

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

На правах рукописи

Осипова Зинаида Михайловна

**Синтез люциферинов, оксилуциферинов и их аналогов для
изучения механизмов биолюминесценции почвенного червя
Fridericia heliota и высших грибов**

специальность – 02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2016

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

Научный руководитель:

Кандидат химических наук Илья Викторович Ямпольский

Официальные оппоненты:

Устюжанина Надежда Евгеньевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии гликоконъюгатов №52 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук.

Вацадзе Сергей Зурабович, доктор химических наук, профессор кафедры органической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН)

Защита состоится «8» июня 2016 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « » 2016 г.

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



ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Билюминесценция – это явление свечения живых организмов. Процесс имеет химическую природу и в общем случае обусловлен взаимодействием между белком-люциферазой и субстратом – молекулой люциферина. Люцифераза катализирует окисление люциферина кислородом воздуха и его последующее превращение в молекулу оксилюциферина в возбужденном состоянии, которая испускает квант видимого света при переходе в нормальное состояние.

На сегодняшний день известно о существовании около 30 различных механизмов билюминесценции, однако лишь для восьми природных люциферин-люциферазных систем определены структуры. Помимо люциферин-люциферазных билюминесцентных систем активно изучаются фотопротеины – необычные билюминесцентные белки, представляющие собой стабильные фермент-субстратные комплексы. Люминесценция большинства фотопротеинов не требует присутствия кислорода и активируется ионами металлов (Ca^{2+} , Fe^{2+}).

Благодаря высоким квантовым выходам реакций билюминесценции и относительной нетоксичности люциферин-люциферазных систем, на основе этого явления с использованием возможностей генной инженерии был разработан широкий ряд аналитических методов *in vitro* и *in vivo*, включающий в себя тесты на различные аналиты, иммунологические исследования, изучение экспрессии генов, скрининг лекарств, а также биоимиджинг живых систем в режиме реального времени. Большинство методов на сегодняшний день активно применяется при изучении развития онкологических процессов, инфекционных заболеваний и в экологическом мониторинге.

Каждая из исследованных билюминесцентных систем обладает своим набором недостатков и ограничений, что провоцирует искать и исследовать новые системы и механизмы их функционирования в качестве альтернативы к существующим.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы было изучение двух новых люциферин-люциферазных систем: почвенных кольчатых малощетинковых червей *Fridericia heliota* и высших грибов.

В рамках поставленной цели были сформулированы задачи:

- Оптимизировать синтез природного люциферина почвенного червя *Fridericia heliota*.
- Разработать метод синтеза CompY - фрагмента природных аналогов люциферина почвенного червя *Fridericia heliota* AsLn5, AsLn11 и AsLn12. Установить конфигурацию трехзамещенной двойной связи в CompY и соединениях AsLn5, AsLn11 и AsLn12.
- Получить аналоги люциферина *Fridericia heliota*, переменные по фрагменту ГАМК, и изучить их спектральные характеристики.
- Разработать метод синтеза аденилата люциферина *Fridericia heliota* для подтверждения механизма билюминесценции *F. heliota*.
- Разработать метод синтеза нового природного люциферина высших грибов.
- Получить ряд структурных аналогов люциферина высших грибов и изучить их спектральные характеристики.
- Установить строение продуктов билюминесцентной реакции грибов.
- Установить структуру оксилюциферина грибов.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые получены билюминесцентные аналоги люциферина *Fridericia heliota*, переменные

по фрагменту ГАМК – производное люциферина с линкерной аминогруппой и его конъюгат с флуоресцентным красителем. Впервые получен аналог люциферина *Fridericia* с измененными спектральными свойствами. Путем синтеза фрагмента природных аналогов люциферина почвенного червя *Fridericia heliota* (*Z*)-CompY ((*Z*)-3-(4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота) и *транс*-изомера доказана *Z*-конфигурация двойной связи в природных аналогах люциферина *Fridericia* AsLn5, AsLn11 и AsLn12. Впервые синтезировано модельное соединение аденилата люциферина *Fridericia heliota* (*S,Z*)-*mpem*-бутил 6-(((бензилокси)карбонил)амино)-2-(3-(3-((4-*mpem*-бутокси)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексаноат. Показано, что механизм билюминесцентной реакции *Fridericia heliota* включает образование аденилата люциферина. Впервые осуществлен синтез люциферина высших грибов (*E*)-6-(3,4-дигидрокстирил)-3,4-дигидрокси-2*H*-пиран-2-она. Впервые получены шесть структурных аналогов люциферина высших грибов. Показано, что в реакции билюминесценции люциферина грибов ключевую роль играет пираноновый фрагмент субстрата, в то время как катехольный фрагмент выполняет роль ауксохромного заместителя. Установлено строение продуктов билюминесцентной реакции грибов и предложена структура оксилуциферина высших грибов (2*Z*,5*E*)-6-(3,4-дигидроксифенил)-2-гидрокси-4-оксогекса-2,5-диеновой кислоты.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Механизм билюминесцентной реакции почвенного червя *F. heliota* аналогичен механизму билюминесценции D-люциферина светляка и проходит через стадии образования аденилата люциферина и окислительное декарбоксилирование по α -положению в остатке лизина.
- Люциферин высших грибов представляет собой (*E*)-6-(3,4-дигидрокстирил)-3,4-дигидрокси-2*H*-пиран-2-он.
- Сохранение билюминесцентной активности в полученных структурных аналогах люциферина грибов и их спектральные свойства показывают, что в реакции билюминесценции высших грибов ключевую роль играет пираноновый фрагмент субстрата, в то время как катехольный фрагмент выполняет роль ауксохромного заместителя.
- На основании строения продуктов реакции билюминесценции люциферина грибов предложена структура оксилуциферина: (2*Z*,5*E*)-6-(3,4-дигидроксифенил)-2-гидрокси-4-оксогекса-2,5-диеновая кислота.

Апробация полученных данных и публикации. Основные материалы диссертации были доложены на I Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (г. Казань, 2015) и на XXVIII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 2016). По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 138 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, благодарностей, списка сокращений, а также списка цитируемой литературы, включающего 403 ссылки. Диссертация содержит 31 рисунок, 28 схем и 9 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы представлен в первой главе диссертации и рассматривает основные существующие на сегодняшний день способы применения билюминесценции в контексте многообразия субстратов люцифераз – люциферинов. Обзор состоит из двух частей. В первой части изложены общие и наиболее популярные направления применения билюминесценции, во второй части подробно описаны применения конкретных люциферин-люциферазных и фотопротеиновых систем на основе каждого из восьми известных на сегодняшний день люциферинов.

Экспериментальная часть представлена в третьей главе диссертации и включает в себя описание методов синтеза и очистки веществ, представленных в настоящей работе.

1 Билюминесцентная система *Fridericia heliota*

Билюминесцентная система сибирского почвенного червя *Fridericia heliota* была впервые охарактеризована в 2014 году, когда была определена структура субстрата люциферина **2.1**. Первичный синтез люциферина и его простейших аналогов был выполнен в ходе работы над кандидатской диссертацией Александрой Царьковой¹.

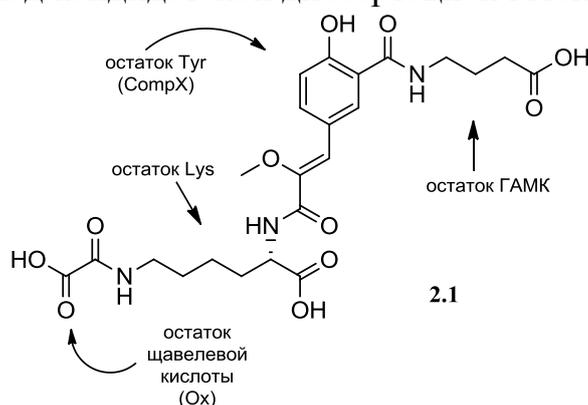


Рисунок 1. Структура люциферина *Fridericia heliota*.

Люциферин *Fridericia heliota* **2.1** – это необычный пептид, состоящий из остатков гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), модифицированного тирозина (CompX), лизина (Lys) и щавелевой кислоты (Ox). В настоящей работе была поставлена задача оптимизации некоторых ключевых стадий синтеза люциферина *F. heliota* с целью его получения в больших количествах.

1.1 Оптимизация синтеза люциферина *Fridericia heliota*

Одним из исходных соединений для синтеза люциферина является метиловый эфир CompX **2.4**, получаемый в две стадии из доступной салициловой кислоты (Схема 1). Недостатком использовавшихся ранее методик синтеза были низкие выходы реакций (Схема 1, пунктир) и трудность разделения *Z,E*-изомеров на второй стадии. Метод синтеза CompX был нами усовершенствован. В итоге выходы реакций повысились с 2% до 13% на две стадии, соотношение *Z:E*-изомеров изменилось с 2:1

¹ Царькова А. С. Синтез люциферина люминесцентного червя *Fridericia heliota* и его аналогов: диссертация кандидата химических наук – Москва: ИБХ РАН, 2015.

до 3:1. Был найден удобный метод очистки целевого продукта путем перекристаллизации в толуоле.

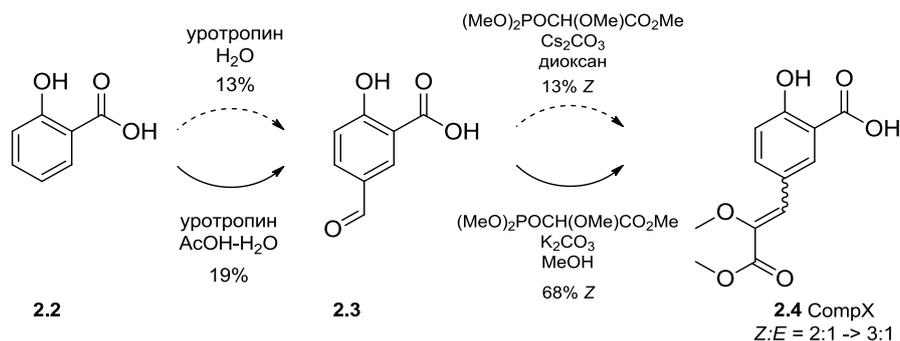


Схема 1. Оптимизация синтеза метилового эфира CompX **2.4**.

Если обратиться к схеме дальнейшего синтеза люциферина *F. heliota* из диссертации А.С. Царьковой, то далее требуется еще 7 стадий для получения люциферина **2.1** из соединения **2.4** (Схема 2).

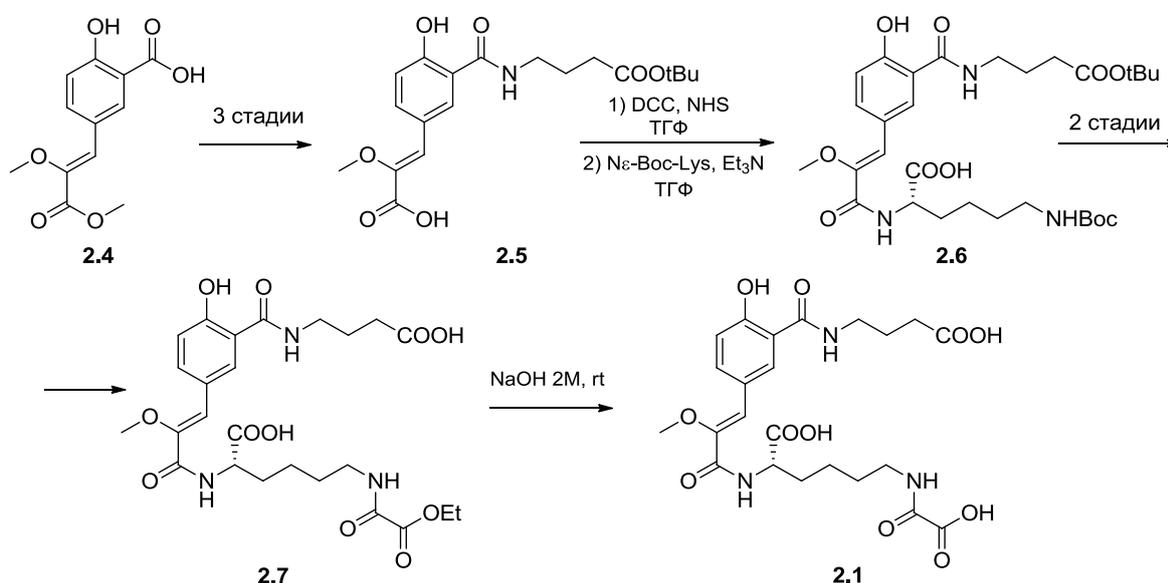


Схема 2. Синтез люциферина *F. heliota* (из диссертации А.С. Царьковой¹).

Для оптимизации синтеза люциферина в реакции пептидного синтеза с соединением **2.5** было предложено вместо ε-N-БОК-L-лизина использовать его производное **2.10** (Схема 3), уже содержащее фрагмент щавелевой кислоты. Соединение **2.10** позволило упростить синтез люциферина червя и его аналогов, исключив лишние стадии удаления защитных групп и ацилирования.

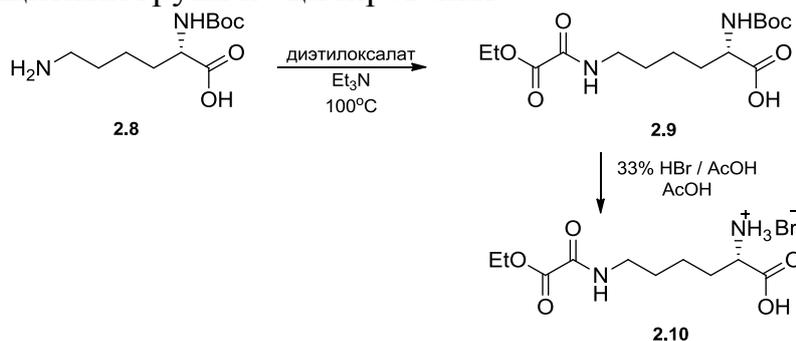


Схема 3. Синтез гидробромида ω-(этилоксалил)лизина **2.10**.

Впоследствии для еще большего упрощения сборки люциферина *F. heliota* из α -*N*-(бензилокси)карбонил-*L*-лизина **2.11** был получен новый структурный фрагмент лизина, содержащий *трет*-бутильную защитную группу на остатке щавелевой кислоты вместо этильной **2.13** (Схема 4).

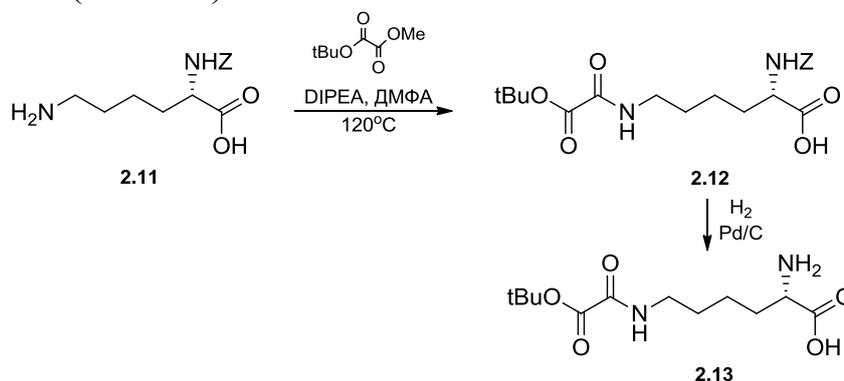


Схема 4. Синтез ω -(*трет*-бутилоксалил)лизина **2.13**.

Таким образом, исходная схема синтеза люциферина *Fridericia* была сокращена с девяти до семи стадий с суммарным выходом 2% (было 0.04%) (Схема 5):

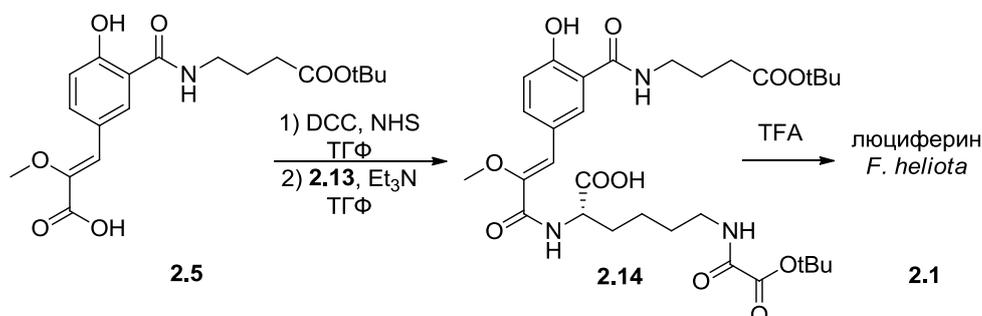


Схема 5. Улучшенная схема синтеза люциферина *Fridericia heliota*.

1.2 Изучение структуры природных аналогов люциферина *Fridericia heliota*

В рамках работы по установлению структуры природных аналогов люциферина *F. heliota* Максимом Дубинным из данных спектров ЯМР было определено, что природные соединения AsLn5 **2.15**, AsLn11 **2.16** и AsLn12 **2.17**, выделяемые из червей, имеют общий тирозиноподобный фрагмент, который был назван нами CompY (по аналогии с фрагментом CompX) (Рисунок 2).

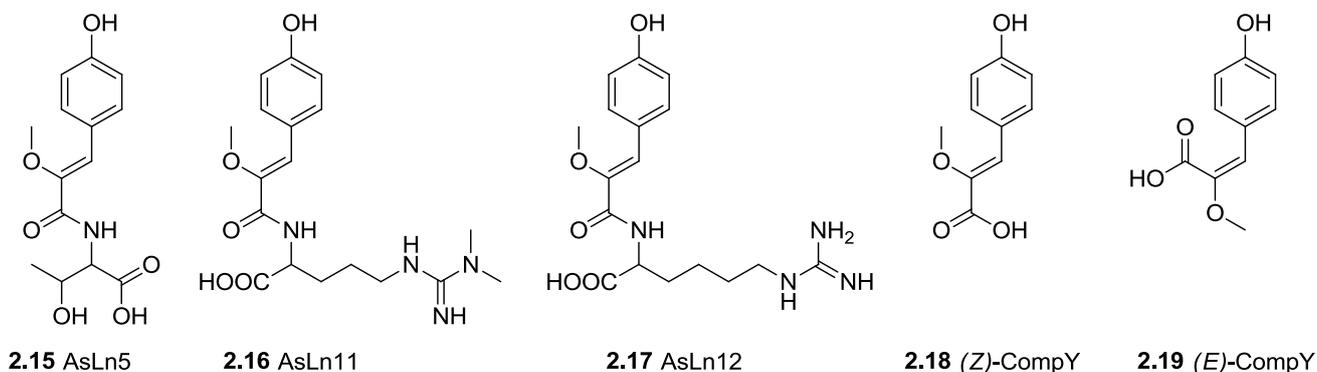


Рисунок 2. Природные аналоги люциферина из *F. heliota* AsLn5, AsLn11 и AsLn12, их структурный фрагмент (*Z*)-CompY и изомер (*E*)-CompY.

Для установления конфигурации двойной связи в CompY нами был осуществлен синтез соединений (Z)-CompY **2.18** и (E)-CompY **2.19** (см. далее). Сравнение характерных сигналов в ¹H-ЯМР и отсутствие в ROESY-спектре кросс-пика между метокси-группой и винильным синглетом доказало, что именно (Z)-CompY является структурным фрагментом соединений **2.15-2.17** (Рисунок 3).

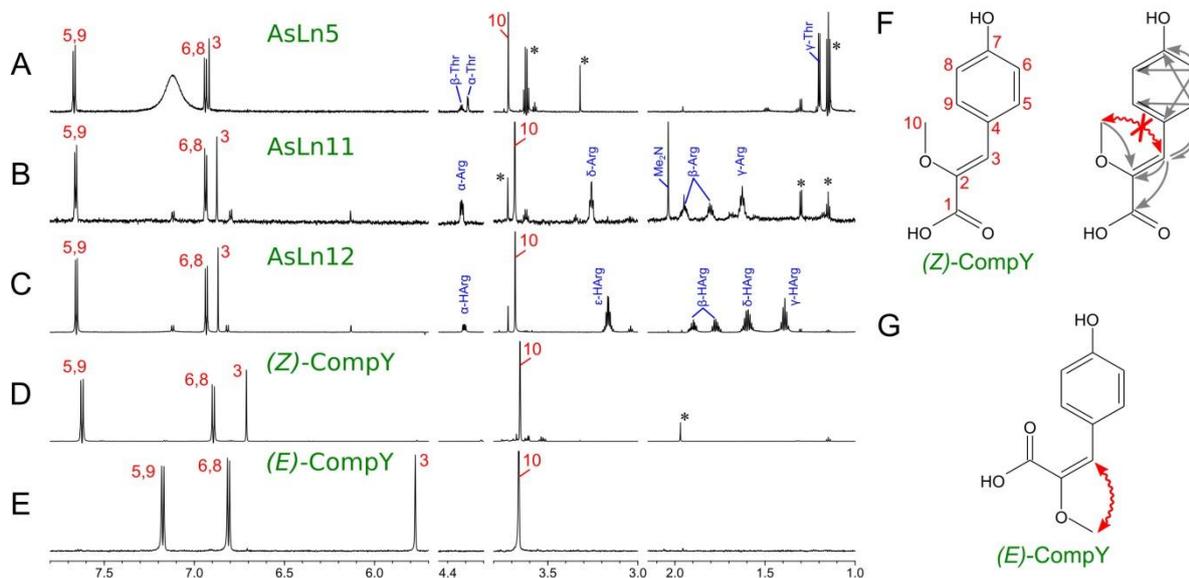


Рисунок 3. ¹H-ЯМР спектры природных и синтетических аналогов люциферина *F. heliota*: 800 МГц (A,B,C) и 700 МГц (D,E). F: нумерация атомов в структуре (Z)-CompY, показаны взаимодействия в эксперименте HMBC и отсутствие сигнала в спектре ROESY. E: наблюдаемый сигнал в ROESY-эксперименте для (E)-CompY.

Соединения CompY получали из общего исходного *n*-гидроксibenзальдегида (Схема 6). После введения бензилоксиметильной защитной группы проводили реакцию Хорнера-Уодсворта-Эммонса, образующиеся изомеры разделяли при хроматографической очистке. В полученных соединениях последовательно удаляли две защитные группы. Целевые продукты **2.18** и **2.19** были получены в четыре стадии с суммарным выходом 20% и 10% соответственно.

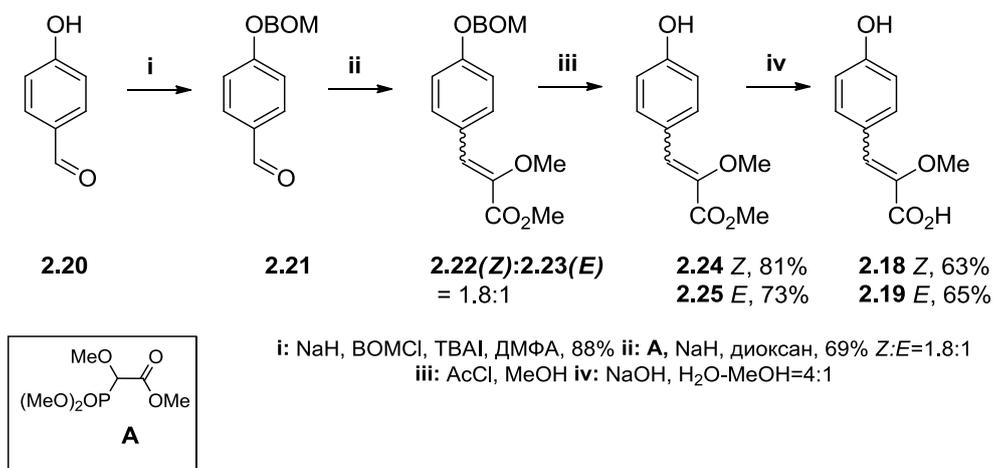


Схема 6. Синтез соединений (Z)-CompY **2.18** и (E)-CompY **2.19**.

Таким образом, было доказано, что все природные аналоги люциферина из *F. heliota* (CompX, CompY и AsLn5, AsLn 11, AsLn12) так же, как и сам люциферин, имеют Z-конфигурацию двойной связи в тирозиновом фрагменте. Эти данные

в дальнейшем будут использованы для установления путей биосинтеза люциферина *F. heliota*.

1.3 Изучение механизма реакции биолюминесценции *Fridericia heliota*

В связи с установлением структуры люциферина актуальной стала задача определения механизма биолюминесценции и получения его аналогов, которые бы обладали новыми спектральными характеристиками. Для решения этой задачи необходимо было ответить на вопрос о функциональной роли различных структурных фрагментов молекулы люциферина. В ходе предварительных исследований было установлено, что активность в реакции биолюминесценции, вероятнее всего, проявляет одна из карбоксильных групп в остатке ω-оксалиллизина (LysOx), поэтому модификация исходной структуры без потери активности возможна по фрагменту ГАМК. Для проверки этой гипотезы был осуществлен синтез двух аналогов люциферина **2.28** и **2.30**, варьируемых по этому остатку (Схема 7).

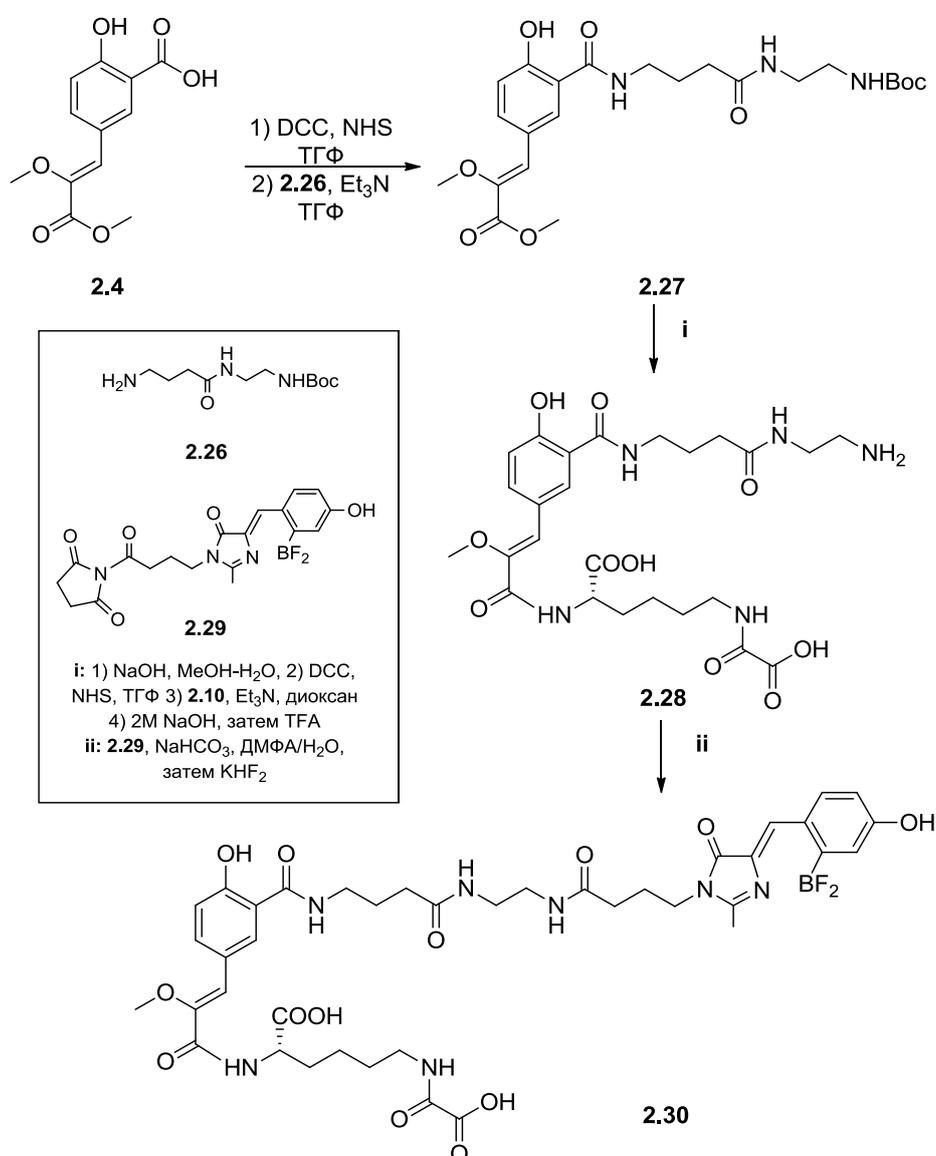


Схема 7. Синтез аналогов люциферина *F. heliota* **2.28** и **2.30**.

Путем активации кислоты из **2.4** был получен пептид **2.27**, в котором удаляли метильную защитную группу, а затем проводили сочетание с остатком лизина **2.10**.

Для получения целевого продукта **2.28** удаляли все защитные группы. Соединение **2.30** было получено конъюгацией амина **2.28** и соответствующего активированного эфира **2.29** (соединение предоставлено Михаилом Барановым) в гидрокарбонатном буфере.

Было показано, что соединения **2.28** и **2.30** обладают биолюминесцентными свойствами, и, аналогично природному люциферину, проявляют активность при добавлении экстракта люциферазы, тем самым, подтверждая гипотезу о том, что фрагмент ГАМК не принимает участие в реакции биолюминесценции *F. heliota*.

Спектры поглощения и биолюминесценции аналога люциферина **2.30** в сравнении с люциферинем **2.1** представлены на Рисунке 4. Можно наблюдать значительное смещение максимума поглощения для соединения **2.30** в красную область, которое объясняется наличием новой хромофорной группы. Максимум биолюминесценции для люциферина **2.1** составляет 478 нм, а для аналога **2.30**, в котором возможен Фёрстеровский перенос энергии излучения (BRET) с люциферина на хромофорную группу, пик биолюминесценции соответствует 528 нм.

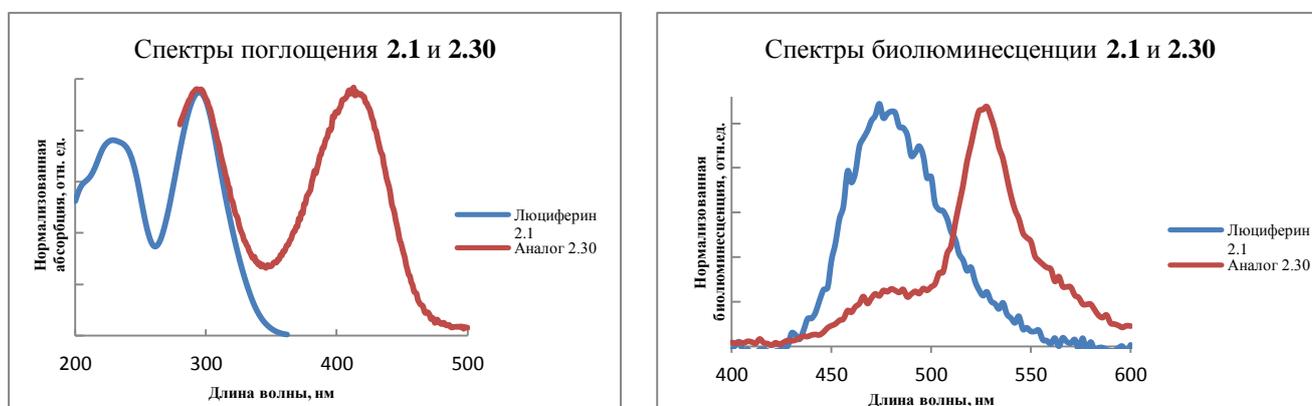


Рисунок 4. Спектры поглощения и биолюминесценции люциферина **2.1** и аналога **2.30**.

Наши коллеги из Красноярска Валентин Петушков и Наталья Родионова смешали синтетический люциферин *F. heliota* с экстрактом люциферазы в присутствии избытка АТФ. Контроль за ходом реакции осуществлялся методом ВЭЖХ аликвот. Через 25 часов, когда примерно 62% люциферина было израсходовано, основной продукт реакции (предположительно, оксилуциферин) был выделен с помощью ВЭЖХ. Структура оксилуциферина была определена Максимом Дубинным при использовании сочетания методов спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии. Таким образом, реакция биолюминесценции *F. heliota* имеет вид (Схема 8):

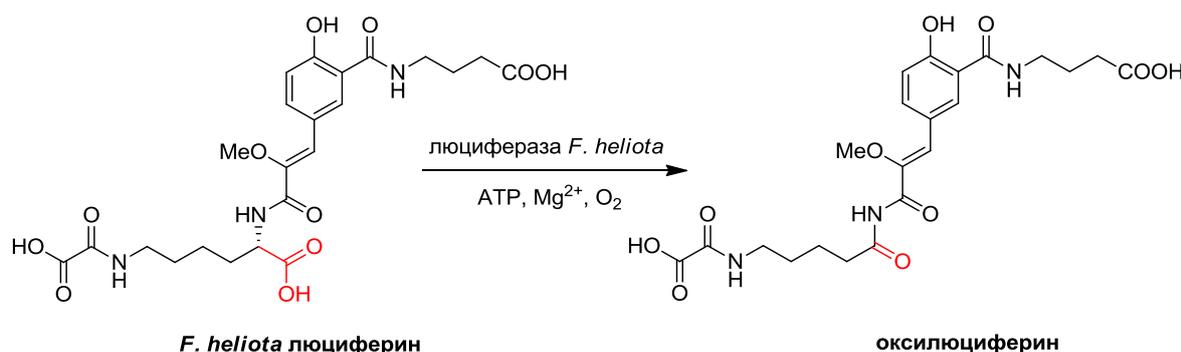


Схема 8. Реакция биолюминесценции *Fridericia heliota*.

При рассмотрении структуры оксильюциферина *F. heliota* возникает предположение, что он получается путем окислительного декарбоксилирования по α -положению в лизиновом остатке. На основании полученных данных был предложен механизм реакции биолюминесценции *F. heliota*, аналогичный механизму биолюминесценции D-люциферина светляка² (Схема 9):

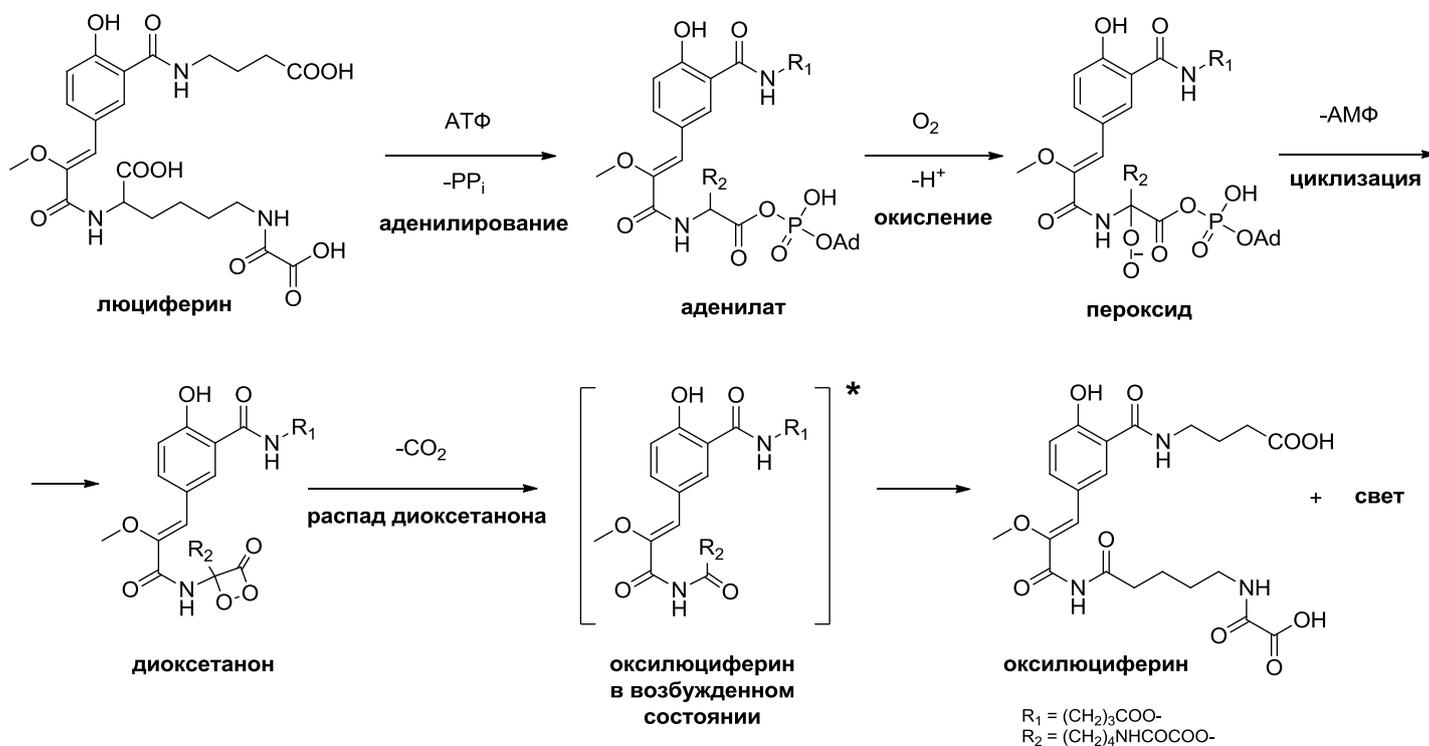


Схема 9. Механизм реакции биолюминесценции *Fridericia heliota*.

Если механизм верен, то промежуточным продуктом биолюминесценции является аденилат люциферина по карбоксильной группе лизина. Для доказательства этой гипотезы мы пробовали синтезировать аденилат из люциферина, чтобы затем продемонстрировать его биолюминесцентные свойства. Однако активация карбоксильной группы лизина с помощью любого известного способа приводила к разложению субстрата и образованию сложной смеси продуктов. Тогда было получено модельное соединение аденилата, содержащего *трет*-бутильный заместитель на карбокси-группе лизина **2.31** (Схема 10). Хемилюминесценция соединения **2.31** под действием оснований подтвердила гипотезу о механизме реакции биолюминесценции *F. heliota*.

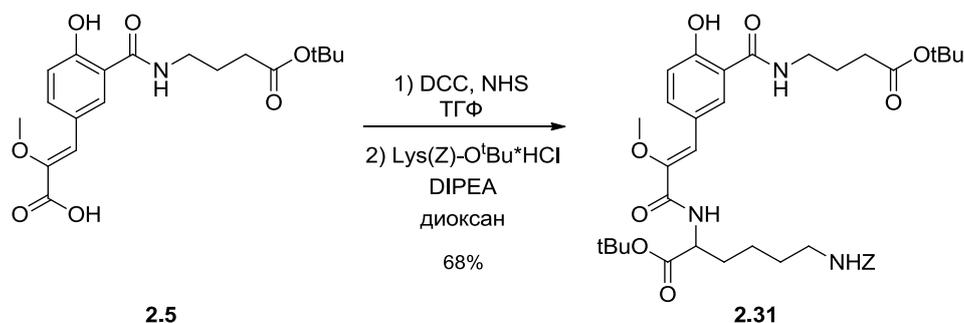


Схема 10. Синтез модельного соединения аденилата люциферина *F. heliota* **2.31**.

² Shimomura O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods. World Scientific: Singapore, 2006.

2 Билюминесцентная система высших грибов

Билюминесценция грибов – грибного мицелия и плодовых тел - была выявлена еще в глубокой древности³. Всего существует около 70 видов люминесцентных грибов, они распределены по 9 родам⁴. Максимум эмиссии билюминесценции для всех известных грибов составляет около 530 нм.

В 1959 году впервые удалось продемонстрировать люциферин-люциферазную реакцию при смешении грибных экстрактов⁵ и добавлении НАД(Ф)Н. На сегодняшний день точно известно, что билюминесценция в высших грибах – это двухступенчатый процесс. На первой стадии происходит превращение предшественника люциферина в люциферин под действием растворимого фермента и при участии НАД(Ф)Н. На второй стадии люциферин окисляется в присутствии нерастворимой люциферазы – происходит процесс собственно билюминесценции^{6,7}:

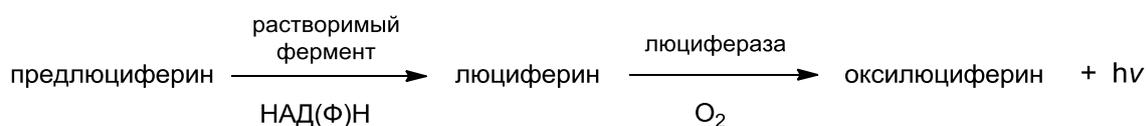


Схема 11. Реакция билюминесценции в высших грибах.

Наши коллеги из Красноярска (Константин Пуртов, Валентин Петушков и Наталья Родионова) обнаружили, что в несветящихся грибах *Pholiota squarrosa* предшественник люциферина содержится в количествах, в 100 раз превышающих его содержание в светящихся грибах⁸. Предлюциферин был выделен хроматографически и охарактеризован методами ЯМР и масс-спектрометрии – оказалось, что это вещество уже было описано и представляет собой гиспидин – соединение класса стирилпиронов, вторичных метаболитов в растениях и грибах⁹. Кросс-эксперименты показали универсальность данного субстрата для билюминесцентной реакции разных видов люминесцентных грибов. Дальнейшие работы с использованием экстрактов растворимого фермента из светящихся грибов *Neonothopanus nambi* позволили энзиматически конвертировать гиспидин в грибной люциферин и определить его структуру⁸. ¹Н-ЯМР-спектры гиспидина и грибного люциферина из природных экстрактов представлены на Рисунке 5:

³ Harvey E.N. in History of Luminescence From the Earliest Times Until 1900. - Philadelphia, USA: American Philosophical Society, 1957.

⁴ 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. 1318–26.

⁵ Airth R.L., McElroy W.D. Light emission from extracts of luminous fungi. // *J. Bacteriol.* 1959. Т. 77. № 2. С. 249–50.

⁶ 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.

⁷ Airth R.L., Foerster G.E. Enzymes associated with bioluminescence in *Panus stypticus luminescens* and *Panus stypticus non-luminescens*. // *J. Bacteriol.* 1964. Т. 88. № 5. С. 1372–1379.

⁸ Purtov K. V и др. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. Т. 54. № 28. С. 8124–8.

⁹ Lee I.-K., Yun B.-S. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2011. Т. 64. № 5. С. 349–59.

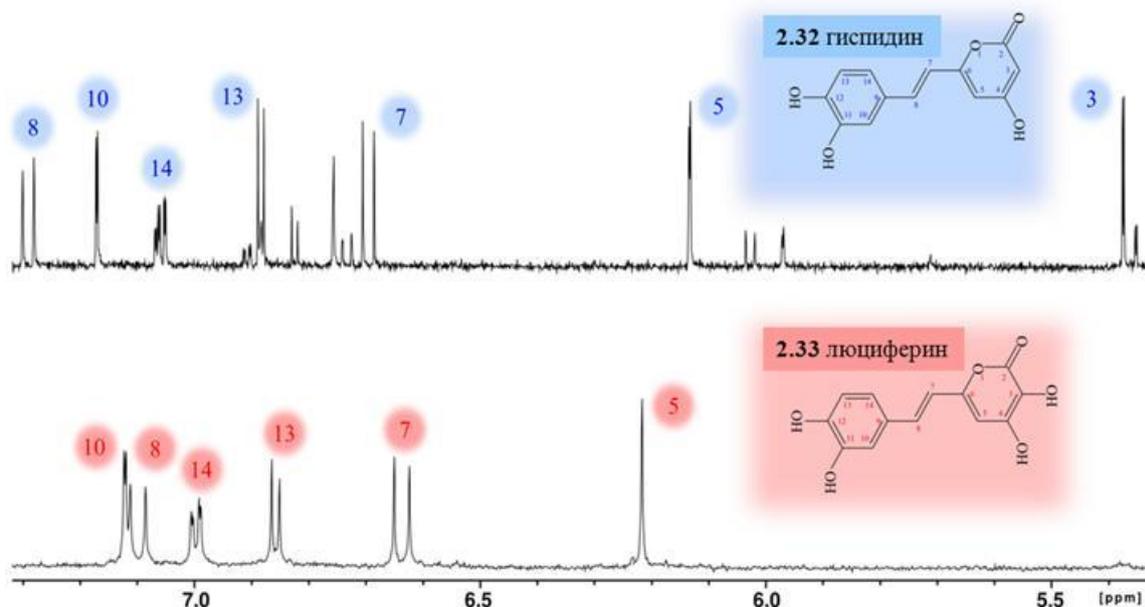


Рисунок 5. ^1H -ЯМР-спектры и структуры предлюциферина **2.32** и люциферина грибов **2.33**.

Люциферин грибов **2.33** представляет собой 3-гидроксигиспидин. Гидроксилирование гиспидина по третьему положению в пираноновом ядре является первой стадией в последовательности химических превращений, приводящих к грибной биолюминесценции.

2.1 Синтез люциферина высших грибов

В настоящей работе была поставлена задача получить грибной люциферин синтетическим путем, в первую очередь, для независимого подтверждения его структуры, а также для использования синтетического субстрата в дальнейших работах по изучению биолюминесцентной системы грибов.

Поскольку сам гиспидин **2.32** является коммерчески доступным, то первой нашей попыткой провести синтез 3-гидроксигиспидина **2.33** стал биомиметический синтез из гиспидина **2.32**. Однако пробные эксперименты с гиспидином и его защищенными производными с использованием различных окислителей приводили в основном к деградации исходного вещества и образованию следовых количеств продукта, детектируемых на хроматограммах ВЭЖХ, а также с помощью анализа аликвот реакционной смеси на люминометре в присутствии люциферазы грибов. Тогда было принято решение проводить синтез люциферина *de novo*. Ключевой стадией в синтезе гиспидина **2.32** является создание двойной связи путем конденсации фрагментов дигидроксибензальдегида и метилпиранона. Поскольку попытки окисления гиспидина по третьему положению оказались неудачными, мы решили ввести гидроксильную группу в пираноновое ядро до того, как оно вступит в реакцию конденсации.

Синтез люциферина грибов был начат исходя из коммерчески доступного предшественника – дегидроацетовой кислоты **2.37** (Схема 12). В исходном веществе под действием концентрированной серной кислоты удаляли ацетильную группу¹⁰, а затем проводили окисление третьего положения под действием производного, полученного

¹⁰ 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. Т. 2012. № 19. С. 3607–3616.

из камфорсульфонокислоты и БАИБ¹¹. Полученное соединение **2.39** обрабатывали 5М раствором щелочи для омыления сульфонового эфира.

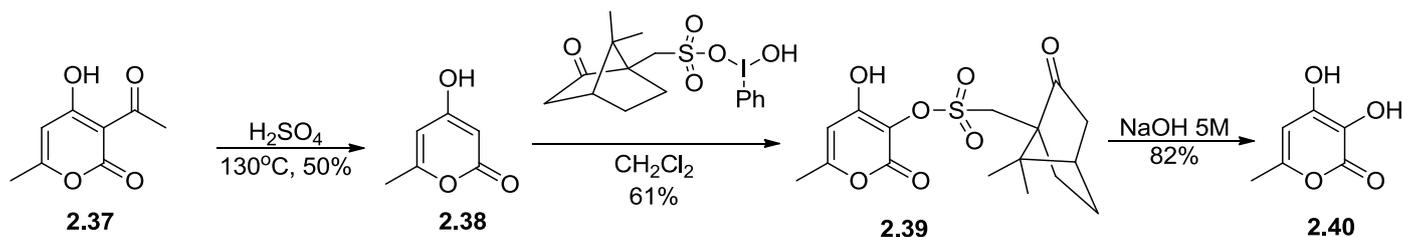


Схема 12. Синтез соединения **2.40**.

Нами были опробованы методики конденсации незащищенных производных **2.38** и **2.40** с различными альдегидами для получения гиспидина или грибного люциферина напрямую, минуя введение защитных групп (Схема 13). Подбираемые условия указаны в Таблице 1. Однако все предпринятые попытки оказались неудачными: либо реакция не шла вовсе, либо в качестве мажорных образовывались продукты поликонденсации. Поэтому в дальнейшем мы перешли к варианту синтеза с защитой гидроксильных групп в обоих циклах люциферина.

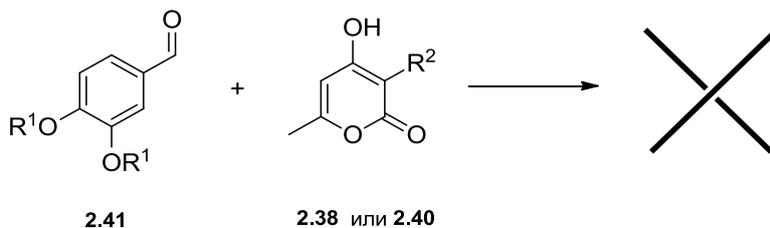


Схема 13. Реакция конденсации незащищенных производных **2.38** и **2.40** с альдегидами.

Таблица 1. Подбор условий для проведения реакции конденсации.

| R ¹ | R ² | Условия |
|---------------------------|----------------|---|
| H | H | ZnCl ₂ в ТГФ, кипячение |
| | | tBuOK, ТГФ |
| | | Пиридин, нагревание |
| | | Mg(OMe) ₂ , MeOH, нагревание |
| -CH ₂ - | H | ZnCl ₂ в ТГФ, кипячение |
| | | tBuOK, ТГФ |
| | OH | Пиридин, нагревание |
| | | Mg(OMe) ₂ , MeOH, нагревание |
| 2M NaOH, H ₂ O | | |

Попытки ввести стандартные защитные группы на свободные гидроксильные группы в **2.40**, которые бы выдержали дальнейшие планируемые превращения: третбутилдиметилсилильные, бензильные, а также метиленовую или ацетонидную защиты, - также оказались неудачными. Был сделан косвенный вывод о том, что постановка защит на две соседние гидроксильные группы в пираноновом кольце

¹¹ Hatzigrigoriou E., Varvoglis A., Bakola-Christianopoulou M. Preparation of [hydroxy((+)-10-camphorsulfonyl)oxy]iodobenzene and its reactivity toward carbonyl compounds. // *J. Org. Chem.* 1990. Т. 55. № 1. С. 315–318.

затруднена стерически. Единственный вариант защитных групп, которые можно было установить, это метильные. Реакция метилирования **2.40** под действием диметилсульфата и карбоната натрия в ацетоне при нагревании позволила получить исходное вещество **2.42** для синтеза грибного люциферина и, как оказалось впоследствии, различных его аналогов (Схема 14).

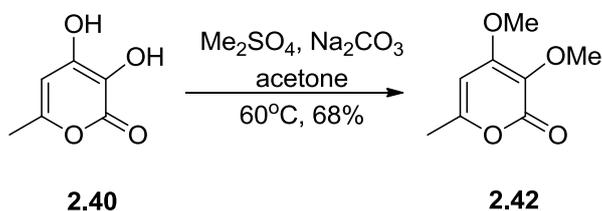


Схема 14. Метилирование пиранона **2.40**.

Реакция конденсации **2.42** с 3,4-метилендиоксibenзальдегидом **2.43** в присутствии метилата магния в метаноле давала продукт **2.44**, в котором затем удаляли все защитные группы действием избытка трибромида бора (Схема 15). Таким образом, грибной люциферин **2.33** был получен из исходного 3,4-дигидрокси-6-метил-2*H*-пиран-2-она **2.40** с суммарным выходом 18% на три стадии.

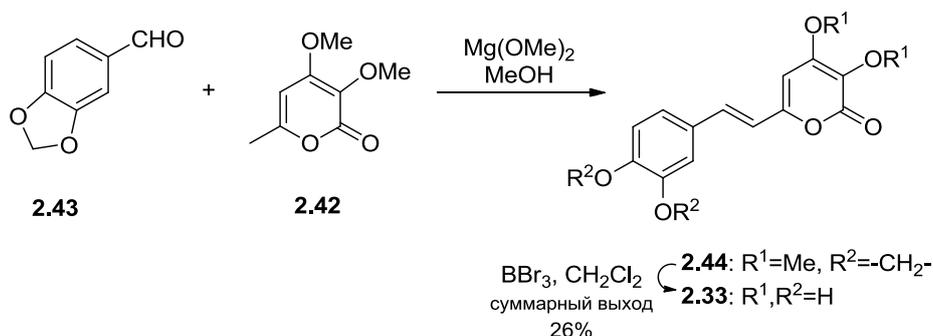


Схема 15. Синтез грибного люциферина **2.33**.

2.2 Синтез аналогов грибного люциферина

Для определения структурных фрагментов молекулы люциферина грибов, ответственных за люминесцентную реакцию, и получения аналогов люциферина грибов с измененными спектрами биолюминесценции, была поставлена задача получить ряд аналогов грибного люциферина, содержащих различные донорные заместители в бензольном ядре. Структуры целевых соединений **2.45-2.50** представлены на Рисунке 6:

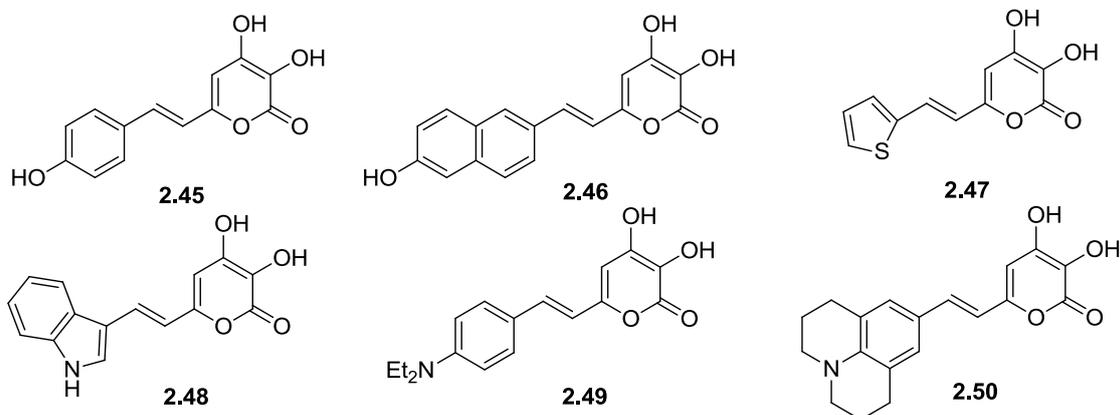


Рисунок 6. Структуры целевых соединений **2.45-2.50**.

Сборку аналогов люциферина было запланировано осуществить аналогично разработанной нами схеме синтеза люциферина. Однако в данном случае мы столкнулись с очень низкими выходами в реакции конденсации с метилатом магния в метаноле. Поэтому был предложен альтернативный вариант сборки целевых продуктов. Исходное вещество **2.42** обрабатывали NBS при катализе бензоилпероксидом в CCl_4 ¹². Полученный бромид **2.51** переводили в трифенилфосфониевую соль **2.52**, которую затем использовали для проведения реакции Виттига с альдегидами в стандартных условиях для построения двойной связи. В полученных продуктах защитные группы удаляли действием трибромида бора. Таким образом, в пять стадий из **2.42** был получен ряд аналогов природного люциферина грибов с выходами 1-7% (Схема 16).

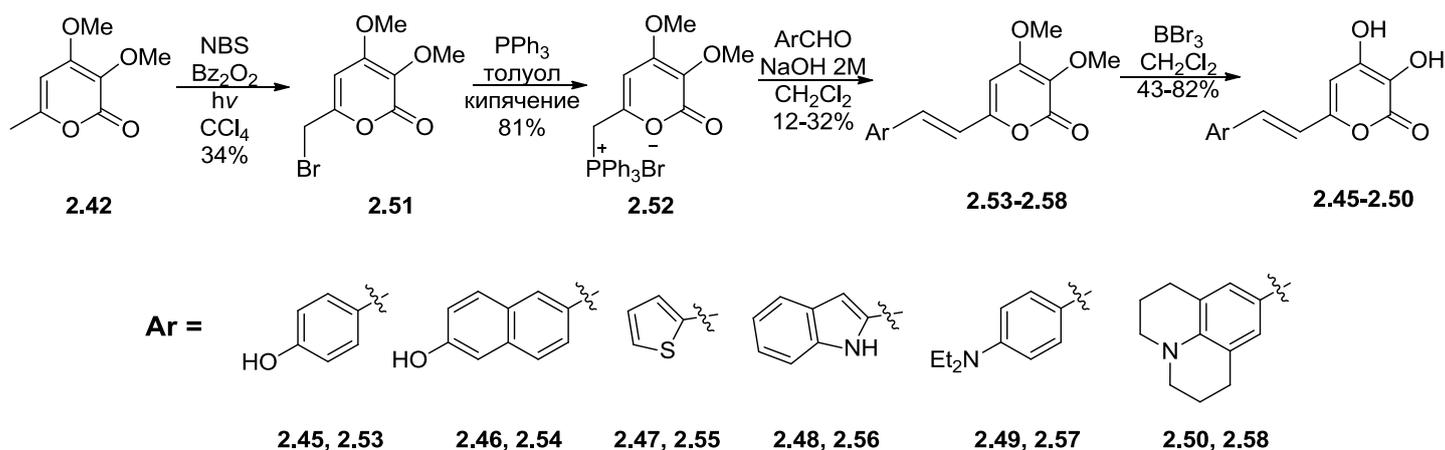


Схема 16. Синтез аналогов грибного люциферина **2.45-2.50**.

2.3 Спектральные характеристики аналогов грибного люциферина

Для аналогов **2.45-2.50** были изучены спектральные характеристики: измерены спектры абсорбции, возбуждения и эмиссии флуоресценции, а также изучена их активность при добавлении экстракта люциферазы грибов.

Из шести полученных аналогов билюминесцентную активность проявили пять, неактивным с люциферазой оказалось только тиофен-содержащее производное **2.47**. Спектры билюминесценции соединений **2.33**, **2.45-2.46**, **2.48-2.50** представлены на Рисунке 7. Можно наблюдать, что максимум билюминесценции для нафталин-содержащего производного **2.46** смещен относительно природного люциферина в красную область, в то время как для производных **2.45** и **2.48-49** наблюдается смещение в синюю часть спектра. Максимум билюминесценции для производного **2.50** близок к максимуму для люциферина (Таблица 3).

¹² Bacardit R., Moreno-Mañas M., Pleixats R. Functionalization at C-5 and at the C-6 methyl group of 4-methoxy-6-methyl-2-pyrone // *J. Heterocycl. Chem.* 1982. Т. 19. № 1. С. 157–160.

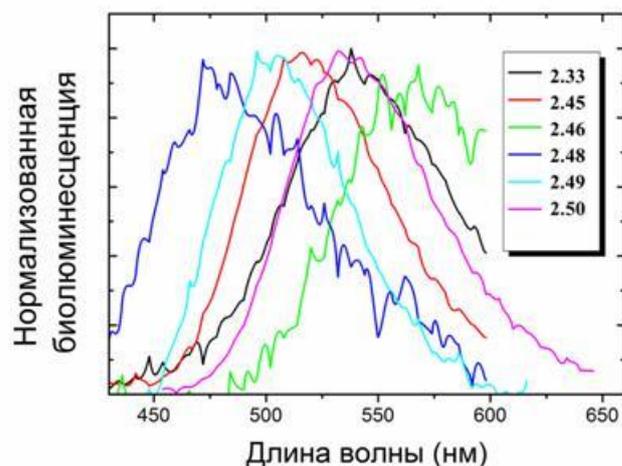


Рисунок 7. Спектры билюминесценции соединений **2.33**, **2.45-46** и **2.48-50**.

Для пяти аналогов люциферина, проявивших билюминесцентные свойства, была измерена активность относительно природного люциферина (Таблица 2). Сравнение проводили на основании высоты максимума билюминесценции образца (в отн. ед.), нормированной на концентрацию вещества. По полученным данным можно наблюдать, что активность аминоксодержащих аналогов люциферина **2.49** и **2.50** в 2 и 4 раза соответственно превышает активность природного люциферина **2.33**, в то время как производные с нафталиновым и индольным ядром малоактивны. Самый близкий аналог люциферина **2.33**, содержащий фенольный заместитель вместо катехольного, проявляет активность, равную 75% активности природного люциферина.

Таблица 2. Активность билюминесценции полученных соединений.

| Соединение | Активность, % |
|-------------|---------------|
| 2.33 | 100 |
| 2.45 | 75 |
| 2.46 | 5 |
| 2.48 | 2 |
| 2.49 | 190 |
| 2.50 | 390 |

Спектры поглощения и эмиссии флуоресценции для соединений **2.45-2.50** приведены в Таблице 3. Максимумы абсорбции для данных соединений находятся в диапазоне от 366 нм (*n*-диэтиламинопроизводное **2.49**) до 424 нм (производное **2.50**), максимумы флуоресценции – в диапазоне от 430 нм до 574 нм.

Таблица 3. Суммарные данные по спектральным характеристикам полученных субстратов.

| Соединение | λ_{max} билюминесценции нм | λ_{max} абсорбции, нм | λ_{max} возбуждения, нм | λ_{max} флуоресценции, нм |
|-------------|--|---|---|---|
| 2.33 | 538 | - | - | - |
| 2.45 | 516 | 372 | 367 | 458 |
| 2.46 | 564 | 380 | 350 | 430 |
| 2.47 | - | 376 | 350 | 430 |
| 2.48 | 480 | 386 | 351 | 431 |
| 2.49 | 504 | 366 | 370 | 430 |
| 2.50 | 534 | 424 | 450 | 574 |

2.4 Синтез предполагаемого оксильюциферина грибов и его аналога для изучения механизма биolumинесцентной реакции грибов

Возможность широкого варьирования структуры полученных аналогов в области ароматического ядра люциферина без потери люминесцентной активности ясно указывает на то, что реакция биolumинесценции грибного люциферина затрагивает только пираноновый фрагмент молекулы субстрата.

Для установления структуры продукта реакции биolumинесценции грибного люциферина – оксильюциферина – субстрат реакции инкубировали с белковым экстрактом гриба *N. nambi*, содержащим люциферазу, отслеживая динамику образования продуктов по ВЭЖХ во времени. Анализ ВЭЖХ давал следующую картину: первоначально из люциферина (пик №5) образуется продукт (пик №6), который затем деградирует (пик уменьшается), и начинают увеличиваться пики №1-4 (Рисунок 8).

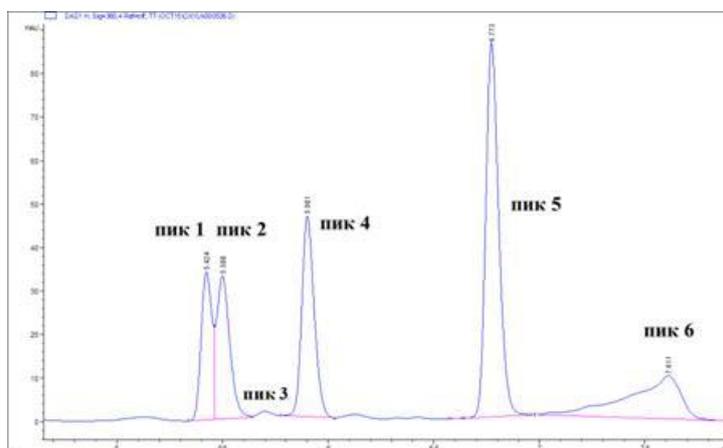


Рисунок 8. Хроматограмма реакционной смеси люциферин+люцифераза после 180 минут реакции

Из диаграммы динамики пиков (Рисунок 9) можно наблюдать, как со временем практически исчезает пик люциферина (пик №5). Пик №6 сначала накапливается, а затем уменьшается, демонстрируя кинетику стационарного состояния. Пики №1-4 постепенно накапливаются. Пик №1 начинает медленно убывать со временем.

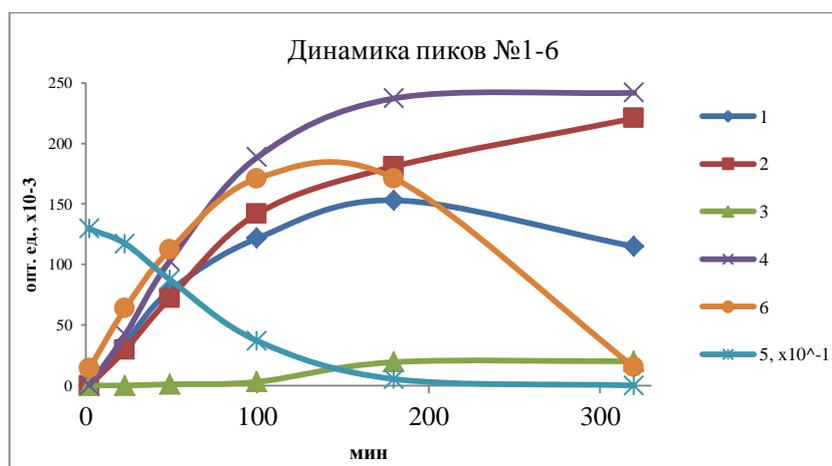


Рисунок 9. Диаграмма динамики пиков ВЭЖХ.

На основе кинетических данных мы предположили, что пик №6 соответствует оксильюциферину, а пики №1-4 – продуктам его распада. Пик №3 был идентифицирован по виду спектра поглощения, а также по хроматографической подвижности и

сравнению с коммерческим образцом, как кофейная (3,4-дигидроксикоричная) кислота **2.59** (Рисунок 10):

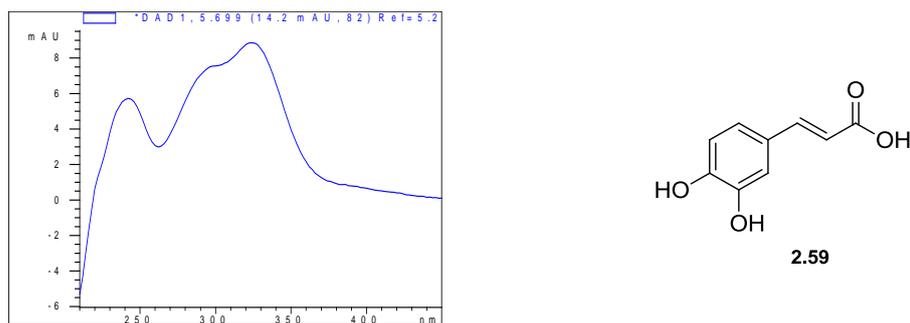


Рисунок 10. Спектр поглощения и структура продукта в пике №3 (кофейная кислота).

Продукты в пиках №2 и №4 были выделены методом ВЭЖХ и проанализированы методом спектроскопии ЯМР, получены спектры поглощения. В спектрах ЯМР (Рисунок 11) для пиков №2 и 4 отсутствовали сигналы, характерные для ароматической системы. Вместо них наблюдалась пара дублетов с КССВ 16.0 Гц – признак наличия *транс*-двойной связи. Также для вещества из пика №2 было замечено изменение набора сигналов в спектре ЯМР, идентичный пику №4, и соответствующее изменение набора сигналов в спектре ЯМР.

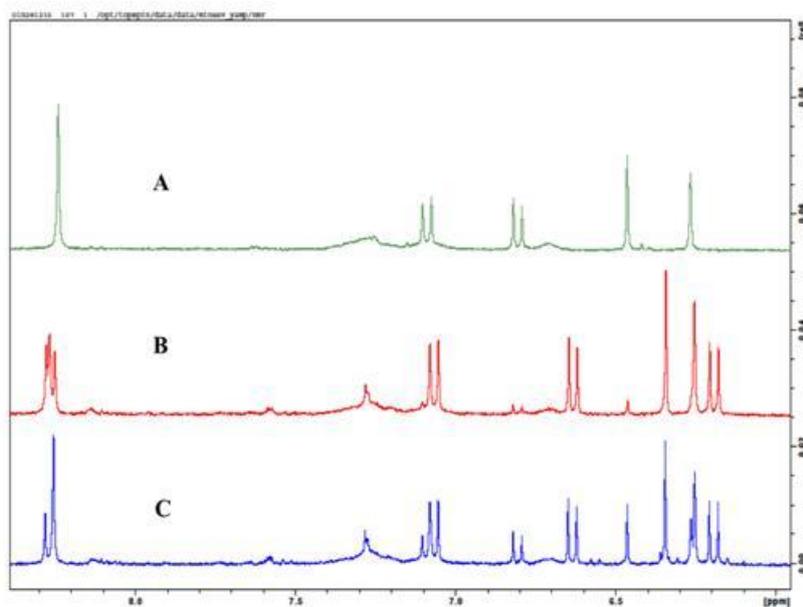


Рисунок 11. ¹H-ЯМР спектры в CD₃OD для пика №2 (А), пика №4 (В) и пика №2 после инкубации в ампуле при 20°C в течение суток (С).

Из-за малой концентрации для пары соединений удалось получить лишь ¹H, {¹H-¹³C}-HSQC и {¹H-¹³C}-HMBC спектры. Полученным данным ЯМР-спектроскопии отвечали структуры, представленные на Рисунках 12 и 13.

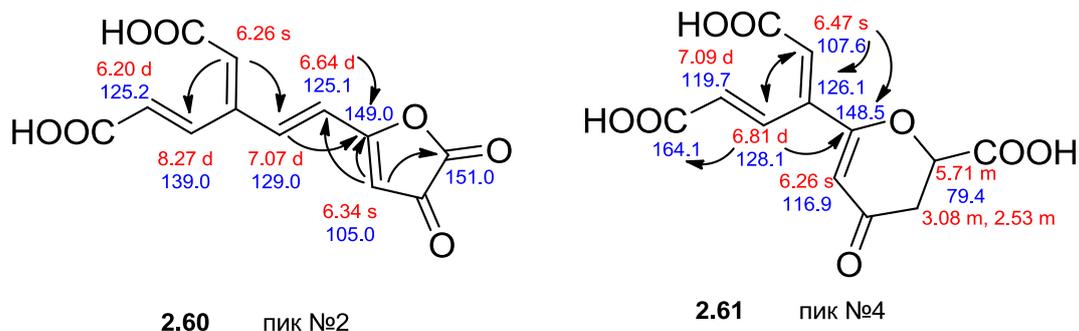


Рисунок 12. Структуры веществ для пиков №2 (**2.60**) и №4 (**2.61**). Красным цветом указаны хим. сдвиги протонов, синим – атомов углерода. Стрелками указаны Н-С-корреляционные взаимодействия в спектрах НМВС.

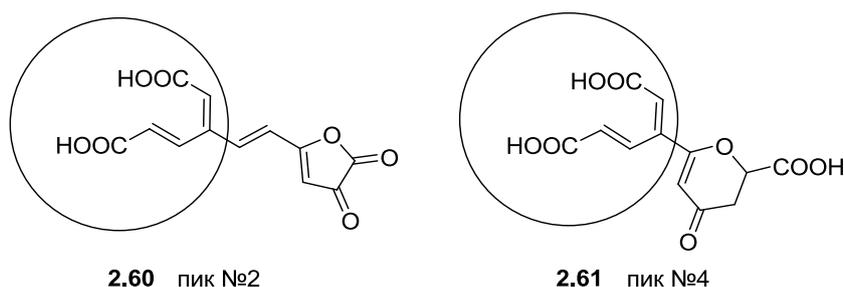


Рисунок 13. Структуры веществ пиков №2 **2.60** и №4 **2.61**. Обведены фрагменты, образующиеся в результате окислительной деградации катехольного фрагмента молекулы люциферина.

В полученных структурах можно наблюдать одинаковые фрагменты, очевидно, образующиеся в результате окислительной деградации катехольного ароматического ядра в молекуле люциферина грибов (Рисунок 13). На основании данных о строении продуктов распада оксилюциферина **2.59-2.61**, с учетом того, что обе молекулы **2.60** и **2.61** содержат на один атом углерода меньше, чем молекула люциферина, была предположена следующая структура оксилюциферина грибов **2.62** (Рисунок 14):

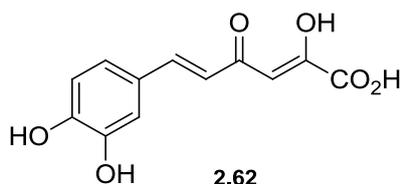


Рисунок 14. Предполагаемая структура оксилюциферина высших грибов **2.62**.

Предполагаемый механизм образования продуктов деградации **2.59-2.61** из оксилюциферина изложен на Схеме 17.

Вследствие кето-енольной таутомеризации исходного оксилюциферина **2.62** возможны два варианта его дальнейших превращений: 1) если нуклеофильная атака в еноле происходит по 6 атому углерода, то получается производное **2.61**; 2) если енол таутомеризуется в кетон, а потом происходит нуклеофильная атака по 4 атому углерода с замыканием пятичленного цикла, то после отщепления воды получается продукт **2.60**. На схеме указано, что деградация ароматического фрагмента происходит в финале превращений, однако установить точный порядок приведенных стадий не представляется возможным. Кофейная кислота **2.59** может образоваться из предполагаемого оксилюциферина **2.62** при отщеплении пирувата или окислении концевых функциональных групп. Причиной образования большого числа продуктов

деградации оксилуциферина в эксперименте может быть недостаточная степень очистки препарата люциферазы грибов. Белковый экстракт гриба *N. nambi*, помимо люциферазы, может содержать примеси редокс-ферментов, поэтому наряду с реакцией биолюминесценции возможны побочные процессы.

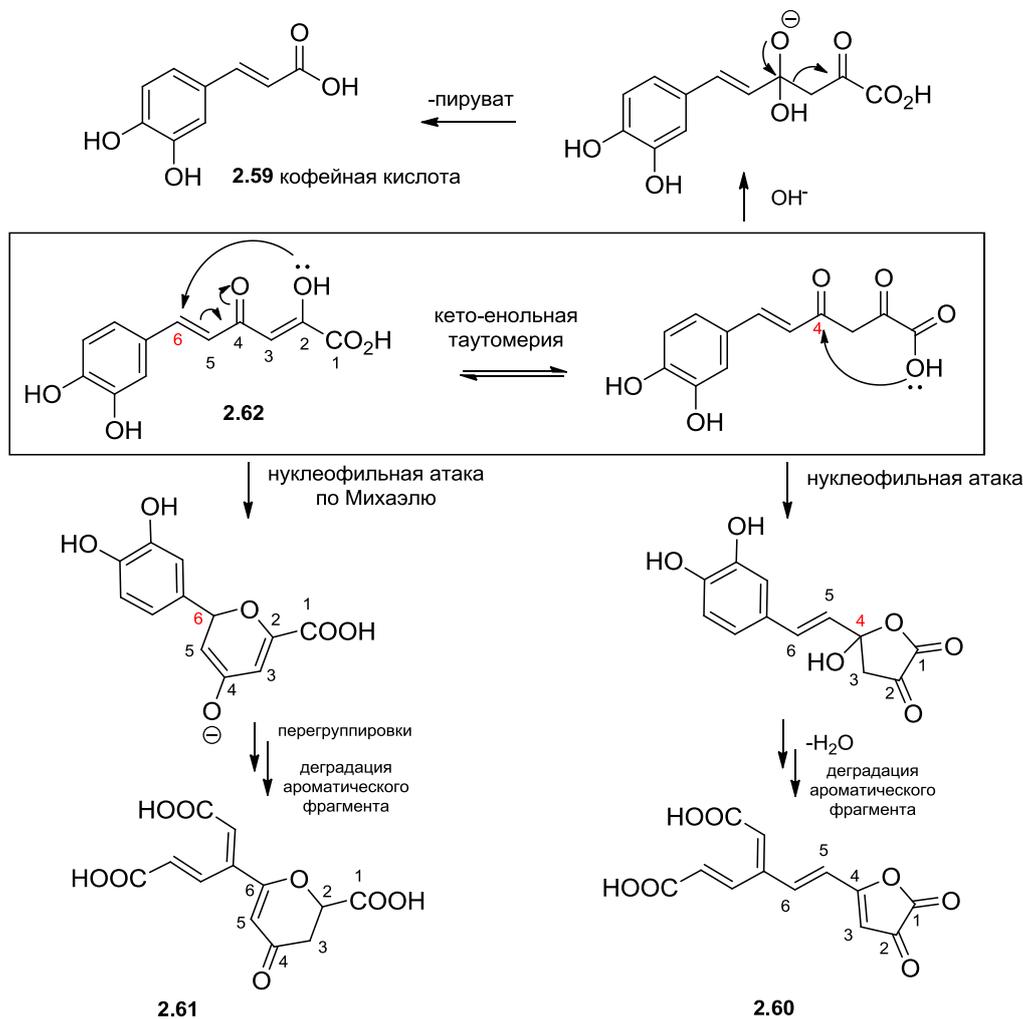


Схема 17. Предполагаемый механизм деградации оксилуциферина **2.62**.

Для подтверждения структуры оксилуциферина **2.62** был осуществлен встречный синтез этого производного (см. далее). Полученное соединение совпало по хроматографической подвижности, форме пика и спектру поглощения с пиком №6 (Рисунок 9).

Таким образом, полученные нами данные позволяют предположить, что реакция биолюминесценции высших грибов имеет вид (Схема 18):

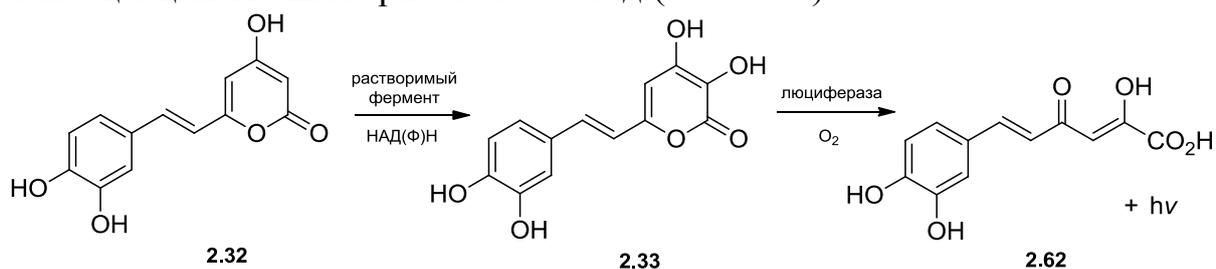


Схема 18. Реакция биолюминесценции высших грибов.

Поскольку при инкубации люциферина с экстрактом люциферазы получается смесь продуктов деградации, включающей в себя расщепление катехольного фрагмента ароматической системы, то для исключения побочного процесса окисления катехольного ядра было предложено использовать вместо люциферина его близкий аналог **2.45**. Так как в соединении **2.45** склонный к окислению катехольный фрагмент заменен на более устойчивый фенольный, мы предположили, что продукт его БЛ реакции - аналог оксилуциферина **2.63** - не должен подвергаться побочному окислительному расщеплению по ароматическому ядру при инкубации с белковым экстрактом, содержащим люциферазу (Схема 19):

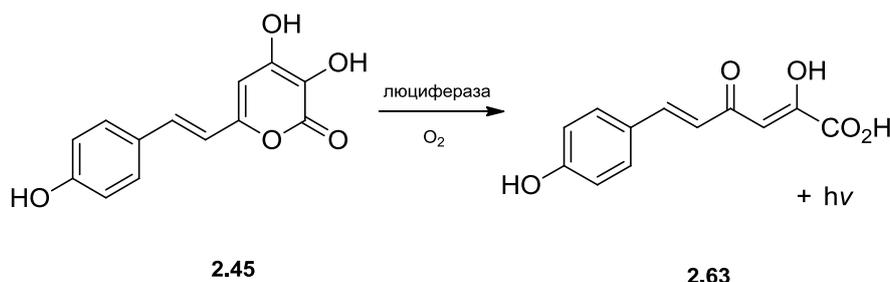


Схема 19. Предполагаемый механизм БЛ реакции аналога люциферина **2.45**.

Оксилуциферин **2.62** и его аналог **2.63** были получены схожим образом из соответствующих альдегидов: 3,4-диметоксибензальдегида и *n*-метоксибензальдегида (Схема 20). Первоначально альдегиды по описанной методике конденсации¹³ переводили в производные **2.64** и **2.65**, которые затем последовательно обрабатывали 1M LiHMDS в абсолютном тетрагидрофуране и метиоксалилхлоридом при -78°C в инертной атмосфере. В полученных производных **2.66** и **2.67** действием избытка триборида бора в абсолютном дихлорметане удаляли все защитные группы, целевые продукты выделяли методом ВЭЖХ.

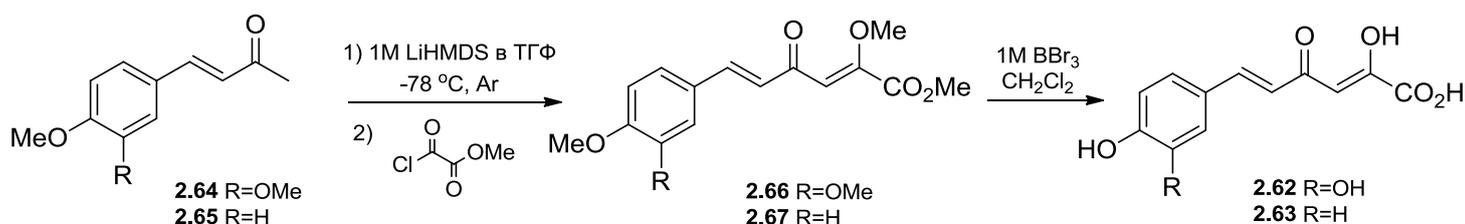


Схема 20. Синтез оксилуциферина **2.62** и его аналога **2.63**.

Проведение экспериментов по инкубации соединений **2.45** и **2.63** с люциферазой грибов позволит в будущем окончательно установить механизм реакции биолуминесценции высших грибов.

¹³ Adeva M. и др. Open Analogues of Arcyriaflavin A. Synthesis through Diels–Alder Reaction between Maleimides and 1-Aryl-3-tert-butyl-dimethylsiloxy-1,3-butadienes // *J. Org. Chem.* 2000. Т. 65. № 11. С. 3387–3394.

Выводы

1. Проведена оптимизация метода синтеза люциферина почвенного червя *Fridericia heliota*: количество стадий уменьшено с девяти до семи, суммарный выход увеличен в 50 раз: с 0.04% до 2%.
2. Синтезирован фрагмент природных аналогов люциферина почвенного червя *Fridericia heliota* – AsLn5, AsLn11 и AsLn12 – (Z)-CompY ((Z)-3-(4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота) и его *транс*-изомер. Доказана Z-конфигурация двойной связи в природных аналогах люциферина *Fridericia* AsLn5, AsLn11 и AsLn12.
3. Получены аналоги люциферина *Fridericia heliota*, варьируемые по фрагменту ГАМК – производное люциферина с линкерной аминогруппой (S,Z)-2-(3-(3-(4-(2-аминоэтиламино)-4-оксобутилкарбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-6-(карбоксиформамидо)гексановая кислота **2.28** и его конъюгат с флуоресцентным красителем (S)-6-(карбоксиформамидо)-2-((Z)-3-(3-(4-(2-(4-((Z)-4-(2-(дифторборил)-4-гидроксибензилиден)-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)бутанамидо)этиламино)-4-оксобутилкарбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановая кислота **2.30**. Показано, что аналоги **2.28** и **2.30** проявляют биолюминесцентную активность, причем максимум эмиссии БЛ соединения **2.30** проявляет батохромный сдвиг на 50 нм по сравнению с люциферинем *Fridericia*. Таким образом, впервые получен аналог люциферина *Fridericia* с измененными спектральными свойствами.
4. Синтезировано модельное соединение аденилата люциферина *Fridericia heliota* (S,Z)-*трет*-бутил 6-(((бензилокси)карбонил)амино)-2-(3-(3-((4-(*трет*-бутоксид)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексаноат **2.31**, изучены его хемилюминесцентные свойства. Показано, что механизм биолюминесцентной реакции *Fridericia heliota* включает образование аденилата люциферина.
5. Впервые синтезирован люциферин высших грибов (E)-6-(3,4-дигидрокстирил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он.
6. Синтезировано шесть структурных аналогов люциферина высших грибов: (E)-3,4-дигидрокси-6-(4-гидроксистирил)-2H-пиран-2-он **2.45**, (E)-3,4-дигидрокси-6-(2-(6-гидроксиафталин-2-ил)винил)-2H-пиран-2-он **2.46**, (E)-3,4-дигидрокси-6-(2-(тиофен-2-ил)винил)-2H-пиран-2-он **2.47**, (E)-6-(2-(1H-индол-3-ил)винил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он **2.48**, (E)-6-(4-(диэтиламино)стирил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он **2.49**, (E)-6-(2-(1,2,3,5,6,7-гексагидропиридо[3,2,1-*ij*])хинолин-9-ил)винил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он **2.50**. Изучены спектральные характеристики полученных соединений. Показано, что соединения **2.45**, **2.46**, **2.48-2.50** проявляют биолюминесцентные свойства. Таким образом, показано, что в реакции биолюминесценции люциферина грибов ключевую роль играет пираноновый фрагмент субстрата, в то время как катехольный фрагмент выполняет роль ауксохромного заместителя.
7. Установлено строение продуктов биолюминесцентной реакции грибов **2.59-2.61**.
8. Предложена структура оксилуциферина высших грибов (2Z,5E)-6-(3,4-дигидроксифенил)-2-гидрокси-4-оксогекса-2,5-диеновой кислоты.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Maxim A. Dubinnyi, Aleksandra S. Tsarkova, Valentin N. Petushkov, **Zinaida M. Kaskova**, Natalja S. Rodionova, Sergey I. Kovalchuk, Rustam H. Ziganshin, Mikhail S. Baranov, Konstantin S. Mineev, and Ilia V. Yampolsky. Novel peptide chemistry in terrestrial animals: natural luciferin analogues from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. // *Chem. Eur. J.* 2015. T. 21. № 10. С. 3942–3947.

2. Maxim A. Dubinnyi, **Zinaida M. Kaskova**, Natalja S. Rodionova, Mikhail S. Baranov, Andrey Yu. Gorokhovatsky, Alexey Kotlobay, Kyril M. Solntsev, Aleksandra S. Tsarkova, Valentin N. Petushkov and Ilia V. Yampolsky. Novel Mechanism of Bioluminescence: Oxidative Decarboxylation of a Moiety Adjacent to the Light Emitter of *Fridericia* Luciferin. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. T.127. № 24. С. 7171-7173.

3. Konstantin V. Purtov, Valentin N. Petushkov, Mikhail S. Baranov, Konstantin S. Mineev, Natalja S. Rodionova, **Zinaida M. Kaskova**, Aleksandra S. Tsarkova, Alexei I. Petunin, Vladimir S. Bondar, Emma K. Rodicheva, Svetlana E. Medvedeva, Yuichi Oba, Yumiko Oba, Alexander S. Arseniev, Sergey Lukyanov, Josef I. Gitelson, Ilia V. Yampolsky. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. T.127. № 28. С. 8242-8246.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Осипова З.М.**, Минеев К.С., Балеева Н.С., Царькова А.С., Ямпольский И.В. Синтез грибного люциферина и его аналогов. // I Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» Тез. докл. – Казань, 2015. Стр. 152.

2. **Осипова З.М.**, Минеев К.С., Балеева Н.С., Царькова А.С., Ямпольский И.В. Синтез грибного люциферина и его аналогов. // XXVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Тез. докл. – Москва, 2016. Стр. 145.

Для заметок

Для заметок