

УДК 577.175.14

## ***N*<sup>6</sup>-(5-ФЕНИЛПЕНТАН-1-ИЛ)АДЕНИН – НОВЫЙ НЕКОНКУРЕНТНЫЙ РЕЦЕПТОРСPECИФИЧНЫЙ ANТИЦИТОКИНИН**

© 2024 г. А. А. Зенченко<sup>1,\*</sup>, Е. М. Савельева<sup>2</sup>, М. С. Дреничев<sup>1</sup>,  
Г. А. Романов<sup>2</sup>, В. Е. Ословский<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН С.Г. Георгиевой

Поступило 15.10.2023 г.

После доработки 17.11.2023 г.

Принято к публикации 17.11.2023 г.

Впервые был получен *N*<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденин – синтетическое производное аденина с рецепторспецифичным антицитокениновым действием. Данное соединение проявляет выраженный антицитокениновый эффект, снижая цитокенин-индуцированную экспрессию репортерного гена GUS, при взаимодействии с цитокениновым рецептором CRE1/АНК4 модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Гораздо слабее данный эффект проявляется с родственным рецептором АНК2 и не проявляется вовсе с рецептором АНК3. Мы показали, что *N*<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденин не связывается с лиганд-связывающими сайтами рецепторов цитокенинов арабидопсиса, что не позволяет отнести его к истинным цитокениновым антагонистам. Несмотря на пока неизученный механизм действия, данное соединение может найти своё применение в качестве компонента растительного регулятора роста. Как и истинные антицитокенины, оно усиливает рост корней проростков арабидопсиса, по-видимому, подавляя действие эндогенных цитокенинов на «корневой» рецептор CRE1/АНК4.

**Ключевые слова:** Цитокенины, антицитокенины, регуляторы роста растений, производное пурина

**DOI:** 10.31857/S2686738924010207, **EDN:** KGJSNF

Цитокенины – группа классических фитогормонов. Цитокениновая сигнальная система обнаружена практически у всех видов растений, в том числе у эволюционно древних [1]. Показано, что цитокенины влияют на множество процессов на протяжении всех этапов онтогенеза растений [2, 3]. Возможность управления этой системой открывает широкие перспективы для развития сельского хозяйства. Цитокенины положительно влияют на скорость роста побега, стимулируют развитие хлоропластов, задерживают старение листьев, повышают устойчивость растений к повреждающим факторам внешней среды [4]. Однако основной сложностью на пути масштабного использования цитокенинов в растениеводстве является их негативное действие на рост корня [5].

Локальные манипуляции с цитокениновым сигналингом, не связанные с генетическими мо-

дификациями растений, возможны за счёт использования растительных стимуляторов и регуляторов роста. В состав таких препаратов могут быть включены рецепторспецифичные антицитокенины, способные действовать орган- и тканеспецифично.

Рецепторы – ключевые белки, определяющие силу и направленность сигналинга гормонов, в том числе цитокенинов. В растениях рецепторы существуют в виде семейства белков, члены которого обладают разной лигандной специфичностью и разной преимущественной локализацией в органах и тканях [6]. Селективное подавление работы «корневых» цитокениновых рецепторов (CRE1/АНК4 у арабидопсиса [7]) с помощью антицитокенинов способно стимулировать рост корней [8], потенциально не влияя на стимулирующую активность цитокенинов в наземных частях растений.

В немногочисленных публикациях, сообщающих об обнаружении соединений с антицитокениновым эффектом, были описаны либо основания-антагонисты [8, 9], либо соединения более сложного строения, не имеющие высокого сродства к лиганд-связывающему сайту цитокениновых рецепторов [10–12]. В данной работе нами получен *N*<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденин – новое *N*<sup>6</sup>-заме-

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии наук, Москва, Россия

\*E-mail: kolomatchenkoa@yandex.ru

шенное производное аденина с антицитокининовым действием по отношению к рецептору CRE1/АНК4. Данное соединение является структурным аналогом природного цитокинина *N*<sup>6</sup>-бензиладенина (БА) и характеризуется наличием гидрофобного заместителя, содержащего длинный пятичленный алифатический линкер, соединяющий фенильный остаток с аминогруппой в *N*<sup>6</sup>-положении аденина. Однако в отличие от уже известных антицитокининов-оснований полученное соединение не является истинным цитокининовым антагонистом.

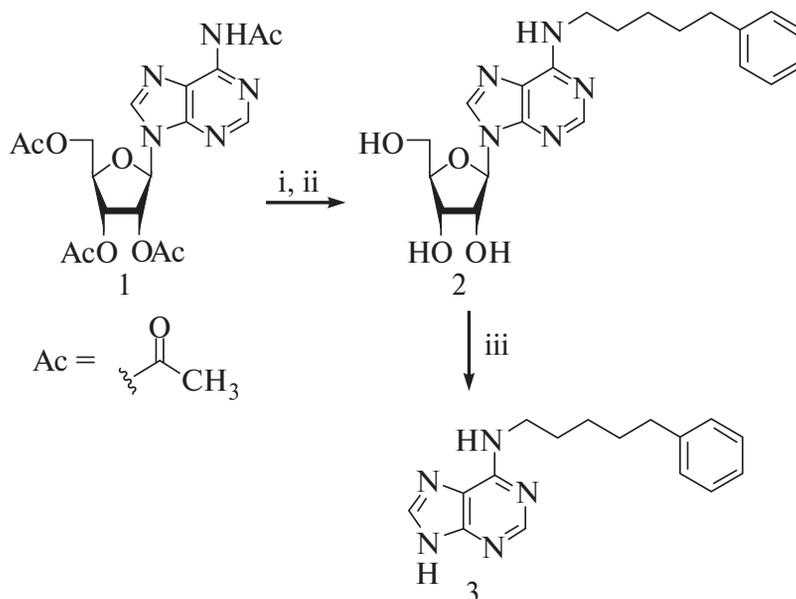
*N*<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденин был получен с использованием метода региоселективного алкилирования *N*<sup>6</sup>-ацетил-2',3',5'-три-*O*-ацетиладенозина (**1**) в условиях реакции Мицунобу с последующим деблокированием в основных условиях с получением нуклеозидного производного *N*<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденозина (**2**), который далее подвергали кислотному гидролизу *N*-гликозидной связи с получением целевого *N*<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденина (**3**) (рис. 1). Структура полученного соединения была подтверждена данными ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS).

Цитокининовая и антицитокининовая активность полученного *N*<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденина **3** была исследована в тест-системе на основе проростков *Arabidopsis thaliana*. Тестирование проводили с использованием двойных инсерционных мутантов по рецепторам цитокининов, у которых в каждом мутантном клоне активен только один из

трех рецепторов (АНК2, АНК3 или CRE1/АНК4). Все используемые растения трансформированы геном *GUS*, который поставлен под контроль промотора гена первичного ответа на цитокинины *ARR5*.

Цитокининовую активность соединения **3** определяли в физиологической концентрации 10<sup>-6</sup> М по уровню *GUS*-активности, отражающей интенсивность экспрессии конструкции *Parr5: GUS* [13], и рассчитывали в процентах от активности природного цитокинина БА в той же концентрации. Из всех полученных значений предварительно вычитали уровень *GUS*-активности, индуцированной эндогенными цитокининами. В результате было показано, что данное соединение не проявляет выраженной фитогормональной активности ни для одного из рецепторов цитокининов арабидопсиса.

Для проверки наличия и силы антицитокининовой активности испытывали способность соединения **3** подавлять физиологическое действие БА. При проведении биотеста на проростках мутантного арабидопсиса, экспрессирующего единственный рецептор CRE1/АНК4, было показано, что **3** достоверно ингибирует действие БА при их совместном добавлении к проросткам. При этом антицитокининовый эффект **3** зависит от его соотношения с цитокинином. При концентрации, превышающей концентрацию БА в 500 раз, *N*<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденин подавляет активацию рецептора CRE1/АНК4 цитокинином на ~92%, тогда как при более низких соотношениях эффект выражен слабее или отсутствует (рис. 2). На проростках, экс-



**Рис. 1.** Синтез *N*<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденина. Реагенты и условия: i. R-OH, Ph<sub>3</sub>P, DIAD, THF, 20 °C, 48 ч; ii. 5M PrNH<sub>2</sub>/MeOH, 20 °C, 24 ч; iii. HCl, 100 °C, 3 ч.

прессурирующих единственный рецептор АНК2, антицитокениновый эффект **3** был зафиксирован при разнице концентраций в 500 раз и составил менее 30%. При разнице концентраций в 100 раз и менее подавление действия БА для рецептора АНК2 не наблюдается. В отношении рецептора АНК3 N<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденин не проявляет антицитокенинового эффекта.

Способность N<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденина **3** непосредственно взаимодействовать с лиганд-связывающими сайтами цитокениновых рецепторов арабидопсиса было проверено радиолигандным методом с использованием растительных мембран из транзигентно трансформированных растений *Nicotiana benthamiana* [14]. Было показано, что исследуемое соединение не обладает сколько-нибудь значимой афинностью к сайтам связывания цитокенинов указанных белков и, соответственно, не может считаться истинным цитокениновым антагонистом.

Мы проверили действие N<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденина **3** на корнеобразование растений арабидопсиса *Colombia-0* в условиях *in vitro*. Растения были введены в стерильную культуру на стадии семян и проращивались в воде до возраста 4 дней. После этого они были перемещены на вертикальные чашки Петри с агаризованной средой MS (½ по макросолям). Добавление в среду соединения **3** в концентрации 10 μM достоверно приводило (на 5-й день проращивания) к увеличению средней длины главных корней на 9% по сравнению со средой без добавок.

Таким образом, N<sup>6</sup>-(5-фенилпентан-1-ил)аденин является, по всей видимости, антицитокенином, специфично взаимодействующим пока неизвестным способом с рецептором CRE1/АНК4; это взаимодействие напоминает аллостерическую регуляцию активности ферментов. В перспективе, обнаруженное соединение может быть использовано в качестве регулятора роста растений в сельском хозяйстве.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

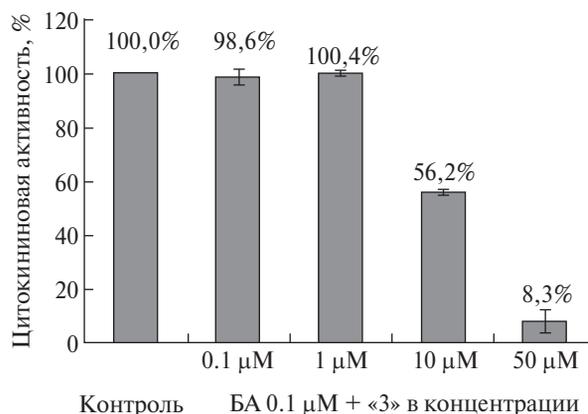
Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-24-00527. Выражаем благодарность Министерству науки и высшего образования Российской Федерации (темы № 0103-2019-0004 и № 122042700043-9).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.



**Рис. 2.** Действие различных концентраций соединения **3** на интенсивность экспрессии конструкции *Parr5: GUS*, активируемой БА (0.1 μM), при взаимодействии с рецептором CRE1/АНК4. Контроль – действие БА 0.1 μM на тот же рецептор.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Spíchal L.* Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules // *Funct. Plant Biol.* 2012. Vol. 39. P. 267–84.
2. *Werner T., Schmülling T.* Cytokinin action in plant development // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009. Vol. 12. P. 527–538.
3. *Gruhn N., Heyl A.* Updates on the model and the evolution of cytokinin signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2013. Vol. 16. P. 569–574.
4. *Kieber J.J., Schaller G.E.* Cytokinins // *Arabidopsis Book*, 2014. Vol. 12. P. e0168.
5. *Schaller G.E., Bishopp A., Kieber J.J.* The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development // *Plant Cell*. 2015. Vol. 27. P. 44.
6. *Higuchi M., Pischke M.S., Mähönen A.P., et al.* In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. Vol. 101. P. 8821–8826.
7. *Riefler M., Novak O., Strnad M., et al.* Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism // *Plant Cell*. 2006. Vol. 18. P. 40.
8. *Spíchal L., Werner T., Popa I., et al.* The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition // *FEBS J.* 2009. Vol. 276. P. 244–53.
9. *Nisler J., Zatloukal M., Popa I., et al.* Cytokinin receptor antagonists derived from 6-benzylaminopurine // *Phytochem.* 2010. Vol. 71 (7). P. 823–30.
10. *Arata Y., Nagasawa-Iida A., Uneme H., et al.* The phenylquinazoline compound S-4893 is a non-competitive cytokinin antagonist that targets Arabidopsis cytokinin receptor CRE1 and promotes root growth in Arabidopsis and rice // *Plant Cell Physiol.* 2010. Vol. 51 (12). P. 2047–2059.
11. *Krivosheev D.M., Kolyachkina S.V., Mikhailov S.N., et al.* N<sup>6</sup>(Benzyloxymethyl)adenosine is a novel anticytokinin

- kinin, an antagonist of cytokinin receptor CRE1/AHK4 of *Arabidopsis* // Doklady Biochem. Biophys. 2012. Vol. 444. P. 178–181.
12. Savelieva E. M., Zenchenko A. A., Drenichev M. S., et al. In planta, in vitro and in silico studies of chiral N<sup>6</sup>-benzyladenine derivatives: discovery of receptor-specific S-enantiomers with cytokinin or anticytokinin activities // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23 (19). P. 11334.
13. Zvereva S. D., Romanov G. A. Reporter genes for plant genetic engineering: characteristics and detection // Russ. J. Plant Physiol. 2000. Vol. 47. P. 424–432.
14. Savelieva E. M., Lomin S. N., Romanov G. A. A modified method for quantification of cytokinin-receptor binding using isolated plant microsomes enriched with cognate transmembrane receptors // Russ. J. Plant Physiol. 2022. Vol. 69. P. 6.

## **N<sup>6</sup>-(5-PHENYLPENTAN-1-YL)ADENINE – A NEW NON-COMPETITIVE RECEPTOR-SPECIFIC ANTI-CYTOKININ**

**A. A. Zenchenko<sup>a, #</sup>, E. M. Savelieva<sup>b</sup>, M. S. Drenichev<sup>a</sup>,  
G. A. Romanov<sup>b</sup>, V. E. Oslovsky<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup>Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>E-mail: kolomatchenkoa@yandex.ru

Presented by Academician of the RAS S.G. Georgieva

For the first time, N<sup>6</sup>-(5-phenylpentan-1-yl)adenine, a synthetic adenine derivative with a receptor-specific anticytokinin effect, was obtained. This compound exhibits a pronounced anticytokinin effect, reducing cytokinin-induced expression of the *GUS* reporter gene, when interacting with the cytokinin receptor CRE1/AHK4 of the model plant *Arabidopsis thaliana*. This effect manifests itself much weaker with the related AHK2 receptor and is not observed at all with the AHK3 receptor. We have shown that N<sup>6</sup>-(5-phenylpentan-1-yl)adenine does not bind to the ligand-binding sites of the *Arabidopsis* cytokinin receptors, which does not allow it to be classified as a true cytokinin antagonist. Despite the currently unknown mechanism of action, this compound may find its use as a component of plant growth regulators. Like true anticytokinins, it enhances root growth of *Arabidopsis* seedlings, apparently suppressing the action of endogenous cytokinins on the “root” receptor CRE1/AHK4.

**Keywords:** Cytokinins, anticytokinins, plant growth regulators, purine derivative