

А.Ю. НЫПОРКО<sup>1,2</sup>, А.И. ЕМЕЦ<sup>2</sup>, В.Н. БРЫЦУН<sup>3</sup>,  
М.О. ЛОЗИНСКИЙ<sup>3</sup>, Я.Б. БЛЮМ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт пищевой биотехнологии и гномики НАН Украины, Киев

<sup>2</sup> Институт клеточной биологии и генетической инженерии  
НАН Украины, Киев

<sup>3</sup> Институт органической химии НАН Украины, Киев

E-mail: dfnalex@gmail.com

## СТРУКТУРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТУБУЛИНА С ДИНИТРОАНИЛИНАМИ



*Взаимодействие динитроанилиновых соединений с молекулами тубулина характеризуется чрезвычайно высокой избирательностью – эти вещества эффективно связываются с тубулинами растительного, а также протозойного происхождения и практически не взаимодействуют с тубулинами животных и грибов, несмотря на чрезвычайно высокий уровень сходства их последовательностей. Структурные особенности и механизмы этого взаимодействия обобщены и детально проанализированы в настоящем исследовании, в частности охарактеризованы закономерности структуры и расположения сайтов связывания динитроанилинов на поверхности разных субъединиц тубулина и тубулинов разного происхождения. Сайты связывания динитроанилинов располагаются на поверхностях продольных контактов между субъединицами тубулина, содержат остатки диаминовых аминокислот (лизина либо аргинина), связывающих нитрильную группу динитроанилинов. Локализация сайтов на поверхности одинаковых субъединиц различного происхождения (например,  $\alpha$ -тубулинов растений и простейших) совпадает, однако расположение сайтов связывания на поверхности  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц тубулина является различным. Охарактеризованные сайты потенциально могут быть местами связывания и других антимикротрубочковых соединений, в частности цианоакрилатов.*

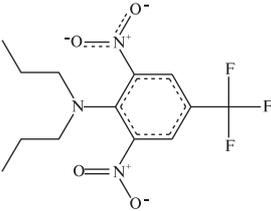
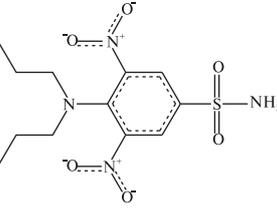
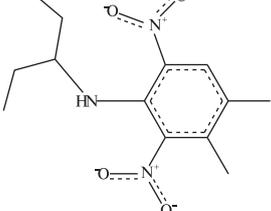
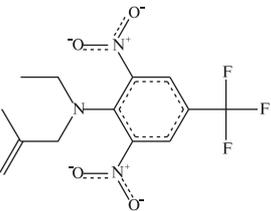
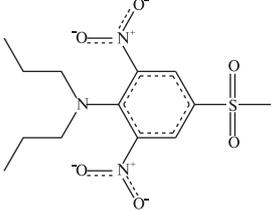
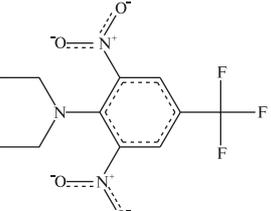
© А.Ю. НЫПОРКО, А.И. ЕМЕЦ, В.Н. БРЫЦУН,  
М.О. ЛОЗИНСКИЙ, Я.Б. БЛЮМ, 2009

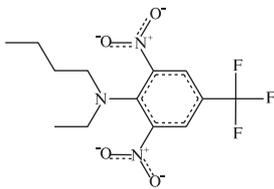
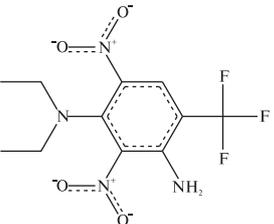
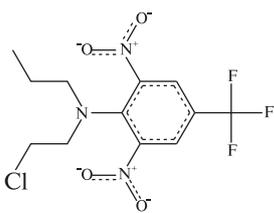
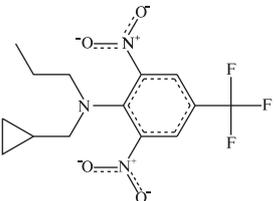
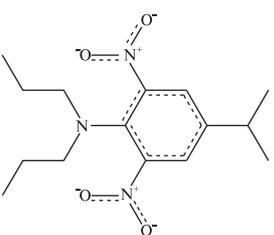
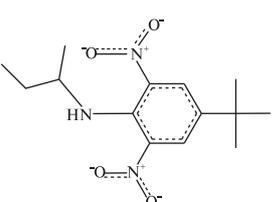
### Особенности структуры динитроанилиновых соединений

Соединения динитроанилиновой природы, в частности производные 2,6-динитроанилина, получили широкое распространение в сельскохозяйственной практике благодаря своим гербицидным свойствам [1, 2]. Они также известны как эффективные антипротозойные агенты [2]. Как правило, гербициды динитроанилинового ряда имеют заместители в положении 4 бензольного кольца. В качестве таких заместителей обычно выступают трифторметильная группа (у таких производных 2,6-динитроанилинов, как трифлуралин, эталфлуралин, нитрофор, динитрамин, флухлоралин, профлуралин) либо алкильная, нитрильная, алкоксильная, сульфидная, сульфонильная и сульфоксидная группы. Кроме того, аминогруппа в положении 1 бензольного кольца динитроанилинов, как правило, также несет группы-заместители. В качестве таких заместителей выступают углеводородные цепи различной длины и разветвленности, к которым, в свою очередь, могут присоединяться атомы галогенов, гомо- и гетероциклы и др. Кроме того, некоторые гербициды могут также содержать группы-заместители в положении 3 и 5 бензольного кольца, в качестве которых обычно выступают атомы галогенов (хлор либо бром), нитрильные и аминогруппы. Структурные формулы и сельскохозяйственное назначение ряда наиболее употребляемых гербицидов приведены в табл. 1.

Пространственная структура 2,6-динитроанилинов характеризуется рядом общих закономерностей. Геометрия их общего участка, который включает в себя бензольное кольцо, остаток аминогруппы в положении 1 и две нитрильные группы в положениях 2 и 6, имеет весьма сходный характер. Смещение электронной плотности в стороны атомов кислорода на нитрильных группах приводит к возникновению у каждого из рассматриваемых соединений двух областей с ярко выраженным отрицательным электростатическим потенциалом (рис. 1, см. вклейку в конце номера). Однако ориентация нитрильных групп относительно бензольного кольца, возникающая как результат поворота относительно соответствующих C-N связей, варьирует (табл. 2), причем по характеру этой ориентации наблюдается четкое разделение гербицидов на два подкласса. Гербициды с асимметричными за-

Наиболее используемые гербициды динитроанилинового ряда

Гербицид	Синонимы	Структурная формула	Химическое название	Основное применение
Трифлоралин	Трефлан, агрефлан, кри- салин, трифлюрекс, нитран трефаноцид, ди- гермин, эланколан		2,6-динитро-4-(три- фторметил)-N,N-ди- пропиланилин	Для борьбы с сорняка- ми в посевах хлопчат- ника, в овощных куль- турах (1–2 кг/га)
Оризалин	Сурфлан, диримал, ри- целан, рицелон, динит- ропил, сулфаниламида		4-аминсульфонил- 2,4-динитро-N,N-ди- пропиланилин	Для борьбы с сорня- ками в посевах сои, рапса, картофеля (1– 2 кг/га)
Пендимета- лин	Пеноксалин, тендимета- лин, феноксалин, герба- докс, аккотаб, пеноксин, сипаксол проул, стомп, вэйап, гоугоусан		3,4-диметил-2,6-ди- нитро-N-(пентил-3) анилин	Предпосевной и пред- всходовый гербицид для борьбы с сорняка- ми в посевах хлопчат- ника (1–2 кг/га)
Эталфлора- лин	Соналан, бувилан эдж лин		N-(2-метилпропе- нил-2)-2,6-динитро- 4-(трифторметил)- N,N-этиланилин	Для борьбы с сорня- ками в хлопчатнике и сое (0,75–1,25 кг/га )
Нитралин	Планавин, ниралин, пла- нуин		4-метилсульфонил- 2,6-динитро-N,N- дипропиланилин	Для борьбы с сорняка- ми в посевах хлопчат- ника, томатов, капу- сты, сои (0,5–1 кг/га)
Нитрофор	—		2,6-динитро-4- (трифторметил)- N,N-диэтиланилин	Для борьбы с сорня- ками в посевах капу- сты, томатов, хлопчат- ника (3–6 кг/га)

Гербицид	Синонимы	Структурная формула	Химическое название	Основное применение
Бенфлюоралин	Бенефин, бетродин, банафин, карпидор, флуба-лекс, беналан, бенефекс, бинел, боналан, балфин, блулан, эмблем, куалин, балан		N-бутил-2,6-динитро-4-(трифторметил)-N,N-этиланилин	Предвсходовый гербицид для борьбы с сорняками в посевах люцерны и табака (1–1,5 кг/га)
Динитрамин	Кобекс		3-амино-2,6-динитро-4-(трифторметил)-N,N-диэтиланилин	Предпосевной гербицид для борьбы с сорняками в посевах хлопчатника, сои, подсолнечника и др. (0,35–0,75 кг/га)
Флухлоралин	Базалин		2,6-динитро-N-пропил-4-(трифторметил)-N-(2-хлорэтил)анилин	Для борьбы с сорняками в посевах хлопчатника и сое (0,5–1,5 кг/га)
Профлюоралин	Прегард, толбанлин		2,6-динитро-N-пропил-4-(трифторметил)-N-(циклопропил)анилин	Для борьбы с сорняками в посевах хлопчатника, сои, подсолнечника и др. (0,75–1,5 кг/га)
Изопропалин	Паарлан		4-изопропил-2,6-динитро-N,N-дипропиланилин	Предвсходовый гербицид для борьбы с сорняками в посевах томатов, перца, картофеля и бобовых (1,1–2,3 кг/га)
Бутралин	Дибуталин, рутралин, зитсаосол, буталин, тамекс, нокраб, амекс		N-(бутил-2)-4-трет-бутил-2,6-динитроанилин	Предвсходовый гербицид для борьбы с сорняками в посевах сои и хлопчатника (0,75–1,5 кг/га)

местителями при аминогруппе (пендиметалин, эталфлюоралин, бенфлюоралин, профлюоралин, бутралин) характеризуются дифференцированными углами разворота нитрильных групп — разность между ними составляет от 7,5° (профлюоралин) до 42° (эталфлюоралин). Гербициды с симметричными заместителями (трифлюоралин, оризалин, нитралин, нитрофор, динитрамин, флухлоралин), напротив, характеризуются сходной либо идентичной ориентацией обеих NO<sub>2</sub>-групп — величина отклонения не превышает 4°, а в случае нитрофора поворот групп относительно соответствующих C–N-связей оказывается идентичным. В то же время величины зарядов на атомах кислорода в нитрильных группах практически идентичны для всех гербицидов — их колебание не превышает 0,06.

**Динитроанилины — соединения с антимикротрубочковым механизмом активности**

Понимание особенностей структуры динитроанилиновых соединений является важным фактором понимания особенностей механизмов их воздействия на растительную клетку. Несмотря на широкий спектр клеточных (физиологических) нарушений у растений, вызываемых веществами динитроанилиновой природы [1, 3], основным свойством, обуслов-

ливающим гербицидное действие этих соединений, является их антимитотическая активность [4–7]. Последняя, в свою очередь, обусловлена способностью динитроанилинов высокоспецифичным образом связываться с тубулином — основным структурным компонентом микротрубочек, приводя к их деполимеризации [8]. Способность связываться с изолированным растительным тубулином и таким образом ингибировать сборку микротрубочек была продемонстрирована в экспериментах *in vitro* [8], после чего подтверждена в условиях *in vivo*.

Следует отметить, что антимикротрубочковая активность динитроанилинов сама по себе не является уникальным свойством этой группы соединений. Способность молекул α- и β-тубулина специфическим образом связывать ряд низкомолекулярных соединений различной химической природы [9–11] делает их основной клеточной мишенью для целого ряда коммерчески значимых соединений, используемых в качестве противоопухолевых, гербицидных, фунгицидных, антигельминтных и антипротозойных средств [11–13]. Такого рода связывание может обуславливать два типа нарушения структуры микротрубочек, формируемых α- и β-тубулинами.

В первом случае низкомолекулярное вещество связывается с мономерами или димерами

Таблица 2

**Характеристика структурных особенностей различных динитроанилинов**

Гербицид	Ориентация нитрильной группы 2 по отношению к плоскости бензольного кольца, градус	Заряд на атомах кислорода нитрильной группы 2	Ориентация нитрильной группы 6 по отношению к плоскости бензольного кольца, градус	Заряд на атомах кислорода нитрильной группы 6
Трифлюоралин	48,60	–0,58 –0,59	48,9	–0,58 –0,59
Оризалин	41,30	–0,55 –0,57	40,8	–0,56 –0,57
Пендиметалин	65	–0,57 –0,58	28,4	0,59 –0,58
Эталфлюоралин	33,7	–0,59 –0,58	75,7	–0,57 –0,58
Нитралин	54,2	–0,5 –0,59	52,2	–0,60 –0,58
Нитрофор	48,5	–0,59 –0,58	48,5	–0,59 –0,58
Бенфлюоралин	51,3	–0,58 –0,58	42,4	–0,56 –0,6
Динитрамин	46,5	–0,58 –0,62	47,1	–0,6 –0,6
Флухлоралин	40,6	–0,56 –0,57	42,9	–0,56 –0,56
Профлюоралин	32,1	–0,58 –0,6	39,6	–0,58 –0,6
Изопропалин	43,5	–0,59 –0,59	42,5	–0,59 –0,6
Бутралин	47	–0,58 –0,61	8	–0,59 –0,6

тубулина, препятствуя полимеризации последних в надмолекулярные комплексы (микротрубочки и ЦОМТы), вследствие чего происходит разрушение интерфазной сети микротрубочек и/или веретена деления (в зависимости от фазы клеточного цикла) [9–11]. Демонстрирующим микротрубочки механизмом действия наряду с динитроанилинами (и разделяющими с ними общий сайт связывания фосфоротиоамидами) характеризуются вещества, взаимодействующие с тубулином по колхициновому, винбластинному/мэйтансиновому, ризоксиновому, бензимидазол/фенилкарбаматному сайтам, а также ряд других соединений [11, 13].

Во втором случае низкомолекулярные вещества связываются с полимеризованным в микротрубочки тубулином, необратимо стабилизируя микротрубочки [11, 14]. К веществам со стабилизирующим механизмом действия относятся таксаны, эпотилоны, лолималиды, саркодиктаины, элеутеробины [11, 13].

Однако взаимодействие соединений динитроанилинового ряда с молекулами  $\alpha$ -тубулина заключается в его чрезвычайно высокой специфичности — эти вещества эффективно связываются с тубулинами растительного, а также протозойного происхождения и практически не взаимодействуют с тубулинами животных и грибов, несмотря на чрезвычайно высокий уровень сходства их последовательностей [8, 15–17]. Прочие классы химических соединений, обладающих сродством к молекулам тубулина (за исключением фосфоамидных соединений), способны связываться с этими белками вне зависимости от происхождения последних.

#### Особенности пространственной организации тубулинов

Для более полного понимания механизмов специфического взаимодействия низкомолекулярных веществ и, в частности, динитроанилинов с  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулинами, необходимо остановиться на некоторых особенностях пространственной структуры этих белков. Тубулины ( $\alpha$  и  $\beta$ ) представляют собой глобулярные белки массой порядка 50–55 кДа [18, 19]. Как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -тубулины характеризуются весьма сходной пространственной сверткой полипептидных цепей в нативной структуре и, соответственно,

сходным расположением элементов вторичной структуры в молекулярном пространстве [20–23] (рис. 2, см. вклейку в конце номера). Внутреннюю часть тубулиновой глобулы образуют два  $\beta$ -слоя, которые располагаются приблизительно под углом от 70 к 80° относительно друг друга. Периферийная область молекулярного пространства образована  $\alpha$ -спиральными элементами, длина и количество которых могут различаться у разных представителей надсемейства тубулинов. Первый складчатый слой образуется параллельными  $\beta$ -полосами, формируя вместе с окружающими их спиралями типичную свертку Росмана, характерную для нуклеотид-связывающих белков. Второй  $\beta$ -слой — антипараллельный и также окружен  $\alpha$ -спиральными элементами.

Таким образом, по типу упаковки все исследуемые белки принадлежат к типу  $\alpha/\beta$  согласно классификации SCOP [24], т.е. к такому, где спиральные и складчатые элементы чередуются между собой.

Сходство пространственной организации тубулинов разных семейств и разных органических царств легко объясняется высокой степенью гомологии, которой характеризуется все надсемейство тубулинов [18, 25, 26]. В частности, было показано, что разница между пространственными структурами  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулинов в основном ограничивается смещением элементов вторичной структуры, длиной и конформацией ряда петель и особенностями ориентации боковых цепей [20], что в дальнейшем подтверждалось при изучении пространственной структуры тубулинов растений [23]. Поэтому можно утверждать, что отличия пространственной структуры, определяющие наличие либо отсутствие у тубулинов различного происхождения специфической избирательности в отношении тех или иных классов низкомолекулярных соединений (в частности, динитроанилинов), обусловлены различиями в конформациях боковых групп определенных аминокислотных остатков, следствием чего являются отличия молекулярной поверхности тубулинов из различных органических царств.

В процессе полимеризации каждый мономер тубулина формирует четыре контактные поверхности (рис. 2). Две продольные контактные поверхности образуются в процессе ас-

социации  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина в гетеродимер (интрадимерная поверхность) и последующей полимеризации гетеродимеров с образованием протофиламента (интердимерная поверхность) [27, 28]. Две латеральные поверхности формируются в результате контакта между одноименными субъединицами соседних протофиламентов. Состав контактных поверхностей тубулинов разного происхождения весьма консервативен, однако не идентичен (рис. 3, см. вклейку в конце номера), что свидетельствует об определенной толерантности структуры контактных поверхностей по отношению к случайным аминокислотным заменам.

#### Мутации в молекулах тубулинов, обуславливающие устойчивость к динитроанилинам

Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что пространственная структура поверхностей продольных и латеральных контактов между субъединицами тубулина играет критическую роль в процессах специфического взаимодействия между тубулином и его низкомолекулярными лигандами. Так, известно, что возникновение устойчивости к веществам как с деполимеризующим, так и со стабилизирующим микротрубочки механизмом действия связано, как правило, с точечными заменами в  $\alpha$ - либо  $\beta$ -субъединицах тубулина [12, 29–32]. В настоящее время выявлена 61 позиция для подобных мутаций, в сумме несущих порядка 90 возможных замен [32–71]. Их локализация в пространственной структуре тубулинов подчиняется определенным закономерностям: мутации, вызывающие устойчивость к веществам, которые деполимеризуют микротрубочки, приурочены к поверхностям продольных контактов, тогда как мутации, повышающие устойчивость к стабилизирующим микротрубочки соединениям, располагаются соответственно вблизи латеральных контактных поверхностей и, как правило, экспонированы на поверхности молекулы [32, 72].

Не составляют исключения из этого правила и мутации, обуславливающие повышенную устойчивость растений к гербицидам динитроанилинового ряда. Классическим примером таких мутаций можно считать замены, найденные у гусиной травы (*Eleusine indica* L. Gaerth.).

Вследствие интенсивного использования динитроанилиновых гербицидов в сельском хозяйстве США этот сорняк приобрел устойчивость к динитроанилинам и в начале 80-х годов прошлого столетия стал настоящим бичом американских фермеров [73]. В настоящее время известны три биотипа этого вида, различающиеся по уровню чувствительности/устойчивости к динитроанилиновым соединениям: чувствительный (sensitive) S-биотип, высокоустойчивый (resistant) R-биотип и обладающий промежуточным уровнем устойчивости (intermediate) I-биотип [74]. Установлено, что устойчивость R-биотипа к динитроанилинам обусловлена точечной мутацией, приводящей к замене остатка треонина в позиции 239 молекулы  $\alpha$ -тубулина на изолейцин [15, 46], а устойчивость I-биотипа также обусловлена аминокислотной заменой в позиции 268, где метионин меняется на треонин [15, 46]. Позже было показано, что устойчивость к динитроанилинам сорняка *Setaria viridis* (щетинник зеленый, или мышей зеленый) [75] также обусловлена мутациями в положениях 239 (треонин на изолейцин) и 136 (лейцин на фенилаланин) [60].

Кроме мутаций в молекуле  $\alpha$ -тубулина растений, следствием которых является уменьшение его сродства к динитроанилинам, подобные замены обнаружены также и в  $\beta$ -субъединице. Так, устойчивость зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. к динитроанилинам обусловлена заменой лизина в положении 350 молекулы  $\beta$ -тубулина на метионин [37, 39], а причиной устойчивости у полученной нами ранее линии табака мексиканского (*Nicotiana glauca* Viviani) [76] является замена серина в положении 248 на пролин [77]. Кроме того, показано, что аналогичная устойчивость к динитроанилинам, обнаруженная у мятлика однолетнего (*Poa annua* L.), является следствием замены аргинина-241 на лизин [78].

Таким образом, наличие мутаций как в  $\alpha$ -, так и в  $\beta$ -субъединицах растительного тубулина, определяющих устойчивость к динитроанилинам, свидетельствует о том, что динитроанилины способны связываться как с  $\alpha$ -, так и с  $\beta$ -тубулином, несмотря на высокую избирательность этого взаимодействия. Кроме того, поскольку позиция в аминокислотной последо-

вательности, соответствующая 239 положению  $\alpha$ -тубулина гусиной травы, является высококонсервативной и содержит треонин практически у всех представителей разных семейств тубулинов, ранее было высказано предположение, что соответствующие замены в последовательностях  $\beta$ - и  $\gamma$ -тубулинов должны были бы вызывать повышение устойчивости к динитроанилиновым соединениям [79]. Интересным является тот факт, что замены, повышающие резистентность растений к динитроанилинам, всегда обеспечивают устойчивость в отношении еще одной группы гербицидов – фосфоротиоамидов, характеризующихся иной химической природой [74, 75, 80, 81], что с высокой долей вероятности свидетельствует о том, что оба эти класса веществ связываются с одним и тем же сайтом на поверхности тубулина.

Как и места локализации мутаций, определяющих устойчивость к антимикротрубочковым соединениям, так и расположение известных сайтов связывания этих веществ на поверхности молекул тубулина характеризуются определенными закономерностями. Все экспериментально выявленные и предсказанные сайты связывания веществ с деполимеризующим механизмом действия локализуются либо вблизи поверхностей продольных контактов между субъединицами тубулина, либо непосредственно на поверхностях в зоне этих контактов [32, 82–86], тогда как вещества, стабилизирующие микротрубочки, связываются с тубулином вблизи поверхностей латерального взаимодействия [87, 88]. Такая локализация сайтов связывания вполне логична и объяснима. Состояние поверхностей тубулина в области продольного контакта является критическим для процесса ассоциации субъединиц тубулина в димеры и последующего формирования протофиламентов. Таким образом, изменение их топологии, а тем более прямое связывание в этих местах молекулы антимикротрубочкового вещества закономерно приводит к нарушению сборки микротрубочек. Вместе с тем изменение топологии молекул тубулина в области латеральных контактов критично для перехода включенных в микротрубочку димеров тубулина из прямой в изогнутую конформацию вследствие гидролиза ГТФ  $\beta$ -тубулином, обеспечивающего возможность диссоциации микротрубочек [89].

Вероятно, что связывание тубулином вещества, стабилизирующего микротрубочки, препятствует этой структурной перестройке области латерального контакта, хотя нельзя исключить и наличия более сложных механизмов воздействия стабилизирующих соединений на структуру тубулина [90].

#### Особенности взаимодействия динитроанилиновых соединений с $\alpha$ -тубулином растений

Для детального анализа структурных механизмов специфического взаимодействия тубулина с динитроанилинами нами были реконструированы трехмерные структуры молекул  $\alpha$ -тубулина из различных биотипов *E. indica*, включая распределение электростатического потенциала на их поверхности и одновременной локализацией сайта связывания динитроанилинов [82, 83].

В результате анализа структуры молекулярной поверхности  $\alpha$ -тубулина гусиной травы и распределения на ней электростатического потенциала было установлено, что местом связывания нитрильной группы динитроанилинов является полость на поверхности молекулы в области интердимерного контакта между субъединицами тубулина, образованная аминокислотными остатками Arg2, Arg243, Val250, Asp251, Val252, Asn253, Glu254, а также частично Cys4, His8, Leu136 и Phe138 [82, 83] (рис. 4, а и рис. 5, см. вклейку в конце номера). При этом ближайшими к нитрогруппе являются остатки Arg2, Asp251 и Asn253. Дополнительная аминокислотная группа аргинина в положении 2 экспонирована на поверхности молекулы и ориентирована в сторону потенциальной области взаимодействия, внося таким образом непосредственный вклад в формирование позитивного потенциала в районе обнаруженной полости. Напротив, кислотная группа аспартата в положении 251 погружена в толщу молекулы и ориентирована в противоположную от области взаимодействия сторону, не влияя, таким образом, на ее свойства.

При осуществлении докинга различных динитроанилинов с последующим анализом пространственной структуры образованных комплексов растительного  $\alpha$ -тубулина с ними показано, что, кроме семи перечисленных остатков,

во взаимодействие с лигандами вовлечены также остатки Глн133, Асн249 и Гли256. В частности, углеводородные цепи динитроанилиновых соединений располагаются в пространстве вдоль остатков, участвующих в формировании поверхности интердимерного контакта с субъединицей  $\beta$ -тубулина соседнего димера [82, 83]. Вполне закономерно, что в результате связывания  $\alpha$ -тубулином молекулы динитроанилина в районе обнаруженного сайта последующая полимеризация микротрубочки оказывается невозможной, поскольку гербицид становится стерическим препятствием для нормального узнавания и связывания  $\beta$ -тубулина следующего димера. Кроме того, ряд остатков, которые образуют сайт взаимодействия, в частности Гли133, Асн249, Асп251 и Глу256, принимают участие во взаимодействии с молекулой ГТФ — обязательного фактора полимеризации тубулина, присоединенного к последующему димеру. Наряду с этим важность остатка Арг-2 не ограничивается его вкладом в повышение позитивного электростатического потенциала сайта взаимодействия. Особая роль этой аминокислоты заключается в дополнительной стабилизации образованных комплексов в результате взаимодействия ее аминокислотной группы с дополнительными группами динитроанилиновых соединений, которые являются индивидуальными для каждого конкретного соединения и, как правило, несут частичный отрицательный заряд (исключение составляют молекулы пенициллина, изопроталина и бутралина).

Аминокислотный остаток треонина в позиции 239, замена которого на изолейцин приводит к возникновению устойчивости к гербицидам динитроанилинового, а также и фосфорамидного рядов [46], не экспонируется на поверхности молекулы растительного  $\alpha$ -тубулина. Впрочем, это является достаточно характерным для расположения мутаций, обуславливающих возникновение устойчивости к антитубулиновым веществам с деполимеризующим механизмом действия [32, 72]. Но следует отметить, что треонин-239, хотя и не может принимать непосредственного участия в связывании молекулы гербицида, но располагается прямо под обнаруженной полостью взаимодействия. При такой локализации замена остатка, происходящая в этой позиции, может непосредственно влиять

на пространственную структуру сайта взаимодействия  $\alpha$ -тубулина с динитроанилинами.

Сравнительный анализ молекулярной поверхности  $\alpha$ -тубулина R-биотипа гусиной травы показал, что замена треонина на изолейцин действительно является стерически эффективной — она приводит к пространственной переориентации боковых цепей соседствующих на поверхности молекулы и вблизи нее аминокислотных остатков, в результате чего обнаруженная полость взаимодействия закрывается (рис. 4, б). Внедрение нитрильной группы динитроанилинов в эту область на поверхности белка становится невозможным. Таким образом, полученные результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными относительно влияния точечной замены в положении 239 молекулы  $\alpha$ -тубулина на уровень чувствительности к динитроанилинам [15, 46].

В случае замены Мет-268 на Тре ( $\alpha$ -тубулин I-биотипа) картина изменений, наблюдаемая в сайте взаимодействия, является несколько иной (рис. 4, в). Отмеченная замена вызывает не полное, а лишь частичное закрытие положительно заряженной полости. Такая перестройка молекулярной поверхности в области сайта связывания приводит к тому, что способность к образованию комплексов между гербицидом и белком частично сохраняется.

В то же самое время результаты реконструкции трехмерной структуры молекул  $\beta$ - и  $\gamma$ -тубулинов свидетельствуют о том, что наличие остатков треонина в положениях 237 или 240 (которые соответствуют положению 239 в молекуле  $\alpha$ -тубулина) не влияет на формирование полости взаимодействия с изучаемыми гербицидами, поскольку эта полость вообще отсутствует в обоих случаях (рис. 6, см. вклейку в конце номера) [91]. Замена же остатка треонина в этих положениях на остаток изолейцина не приводит к заметной реорганизации поверхности молекул как  $\beta$ -, так и  $\gamma$ -тубулинов, т.е. не влечет за собой никаких функциональных последствий. Следовательно, устойчивость молекулы тубулина к динитроанилинам определяется не только положением и природой заменяемого аминокислотного остатка, но и его пространственным микроокружением, формируемым соседствующими аминокислотными остатками. Таким образом, ранее сформулированный вы-

вод о том, что замены Тре-237 в молекуле β-тубулина и Тре-240 в молекуле γ-тубулина должны приводить к их повышенной устойчивости к динитроанилиновым гербицидам [79], опровергается результатами пространственного моделирования.

Полученные нами результаты по анализу особенностей пространственных структур молекул α-тубулинов S-, I- и R-биотипов *E. indica* позже были подтверждены независимыми исследованиями по реконструкции сайта взаимодействия с динитроанилинами молекулы α-тубулина из *S. viridis*. Как уже отмечалось, у этого растения были обнаружены две мутации, вызывающие повышенную устойчивость к динитроанилинам — замена треонина на изолейцин в позиции 239, аналогичная мутации у гусиной травы, а также замена лейцина на фенилаланин в позиции 136 [60], входящей в состав предсказанной нами ранее области взаимодействия. Кроме этой, упомянутой авторами работы, показано, что сайт связывания динитроанилинов расположен практически в зоне контакта между димерами тубулина. Это также согласуется с нашими данными.

#### **Возможные механизмы взаимодействия динитроанилинов с α-тубулином простейших**

Как уже отмечено, динитроанилиновые соединения обладают сродством не только к тубулинам растительного, но также и протозойного происхождения. Антипротозойная активность динитроанилинов продемонстрирована на целом ряде видов простейших, таких как *Trypanosoma cruzi*, *Tr. brucei*, *Leishmania major*, *L. amazonensis*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. panamensis*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* [16, 17, 92]. В то же время авторы исследований, посвященных изучению закономерностей взаимодействия α-тубулинов простейших *T. gondii* и *L. major* с динитроанилинами, полагают, что хотя сайты взаимодействия, предсказанные для α-тубулина высших растений и простейших, частично перекрываются, связывание динитроанилинов нарушает латеральные контакты между протофиламентами микротрубочек [93, 94]. Однако такие выводы по ряду причин являются дискуссионными. Во-первых, такое расположение сайта выпадает из общей закономерности

расположения сайтов связывания деполимеризующих микротрубочки веществ, ранее рассмотренных в этой статье. Во-вторых, докинг динитроанилинов в потенциальный сайт связывания α-тубулинов простейших произведен без учета того, что всем динитроанилинам присущ общий структурный компонент, подробно рассмотренный нами выше. В результате этого оризалин оказался пристыкованным к α-тубулину с помощью сульфоксильной группы. И, наконец, в-третьих, несмотря на то, что программное обеспечение AutoDock [95], использованное авторами исследований для автоматического поиска сайта взаимодействия, является распространенным и широко цитируемым в научной литературе (207 ссылок в базе данных PubMed), его оказалось невозможно откалибровать на комплексах тубулина с низкомолекулярными веществами, структура которых была установлена по данным кристаллографии. Иными словами, нам не удалось подобрать параметры, при которых программа воспроизводила бы комплексы с известной пространственной структурой и соответствующей локализацией сайтов взаимодействия.

В то же время наши результаты по реконструкции пространственной структуры α-тубулинов малярийного плазмодия *Plasmodium falciparum* показали, что в области, соответствующей сайту связывания динитроанилинов на поверхности молекулы α-тубулина *Eleusine indica*, находится положительно заряженная полость, которая может служить местом связывания нитрогруппы динитроанилинов, подобно соответствующей области на поверхности α-тубулина гусиной травы (рис. 7, см. вклейку в конце номера). Структуры «карманов» на поверхности сравниваемых α-тубулинов несколько отличаются между собой, что закономерно определяется отличиями в аминокислотном составе исследуемых белков (рис. 3). В частности, в составе сайта связывания, приведенного в табл. 3, вместо аспарагина в положении 253 содержится остаток треонина, что может приводить к образованию дополнительной водородной связи [96]. В то же время в этой области α-тубулинов животных (*Sus scrofa*) и грибов (*Mycosphaerella graminicola*) подобные полости не формируются (рис. 8, см. вклейку в конце номера), что согласуется с отсутствием

Аминокислотные остатки сайтов взаимодействия  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулинов различного происхождения с динитроанилиновыми соединениями

Тип тубулина	$\alpha$ -тубулин <i>E. indica</i>	$\alpha$ -тубулин <i>P. falciparum</i>	$\beta$ -тубулин <i>C. reinhardtii</i>	$\beta$ -тубулин <i>N. plumbaginifolia</i>
Аминокислоты сайта связывания	Арг2, Глн133, Арг243, Асн249, Вал250, Асп251, Вал252, Асн253, Глу254	Арг2, Глн133, Арг243, Асн249, Вал250, Асп251, Вал252, Тре 253, Глу254	Лей246, Асн247, Ала248, Асп249, Лиз252, Лей253, Вал255, Асн256, Лиз350	Лей246, Асн247, Сер248, Асп249, Лиз252, Лей253, Асн256, Лиз350, Сер351, Тре 352
Аминокислоты, образующие микроокружение нитрогруппы	Арг2, Асп251, Асн253	Арг2, Асп251, Тре 253	Ала248, Лиз252, Лиз350	Сер248, Лиз252, Лиз350

соответствующих сайтов связывания на поверхности этих белков. Таким образом, можно с высокой степенью достоверности допустить, что сайты связывания исследуемых низкомолекулярных соединений на поверхности  $\alpha$ -тубулинов растений и простейших все-таки совпадают между собой.

#### Особенности взаимодействия динитроанилинов с $\beta$ -тубулином

С целью идентификации сайтов связывания динитроанилинов на поверхности  $\beta$ -тубулина нами были реконструированы пространственные структуры молекул  $\beta$ -тубулина *Ch. reinhardtii* и *N. plumbaginifolia*, различающихся по степени родства к динитроанилиновым соединениям [77]. Анализ особенностей пространственной структуры и распределения электростатического потенциала на их поверхности показал, что локализация и аминокислотный состав этих сайтов характеризуются определенными различиями в сравнении с соответствующими сайтами на поверхности молекулы  $\alpha$ -тубулина (табл. 3). В обоих случаях сайты располагаются на интрадимерной поверхности молекулы  $\beta$ -тубулина. Они содержат по два диаминовых аминокислотных остатка, причем остаток Лиз-350, в результате мутации по которому приобретает устойчивость к динитроанилинам у хламидомонады, и остаток Сер-248, вызывающий аналогичный эффект у табака, непосредственно входят в состав соответствующего сайта взаимодействия и микроокружения связанной нитрогруппы динитроанилинов. Замена Лиз-248 на остаток

метионина либо Сер-248 на остаток пролина практически блокирует полости, принимающие участие в связывании молекул гербицидов. Таким образом, стерические последствия этих мутаций подобны эффектам, наблюдающимся в случае замены Тре-239 на Иле в  $\alpha$ -субъединице тубулина. Следовательно, можно заключить, что связывание динитроанилиновых соединений  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулинами происходит с помощью подобных структурных механизмов, хотя и при различии в локализации и составе сайтов взаимодействия.

В последнее время установлено, что устойчивые к динитроанилиновым соединениям растения обладают не только перекрестной устойчивостью к фосфоротиоамидам, но еще и к другому классу антимиотрубочковых гербицидов — цианоакрилатам. В частности показано, что R-биотип *Eleusine indica*, устойчивый к динитроанилинам, обладает перекрестной устойчивостью к цианоакрилату CA1 и его изопропиловому эфиру CA2 [66]. Интересно, что в отличие от фосфоротиоамидатов, цианоакрилаты не имеют общих структурных частей с динитроанилинами. Однако высокая ригидность центральной области молекул цианоакрилатов, подобная ригидности бензольного кольца у динитроанилинов, и наличие сильного отрицательного потенциала на карбонильной группе и цианогруппе позволяет высказать предположение, что эти соединения также могут связываться с теми же сайтами взаимодействия на поверхности тубулинов растений и простейших, что и динитроанилины и фосфоамидамы.

Таким образом, суммируя изложенный материал, уже сейчас можно утверждать, что связывание тубулина с динитроанилинами происходит в соответствии со структурными закономерностями, общими для процессов взаимодействия тубулина с любыми соединениями, которые вызывают деполимеризацию микротрубочек, а описанный нами сайт связывания динитроанилиновых соединений на поверхности молекул  $\alpha$ -тубулина может быть активным в отношении нескольких групп целиком различающихся по своей структуре веществ, подобно тому, как это описано в случае колхицинового, винбластинного/мэйтансинового и таксол/эпотилонового сайтов связывания.

*A.Yu. Nyporko, A.I. Yemets, V.N. Brytsun,  
M.O. Lozinsky, Ya.B. Blume*

#### STRUCTURAL-BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TUBULIN INTERACTION WITH DINITROANILINES

The interaction of dinitroaniline compounds with tubulin molecules is characterized by extraordinary selectivity – these matters effectively associate with plant as well as protozoan tubulin and practically don't interact with fungal and animal tubulin in spite of extraordinarily high level of similarity of their sequences. Structural features and mechanisms of this interaction are generalized and in detail analysed in this research. In particular, the regularities of dinitroaniline binding sites' structure and localization on surfaces of tubulin different subunits and tubulins of different origin are characterized. Dinitroaniline binding sites are disposed on the surfaces of longitudinal contacts between tubulin subunits, contain residues of diamine amino acids (lysine or arginine) coupling al nitrile group (s) of dinitroanilines. Binding site location on the surfaces of the same subunit of different origin (for example, plant and protozoan  $\alpha$ -tubulins) is coincided, however site localisation on surface of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits is distinct. The described sites potentially can be the binding areas for another antimicrotubular compounds, in particular, cyanoacrilates.

*О.Ю. Ныпорко, А.И. Емец, В.М. Брыцун,  
М.О. Лозинский, Я.Б. Блюм*

#### СТРУКТУРНО-БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАЄМОДІЇ ТУБУЛІНУ З ДІНІТРОАНІЛІНАМИ

Взаємодія динітроанілінових сполук з молекулами тубуліна характеризується надзвичайно високою вибірковістю – ці речовини ефективно зв'язуються з тубулінами рослинного, а також протозойного походження і практично не взаємодіють з тубулінами тварин і грибів, незважаючи на надзвичайно високий рі-

вень схожості їх послідовностей. Структурні особливості і механізми цієї взаємодії узагальнені і детально проаналізовані в цьому дослідженні, зокрема охарактеризовані закономірності структури і розташування сайтів зв'язування динітроанілінів на поверхні різних субодиниць тубуліна і тубулінів різного походження. Сайти зв'язування динітроанілінів розташовуються на поверхнях поздовжніх контактів між субодиницями тубуліна, містять залишки діамінових амінокислот (лізину або аргініну), що зв'язують нітрильну групу динітроанілінів. Локалізація сайтів на поверхні однакових субодиниць різного походження (наприклад,  $\alpha$ -тубулінів рослин і найпростіших) збігається, проте розташування сайтів зв'язування на поверхні  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць тубуліна є різним. Охарактеризовані сайти потенційно можуть бути місцями зв'язування і інших антимікротрубочкових сполук, зокрема ціаноакрилатів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Пестициды и регуляторы роста растений* : Справочник / Под ред. Н.Н. Мельникоа и др. – М.: Химия, 1995. – 573 с.
2. *Брыцун В.М., Емец А.И., Лозинский М.О., Блюм Я.Б.* 2,6-Динітроаніліни: синтез, пестицидні та антипротозойні властивості // *Bioorg. Acta.* – 2009. – № 2.
3. *Захаренко В.А.* Гербициды. – М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
4. *Parka S.J., Soper O.F.* The physiology and mode of action of the dinitroaniline herbicides // *Weed Sci.* – 1977. – **25**. – P. 79–87.
5. *Upadhyaya M.K., Noodén L.D.* Mode of dinitroaniline herbicide action // *Plant Physiol.* – 1980. – **66**. – P. 1048–1052.
6. *Molin W.T., Khan R.A.* Mitotic disrupter herbicides: recent advances and opportunities // *Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology* / Ed. R.M. Roe. – Burke (VA, USA): IOS Press, 1997. – P. 143–158.
7. *Vaughn K.C.* Anticytoskeletal herbicides // *Plant microtubules: potential for biotechnology* / Ed. P. Nick. – Berlin : Springer Verlag etc., 2000. – P. 193–205.
8. *Morejohn L.C., Bureau T.E., Molé-Bajer J., Bajer A.S., Fosket D.E.* Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro // *Planta.* – 1987. – **172**. – P. 252–264.
9. *Morejohn L.C., Fosket D.E.* The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells // *Pharm. Ther.* – 1991. – **51**. – P. 217–230.
10. *Correia J.J.* Effects of antimetabolic agents on tubulin-nucleotide interactions // *Pharm. Ther.* – 1991. – **52**. – P. 127–147.
11. *Correia J.J., Lobert S.* Physicochemical aspects of tubulin-interacting antimetabolic drugs // *Curr. Pharm. Design.* – 2001. – **7**. – P. 1213–1223.

12. Емец А.И., Блюм Я.Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов // Физиология растений. – 1999. – **46**, № 6. – С. 899–907.
13. Jordan M.A., Wilson L. Microtubules as a target for anti-cancer drugs // Nat. Rev. Cancer. – 2004. – **4**. – P. 253–265.
14. Dumontet C. Mechanisms of action and resistance to tubulin-binding agents // Exp. Opin. Investig. Drugs. – 2000. – **9**. – P. 779–788.
15. Anthony R.G., Waldin T.R., Ray J.A., Bright S.W. J., Hussey P.J. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin // Nature. – 1998. – **393**. – P. 260–263.
16. Bogtish B.J., Middleton O.L., Ribeiro-Rodrigues R. Effects of the antitubulin drug trifluralin on the proliferation and metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes // Parasit. Res. – 1999. – **85**. – P. 475–480.
17. Traub-Cseko Y.M., Ramalho-Ortigao J.M., Dantas A.P., de Castro S.L., Barbosa H.S., Downing K.H. Dinitroaniline herbicides against protozoan parasites: the case of *Trypanosoma cruzi* // Trends Parasit. – 2001. – **17**. – P. 136–141.
18. Fosket D.E., Morejohn L.C. Structural and functional organization of tubulin // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1992. – **43**. – P. 201–240
19. McKean P.G., Vaughan S., Gull K. The extended tubulin superfamily // J. Cell Sci. – 2001. – **114**. – P. 2723–2733.
20. Nogales E., Wolf S.G., Downing K.H. Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography // Nature. – 1998. – **391**. – P. 199–203.
21. Gogonea C.B., Gogonea V., Ali Y.M., Merz K.M.Jr., Siddiqui S.S. Computational prediction of the three-dimensional structures for the *Caenorhabditis elegans* tubulin family // J. Mol. Graph. and Modell. – 1999. – **17**. – P. 90–100.
22. Löwe J., Li H., Downing K.H., Nogales E. Refined structure of  $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution // J. Mol. Biol. – 2001. – **313**. – P. 1045–1057.
23. Ныпорко А.Ю., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ вторичной структуры тубулинов и FtsZ-белков // Биополимеры и клетка. – 2001. – **17**. – С. 61–69.
24. Murzin A.G., Brenner S.E., Hubbard T., Chothia C. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures // J. Mol. Biol. – 1995. – **247**. – P. 536–540.
25. Little M., Seehaus T. Comparative analysis of tubulin sequences // Comp. Biochem. Physiol. – 1988. – **90B**. – P. 655–670.
26. Демчук О.Н., Блюм Я.Б. Построение филогенетического древа растительных тубулинов на основании гомологии их белковых последовательностей // Цитология и генетика. – 2005. – **39**, № 2. – С. 3–9.
27. Nogales E., Whittaker M., Milligan R.A., Downing K.H. High-resolution model of the microtubule // Cell. – 1999. – **96**. – P. 79–88.
28. Meurer-Grob P., Kasparian J., Wade R.H. Microtubule structure at improved resolution // Biochemistry. – 2001. – **40**. – P. 8000–8008.
29. Страшнюк Н.М., Блюм Я.Б. Получение мутантов по генам белков микротрубочек // Цитология и генетика. – 1993. – **27**. – С. 79–96.
30. Емец А.И., Блюм Я.Б. Мутантные гены тубулинов растений как маркерные селективные гены для генетической инженерии // Цитология и генетика. – 2007. – **41**, № 3. – С. 29–43.
31. Baird W.V., Blume Ya.B., Wick S. Microtubular and cytoskeletal mutants // Plant microtubules: potential for biotechnology / Ed. P. Nick. – Berlin etc.: Springer Verlag, 2000. – P. 159–191.
32. Nyporko A. Yu., Blume Y.B. Spatial distribution of tubulin mutations conferring resistance to antimicrotubular compounds // The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology / Eds Y.B. Blume, W.V. Baird, A.I. Yemets, D. Breviario. – Dordrecht : Springer, 2008.
33. Borck K., Braymer H. D. The genetic analysis of resistance to benomyl in *Neurospora crassa* // J. Gen. Microbiol. – 1974. – **85**. – P. 51–56.
34. Thomas J.H., Neff N.F., Botstein D. Isolation and characterization of mutations in the  $\beta$ -tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. – 1985. – **112**. – P. 715–734.
35. Orbach M.J., Porro E.B., Yanofsky C. Cloning and characterization of the gene for  $\beta$ -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker // Mol. Cell Biol. – 1986. – **6**. – P. 2452–2461.
36. Jung M.K., Oakley B.R. Identification of an amino acid substitutions in the ben,  $\beta$ -tubulin gene of *Aspergillus nidulans* that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity // Cell Motil. Cytoskeleton. – 1990. – **17**. – P. 87–94.
37. Lee V.D., Huang B. Missense mutations at lysine 350 in  $\beta$ -tubulin confer altered sensitivity to microtubule inhibitors in *Chlamydomonas* // Plant Cell. – 1990. – **2**. – P. 1051–1057.
38. Takahashi M., Matsumoto S., Iwasaki S., Yahara I. Molecular basis for determining the sensitivity of eukaryotes to the antimetabolic drug rhizoxin // Mol. Gen. Genet. – 1990. – **222**. – P. 169–175
39. Schilber M.J., Huang B. The colR4 and colR15  $\beta$ -tubulin mutations in *Chlamydomonas reinhardtii* confer altered sensitivities to microtubule inhibitors and herbicides by enhancing microtubule stability // J. Cell Biol. – 1991. – **113**. – P. 605–614.
40. Jung M.K., Wilder I.B., Oakley B.R. Amino acid alterations in the ben ( $\beta$ -tubulin) gene of *Aspergillus nidu-*

- lans* that confer benomyl resistance // Cell Motil. Cytoskelet. – 1992. – **22**. – P. 170–174.
41. Fujimura M., Kamakura T., Inoue H., Yamaguchi I. Amino-acid alterations in the beta-tubulin gene of *Neurospora crassa* that confer resistance to carbendazim and diethofencarb // Curr. Genet. – 1994. – **25**. – P. 418–422.
  42. Buhr T.L., Dickman M.B. Isolation, characterization, and expression of a second beta-tubulin-encoding gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – **60**. – P. 4155–4159.
  43. Park S.Y., Jung O.J., Chung Y.R., Lee C.W. Isolation and characterization of a benomyl-resistant form of beta-tubulin-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* // Mol. Cells. – 1997. – **7**. – P. 104–109.
  44. Giannakakou P., Sackett D.L., Kang Y.K., Zhan Z., Buters J.T., Fojo T., Poruchynsky M.S. Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization // J. Biol. Chem. – 1997. – **272**. – P. 17118–17125.
  45. McKay G.J., Cooke L.R. A PCR-based method to characterize and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani* // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – **152**. – P. 371–378.
  46. Yamamoto E., Zeng L., Biard W.V.  $\alpha$ -Tubulins missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica* // Plant Cell. – 1998. – **10**. – P. 297–308.
  47. Elard L., Humbert J.F. Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 beta-tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta* // Parasit. Res. – 1999. – **85**. – P. 452–456.
  48. Gonsales-Garay M., Chang L., Blade K., Menick D., Cabral F. A beta-tubulin leucine involved in microtubule assembly and paclitaxel resistance // J. Biol. Chem. – 1999. – **274**. – P. 23875–23882.
  49. Giannakakou P., Gussio R., Nogales E., Downing K.H., Zaharevitz D., Bollbuck B., Poy G., Sackett D., Nicolaou K.C., Fojo T. A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2000. – **97**. – P. 2904–2909.
  50. He L., Yang C.P., Horwitz S.B. Mutations in beta-tubulin map to domains involved in regulation of microtubule stability in epothilone-resistant cell lines // Mol. Cancer. Ther. – 2001. – **1**. – P. 3–10.
  51. Hua X.H., Genini D., Gussio R., Tawatao R., Shih H., Kipps T.J., Carson D.A., Leoni L.M. Biochemical genetic analysis of indanocene resistance in human leukemia // Cancer Res. – 2001. – **61**. – P. 7248–7254.
  52. Kavallaris M., Tait A.S., Walsh B.J., He L., Horwitz S.B., Norris M.D., Haber M. Multiple microtubule alterations are associated with *Vinca* alkaloid resistance in human leukemia cells // Cancer Res. – 2001. – **61**. – P. 5803–5809.
  53. Hasegawa S., Miyoshi Y., Egawa C., Ishitobi M., Tamaki Y., Monden M., Noguchi S. Mutational analysis of the class I beta-tubulin gene in human breast cancer // Int. J. Cancer. – 2002. – **101**. – P. 46–51.
  54. Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M., Chapeland F. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea* // Pest. Manag. Sci. – 2002. – **58**. – P. 876–888.
  55. Hari M., Wang Y., Veeraraghavan S., Cabral F. Mutations in alpha- and beta-tubulin that stabilize microtubules and confer resistance to colcemid and vinblastine // Mol. Cancer Ther. – 2003. – **7**. – P. 597–605.
  56. Ma Z., Yoshimura M.A., Michailides T.J. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – **69**. – P. 7145–7152.
  57. Ma Z., Yoshimura M.A., Holtz B.A., Michailides T.J. Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California // Pest. Manag. Sci. – 2005. – **61**. – P. 449–457.
  58. Martello L.A., Verdier-Pinard P., Shen H.J., He L., Torres K., Orr G.A., Horwitz S.B. Elevated levels of microtubule destabilizing factors in a Taxol-resistant/dependent A549 cell line with an alpha-tubulin mutation // Cancer Res. – 2003. – **63**. – P. 1207–1213.
  59. Verrills N.M., Flemming C.L., Liu M., Ivery M.T., Cobon G.S., Norris M.D., Haber M., Kavallaris M. Microtubule alterations and mutations induced by desoxyepothilone B: implications for drug-target interactions // Chem Biol. – 2003. – **10**. – P. 597–607.
  60. Delye C., Menchari Y., Michel S., Darmency H. Molecular bases for sensitivity to tubulin-binding herbicides in green foxtail // Plant Physiol. – 2004. – **136**. – P. 3920–3932.
  61. Loganzo F., Hari M., Annable T., Tan X., Morilla D.B., Musto S., Zask A., Kaplan J., Minnick A.A.Jr., May M.K., Ayril-Kaloustian S., Poruchynsky M.S., Fojo T., Greenberger L.M. Cells resistant to HTI-286 do not overexpress P-glycoprotein but have reduced drug accumulation and a point mutation in alpha-tubulin // Mol. Cancer. Ther. – 2004. – **10**. – P. 1319–1327.
  62. Poruchynsky M.S., Kim J.H., Nogales E., Annable T., Loganzo F., Greenberger L.M., Sackett D.L., Fojo T. Tumor cells resistant to a microtubule-depolymerizing hemiasterlin analogue, HTI-286, have mutations in alpha- or beta-tubulin and increased microtubule stability // Biochemistry – 2004. – **43**. – P. 13944–13954.
  63. Ruiz F., Dupuis-Williams P., Klotz C., Forquignon F.,

- Bergdoll M., Beisson J., Koll F. Genetic evidence for interaction between eta- and beta-tubulins // *Eukaryot. Cell.* – 2004. – 3. – P. 212–220.
64. Wang Y., Veeraraghavan S., Cabral F. Intra-allelic suppression of a mutation that stabilizes microtubules and confers resistance to colcemid // *Biochemistry.* – 2004. – 43. – P. 8965–8973.
65. Gokmen-Polar Y., Escuin D., Walls C.D., Soule S.E., Wang Y., Sanders K.L., Lavalley T.M., Wang M., Guenther B.D., Giannakakou P., Sledge G.W.  $\beta$ -Tubulin mutations are associated with resistance to 2-methoxyestradiol in MDA-MB-435 cancer cells // *Cancer Res.* – 2005. – 65. – P. 9406–9414.
66. Tresch S., Plath P., Grossmann K. Herbicidal cyanocrylates with antimicrotubule mechanism of action // *Pest. Manag. Sci.* – 2005. – 61, № 11. – P. 1052–1059.
67. Yang C.P., Verdier-Pinard P., Wang F., Lippaine-Horvath E., He L., Li D., Hofle G., Ojima I., Orr G.A., Horwitz S.B. A highly epothilone B-resistant A549 cell line with mutations in tubulin that confer drug dependence // *Mol. Cancer Ther.* – 2005. – 4. – P. 987–995.
68. Blackhall W.J., Drogemuller M., Schnieder T., von Samson-Himmelstjerna G. Expression of recombinant beta-tubulin alleles from *Cylicocyclus nassatus* (Cyathostominae) // *Parasit. Res.* – 2006. – 99. – P. 687–693.
69. Hari M., Loganzo F., Annable T., Tan X., Musto S., Morilla D.B., Nettles J.H., Snyder J.P., Greenberger L.M. Paclitaxel-resistant cells have a mutation in the paclitaxel-binding region of beta-tubulin (Asp26Glu) and less stable microtubules // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – 5. – P. 270–278.
70. Wang Y., Yin S., Blade K., Cooper G., Menick D.R., Cabral F. Mutations at leucine 215 of beta-tubulin affect paclitaxel sensitivity by two distinct mechanisms // *Biochemistry* – 2006. – 45. – P. 185–194.
71. Ghisi M., Kaminsky R., Mäser P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes // *Vet. Parasit.* – 2007. – 144. – P. 313–320.
72. Ныпорко А.Ю., Живолуп А.Н., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ первичной структуры мутантных тубулинов, устойчивых к антимицротрубочковым соединениям, для предсказания позиций новых мутаций с аналогичными свойствами // *Цитология и генетика.* – 2003. – 37, № 2. – P. 69–78.
73. Mudge L.C., Gossett B.J., Murphy T.R. Resistance of goosegrass (*Eleusine indica*) to dinitroaniline herbicides // *Weed Sci.* – 1984. – 32. – P. 591–594.
74. Vaughn K.C., Vaughan M.A. Structural and biochemical characterization of dinitroaniline-resistant *Eleusine* // *Managing Resistance to Agrochemicals.* V. 421 / Eds M.B. Green, H.M. LeBaron, W.K. – Washington, 1990. – P. 364–375.
75. Smeda R.J., Vaughn K.C., Morrison I.N. Trifluralin-resistant green foxtail (*Setaria viridis* (L.) Beauv.) exhibits cross-resistance to mitotic disrupter herbicides // *Plant Physiol.* – 1992. – 96. – P. 114.
76. Блюм Я.Б., Страшнюк Н.М., Смертенко А.П., Солодушко В.Г., Глеба Ю.Ю. Изменения  $\beta$ -тубулина обеспечивают устойчивость к трифлуралину мутантов *Nicotiana plumbaginifolia*, полученных *in vitro* // *Доп. НАН України.* – 1996. – № 7. – С. 132–137.
77. Yemets A.J., Nyporko A.Yu., Swire-Clark G., Baird W.V., Blume Ya.B. Mechanisms of plant resistance to dinitroanilines and phosphoroamidates based on  $\beta$ -tubulin mutations // *Abstr. XVII Int. Bot. Congress.* – Vienna, 2005. – P. 292.
78. Lowe D.B., Swire-Clark G.A., McCarty L.B., Whitwell T., Baird W.V. Biology and molecular analysis of dinitroaniline-resistant *Poa annua* L. // *Int. Turfgrass Soc. Res. J.* – 2001. – 9. – P. 1019–1025.
79. Cronin K.E., Hussey P.J., Ray J.A., Waldin T.R. Herbicide resistant plants // *World Intellect. Property Org. Int. Publ.*, 1993. No. WO 93/24637.
80. Ellis J.R., Taylor R., Hussey P.J. Molecular modelling indicates that two chemically distinct classes of anti-mitotic herbicide bind to the same receptor site (s) // *Plant Physiol.* – 1993. – 105. – P. 15–18.
81. Murthy J.V., Kim H.H., Hanesworth V.R., Hugdahl J.D., Morejohn L.C. Competitive-inhibition of high-affinity oryzalin binding to plant tubulin by the phosphoric amide herbicide amiprofos-methyl // *Plant Physiol.* – 1994. – 105. – P. 309–320.
82. Ныпорко А.Ю., Емец А.И., Климкина Л.А., Блюм Я.Б. Взаимосвязь чувствительности каллуса *Eleusine indica* к трифлуралину и амипрофосметилу с особенностями взаимодействия этих соединений с тубулином // *Физиология растений.* – 2002. – 49. – С. 459–466.
83. Blume Ya.B., Nyporko A.Yu., Yemets A.I., Baird W.V. Structural modelling of plant  $\alpha$ -tubulin interaction with dinitroanilines and phosphoroamidates // *Cell Biol. Int.* – 2003. – 27. – P. 171–174.
84. Ravelli R., Gigant B., Curmi P., Jourdain I., Lachkar S., Sobel A., Knosso M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicines and a stathmin-like domain // *Nature.* – 2004. – 428. – P. 198–202.
85. Gigant B., Wang C., Ravelli R.B., Roussi F., Steinmetz M.O., Curmi P.A., Sobel A., Knosso M. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine // *Nature.* – 2005. – 435. – P. 519–522.
86. Robinson M.W., McFerran N., Trudgett A., Hoey L., Fairweather I. A possible model of benzimidazole binding to  $\beta$ -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement // *J. Mol. Graph. Model.* – 2004. – 23. – P. 275–284.
87. Snyder J.P., Nettles J.H., Cornett B., Downing K.H., Nogales E. The binding conformation of taxol in  $\beta$ -tubulin : A model based on electron crystallographic

- density // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2001. — **98**. — P. 5312–53126.
88. Nettles J.H., Li H., Cornett B., Krahn J.M., Snyder J.P., Downing K.H. The binding mode of epothilone A on  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin by electron crystallography // Science. — 2004. — **305**. — P. 866–869.
89. Nogales E., Wang H.W. Structural mechanisms underlying nucleotide-dependent self-assembly of tubulin and its relatives // Curr. Opin. Struct. Biol. — 2006. — **16**. — P. 221–229.
90. Nyporko A.Yu., Blume Ya.B. Structural perturbation of longitudinal and lateral contact interfaces of tubulins induced by interaction with microtubule stabilizing compounds // Proc. 3rd Moscow Conference on Computational Molecular Biology. — Moscow, 2007. — P. 235–236.
91. Blume Ya.B., Nyporko A.Yu., Yemets A.I., Baird W.V. Are earlier predicted sites of different plant tubulins involved in interaction with dinitroanilines? // Mol. Biol. Cell. — 2002. — **13**(Suppl.). — P. 463a.
92. Fennell B.J., Naughton J.A., Dempsey E., Bell A. Cellular and molecular actions of dinitroaniline and phosphorothioamidate herbicides on *Plasmodium falciparum*: Tubulin as a specific antimalarial target // Mol. Biochem. Parasit. — 2006. — **145**. — P. 226–238.
93. Morissette N.S., Mitra A., Sept D., Sibley L.D. Dinitroanilines bind  $\alpha$ -tubulin to disrupt microtubules // Mol. Biol. Cell. — 2004. — **15**. — P. 1960–1968.
94. Mitra A., Sept D. Binding and interaction of dinitroanilines with apicomplexan and kinetoplastid  $\alpha$ -tubulin // J. Med. Chem. — 2006. — **49**. — P. 5226–5231.
95. Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., Olson A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function // J. Comp. Chem. — 1998. — **19**. — P. 1639–1662.
96. Nyporko A.Yu., Yemets A.I., Blume Ya.B. Protozoan and plant tubulins as specific targets for dinitroanilines and phosphoramidates: common structural features and interactive sites // Abstr. of 4<sup>th</sup> ISGO International Conf. of Structural Genomics. — Beijing, 2006. — P. 257–259.

Поступила 14.10.08