

УДК 581.143.6

А.А. ОГАНЕСЯН

ДЕЙСТВИЕ ЭЛИСИТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА АКТИВНОСТЬ
ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ЛИГНАНОВ В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ
LINUM AUSTRIACUM L.

Исследовано влияние элиситоров (маннана, β -1,3-глюкана и ансимидола) на активность некоторых ключевых ферментов, участвующих в биосинтезе лигнанов и лигнинов в каллусных культурах *Linum austriacum*. Определены активности L-фенилаланин-аммиак-лиазы, полифенолоксидазы, тирозиназы, растворимой фенолазы, мембранно-связанной и растворимой оксидазы.

Показано, что стимулирование элиситорами синтеза подофиллотоксина и пельтатина сопровождается увеличением активности некоторых ферментов метаболического пути их биосинтеза, а исследованные элиситоры действуют на разные ее этапы.

Лигнаны – это большая группа природных соединений, которые в основном обнаруживаются у цветковых растений и обладают высокой биологической активностью. Идентифицировано несколько сот представителей этого класса соединений, которые образованы из двух фенилпропаноидных единиц [1]. Этопозид и тенипозид, полусинтетические производные подофиллотоксина, широко используются в качестве противоопухолевых препаратов [2]. Химический синтез лигнанов, имеющих фармакологическую значимость, трудно выполним и экономически невыгоден. Подофиллотоксины (Ptox) обычно экстрагируют из природных корней *Podophyllum hexandrum* и *P. peltatum*, запасы и ареал распространения которых ограничены. Кроме того, их каллусные культуры растут очень плохо, накапливают малые количества Ptox и не могут служить в качестве стабильного источника его получения. Источниками Ptox являются также растения семейства *Linaceae* рода *Linum*, каллусные культуры которых способны синтезировать и накапливать лигнаны [2–5]. Суспензионные и каллусные культуры *Linum* растут намного лучше, но они в основном накапливают 5-метокси-подофиллотоксин (5-mPtox).

Ранее было показано, что использование различных элиситоров приводит к индукции вторичного метаболизма и усилению биосинтеза многих классов вторичных метаболитов [6–8]. Целью настоящей работы являлось

исследование действия элиситоров (маннана, β -1,3-глюкана и ансимидола) на биосинтез Pтох и пельтатинов, а также на активность ряда ферментов, участвующих в регуляции метаболизма биосинтеза лигнанов в каллусных культурах *L. austriacum*.

Методика. Объектом исследования являлись каллусные культуры льна, полученные из стерильных проростков. В работе были использованы семена *L. austriacum* экспозиции 1999 года. Семена стерилизовали в течение 20 мин в 96%-ом этаноле, дважды промывали в стерильной воде, инкубировали 30 мин в 1%-ом растворе гипохлорида кальция и повторно 3 раза промывали стерильной водой. Семена проращивали в дважды разбавленной МС-среде [9]. Гипокотиль и стебель проростков (0.4–1 г) разрезали на кусочки по 0.1 г, которые для инициации каллусогенеза помещали на модифицированную питательную МС-среду [9] следующего состава: 30 г/л сахарозы, 8 г/л агар, 0.1 мг/л тиамин-НCl, 100 мг/л мио-инозитола, 1 мг/л никотиновой кислоты, 1 мг/л пиридоксин-НCl, 0.5 мг/л БАП и 0.05 мг/л α -НУК (все препараты фирмы “Sigma”, США). Каллусы после пересева выращивали в течение 15 дней при 24°C и непрерывном освещении (3000 лк) на средах, содержащих элиситоры (маннан (0.1 мг/мл), β -1,3-глюкан (0.1 мг/мл) и ансимидол (10^{-7} M) фирмы “Sigma”), которые перед автоклавированием были введены в питательную среду.

Отбор проб для химического анализа проводили из лиофильно высушенной каллусной ткани. Ткани (0.2 г) растирали в фарфоровой ступке, смешивали с 2 мл этанола и гомогенизировали 2 раза по 30 с на высокоскоростном гомогенизаторе MPW-302 (Польша) при непрерывном охлаждении. В полученную суспензию добавляли 6 мл дистиллированной воды и доводили pH 0.6%-ой о-фосфорной кислотой до 5.4, после чего добавляли 0.1 мл дистиллированной воды, содержащей 0.1 мг β -глюкозидазы. Смесь инкубировали в течение 1 ч на водяной бане при 35°C. В полученную смесь добавляли 12 мл этанола для улучшения растворения лигнанов и инкубировали 30 мин при 70°C в ультратермостате. Затем суспензию центрифугировали 15 мин при 12000g, отделяли надосадочную жидкость и использовали ее для хроматографического анализа. Полученные препараты хранили при –20°C.

Определение относительного содержания Pтох, 5-mPтох, дезоксиподофиллотоксина (de-Pтох), α - и β -пельтатинов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на установке HPLC–Termo Quest (Германия), используя колонки Spherisorb ODS–2 (фирма “Sigma”, США) по методу [5].

В качестве стандартов использовали коммерческие препараты Pтох, α - и β -пельтатинов, 5-mPтох, de-Pтох (фирма “Roth”, Германия). Все пики, соответствующие значениям R_t – Pтох, 5-mPтох, de-Pтох, α - и β -пельтатинов, – по специальной программе сравнивались со спектрами поглощения используемых стандартов. Концентрацию Pтох определяли при 290 нм по уравнению $C = \sqrt{S \cdot 350 / \epsilon}$, где S – площадь пика, ϵ – экстинкция, равная 29000.

Определение активностей ферментов (в кат/кг белка) фенилаланин-аммиак-лиазы (ФАЛ) проводили по методу [10], тирозиназы (ТАЛ) – по

[11], полифенолоксидазы (ПФО) и фенолоксидазы (СЗН) – по [12, 13], мембранносвязанной (м-ОД) и растворимой (р-ОД) оксидаз – по [14] на спектрофотометре Specord M-400 (Германия), а определение белка – по методу Лоури [15]. Биологическая повторность опытов 4–6-кратная при проведении 2–3 серий в каждом. В табл. 1 и 2 приведены средние арифметические и стандартные ошибки ($n = 8-12$).

Результаты и обсуждение. Устойчивость растений к действию различных патогенов и изменению функционального статуса часто коррелирует с высоким содержанием в тканях фенольных соединений и продуктов их метаболизма. При исследовании путей биосинтеза лигнанов обычно основное внимание уделяется активностям ферментативных систем, принимающих непосредственное участие в биосинтезе подофиллотоксинов, таких, как ФАЛ и др. Ряд данных указывает на то, что ключевые ферменты основных метаболических путей, таких, как фенилпропаноидный, активируются при добавлении в питательную среду элиситоров [6–8]. В качестве элиситоров для индукции вторичного метаболизма используются некоторые полисахариды, такие, как дрожжевой маннан, β -1,3-глюкан и ансимидол. Полученные нами каллусные культуры *L. austriacum* были использованы в качестве модельной системы для изучения механизма действия этих элиситоров на стимулирование биосинтеза лигнанов.

Каллусные культуры *L. austriacum* способны накапливать лигнаны, в том числе Pтох и 5-mPтох, которые обнаруживаются в виде глюкозидов, de-Pтох, α - и β -пелтатинов, нескольких видов флавоноидов и кониферолов.

Таблица 1

Содержание лигнанов в каллусных культурах *L. austriacum* (мг/г сухого веса)

Лигнаны	Среда			
	МС	МС + маннан	МС + ансимидол	МС + β -1,3-глюкан
α -пелтатин	1.28 $\pm$ 0.06	2.86 $\pm$ 0.07	1.40 $\pm$ 0.06	4.31 $\pm$ 0.23
Pтох	0.43 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.04
5-iPтох	1.21 $\pm$ 0.05	2.66 $\pm$ 0.07	1.54 $\pm$ 0.07	–
de-Pтох	0.42 $\pm$ 0.01	0.60 $\pm$ 0.01	0.63 $\pm$ 0.03	–
β -пелтатин	0.52 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.02	–	–
Σ лигнанов	3.87 $\pm$ 0.19	7.71 $\pm$ 0.19	4.14 $\pm$ 0.02	5.10 $\pm$ 0.28

Содержание лигнанов в каллусных культурах *L. austriacum*, пассируемых в контрольной среде и после элиситации, приведено в (табл. 1). Результаты свидетельствуют о том, что использование элиситоров различной природы в каллусных культурах *L. austriacum* сильно отражается на количественном и качественном спектрах образования лигнанов. Как видим, при воздействии маннана синтезируется намного больше вторичных метаболитов в каллусных культурах, чем в контрольных. Присутствие ансимидола также приводит к количественному увеличению лигнанов, кроме β -пелтатина, который не обнаруживается. Особый интерес представляет нарушение биосинтеза некоторых производных подофиллотоксинов и пелтатинов под действием β -1,3-глюкана. Подобная картина обнаруживается только в том случае, если элиситоры обладают свойством избирательного действия на

Биосинтез лигнанов происходит главным образом фенилпропаноидным путем из шикимовой кислоты. В биосинтезе участвуют как лиазы, так и оксидазы. Предполагаемые пути биосинтеза лигнанов показаны на рис. 1.



Таблица 2

Фермент	Среды			
	МС	МС+маннан	МС+ансимидол	МС+β-1,3-глюкан
ФАЛ	2.034±0.102	2.248±0.056	1.740±0.085	1.448±0.080
ТАЛ	0.059±0.004	0.072±0.004	0.036±0.004	0.049±0.001
СЗН	2.096±0.120	2.320±0.060	1.740±0.117	1.497±0.020
ПФО	1.463±0.032	1.611±0.100	1.252±0.085	1.496±0.015
м-ОД	0.187±0.007	0.312±0.019	0.218±0.015	0.238±0.016
р-ОД	0.938±0.052	0.270±0.011	0.822±0.070	0.426±0.036

Маннан (гликопептид, полученный из экстрактов дрожжей) известен как сильный элиситор, который активизирует шикиматные и фенилпропа-

ноидные пути [7, 8] и стимулирует активность ферментов, участвующих в метаболизме лигнанов, кроме р-ОД. Самая высокая активность наблюдается для ТАЛ – 22 %. ФАЛ, СЗН и ПФО были активированы приблизительно на 10% по сравнению с контролем (см. рис. 2). Под действием маннана, как и в случае других патогенов [16–18], в цитозоле увеличивается концентрация H_2O_2 , одной из причин тому может быть ингибирование активности цитоплазматической р-ОД. Примечательно, что маннан стимулирует биосинтез общего количества лигнанов приблизительно на 100%.

Ансимидол (α -циклопропил-(4-метоксифенил)-5-пиримидинил-метанол) ингибирует активность цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ в растениях и гидроксилирование метаболитов, участвующих в формировании лигнанов. Под действием ансимидола понижается активность дезоксиподофилло-токсин-4-гидроксилаз, что приводит к ингибированию биосинтеза

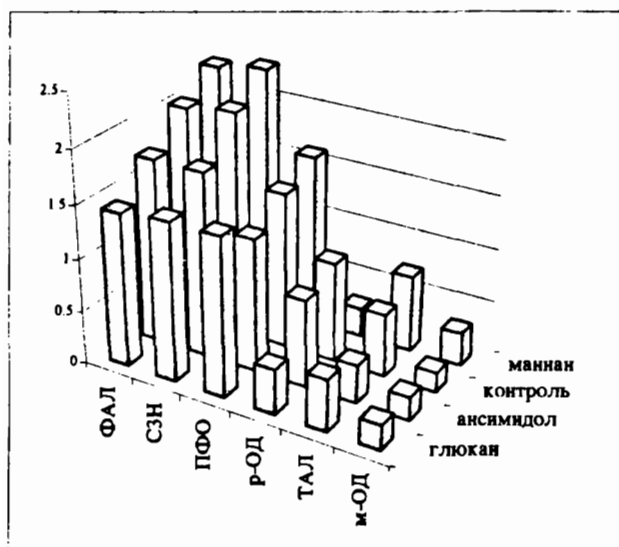


Рис. 2. Активность ферментов, участвующих в биосинтезе лигнанов.

за β -пельатина. При этом специфические метилтрансферазы участвуют только в превращении Pтох в 5-mPтох, который в данном случае выступает в качестве одного из конечных продуктов метаболизма. Одновременно наблюдается незначительное увеличение биосинтеза α -пельатина.

β -1,3-глюкан приводит к стимулированию биосинтеза фитоалексинов в виде различных фуранокумариновых соединений и их производ-

ных [19]. В результате *p*-кумаровая кислота в качестве субстрата частично используется для синтеза различных фитоалексинов. Это сопровождается падением активностей ряда ферментов, в частности СЗН от 2.096 для контроля до 1.497 (или на 30%) в присутствии β -1,3-глюкана. В присутствии β -1,3-глюкана ингибируется активность дезоксиподофиллотоксин-4-гидроксилаз и специфических метилтрансфераз, что приводит к ингибированию метаболических путей превращения de-Pтох в β -пельатин и 5-mPтох. В результате de-Pтох практически полностью превращается в Pтох, который в данном случае является конечным продуктом метаболизма, что подтверждается результатами ВЭЖХ анализа (табл. 1). Необходимо отметить, что хотя при этом суммарное количество синтезируемых лигнанов (подофиллотоксины+пельатины) увеличивается от 3.876 до 5.1 (примерно на 30%), равновесие смещается в сторону резкого увеличения биосинтеза α -пельатина (от 1.284 до 4.308).

Таким образом, под воздействием различных элиситоров возможно

стимулирование продуктивности клеточных культур по отношению к биосинтезу фенилпропаноидов, в частности подофиллотоксинов. Применение элиситоров позволяет в значительной мере увеличивать выход вторичных метаболитов, не меняя условий культивирования, практически без дополнительных затрат. Кроме того, меняя природу использованных элиситоров, можно регулировать направление биосинтеза в сторону увеличения выхода как подофиллотоксинов, так и пельтатинов. Из наших результатов следует, что для индукции биосинтеза отдельных лигнанов, в частности Ртох и α -пельтатина, более эффективными могут быть элиситоры типа β -1,3-глюкана, а для общей индукции биосинтеза лигнанов – элиситоры типа маннана, обладающие патогенным действием.

Кафедра биофизики

Поступила 16.11.2001

ЛИТЕРАТУРА

1. Smolni T., Wichers H., Kalenberg S., Shasavari A., Petersen M., Alfermann W. – Phytochemistry, 1998, v. 48, № 6, p. 975–979.
2. Issell B.F., Rudolph A.R., Louie A.C. An overviw. In: Etoposide (VP-16–213) – Current Status and New Developments, Orlando: Academic Press Inc, p. 1–13, 1984.
3. Oostdam A., Mol J.N.M. H.W. van der Plas. – Plant Cell Reports, 1993, v. 12, p. 474–477.
4. Konuklugil B., Schmidt T., Alfermann W. – Planta Medica, 1999, v. 65, p. 587–588.
5. Smolni T., Wichers H., Rijk H., van Zwam A., Shasavari A., Alfermann W. – Planta Medica, Supplement Issue, 1992, v. 58, p. 623.
6. Moreno P.R., Heijden R., Verpoorte R. – Plants Cell Reports, 1994, v. 14, p. 188–191.
7. Yamamoto H., Ichimura M., Inoue K. – Phytochemistry, 1995, v. 40, p. 77–81.
8. Kirakosyan A., Hajashi H., Inoue K., Charchoglyan A., Vardapetyan H. – Phytochemistry, 2000, v. 53, p. 345–348.
9. Murashige T. and Skoog F. – Physiology. Plant arum, 1962, v. 15, № 3, p. 473–478.
10. Ogata K. et al. – Agr. Biol. Chem., 1967, v. 31, p. 600.
11. Cory J.G. and Frieden E. – Biochem., 1967, v. 6, p. 116–119.
12. Golán-Goldhirsh A. – J. Mol. Catal., 1985, v. 2, p. 141–147.
13. Ros J., Rodriguez-Lopez J., Garcia-Canovas F. – Biochim. Biophys. Acta, 1993, v. 3, p. 303–308.
14. Gonzalez L.F., Rojas M.C., Perez F.J. – Phytochemistry, 1997, v. 50, p. 711–717.
15. Lowry O.H., Rosenbrough N.Y., Farr A.L., Randall R.J. – J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
16. Dixon R.A., Paiva N.L. – Plant Cell, 1995, v. 7, p. 1085–1097.
17. Mittler R., Lam E., Shulaev V., Cohen M. – Plant. Mol. Biol., 1999, v. 39, № 5, p. 1025–1035.
18. Piffanelli P., Devoto A., Schulze-Lefert P. – Curr. Opin. Plant. Biol., 1999, v. 2, p. 295–300.
19. Запромeтов М.Н. – Физиология растений, 1993, т. 40, № 6, с. 921–931.

Ա.Ա. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ՏԱՐԱԲՆՈՒՅԹ ԷԼԻՍԻՏՈՐՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ *LINUM AUSTRIACUM* L. ԿԱԼՈՒՍԱՅԻՆ ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՆԵՐՈՒՄԼԻԳՆԱՆՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻՆ ՄԱՍՆԱԿՑՈՂ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ամփոփում

Ուսումնասիրվել է *Linum austriacum*-ի բջջային կուլտուրաներում լիզոմանների կենսասինթեզին մասնակցող որոշ ֆերմենտների ակտիվության

վրա էլիսիտորների (մաննան, β -1,3-գլյուկան, անսիմիդոլ) ազդեցությունը: Որոշվել է L-Ֆենիլալանին ամոնիում-լիազի, պոլիֆենոլօքսիդազի, թիրոզինազի, լուծելի ֆենոլազի, բջջապատային և լուծելի օքսիդազների ակտիվությունները:

Ցույց է տրված, որ պոդոֆիլոտոքսինների և պելտատինների սինթեզի խթանումը էլիսիտորներով ուղեկցվում է նրանց կենսասինթեզի մեթաբոլիկ ճանապարհին մասնակցող մի քանի ֆերմենտների ակտիվությունների աճով: Հայտնաբերվել է, որ ուսումնասիրված էլիսիտորները ներգործում են լիզնանների կենսասինթեզի մեթաբոլիկ ճանապարհի տարբեր փուլերում:

A.A. HOVHANNISSIAN

INFLUENCE OF ELICITORS OF VARIOUS NATURES ON THE ACTIVITY
OF ENZYMES INVOLVED IN BIOSYNTHESIS OF LIGNANS IN CALLUS
CULTURES *LINUM AUSTRIACUM* L.

Summary

The effect of mannan, β -1,3 glucan and ancymidol on the activity of enzymes involved in biosynthesis of lignans, podophyllotoxin, 5-metoxypodophyllotoxin and their derivatives production in the callus culture of *L. austriacum* was investigated. The activities of L-Phenylalanine ammonia-lyase, Polyphenoloxidase, Tyrosinase, soluble Phenolase, wall-bound and soluble Oxidases were determined. Effects of elicitation on different steps of metabolic pathways in *L. austriacum* callus cultures were revealed.

It was concluded that elicitors, which could stimulate the biosynthetic pathways affecting on activity of key enzymes, could stimulate the production of podophyllotoxins.