# Phân tích sinh hóa và phân tử của một Minovincinine cụ thể rễ cây dừa cạn - 19-Hydroxy- O –Acetyltransferase

[Đi đến:](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC61001/)

TRỪU TƯỢNG

Các bước cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp monoterpenoid indole alkaloids vindoline và minovincinine được xúc tác bởi acetyl coenzyme riêng biệt *O* -acetyltransferase phụ thuộc A ở Madagascar periwinkle ( *Catharanthus roseus* G. Don). Hai gen được phân lập có 63% axit nucleic và có trình tự axit amin được suy ra giống nhau đến 78%. Các enzyme hoạt động được biểu hiện dưới dạng tái tổ hợp Các protein được gắn thẻ của ông trong *Escherichia coli* được đặt tên là minovincinine-19- *O* -acetyltransferase (MAT) và deacetylvindoline-4- *O* -acetyltransferase (DAT) vì chúng đã xúc tác như minovincinine và hormammericine và 4- *O* -acetylation của deacetylvindoline, tương ứng. Các nghiên cứu động học cho thấy hiệu quả xúc tác của MAT tái tổ hợp (rMAT) rất kém so với DAT tái tổ hợp (rDAT), có tỷ lệ doanh thu của Acetyl-coenzyme A và deacetylvindoline cao hơn khoảng 240 và 10.000 lần so với rMAT. Các phân tích phương Bắc cho thấy MAT được biểu hiện trong các tế bào vỏ của chóp rễ, trong khi đó, chỉ được biểu hiện ở các tế bào đặc biệt và tế bào thần kinh trong các mô tiếp xúc với ánh sáng như lá và thân. Biểu hiện trùng hợp của trytophan decarboxylase ,rictosidine synthase và MAT trong các tế bào vỏ rễ cho thấy rằng toàn bộ quá trình sinh tổng hợp của tabersonine và các chất tương tự thay thế của nó xảy ra trong các tế bào này. Khả năng MAT xúc tác cho 4- *O* -acetyl hóa deacetylvindoline với hiệu quả thấp cho thấy enzyme này, chứ không phải là DAT, có liên quan đến sinh tổng hợp vindoline trong nuôi cấy tế bào và rễ biến đổi, tích lũy mức độ thấp của chất kiềm này trong một số trường hợp nhất định.

Họ thực vật Apocynaceae, có chứa cây dược liệu quan trọng Madagascar periwinkle ( *Catharanthus roseus*G. Don), được đặc trưng bởi một lượng lớn các alcaloid monoterpenoid indole mà nó tạo ra. Hóa học alkaloid của nhiều thành viên trong gia đình này đã được đặc trưng và hàng ngàn cấu trúc đã được làm sáng tỏ. Trong số nhiều cấu trúc này, vinblastine và vincristine từ cây dừa cạn có tầm quan trọng đặc biệt vì được sử dụng rộng rãi trong hóa trị ung thư. Các alcaloid này được sản xuất in vivo bằng cách ngưng tụ vindoline và catharanthine. Giá trị dược phẩm của các alcaloid dimeric này, độ phong phú thấp và chi phí sản xuất của chúng đã thúc đẩy nỗ lực rộng rãi để tạo ra tế bào nuôi cấy tế bào và nội tạng có năng suất cao hiệu quả của cây dừa cạn. Những nỗ lực này đã tạo ra thành công việc nuôi cấy tế bào, tích lũy mức độ cao của tất cả các loại ancaloit periwinkle Madagascar, như serpentine (corynanthe), catharanthine (iboga) và tabersonine (aspidosperma). Tuy nhiên, việc nuôi cấy tế bào không thể tạo ra vindoline liên tục dẫn đến sự thất bại cuối cùng trong việc tạo ra các ancaloit indole dimeric.

Các nghiên cứu về enzyme và trao đổi chất với thực vật cho thấy rằng sinh tổng hợp vindoline bị hạn chế ở các cơ quan trên mặt đất và con đường vượt ra ngoài tabersonine, không được biểu hiện trong nuôi cấy mô. Những kết quả này đã làm tăng khả năng nuôi cấy tế bào thiếu các loại tế bào cần thiết để phù hợp với giai đoạn cuối của quá trình sinh tổng hợp vindoline. Các thí nghiệm gần đây đã chỉ ra rằng sự hình thành vindoline trong thực vật nguyên vẹn bao gồm ít nhất hai loại tế bào riêng biệt đòi hỏi sự chuyển vị của một con đường trung gian. Trong các nghiên cứu lai tạo và điều hòa miễn dịch tại chỗ đã xác nhận rằng Trp decarboxylase vàrictosidine synthase, có liên quan đến sự hình thành củarictosidine, chỉ được biểu hiện trong lớp biểu bì của mô trên không và trong các tế bào vỏ của mô rễ. Ngược lại, sự biểu hiện của desacetoxyvindoline-4-hydroxylase (D4H) và deacetylvindoline-4- *O* -acetyl-transferase (DAT), xúc tác hai bước cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp vindoline, xảy ra độc quyền trong các laticifers và idioblasts của các mô trên không.

Nuôi cấy rễ cây periwinkle Madagascar, có vẻ ổn định hơn so với nuôi cấy tế bào gần đây đã được nghiên cứu về khả năng sản xuất các ancaloit indole. Rễ lông tích lũy tabersonine, lochnericine và hörhammericine ngoài serpentine và ajmalicine . Rễ phân lập từ cây cũng tích lũy cùng loại corynanthe, iboga và aspidosperma, nhưng không phải vindoline. Tuy nhiên, mức độ thấp của vindoline gần đây đã được báo cáo là tích lũy trong môi trường nuôi cấy rễ có lông biến đổi với Agrobacterium rhizogenes . Ngoài ra, nuôi cấy huyền phù được thiết lập sau khi biến đổi đĩa lá bằng Agrobacterium tumefaciens hoặc A. rhizogenes tích lũy catharanthine, cũng như nồng độ vindoline thấp và cũng cho thấy hoạt động deacetylvindoline- O -acetyltransferase, làm xúc tác bước cuối cùng trong quá trình tổng hợp.

Khả năng đáng ngạc nhiên của các mô biến đổi để tích lũy vindoline làm tăng khả năng biểu hiện đặc hiệu của loại tế bào cần thiết cho điều này xảy ra ở lá và thân của cây dừa cạn Madagascar có thể không thực sự cần thiết trong mọi trường hợp. Báo cáo hiện tại mô tả đặc tính nhân bản và sinh hóa của minovincinine- O-acetyltransferase (MAT). Gen này, chỉ được biểu hiện trong rễ, là một tương đồng của DAT , nó chỉ được thể hiện trong các idioblasts và laticifers. Bằng chứng được trình bày rằng MAT, có chức năng là acetylate minovincinine và / hoặc hhamhammericine, cũng có thể liên quan đến sinh tổng hợp vindoline trong các trường hợp đặc biệt được tạo ra trong quá trình chuyển đổi thực vật.

## CÁC KẾT QUẢ

### **So sánh các gen và trình tự của DAT và MAT**

Phân tích trình tự của gDAT -6 và gDAT -15 cho thấy các khung đọc mở (ORF) cho các protein tương ứng 439- và 443-amino acid DAT và MAT. So sánh trình tự của gDAT -6 và gDAT -15 cho thấy nhận dạng axit nucleic 63% giữa hai gen này (kết quả không hiển thị) và nhận dạng axit amin 78% giữa các ORF giả định . Các nghiên cứu trước đây với DAT cho thấy nó thuộc về một họ acyltransferase lớn với vị trí hoạt động giả định liên quan đến chloramphenicol O -acetyltransferase và dihydrolipoyl acetyltransferase. Các thành viên của họ gen này đặc biệt phong phú trong thực vật hiển thị M r s tương tự, cũng như các chuỗi axit amin được bảo tồn HXXXDG và DFGWGKP. Gen MAT cũng thuộc về họ này vì nó có M r tương tự ĐẠT và chứa cả hai chuỗi đồng thuận. NGUỒN bảo tồn trong trình tự MAT HXXXDA được cho là có liên quan đến việc liên kết với coubyme Ac coenzyme A (coA) như đã được chứng minh là trường hợp của DAT. Ngược lại, MAT dường như chứa thêm năm axit amin (MENVD) gần đầu cuối của hộp carboxy không tìm thấy trong DAT và có thể chịu trách nhiệm cho một số khác biệt về tính chất động học của hai loại enzyme này.

### **Tính chất nền và thông số động học**

MAT tái tổ hợp (rMAT) và DAT (rDAT) đã được tinh chế (xem Vật liệu và phương pháp rèn) và được sử dụng trong các xét nghiệm enzyme để so sánh các đặc tính cơ chất của chúng. Các sản phẩm phản ứng thu được từ các xét nghiệm rMAT phóng xạ đã được gửi đến sắc ký lớp mỏng Si-K Dieselgel (TLC) và autoradiography . Không có sản phẩm phản ứng nào được sản xuất với lochnericine làm chất nền, trong khi hhamhammericine được chuyển đổi thành chất phóng xạ 19- O -acetyl-hörhammericine (R f = 0,66). hoặc các alcaloid gốc có lông cũng chứa chất nền có khả năng bị acetyl hóa bởi rMAT. Việc ủ các chiết xuất này với protein rMAT tạo ra một điểm phóng xạ cực mạnh (R f= 0,62) trên biểu đồ tự động kết hợp với tiêu chuẩn echitovenine. Những kết quả này cho thấy rễ cây dừa cạn Madagascar có thể chứa đủ minovincinine để tạo ra echitovenine phóng xạ. Nỗ lực làm sạch chất nền này từ chiết xuất rễ thô tỏ ra không thành công (dữ liệu không được hiển thị), cho thấy nó hiện diện ở mức rất thấp.

Các đặc tính cơ chất của alcaloid của rDAT và rMAT rất khác nhau. Chiết xuất từ ​​rễ có chứa Minovincinine và hormammericine là chất nền cho hoạt động rMAT, trong khi chúng không được chấp nhận làm cơ chất bởi rDAT . Ngược lại, deacetylvindoline (DAV), là chất nền thực sự của rDAT, cũng được acetyl hóa bởi rMAT. K m của rMAT cho DAV cao hơn 8 lần so với rDAT và DAT được tinh chế từ lá cây dừa cạn Madagascar. Hoạt động cụ thể rõ ràng của rDAT đã được tinh chế một phần tương tự như hoạt động trước đây đối với rDAT đồng nhất và DAT được tinh chế từ lá cây dừa cạn Madagascar. Tốc độ quay vòng của rDAT đối với acetyl CoA và DAV lần lượt cao hơn khoảng 240 lần và 10.000 lần so với rMAT ( V max / K m ;. Tỷ lệ doanh thu thấp này được duy trì cho rMAT với hormammericine là chất nền và xác nhận hiệu quả thấp của enzyme này so với DAT.

## THẢO LUẬN

Việc nhân bản và đặc tính của gen ĐẠT dẫn đến sự phân lập của một dòng vô tính gen riêng biệt (g DAT -15), được mô tả trong báo cáo hiện tại. Bản sao này, chứa chấp trình tự cho bản sao cDNA một phần, A-3, là một bản sao đơn, gen đặc hiệu gốc chia sẻ 63% axit nucleic với gen DAT và có ORF mã hóa protein axit amin 443 với khối lượng phân tử ước tính khoảng 50 kD và 78% axit amin nhận dạng với DAT ORF được khuếch đại PCR, được đăng ký và được biểu thị bằng Escherichia coli dưới dạng protein có chứa phần mở rộng sáu-NG ở đầu amino của nó. Protein tái tổ hợp được đặt tên là MAT, vì nó xúc tác cho quá trình O -acetyl hóa của nhóm 19-hydroxyl của các alcaloid như minovincinine để tạo ra echitovenine và hörhammericine để tạo ra 19- O -acetyl-hhamhammericine tự nhiên và ban đầu được phân lập từ rễ của Catharanthus tricophyllus .

Các nghiên cứu động học đã chứng minh rằng hai protein tái tổ hợp (rMAT và rDAT) khá khác nhau về đặc tính cơ chất và hiệu quả xúc tác của chúng. Mặc dù rMAT đã xúc tác cho quá trình acetyl hóa minovincinine, hhamhammericine và DAV, rDAT chỉ chấp nhận DAV làm cơ chất. Ngoài ra, hiệu quả xúc tác của rMAT rất kém so với rDAT, với tốc độ quay vòng của Acetyl CoA và DAV cao hơn khoảng 240 và 10.000 lần so với rMAT. Ngoài ra, rMAT cũng thể hiện tỷ lệ doanh thu thấp liên quan đến hhamhammericine cũng cho thấy nó là một acetyltransferase kém cho các chất nền alkaloid này.Những phát hiện này chỉ ra rõ ràng rằng hai O -acetyltransferase phụ thuộc vào acetyl CoA đặc biệt có mặt trong cây dừa cạn có trách nhiệm sinh tổng hợp các dẫn xuất thay thế 19- O -acetyl của tabersonine và vindoline.

Rõ ràng từ các phân tích phía bắc của các mô cây periwinkle Madagascar khác nhau mà các bản sao MATđược tích lũy trong rễ non, đầu rễ có lông và trong các hạt của cây con bị xâm lấn, so với bảng điểm của DAT , chỉ được tìm thấy trong các mô tiếp xúc với ánh sáng như lá và cánh hoa. Hơn nữa, hoạt động MAT, đạt cực đại từ 4 đến 5-d- các radicle cũ khoảng 24 đến 48 giờ sau khi mức tích lũy bản sao tối ưu giảm theo tuổi. Những kết quả này, cùng với đầu rễ Sự biểu hiện tập trung của các bản phiên mã MAT cho thấy biểu hiện gen MAT cũng được điều hòa cao trong quá trình phát triển của rễ. Sự hiện diện của các alcaloid và gen biểu hiện khác nhau trong các mô trên mặt đất và dưới đất xác nhận rằng các con đường cụ thể của mô được thể hiện.

Sự biểu hiện đặc trưng của idioblast và laticifer của D4H và DAT, đã xúc tác hai bước cuối cùng trong sinh tổng hợp vindoline, đã được sử dụng để suy đoán về nguồn tiền chất sinh tổng hợp, cho phép hình thành các sản phẩm cuối cùng. Tiền chất tiên tiến để sinh tổng hợp vindoline, như tabersonine, có thể được tổng hợp trong rễ để được vận chuyển đến laticifers và idioblasts trong lá và thân, để xây dựng thành vindoline. Các mô hình nội địa hóa và biểu hiện của TDC , STR1 và MAT trong các tế bào đầu rễ vỏ não gợi ý mạnh mẽ rằng toàn bộ con đường dẫn đến sinh tổng hợp tabersonine và các chất tương tự thay thế của nó xảy ra trong cùng các tế bào vỏ rễ. Do đó, các enzyme như tabersonine 19-hydroxylase giả định và MAT có thể kiểm soát lượng tabersonine có sẵn để vận chuyển ra khỏi rễ để phát triển thêm .

Sự hiện diện có khả năng của con đường tabersonine, cũng như MAT trong rễ có thể giải thích cách các alcaloid như 19-hydroxytabersonine, lochnericine, hhamhammericine và echitovenine được thực hiện. Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng nuôi cấy tế bào biến đổi và rễ có thể tạo ra mức độ vindoline thấp trong những trường hợp nhất định có thể gây ra con đường vindoline. Kích hoạt con đường này được đề xuất bằng cách phân lập enzyme có khả năng xúc tác cho 4- O -acetyl hóa DAV để tạo ra vindoline và nhân bản và đặc tính gần đây của tabersonine 16-hydroxylase từ nuôi cấy tế bào periwinkle Madagascar. Nuôi cấy rễ lông không tạo ra vindoline được lấy từ và được chứng minh là có hoạt tính enzyme MAT (dữ liệu không được hiển thị). Những kết quả này, cũng như biểu hiện cụ thể của MAT và khả năng của rMAT xúc tác cho quá trình 4- O -acetyl hóa của DAV cho thấy enzyme được mô tả trong và là có khả năng là MAT chứ không phải là ĐẠT.

Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng mặc dù rễ cây có chứa chất kích thích, chúng không biểu hiện D4H và DAT, cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp vindoline. Các nghiên cứu với cây con bị xâm lấn trẻ cho thấy rằng mặc dù có sự hiện diện của các tế bào laticifer trong phôi trưởng thành và trong các lá mầm bị xâm lấn, ánh sáng là điều cần thiết để kích hoạt sinh tổng hợp vindoline . Xử lý ánh sáng của cây con bị xâm lấn không làm thay đổi sự phân bố của các tế bào laticifer và idioblast trong lá mầm, cũng không làm thay đổi mức độ hoặc sự phân phối tế bào của protein D4H trong laticifers và idioblasts. Sự hiện diện của protein D4H không hoạt động trong idioblasts và laticifers của cây con bị xâm lấn chỉ ra rằng D4H được thể hiện đúng ở giai đoạn đầu phát triển của cây con. Kết quả cho thấy ánh sáng kích hoạt sự biểu hiện của d4h và dat thay vì tạo ra sự sản sinh của các tế bào cụ thể như idioblasts và laticifers. Mặc dù điều này đã được giải thích một phần trong báo cáo này, nhưng vẫn còn phải xác định cách nuôi cấy rễ có thể tái tạo các điều kiện sinh học phức tạp cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp vindoline.