

УДК 577.175.14

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОСИНТЕЗА АРОМАТИЧЕСКИХ
И ИЗОПРЕНОИДНЫХ ЦИТОКИНИНОВВ. Е. Ословский¹, Е. М. Савельева², М. С. Дреничев¹, Г. А. Романов², С. Н. Михайлов^{1,*}

Представлено академиком РАН А.А. Макаровым 08.05.2019 г.

Поступило 23.05.2019 г.

С целью сравнительного изучения путей биосинтеза ароматических и изопреноидных цитокининов получена серия нуклеозидных производных природных цитокининов и определена их гормональная активность в тест-системе на основе проростков *Arabidopsis thaliana*. Известно, что цитокининовые нуклеозиды не обладают гормональной активностью и приобретают её только после удаления остатка рибозы в N^9 -положении. Опыты показали, что рибо- и 5'-дезоксирибопроизводные N^6 -изопентениладенина способны превращаться в активный цитокинин *in planta* и проявляли цитокининовую активность, в то время как 5'-дезоксинуклеозиды ароматических цитокининов были неактивными. Поскольку 5'-дезоксинуклеозиды не способны фосфорилироваться *in vivo*, прямой путь образования активных цитокининов за счёт расщепления нуклеотидов становится невозможным. Обнаружение активности 5'-дезоксинуклеозидов изопреноидных цитокининов и отсутствие активности у 5'-дезоксинуклеозидов ароматических цитокининов указывает на различие в их биосинтезе.

Ключевые слова: Цитокинины, биосинтез, цитокининовые нуклеозиды, цитокининовая активность.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524886673-676>

Цитокинины — группа фитогормонов, играющих важную роль во всех процессах роста и развития растений [1, 2]. Природные цитокинины представляют собой производные аденина, содержащие в N^6 -положении гидрофобный заместитель. В зависимости от структуры заместителя цитокинины разделяют на две группы: изопреноидные, включающие N^6 -изопентениладенин (iP) и зеатины, и ароматические, включающие N^6 -бензиладенин (BA), тополины и кинетин (рис. 1) [1, 2]. При этом собственной гормональной активностью обладают только цитокинины-основания, но не их производные, в том числе рибозиды [3, 4].

В настоящее время биосинтез цитокининов до конца не выяснен. Наиболее изученным является биосинтез изопреноидных цитокининов, в частности iP, в то время как биосинтез ароматических цитокининов практически не изучен [5]. Предполагается, что ключевым этапом биосинтеза iP является катализируемый изопентенилтрансферазой перенос изопентенильного остатка от диметилаллилдифосфата (DMAPP) к N^6 -положению аденозин-5'-моно-, ди- или трифосфата (AMP, ADP, ATP) с образованием соответствующих нуклеотидов (iPRMP, iPRDP, iPRTP) (рис. 2). iPRDP и iPRTP

способны дефосфорилироваться до iPRMP под действием фосфатазы. Далее выделяют два пути образования iP:

1) происходит катализируемое 5'-рибонуклеотидфосфогидролазой дефосфорилирование iPRMP с образованием N^6 -изопентениладенозина (iPR) и с последующим гидролизом *N*-гликозидной связи под действием аденозиннуклеозидазы;

2) iPRMP может напрямую расщепляться до iP действием фосфорибогидролазы (LOG). При этом LOG специфически связывается только с 5'-монофосфатами цитокининовых нуклеозидов, но не с ди- или трифосфатами, AMP и цитокининовыми рибозидами [6].

В нашей работе предложен новый подход для сравнительного изучения путей биосинтеза ароматических и изопреноидных цитокининов. Получена серия рибо- и 5'-дезоксирибопроизводных iP, BA и N^6 -фенилэтиладенина [7]. Известно, что нуклеозиды в клетках метаболизируются до 5'-моно-, ди- и трифосфатов под действием клеточных нуклеозидкиназ и что с этим механизмом связана биологическая активность большинства нуклеозидных аналогов [8]. Серия 5'-дезоксипроизводных получена с целью изучения необходимости фосфорилирования нуклеозидов в механизмах биосинтеза цитокининов, поскольку такие соединения не могут фосфорилироваться в клетках и превращаться в основание по пути расщепления 5'-монофосфата ферментом LOG (рис. 2, превращение 6).

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской Академии наук, Москва

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской Академии наук, Москва

*E-mail: smikh@eimb.ru

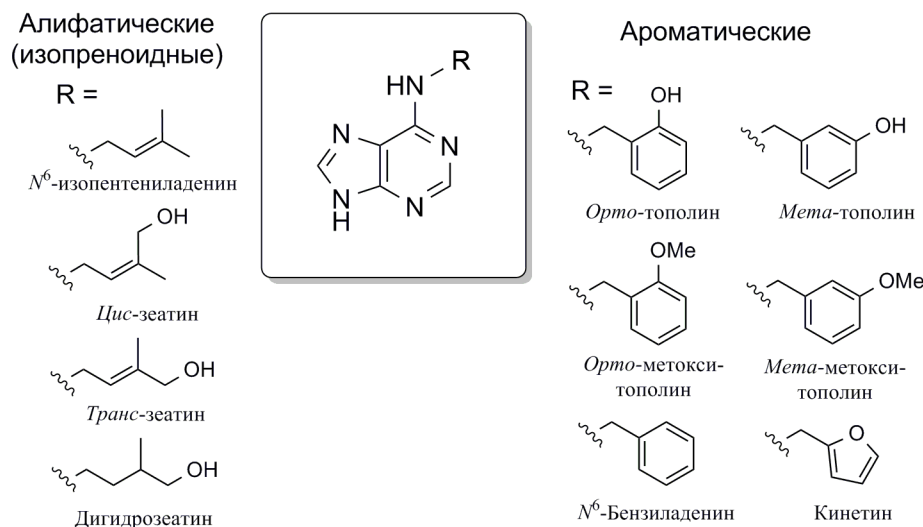


Рис. 1. Структура природных цитокининов.

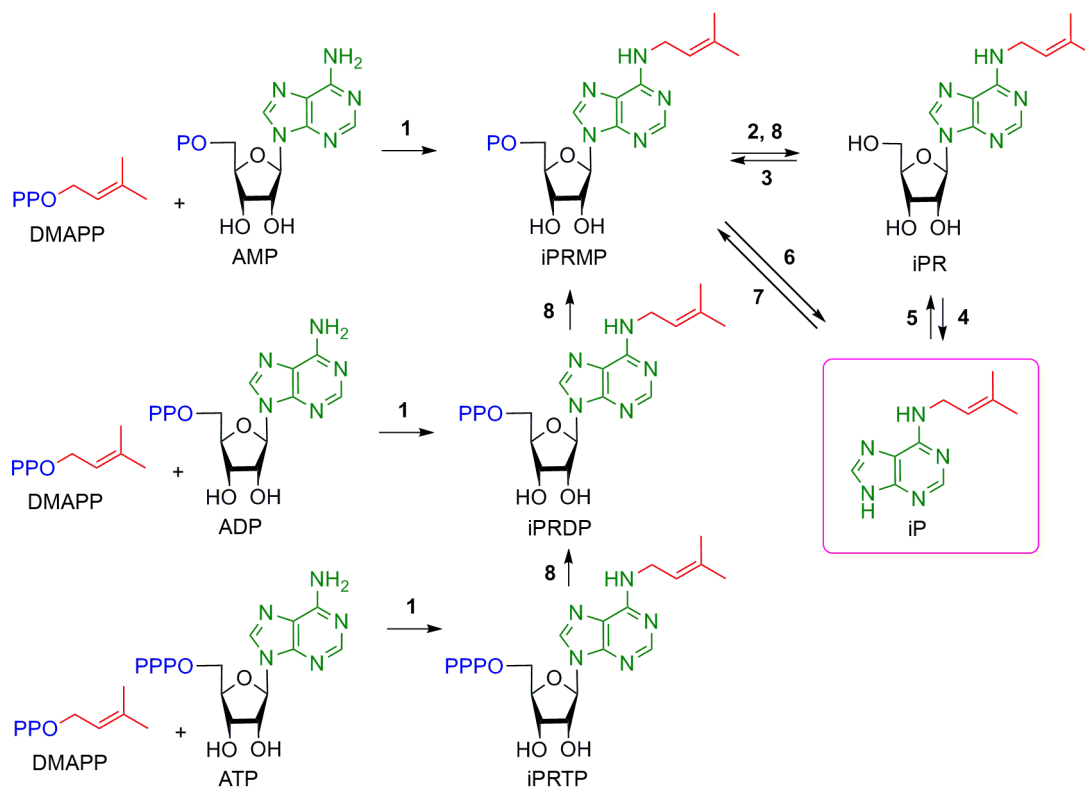
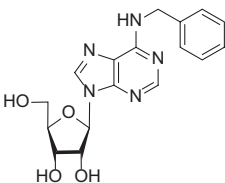
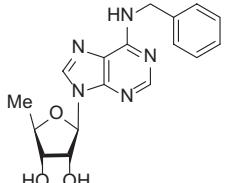
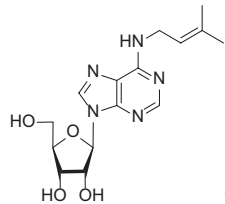
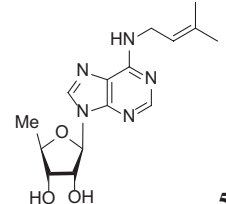
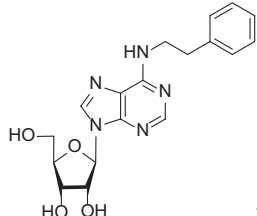
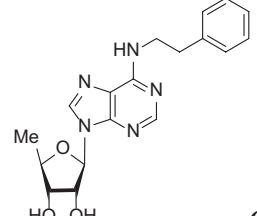


Рис. 2. Схема биосинтеза iP. 1 – изопентенилтрансфераза; 2 – 5'-рибонуклеотидфосфогидролаза (5'-нуклеотидаза), 3 – аденозинкиназа, 4 – аденозиннуклеозидаза, 5 – пурииннуклеозидфосфорилиза, 6 – фосфорибогидролаза (LOG), 7 – аденинфосфорибозилтрансфераза, 8 – фосфатаза.

Цитокининовая активность этих соединений в двух концентрациях (10^{-5} и 10^{-6} М) была исследована в тест-системе на основе проростков модельного растения *Arabidopsis thaliana* [9]. Стоит отметить, что концентрация 10^{-6} М является более физиологичной. В работе использовали двойные инсерционные мутанты по рецепторам цитокининов, у которых в каждом мутантном клоне активен только один из

трех рецепторов (АНК2, АНК3 или CRE1/АНК4/WOL), а также растения с тремя работающими рецепторами (WT) (табл. 1). Все используемые растения трансформированы геном *GUS*, который поставлен под контроль промотора гена первичного ответа на цитокинины *ARR5*. Гормональную активность соединений определяли по уровню *GUS*-активности, отражающей интенсивность экспрессии

Таблица 1. Цитокининовая активность нуклеозидных производных в биотесте на основе проростков *Arabidopsis thaliana* (% от активности ВА соответствующей концентрации)*

	Рибонуклеозиды					5'- дезоксирибонуклеозиды				
	Концентрация	WT	АНК2	АНК3	АНК4	Концентрация	WT	АНК2	АНК3	АНК4
1	 1					 4				
	Концентрация	WT	АНК2	АНК3	АНК4	Концентрация	WT	АНК2	АНК3	АНК4
	10 ⁻⁵ М	116 ± 5	90 ± 5	59 ± 5	43 ± 1	10 ⁻⁵ М	22 ± 1	12 ± 1	7 ± 0,2	6 ± 0,4
	10 ⁻⁶ М	75 ± 3	94 ± 9	77 ± 4	51 ± 3	10 ⁻⁶ М	9 ± 1	3 ± 0,6	4 ± 1	1,5 ± 0,1
2	 2					 5				
	Концентрация	WT	АНК2	АНК3	АНК4	Концентрация	WT	АНК2	АНК3	АНК4
	10 ⁻⁵ М	113 ± 6	94 ± 6	55 ± 4	40 ± 1	10 ⁻⁵ М	87 ± 7	67 ± 9	34 ± 5	51 ± 2
	10 ⁻⁶ М	52 ± 6	114 ± 5	80 ± 4	40 ± 5	10 ⁻⁶ М	41 ± 6	20 ± 2	9 ± 1	11 ± 1
3	 3					 6				
	Концентрация	WT	АНК2	АНК3	АНК4	Концентрация	WT	АНК2	АНК3	АНК4
	10 ⁻⁵ М	53 ± 3	75 ± 8	32 ± 4	19 ± 1	10 ⁻⁵ М	15 ± 3	10 ± 1	14 ± 5	4 ± 0,2
	10 ⁻⁶ М	28 ± 3	38 ± 0,5	12 ± 1	16 ± 0,1	10 ⁻⁶ М	7 ± 1	5 ± 1	10 ± 1	4 ± 0,2

Примечание. * Данные на основе трёх биологических повторностей.

конструкции *Parr5:GUS* [9], и рассчитывали в процентах от активности ВА. Соединения со значениями активности менее 30% от активности ВА считали мало- или неактивными.

Рибозиды ВА и iP (**1**, **2**) проявляют цитокининовую активность во всех экспериментальных вариантах. В случае *N*⁶-фенилэтиладенозина **3**, который не является природным цитокинином, активность в концентрации 10⁻⁶ М видна только для рецептора АНК2. 5'-дезоксипроизводное iP **5** при большей концентрации показало активность при взаимодействии со всеми индивидуальными рецепторами, в то время как 5'-дезоксипроизводные ароматических цитокининов **4**, **6** оказались неактивными даже при концентрации 10⁻⁵ М. Нуклеозид **5** не может фос-

форилироваться *in vivo* и тем самым блокируется путь превращения из iPRMP в iP под действием фосфорибогидролазы LOG, но поскольку это соединение сохраняет цитокининовую активность, то единственно возможным путем его превращения в активную форму остается расщепление нуклеозида аденозиннуклеозидазой. В свою очередь нуклеозид **4** оказался полностью неактивным, и поскольку блокирован путь превращения в активную форму действием LOG, то можно сделать вывод, что для ароматических цитокининов этот механизм биосинтеза, по-видимому, является основным.

Известно, что аденозиннуклеозидаза, выделенная из различных источников, обладает широкой субстратной специфичностью. Субстратами для этого

фермента являются аденозин, гуанозин, инозин, N^6 -бензиладенозин, N^6 -изопентениладенозин, а также 5'-дезоксаденозин, 2'-дезоксаденозин и другие пуриновые нуклеозиды [11, 12]. Несмотря на эти данные, нельзя исключать, что отсутствие активности полученных соединений может быть связано с субстратной специфичностью аденозиннуклеозидазы у данного вида растений.

Таким образом, получена серия нуклеозидных производных изопреноидных и ароматических цитокининов и определена их цитокининовая активность в тест-системе на основе проростков *Arabidopsis thaliana*. Продемонстрировано, что рибо- и 5'-дезоксирибопроизводные iP, а также рибозиды ароматических цитокининов ВА и N^6 -фенилэтиладенина способны превращаться в активные цитокинины *in planta* и проявляют цитокининовую активность, в то время как 5'-дезоксипроизводные ароматических цитокининов неактивны. Следовательно, не только рибо-, но и дезоксирибонуклеозиды могут служить предшественниками активных цитокининов. Однако в последнем случае единственным путём биосинтеза ароматических цитокининов, вероятно, является катализируемое фосфоририбогидролазой LOG прямое расщепление 5'-монофосфатов до активных оснований, тогда как биосинтез изопреноидных цитокининов происходит также за счёт катализируемого аденозиннуклеозидазой гидролиза нуклеозидов. Однако, поскольку испытания проводились только на одном виде растений, нельзя исключать, что у других видов растений пути биосинтеза цитокининов могут отличаться. С учётом многообразия

эффектов цитокининов на рост, развитие, устойчивость и продуктивность растений, полученные знания могут способствовать появлению новых подходов к управлению ростом и развитием ценных для человека видов растений.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 18–34–00084 и № 17–04–00969.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sakakibara H. // Annu. Rev. Plant Biol. 2006. V. 57. P. 431–449.
2. Romanov G.A. // Rus. J. Plant Physiol. 2009. V. 56. P. 268–290.
3. Lomin S.N., Krivosheev D.M., et al. // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 1851–1863.
4. Savelieva E.M., Oslovsky V.E., et al. // Phytochemistry. 2018. V. 149. P. 161–177.
5. Kamínek M. // J. Plant Growth Regul. 2015. V. 34. P. 723–739.
6. Komada-Nobusada T., Sakakibara H. // Phytochemistry. 2009. V. 70. P. 444–449.
7. Drenichev M.S., Oslovsky V.E., et al. // Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 111. P. 84–94.
8. Jordheim L.P., Durantel D., et al. // Nat. Rev. Drug Discov. 2013. V. 12. P. 447–464.
9. Romanov G.A., Kieber J.J., Schmölling T. // FEBS Lett. 2002. V. 515. P. 39–43.
10. Abusamhadneh E., McDonald N.E., Kline P.C. // Plant Science. 2000. V. 153. P. 25–32.
11. Chen C.M., Kristopeit S.M. // Plant Physiol. 1981. V. 68. P. 1020–1023.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE BIOSYNTHESIS OF ISOPRENOID AND AROMATIC CYTOKININS

V. E. Oslovsky¹, E. M. Savelieva², M. S. Drenichev¹, G. A. Romanov², S. N. Mikhailov¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

² Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Presented by Academician of the RAS A.A. Makarov May 8, 2019

Received May 23, 2019

To compare the biosynthesis pathways of aromatic and isoprenoid cytokinins, a series of nucleoside derivatives of natural cytokinins was synthesized and their cytokinin activity was determined in a test system based on the model plant *Arabidopsis thaliana*. Cytokinin nucleosides are known to lack the hormonal activity until cleaving the ribose moiety at the position 9. Our experiments have shown that both ribo- and 5'-deoxyribo derivatives of N^6 -isopentenyladenine were able to turn into active cytokinins *in planta* exhibiting cytokinin activity. By contrast, 5'-deoxy nucleosides of aromatic cytokinins did not show similar activity. Since 5'-deoxy nucleosides cannot phosphorylate *in vivo*, the direct pathway of active cytokinin formation by cleavage of nucleotides is blocked here. The detected activity in 5'-deoxy nucleosides of isoprenoid cytokinins and the lack of the activity in 5'-deoxy nucleosides of aromatic cytokinins indicates a difference in the biosynthesis of these compounds.

Keywords: cytokinins, biosynthesis, cytokinin nucleosides, cytokinin activity.