

УДК 547.2.33.4-38.4.57.116

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ ФИТОРЕГУЛЯТОРОВ В ВОСПРИЯТИИ ХИМИЧЕСКОГО СИГНАЛА РЕЦЕПТОРАМИ ГОРМОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ РАСТЕНИЙ

Р.Г. Гафуров*, Н.С. Зефилов

(кафедра органической химии; e-mail: zefirov@org.chem.msu.ru)

Роль молекулярной структуры фиторегуляторов в восприятии химического сигнала рецепторами гормональных систем растений и характер соответствия фиторегулятора рецептору рассмотрены на основе: 1) механизма восприятия и трансдукции гормонального сигнала в растительной клетке; 2) постулатов физиологической парадигмы, на которой основана стратегия химического дизайна фиторегуляторов с заданными свойствами. Показано, что при регуляторном взаимодействии в отличие от взаимодействия ферментов с их субстратами существенно не геометрическое (“ключ к замку”), а топохимическое соответствие биорегулятора рецептору биомиметики. При этом предполагается, что действие биорегулятора на рецептор кооперативное и квантованное. Показано, что совокупность молекулярных параметров солей четвертичного аммония, которые определяют их антигипбереллиновую (ретардантную) активность, может служить мерой топохимического соответствия рецептору, если речь идет о сравнении соединений одного и того же кластера по их физиологической активности. Субмолекулярное рассмотрение формирования физиологической активности молекулы как интеграла активности составляющих ее эффекторных фрагментов с учетом влияния фрагментов, определяющих полярное и гидрофобное связывание с рецептором, предложено как возможный путь усовершенствования метода QSAR и приобретения им эвристичности.

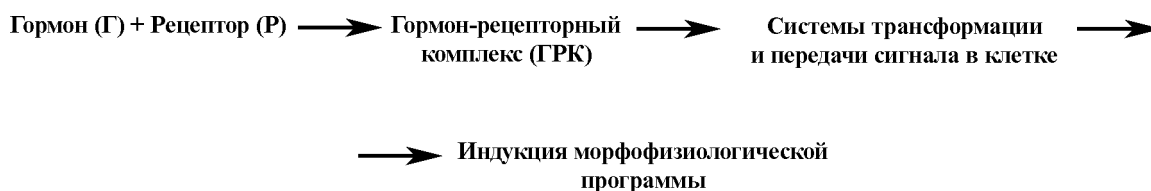
По данным, приведенным в работе [1], восприятие и трансдукция гормонального сигнала в растительной клетке происходит по схеме, представленной на схеме. Рецептор должен соответствовать критериям [2, 3], общим для гормональной системы как растений, так и животных. Он должен однозначно распознавать структуру молекулы гормона и связывать ее обратимо, с высокой афинностью и насыщаемостью мест связывания. В ряду соединений с гормональной активностью (аналоги фитогормонов) предполагается соответствие между их сродством к рецептору и физиологической активностью. Гормон-рецепторное взаимодействие должно инициировать типичный для данного типа клеток физиологический ответ.

Подходы, развитые в работах [1] и [4], позволяют с единой точки зрения рассмотреть роль молекулярной структуры биорегулятора при восприятии рецепторами химических сигналов от природных фитогормонов и их агонистов-биомиметиков, от антагонистов,

ингибирующих биосинтез природных фитогормонов, а также от блокаторов регуляторных систем, каковыми являются ферментные яды, например, гербициды.

Как вышеуказанные требования к рецептору могут быть связаны со структурой физиологически активных веществ, взаимодействующих с ним? Подобного рода взаимодействия рассмотрены нами здесь на примере некоторых фитогормонов, их биомиметиков, антагонистов, а также отдельных гербицидов и фунгицидов. Для проявления активности определенного вида в молекулах фиторегуляторов должны содержаться эффекторные фрагменты [4-7], которые могут инициировать или блокировать типичный для данного типа клеток физиологический ответ при взаимодействии с рецептором.

Для **ауксинов** таким фрагментом является система, состоящая из конденсированных или отдельных ароматических колец, к которой через метиленовую, диметиленовую, триметиленовую или оксаалкилено-



Восприятие и трансдукция гормонального сигнала в растительной клетке

*Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка; e-mail: ravig@icp.ac.ru.

вую группы присоединена полярная группа, представленная карбоксилем, амидной группой, нитрилом или гидроксильной группой [8]. Недавно показано, что минимальным (простейшим) топахимическим аналогом такой структуры является бензильная группа, замещенная по метиле через гетероатом и цепь углеродных атомов теми же полярными заместителями [9, 10].

Для **ретардантов** эффекторной является ониева группа, тормозящая свертывание линейного геранилгеранилолпирофосфата в копалидифосфат, из которого образуется тетрациклический каурен – предшественник молекулы гиббереллина [8]. Антигиббереллиновую активность имеют ониевые соли как с четвертичной аммониевой, так и с третичной сульфинеовой или с четвертичной фосфониевой группами [11]. В роли эффекторного фрагмента, блокирующего биосинтез гиббереллина, может выступить 1,2,4-триазолильная, имидазолильная и некоторые другие родственные группы. Однако механизм проявления антигиббереллиновой активности здесь другой. Азолильные производные ингибируют окисление метильной группы $C18\pm$ в каурене в карбоксильную с образованием кауреновой кислоты, которая далее превращается в гибберелловую кислоту [8]. Соответствующие эффекторные группы присущи и другим видам фитогормонов, их биомиметиков и антагонистов.

Важным атрибутом взаимодействия гормона или его биомиметика с рецептором является насыщенность мест связывания. При рассмотрении взаимоотношений биорегулятор–рецептор анализируются, как правило, свойства и действие единичной молекулы. Между тем известно, что каждая биорегуляторная система имеет свой порог чувствительности к химическому или биохимическому воздействию. Сигналы, интенсивность которых ниже этого порога, не воспринимаются, и система на них не реагирует. Логично предположить, что речь скорее всего может идти о кооперативном и квантованном действии биорегуляторов. При этом необходимо, чтобы на рецепторе одновременно было занято несколько мест связывания (кооперативность, а число занятых мест не должно быть меньше некоторой характерной для данной системы величины, необходимой для инициирования ответа (квантованность).

Другим важнейшим критерием является обратимость гормон-рецепторного взаимодействия. Насыщенность связывания и обратимость взаимодействия обеспечивают процессу восприятия и трансдукции сигнала режим работы в формате “больше-меньше”, что необходимо для процесса регулирования. При этом степень регуляторного воздействия должна зависеть не только от числа занятых мест на рецепторе, но и в силу обратимости процесса от времени

существования гормон-рецепторного комплекса, т.е. от длительности пребывания молекул биорегулятора на рецепторе. Определим произведение плотности распределения на рецепторе на среднее время присутствия молекул в местах связывания как момент действия биорегулятора.

В отличие от гормон-рецепторного взаимодействия фермент-субстратное взаимодействие происходит в режиме “да-нет”. Для обеспечения требуемой избирательности здесь необходимо необратимое связывание субстрата с активным центром фермента и геометрическое соответствие субстрата активному центру по принципу “ключ к замку” [10]. Химический сигнал для освобождения центра связывания дает химическое превращение субстрата, специфически присущее данной паре субстрат-фермент. Вещества, которые необратимо связаны с активным центром фермента и не могут подвергнуться специфическому для данной системы химическому превращению, представляют собой ферментные яды. Это общее свойство ферментных систем растений, животных и грибов.

При компьютерном моделировании гербицидов трех рядов – триазинов, карбаматов и бензимидазолов, ингибирующих в растениях фотосистему II, показано [14], что в этих соединениях эффекторным фрагментом является группа $-C(X)-N-R$, где X – карбонильный кислород, иминный азот или группа с высокой электроотрицательностью (например, $-CF_3$), R – атом водорода или алкил. Именно она отвечает за необратимое связывание молекул гербицида и блокирование работы фотосистемы II, что приводит к прекращению фотосинтеза, а растение – к гибели.

Необратимость взаимодействия биомиметика с активным центром определяет фунгицидную активность производных 1,2,4-триазола и имидазола, например, R,R-стереоизомера 4,4-диметил-2-(1',2',4'-триазолил-1')-1-(2'',4''-дихлорфенил)-пентанола-3 [15,16]. С гемом цитохрома P-450 необратимо связывается NH-группа азолильного фрагмента, занимая место кислорода, что препятствует окислительному деметилированию углеродного атома ланостерола (C14 α) и превращению его в эргостерол, из которого в основном строится цитоскелет клеточной мембраны грибов.

Таким образом, типичный для данного вида клеток физиологический ответ при гормон-рецепторном или фермент-субстратном взаимодействии зависит от эффекторной группы в молекуле гормона, его биомиметика, антагониста или блокатора ферментной системы. Кроме того, в молекуле должны присутствовать фрагменты, связывающие биорегулятор с гидрофобными и полярными сайтами рецептора или активного центра биомиметика и обеспечивающие при этом избирательность и продолжительность действия био-

регулятора. Эти центры связывания предъявляют свои требования к структуре как молекулы биорегулятора в целом, так и ее соответствующих фрагментов. В работах [17, 18] проведено моделирование ретардантной активности пептидных аналогов S,S-стереоизомера 4,4-диметил-2-(1',2',4'-триазолил-1')-1-(4'-хлорфенил)-пентанола-3, известного под названием паклобутразол [19]. Показано, что имидазолильная группа гистидина, *изо*-пропильная группа валина и фенильная группа фенилаланина миметируют соответственно 1,2,4-триазолильный, *трет*-бутильный и 4-хлорфенильный фрагменты паклобутразола. В роли фрагментов-миметиков выступают также *трет*-бутильная группа *трет*-бутилпирокарбоната (Вос-защита аминокруппы при пептидном синтезе) и бензилоксикарбонильная группа (Z-защита аминного конца пептидной цепи или вторичной аминокруппы в имидазолильном фрагменте гистидина), которые могут миметировать соответственно *трет*-бутильный и 4-хлорфенильный фрагменты паклобутразола. Три пептида этой серии с первичной структурой Z-His-Вос, Вос-Phe-His(H) и Вос-Val-Phe-His(H), топохимически близкие к S,S-стереоизомеру прототипа, обладают выраженной ретардантной активностью в стандартном биотесте [20] на гипокотилых проростков огурца. Ключевым эффекторным фрагментом, определяющим ретардантную активность, является остаток гистидина. Его присутствия в составе молекулы при наличии в ней Вос- и Z-фрагментов достаточно для проявления ретардантной активности. Активность возрастает при удлинении пептидной цепи фенилаланином или последовательностью Val-Phe. Перестановка мест валина и фенилаланина в пептидной цепи элиминирует ретардантную активность и превращает трипептид в стимулятор роста растений. Стереоизомерия этого трипептида наиболее далека от пространственной конфигурации S,S-стереоизомера паклобутразола.

Таким образом, объединение в молекуле биомиметического эффекторного фрагмента с другими биомиметическими фрагментами, необходимыми для взаимодействия с участками гидрофобного и полярного связывания в активном центре биомишени, позволяет получить новое соединение с искомой физиологической активностью (при условии, что по стереоизомерии биомиметик близок к прототипу [4–7, 18]).

Примечательно, что ретардантная активность вышеуказанных пептидов воспроизводится несмотря на то, что их молекулярные массы более чем в два раза превосходят массу паклобутразола. Соответствующая разница, несомненно, имеется и в геометрических размерах молекул прототипа и его пептидных аналогов. Для объяснения этого факта может быть выдвинуто следующее предположение. Пептидная цепь свернута

в структуру, удобную для тормозящего действия на один из ферментов гиббереллинового каскада. При этом рецептор биомишени имеет структуру, в которой его сайты, взаимодействующие с молекулой пептида, достаточно доступны, если обеспечивается топохимическое подобие пептида прототипу.

Однако аналогичная картина (разница в строении и молекулярных массах при близких значениях физиологической активности) наблюдается и в других рядах фиторегуляторов, не имеющих в отличие от пептидов вторичной пространственной структуры. Так, в ряду производных холина и N,N,N-триэтилхолина [21, 24] разница в молекулярных массах хлорохолинхлорида и N,N,N-триэтилхлорохолинхлорида, с одной стороны, и соответствующих бензиловых эфиров холина и N,N,N-триэтилхолина – с другой, равна соответственно 45 и 36%. Несмотря на это, все четыре соединения в выбранном биотесте обладают практически одинаковой антигиббереллиновой активностью. А весь исследованный ряд простых эфиров и галогенпроизводных имеет антигиббереллиновую активность одного порядка. При этом N,N,N-триэтилхолин является слабым ретардантом из-за низкой липофильности, а холин вообще не обладает антигиббереллиновой активностью. Напротив, он стимулирует биосинтез гиббереллина. Не исключено, что холин выполняет в жизненном цикле гриба трофическую функцию. Наиболее активны компактные молекулы галогенхолингалогенидов с высокими значениями липофильности и наибольшей асимметрией молекулярного электронного облака. Возможно, здесь играет роль меньшая обратимость связывания по гидрофобному и полярному сайтам и большая насыщаемость мест связывания компактными молекулами, что должно увеличивать момент действия – произведение плотности распределения на рецепторе на среднее время присутствия молекул в местах связывания.

В качестве дополнительного примера следует указать на то, что у известных ретардантов N,N,N,N-три-*n*-бутил-(2',4'-дихлорбензил)-фосфинийхлорида (фосфон D) и N,N-метил-(2',4'-дихлорбензил)-2-(3'-пиридил)-пирролидинийхлорида [11], молекулярные массы соответственно в 2,2 и 2,5 раза больше, чем у хлорохолинхлорида, тем не менее они обладают высокой антигиббереллиновой активностью.

Ауксиновые биомиметики (N- и O-бензилсодержащие соединения [9, 10]) являют пример, когда молекула биомиметика существенно компактней по структуре и меньше по массе, чем ее функциональный природный прототип. Так, бензиловый спирт (молекулярная масса 118) почти вдвое легче, чем природный ауксин индоллил-3-уксусная кислота (молекулярная масса 203), а значения их активности в тесте укор-

нения черенков фасоли [12] близки. Наоборот, при близких значениях молекулярных масс 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (гербицид 2,4-Д) (молекулярная масса 223) как ауксин на несколько порядков активнее, чем индолил-3-уксусная кислота. Причина может заключаться в существенно меньшей обратимости связывания 2,4-Д с ауксиновым рецептором и как следствие в росте момента действия биомиметика. Видимо, это является физиологической основой проявления гербицидных свойств и соответствующего применения 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и ее солей на практике.

На основе вышеизложенного приходится признать, что в рассматриваемых случаях регуляторного взаимодействия, в отличие от взаимодействия ферментов с их субстратами, существенно не геометрическое (“ключ к замку”) [13], а топохимическое соответствие биорегулятора рецептору биомишени. Структура и геометрия молекулы могут изменяться, но если при этом биомиметически воспроизводятся эффекторный фрагмент, фрагменты, обуславливающие гидрофобное и полярное связывание, а также стереоизомерия молекулы-прототипа, то воспроизводится и искомая активность нового соединения.

Топохимическое соответствие биорегулятора рецептору неразрывно связано со структурными и физико-химическими свойствами молекулы. Могут ли молекулярные параметры быть мерой этого соответствия? В работе [21] проведен регрессионный анализ влияния шести расчетных молекулярных параметров на антигипбереллиновую (ретардантную) активность четвертичных аммониевых солей, определенную с помощью чувствительного биотеста [22, 23] на клеточной культуре гриба *Gibberella fujikuroi*. Установлено, что в случае производных N,N,N,N-триметил-(2-оксиэтил)-аммонийхлорида (холина) и N,N,N,N-триэтил-(2-оксиэтил)-аммонийхлорида (N,N,N,N-триэтилхолина), имеющих линейную структуру, наибольшее влияние на антигипбереллиновую активность оказывают поляризуемость (α), протоноакцепторный фактор ($C_a^{\text{макс}}$) и липофильность ($\log P$). Наиболее сильными блокаторами биосинтеза гиббереллина в обеих группах являются бензиловые эфиры и галогениды холинов с максимальными значениями парциального заряда (q_x) на отрицательном конце молекулярного диполя, т.е. с наибольшей асимметрией молекулярного электронного облака. На антигипбереллиновую активность пространственно более затрудненных солей N,N-диалкилпиперидиниев влияет главным образом стерический параметр E_s , меньший вклад вносят поляризуемость α , протоноакцепторный фактор $C_a^{\text{макс}}$ и $\log P$ [24]. Согласно схеме процесса восприятия и трансдукции гормонального сигнала в растительной клетке предполагается соот-

ветствие между физиологической активностью и сродством биорегулятора к рецептору [1]. Тогда в рамках этой гипотезы молекулярные параметры в исследованных рядах четвертичных аммониевых солей действительно могут служить мерой сродства или топохимического соответствия рецептору, если речь идет о сравнении по физиологической активности соединений, входящих в один и тот же кластер.

В работах [21, 24] выстроены канонические QSAR-профили трех групп носителей антигипбереллиновой активности. Еще раз обратим внимание на то, что простые бензиловые эфиры холина и N,N,N-триэтилхолина проявляют антигипбереллиновую активность на том же уровне, что и эталонный хлорхолинхлорид. В то же время благодаря наличию ауксиновой активности они обладают повышенной рострегулирующей и стресспротекторной эффективностью, увеличивают устойчивость посевов ряда технических и продовольственных культур к метеорологическим и фитопатогенным стрессам, существенно повышают их продуктивность [25–29] в сравнении с известными эталонами. Классический “QSAR” как метод многопараметрового корреляционного анализа по определению не обладает эвристичностью. На основе физико-химического QSAR-профиля одного вида активности (например, антигипбереллиновой) невозможно выявить ни нового качества соединений (в нашем случае сопутствующую ауксиновую активность четвертичных аммониевых солей, содержащих O-бензиловые фрагменты [9, 10]), ни синергизма согласованного действия этих видов активности на регуляторные системы целостного организма [10]. Для этого требуется проведение соответствующего биотестирования с выходом на новые обучающие выборки для компьютерных программ с последующим построением QSAR-профилей для новых видов физиологической активности. Новое качество физиологической активности и повышение технической эффективности достигаются введением в молекулу нового фрагмента-эффектора, обладающего активностью, которая дополняет имеющуюся и согласуется с ней. Напрашивается вывод о необходимости выявления всех существенных видов активности, присущих данному соединению и составляющих спектр его физиологической активности. Наиболее полно такой подход можно реализовать в автоматизированных системах биотестирования “*path through*”.

Качественно новым путем развития метода “QSAR” может стать субмолекулярное рассмотрение формирования физиологической активности молекулы как интеграла активности составляющих ее эффекторных фрагментов с учетом влияния тех фрагментов, которые определяют полярное и гидро-

фобное связывание с рецептором. При этом необходимо выявить виды активности, которые вносят отдельные фрагменты-эффекторы в спектр физиологической активности данной группы веществ, учесть роль ответственных за гидрофобное и полярное связывание молекулярных фрагментов в формировании активности данного вида, а также определить влияние отдельных фрагментов на молекулярные параметры соединений. Полученная таким образом картина соотношения структуры, молекулярных параметров и активности позволяет из отдельных хими-

ческих фрагментов конструировать молекулы с ожидаемыми свойствами по принципу конструктора "Lego". После экспериментального уточнения спектров физиологической активности полученных соединений можно будет классическими средствами метода "QSAR" определить структуры со свойствами, оптимальными для решения данной задачи. Физиология действия регуляторной системы, с которой связана задача, должна быть достаточно изучена. Таков возможный путь развития "QSAR" в плане приобретения им эвристичности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кулаева О.Н. // Физиол. раст. 1995. **42**. С. 661.
2. Venis M. Hormone Binding Sites in Plants. N.Y.; L., 1995.
3. Кулаева О.Н. ХЛТ Тимирязевское чтение. М., 1982.
4. Гафуров Р.Г., Зефирова Н.С. // Докл. РАН. 2004. **399**. С. 422.
5. Гафуров Р.Г. // Наука производству. 1999. № 8. С. 39.
6. Гафуров Р.Г. // Тез. докл. VI международной конференции "Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях". М., 2001. С. 87.
7. Гафуров Р.Г. // Тез. докл. XVII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Т. 4. Казань, 2003. С. 218.
8. Дерфлинг К. Гормоны растений. М., 1985.
9. Гафуров Р.Г., Махмутова А.А. // Докл. РАН. 2003. **391**. С. 562.
10. Гафуров Р.Г., Махмутова А.А. // Прикл. биохимия и микробиол. 2005. **41**. С. 243.
11. Гамбург К.З., Кулаева О.Н., Муромцев Г.С., Прусакова Л.Д., Чкаников Д.И. Регуляторы роста растений. М., 1979.
12. Кефели В.И., Чайлахян М.Х., Турецкая Р.Х. и др. // Физиол. раст. 1975. **22**. С. 1291.
13. Клесов А.А., Березин И.В. Ферментативный катализ. М., 1980.
14. Trebst A., Dräber W., Donner W. // Transactions of 10-th international congress of plant protection. Brighton. V.1. 1983. P. 209.
15. Marchington A.F. // Transactions of 10-th international congress of plant protection. Brighton. V.1. 1983. P. 201.
16. Мельников Н.Н., Мильштейн И.М. // Агрохимия. 1986. № 6. С. 115.
17. Огрель А.А., Звонкова Е.Н., Гафуров Р.Г. // Биоорган. химия. 1993. **19**. С. 880.
18. Огрель А.А., Звонкова Е.Н., Гафуров Р.Г. // Биоорган. химия. 1995. **21**. С. 590.
19. Мельников Н.Н. Пестициды. М., 1987.
20. Namura H., Yagy H., Iwata T., Tamura S. // Agr. Biol. Chem. 1974. **38**. P. 141.
21. Гафуров Р.Г., Григорьев В.Ю., Прошин А.Н., Чистяков В.Г., Мартынов И.В., Зефирова Н.С. // Докл. РАН. 2003. **394**. С. 710.
22. Mupomtsev G.S., Kokurin A.V. Abstr. 11-th Intern. Congr. on Plant Growth Reg. Subst. Aberthwyth. 1982.
23. Муромцев Г.С., Кокурин А.В. Методы определения некоторых регуляторов роста растений (методические рекомендации). М., 1983. С. 16.
24. Гафуров Р.Г., Григорьев В.Ю., Прошин А.Н., Чистяков В.Г., Мартынов И.В., Зефирова Н.С. // Биоорган. химия. 2004. **30**. С. 656.
25. Мухаметшин А.М., Исмагилов Р.Р. // Тез. докл. VI международной конференции "Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях". М., 2001. С. 262.
26. Платонова Н.А., Путищев А.Ф., Гафуров Р.Г. // Тез. докл. VI международной конференции "Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях". М., 2001. С. 116.
27. Гафуров Р.Г. // Хим. журнал. 2003. № 12. С. 32.
28. Тимейко Л.В. Дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2003.
29. Панина Н.В. Дис. ... канд. сельхоз. наук. Рамонь. Воронежская обл., 2004.

Поступила в редакцию 05.12.05

ROLE OF THE MOLECULAR STRUCTURE OF PHYTOREGULATORS IN PERCEPTION OF THE CHEMICAL SIGNAL BY RECEPTORS OF THE PLANT HORMONE SYSTEMS

R.G. Gafurov, N.S. Zefirov

(Division of Organic Chemistry)

A role of molecular structure phyto regulators in perception of the chemical signal by receptors of plant hormonal systems and character of conformity phyto regulator to a receptor are considered on a basis a) the mechanism of perception and transduction a hormonal signal in a vegetative cell and б) postulates of physiological paradigm on which authors base strategy of chemical design phyto regulators with the given properties. It is shown, that at regulatory interaction, as against interaction of enzymes with their substrata, it is essential not geometrical ("a key to the lock"), but topochemical conformity of a bioregulator to a receptor of a biotarget. Submolecular consideration of formation of physiological activity of a molecule as integral of activity making her(it) effector fragments in view of influence of those fragments which determined polar and hydrophobic linkage with a receptor, is offered as a possible way of development QSAR to purchase heuristicity.