

**N⁶-(БЕНЗИЛОКСИМЕТИЛ)АДЕНОЗИН –
НОВЫЙ АНТИЦИТОКИНИН, АНТАГОНИСТ
ДЛЯ РЕЦЕПТОРА CRE1/АНК4 АРАБИДОПСИСА**

© 2012 г. Д. М. Кривошеев, С. В. Колячкина, С. Н. Михайлов, В. И. Тараров,
член-корреспондент РАН Б. Ф. Ванюшин, Г. А. Романов

Поступило 30.01.2012 г.

Среди синтетических производных N⁶-аденозина выявлен новый антицитокинин N⁶-(бензилоксиметил)аденозин (БОМА), который является антагонистом рецептора цитокининов CRE1/АНК4 растений арабидопсиса. Описанный нами новый антицитокинин БОМА очень специфичен: он подавляет активацию рецептора CRE1/АНК4, но не сходного по структуре рецептора АНК3.

Цитокинины относятся к классическим фитогормонам и представляют собой большую группу природных и синтетических соединений – производных аденина или фенилмочевины [1]. Природные цитокинины – производные аденина – участвуют в регуляции роста и развития, а также в адаптации растений к внешним воздействиям. Исследования молекулярного механизма действия цитокининов обрели надежную основу после открытия в 2001 г. рецепторов и выяснения путей трансдукции цитокининового сигнала до первичных клеточных мишеней [1, 2]. В настоящее время для изучения особенностей действия и сигналинга гормонов применяют различные подходы, в том числе активацию или подавление биосинтеза или распада гормона, а также блокирование генов рецепторов и элементов трансдукции сигнала. Полезным инструментом исследований являются антигормоны, которые способны подавлять действие гормона на уровне его рецепции. Такие антигормоны называют рецепторными антагонистами; они наиболее специфично ингибируют действие соответствующего гормо-

на. Рецепторные антагонисты нашли широкое применение в изучении механизма действия гормонов животных [3]. Они с успехом применяются и в медицинской практике, например, в виде антигистаминов для подавления аллергических реакций [4] или антиандрогенов для борьбы с раковыми заболеваниями простаты [5].

В исследованиях гормональной регуляции у растений также предпринимались попытки получения и использования антигормонов, хотя успехи в этой области пока очень ограничены. В случае цитокининов еще в 60–70-х годах XX в. были синтезированы соединения, подавлявшие многие специфические эффекты этих фитогормонов [6]. “Классическими” антицитокининами долгое время считались отдельные производные пирроло[2,3-*d*]пиримидина и пиразоло[4,3-*d*]пиримидина, относительно близкие по структуре к аденину [6]. Однако после открытия рецепторов цитокининов прямая проверка показала, что действие этих классических антицитокининов происходит не на уровне рецепторов [7], а, следовательно, они не являются истинными рецепторными антагонистами. И только в последнее время удалось обнаружить первые соединения, которые проявляли настоящую антицитокининовую активность, т.е. способность подавлять сигналинг цитокининов именно на уровне их рецепторов [8, 9]. Данные антицитокинины конкурентно ингибировали связывание цитокининов с рецепторами растений арабидопсиса и при этом сами по себе не вызывали гормональные эффекты в биотестах. Этими соединениями оказались производные хорошо известного цитокинина 6-бензиламинопурина (БАП): N⁶-(2-гидрокси-3-метилбензиламино)пурин (PI-55) [8] и N⁶-(2,5-дигидроксибензиламино)пурин (LGR-991) [9] (рис. 1). PI-55 и LGR-991 близки по структуре и характеризуются двумя заместителями в бензольном кольце: ОН- и метильной группами в соседних *орто*- и *мета*-позициях у PI-55 и двумя ОН-группами в удаленных *орто*- и *мета*-позициях у LGR-991. Причины нали-

*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской Академии наук, Москва
Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта
Российской Академии наук, Москва
Институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова*

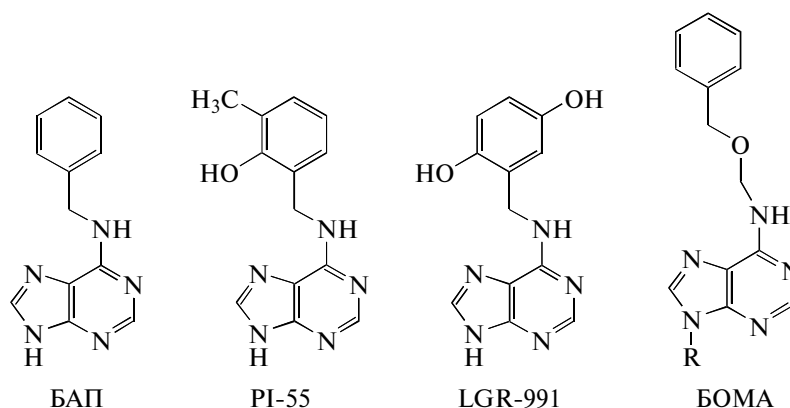


Рис. 1. Структурные формулы БАП и веществ с антицитокининовой активностью — рецепторных антагонистов. R — β -D-рибофуранозил.

чия именно у этих соединений антицитокининовой активности, а также особенности их взаимодействия с рецептором остаются неизвестными, поэтому для ответа на эти вопросы представляет особый интерес поиск других антагонистов цитокининовых рецепторов.

В настоящей работе нам впервые удалось выявить антицитокининовую активность производного аденина иного строения: N⁶-(бензилоксиметил)аденозина (БОМА) (рис. 1). Это соединение принципиально отличается от двух ранее описанных антицитокининов наличием остатка кислого рода в цепочке атомов, соединяющей ароматическое кольцо с N⁶ аденина, а также отсутствием модификаций бензольного остатка.

Синтез БОМА проводили согласно описанному ранее методу [10, 11]. Структура этого соединения подтверждена данными ЯМР-, УФ- и масс-спектрометрии. Антицитокинин PI-55 был любезно предоставлен L. Spíchal (г. Оломоуц, Чешская Республика). Опыты по лиганд-рецепторному взаимодействию проводили с использованием трансгенных бактерий (*E. coli*), экспрессирующих цитокининовые рецепторы CRE1/АНК4 или АНК3 арабидопсиса, согласно методу [12, 13]. Тестирование физиологического действия соединений осуществляли с использованием проростков двойных мутантов арабидопсиса с блокированными инсерцией двумя из трех генов рецепторов цитокининов и экспрессирующих репортерный ген *GUS* под контролем цитокинин-специфичного промотора гена *ARR5* (*P_{ARR5}:GUS* арабидопсис) [14, 15].

Ранее мы испытали целый ряд синтетических производных аденозина на цитокининовую активность в биотестах *in planta* [11]. Гормональная активность этих соединений варьировалась в широких пределах. Далее мы протестировали способность соединений связываться с рецепторами цитокини-

нов арабидопсиса CRE1/АНК4 или АНК3. Параллельно проверяли активность этих же соединений в биотесте на проростках двойных мутантов *P_{ARR5}:GUS* арабидопсиса, у которых функционировал всего один (из трех) рецептор цитокининов. Таким образом, мы имели возможность сопоставить сродство лиганда к конкретному рецептору со способностью этой же пары лиганд-рецептор вызывать первичный гормональный ответ *in vivo* (активацию репортерного гена *GUS*). Для большинства соединений мы получили четкую корреляцию между способностью связываться с цитокининовым рецептором и способностью вызывать реакцию в биотесте. Однако в случае соединения БОМА такой корреляции не было: это вещество было способно связываться с рецепторами, в первую очередь с рецептором CRE1/АНК4 (K_D для CRE1/АНК4 и АНК3 примерно 230 и 3500 нМ соответственно), однако при этом реакция в биотесте была крайне слабой (для рецептора АНК3) или отсутствовала вовсе (для рецептора CRE1/АНК4) (рис. 2). Это позволило предположить, что данное соединение обладает антицитокининовой активностью, в первую очередь для рецептора CRE1/АНК4, сродство которого к БОМА было достаточно высоким, а типичный цитокининовый сигналинг при этом отсутствовал.

Для проверки этого предположения мы испытали способность БОМА подавлять физиологическое действие типичного цитокинина БАП. В качестве контроля взято производное аденина PI-55, которое ранее было охарактеризовано как конкурентный антагонист рецептора цитокининов CRE1/АНК4 [8]. При проведении биотеста на проростках мутантного *P_{ARR5}:GUS* арабидопсиса, экспрессирующих единственный рецептор CRE1/АНК4, было показано, что БОМА достоверно ингибирует действие БАП при их совместном добавлении к проросткам (рис. 3, сверху). При этом эффекты БОМА и ан-

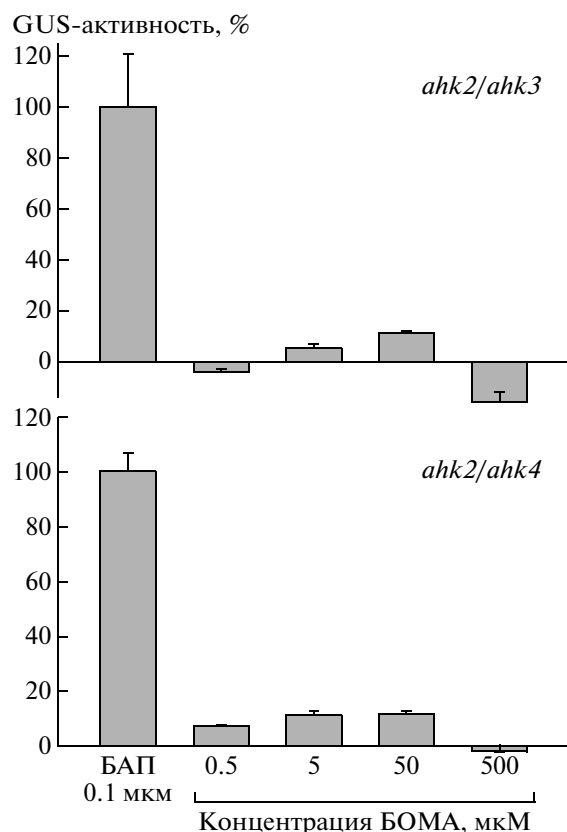


Рис. 2. Активность GUS у двойных мутантов *ahk2/ahk3* (вверху) и *ahk2/ahk4* (внизу) арабидопсиса в присутствии различных концентраций БОМА. Повышение GUS-активности под действием БАП (0.1 мкМ) принято за 100%, столбцами показаны средние значения $\pm$ стандартная ошибка.

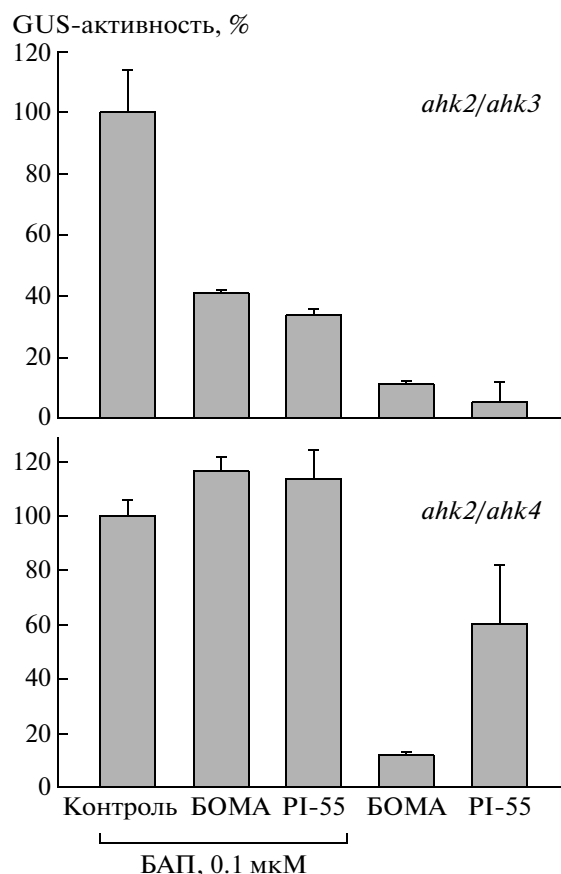


Рис. 3. Действие БОМА (50 мкМ) и PI-55 (50 мкМ) на активацию GUS цитокинином в двойных мутантах *ahk2/ahk3* (вверху) и *ahk2/ahk4* (внизу) арабидопсиса. Повышение GUS-активности под действием БАП (0.1 мкМ) принято за 100%, столбцами показаны средние значения $\pm$ стандартная ошибка.

тицитокина PI-55 практически совпали, что служит прямым подтверждением антицитокининовых свойств БОМА. Антицитокининовый эффект БОМА, как и PI-55, отсутствовал на проростках, экспрессирующих АНК3 как единственный рецептор цитокининов (рис. 3, внизу), что было ожидаемо, исходя из низкого сродства БОМА к этому рецептору.

Антицитокининовый эффект БОМА зависел от дозы этого соединения, точнее от соотношения используемых концентраций цитокина (БАП) и антицитокинина (БОМА). При концентрации 50 мкМ, превышающей концентрацию БАП в 500 раз, БОМА подавлял активацию рецептора CRE1/АНК4 цитокинином на 50–60% (рис. 3, 4), тогда как при низких соотношениях эффект БОМА был выражен гораздо слабее (рис. 4).

Таким образом, в результате данного исследования к двум недавно найденным антицитокининам добавился третий антагонист цитокининово-

го рецептора CRE1/АНК4. Он заметно отличается по структуре от обнаруженных ранее. Этот новый антицитокинин БОМА, как и ранее описанный PI-55 [8], подавляет активацию рецептора CRE1/АНК4, но не рецептора АНК3. Исходя из близости структур этих антицитокининов и природных цитокининов — производных аденина, а также количественного подобия действия БОМА и конкурентного рецепторного антагониста PI-55, логично предположить, что БОМА обладает конкурентным характером действия. Стоит отметить, что другой ранее обнаруженный конкурентный антицитокинин, LGR-991, менее специфичен и способен подавлять активацию агонистом как рецептора CRE1/АНК4, так и АНК3 [9]. В перспективе, благодаря открытию рецепторов цитокининов и возможности исследовать индивидуальные рецепторы *in planta* и *in vitro* [1, 2], можно ожидать обнаружения новых антицитокининов разной структуры

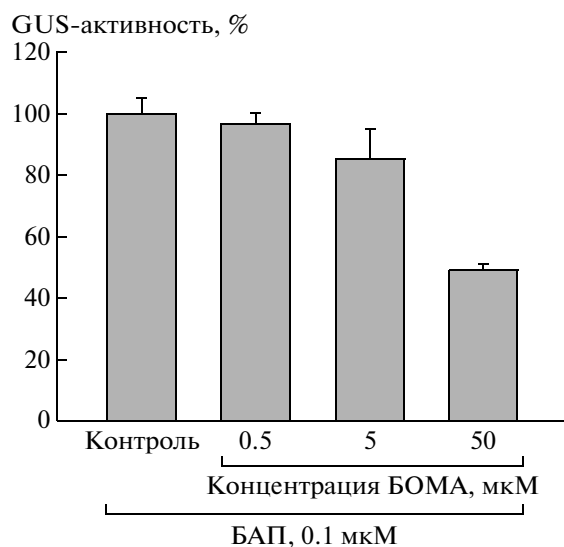


Рис. 4. Действие различных концентраций БОМА на активацию GUS цитокинином в двойных мутантах *ahk2/ahk3* арабидопсиса. Повышение GUS-активности под действием БАП (0.1 мкМ) принято за 100%, столбцами показаны средние значения $\pm$ стандартная ошибка.

и различного механизма действия и их применения для решения исследовательских и практических задач.

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 11–04–00614, 11–04–90491, 11–04–00026-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Романов Г.А. // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 295–319.
2. Heyl A., Riefler M., Romanov G.A., Schmölling T. // Europ. J. Cell Biol. 2012. V. 91. P. 246–256.
3. Negus S.S. // Biochem. Pharmacol. 2006. V. 71. P. 1663–1670.
4. Leurs R., Church M.K., Taglialatela M. // Clin. Exp. Allergy. 2002. V. 32. P. 489–498.
5. Bahashwan S.A.E., Al-Omar M.A.E., Ezzeldin E., et al. // Chem. Pharm. Bull. 2011. V. 59. P. 1363–1368.
6. Iwamura H. In: Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. Boca Raton: CRC Press, 1994, P. 43–55.
7. Spíchal L., Kryštof V., Paprskářová M., et al. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 14356–14363.
8. Spíchal L., Werner T., Popa I., et al. // FEBS J. 2009. V. 276. P. 244–243.
9. Nisler J., Zatloukal M., Popa I., et al. // Phytochem. 2010. V. 71. P. 823–830.
10. Tararov V.I., Kolyachkina S.V., Alexeev C.S., Mikhailov S.N. // Synthesis. 2011. № 15. P. 2483–2489.
11. Kolyachkina S.V., Tararov V.I., Alexeev C.S., et al. // Coll. Czech. Chem. Commun. 2011. V. 76. P. 1361–1378.
12. Romanov G.A., Lomin S.N., Schmölling T. // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 4051–4058.
13. Lomin S.N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G.A., Sakakibara H. // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 5149–5159.
14. Romanov G.A., Kieber J.J., Schmölling T. // FEBS Lett. 2002. V. 515. P. 39–43.
15. Stolz A., Riefler M., Lomin S.N., et al. // Plant J. 2011. V. 67. P. 157–168.