

СКРИНІНГ НІТРОАНІЛІНІВ НА СПОРІДНЕНІСТЬ ДО α -ТУБУЛІНУ МІСКАНТУСУ ДЛЯ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ У ПОЛІПЛОЇДИЗАЦІЇ РОСЛИН ЦЬОГО РОДУ

Міскантус гігантський (*Miscanthus × giganteus*) посідає одне із чільних місць серед перспективних видів біоенергетичних рослин [1]. Проте цікавим є той факт, що у зв'язку з нефертильністю цього гібриду лише один вегетативно розмножений його генотип представлений у всіх комерційних насадженнях [2]. Звичайно, для забезпечення генетичного різноманіття, зокрема у випадку стерильного міскантуса гігантського, поліплоїдизація є незамінним методом одержання нових популяцій рослин цього виду. Відомо, що у більшості випадків поліплоїдні рослини мають перевагу над вихідними формами за показниками розміру клітин та більшої біомаси рослин і, як наслідок, більш високого потенціалу врожайності порівняно з диплоїдними аналогами [3, 4]. Подвоєння хромосом та одержання тетраплоїдів, фертильних амфідиплоїдів або гексаплоїдів успішно було застосовано як для міскантуса [5–9], так і для близьких до нього видів [10].

Раніше було продемонстровано, що обробка рослинних тканин сполуками динітроанілінового ряду призводить до більш ефективної поліплоїдизації клітин, ніж обробка колхіцином. Оскільки спорідненість колхіцину, як і близьких до нього сполук, до тубуліну рослин дуже низька, використання динітроанілінів набуває все більш широкого поширення як сполук, здатних ефективно деполімеризувати мікротрубочки, блокуючи утворення веретена поділу клітин [11]. Оризалін та трифлуралін – найбільш вживані сполуки динітроанілінового ряду – набули поширення як досходові гербіциди, механізм дії яких базується на деполімеризації мікротрубочок клітини, що в кінцевому результаті пригнічує розвиток кореневої системи рослин.

За науковимілітературними даними, під час проведення поліплоїдизації *M. giganteus* в умовах *in vitro* ефективність оризаліну є вищою в порівнянні з колхіцином. Проте застосування ориза-

ліну призводить до зменшення кількості регенерантів поліплоїдних рослин порівняно з дослідями із використанням колхіцину за рахунок його високої фітотоксичності [9]. Схожі результати одержані під час отримання поліплоїдів інших видів злаків [12]. Все це знижує ефективність використання класичних динітроанілінових сполук з метою отримання поліплоїдних рослин. З іншого боку, за результатами наших попередніх досліджень було відібрано низки сполук динітроанілінового ряду, які мали значно нижчий рівень фітотоксичності, але істотно не поступалися таким класичним сполукам, як оризалін та трифлуралін, за здатністю блокувати процеси полімеризації тубуліну [13, 14]. Крім того, накопичений нами досвід використання методів *in silico* дозволяє провести масовий скринінг низькомолекулярних сполук на їх спорідненість до α -тубуліну з конкретного організму, а саме з міскантуса, для відбору найбільш перспективних сполук для подальшого проведення поліплоїдизації в умовах *in vitro*, що і стало метою цієї роботи.

Матеріали і методи

Для дослідження були використані похідні нітроанілінів, синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України. Пошук послідовностей α -тубулінів із різних видів *Miscanthus* здійснювали за допомогою *on line* інструментів у банку амінокислотних послідовностей білків UniProt (www.expasy.org).

Реконструкцію просторової структури молекул α -тубулінів здійснювали за методом *in silico* (моделювання за гомологією) [15]. Пошук та підбір матричних структур здійснювали у базі даних RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). Оптимізацію геометрії побудованих промоделей здійснювали шляхом мінімізації енергії згідно з методом L-BFGS. Верифікацію якості

промоделей здійснювали за допомогою сервісу MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu>).

Докування досліджуваних сполук на поверхню молекули α -тубуліну проводили з використанням програмного пакету CCDC GOLD (<http://www.ccdc.cam.ac.uk>). Як потенційний сайт зв'язування було відмічено область на поверхні молекули α -тубуліну радіусом 10 Å з центром на атомі кисню O залишку Val250. Відбір найбільш перспективних сполук та їх конформаційних положень на поверхні білка здійснювали на підставі оціночних балів за показниками GoldScore та ChemScore.

Результати та обговорення

У результаті проведених досліджень було здійснено реконструкцію та верифікацію просторової структури молекул α -тубуліну з міскантусу. Для цього проводили пошук у базах даних UniProt відомих амінокислотних послідовностей цього білка з різних видів *Miscanthus* з подальшим їх аналізом за допомогою *on line* інструмен-

тів. За результатами пошуку було відібрано 14 послідовностей α -тубуліну з *Miscanthus*, в тому числі 6 з *Miscanthus sinensis*. Для подальшої роботи використовували послідовність α -тубуліну з *Miscanthus sinensis* (Q70ZL7). Реконструкцію просторової структури відібраного білка здійснювали за допомогою методу гомологічного (профільного) моделювання. В результаті нами були отримані 5 промоделей просторової структури молекул α -тубуліну. Їх оцінка із використанням *on line* сервісу MolProbity показала достатній рівень якості отриманих промоделей. Для подальшої роботи нами була відібрана одна з моделей, яка мала найкращі показники якості.

Докування досліджуваних нітроанілінів на поверхню реконструйованої молекули α -тубуліну з *Miscanthus sinensis* (Q70ZL7) проводили в області, яка включала раніше описаний сайт взаємодії нітроанілінових сполук з α -тубуліном *Eleusine indica* [16]. Потенційний сайт їх зв'язування знаходиться на поверхні білкової глобули в зоні між-димерного контакту та включає Met1, Arg2, Phe4,

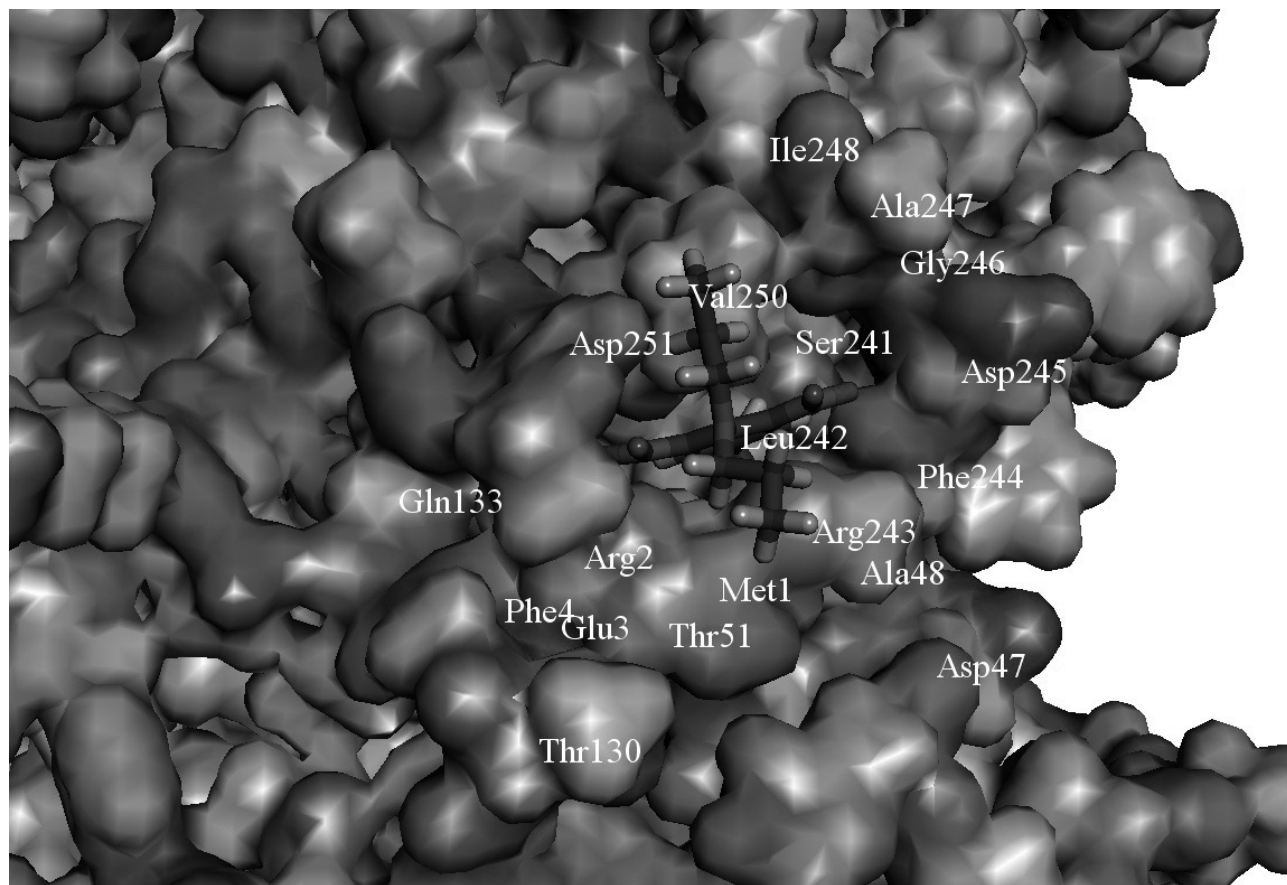
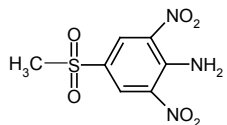
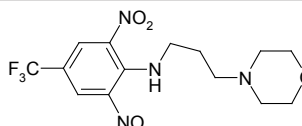
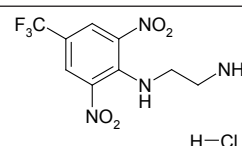
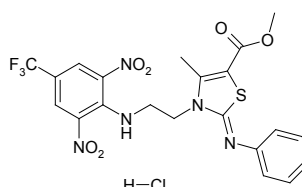


Рис. Положення трифлюораліну на поверхні α -тубуліну з *Miscanthus sinensis* у потенційному сайті зв'язування за результатами докину із використанням CCDC GOLD

Перелік найбільш перспективних сполук для поліплоїдизації рослин роду *Miscanthus* в умовах *in vitro*

Назва	Хімічна назва	Формула	
BR-37	4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін	$C_7H_7N_3SO_6$	
BR-44	N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметил-феніл]пропіл) морфолін	$C_{14}H_{17}O_5N_4F_3$	
CNA 017	N'1'-(2,6-Дінітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид	$C_9H_{10}ClF_3N_4O_4$	
CNA 033	1-{3-[2-(2,6-Дінітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид	$C_{21}H_{19}ClF_3N_5O_5S$	

Asp47, Ala48, Thr51, Thr130, **Gln133**, Ser241, Leu242, **Arg243**, Phe244, Asp245, Gly246, Ala247, Pe248, Val250, **Asp251** і **Val252**. Виділені жирним амінокислотні залишки співпадають зі згаданим вище сайтом. Результати дослідження виявили високу ймовірність утворення ліганд-білкового комплексу, як показано на рис. Більш детальний аналіз потенційного сайту взаємодії досліджуваних сполук з α -тубуліном *Miscanthus sinensis* буде можливим після проведення аналізу їх зв'язування за результатами обрахунку довготривалої молекулярної динаміки ліганд-білкового комплексу.

На підставі оціночних балів за такими показниками, як GoldScore та ChemScore, за результатами експериментів нами було відібрано 4 найбільш перспективні сполуки для подальшого використання з метою отримання поліплоїдів (табл.): 4 – метилсульфоніл–2,6–динітроанілін (Br-37); N'-(N''-[2,6–динітро–4 – трифторметилфеніл] пропіл) морфолін (Br-44); N'1'-(2,6-динітро-4-трифторметилфеніл)-етилен-1,2-діамінгідрохлорид (CAN 017); 1-{3-[2-(2,6–динітро–4–трифторметил–феніламіно)–етил]–4–метил–2–феніламіно–2,3–дигідротіазол–5–іл}-етанон гідрохлорид (CAN 033).

За науковими літературними даними, застосування оризаліну для індукування процесів поліплоїдизації рослин *Miscanthus × giganteus* в умовах

in vitro є більш ефективним, ніж використання колхіцину. Проте кількість рослин-регенерантів при цьому знижується за рахунок високої фітотоксичності цієї сполуки. Так, під час застосування колхіцину відсоток регенерантів після обробки складає 8,9 %, а оризаліну – 6 % [9]. Схожі результати були отримані також у дослідях із поліплоїдизації рослин кукурудзи, де застосування оризаліну зумовлювало зниження регенеративної здатності калюсу порівняно із варіантами, які обробляли колхіцином [12]. У той же час, у ході проведення досліджень гербіцидної активності нітроанілінових сполук було показано, що деякі з них мають нижчий токсичний вплив на рослини, поступаючись при цьому в незначній мірі за антимікротрубочковою активністю таким класичним представникам згаданого вище класу сполук, як трифлуралін та оризалін [13].

Наразі триває дослідження з отримання поліплоїдних рослин родини *Miscanthus* в умовах *in vitro* із використанням як класичних (оризалін та трифлуралін), так і відібраних нових перспективних сполук нітроанілінового ряду.

Висновки

Здійснено реконструкцію та верифікацію просторової структури молекули α -тубуліну міскантусу. Проведено оцінку здатності нових та класичних сполук динітроанілінового класу

утворювати ліганд-білковий комплекс з α -тубуліном *M. sinensis* (Q70ZL7). Відібрано 4 найбільш перспективні нові динітроанілінові сполуки для подальшого використання у дослідках із поліплоїдизації рослин родини *Miscanthus*, а саме 4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін; N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметилфеніл]пропіл)морфолін; N'1'-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамінгідрохлорид; 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-

метил-2-феніламіно-2,3-дигідротіазол-5-іл}-етанонгідрохлорид.

Робота була виконана в рамках проекту «Створення нових високоврожайних ліній міскантусу як сировини для біоетанолу шляхом отримання поліплоїдів» цільової комплексної науково-технічної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії» (№ держреєстрації 011U004719).

ЛІТЕРАТУРА

1. Clifton-Brown J., Chiang Y.-C., Hodkinson T.R. *Miscanthus*: Genetic resources and breeding potential to enhance bioenergy production // Genetic improvement of bioenergy crops / Vermis W. (ed). – Springer: New York, 2008. – P. 273–294.
2. Clifton-Brown J.C., Lewandowski I. Performance of 15 *Miscanthus* genotypes at five sites in Europe // *Agronomy J.* – 2001. – 93. – P. 1013–1019.
3. Mitrofanova I.V., Zilberverg I.R., Yemets A.I., Mitrofanova O.V., Blume Ya.B. The effect of dinitroaniline and phosphorothioamide herbicides on polyploidization *in vitro* of *Nepeta* plants // *Cell Biol. Int.* – 2003. – 27, № 3. – P. 229–231.
4. Birchler J.A., Auger D.L., Riddle N.C. In search of the molecular basis of heterosis // *Plant Cell.* – 2003. – 15. – P. 2236–2239.
5. Głowacka K., Jeżowski S. Genetic and nongenetic factors influencing callus induction in *Miscanthus sinensis* (Anderss.) anther cultures // *J. Appl. Genet.* – 2009. – 50. – P. 341–345.
6. Jain S.M., Gupta S.D. *Biotechnology of Neglected and Underutilized Crops* / Gupta S.D. (eds.). – Springer Science+Business Media Dordrecht, 2013. – 247 p.
7. Petersen K.K., Hagberg P., Kristiansen K. *In vitro* chromosome doubling of *Miscanthus sinensis* // *Plant Breed.* – 2002. – 121. – P. 445–450.
8. Petersen K.K., Hagberg P., Kristiansen K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis* // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2003. – 73. – P. 137–146.
9. Yu C.Y., Kim H.S., Burn A.L., Widholm J.M., John A.J. Chromosome doubling of the bioenergy crop, *Miscanthus* \times *giganteus* // *Global Change Biology Bioenergy* 1. – 2009. – P. 404–412.
10. Thomas H. Chromosome manipulation and polyploidy // *Plant Breeding: Principals and Prospects* / Hayward M., Bosemark N., Romagosa I. (eds). – London: Chapman and Hall, 1993. – P. 79–92.
11. Yemets A.I., Blume Ya.B. Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs // *The Open Horticulture J.* – 2008. – 1. – P. 15–20.
12. Wan Y., Ducan D.R., Rayburn A.L., Widholm J.M. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther culture derived maize callus // *Theor. Appl. Genetics.* – 1991. – 81. – P. 205–211.
13. Ожередов С.П., Емец А.И., Брицун В.Н., Ожередова И.П., Лозинский М.О., Блюм Я.Б. Скрининг новых производных 2,4- и 2,6-динитроанилинов на фитотоксичность и антимитотическую активность // *Цитология и генетика.* – 2009. – 43, № 5. – С. 3–13.
14. Ожередов С.П., Емец А.И., Брицун В.Н., Лозинский М.О., Швартау В.В., Блюм Я.Б. Повышение эффективности гербицидов – ингибиторов ацетил КоА карбоксилазы при использовании их в композиции с новыми производными динитроанилинов // *Физиология и биохимия культур. растений.* – 2011. – 43, № 2. – С. 96–102.
15. Venselaar H., Krieger E., Vriend G. Homology modeling. // *Structural Bioinformatics. Second Edition* / Bourne P.E., Weissig H. (eds.) – John Wiley & Sons. – Hoboken NJ. – 2009. – P. 715–732.
16. Ныпорко А.Ю., Емец А.И., Брицун В.Н., Лозинский М.О., Блюм Я.Б. Структурно-биологическая характеристика взаимодействия тубулина с динитроанилинами // *Цитология и генетика.* – 2009. – 43, № 4. – С. 56–69.

MELNYCHUK O.V.¹, OZHEREDOV S.P.¹, RAKHMETOV D.B.², YEMETS A.I.¹, BLUME YA.B.¹

¹ *Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: ozheredov@gmail.com*

² *M.M. Gryshko National Botanic Garden Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 01014, Kyiv, Tymiryazevska str., 1*

SCREENING OF NITROANILINES FOR THEIR AFFINITY TO MISCANTHUS α -TUBULIN FOR FURTHER *IN VITRO* POLYPLOIDIZATION OF *MISCANTHUS* SPECIES

Aim. Biofuel is one of the most prominent directions in contemporary energy technologies. In many cases polyploids are superior to their original forms. Creation of polyploids of *Miscanthus* species may allow obtaining of great amount of high

quality biomass. Wide range of antimetabolic agents can be used to block formation of spindle fiber during cell division. However, most of them are highly toxic for plant cells. Dinitroanilines are known to be highly efficient in preventing of microtubules to be assembled. The aim of the study was to screen wide range of nitroanilines for their affinity to miscanthus α -tubulin and, thus, to identify the most promising to be applied in polyploidization of miscanthus species. **Methods.** Derivatives of nitro- and dinitroanilines have been used in the study. Online tools have been applied to find sequences of miscanthus α -tubulins with the aid of database of protein sequences UniProt. Reconstruction of spatial structure of miscanthus α -tubulin has been done *in silico* by modelling based on homology. Matrix structures have been obtained from data base RCSB Protein Data Bank. The results have been verified with the aid of service MolProbity. Binding of dinitroanilines to α -tubulin molecules has been analyzed with the aid of CCDC GOLD software. **Results.** Protein sequence of *Miscanthus sinensis* α -tubulin (Q70ZL7) has been chosen from 14 found and used in the study. Spatial structure of the molecule has been reconstructed and verified. Two nitroanilines docking sites have been identified and analyzed on the surface of the α -tubulin molecule. Several compounds have been determined to be the most efficient to form ligand-protein complex with α -tubulin (Q70ZL7) based on GoldScore and ChemScore estimation. **Conclusions.** Reconstruction and verification of spatial structure of miscanthus α -tubulin molecule have been conducted. Ability of both new and classic dinitroanilines to form ligand-protein complex with α -tubulin of miscanthus has been evaluated. Four compounds were found to be the most promising for further research on *in vitro* polyploidization of miscanthus species. **Keywords:** nitroanilines, α -tubulin, docking sites, polyploidization, *Miscanthus* spp.