

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики
Работа выполнена на базе
УНЦ физико-химической биологии
СГУ и ИБФРМ РАН

**СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА
XANTHOMONAS CAMPESTRIS ВКМ В-611**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы

направления 06.03.01 - биология

биологического факультета

Савельевой Александры Сергеевны

Научный руководитель:

доцент кафедры биохимии

и биофизики, к.б.н.

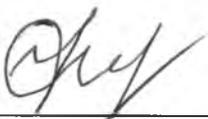


16.06.17

В.А. Великов

Научный консультант:

науч. сотр. ИБФРМ РАН, к.б.н.



17.06.2017

Е.Н. Сигида

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

д.б.н., профессор



16.06.2017

С.А. Коннова

Саратов 2017

Введение. Бактерии рода *Xanthomonas* являются фитопатогенами обширного спектра действия, которые охватывают большое количество семейств продовольственных культур. Экономический убыток наносимый данными родом очень высок. Род *Xanthomonas* включает более 35 видов [1], обладающих сходными физиологическими и генетическими признаками и уничтожают более 400 видов растений [2]. Изучение ксантомонад, в связи с этим начато с их выделения и установления первичных химических свойств.

Выявление механизмов патогенеза, поиск эффективных средств защиты для борьбы с болезнями, возбудителями которых являются микроорганизмы данного рода, становится одним из важных направлений научных исследований в этой области. В связи с отсутствием эффективных мер борьбы с бактериозами и недостатком устойчивых сортов растений, ранняя диагностика бактериального заражения семян и посадочного материала, считается ключевым способом снижения вредоносности заболеваний [3-6].

Первенствующей задачей в данном разделе исследований является обнаружение чужеродных веществ бактерии, которые отвечают за проявление симптомов заболевания. Грамотрицательные бактериальные липополисахариды (ЛПС) имеют множественные роли во взаимодействиях растений и микробов. ЛПС способствуют низкой проницаемости бактериальных наружных мембран, которые выступают в качестве барьеров для защиты бактерий от растительных антибактериальных веществ. ЛПС являются ключевыми молекулами во взаимодействиях между бактериями и растениями, либо в симбиозе, либо в патогенезе. Так как ЛПС являются гликоконъюгатами, генетически и химически состоящими из трех различных молекулярных областей, то их подробное объяснение структуры является очень актуальной и важной научной задачей для химиков, и достигается сочетанием современных химических и спектроскопических методов. Знание химических структур ЛПС является важным предварительным условием для

дальнейшего понимания биологических процессов взаимодействия растений и микробов [7].

Целью работы было получение данных о структуре ЛПС *Xanthomonas campestris* В-611.

Для реализации цели были поставлены следующие задачи:

1. Проведение культивирования бактерий исследуемого штамма *Xanthomonas campestris* В-611, выделение и очищение ЛПС экстракция ЛПС.
2. Охарактеризовать электрофоретическую подвижность ЛПС исследуемых бактерий в полиакриламидном геле.
3. Проведение анализа биополимерного состава колориметрическими методами.
4. Проведение анализа жирных кислот липид а. Установление характера связывания с помощью о-дезацелирования.
5. Установление структуры О - специфического олигосахарида.

Объектом исследования являлись бактерии *Xanthomonas campestris* В-611 из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Бактерии культивировали в жидкой среде LB, биомассу осаждали центрифугированием, клетки отмывали забуференным физиологическим раствором и высушивали ацетоном.

Для выделения ЛПС использовали традиционный способ водно-фенольной экстракции по методу Вестфаля. Примеси белков осаждали из экстракта 40% ТХУ при рН 2.7. Колориметрическими методами было установлено, что ЛПС содержит характерные для этих соединений компоненты – углеводы, 2-кето-3-дезоксооктоновую кислоту и фосфор. Электрофорез в ПААГ с последующим окрашиванием углеводсодержащих компонентов реагентом на основе нитрата серебра после периодатного окисления определили тип ЛПС. Методом ГЖХ МЭЖК проводили анализ жирных кислот липида А.

О-специфический полисахарид выделяли кислотной деградацией ЛПС в мягких условиях. На основании данных ГЖХ и ЯМР спектроскопии была установлена структура.

Бакалаврская работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования), заключения, выводов, списка использованных источников, включающего 43 источника.

Основное содержание работы. Из высушенной биомассы клеток *X. campestris* В-611 нами был выделен ЛПС с выходом 2.3%. Известно, что ЛПС представляют собой достаточно гетерогенную группу молекул, обусловленную наличием молекул с разной степенью полимеризации их ОПС. Одним из методов, позволяющих определить тип ЛПС – отношение его к S- либо R-форме, а также оценить степень его гетерогенности, является электрофорез в ПААГ. Для визуализации углеводсодержащих компонентов используют метод окрашивания азотнокислым серебром после периодатного окисления.

Как следует из представленных на рисунке 2 данных, ЛПС исследуемого штамма относится к S-форме. его полисахаридная часть достаточно гетерогенна, о чем свидетельствует характерная «лестница» проявляемая по всей длине трека. Достаточно выраженные полосы в нижней части трека позволяет констатировать присутствие в общем пуле молекул ЛПС R-форм, для которых характерно отсутствие полимерной цепи.



Рисунок 1– Электрофорез ЛПС *Xanthomonas campestris* В-611.

Определение биополимерного состава выделенного препарата ЛПС (таблица 1) позволило нам выявить в нем присутствие характерных для данного класса молекул компонентов: углеводов $39,6 \pm 1,7\%$, КДО $\sim 6\%$, а также фосфор и примеси белков.

Таблица 1 – Биополимерный состав ЛПС *X. campestris* В-611

Компоненты	Содержание, весовые %
Углеводы	$39,6 \pm 1,7$
Белки	$0,21 \pm 0,09$
КДО	$5,9 \pm 0,3$
Фосфор	$1,6 \pm 0,2$

Состав ЖК ЛПС приведен в таблице 2. В ЛПС обнаружены ЖК с длиной углеводородной цепи от C12 до C17. В составе преобладали 2-гидроксидекановая, додекановая, 3-гидроксидодекановая, 3-гидрокситридекановая и пентадекановая кислоты. Они составляли примерно 88% от суммы идентифицированных МЭЖК. Гидроксилированные ЖК составляли около 40% жирных кислот ЛПС. Для установления характера связывания ЖК в липиде А было проведено О-деацилирование ЛПС, как описано в работе [8]. Анализ ЖК О-деацилированного ЛПС выявил увеличение содержания 3-ОН C13:0 кислоты, что свидетельствует о том, что она связана амидной связью в липиде А. Снижение содержания остальных ЖК свидетельствует о сложноэфирном характере их связывания в липиде А. В целом, результаты анализа ЖК ЛПС бактерий *X. campestris* В-611

согласуются с имеющимися в литературе данными о структуре липида А ксантомонад [8].

Таблица 2– Состав метиловых эфиров жирных кислот ЛПС *X. campestris* В-611 (в % от суммы идентифицированных ЖК)

2-гидроксидекановая кислота (2ОН C _{10:0}) CH ₃ (CH ₂) ₇ CH(OH)COOH	12,1
додекановая кислота CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	12,2
3-гидроксидодекановая кислота (3ОН C _{12:0}) CH ₃ (CH ₂) ₈ CH(OH)CH ₂ COOH	7,2
3-гидрокситридекановая кислота 3-ОНC _{13:0}	18,3
изопентадекановая кислота iC _{15:0}	18,6
антеизопентадекановая кислота aC _{15:0}	19,9
изогептадекановая кислота aC _{17:0}	4,7
антеизогептадекановая кислота aC _{17:0}	7,0

Моносахаридный анализ ЛПС, проведенный методом ГЖХ ацетатов полиолов продемонстрировал присутствие Rha как основного моносахарида (рисунок 3) . Ее доля составила около 70 % всех моносахаридов, выявленных в анализе. Также в составе ЛПС были выявлены: Fuc3NAc, Glc, Man и Gal, однако их содержание было значительно меньше, чем преобладающего моносахарида.

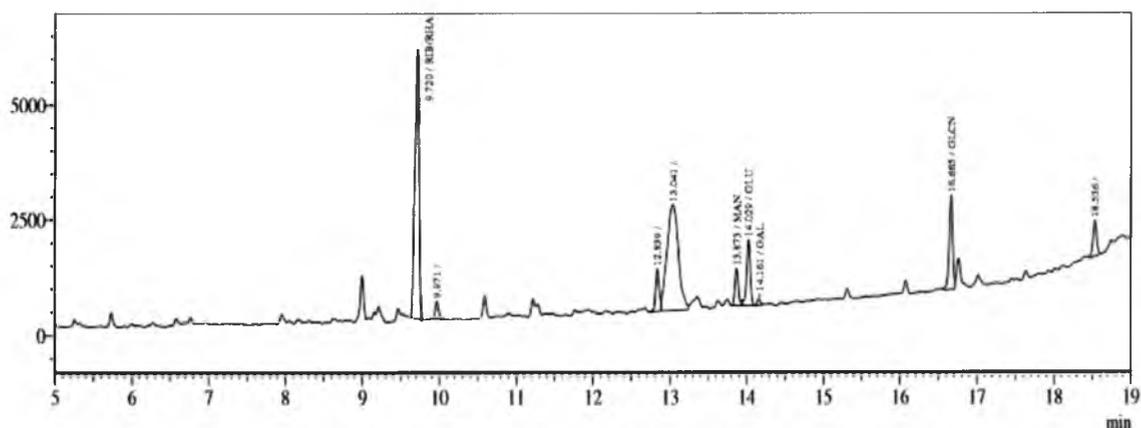


Рисунок 2 – ГЖХ ацетатов полиолов ЛПС *X. campestris* B-611.

Для дальнейшего анализа ЛПС был подвергнут мягкому кислотному гидролизу. Через полтора часа гидролиза наблюдалось образование творожистого осадка, вызванного разрушением кислотолабильной КДО и разобщением гидрофобного липида А от гидрофильной углеводной части молекулы. Липид А осаждали центрифугированием. Водорастворимую часть гидролизата ЛПС фракционировали методом гель-фильтрации на колонке с Сефадекс G-50 (рисунок 4), как описано в работе [9]. Результаты хроматографического разделения хорошо согласуются с анализом биополимерного состава и данными электрофореза.

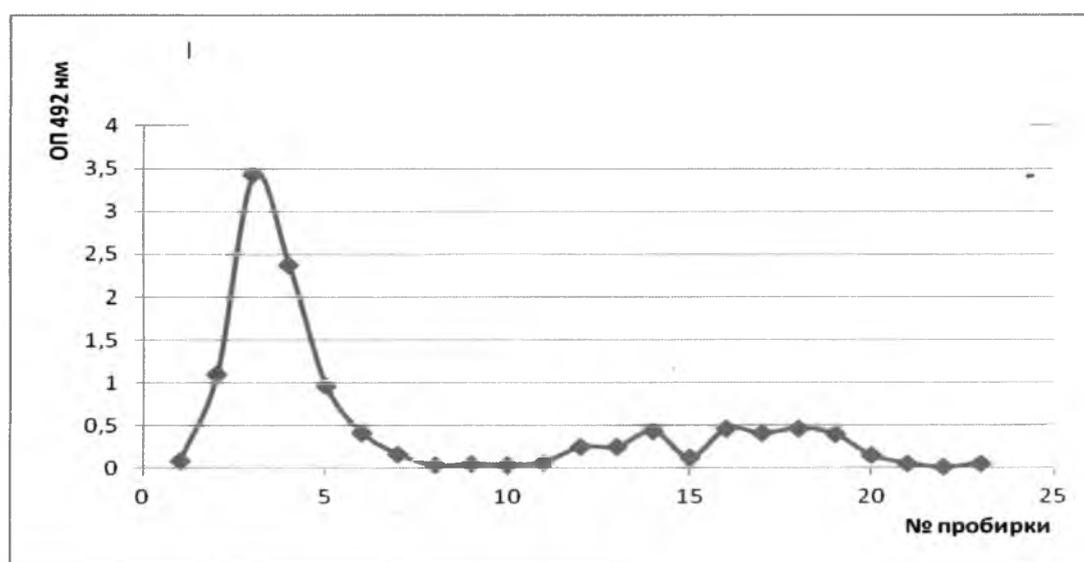
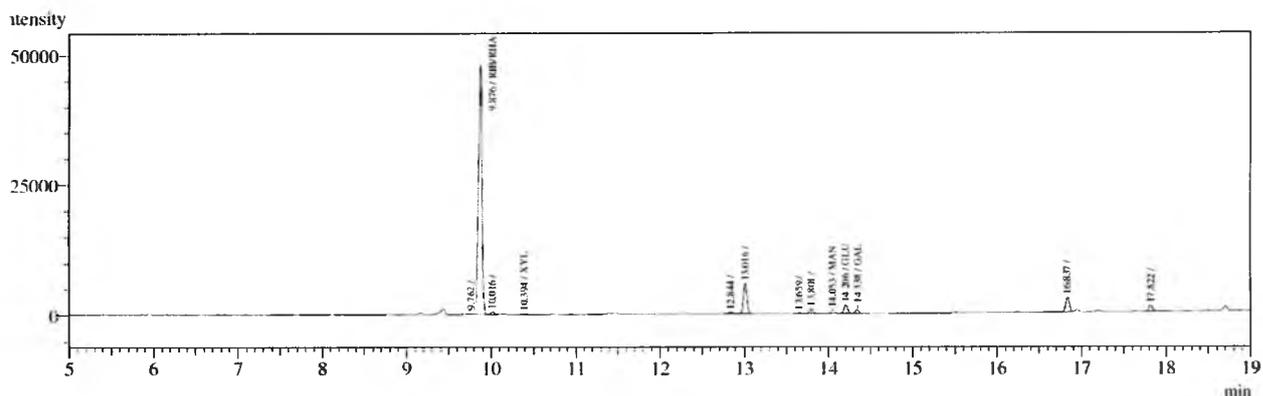
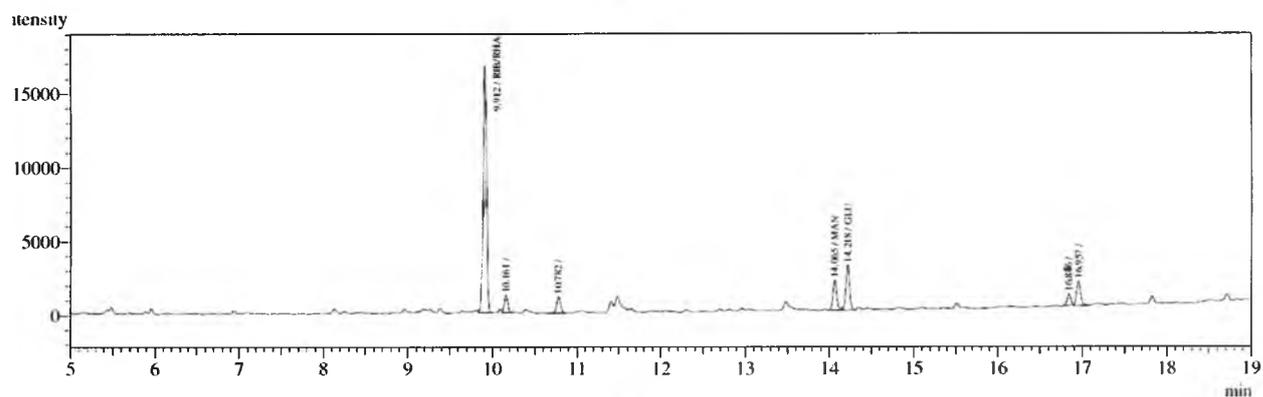


Рисунок 3 – Профиль элюции углеводсодержащей фракции ЛПС *Xanthomonas campestris* B-611 на колонке с Sephadex G-50.

В результате хроматографии были выделены О-специфический полисахарид, соответствующий 1 фракции (выход составил 43 %) и коровый олигосахарид, соответствующий 2 фракции (выход 27%). Для каждой из собранных фракций был определен моносахаридный состав. В ОПС основным моносахаридом была Rha, ее содержание составляло 89%, также присутствовала Fuc3NAc (~11%). В коровом олигосахариде основным моносахаридом так же являлась Rha (75%), кроме того были идентифицированы Man (10%) и Glc (14%).



А



Б

Рисунок 4 – ГЖХ ацетатов полиолов фракции ОПС (А) и корового олигосахарид (Б) *X. campestris* В-611.

¹³С-ЯМР спектр ОПС (рисунок 7) содержал сигналы трех аномерных атомов углерода при δ 98.1-102.3, трех CH₃-С групп (С-6 Rha и Fuc3NAc) при

δ 17.8, сигнал атома углерода, связанного с азотом (C-3 Fuc3NAc) при δ 52.6, сигналы остальных атомов углерода моносахаридного кольца при δ 68.5-79.9, а также сигнал одной *N*-ацетильных групп (CH₃ при δ 23.4, CO при δ 175.6). Отсутствие сигналов в области при δ 84-88, характеристичных для фуранозидов [8], указывало на пиранозную форму всех моносахаридных остатков. Соответственно, в ¹H-ЯМР спектре ОПС (рисунок 8) присутствовали сигналы трех аномерных протонов при δ 4.84-5.24, трех CH₃-C групп при δ 1.22-1.37, других протонов моносахаридного кольца при δ 3.46-4.54, одной *N*-ацетатных групп при δ 2.08. Отнесение сигналов в ¹H- и ¹³C-ЯМР спектрах было произведено с использованием ¹H, ¹H COSY, TOCSY, ROESY, ¹H, ¹³C HSQC и HMBC экспериментов (таблица 3), как описано в работе [9]. Три спин-спиновых систем моносахаридов, две с *рамно* конфигурацией и одна с *галакто* конфигурацией были идентифицированы путем выявления корреляций от H-1 до H-2, от H-2 до H-6 для Rha, от H-1 до H-4, от H-6 до H-5 для α Fuc3NAc в COSY и TOCSY спектрах, учитывая значения характеристических констант спин-спинового взаимодействия.

Таблица 3— Данные ¹H и ¹³C ЯМР спектров ОПС *X. campestris* В-611.

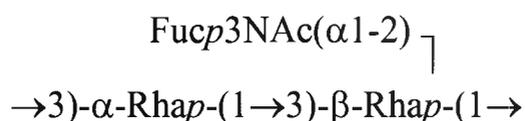
Моносахаридный остаток	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
\rightarrow 3)- α -Rhap	5,24 102,3	4,24 68,5	3,97 78,4	3,56 71,2	3,82 70,5	1,34 18,2
\rightarrow 2,3)- β -Rhap	4,84 98,1	4,22 78,1	3,85 79,9	3,72 74,0	3,46 73,7	1,37 17,8
α -Fucp3NAc	5,22 100,6	3,80 68,5	4,30 52,6	3,75 71,9	4,54 68,5	1,22 16,5

Конфигурации гликозидного центра α и β Rha установили на основании химических сдвигов сигналов C-5 ¹³C-ЯМР спектре при δ 70.5 и 73.7,

соответственно (по сравнению с литературными данными δ 70.0 и 73.2 для C-5 α -Rhap и β -Rhap соответственно) [8].

В ^{13}C -ЯМР спектре ПС было выявлено смещение сигналов C-3 α -Rha, C-2 и C-3 β -Rha в относительно слабopольную область, по сравнению с их позициями в соответствующих незамещенных моносахаридах. Анализ последовательности моносахаридов в повторяющихся звеньях был осуществлен с использованием 2D ROESY и HMBC экспериментов. В $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY спектре наблюдались следующие корреляции: α -Rha H-1, β -Rha H-3 при δ 5.24/3.85, β -Rha H-1, α -Rha H-3 при δ 4.84/3.97 и Fuc3NAc H-1, β -Rha H-2 при δ 5.22/4.22 в повторяющемся звене.

На основании полученных данных была установлена следующая структура повторяющихся звеньев O-специфического полисахарида:



Xant_camp_B611 323K 21.11.2016 13C

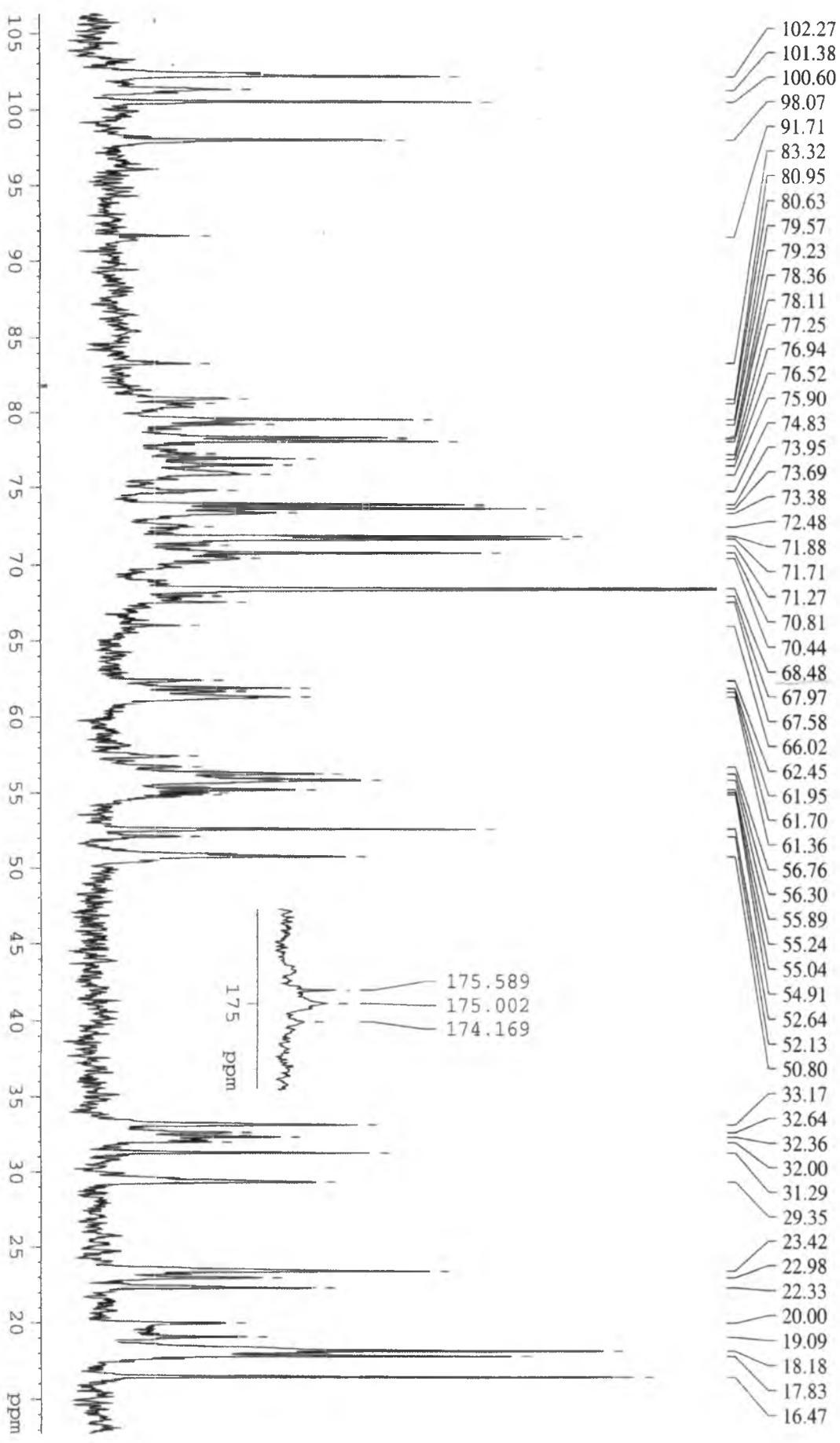


Рисунок 7-¹³C-ЯМР-спектр ОПС *Xanthomonas campestris* B-611.

Xant.camp_B611 323K 11.11.16 1H

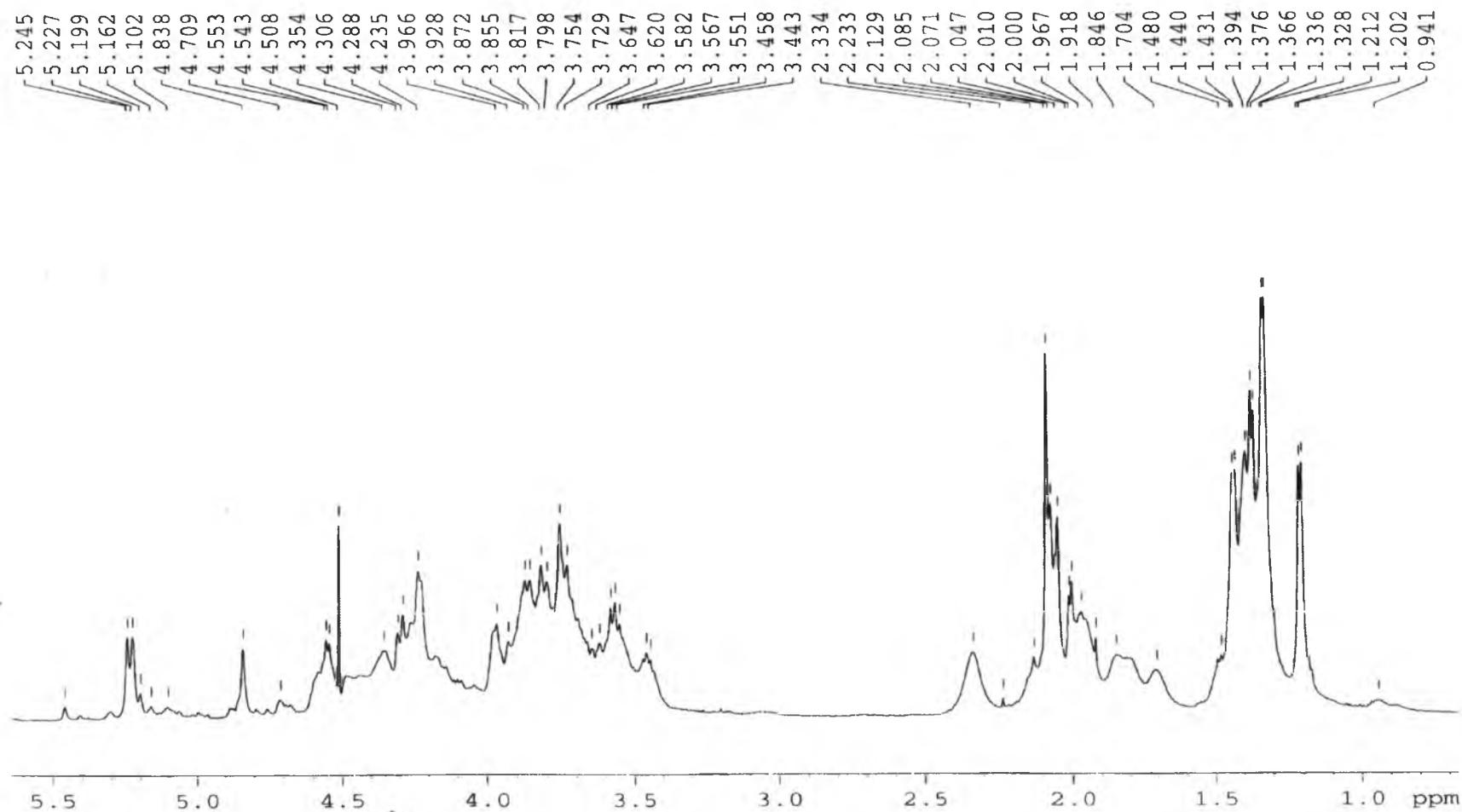


Рисунок 8— ^1H -ЯМР-спектр *Xanthomonas campestris* B-611.

Заключение. Бактерии рода *Xanthomonas* являются возбудителями бактериозов множества семейств культурных растений, что наносит сельскому хозяйству значительный убыток. С каждым годом повышается вирулентность патогена и отмечается появление новых симптомов. Единственным эффективным методом борьбы с патогеном является ранняя диагностика посадочного материала. Ключевую роль в механизме патогенеза отдают липополисахаридам, одной из важных составляющей грамотрицательных бактерий, поэтому изучение и понимание структуры молекулы ЛПС является первенствующей для понимания взаимодействия растений и микробов, и поиска мер борьбы с ними.

В работе рассмотрены структурные особенности липополисахарида *Xanthomonas campestris* В-611, проведен анализ составных частей ЛПС, определены основные компоненты характерные для изучаемой молекулы.

В ходе проведения исследования были получены данные о составе компонентов липополисахарида, установлена структура повторяющихся звеньев О-специфического полисахарида. Проведен анализ жирных кислот липида А, который используется в качестве одного из хемотаксономических критериев классификации бактерий. Полученные данные являются первым шагом в установлении полной структуры ЛПС исследуемого штамма бактерий.

Результаты работы помогут приблизиться к расшифровке механизма вирулентности исследуемого патогена и в дальнейшем стать основой для создания эффективных средств борьбы с ним.

Выводы:

1. Проведено культивирование бактерий исследуемого штамма *Xanthomonas campestris* В-611, выделен и очищен ЛПС.

2. Охарактеризована электрофоретическая подвижность ЛПС исследуемых бактерий в полиакриламидном геле. Выявлено преобладание S-форм ЛПС в мембранном пуле.

3. Колориметрическими методами проведен анализ биополимерного состава ЛПС. Установлено содержание характеристичных для ЛПС компонентов: углеводов, КДО, фосфора.

4. Проведен анализ жирных кислот липида А. Установлено, что преобладающими кислотами являлись 2-гидроксидекановая, додекановая, 3-гидроксидодекановая, 3-гидрокситридекановая и пентадекановая кислоты. С помощью О-дезацелирования установлен характер связывания ЖК.

5. Установлено, что О-специфический полисахарид *X. campestris* В-611 состоит из разветвленных трисахаридных повторяющихся звеньев, основную цепь которых составляет рамнан, а в боковой цепи присутствуют остатки 3-ацетомидо-3-дезоксифукозы.

Список использованных источников

1. Игнатов, А.Н. Кугинуки Я. Хида К. Возбудитель бактериозов капустных *Xanthomonas campestris*. О создании устойчивых к ксантомонадам растений семейства Brassicaceae. // Сельскохозяйственная биология. 2002. Т.5, С.75-84.
2. Vauterin, L. Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*/ L.Vauterin, J. Swings // Microbiol Biotechnol. 1987. V.3. P. 77–82.
3. Пировиноградная кислота экзополисахаридов бактерий рода *Xanthomonas* II / Р.И. Гвоздяк [и др.] // Микробиологический журнал 1985. Т. 47, № 3. С. 29-31.
4. Блинов, Н.П. Химия микробных полисахаридов / Н.П. Блинов // Москва: Высш. шк. 1984. С.256.
5. Матышевская, М.С. Экзопалисахариды бактерий рода *Xanthomonas* VI съезд Всесоюзного микробиологического общества / М.С. Матышевская, И.И. Майко, С.С. Сидоренко // Тез. докл. — Рига, март 1980. Т.4 С.55.
6. Alexander, C. Bacterial lipopolisaccharides and innate immunity / C. Alexander, E.T. Rietschel // J. Endotoxin Res. 2001. V. 7. P. 167-202.

7. Newman, M.A. Bacterial lipopolysaccharides and plant-pathogen interactions / M.A. Newman, J.M. Dow, M.J. Daniels // Eur. J. Plant Pathol. 2001. V. 107. P.95-102.
8. Bock, K. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Monosaccharides / K. Bock, C. Pedersen // Chem. Biochem. 1983.V.41. P. 27-66.
9. Структурные особенности O-специфических полисахаридов бактерий *Azospirillum* серогруппы III / Ю.П. Федоненко [и др.] // Биохимия. 2011.Т. 76, вып. 7. С. 976 - 982.

