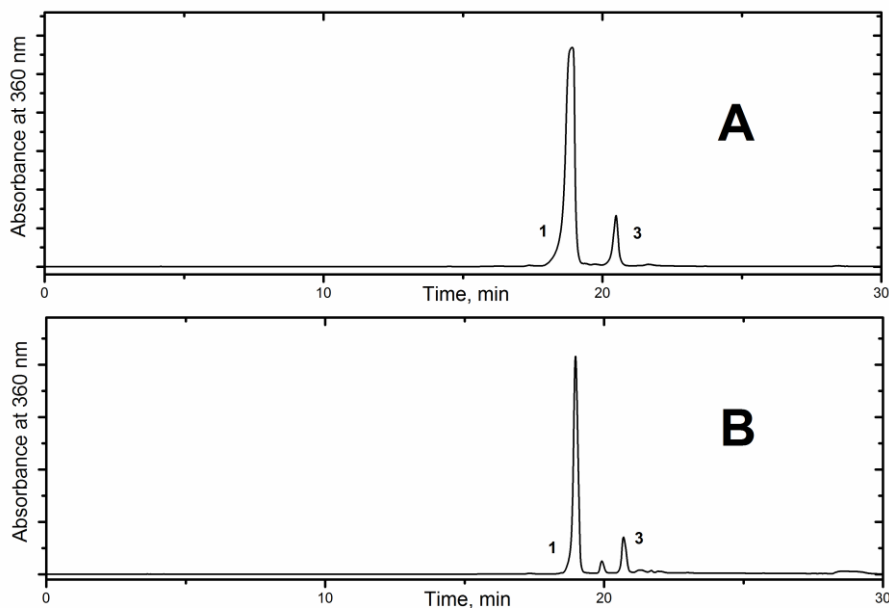


Рисунок 4.8.2. Таутомеризация соединений **3.8.1** и **3.8.3** в растворе, приводящая к образованию равновесной смеси. (А) Повторная хроматография **3.8.1** в условиях, показанных на рис. 3.8.2. (В) Повторная хроматография **3.8.3** в условиях, показанных на рис. 3.8.2.

### Установление структуры соединений 3.8.1-3.8.6

Для установления химического строения соединений **3.8.1-3.8.6**, выделенных из “горячего экстракта” плодовых тел *Ph. squarrosa*, регистрировали спектры ЯМР 2D DQF-COSY, 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC и 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC. Высокое качество спектров ЯМР позволяло прямую структурную интерпретацию, т.к. в спектрах HMBC наблюдались сигналы всех атомов углерода, включая четвертичные.

#### Вещества 3.8.1 и 3.8.3

Спектральные данные HRMS и ЯМР соединений **3.8.1** и **3.8.3** были полностью идентичными. Спектры ESI-HRMS обоих соединений выявили молекулярный ион с  $m/z$  247.0616, которой соответствует элементный состав  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_5^+$  (вычислено  $m/z$  247.0601). Спектры ЯМР в  $\text{DMSO-d}_6$  выявили наличие двух наборов сигналов. Как для основного, так и для минорного компонентов в спектрах наблюдалась спиновая система, характерная для бензольного кольца, несущего 3 заместителя, 2 из которых являются гидроксильными группами в соседних положениях (хим. сдвиги  $^{13}\text{C}$  ~146-147). Также для обоих компонентов наблюдались сигналы замещенной этенильной группы (2 дублета с константами спин-спинового взаимодействия 16 Гц для основного и 12 Гц для минорного изомера) и гидроксипиранонового кольца (2 протона при 5.37 и 6.13 м.д. и 3 четвертичных углерода при 163, 170 и 160 м.д.). Все фрагменты были связаны в спектрах HMBC. Сравнение полученных нами данных с

литературными позволило заключить, что изучаемый образец идентичен гиспидину [Adam и др., 1994]. Окончательное подтверждение структуры гиспидина было проведено сравнением образца коммерчески доступного гиспидина (Sigma) с исследуемым образцом методами ВЭЖХ и ЯМР. Два набора сигналов в образце гиспидина соответствуют находящимся в динамическом равновесии в растворах *цис*- и *транс*-изомерам последнего. Величины химических сдвигов **3.8.1** и **3.8.3** приведены в таблице 3.8.1.

#### *Вещества 3.8.5 и 3.8.6.*

Соединения **3.8.5** и **3.8.6** также характеризовались идентичными спектрами HRMS и ЯМР. В спектрах ESI-HRMS наблюдали молекулярный ион с  $m/z$  231.0661, соответствующий составу  $C_{13}H_{11}O_4^+$  (вычислено  $m/z$  231.0652). В спектрах ЯМР наблюдали 2 набора сигналов, соответствующих 4-гидроксифенильной группе (2 дублета с интегралами 2H и четвертичный атом углерода при 160 м.д.), этенильной группе и гидроксипиранону с химическими сдвигами, близкими к таковым гиспидина (**3.8.1**). Анализ спектров HMBC позволил недвусмысленно заключить, что структуры **3.8.5** и **3.8.6** соответствуют *транс*- и *цис*- изомерам биснорианголина. Данные спектров приведены в таблице 3.8.1.

#### *Вещество 3.8.2*

В спектре ESI-HRMS **3.8.2** наблюдали молекулярный ион с  $m/z$  491.0955, соответствующий составу  $C_{26}H_{19}O_{10}^+$  (вычислено  $m/z$  491.0973). В спектрах ЯМР наблюдали набор сигналов гиспидина, за исключением сигнала протона H-3 и второй набор сигналов гиспидина, за отсутствием сигнала H-14. Эти 2 фрагмента были связаны кросс-пиком в спектре HMBC, что позволяет заключить, что **3.8.2** представляет собой конъюгат из 2 молекул гиспидина, окислительно соединенных по положениям C-3 и C-14 (3,14-бисгиспидинил) [Lee, Yun, 2011]). Данные ЯМР приведены в таблице 3.8.2.

#### *Вещество 3.8.4*

В спектре ESI-HRMS **3.8.4** наблюдали молекулярный ион с  $m/z$  475.0994, соответствующий составу  $C_{26}H_{19}O_9^+$  (вычислено  $m/z$  475.1024). В спектрах ЯМР наблюдали набор сигналов биснорианголина, за исключением сигнала протона H-3 и второй набор сигналов биснорианголина, за отсутствием сигнала H-14. Эти 2 фрагмента были связаны кросс-пиком в спектре HMBC, что позволяет заключить, что **3.8.4** представляет собой конъюгат из 2 молекул биснорианголина, окислительно соединенных по положениям C-3 и C-14. Данные ЯМР приведены в таблице 3.8.2.



## Синтез гиспидина и биснориангонина

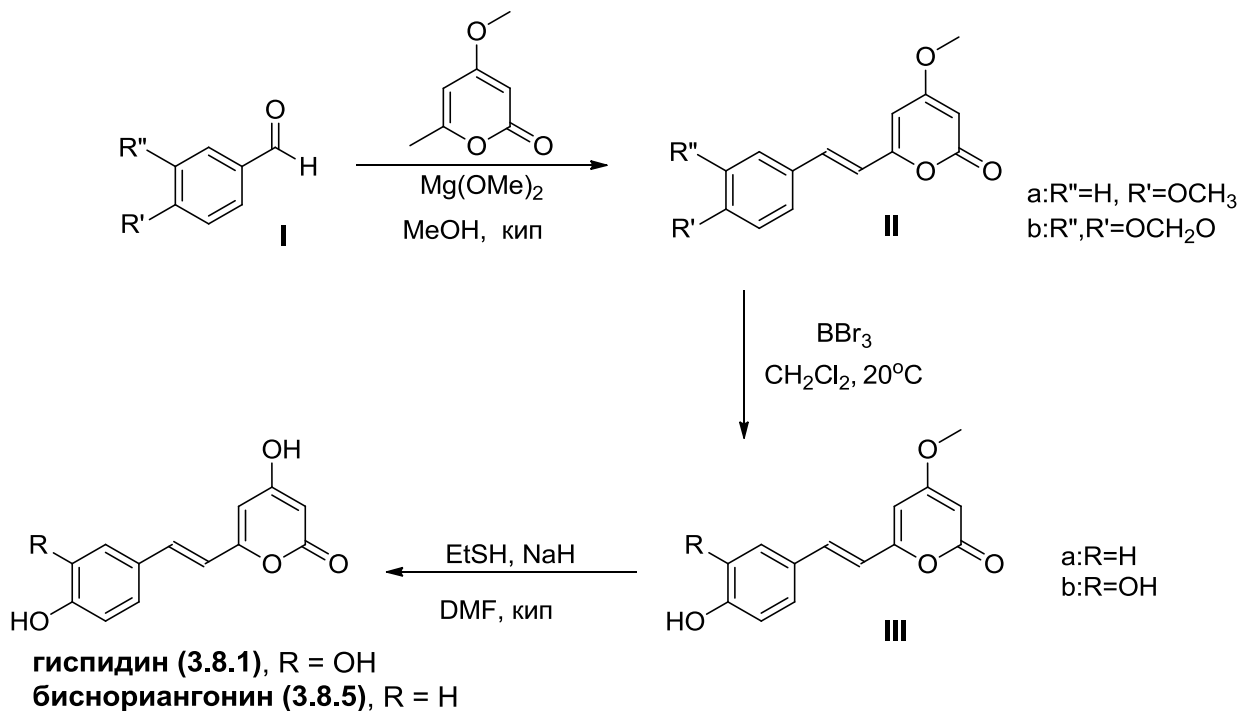


Схема 4.8.1. Синтез гиспидина (3.8.1) и биснориангонина (3.8.5).

**(E)-4-метокси-6-стирил-2H-пиран-2-оны (II)**

Стружки металлического Mg (720 мг, 30 ммоль) растворяли в безводном метаноле (25 мл), и добавляли раствор защищенного альдегида **I** (см. схему, 10 ммоль) и 4-метокси-6-метил-2H-пиран-2-он [Fang и др., 2010; Nagawade и др., 2005] (1.68 г, 12 ммоль) в метаноле (25 мл). Смесь кипятили 4 ч, после чего растворитель упаривали в вакууме. Смесь суспендировали в хлороформе (75 мл) и промывали раствором уксусной кислоты (5 мл) в воде (25 мл). Водный слой отделяли и экстрагировали хлороформом (2 x 50 мл). Объединенные органические экстракты промывали насыщенным раствором NaCl (2 x 30 мл) и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель упаривали, остаток промывали диэтиловым эфиром (3 x 10 мл) и получали чистый продукт.

**IIa:** Желтый порошок (770 мг, 30%); т.пл. = 156-159°C; <sup>1</sup>H ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.60 (д, J=8.7 Гц, 2H), 7.30 (д, J=16.0 Гц, 1H), 6.98 (д, J=8.7 Гц, 2H), 6.84 (д, J=16.0 Гц, 1H), 6.25 (д, J=2.2 Гц, 1H), 5.60 (д, J=2.2 Гц, 1H), 3.83 (с, 3H), 3.80 (с, 3H); <sup>13</sup>C ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 55.2 (CH<sub>3</sub>), 56.3 (CH<sub>3</sub>), 88.3 (CH), 100.4 (CH), 114.4 (2xCH), 117.2, 127.7, 129.1 (2xCH), 133.9, 158.7, 160.3, 162.6, 170.9; HRMS (ESI) найдено m/z: 259.0962 (Вычислено для C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>, [M+H]<sup>+</sup> 259.0965).

**IIb:** Желтый порошок (1.70 г, 63%); т.пл. = 233-235°C (лит. – 234-235°C [Adam и др., 1994]); <sup>1</sup>H ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.60 (д, J=1.3 Гц, 1H), 7.25 (д, J=16.0 Гц, 1H), 7.14 (дд, J=7.9, 1.1 Гц, 1H), 6.96 (д, J=7.9 Гц, 1H), 6.84 (д, J=16.0 Гц, 1H), 6.21 (д, J=2.1 Гц, 1H), 6.07 (с, 2H), 5.61 (д, J=2.1 Гц, 1H), 3.83 (с, 3H).

**(E)-4-метокси-6-стирил-2H-пиран-2-оны (III)**

(E)-4-methoxy-6-стирил-2H-пиран-2-он **II** (3 ммоль) растворяли в сухом  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (75 мл) и добавляли раствор  $\text{VBr}_3$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 мл, 1M). Смесь перемешивали 15 минут при комнатной температуре, затем добавляли воду (50 мл), изопропанол (25 мл) и  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 мл). Органический слой промывали насыщенным раствором  $\text{NaCl}$  (2 x 30 мл) и сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворители упаривали и продукты **III** очищали колоночной хроматографией ( $\text{CHCl}_3$ -EtOH 15:1).

**IIIa:** Желтый порошок (690 мг, 94%); т.пл. – более  $250^\circ\text{C}$  с разл.;  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  9.86 (с, 1H), 7.49 (д,  $J=8.5$  Гц, 2H), 7.24 (д,  $J=16.0$  Гц, 1H), 6.80 (д,  $J=8.5$  Гц, 2H), 6.76 (д,  $J=16.0$  Гц, 1H), 6.25 (д,  $J=1.7$  Гц, 1H), 5.60 (д,  $J=1.7$  Гц, 1H), 3.82 (с, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  56.3 ( $\text{CH}_3$ ), 88.1 (CH), 100.4 (CH), 115.8 (2xCH), 116.1, 126.2, 129.2 (2xCH), 134.4, 158.9, 159.0, 162.7, 170.9; HRMS (ESI) найдено  $m/z$ : 245.0796 (Вычислено для  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_4$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  245.0808).

**IIIb:** Желтый порошок (650 мг, 83%); т.пл. =  $255-257^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  9.43 (уш.с., 1H), 9.06 (уш.с., 1H), 7.16 (д,  $J=16.0$  Гц, 1H), 7.02 (д,  $J=1.9$  Гц, 1H), 6.94 (дд,  $J=8.0, 1.9$  Гц, 1H), 6.75 (д,  $J=8.0$  Гц, 1H), 6.66 (д,  $J=16.0$  Гц, 1H), 6.25 (д,  $J=2.1$  Гц, 1H), 5.58 (д,  $J=2.1$  Гц, 1H), 3.82 (с, 3H).

**(E)-4-гидрокси-6-(4-метилстирил)-2H-пиран-2-оны (3.8.1, 3.8.5)**

Гидрид натрия (140 мг, 60% в минеральном масле, 3.6 ммоль) суспендировали в сухом DMF (7 мл) и добавляли этилмеркаптан (220 мг, 3.5 ммоль). Смесь перемешивали 10 мин и добавляли раствор **III** (1 ммоль) в ДМФА (5 мл). Смесь кипятили 1 ч, охлаждали до комнатной температуры, подкисляли 5% водным  $\text{HCl}$  и экстрагировали  $\text{EtOAc}$  (3x50 мл). Экстракт промывали насыщенным раствором  $\text{NaCl}$  (2 x 25 мл) и сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворитель упарили, продукт выделяли колоночной хроматографией ( $\text{CHCl}_3$ -EtOH 10:1).

**3.8.1:** Желтый порошок (120 мг, 49%); т.пл. – более  $250^\circ\text{C}$  с разложением;  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  11.6 (уш.с., 1H), 9.42 (уш.с., 1H), 9.05 (уш.с., 1H), 7.13 (д,  $J=16.0$  Гц, 1H), 7.02 (д,  $J=1.8$  Гц, 1H), 6.93 (дд,  $J=8.1, 1.8$  Гц, 1H), 6.76 (д,  $J=8.1$  Гц, 1H), 6.67 (д,  $J=16.0$  Гц, 1H), 6.14 (д,  $J=1.5$  Гц, 1H), 5.26 (д,  $J=1.5$  Гц, 1H).

**3.8.5:** Желтый порошок (130 мг, 57%); т.пл. – более  $250^\circ\text{C}$  с разложением;  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  11.6 (уш.с., 1H), 9.85 (уш.с., 1H), 7.49 (д,  $J=8.6$  Гц, 2H), 7.21 (д,  $J=16.2$  Гц, 1H), 6.80 (д,  $J=8.6$  Гц, 2H), 6.77 (д,  $J=16.2$  Гц, 1H), 6.13 (д,  $J=1.6$  Гц, 1H), 5.28 (д,  $J=1.6$  Гц, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  89.3 (CH), 100.5 (CH), 115.7 (2xCH), 116.4, 126.2, 129.2 (2xCH), 134.2, 158.8, 159.7, 162.9, 170.3; HRMS (ESI) найдено  $m/z$ : 231.0636 (Вычислено для  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_4$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  231.0652).

### Частичная очистка водорастворимого НАДФН-зависимого фермента гиспидин-3-гидроксилазы и люциферазы *N. nambí*

“Холодный экстракт” описанный выше (0.4 мл) подвергали гель-фильтрации на колонке Superdex 75 (10 x 300 мм). Элюцию вели буфером 10 мМ PBS pH 7.5 содержащим 0.1 М NaCl, 1 мМ DTT и 1 мМ EDTA, скорость потока 0.7 мл/мин. Собирали фракции объемом 0.35 мл и оценивали их специфическую активность одним из следующих методов:

#### Метод 1, измерение активности люциферазы

К 100 мкл 0.2М фосфатного буфера pH 7.5 содержащего 1 мМ DTT, 1 мМ EDTA, 1.3 мкМ гиспидина, 0.5 мМ NADPH добавляли 5 мкл фракции, содержащей активность гиспидин-3-гидроксилазы и 10 мкл исследуемого образца. Люминесценцию измеряли незамедлительно после смешивания.

#### Метод 2, измерение активности гиспидин-3-гидроксилазы

К 100 мкл 0.2М фосфатного буфера pH 7.5 содержащего 1 мМ DTT, 1 мМ EDTA, 1.3 мкМ гиспидина, 0.5 мМ NADPH добавляли 10 мкл фракции, содержащей люциферазную активность и 5 мкл исследуемого образца. Наблюдали постепенное увеличение люминесцентного сигнала, и наклон этой кривой при 30 с сопоставляли с измеряемой активностью.

Активность гиспидин-3-гидроксилазы наблюдалась во фракциях, соответствующих молекулярной массе ~35 кДа, в то время, как активность люциферазы элюировалась в свободном объеме колонки (Рисунок 4.8.3).

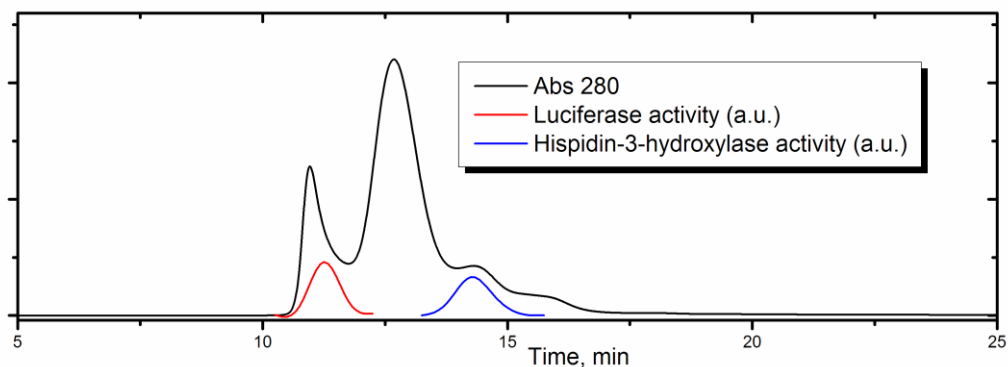


Рисунок 4.8.3 Профиль хроматограммы «холодного экстракта» мицелия *N. nambí* (гель-фильтрация на колонке Superdex 75). Профили распределения активностей люциферазы и гиспидин-3-гидроксилазы (условные единицы) показаны красным и синим, соответственно.

### Частичная очистка люциферазы грибов

Вышеописанный “холодный экстракт” (70 мл) подвергали ультрацентрифугированию (60 мин при 140,000 x g, 4°C). Осадок ресуспендировали в 5 мл буфера, содержащего 0.1 М NaKPO<sub>4</sub>, 0.1 М NaCl, 1% Triton X-100, pH 7.4. Для измерения активности смешивали 2 мкл

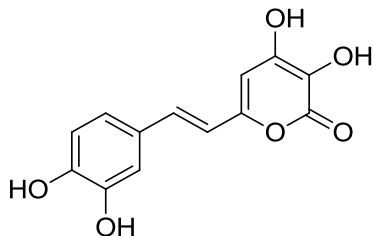
полученной суспензии с 5 мкМ раствором 3-гидроксигиспидина в том же буфере. Активность ресуспендированного осадка превышала таковую супернатанта в ~200 раз ( $3.2 \times 10^6$  отн.ед. против  $1.7 \times 10^4$  отн.ед., люминометр Glomax 20/20, Promega, USA). Полученный ультрацентрифугированием осадок хранили при  $-70^\circ\text{C}$  в течение нескольких недель без существенной потери активности.

### Ферментативный синтез люциферина грибов из гиспидина

Реакционную смесь для синтеза люциферина грибов готовили смешением 0.2 М фосфатного буфера pH 7.5 (5 мл), водных растворов DTT (0.1М, 200 мкл), гиспидина (0.65 мМ, 200 мкл), частично очищенной гиспидин-3-гидроксилазы (5 мл, получение см. выше). Активность люциферина измеряли каждые 5 минут анализом аликвот 1 мкл реакционной смеси как описано выше.

По достижении максимальной активности люциферина (35 минут после начала реакции), реакционную смесь подкисляли добавлением 150 мкл концентрированной соляной кислоты, центрифугировали при 30000 g в течение 15 мин, затем концентрировали продукт реакции твердофазной экстракцией с использованием картриджа Diarack-C<sub>16</sub> 1 мл (BioChemMak S&T, Moscow, Russia). Реакционную смесь наносили на картридж, промывали 10 мМ раствором HCl, содержащим 3% MeCN (4 мл), затем элюировали продукт 75% водным MeCN (2 мл). Элюат концентрировали до объема 50 мкл на вакуумной центрифуге, добавляли 50 мкл DMSO и наносили полученную смесь на колонку ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (9.4 мм x 250 мм). Элюцию проводили градиентным методом: буфер А водная муравьиная кислота (0.1%, pH 2.8), буфер В ацетонитрил., градиент 5-40% В в течение 25 мин, скорость потока 3 мл/мин. Собирали пик при 17.2 мин.

### Синтез люциферина грибов.



### (E)-6-(3,4-дигидрокстирил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он (3.8.7)

К раствору **3.8.9** (30 мг, 0.18 ммоль) и 3,4-метилendioксибензальдегида (98 мг, 0.59 ммоль) в сухом метаноле (0.5 мл) в инертной атмосфере добавляли раствор метилата магния в метаноле, приготовленный из 50 мг Mg и 1 мл MeOH. Смесь перемешивали 2 суток, затем

добавляли  $\text{CHCl}_3$  (2x10 мл), промывали фосфатным буфером pH 7.0 (10 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали на роторном испарителе. Продукт **3.8.10** выделяли флеш-хроматографией и вводили в дальнейший синтез. К раствору **3.8.10** в сухом  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.1 мл) в инертной атмосфере добавляли 1М раствор  $\text{VBr}_3$  в дихлорметане (0.2 мл). Реакционную смесь выдерживали ночь, разбавляли  $\text{EtOAc}$  (2x0.5 мл), промывали фосфатным буфером (pH 7.0, 0.5 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали на роторном испарителе и остаток подвергали ВЭЖХ в условиях, описанных ниже для вещества, полученного ферментативным синтезом. Выделено 12 мг **3.8.7** (26%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (800 МГц, ацетон- $d_6$ )  $\delta$  7.12 (д,  $J=2.0$  Гц, 1H), 7.10 (д,  $J=16.0$  Гц, 1H), 6.99 (дд,  $J=8.2, 2.0$  Гц, 1H), 6.86 (д,  $J=8.2$  Гц), 6.64 (д,  $J=16.0$  Гц, 1H), 6.21 (с, 1H).

HRMS (ESI) m/z: рассчитано для  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_6^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 263.0550, найдено 263.0570.

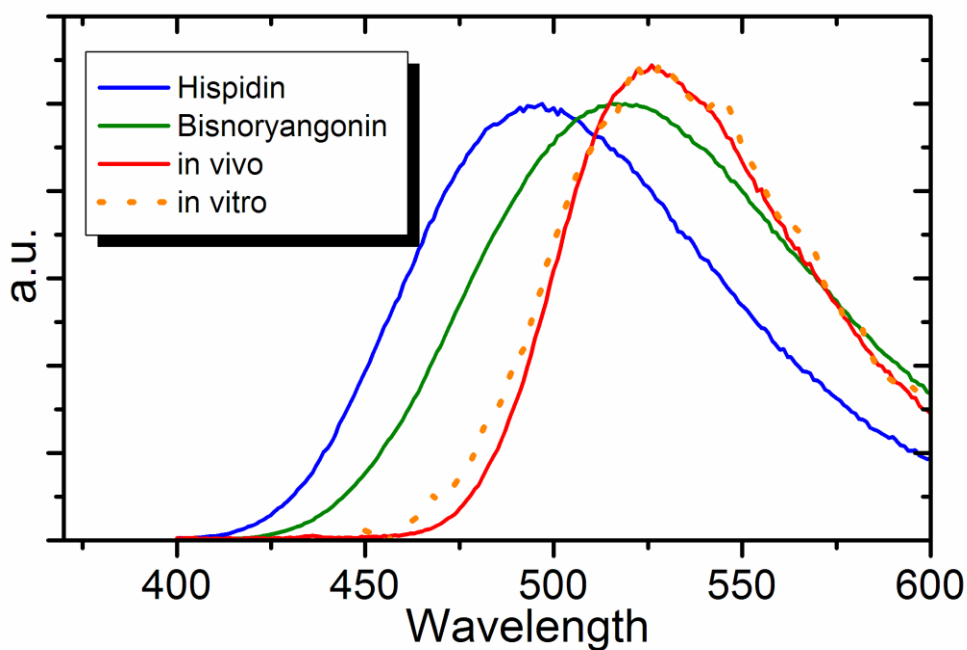


Рисунок 4.8.4. Спектры эмиссии флуоресценции гиспидина (синий) и биснориангонина (зеленый), возбуждение при 360 нм. Спектры биолюминесценции гиспидина в присутствии NADPH и “холодного экстракта” *N. nambi* *in vitro* (прерывистая оранжевая линия) и спектр биолюминесценции живого мицелия *N.* (сплошная красная линия).

## 5. ВЫВОДЫ

1. Разработан новый подход к синтезу производных хромофора GFP, содержащих  $\alpha$ -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*-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 ( $pK_a$  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  $pK_a$  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-(карбоксоформамидо)-2-(3-(3-((3-карбоксопропил)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-(карбоксоформамидо)пентанамидо)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)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-2Н-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-2Н-пиран-2-он. Строение люциферина грибов доказано встречным синтезом.

## 6. 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 и 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 метил 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 и 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-дигидро-4H-имидазол-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 и 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 AsLn<sub>2</sub> – 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, и 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 и 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 и its analogs (Oral presentation). 18th International Symposium on Bioluminescence и 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 и Earthworm *Fridericia* (Invited lecture). 19th International Symposium on Bioluminescence и Chemiluminescence, May 29 – June 2, 2016, Tsukuba, Japan.  
[http://isbc2016.com/programs/pdf/detail\\_program.pdf](http://isbc2016.com/programs/pdf/detail_program.pdf)

## 7. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adam W. и др. A Convenient Synthesis of Hispidin from Piperonal // *Synthesis (Stuttg)*. 1994. Т. 1994. № 11. С. 1133–1134.
2. Adamczyk M., Reddy R.E., Yu Z. Synthesis of a novel fluorescent probe for estrogen receptor // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002. Т. 12. № 9. С. 1283–1285.
3. Aghamaali M.R. и др. Cloning, sequencing, expression and structural investigation of mnemiopsin from *Mnemiopsis leidyi*: an attempt toward understanding Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins. // *Protein J.* 2011. Т. 30. № 8. С. 566–574.
4. Agmon N. Proton pathways in green fluorescence protein. // *Biophys. J.* 2005. Т. 88. № 4. С. 2452–2461.
5. Airth R.L., Foerster G.E. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence // *Arch. Biochem. Biophys.* 1962. Т. 97. № 3. С. 567–573.
6. Airth R.L., McElroy W.D. Light emission from extracts of luminous fungi. // *J. Bacteriol.* 1959. Т. 77. № 2. С. 249–250.
7. Akiyoshi R., Ogo K., Suzuki H. Star-worm luciferase // 2014.
8. Alipour B.S. и др. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyris turkestanicus*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Т. 325. № 1. С. 215–222.
9. Amaral D.T., Prado R.A., Viviani V.R. Luciferase from *Fulgeochlizus bruchi* (Coleoptera:Elateridae), a Brazilian click-beetle with a single abdominal lantern: molecular evolution, biological function and comparison with other click-beetle luciferases. // *Photochem. & Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 2012. Т. 11. № 7. С. 1259–1267.
10. Arai R. и др. Detection of protein-protein interaction by bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase to red fluorescent protein // *J. Biosci. Bioeng.* 2002. Т. 94. № 4. С. 362–364.
11. Arnaut L.G., Formosinho S.J. Excited-state proton transfer reactions I. Fundamentals and intermolecular reactions // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 1993. Т. 75. № 1. С. 1–20.
12. Asai D. и др. Direct Measure of Fluorescence Intensity for Efficient Receptor-binding Assay: Conjugates of Ethinylcarboxyestradiol and 5(and 6)-Carboxyfluorescein via  $\omega$ -Diaminoalkanes as a Tracer for Estrogen Receptor // *J. Biochem.* 2007. Т. 143. № 6. С. 781–792.
13. Azevedo M.F. и др. Plasmodium falciparum transfected with ultra bright NanoLuc luciferase offers high sensitivity detection for the screening of growth and cellular trafficking inhibitors. // *PLoS One.* 2014. Т. 9. № 11. С. e112571.
14. Baldrige A. и др. Inhibition of twisting of a green fluorescent protein-like chromophore by metal complexation // *Chem. Commun.* 2010. Т. 46. № 31. С. 5686–5688.
15. Baldrige A. и др. Steric and Electronic Effects in Capsule-Confined Green Fluorescent Protein Chromophores // *J. Am. Chem. Soc.* 2011a. Т. 133. № 4. С. 712–715.
16. Baldrige A. и др. Recapture of GFP Chromophore Fluorescence in a Protein Host // *ACS Comb. Sci.* 2011b. Т. 13. № 3. С. 214–217.
17. Baldrige A., Amador A., Tolbert L.M. Fluorescence Turn On by Cholates Aggregates // *Langmuir.* 2011. Т. 27. № 7. С. 3271–3274.
18. Baldrige A., Kowalik J., Tolbert L. Efficient Synthesis of New 4-Arylideneimidazolin-5-ones Related to the GFP Chromophore by 2+3 Cyclocondensation of Arylideneimines with Imidate Ylides // *Synthesis (Stuttg)*. 2010. Т. 2010. № 14. С. 2424–2436.
19. Baranov M.S. и др. Conformationally Locked Chromophores as Models of Excited-State Proton

- Transfer in Fluorescent Proteins // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. T. 134. № 13. C. 6025–6032.
20. Baranov M.S. и др. Ring-expanding rearrangement of 2-acyl-5-arylidene-3,5-dihydro-4H-imidazol-4-ones in synthesis of flutimide analogs // *Tetrahedron*. 2014a. T. 70. № 23. C. 3714–3719.
21. Baranov M.S. и др. Red-Shifted Fluorescent Aminated Derivatives of a Conformationally Locked GFP Chromophore // *Chem. - A Eur. J.* 2014b. T. 20. № 41. C. 13234–13241.
22. Baranov M.S., Lukyanov K.A., Yampolsky I. V. Synthesis of the chromophores of fluorescent proteins and their analogs // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2013. T. 39. № 3. C. 223–244.
23. Beckert C. и др. Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense* // *Phytochemistry*. 1997. T. 44. № 2. C. 275–283.
24. Bell A.F. и др. Probing the Ground State Structure of the Green Fluorescent Protein Chromophore Using Raman Spectroscopy † // *Biochemistry*. 2000. T. 39. № 15. C. 4423–4431.
25. Bhadra S., Ellington A.D. A Spinach molecular beacon triggered by strand displacement // *RNA*. 2014. T. 20. № 8. C. 1183–1194.
26. Boger D.L. и др. Synthesis of (9 R ,12 S )- and (9 S ,12 S )-Cycloisodityrosine and Their N -Methyl Derivatives // *J. Org. Chem.* 1997. T. 62. № 7. C. 2054–2069.
27. Bolhofer W.A. The Preparation of Hydroxyphenylserines from Benzyloxybenzaldehydes and Glycine 1 // *J. Am. Chem. Soc.* 1954. T. 76. № 5. C. 1322–1326.
28. Bomati E.K., Manning G., Deheyn D.D. Amphioxus encodes the largest known family of green fluorescent proteins, which have diversified into distinct functional classes // *BMC Evol. Biol.* 2009. T. 9. № 1. C. 77.
29. Boyd V.L. и др. Activation of the Carboxy Terminus of a Peptide for Carboxy-Terminal Sequencing // *J. Org. Chem.* 1995. T. 60. № 8. C. 2581–2587.
30. Branchini B.R. и др. Luciferase from the Italian firefly *Luciola italica*: molecular cloning and expression. // *Comp. Biochem. Physiol. Part B, Biochem. {&} Mol. Biol.* 2006. T. 145. № 2. C. 159–167.
31. Branchini B.R. и др. A *Photinus pyralis* and *Luciola italica* chimeric firefly luciferase produces enhanced bioluminescence. // *Biochemistry*. 2014. T. 53. № 40. C. 6287–6289.
32. Branchini B.R. и др. An enhanced chimeric firefly luciferase-inspired enzyme for ATP detection and bioluminescence reporter and imaging applications. // *Anal. Biochem.* 2015. T. 484. C. 148–153.
33. Brejc K. и др. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. T. 94. № 6. C. 2306–2311.
34. Brini M. Calcium-sensitive photoproteins. // *Methods*. 2008. T. 46. № 3. C. 160–166.
35. Bulina M.E. и др. Interconversion of Anthozoa GFP-like fluorescent and non-fluorescent proteins by mutagenesis // *BMC Biochem.* 2002. T. 3. № 1. C. 7.
36. Cacciarini M. и др.  $\beta$ -Cyclodextrin as a mimetic of the natural GFP-chromophore environment // *Tetrahedron Lett.* 2012. T. 53. № 8. C. 973–976.
37. Campbell A.K. Extraction, partial purification and properties of obelin, the calcium-activated luminescent protein from the hydroid *Obelia geniculata*. // *Biochem. J.* 1974. T. 143. № 2. C. 411–8.
38. Campbell A.K., Herring P.J. Imidazolopyrazine bioluminescence in copepods and other marine organisms // *Mar. Biol.* 1990. T. 104. № 2. C. 219–225.
39. Chattoraj M. и др. Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. T. 93. № 16. C. 8362–8367.
40. Chen S. и др. Ingestibility, digestibility, and engineered biological control potential of *Flavobacterium hibernum*, isolated from larval mosquito habitats. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. T. 80. № 3. C. 1150–1158.

41. Chen S., Bagdasarian M., Walker E.D. Elizabethkingia anophelis: molecular manipulation and interactions with mosquito hosts. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. T. 81. № 6. С. 2233–2243.
42. Chen Y.-H., Lo W.-J., Sung K. Synthesis, photophysical properties, and application of o- and p-amino green fluorescence protein synthetic chromophores. // *J. Org. Chem.* 2013. T. 78. № 2. С. 301–10.
43. Choi Y.S. и др. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the luciferase from the firefly, *Hotaria unmunisana* // *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 2002. T. 132. № 3. С. 661–670.
44. Choi Y.S. и др. Genomic structure of the luciferase gene and phylogenetic analysis in the *Hotaria*-group fireflies // *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 2003. T. 134. № 2. С. 199–214.
45. Christensen M.A. и др. Highly fluorescent benzofuran derivatives of the GFP chromophore // *RSC Adv.* 2012. T. 2. № 22. С. 8243.
46. Christoph S., Meyer-Almes F.-J. Novel fluorescence based receptor binding assay method for receptors lacking ligand conjugates with preserved affinity: Study on estrogen receptor ? // *Biopolymers.* 2003. T. 72. № 4. С. 256–263.
47. Chudakov D.M. и др. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. // *Physiol. Rev.* 2010. T. 90. № 3. С. 1103–1163.
48. Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging // *Trends Biotechnol.* 2005. T. 23. № 12. С. 605–613.
49. Clark T.B. и др. Synthesis and Optical Properties of Two-Photon Absorbing GFP-type Probes // *J. Phys. Chem. C.* 2011. T. 115. № 15. С. 7331–7338.
50. Clark T.B. и др. Two-Photon and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy as Probes for Structural Determination in Amyloid- $\beta$  Peptides and Aggregates // *J. Phys. Chem. B.* 2014. T. 118. № 9. С. 2351–2359.
51. Close D. и др. The evolution of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) as a real-time bioreporter. // *Sensors (Basel).* 2012. T. 12. № 1. С. 732–752.
52. Contag C.H., Bachmann M.H. Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2002. T. 4. С. 235–60.
53. Conyard J. и др. Chemically Modulating the Photophysics of the GFP Chromophore // *J. Phys. Chem. B.* 2011. T. 115. № 6. С. 1571–1577.
54. Daniel C. и др. Bioluminescence imaging study of spatial and temporal persistence of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in living mice. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. T. 79. № 4. С. 1086–1094.
55. Daniel C. и др. Dual-Color Bioluminescence Imaging for Simultaneous Monitoring of the Intestinal Persistence of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in Living Mice. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. T. 81. № 16. С. 5344–5349.
56. Datta S.G. и др. Interaction of YOYO-1 with guanine-rich DNA // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014. T. 32. № 7. С. 1155–1163.
57. Day J.C. и др. Genomic structure of the luciferase gene from the bioluminescent beetle, *Nyctophila cf. caucasica*. // *J. Insect Sci.* 2006. T. 6. С. 1–8.
58. Delarze E. и др. Adaptation of a *Gaussia princeps* Luciferase reporter system in *Candida albicans* for in vivo detection in the *Galleria mellonella* infection model. // *Virulence.* 2015. T. 6. № 7. С. 684–693.
59. DeLuca M. Firefly luciferase. // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1976. T. 44. С. 37–68.
60. DeLuca M., McElroy W.D. Purification and properties of firefly luciferase // *Methods Enzymol.*

1978.

61. Demont E.H. и др. 1,3-Dimethyl Benzimidazolones Are Potent, Selective Inhibitors of the BRPF1 Bromodomain. // *ACS Med. Chem. Lett.* 2014. Т. 5. № 11. С. 1190–1195.
62. Deng H. и др. GFP-inspired fluorescent polymer // *Polym. Chem.* 2012. Т. 3. № 8. С. 1975.
63. Deplus R. и др. TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS // *EMBO J.* 2013. Т. 32. № 5. С. 645–655.
64. Devasia G.M. A new method for the synthesis of unsaturated 2,4-disubstituted 2-imidazolin-5-ones. // *Tetrahedron Lett.* 1976. Т. 17. № 7. С. 571–572.
65. Devine J.H. и др. Luciferase from the East European firefly *Luciola mingrelica*: Cloning and nucleotide sequence of the cDNA, overexpression in *Escherichia coli* and purification of the enzyme // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1993. Т. 1173. № 2. С. 121–132.
66. Ding D. и др. Bioprobes Based on AIE Fluorogens // *Acc. Chem. Res.* 2013. Т. 46. № 11. С. 2441–2453.
67. Dixon A.S. и др. NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. // *ACS Chem. Biol.* 2015.
68. Dong J. и др. The Meta - Green Fluorescent Protein Chromophore // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. Т. 129. № 33. С. 10084–10085.
69. Dong J. и др. Isomerization in Fluorescent Protein Chromophores Involves Addition/Elimination // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Т. 130. № 43. С. 14096–14098.
70. Dong J., Solntsev K.M., Tolbert L.M. Solvatochromism of the Green Fluorescence Protein Chromophore and Its Derivatives // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Т. 128. № 37. С. 12038–12039.
71. Drouot E., Piret J., Boivin G. Novel method based on “en passant” mutagenesis coupled with a gaussia luciferase reporter assay for studying the combined effects of human cytomegalovirus mutations. // *J. Clin. Microbiol.* 2013. Т. 51. № 10. С. 3216–3224.
72. Drozak J. и др. Molecular Identification of Carnosine Synthase as ATP-grasp Domain-containing Protein 1 (ATPGD1) // *J. Biol. Chem.* 2010. Т. 285. № 13. С. 9346–9356.
73. Dubinnyi M.A. и др. Lignan from Thyme Possesses Inhibitory Effect on ASIC3 Channel Current // *J. Biol. Chem.* 2012. Т. 287. № 39. С. 32993–33000.
74. Dunlap P. V., Kita-Tsukamoto K. Luminous Bacteria // *The Prokaryotes: Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry* / под ред. M. Dworkin и др. New York, NY: Springer New York, 2006. С. 863–892.
75. Duraj-Thatte A. Fluorescent GFP chromophores as potential ligands for various nuclear receptors.
76. Eckert N. и др. Influenza A virus encoding secreted Gaussia luciferase as useful tool to analyze viral replication and its inhibition by antiviral compounds and cellular proteins. // *PLoS One.* 2014. Т. 9. № 5. С. e97695.
77. Ekeley J.B., Ronzio A.R. The Action of Aromatic Aldehydes upon the Addition Products Obtained from Aromatic Amidines and Glyoxal // *J. Am. Chem. Soc.* 1935. Т. 57. № 7. С. 1353–1356.
78. El-Sayed R. и др. Thermostable luciferase from *Luciola cruciate* for imaging of carbon nanotubes and carbon nanotubes carrying doxorubicin using in vivo imaging system. // *Nano Lett.* 2013. Т. 13. № 4. С. 1393–1398.
79. Endo M., Kajiwaru M., Nakanishi K. Fluorescent constituents and cultivation of *Lampteromyces japonicus* // *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* 1970. № 5. С. 309.
80. Fagan T.F. и др. Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-binding photoprotein, mitrocomin. // *FEBS Lett.* 1993. Т. 333. № 3. С. 301–305.
81. Fang X. и др. Blue fluorescent protein analogs as chemosensors for Zn<sup>2+</sup> // *Biosens. Bioelectron.*

2013. Т. 42. С. 308–313.

82. Fang X. и др. Synthesized Blue Fluorescent Protein Analogue with Tunable Colors from Excited-State Intramolecular Proton Transfer through an N–H···N Hydrogen Bond // *J. Phys. Chem. Lett.*

2014. Т. 5. № 1. С. 92–98.

83. Fang Z. и др. Synthesis and biological evaluation of polyenylpyrrole derivatives as anticancer agents acting through caspases-dependent apoptosis. // *J. Med. Chem.* 2010. Т. 53. № 22. С. 7967–78.

84. Fernández-Piñas F. и др. Evaluation of the ecotoxicity of pollutants with bioluminescent microorganisms. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2014. Т. 145. С. 65–135.

85. Fery-Forgues S. и др. Microcrystals with Enhanced Emission Prepared from Hydrophobic Analogues of the Green Fluorescent Protein Chromophore via Reprecipitation // *Langmuir.* 2013. Т. 29. № 47. С. 14718–14727.

86. Filonov G.S. и др. Broccoli: Rapid Selection of an RNA Mimic of Green Fluorescent Protein by Fluorescence-Based Selection and Directed Evolution // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. Т. 136. № 46. С. 16299–16308.

87. Follenius-Wund A. и др. Fluorescent Derivatives of the GFP Chromophore Give a New Insight into the GFP Fluorescence Process // *Biophys. J.* 2003. Т. 85. № 3. С. 1839–1850.

88. Frizler M. и др. Chemical introduction of the green fluorescence: imaging of cysteine cathepsins by an irreversibly locked GFP fluorophore // *Org. Biomol. Chem.* 2013. Т. 11. № 35. С. 5913.

89. Frundzhyan V., Ugarova N. Bioluminescent assay of total bacterial contamination of drinking water. // *Luminescence.* 2007. Т. 22. № 3. С. 241–244.

90. Gabriel G.V.M., Lopes P.S., Viviani V.R. Suitability of *Macrolampis* firefly and *Pyrearinus* click beetle luciferases for bacterial light off toxicity biosensor. // *Anal. Biochem.* 2014. Т. 445. С. 73–79.

91. Gabriel G.V.M., Viviani V.R. Novel application of pH-sensitive firefly luciferases as dual reporter genes for simultaneous ratiometric analysis of intracellular pH and gene expression/location. // *Photochem. & Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 2014. Т. 13. № 12. С. 1661–1670.

92. Gahan C.G.M. The bacterial lux reporter system: applications in bacterial localisation studies. // *Curr. Gene Ther.* 2012. Т. 12. № 1. С. 12–19.

93. Gammon S.T. и др. Rational design of novel red-shifted BRET pairs: Platforms for real-time single-chain protease biosensors. // *Biotechnol. Prog.* 2009. Т. 25. № 2. С. 559–569.

94. Germain-Genevois C., Garandeau O., Couillaud F. Detection of Brain Tumors and Systemic Metastases Using NanoLuc and Fluc for Dual Reporter Imaging. // *Mol. Imaging Biol.* 2015.

95. Goedhart J. и др. Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. // *Nat. Methods.* 2010. Т. 7. № 2. С. 137–139.

96. Goedhart J. и др. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93% // *Nat. Commun.* 2012. Т. 3. С. 751.

97. Goto T. Chemistry of bioluminescence // *Pure Appl. Chem.* 1968. Т. 17. № 3-4. С. 421–442.

98. Gould S.J., Subramani S. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. // *Anal. Biochem.* 1988. Т. 175. № 1. С. 5–13.

99. Grabowski Z.R., Grabowska A. The Förster Cycle Reconsidered // *Zeitschrift für Phys. Chemie.* 1976. Т. 101. № 1-6. С. 197–209.

100. Green A.A., McElroy W.D. Crystalline firefly luciferase // *Biochim. Biophys. Acta.* 1956. Т. 20. С. 170–176.

101. Gronemeyer H., Gustafsson J.-Å., Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004. Т. 3. № 11. С. 950–964.



102. Gross L.A. и др. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. Т. 97. № 22. С. 11990–11995.
103. Gu M.B., Mitchell R.J., Kim B.C. Whole-cell-based biosensors for environmental biomonitoring and application. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2004. Т. 87. С. 269–305.
104. Gupta R. и др. Expression of the *Photobacterium luminescens lux* genes (*luxA*, *B*, *C*, *D*, and *E*) *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* 2003. Т. 4. № 3. С. 305–313.
105. Hall M.P. и др. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. // *ACS Chem. Biol.* 2012. Т. 7. № 11. С. 1848–57.
106. Hamorsky K.T. и др. *Chemiluminescence and Bioluminescence* / под ред. A. Roda. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010.
107. Han K.Y. и др. Understanding the Photophysics of the Spinach–DFHBI RNA Aptamer–Fluorogen Complex To Improve Live-Cell RNA Imaging // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. Т. 135. № 50. С. 19033–19038.
108. Harvey E.N. *No Title // History of Luminescence From the Earliest Times Until 1900.* Philadelphia, USA: American Philosophical Society, 1957.
109. Hasson S.A. и др. Chemogenomic profiling of endogenous *PARK2* expression using a genome-edited coincidence reporter. // *ACS Chem. Biol.* 2015. Т. 10. № 5. С. 1188–1197.
110. Hastings J.W., Nealson K.H. Bacterial bioluminescence. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1977. Т. 31. С. 549–95.
111. Hatano K. и др. A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation. // *Nucleic Acids Res.* 2015. Т. 43. № 8. С. 4075–4086.
112. Hatzigrigoriou E., Varvoglis A., Bakola-Christianopoulou M. Preparation of [hydroxy(((+)-10-camphorsulfonyl)oxy)iodo]benzene and its reactivity toward carbonyl compounds // *J. Org. Chem.* 1990. Т. 55. № 1. С. 315–318.
113. Haugwitz M. и др. Multiplexing Bioluminescent and Fluorescent Reporters to Monitor Live Cells // *Curr. Chem. Genomics.* 2008. Т. 1. № 1.
114. Hayashi S., Fukushima R., Wada N. Extraction and purification of a luminiferous substance from the luminous mushroom *Mycena chlorophos* // *Biophysics (Oxf).* 2012. Т. 8. С. 111–114.
115. He S.-X. и др. Nanoluciferase as a novel quantitative protein fusion tag: Application for overexpression and bioluminescent receptor-binding assays of human leukemia inhibitory factor // *Biochimie.* 2014. Т. 106. С. 140–148.
116. He X., Bell A.F., Tonge P.J. Synthesis and Spectroscopic Studies of Model Red Fluorescent Protein Chromophores // *Org. Lett.* 2002. Т. 4. № 9. С. 1523–1526.
117. Heim R., Prasher D.C., Tsien R.Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994. Т. 91. № 26. С. 12501–12504.
118. Henderson J.N. и др. Excited state proton transfer in the red fluorescent protein mKeima // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. Т. 131. № 37. С. 13212–13213.
119. Henrich C.J. и др. Botryllamides: Natural Product Inhibitors of ABCG2 // *ACS Chem. Biol.* 2009. Т. 4. № 8. С. 637–647.
120. Higuchi R., Krummel B., Saiki R.K. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. // *Nucleic Acids Res.* 1988. Т. 16. № 15. С. 7351–7367.
121. Hiramatsu N. и др. Alkaline phosphatase vs luciferase as secreted reporter molecules in vivo. // *Anal. Biochem.* 2005. Т. 339. № 2. С. 249–256.
122. Ho P. и др. Reporter enzyme inhibitor study to aid assembly of orthogonal reporter gene assays.

// ACS Chem. Biol. 2013. T. 8. № 5. C. 1009–1017.

123. Höfer K., Langejürgen L. V., Jäschke A. Universal Aptamer-Based Real-Time Monitoring of Enzymatic RNA Synthesis // J. Am. Chem. Soc. 2013. T. 135. № 37. C. 13692–13694.

124. Hopkins T.A. и др. Chemiluminescence of firefly luciferin. Model for the bioluminescent reaction and identification of the product excited state // J. Am. Chem. Soc. 1967. T. 89. № 26. C. 7148–7150.

125. Hori K. и др. Bioluminescence of *Renilla reniformis*. XIII. Identification of the product excited states during the chemiluminescent and bioluminescent oxidation of *Renilla* (sea pansy) luciferin and certain of its analogs // Biochemistry. 1973. T. 12. № 22. C. 4463–4468.

126. Hori K., Wampler J.E., Cormier M.J. Chemiluminescence of *Renilla*(sea pansy) luciferin and its analogues // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1973. № 14. C. 492.

127. Hsu Y.-H. и др. Locked ortho - and para -Core Chromophores of Green Fluorescent Protein; Dramatic Emission Enhancement via Structural Constraint // J. Am. Chem. Soc. 2014. T. 136. № 33. C. 11805–11812.

128. Htun H. и др. Direct Visualization of the Human Estrogen Receptor alpha Reveals a Role for Ligand in the Nuclear Distribution of the Receptor // Mol. Biol. Cell. 1999. T. 10. № 2. C. 471–486.

129. Huang G. и др. Modification of the Green Fluorescent Protein Chromophore with Large Aromatic Moieties: Photophysical Study and Solid-State Emission // Asian J. Org. Chem. 2012a. T. 1. № 4. C. 352–358.

130. Huang G.-J. и др. Site-Selective Hydrogen-Bonding-Induced Fluorescence Quenching of Highly Solvatofluorochromic GFP-like Chromophores // Org. Lett. 2012b. T. 14. № 19. C. 5034–5037.

131. Huang H. и др. A G-quadruplex-containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore // Nat. Chem. Biol. 2014. T. 10. № 8. C. 686–691.

132. Huang P.-C. и др. A multisampling reporter system for monitoring microRNA activity in the same population of cells. // J. Biomed. {&} Biotechnol. 2009. T. 2009. C. 104716.

133. Hulleman J.D. и др. A high-throughput cell-based Gaussia luciferase reporter assay for identifying modulators of fibulin-3 secretion. // J. Biomol. Screen. 2013. T. 18. № 6. C. 647–658.

134. Hwang M.-H. и др. Biological production of an integrin  $\alpha\beta3$  targeting imaging probe and functional verification. // Biomed Res. Int. 2015. T. 2015. C. 681012.

135. Ikejiri M. и др. Design and Concise Synthesis of a Novel Type of Green Fluorescent Protein Chromophore Analogue // Org. Lett. 2012. T. 14. № 17. C. 4406–4409.

136. Illarionov B.A. и др. Sequence of the cDNA encoding the Ca(2+)-activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima*. // Gene. 1995. T. 153. № 2. C. 273–274.

137. Inoue S. и др. Squid bioluminescence II. Isolation from *Watasenia scintillans* and synthesis of 2-(p-hydroxybenzyl)-6-(p-hydroxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one // Chem. Lett. 1975. № 2. C. 141–144.

138. Inouye S. и др. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1985. T. 82. № 10. C. 3154–3158.

139. Inouye S. и др. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris* : cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase // FEBS Lett. 2000a. T. 481. № 1. C. 19–25.

140. Inouye S. и др. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase. // FEBS Lett. 2000b. T. 481. № 1. C. 19–25.

141. Inouye S. Cloning, expression, purification and characterization of an isotype of clytin, a calcium-binding photoprotein from the luminous hydromedusa *Clytia gregarium*. // J. Biochem. 2008. T. 143. № 5. C. 711–717.

142. Inouye S., Sahara Y. Identification of two catalytic domains in a luciferase secreted by the copepod *Gaussia princeps*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. T. 365. № 1. C. 96–101.
143. Inouye S., Sasaki S. Overexpression, purification and characterization of the catalytic component of *Oplophorus* luciferase in the deep-sea shrimp, *Oplophorus gracilirostris*. // *Protein Expr. Purif.* 2007a. T. 56. № 2. C. 261–8.
144. Inouye S., Sasaki S. Overexpression, purification and characterization of the catalytic component of *Oplophorus* luciferase in the deep-sea shrimp, *Oplophorus gracilirostris* // *Protein Expr. Purif.* 2007b. T. 56. № 2. C. 261–268.
145. Inouye S., Tsuji F.I. Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-activated photoprotein, clytin. // *FEBS Lett.* 1993. T. 315. № 3. C. 343–346.
146. Ishida N. и др. Synthesis of Pyridine–Borane Complexes via Electrophilic Aromatic Borylation // *J. Org. Chem.* 2010. T. 75. № 24. C. 8709–8712.
147. Isobe M., Uyakul D., Goto T. Lampteromyces bioluminescence - 2 lampteroflavin, a light emitter in the luminous mushroom, *L. japonicus* // *Tetrahedron Lett.* 1988. T. 29. № 10. C. 1169–1172.
148. Ivashkin P.E. и др. A synthetic GFP-like chromophore undergoes base-catalyzed autoxidation into acylimine red form // *J. Org. Chem.* 2011. T. 76. № 8. C. 2782–2791.
149. Ivashkin P.E., Yampolsky I. V., Lukyanov K.A. Synthesis and properties of chromophores of fluorescent proteins // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2009. T. 35. № 6. C. 652–669.
150. Jaeger D.A., Broadhurst M.D., Cram D.J. Electrophilic substitution at saturated carbon. 52. A model for the proton transfer steps of biological transamination and the effect of a 4-pyridyl group on the base-catalyzed racemization of a carbon acid // *J. Am. Chem. Soc.* 1979. T. 101. № 3. C. 717–732.
151. Jia R. и др. Extension of a cascade reaction: Microwave-assisted synthesis of the GFP chromophore derivatives // *J. Heterocycl. Chem.* 2010. C. NA–NA.
152. Jones B.L. и др. Conservation of the estrogen receptor function in invertebrate reproduction (IN PREPARATION) // 2015.
153. Jones K., Hibbert F., Keenan M. Glowing jellyfish, luminescence and a molecule called coelenterazine // *Trends Biotechnol.* 1999. T. 17. № 12. C. 477–481.
154. Jones K., Keenan M., Hibbert F. A Suzuki Coupling Approach to Pyrazines Related to Coelenterazine // *Synlett.* 1996. T. 1996. № 06. C. 509–510.
155. Kamlet M.J. и др. Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, .pi.\*, .alpha., and .beta., and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation // *J. Org. Chem.* 1983. T. 48. № 17. C. 2877–2887.
156. Karlsson E.A. и др. Visualizing real-time influenza virus infection, transmission and protection in ferrets. // *Nat. Commun.* 2015. T. 6. C. 6378.
157. Karp M. и др. A Sensitive Model System for In Vivo Monitoring of Baculovirus Gene Expression in Single Infected Insect Cells // *Bio/Technology.* 1992. T. 10. № 5. C. 565–569.
158. Karp M. и др. Identification of biotinylated molecules using a baculovirus-expressed luciferase-streptavidin fusion protein. // *Biotechniques.* 1996. T. 20. № 3. C. 452–456,458–459.
159. Karpetsky T.P., White E.H. The synthesis of cypridina etiolumiferamine and the proof of structure of cypridina luciferin // *Tetrahedron.* 1973. T. 29. № 23. C. 3761–3773.
160. Katritzky A.R. и др. Synthesis and photochemistry of pH-sensitive GFP chromophore analogs // *Tetrahedron Lett.* 2011. T. 52. № 17. C. 2224–2227.
161. Keenan M., Jones K., Hibbert F. Highly efficient and flexible total synthesis of coelenterazine // *Chem. Commun.* 1997. № 3. C. 323–324.
162. Kehraus S. и др. Novel Amino Acid Derived Natural Products from the Ascidian Atriolum

- robustum : Identification and Pharmacological Characterization of a Unique Adenosine Derivative // *J. Med. Chem.* 2004. Т. 47. № 9. С. 2243–2255.
163. Kellenberger C.A. и др. RNA-Based Fluorescent Biosensors for Live Cell Imaging of Second Messengers Cyclic di-GMP and Cyclic AMP-GMP // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. Т. 135. № 13. С. 4906–4909.
164. Kerneur G. и др. Convenient Preparation of 4-Alkylidene-1H-imidazol-5(4H)-one Derivatives from Imidate and Aldehydes by a Solvent-Free Cycloaddition under Microwaves // *Synthesis (Stuttg)*. 1997. Т. 1997. № 03. С. 287–289.
165. Kesvatera T. и др. Measurement and modelling of sequence-specific pKa values of lysine residues in calbindin D9k. // *J. Mol. Biol.* 1996. Т. 259. № 4. С. 828–839.
166. Kidwai A.R., Devasia G.M. A New Method for the Synthesis of Amino Acids. Synthesis of Amino Acids and Their Derivatives through 2,4-Disubstituted 2-Imidazolin-5-ones 1 // *J. Org. Chem.* 1962. Т. 27. № 12. С. 4527–4531.
167. Kim M.S., Kim K.H. Effects of NV gene knock-out recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) on Mx gene expression in Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) // *Fish & Shellfish Immunol.* 2012. Т. 32. № 3. С. 459–463.
168. Kim S.B. и др. Superluminescent variants of marine luciferases for bioassays. // *Anal. Chem.* 2011. Т. 83. № 22. С. 8732–8740.
169. Kim S.B., Sato M., Tao H. Circularly permuted bioluminescent probes for illuminating ligand-activated protein dynamics. // *Bioconjug. Chem.* 2008. Т. 19. № 12. С. 2480–2486.
170. Kobayashi M. и др. Establishment and characterization of transplantable, luminescence labeled rat renal cell carcinoma cell lines. // *J. Urol.* 2010. Т. 183. № 5. С. 2029–2035.
171. Kogure T. и др. A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. // *Nat. Biotechnol.* 2006. Т. 24. № 5. С. 577–581.
172. Kojima S. и др. Mechanism of the redox reaction of the *Aequorea* green fluorescent protein (GFP) // *Tetrahedron Lett.* 1997. Т. 38. № 16. С. 2875–2878.
173. Kojima S. и др. Fluorescent properties of model chromophores of tyrosine-66 substituted mutants of *Aequorea* green fluorescent protein (GFP) // *Tetrahedron Lett.* 1998. Т. 39. № 29. С. 5239–5242.
174. Koksharov M.I., Ugarova N.N. Approaches to engineer stability of beetle luciferases. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2012. Т. 2. № 3. С. e201209004.
175. Koo J.A., Schmidt S.P., Schuster G.B. Bioluminescence of the firefly: key steps in the formation of the electronically excited state for model systems. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1978. Т. 75. № 1. С. 30–3.
176. Kuchar'iková S. и др. *Candida albicans* biofilm development on medically-relevant foreign bodies in a mouse subcutaneous model followed by bioluminescence imaging. // *J. Vis. Exp.* 2015. № 95. С. 52239.
177. Kwok R.T.K. и др. Biosensing by luminogens with aggregation-induced emission characteristics // *Chem. Soc. Rev.* 2015. Т. 44. № 13. С. 4228–4238.
178. Lampinen J., Virta M., Karp M. Use of controlled luciferase expression to monitor chemicals affecting protein synthesis. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. Т. 61. № 8. С. 2981–2989.
179. Lang I. и др. Binding studies of TNF receptor superfamily (TNFRSF) receptors on intact cells. // *J. Biol. Chem.* 2015.
180. Leclerc G.M. и др. Development of a destabilized firefly luciferase enzyme for measurement of gene expression. // *Biotechniques.* 2000. Т. 29. № 3. С. 590–1, 594–6, 598 passim.

181. Lee I.-K., Yun B.-S. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2011. T. 64. № 5. С. 349–359.
182. Lee J.-S. и др. Fluorescence Response Profiling for Small Molecule Sensors Utilizing the Green Fluorescent Protein Chromophore and Its Derivatives // *ACS Comb. Sci.* 2011. T. 13. № 1. С. 32–38.
183. Lee K.S. и др. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the luciferase from the firefly, *Pyrocoelia rufa*. // *J. Biotechnol.* 2001. T. 92. № 1. С. 9–19.
184. Leiderman P. и др. Ultrafast Excited-State Dynamics in the Green Fluorescent Protein Variant S65T/H148D. 3. Short- and Long-Time Dynamics of the Excited-State Proton Transfer † // *Biochemistry*. 2007. T. 46. № 43. С. 12026–12036.
185. Lelimosin M. и др. Intrinsic Dynamics in ECFP and Cerulean Control Fluorescence Quantum Yield // *Biochemistry*. 2009. T. 48. № 42. С. 10038–10046.
186. Lerestif J.M. и др. 1,3-Dipolar cycloaddition of imidate ylides on imino-alcohols: Synthesis of new imidazolones using solvent free conditions // *Tetrahedron*. 1995. T. 51. № 24. С. 6757–6774.
187. Lerestif J.M., Bazureau J.P., Hamelin J. Cycloaddition with stabilized imidates as potential azomethines ylides : A new route to 2-imidazoline and 4-yliden-s-imidazolinone // *Tetrahedron Lett.* 1993. T. 34. № 29. С. 4639–4642.
188. Li Y. и др. An OFF–ON fluorescent probe for Zn<sup>2+</sup> based on a GFP-inspired imidazolone derivative attached to a 1,10-phenanthroline moiety // *Chem. Commun.* 2011. T. 47. № 15. С. 4361.
189. Liang J., Tang B.Z., Liu B. Specific light-up bioprobes based on AIEgen conjugates // *Chem. Soc. Rev.* 2015. T. 44. № 10. С. 2798–2811.
190. Liu D. и др. Fast hepatitis C virus RNA elimination and NS5A redistribution by NS5A inhibitors studied by a multiplex assay approach. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. T. 59. № 6. С. 3482–3492.
191. Liu M. и др. Secreted *Gaussia princeps* luciferase as a reporter of *Escherichia coli* replication in a mouse tissue cage model of infection. // *PLoS One*. 2014a. T. 9. № 3. С. e90382.
192. Liu X.-Y. и др. New insight into the application of GFP chromophore inspired derivatives: a F – fluorescent chemodosimeter // *RSC Adv.* 2014b. T. 4. № 96. С. 53557–53560.
193. Lorenz W.W. и др. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991. T. 88. № 10. С. 4438–4442.
194. Louber J. и др. RIG-I self-oligomerization is either dispensable or very transient for signal transduction. // *PLoS One*. 2014. T. 9. № 9. С. e108770.
195. Lowell A.N. и др. Syntheses of differentially protected isocoumarins // *Tetrahedron*. 2010. T. 66. № 30. С. 5573–5582.
196. Luker K.E. и др. In vivo imaging of ligand receptor binding with *Gaussia* luciferase complementation. // *Nat. Med.* 2012. T. 18. № 1. С. 172–177.
197. Lupold S.E. и др. A real time *Metridia* luciferase based non-invasive reporter assay of mammalian cell viability and cytotoxicity via the  $\beta$ -actin promoter and enhancer. // *PLoS One*. 2012. T. 7. № 5. С. e36535.
198. Machleidt T. и др. NanoBRET--A Novel BRET Platform for the Analysis of Protein-Protein Interactions. // *ACS Chem. Biol.* 2015. T. 10. № 8. С. 1797–1804.
199. Maguire C.A. и др. Codon-optimized *Luciola italica* luciferase variants for mammalian gene expression in culture and in vivo. // *Mol. Imaging*. 2012. T. 11. № 1. С. 13–21.
200. Malikova N.P. и др. Characterization of hydromedusan Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins as a tool for measurement of Ca<sup>2+</sup>-concentration // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. T. 406. № 23. С. 5715–5726.
201. Mandal D., Tahara T., Meech S.R. Excited-State Dynamics in the Green Fluorescent Protein

- Chromophore // *J. Phys. Chem. B*. 2004. Т. 108. № 3. С. 1102–1108.
202. Markova S. V и др. Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins. // *Biochemistry*. 2002. Т. 41. № 7. С. 2227–2236.
203. Markova S. V и др. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme. // *J. Biol. Chem.* 2004. Т. 279. № 5. С. 3212–7.
204. Markova S. V и др. Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria*: cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein. // *Photochem. {&} Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 2010. Т. 9. № 6. С. 757–765.
205. Markova S. V и др. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroë abyssicola*: a novel type of Ca(2+) -regulated photoprotein. // *FEBS J.* 2012. Т. 279. № 5. С. 856–870.
206. Markova S. V и др. The smallest natural high-active luciferase: Cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. Т. 457. № 1. С. 77–82.
207. Markova S. V, Burakova L.P., Vysotski E.S. High-active truncated luciferase of copepod *Metridia longa*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. Т. 417. № 1. С. 98–103.
208. Markova S. V, Vysotski E.S. Coelenterazine-Dependent Luciferases. // *Biochem. Biokhimiia*. 2015. Т. 80. № 6. С. 714–732.
209. Markwardt M.L. и др. An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible photoswitching // *PLoS One*. 2011. Т. 6. № 3. С. e17896.
210. Marques S.M. и др. LC-MS and microscale NMR analysis of luciferin-related compounds from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. // *J. Photochem. Photobiol. B*. 2011. Т. 102. № 3. С. 218–23.
211. Marquette C.A., Blum L.J. *Chemiluminescence and Bioluminescence* / под ред. A. Roda. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010.
212. Martynov I.Y. и др. Proton Transfer Reactions in the Excited Electronic States of Aromatic Molecules // *Russ. Chem. Rev.* 1977. Т. 46. № 1. С. 1–15.
213. Matthews J.C., Hori K., Cormier M.J. Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase // *Biochemistry*. 1977. Т. 16. № 1. С. 85–91.
214. McCutcheon D.C. и др. Expedient synthesis of electronically modified luciferins for bioluminescence imaging. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Т. 134. № 18. С. 7604–7.
215. McGrier P.L. и др. Hydroxycruciforms: Amine-Responsive Fluorophores // *Chem. - A Eur. J.* 2008. Т. 14. № 15. С. 4503–4510.
216. McKay M.J., Carroll A.R., Quinn R.J. Perspicamides A and B, Quinolinecarboxylic Acid Derivatives from the Australian Ascidian *Botrylloides perspicuum* // *J. Nat. Prod.* 2005. Т. 68. № 12. С. 1776–1778.
217. Mehraein-Ghomi F. и др. Inhibitor of p52 NF-κB subunit and androgen receptor (AR) interaction reduces growth of human prostate cancer cells by abrogating nuclear translocation of p52 and phosphorylated AR(ser81). // *Genes {&} cancer*. 2015. Т. 6. № 9-10. С. 428–444.
218. Mei J. и др. Aggregation-Induced Emission: The Whole Is More Brilliant than the Parts // *Adv. Mater.* 2014. Т. 26. № 31. С. 5429–5479.
219. Michelini E. и др. Spectral-resolved gene technology for multiplexed bioluminescence and high-content screening. // *Anal. Chem.* 2008. Т. 80. № 1. С. 260–267.

220. Misawa N. и др. Rapid and high-sensitivity cell-based assays of protein-protein interactions using split click beetle luciferase complementation: an approach to the study of G-protein-coupled receptors. // *Anal. Chem.* 2010. Т. 82. № 6. С. 2552–2560.
221. Mitani Y. и др. Cloning and characterization of luciferase from a Fijian luminous click beetle. // *Photochem. Photobiol.* 2013. Т. 89. № 5. С. 1163–1169.
222. Mizuno H. и др. Photo-Induced Peptide Cleavage in the Green-to-Red Conversion of a Fluorescent Protein // *Mol. Cell.* 2003. Т. 12. № 4. С. 1051–1058.
223. Mo X.-L. и др. Enabling systematic interrogation of protein-protein interactions in live cells with a versatile ultra-high-throughput biosensor platform. // *J. Mol. Cell Biol.* 2015.
224. Mukherjee A. и др. Monitoring nanoparticle-mediated cellular hyperthermia with a high-sensitivity biosensor. // *Nanomedicine (Lond).* 2014. Т. 9. № 18. С. 2729–2743.
225. Munier S. и др. Exploration of binary virus-host interactions using an infectious protein complementation assay. // *Mol. Cell. proteomics MCP.* 2013. Т. 12. № 10. С. 2845–2855.
226. Nagawade R.R. и др. Synthesis of new series of 1-Aryl-1,4-dihydro-4-oxo-6-methyl pyridazine-3-carboxylic acid as potential antibacterial agents. // *Eur. J. Med. Chem.* 2005. Т. 40. № 12. С. 1325–30.
227. Nakajima Y., Ohmiya Y. Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay // *Expert Opin. Drug Discov.* 2010.
228. Nakamura H., Takeuchi D., Murai A. Synthesis of 5- and 3,5-Substituted 2-Aminopyrazines by Pd Mediated Stille Coupling // *Synlett.* 1995. Т. 1995. № 12. С. 1227–1228.
229. Nawtaisong P. и др. Trans-splicing group I intron targeting hepatitis C virus IRES mediates cell death upon viral infection in Huh7.5 cells. // *Virology.* 2015. Т. 481. С. 223–234.
230. Nie J. и др. Optimization and validation of a high throughput method for detecting neutralizing antibodies against human papillomavirus (HPV) based on pseudovirions. // *J. Med. Virol.* 2014. Т. 86. № 9. С. 1542–1555.
231. Niers J.M. и др. Single reporter for targeted multimodal in vivo imaging. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Т. 134. № 11. С. 5149–5156.
232. Nishitsuji H. и др. A novel reporter system to monitor early stages of the HBV life cycle. // *Cancer Sci.* 2015.
233. Niwa H. и др. Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. Т. 93. № 24. С. 13617–13622.
234. Noguchi T. и др. A dual-color luciferase assay system reveals circadian resetting of cultured fibroblasts by co-cultured adrenal glands. // *PLoS One.* 2012. Т. 7. № 5. С. e37093.
235. Norisada J. и др. A sensitive assay for the biosynthesis and secretion of MANF using NanoLuc activity. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. Т. 449. № 4. С. 483–489.
236. Novac N., Heinzel T. Nuclear Receptors: Overview and Classification // *Curr. Drug Target - Inflammation Allergy.* 2004. Т. 3. № 4. С. 335–346.
237. Oba Y. и др. Identification and characterization of a luciferase isotype in the Japanese firefly, *Luciola cruciata*, involving in the dim glow of firefly eggs. // *Biochemistry.* 2010. Т. 49. № 51. С. 10788–10795.
238. Oba Y., Kumazaki M., Inouye S. Characterization of luciferases and its paralogue in the Panamanian luminous click beetle *Pyrophorus angustus*: a click beetle luciferase lacks the fatty acyl-CoA synthetic activity. // *Gene.* 2010. Т. 452. № 1. С. 1–6.
239. Oestreicher E.G., Pinto G.F. Pocket computer program for fitting the Michaelis-Menten equation. // *Comput. Biol. Med.* 1983. Т. 13. № 4. С. 309–15.

240. Ogo K., Akiyoshi R., Suzuki H. Firefly luciferase // 2014.
241. Ohmiya Y. и др. CLONING, EXPRESSION and SEQUENCE ANALYSIS OF cDNA FOR THE LUCIFERASES FROM THE JAPANESE FIREFLIES, *Pyrocoelia tniyako* AND *Hotaria parvula* // Photochem. Photobiol. 1995. Т. 62. № 2. С. 309–313.
242. Ohtsuka H., Rudie N.G., Wampler J.E. Structural identification and synthesis of luciferin from the bioluminescent earthworm, *Diplocardia longa* // Biochemistry. 1976. Т. 15. № 5. С. 1001–1004.
243. Oker-Blom C. и др. A baculovirus-expressed fusion protein containing the antibody-binding domain of protein A and insect luciferase. // Biotechniques. 1993. Т. 14. № 5. С. 800–809.
244. Oliveira A.G. и др. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. // Photochem. Photobiol. Sci. 2012. Т. 11. № 5. С. 848–52.
245. Oliveira A.G., Stevani C. V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. // Photochem. Photobiol. Sci. 2009. Т. 8. № 10. С. 1416–21.
246. Ormö M. и др. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. // Science. 1996. Т. 273. № 5280. С. 1392–1395.
247. Ortiz Barbosa Y.A., Hart D.J., Magomedov N.A. Spiroquinazoline support studies: methods for the preparation of imidazoloindolines from oxindoles // Tetrahedron. 2006. Т. 62. № 37. С. 8748–8754.
248. Ortiz de Montellano P.R. Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. // Chem. Rev. 2010. Т. 110. № 2. С. 932–48.
249. Oumouch S. и др. An Expeditious Synthesis of 2,4-Disubstituted 2-Imidazolin-5-ones // Synthesis (Stuttg). 2005. № 1. С. 25–27.
250. Paddison P.J., Caudy A.A., Hannon G.J. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002. Т. 99. № 3. С. 1443–8.
251. Paige J.S. и др. Fluorescence Imaging of Cellular Metabolites with RNA // Science (80-. ). 2012. Т. 335. № 6073. С. 1194–1194.
252. Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R. RNA Mimics of Green Fluorescent Protein // Science (80-. ). 2011. Т. 333. № 6042. С. 642–646.
253. Pakhomov A.A., Martynov V.I. Chromophore Aspartate Oxidation–Decarboxylation in the Green-to-Red Conversion of a Fluorescent Protein from *Zoanthus* sp. 2 † // Biochemistry. 2007. Т. 46. № 41. С. 11528–11535.
254. Pakhomov A.A., Martynov V.I. GFP Family: Structural Insights into Spectral Tuning // Chem. Biol. 2008. Т. 15. № 8. С. 755–764.
255. Pakhomov A.A., Tretyakova Y.A., Martynov V.I. Posttranslational reactions that shift spectra of asFP595, a Protein from *Anemonia sulcata*, towards the long-wavelength region // Russ. J. Bioorganic Chem. 2010. Т. 36. № 1. С. 109–113.
256. Palm G.J. и др. The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein. // Nat. Struct. Biol. 1997. Т. 4. № 5. С. 361–365.
257. Patterson S.S. и др. Codon optimization of bacterial luciferase (*lux*) for expression in mammalian cells. // J. Ind. Microbiol. {&} Biotechnol. 2005. Т. 32. № 3. С. 115–123.
258. Petkova I. и др. Tuning the Excited-State Dynamics of GFP-Inspired Imidazolone Derivatives // J. Phys. Chem. A. 2010. Т. 114. № 1. С. 10–20.
259. Petushkov V.N., Rodionova N.S. New types of luminescent systems of soil enchytraeids (Annelida: Clitellata: Oligochaeta: Enchytraeidae) // Dokl. Biochem. Biophys. 2005. Т. 401. № 1-6. С. 115–118.
260. Petushkov V.N., Rodionova N.S., Bondar V.S. Study of the luminescence system of the soil



- enchytraeid *Fridericia heliota* (Annelida: Clitellata: Oligochaeta: Enchytraeidae). // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2003. T. 391. C. 204–207.
261. Petushkov V.N.N., Rodionova N.S.S. Purification and partial spectral characterization of a novel luciferin from the luminous enchytraeid *Fridericia heliota* // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2007. T. 87. № 2. C. 130–136.
262. Piatkevich K.D. и др. Engineering ESPT pathways based on structural analysis of LSSmKate red fluorescent proteins with large stokes shift // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. T. 132. № 31. C. 10762–10770.
263. Picaud S. и др. 9 H -Purine Scaffold Reveals Induced-Fit Pocket Plasticity of the BRD9 Bromodomain // *J. Med. Chem.* 2015. T. 58. № 6. C. 2718–2736.
264. Pietrella D. и др. A luciferase reporter for gene expression studies and dynamic imaging of superficial *Candida albicans* infections. // *Methods Mol. Biol.* 2012. T. 845. C. 537–546.
265. Pletneva N. и др. Structure of a red fluorescent protein from *Zoanthus*, zRFP574, reveals a novel chromophore // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2006. T. 62. № 5. C. 527–532.
266. Pletneva N. и др. Refined crystal structures of red and green fluorescent proteins from the button polyp *Zoanthus* // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2007. T. 63. № 10. C. 1082–1093.
267. Pothoulakis G. и др. The Spinach RNA Aptamer as a Characterization Tool for Synthetic Biology // *ACS Synth. Biol.* 2014. T. 3. № 3. C. 182–187.
268. Powers M.L. и др. Expression and characterization of the calcium-activated photoprotein from the ctenophore *Bathocyroe fosteri*: insights into light-sensitive photoproteins. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. T. 431. № 2. C. 360–366.
269. Prasher D., McCann R.O., Cormier M.J. Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985. T. 126. № 3. C. 1259–1268.
270. Prasher D.C. и др. Sequence comparisons of complementary DNAs encoding aequorin isotypes. // *Biochemistry.* 1987. T. 26. № 5. C. 1326–1332.
271. Prinz A., Diskar M., Herberg F.W. Application of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for biomolecular interaction studies. // *Chembiochem.* 2006. T. 7. № 7. C. 1007–1012.
272. Qu L. и др. Development of a *Gaussia* luciferase-based human norovirus protease reporter system: cell type-specific profile of Norwalk virus protease precursors and evaluation of inhibitors. // *J. Virol.* 2014. T. 88. № 18. C. 10312–10326.
273. Quillin M.L. и др. Kindling Fluorescent Protein from *Anemonia sulcata*: Dark-State Structure at 1.38 Å Resolution // *Biochemistry.* 2005. T. 44. № 15. C. 5774–5787.
274. Rao M.R., Faulkner D.J. Botryllamides E–H, Four New Tyrosine Derivatives from the Ascidian *Botrylloides t yreum* // *J. Nat. Prod.* 2004. T. 67. № 6. C. 1064–1066.
275. Reet N. Van и др. A panel of *Trypanosoma brucei* strains tagged with blue and red-shifted luciferases for bioluminescent imaging in murine infection models. // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014. T. 8. № 8. C. e3054.
276. Rehemtulla A. и др. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. // *Neoplasia.* 2000. T. 2. № 6. C. 491–5.
277. Remington S.J. и др. zFP538, a Yellow-Fluorescent Protein from *Zoanthus*, Contains a Novel Three-Ring Chromophore // *Biochemistry.* 2005. T. 44. № 1. C. 202–212.
278. Rickert E.L. и др. Synthesis and Characterization of Fluorescent 4-Hydroxytamoxifen Conjugates with Unique Antiestrogenic Properties // *Bioconjug. Chem.* 2010. T. 21. № 5. C. 903–910.
279. Riedl J. и др. GFP-like Fluorophores as DNA Labels for Studying DNA–Protein Interactions // *J. Org. Chem.* 2012. T. 77. № 18. C. 8287–8293.

280. Rizzo M.A. и др. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. // *Nat. Biotechnol.* 2004. Т. 22. № 4. С. 445–449.
281. Robers M.B. и др. Target engagement and drug residence time can be observed in living cells with BRET. // *Nat. Commun.* 2015. Т. 6. С. 10091.
282. Roda A. и др. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. // *Trends Biotechnol.* 2004. Т. 22. № 6. С. 295–303.
283. Roda A. и др. Bioengineered bioluminescent magnetotactic bacteria as a powerful tool for chip-based whole-cell biosensors. // *Lab Chip.* 2013. Т. 13. № 24. С. 4881–4889.
284. Rodionova N.S., Bondar V.S., Petushkov V.N. ATP is a cosubstrate of the luciferase of the earthworm *Fridericia heliota* (Annelida: Clitellata: Oligochaeta: Enchytraeidae). // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2003. Т. 392. С. 253–255.
285. Rodionova N.S., Petushkov V.N. Effect of different salts and detergents on luciferin–luciferase luminescence of the enchytraeid *Fridericia heliota* // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2006. Т. 83. № 2. С. 123–128.
286. Rota E. и др. Redescription of *Fridericia heliota* (Annelida, Clitellata: Enchytraeidae), a luminous worm from the Siberian taiga, with a review of bioluminescence in the Oligochaeta // *J. Zool.* 2003. Т. 260. № 3. С. 291–299.
287. Sala-Newby G.B., Thomson C.M., Campbell A.K. Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyris noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*. // *Biochem. J.* 1996. Т. 313 ( Pt 3. С. 761–767.
288. Salomonson E. и др. Imaging CXCL12-CXCR4 signaling in ovarian cancer therapy. // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 1. С. e51500.
289. Sawano A., Miyawaki A. Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. // *Nucleic Acids Res.* 2000. Т. 28. № 16. С. E78.
290. Schaub F.X. и др. Fluorophore-NanoLuc BRET Reporters Enable Sensitive In Vivo Optical Imaging and Flow Cytometry for Monitoring Tumorigenesis. // *Cancer Res.* 2015. Т. 75. № 23. С. 5023–5033.
291. Schuster G.B. Chemiluminescence of organic peroxides. Conversion of ground-state reactants to excited-state products by the chemically initiated electron-exchange luminescence mechanism // *Acc. Chem. Res.* 1979. Т. 12. № 10. С. 366–373.
292. Schwedhelm E. и др. High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma // *J. Chromatogr. B.* 2007. Т. 851. № 1-2. С. 211–219.
293. Seliger H.H., McElroy W.D. The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1964. Т. 52. № 1. С. 75–81.
294. Seto S., Ogura K., Nishiyama Y. A Convenient Synthetic Method of 2-Carbamoyl-6-methoxybenzothiazole, One of Intermediates for the Synthesis of Firefly Luciferin // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1963. Т. 36. № 3. С. 331–333.
295. Shagin D.A. и др. GFP-like Proteins as Ubiquitous Metazoan Superfamily: Evolution of Functional Features and Structural Complexity // *Mol. Biol. Evol.* 2004. Т. 21. № 5. С. 841–850.
296. Shaner N.C. и др. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. // *Nat. Biotechnol.* 2004. Т. 22. № 12. С. 1567–1572.
297. Shen X. и др. Tuning the solid-state emission of the analogous GFP chromophore by varying alkyl chains in the imidazolinone ring // *Sci. China Chem.* 2013. Т. 56. № 9. С. 1197–1203.
298. Shi L. и др. Simultaneous determination of Hg(II) and Zn(II) using a GFP inspired chromophore

// *Talanta*. 2012. T. 100. C. 401–404.

299. Shigematsu N. и др. Total synthesis of WS9326A, a potent tachykinin antagonist from *Streptomyces violaceoniger*. // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 1997. T. 45. № 2. C. 236–242.

300. Shimomura O. и др. Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilorostris*. // *Biochemistry*. 1978. T. 17. № 6. C. 994–998.

301. Shimomura O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. Singapore: World Scientific Publishing Co Pte Ltd, 2006.

302. Shimomura O., Goto T., Johnson F.H. Source of oxygen in the CO<sub>2</sub> produced in the bioluminescent oxidation of firefly luciferin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977. T. 74. № 7. C. 2799–802.

303. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusa, *Aequorea* // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962. T. 59. № 3. C. 223–239.

304. Shin C. и др. Dehydrooligopeptides. VIII. Convenient syntheses of various dehydrotyrosine derivatives protected with useful N,O-protecting groups via N-carboxy dehydrotyrosine anhydrides. // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1988. T. 61. № 3. C. 885–891.

305. Shin I. и др. Live-cell imaging of Pol II promoter activity to monitor gene expression with RNA IMAGeTag reporters // *Nucleic Acids Res.* 2014. T. 42. № 11. C. e90–e90.

306. Smirnova D. V., Samsonova J. V., Ugarova N.N. The Bioluminescence Resonance Energy Transfer from Firefly Luciferase to a Synthetic Dye and its Application for the Rapid Homogeneous Immunoassay of Progesterone. // *Photochem. Photobiol.* 2016. T. 92. № 1. C. 158–165.

307. Soldi C. и др. Heck-Matsuda Arylation as a Strategy to Access Kavalactones Isolated from *Polygala sabulosa*, *Piper methysticum*, and Analogues // *European J. Org. Chem.* 2012. T. 2012. № 19. C. 3607–3616.

308. Solntsev K.M. и др. Solvatochromic Shifts of “Super” Photoacids // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. T. 120. № 31. C. 7981–7982.

309. Solntsev K.M. и др. Photochemistry of “Super” Photoacids. 2. Excited-State Proton Transfer in Methanol/Water Mixtures // *J. Phys. Chem. A.* 2000. T. 104. № 19. C. 4658–4669.

310. Solntsev K.M. и др. Protolytic Photodissociation and Proton-Induced Quenching of 1-Naphthol and 2-Octadecyl-1-Naphthol in Micelles // *J. Phys. Chem. A.* 2004. T. 108. № 40. C. 8212–8222.

311. Solntsev K.M. и др. Meta and Para Effects in the Ultrafast Excited-State Dynamics of the Green Fluorescent Protein Chromophores 1 // *J. Phys. Chem. B.* 2008. T. 112. № 9. C. 2700–2711.

312. Solntsev K.M., Huppert D., Agmon N. Solvatochromism of  $\beta$ -Naphthol // *J. Phys. Chem. A.* 1998. T. 102. № 47. C. 9599–9606.

313. Song G. и др. A convenient luminescence assay of ferroportin internalization to study its interaction with hepcidin. // *FEBS J.* 2013. T. 280. № 8. C. 1773–1781.

314. Song W. и др. Plug-and-Play Fluorophores Extend the Spectral Properties of Spinach // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. T. 136. № 4. C. 1198–1201.

315. Song W., Strack R.L., Jaffrey S.R. Imaging bacterial protein expression using genetically encoded RNA sensors // *Nat. Methods.* 2013. T. 10. № 9. C. 873–875.

316. Spronken M.I. и др. Optimisations and Challenges Involved in the Creation of Various Bioluminescent and Fluorescent Influenza A Virus Strains for In Vitro and In Vivo Applications. // *PLoS One.* 2015. T. 10. № 8. C. e0133888.

317. Squirrell D.J., Price R.L., Murphy M.J. Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence // *Anal. Chim. Acta.* 2002. T. 457. № 1. C. 109–114.

318. Stacer A.C. и др. NanoLuc reporter for dual luciferase imaging in living animals. // *Mol. Imaging*. 2013. Т. 12. № 7. С. 1–13.
319. Stevani C. V и др. Current status of research on fungal bioluminescence: biochemistry and prospects for ecotoxicological application. // *Photochem. Photobiol.* 2013. Т. 89. № 6. С. 1318–1326.
320. Stoddart L.A. и др. Application of BRET to monitor ligand binding to GPCRs. // *Nat. Methods*. 2015. Т. 12. № 7. С. 661–663.
321. Stolz U. и др. Darwinian natural selection for orange bioluminescent color in a Jamaican click beetle. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. Т. 100. № 25. С. 14955–14959.
322. Stoner-Ma D. и др. An Alternate Proton Acceptor for Excited-State Proton Transfer in Green Fluorescent Protein: Rewiring GFP // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Т. 130. № 4. С. 1227–1235.
323. Strack R.L. и др. Chromophore Formation in DsRed Occurs by a Branched Pathway // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. Т. 132. № 24. С. 8496–8505.
324. Strack R.L., Disney M.D., Jaffrey S.R. A superfolding Spinach2 reveals the dynamic nature of trinucleotide repeat-containing RNA // *Nat. Methods*. 2013. Т. 10. № 12. С. 1219–1224.
325. Strack R.L., Song W., Jaffrey S.R. Using Spinach-based sensors for fluorescence imaging of intracellular metabolites and proteins in living bacteria // *Nat. Protoc.* 2013. Т. 9. № 1. С. 146–155.
326. Subach O.M. и др. Structural Characterization of Acylimine-Containing Blue and Red Chromophores in mTagBFP and TagRFP Fluorescent Proteins // *Chem. Biol.* 2010. Т. 17. № 4. С. 333–341.
327. Subleski J.J. и др. Serum-based tracking of de novo initiated liver cancer progression reveals early immunoregulation and response to therapy. // *J. Hepatol.* 2015. Т. 63. № 5. С. 1181–1189.
328. Sun C. и др. Stable, high-level expression of reporter proteins from improved alphavirus expression vectors to track replication and dissemination during encephalitic and arthritogenic disease. // *J. Virol.* 2014. Т. 88. № 4. С. 2035–2046.
329. Suree N. и др. A novel HIV-1 reporter virus with a membrane-bound Gaussia princeps luciferase. // *J. Virol. Methods*. 2012. Т. 183. № 1. С. 49–56.
330. Szittner R., Meighen E. Nucleotide sequence, expression, and properties of luciferase coded by lux genes from a terrestrial bacterium. // *J. Biol. Chem.* 1990. Т. 265. № 27. С. 16581–16587.
331. Takenaka Y. и др. Two forms of secreted and thermostable luciferases from the marine copepod crustacean, *Metridia pacifica*. // *Gene*. 2008. Т. 425. № 1-2. С. 28–35.
332. Takenaka Y. и др. Evolution of bioluminescence in marine planktonic copepods. // *Mol. Biol. Evol.* 2012. Т. 29. № 6. С. 1669–1681.
333. Takenaka Y. и др. Computational analysis and functional expression of ancestral copepod luciferase. // *Gene*. 2013. Т. 528. № 2. С. 201–205.
334. Takeuchi H., Hagiwara S., Eguchi S. A new efficient synthesis of imidazolinones and quinazolinone by intramolecular aza-Wittig reaction // *Tetrahedron*. 1989. Т. 45. № 20. С. 6375–6386.
335. Tannous B.A., Teng J. Secreted blood reporters: insights and applications. // *Biotechnol. Adv.* 2011. Т. 29. № 6. С. 997–1003.
336. Tatsumi H. и др. Luciferase cDNA from Japanese firefly, *Luciola cruciata*: cloning, structure and expression in *Escherichia coli*. // *J. Biolumin. Chemilumin.* Т. 3. № 2. С. 75–78.
337. Tatsumi H., Kajiyama N., Nakano E. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cDNA clone encoding luciferase of a firefly, *Luciola lateralis* // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1992. Т. 1131. № 2. С. 161–165.
338. Titushin M.S. и др. Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase. // *Photochem. {&} Photobiol. Sci.*

- Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol. 2008. Т. 7. № 2. С. 189–196.
339. Tolbert L.M. и др. Collapse and Recovery of Green Fluorescent Protein Chromophore Emission through Topological Effects // *Acc. Chem. Res.* 2012. Т. 45. № 2. С. 171–181.
340. Tomosugi W. и др. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. // *Nat. Methods.* 2009. Т. 6. № 5. С. 351–353.
341. Tou S.-L. и др. Aggregation-induced emission of GFP-like chromophores via exclusion of solvent–solute hydrogen bonding // *Chem. Commun.* 2014. Т. 50. № 5. С. 620–622.
342. Toya Y. и др. A Convenient Synthetic Method of 2-Cyano-6-methoxybenzothiazole, -A Key Intermediate for the Synthesis of Firefly Luciferin. // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1992. Т. 65. № 2. С. 392–395.
343. Tran V. и др. Highly sensitive real-time in vivo imaging of an influenza reporter virus reveals dynamics of replication and spread. // *J. Virol.* 2013. Т. 87. № 24. С. 13321–13329.
344. Tran V. и др. Multi-Modal Imaging with a Toolbox of Influenza A Reporter Viruses. // *Viruses.* 2015. Т. 7. № 10. С. 5319–5327.
345. Tsien R.Y. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. Т. 67. № 1. С. 509–544.
346. Tsuji F.I. и др. Mechanism of the enzyme-catalyzed oxidation of Cypridina and firefly luciferins studied by means of  $^{17}\text{O}_2$  and  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977. Т. 74. № 2. С. 606–613.
347. Tsutomu M., Hiroki T., Eiichi N. Cloning and sequence analysis of cDNA for luciferase of a Japanese firefly, *Luciola cruciata* // *Gene.* 1989. Т. 77. № 2. С. 265–270.
348. Uebelhoer L.S. и др. High-throughput, luciferase-based reverse genetics systems for identifying inhibitors of Marburg and Ebola viruses. // *Antiviral Res.* 2014. Т. 106. С. 86–94.
349. Urata M. и др. Detection of living *Salmonella* cells using bioluminescence. // *Biotechnol. Lett.* 2009. Т. 31. № 5. С. 737–41.
350. Urban A. и др. Novel whole-cell antibiotic biosensors for compound discovery. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. Т. 73. № 20. С. 6436–43.
351. Verhaegent M., Christopoulos T.K. Recombinant *Gaussia* luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization. // *Anal. Chem.* 2002. Т. 74. № 17. С. 4378–4385.
352. Verkhusha V. V. и др. High stability of *Discosoma* DsRed as compared to *Aequorea* EGFP // *Biochemistry.* 2003. Т. 42. № 26. С. 7879–7884.
353. Villalobos V. и др. Dual-color click beetle luciferase heteroprotein fragment complementation assays. // *Chem. {&} Biol.* 2010. Т. 17. № 9. С. 1018–1029.
354. Vinayak S. и др. Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. // *Nature.* 2015. Т. 523. № 7561. С. 477–480.
355. Virta M. и др. Real-time measurement of cell permeabilization with low-molecular-weight membranolytic agents. // *J. Antimicrob. Chemother.* 1995. Т. 36. № 2. С. 303–315.
356. Virta M. и др. Kinetic measurement of the membranolytic activity of serum complement using bioluminescent bacteria // *J. Immunol. Methods.* 1997. Т. 201. № 2. С. 215–221.
357. Virta M., Karp M., Vuorinen P. Nitric oxide donor-mediated killing of bioluminescent *Escherichia coli*. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994. Т. 38. № 12. С. 2775–2779.
358. Viviani V.R. и др. Cloning and characterization of the cDNA for the Brazilian *Cratomorphus distinctus* larval firefly luciferase: similarities with European *Lampyrus noctiluca* and Asiatic *Pyrocoelia* luciferases. // *Comp. Biochem. Physiol. Part B, Biochem. {&} Mol. Biol.* 2004. Т. 139. №

2. С. 151–156.

359. Viviani V.R. и др. A New Firefly Luciferase with Bimodal Spectrum: Identification of Structural Determinants of Spectral pH-Sensitivity in Firefly Luciferases // *Photochem. Photobiol.* 2007. Т. 81. № 4. С. 843–848.
360. Viviani V.R. и др. A new blue-shifted luciferase from the Brazilian *Amydetes fanestratus* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: molecular evolution and structural/functional properties. // *Photochem. & Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 2011. Т. 10. № 12. С. 1879–1886.
361. Viviani V.R. и др. Correction: A new blue-shifted luciferase from the Brazilian *Amydetes fanestratus* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: molecular evolution and structural/functional properties. // *Photochem. & Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 2015.
362. Viviani V.R., Bechara E.J., Ohmiya Y. Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. // *Biochemistry.* 1999. Т. 38. № 26. С. 8271–8279.
363. Viviani V.R., Ohmiya Y. Nucleic acid molecules encoding red and green emitting luciferases // 2007.
364. Voityuk A.A. и др. Absorption spectra of the GFP chromophore in solution: comparison of theoretical and experimental results // *Chem. Phys.* 2001. Т. 269. № 1-3. С. 83–91.
365. Vydryakova G.A. и др. Intergenomic and intragenomic ITS sequence heterogeneity in *Neonothopanus nambi* (Agaricales) from Vietnam // *Mycology.* 2012.
366. Wang J. и др. Activation of Rab8 guanine nucleotide exchange factor Rabin8 by ERK1/2 in response to EGF signaling. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015a. Т. 112. № 1. С. 148–153.
367. Wang P. и др. Photochemical properties of Spinach and its use in selective imaging // *Chem. Sci.* 2013. Т. 4. № 7. С. 2865.
368. Wang Z. и др. Establishment of a High-Throughput Assay to Monitor Influenza A Virus RNA Transcription and Replication. // *PLoS One.* 2015b. Т. 10. № 7. С. e0133558.
369. Ward W.W., Bokman S.H. Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein // *Biochemistry.* 1982. Т. 21. № 19. С. 4535–4540.
370. Warner K.D. и др. Structural basis for activity of highly efficient RNA mimics of green fluorescent protein // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. Т. 21. № 8. С. 658–663.
371. Wenge U., Wagenknecht H.-A. Synthetic GFP Chromophore and Control of Excited-State Proton Transfer in DNA: An Alternative Concept for Fluorescent DNA Labels with Large Apparent Stokes' Shifts // *Synthesis (Stuttg).* 2011. Т. 2011. № 03. С. 502–508.
372. White E.H. и др. The structure and synthesis of firefly luciferin // *J. Am. Chem. Soc.* 1961. Т. 83. № 10. С. 2402–2403.
373. White E.H. и др. Analogs of Firefly Luciferin // *J. Org. Chem.* 1965. Т. 30. № 7. С. 2344–2348.
374. White E.H. и др. Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin // *J. Am. Chem. Soc.* 1969. Т. 91. № 8. С. 2178–2180.
375. White E.H. и др. The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: An efficient chemical production of electronically excited states // *Bioorg. Chem.* 1971. Т. 1. № 1-2. С. 92–122.
376. Wood K. и др. Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors // *Science (80-. ).* 1989. Т. 244. № 4905. С. 700–702.
377. Wood K. V, Lam Y.A., McElroy W.D. Introduction to beetle luciferases and their applications. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1989. Т. 4. № 1. С. 289–301.

378. Wu L., Burgess K. Syntheses of Highly Fluorescent GFP-Chromophore Analogues // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. T. 130. № 12. С. 4089–4096.
379. Xiang D. и др. Tricolour fluorescence detection of sequence-specific DNA with a new molecular beacon and a nucleic acid dye TOTO-3 // *Analyst.* 2012. T. 137. № 24. С. 5898.
380. Xu T. и др. Detection of organic compounds with whole-cell bioluminescent bioassays. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2014. T. 144. С. 111–151.
381. Xueyan L., Shuang Y., Xingcai L. Phylogenetic relationship of the firefly, *Diaphanes pectinealis* (Insecta, Coleoptera, Lampyridae) based on DNA sequence and gene structure of luciferase // *Zool. Res.* / “Dong wu xue yan jiu” bian ji wei yuan hui bian ji. 2006. T. 27. № 4. С. 367–374.
382. Yamashita H., Nguyen D.T., Chung E. Blood-based assay with secreted *Gaussia* luciferase to monitor tumor metastasis. // *Methods Mol. Biol.* 2014. T. 1098. С. 145–151.
383. Yampolsky I. V. и др. Synthesis and properties of the chromophore of the asFP595 chromoprotein from *Anemonia sulcata* // *Biochemistry.* 2005. T. 44. № 15. С. 5788–5793.
384. Yampolsky I. V. и др. Synthesis and properties of the red chromophore of the green-to-red photoconvertible fluorescent protein Kaede and its analogs // *Bioorg. Chem.* 2008. T. 36. № 2. С. 96–104.
385. Yampolsky I. V., Balashova T.A., Lukyanov K.A. Synthesis and spectral and chemical properties of the yellow fluorescent protein zFP538 chromophore // *Biochemistry.* 2009. T. 48. № 33. С. 8077–8082.
386. Yan Q., Bruchez M.P. Advances in chemical labeling of proteins in living cells // *Cell Tissue Res.* 2015. T. 360. № 1. С. 179–194.
387. Yarbrough D. и др. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. T. 98. № 2. С. 462–467.
388. Ye L. и др. Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica* // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1997. T. 1339. № 1. С. 39–52.
389. Yin S. и др. Botryllamides K and L, new tyrosine derivatives from the Australian ascidian *Aplidium altarium* // *Tetrahedron Lett.* 2010. T. 51. № 26. С. 3403–3405.
390. Yu Y.A. и др. Optical imaging: bacteria, viruses, and mammalian cells encoding light-emitting proteins reveal the locations of primary tumors and metastases in animals. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. T. 377. № 6. С. 964–72.
391. Zhang L. и др. A novel ultrasensitive bioluminescent receptor-binding assay of INSL3 through chemical conjugation with nanoluciferase // *Biochimie.* 2013. T. 95. № 12. С. 2454–2459.
392. Zhang P.-T. и др. Generation of a recombinant West Nile virus stably expressing the *Gaussia* luciferase for neutralization assay. // *Virus Res.* 2016. T. 211. С. 17–24.
393. Zheng Y. и др. Temperature-induced fluorescence enhancement of GFP chromophore containing copolymers for detection of *Bacillus thermophilus* // *Polym. Chem.* 2014. T. 5. № 7. С. 2521.
394. *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Volume 60, Oxazoles: Synthesis, Reactions, and Spectroscopy, Part B* / под ред. David C. Palmer. Weinheim, Germany: Wiley\_VCH Verlag GmbH, KGaA, 2004. 720 С.

## 8. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит научных консультантов Сергея Анатольевича Лукьянова и Иосифа Исаевича Гительзона за предоставленную возможность перенимать опыт научного мышления и организационной работы, а также за всестороннюю поддержку.

Автор благодарит всех, без чьего участия данная работа не могла состояться:

настоящих и бывших сотрудников группы Синтеза природных соединений ИБХ РАН Павла Ивашкина, Александру Царькову, Зинаиду Осипову, Михаила Баранова, Надежду Балееву, Андрея Гороховатского, Алексея Котлобая, Елену Гуглю;

сотрудников Института Биофизики СО РАН Валентина Петушкова, Наталью Родионову, Константина Пуртова и весь коллектив этого института;

коллектив лаборатории Биофотоники под руководством Константина Лукьянова, в особенности Карена Саркисяна и Екатерину Серебровскую;

коллектив лаборатории Биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН под руководством Александра Сергеевича Арсеньева, в особенности Максима Дубинного и Константина Минеева;

коллективы лабораторий Молекулярных технологий под руководством Всеволода Белоусова и Геномики адаптивного иммунитета под руководством Дмитрия Чудакова, Технопарка ИБХ и компании Евроген;

сотрудников ИБХ РАН Рустама Зиганшина, Сергея Ковальчука и Константина Антонова.

Благодарю Александру Царькову за огромное количество технической работы при подготовке текста диссертации.

Благодарю своих оппонентов: доктора химических наук, профессора Юрия Исаевича Смушкевича; доктора медицинских наук Елену Вадимовну Загайнову; доктора биологических наук Анвара Джураевича Исмаилова; представителя ведущей организации: доктора химических наук, профессора Александра Павловича Савицкого.

Автор также благодарит членов своей семьи и друзей за помощь и поддержку.