

УДК 546.100.02.3:547.15/17

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ ПО ЦИКЛОГЕКСЕНОВОМУ ИЛИ БОКОВОМУ ФРАГМЕНТУ АНАЛОГА

© 2020 г. В. П. Шевченко¹, И. Ю. Нагаев^{1,*}, А. И. Шапошников², К. В. Шевченко¹, А. А. Белимов², О. С. Юзихин^{2,3}, Т. Т. Исмаилов⁴, Т. С. Еремеккалиев⁵, Н. Е. Гоголева^{4,5}, Ю. В. Гоголев^{4,5}, академик РАН Н. Ф. Мясоедов¹

Поступило 27.09.2019 г.

После доработки 14.03.2020 г.

Принято к публикации 16.03.2020 г.

Разработана методика введения трития в боковую часть молекулы абсцизовой кислоты. Реакцию проводили в диоксане в присутствии катализатора Линдлара. Выход меченого препарата составил 70%, молярная радиоактивность — 44 Ки/моль. Проведено биологическое тестирование меченого препарата. Показано, что меченный тритием аналог абсцизовой кислоты служит ростовым субстратом для почвенных бактерий, которые включают радиоактивную метку в состав клеточных метаболитов. Поглощение метки бактериями из боковой цепи абсцизовой кислоты более чем на порядок превышает этот показатель для препаратов с меченой циклогексеновой частью молекулы. Полученные данные указывают на существование неизвестного ранее пути метаболизма абсцизовой кислоты у микроорганизмов.

Ключевые слова: мечение, тритий, абсцизовая кислота, катаболизм, ризосферные бактерии

DOI: 10.31857/S2686953520020107

Абсцизовая кислота (АБК) является основным стрессовым гормоном высших растений [1]. Его выработка способствует адаптации растений к неблагоприятным условиям внешней среды, таким как засуха, засоление почв, низкие температуры. По этой причине внимание многих исследователей сфокусировано на регуляции накопле-

ния АБК под действием абиотического стресса. Поскольку высокое содержание АБК ингибирует рост растений, прорастание семян и клубней [2], определение условий, снижающих концентрацию данного фитогормона в тканях и во внешней среде, является крайне важным этапом для разработки подходов, необходимых для гармоничного развития растений.

Известно, что рост-стимулирующие ризосферные бактерии (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) могут усиливать рост растений как благодаря образованию фитогормонов, активаторов роста — ауксинов и цитокининов, так и за счет утилизации 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) предшественника гормона старения — этилена [3]. Нами впервые была выявлена модуляция роста растений ризосферными бактериями благодаря их способности метаболизировать АБК [4]. Два штамма бактерий были охарактеризованы, что позволило отнести их к новым видам рода *Novosphingobium* и рода *Rhodococcium* [5, 6].

Целью работы является использование АБК, содержащей изотопную метку в разных положениях, для выяснения биохимических путей конверсии АБК у названных бактерий.

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН), Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт сельскохозяйственной микробиологии Российской Академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

⁵ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет”, Казань, Россия

*E-mail: nagaev@img.ras.ru

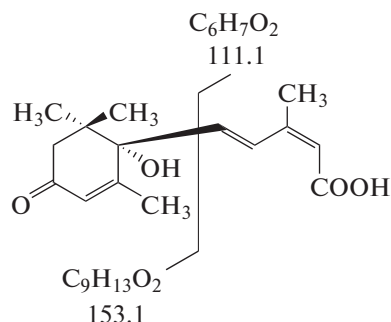


Рис. 1. Фрагментация молекулы абсцизовой кислоты.

Ранее нами был получен препарат АБК с замещением атомов протона на атомы трития в циклогексеновой части молекулы, преимущественно в альфа-положении от кетогруппы С-4 [7]. Для этого тритий вводился изотопным обменом с тритиевой водой при 220°C в присутствии диизо-пропилэтиламина. Меченый препарат метаболизировался АБК-деградирующими штаммами PGPR, однако, большая часть изотопной метки оставалась в культуральной жидкости. Поэтому необходимо было провести соответствующее исследование с АБК, содержащей тритиевую метку в боковой цепи молекулы.

Предварительные эксперименты для оптимизации включения трития в боковую цепь молекулы АБК проводили при использовании различных катализаторов (5% Pd/BaSO₄, (Ph₃P)₃RhCl, катализатор Линдлара) по отработанной схеме [8, 9]. При этом оказалось, что лучший выход и молярная радиоактивность наблюдались при использовании катализатора Линдлара, обработанного триэтиламином. В этих условиях параллельно проводили препаративный синтез при использовании газообразного дейтерия и газообразного трития.

При использовании трития в реакционную ампулу помещали раствор 9.5 мг АБК в 0.3 мл диоксиана, 5.6 мг катализатора Линдлара и 3 мкл триэтиламина. Смесь замораживали жидким азотом, вакуумировали и вводили газообразный тритий до давления 400 гПа. Реакцию вели 1.5 ч при перемешивании при комнатной температуре. Затем содержимое ампулы вновь замораживали жидким азотом, вакуумировали и удаляли лабильный тритий упариванием с метанолом (3 × 1 мл). Меченый препарат очищали методом ВЭЖХ на колонке с сорбентом Kromasil 100 C18 ("Eka Chemicals AB", Швеция, размер 8 × 150 мм, размер частиц 7 мкм), в системе метанол:вода:уксусная кислота (40:60:0.1), скорость потока — 2 мл/мин. Для анализа радиохимической чистоты полученного препарата использовали колонку Reprosil pur C18aq ("Dr. Maisch GmbH", Германия, размер 4 × 150 мм, размер частиц 5 мкм),

элюент А — метанол:вода:уксусная кислота (30:70:0.1), элюент Б — метанол, линейный градиент от 0 до 50% Б в течение 15 мин, скорость потока 1 мл/мин. А также колонку Prontosil 120 C18aq (размер 4 × 150 мм, размер частиц 5 мкм), элюент А — метанол:вода:уксусная кислота (30:70:0.1), элюент Б — метанол, линейный градиент от 0 до 50% Б в течение 15 мин, скорость потока 1 мл/мин. Выход меченого препарата составил 70%, молярная радиоактивность 44 Ки/моль.

Масс-спектрометрические данные получены на приборе LCQ Advantage MAX (Термоэлектрон, США), с ионизацией электрораспылением, прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл в метаноле и дальнейшей фрагментацией молекулярного пика в отрицательных ионах в анализаторе методом ионных соударений с гелием при 35 эВ. Исследование распределения дейтерия между циклической и ациклической частями молекулы АБК проводили по методике [7]. Молекулярный моноизотопный пик для молекулы немеченой АБК, ее циклогексенового фрагмента и боковой цепи наблюдали при $m/z = 263$, 153 и 111, соответственно (рис. 1). Включение дейтерия в молекулу АБК — 1.73 атома. Содержание дейтерия в ациклическом фрагменте молекулы АБК — 92–95%.

Определение способности АБК-утилизирующих бактерий *Novosphingobium* sp. PW6 и *Rhodococcus* sp. P1Y включать в свой метаболизм меченую тритием АБК и накапливать радиоактивный изотоп проводили по следующей методике.

Для этого бактериальные культуры выращивали на минеральной среде, содержащей KН₂РO₄ 13.6 г/л, NH₄Cl 1.0 г/л, MgSO₄ 0.3 г/л, Fe-chelate 64 мг/л, CaCl₂ 0.4 г/л, NaOH 1.4 г/л, pH 6.5 с добавлением АБК из расчета 250 мг/л. При выходе культуры на логарифмическую стадию роста (оптическая плотность OD₆₀₀ 0.2 OE) в питательную среду добавляли меченую АБК до 0.5 мКи/мл. Через 3 ч клетки бактерий осаждали из культуральной жидкости (КЖ) центрифугированием (10000 g, 5 мин), смешивали с мелкодисперсным

Таблица 1. Значения радиоактивности фракций, полученных при анализе лизатов клеток бактерий методом ВЭЖХ

№ фракции	Метаболиты АБК, меченой ^3H в циклогексеновой части (положение С-3', С-5')		Метаболиты АБК, меченой ^3H в боковой цепи (положение С-4,5)	
	<i>Rhodococcus</i> sp. P1Y	<i>Novosphingobium</i> sp. P6W	<i>Rhodococcus</i> sp. P1Y	<i>Novosphingobium</i> sp. P6W
Значения радиоактивности фракций лизатов клеток бактерий (имп./мин/ 10^6 клеток)				
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	18	0	182
6	63	41	383	297
7	31	60	945	46
8	45	0	96	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
Значения радиоактивности фракций культуральной жидкости (имп./мин/мл)				
1	525	5610	0	830
2	117	116	0	0
3	131	57	0	0
4	52	11	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	2640	5980
7	735	1030	5035	484
8	6770	112	111	19
9	280	46	109	0
10	0	0	0	0

кварцевым стеклом (Sigma-Aldrich, США) и разрушали с помощью гомогенизатора Tissue Lyser TL (Qiagen, Германия). Полученные лизаты клеток осветляли центрифугированием (13500 g, 10 мин) и фракционировали методом ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила с использованием хроматографа Prep150 (Waters, США) на колонке XBridge Prep C18 OBD. Радиоактивность хроматографических фракций определяли с использованием жидкосцинтилляционного спектрометра QUANTULUS 1220 (Perkin Elmer, США). Одновременно фракционировалась и исследовалась культуральная жидкость и раствор АБК в качестве стандарта.

Превращение АБК бактериями подтверждалось обнаружением соединений, содержащих тритий в различных хроматографических фракциях бактериальных лизатов и культуральной жидкости. Результаты представлены в табл. 1.

На хроматограмме культуральной жидкости при 254 нм зарегистрирован пик со временем удерживания 2.5 мин, который соответствовал

АБК. Этому пику соответствовали высокие значения радиоактивности в начальной фракции КЖ *Novosphingobium* sp. P6W. В значительно большей степени это выражено для препарата АБК, меченного в циклогексеновой части. Во всех лизатах бактериальных клеток, инкубированных 3 ч в питательной среде с мечеными препаратами АБК, радиоактивность не была зарегистрирована. Это свидетельствует о том, что нативная АБК не проникает в клетки бактерий. Незначительные величины β -распада регистрировались так же в средних фракциях лизатов клеток, инкубированных с препаратом АБК с тритием в положениях С-3', С-5'. Значительно большее возрастание радиоактивности (до 945 имп./мин/ 10^6 клеток) наблюдалось во фракциях клеточных метаболитов с временем удержания 12–14 мин в вариантах с меткой в боковой цепи АБК. Это свидетельствует о фрагментации (деацилировании) фитогормона ферментами АБК-разлагающих бактерий и преимущественном включении в клеточный метаболизм производных боковой цепи молекулы.

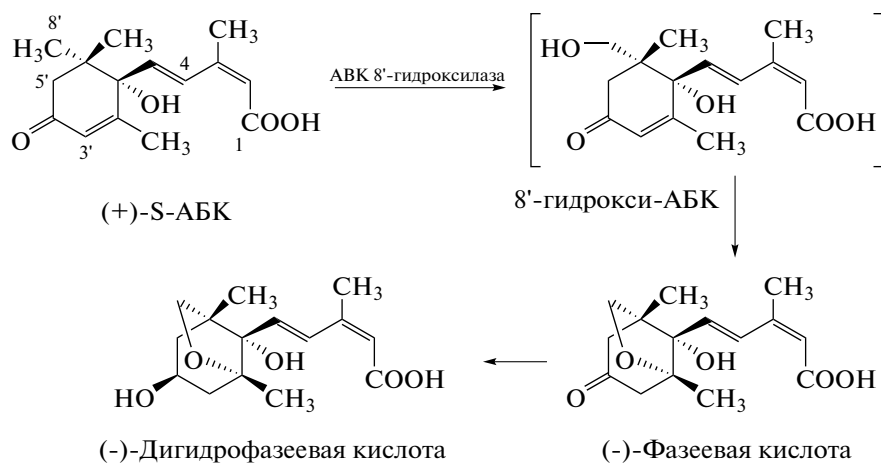


Рис. 2. Катаболизм АБК у растений.

Ранее было показано [10], что у растений катаболизм АБК начинается с гидроксирования в положении С-8' при участии фермента семейства CYP707A (рис. 2). Затем 8'-гидрокси-АБК спонтанно изомеризуется в фазеевую кислоту в результате внутренней циклизации 8'-гидроксила по положению С-2' с образованием енона. На заключительной стадии 4'-кетогруппа ферментативно восстанавливается до гидроксила с образованием дегидрофазеевой кислоты. Таким образом, у растений превращение АБК затрагивает только циклическую часть молекулы, что ведет к значительной (хотя и не полной) инактивации данного стрессового фитогормона.

Информация о механизме микробной трансформации АБК до настоящего времени весьма ограничена [11]. Имеется сообщение, что бактерии, изолированные из АБК-обогащенной почвы, превращают этот фитогормон в дегидрофомиол *in vitro* и обладают вомифолдегидрогеназной активностью [12]. Полученные нами результаты свидетельствуют о существовании нового, не описанного ранее биохимического пути трансформации и утилизации АБК ризосферными бактериями. Расшифровка данного пути, по нашему мнению, заслуживает особого внимания. Ежегодно с опадом листьев и отмирающими частями растений в почву вносится значительное количество АБК, что может привести к замедлению прорастания семян и угнетению роста растений. Кроме того, выработка АБК является фактором вирулентности многих фитопатогенных грибов за счет снижения иммунитета растений в результате стрессовых реакций [11]. Таким образом, АБК-утилизующая способность PGPR может оказывать биопротекторное действие на растения и служить повышению плодородия почвы, восстанавливая ее гормональный баланс.

Изучение данного процесса поможет в разработке новых биопрепаратов для растениеводства.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работу проводили частично при поддержке гранта Российского научного фонда № 17-14-01363 и программ фундаментальных исследований Президиума РАН “Инновационные разработки в биомедицине” и “Постгеномные технологии и перспективные решения в биомедицине”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhu J.K. // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. V. 53. P. 247–273.
2. Sharp R.E., LeNoble M.E. // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. № 336. P. 33–37.
3. Dodd I.C., Zinovkina N.Y., Safronova V.I., et al. // Annals of Applied Biology. 2010. V. 157. № 3. P. 361–379.
4. Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., et al. // Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 74. P. 84–91.
5. Gogoleva N.E., Nikolaichik Y.A., Ismailov T.T., et al. // Microbiol. Resour. Announc. 2019. V. 8. № 15. e01591-18.
6. Gogoleva N.E., Nikolaichik Y.A., Ismailov T.T., et al. // 3 Biotech. 2019. V. 9. № 94. P. 1–8.
7. Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Shaposhnikov A.I., et al. // Doklady Chemistry. 2018. V. 483. № 1. P. 268–271.
8. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // Хим-фарм. журнал. 1999. Т. 33. № 6. С. 14–27.
9. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // Успехи химии. 1999. Т. 68. № 10. С. 944–966.
10. Nambara E., Marion-Poll A. // Annu. Rev. Plant Biol. 2005. V. 56. P. 165–185.
11. Spence C., Bias H. // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 27. P. 52–58.
12. Hasegawa S., Poling S.M., Maier V.P., et al. // Phytochem. 1984. V. 23. № 12. P. 2769–2771.

COMPARATIVE STUDY OF THE ABSCISIC ACID METABOLISM USING TRITIATED ANALOGUE LABELLED IN CYCLOHEXENE OR SIDE FRAGMENT

V. P. Shevchenko^{a, #}, I. Yu. Nagaev^a, A. I. Shaposhnikov^b, K. V. Shevchenko^a, A. A. Belimov^b,
O. S. Yuzikhin^{b, c}, T. T. Ismailov^d, T. S. Ermekkaliev^e, N. E. Gogoleva^{d, e},
Yu. V. Gogolev^{d, e}, and Academician of the RAS N. F. Myasoedov^a

^a Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology of Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russian Federation

^c All-Russian Institute Of Plant Protection, Saint Petersburg, Russian Federation

^d Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences", Kazan, Russian Federation

^e Kazan Federal University, Kazan (Volga region), Russian Federation

[#]E-mail: nagaev@img.ras.ru

A technique has been developed for introducing tritium into the side part of an abscisic acid molecule. The reaction was carried out in dioxane in the presence of a Lindlar catalyst. The output of the labelled drug was 70%, molar radioactivity – 44 Ci/mol. Biological testing of the labelled compounds was carried out. It has been shown that a tritium-labeled abscisic acid analog serves as a growth substrate for soil bacteria that incorporate a radioactive label into cellular metabolites. Absorption of the label by bacteria from the side chain of abscisic acid is more than an order of magnitude higher than that for drugs with a labeled cyclohexene moiety. The data obtained indicate the existence of a previously unknown pathway for the metabolism of abscisic acid in microorganisms.

Keywords: labeling, tritium, abscisic acid, catabolism, rhizosphere bacteria