

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

ПОЛУЧЕНИЕ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ МЕТОК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
КОМПОНЕНТОВ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК *ARABIDOPSIS THALIANA*

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТА

Студента 4 курса 421 группы
направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Ильина Николая Валерьевича

Научный руководитель:
Доцент кафедры биохимии и
биофизики, к.б.н.


подпись, дата
10.06.2019

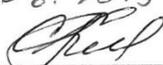
А.А. Галицкая

Научный консультант:
к.б.н., с.н.с. лаборатории
иммунохимии ИБФРМ РАН


подпись, дата
10.06.2019

Н.Ю. Селиванов

Зав. кафедрой биохимии и
биофизики, д.б.н., профессор


подпись, дата
10.06.2019

С.А. Коннова

Саратов, 2019

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Пектин в клеточной стенке растительных организмов представляет собой часть матрикса, который играет большую роль в жизни клетки. Олигосахариды пектина, образующиеся в процессе жизнедеятельности клеток или взаимодействия растения с патогенами (такими как грибы и бактерии) и растительноядными животными, а также при ранениях растительной ткани, выполняют сигнальные функции, причём род сигнала и эффекторный ответ зависит от длины олигомера.

Пектиновые вещества, входящие в состав клеточной стенки, представляют собой интерес из-за сложности структуры полимеров этого класса и разнообразия выполняемых функций. Однако, несмотря на активное исследование пектиновых веществ мировым научным сообществом, нами не была встречена информация о сайтах связывания их с клеточной стенкой растительной клеткой.

Цели и задачи исследования. Основной целью данной работы было получить флуоресцентные метки на основе пектина для выявления участков связывания пектиновых олигосахаридов с компонентами поверхности клеток.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получить пектиновые олигосахариды с различной степенью полимеризации.
2. Провести модификацию полученных олигосахаридов флюорохромом по карбонильной группе С-1 атома.
3. Исследовать способность меченых олигосахаридов различной длины взаимодействовать с компонентами поверхности клеток суспензионной культуры в присутствии кальция.
4. Исследовать локализацию сайтов связывания пектиновых олигосахаридов на поверхности клеток суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana*.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлось межмолекулярное взаимодействие пектиновых олигосахаридов с дезтерифицированным пектином клеточной стенки клеток суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana*. Культивирование клеток осуществлялось на среде Шенка-Хильдебранта при температуре 28°C и постоянном перемешивании в темноте. В работе использовались 3-5-суточная культура.

Для решения поставленных задач готовили препарат конъюгата пектиназы-ЗНЧ для получения пектиновых олигосахаридов методом ограниченного ферментолита и электрофоретический анализ сорбированных на золотых наночастицах полипептидов. Проводили ограниченный ферментолит пектина, хроматографический анализ полученных олигосахаридных фракций, модифицировали олигосахариды флуоресцентными метками, а также готовили препараты для конфокальной микроскопии и исследовали межмолекулярное взаимодействие пектиновых меток с поверхностью клеток с помощью конфокальной микроскопии.

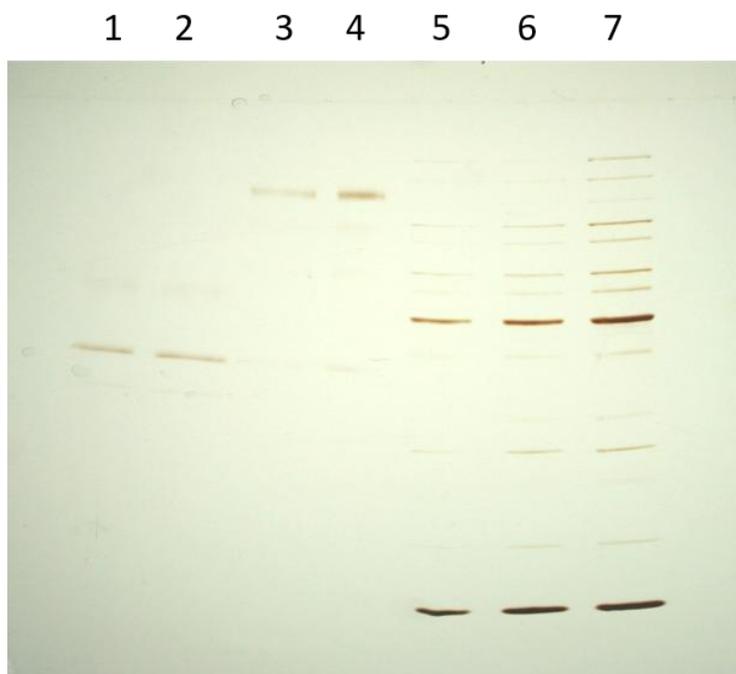
Структура бакалаврской работы: работа состоит из введения, списка сокращений, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор написан с использованием 71 источника, в нём рассмотрены следующие вопросы: клеточная стенка растений и её строение; функции клеточной стенки; пектиновые вещества и их роль; пектиназы как деструкторы компонентов матрикса; золотые наночастицы и их использование в биологических исследованиях.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Для выполнения первой задачи – получения пектиновых олигосахаридов – мы провели несколько работ, а именно: очистку коммерческого препарата пектиназы *Aspergillus niger* методом ВЭЖХ; электрофоретический анализ чистоты полученного препарата; получение конъюгатов пектиназы с золотыми наночастицами; проверку активности свободного и иммобилизованного фермента; ограниченный ферментолит с использованием конъюгатов и

спиртовую преципитацию для разделения высоко- и низкомолекулярных олигомеров пектина.

Результаты электрофоретического анализа чистоты полученного препарата представлены на рисунке 1.



Треки 1, 2 – очищенная полигалактуроназа; треки 3, 4 – фракция примесных белков; треки 5-7 – стандарты молекулярных масс 1, 2 и 3 мкл соответственно.

Рисунок 1 – Электрофоретический анализ фракций, полученных в результате хроматографической очистки полигалактуроназы из *A. niger*

Анализ ферментативных характеристик полученного препарата полигалактуроназы показал, что его удельная активность составляет 2,75 мкМ/мин/мл, или 28,5 мкМ/мин/мг. Концентрация белка в образце, определенная бицинхоиновым методом, составила 68 мкг/мл. Установлено, что при увеличении времени ферментализа, происходит снижение удельной активности фермента в единицу времени. Максимум выявляемой активности в единицу времени в условиях экспериментов приходится на диапазон 15-30 минут. Анализ активности свободного и иммобилизованного фермента показал увеличение активности фермента в комплексе с ЗНЧ. Увеличение количества

продуктов ферментолиза проявляется не на начальном этапе гидролиза (0-15 минут), а в диапазоне измерений 30-45 минут, и составляет 1,3-1,8 раза. Результаты анализа активности свободной и связанной пектиназы представлены на рисунке 2.

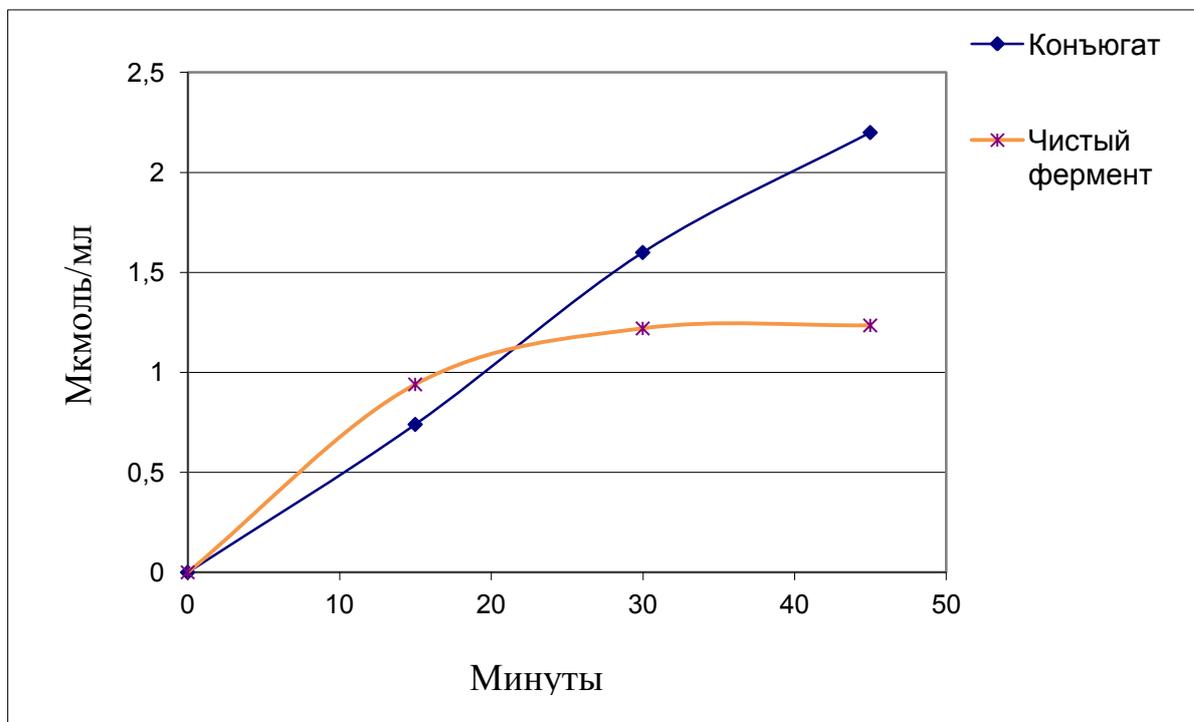


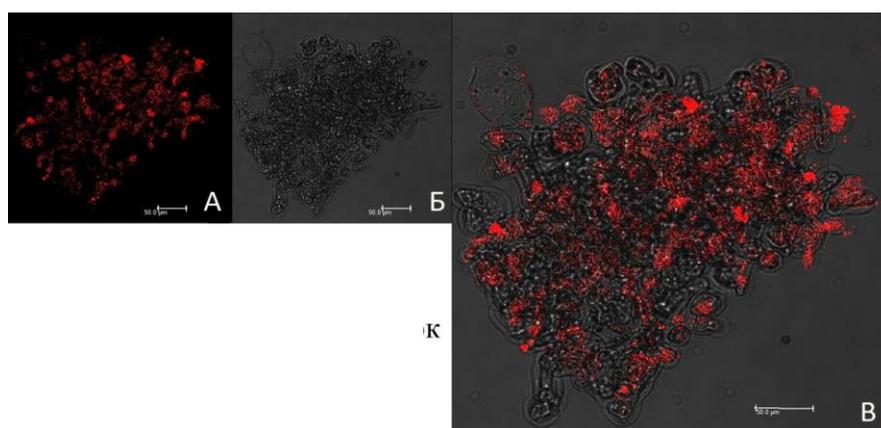
Рисунок 2 – Образование продуктов ферментолиза в присутствии свободного фермента и его конъюгата с НЧЗ

Ограниченный ферментолиз в присутствии конъюгата полигалактуроназы с золотом в течение 30 минут показал увеличение общего содержания олигосахаридных продуктов в 1,27 раза. Наблюдаемое отличие формируется накоплением олигосахаридов со степенью полимеризации $n=3-10$ и уменьшением более чем в 2 раза содержания высокомолекулярных продуктов с $n=11-14$. Т.о. основная массовая доля продуктов смещается в диапазон $n=8-10$, а их содержание в продуктах ферментолиза увеличивается в 2,8-3,1 раза. Полученную смесь олигосахаридов разделяли с помощью центрифугирования и спиртовой преципитации, сушили под вакуумом.

Для выполнения второй поставленной задачи мы модифицировали полученные олигосахариды флюоресцирующей меткой. В данной работе

использовался относительно новый тип меток с амино-окси реакционной группой FC640R-amino-oxu (Sigma-Aldrige, США) с бинарным рудаминовым флюорохромом. С его помощью были получены метки на основе фракций высоко- и низкомолекулярных пектиновых олигосахаридов. Максимум поглощения флюорохрома 642нм, максимум флуоресценции на 662нм. Дополнительным достоинством данного соединения является высокая фотостабильность, позволяющая проводить длительное исследование меченого образца.

Для исследования специфичности взаимодействия пектиновых молекул и локализации сайтов связывания пектина на поверхности клеток была приготовлена серия препаратов для микроскопии с использованием полученных меток. Исследования проводились на фиксированных клетках, то есть обработанных формалином. Такая обработка приводит к стабилизации структуры и инактивации белков, находящихся на поверхности и внутри клеток. Наиболее важные результаты были получены при исследовании мечения в присутствии ионов двухвалентных металлов (а именно магния и кальция) для подтверждения специфичности образования egg-box-структур. Полученные результаты приведены на рисунке 3.



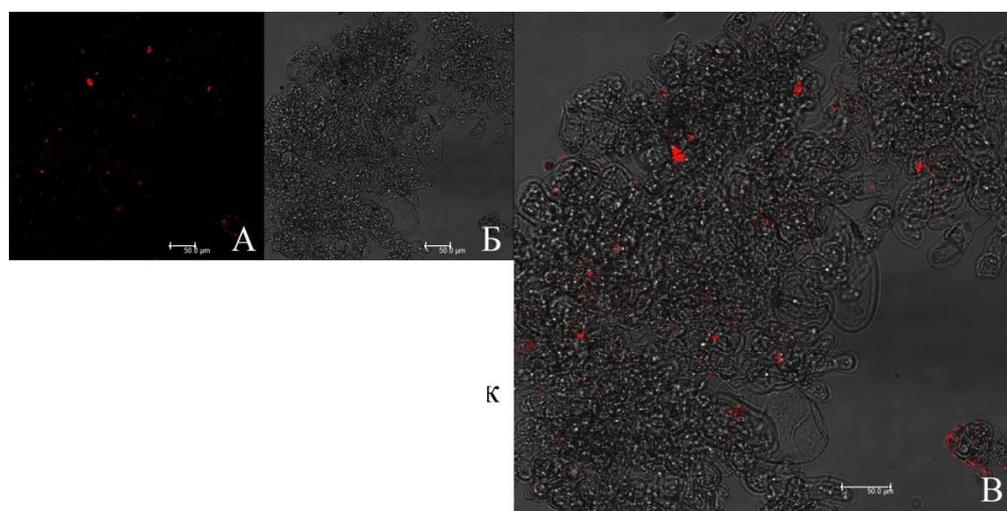
А – распределение метки, Б – внешний вид группы клеток, В – наложение А и Б

Рисунок 3 – Кальций-зависимое распределение полученной метки по поверхности клеток *Arabidopsis thaliana*

Анализ распределения зон мечения показывает, что взаимодействие происходит очень локально, и даже интенсивно окрашенные клетки содержат очень много дискретных сайтов связывания. Это позволяет нам впервые охарактеризовать данные о зонах деэтерификации, в которых возможно проявление эффекта межмолекулярного взаимодействия пектиновых олигосахаридов в присутствии ионов кальция.

На фотографиях контрольных образцов (рисунок 4), обработанных меткой в буфере без добавления кальция видно, что метка высокоселективна, поверхность клеток не подвержена окрашиванию. Окрашиваются лишь отдельные участки, которые предположительно представляют собой агрегаты денатурированных белков или других компонентов из механически разрушенных клеток в процессе пробоподготовки.

Использование метки с короткими олигосахаридами показывает наличие связывания, но локализация его ограничена и, предположительно, ассоциирована с внутриклеточными компонентами. Результаты представлены на рисунке 5.



А – распределение метки, Б – внешний вид группы клеток, В – наложение А и Б.

Рисунок 4 – Распределение метки по поверхности клеток без добавления кальция

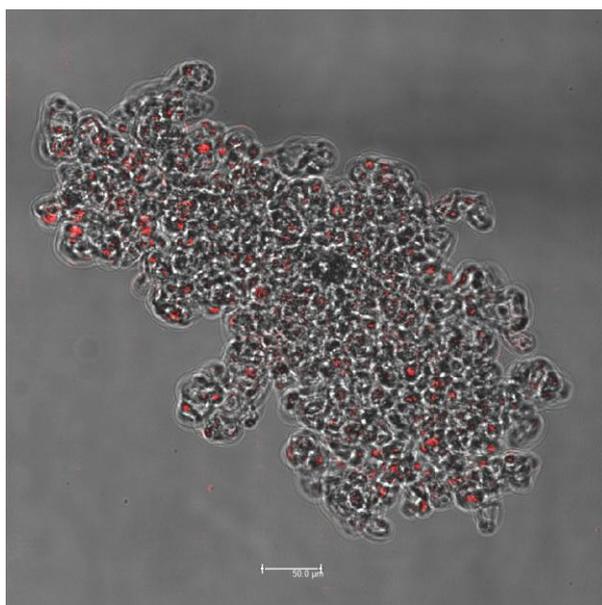


Рисунок 5 - Взаимодействие метки на основе коротких олигосахаридов с клетками при добавлении кальция

Из-за метода приготовления метки, в препарате меченых ОС присутствует молярный избыток немеченых молекул. Взаимодействие меченых и немеченых компонентов носит одинаковый характер и связывание только части меченых молекул позволяет выявить искомую мишень. В данном случае мы выявляем не единичные последовательности из ограниченного количества мономеров, а целые длинные цепи, к которым в реальных условиях может присоединяться множество меченых молекул. Исходя из того, что механизм связывания метки определяется образованием кальциевых комплексов между молекулами именно пектина, можно допустить вариант, что мы наблюдаем свечение отдельных молекул флюоресцентного зонда, но зона деэтерификации пектина в конкретной локальной области может быть больше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы впервые показана возможность использования олигосахаридов, меченых флюорохромом, для выявления сайтов

деэтерифицированного пектина на поверхности клеток суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana*. В основе метода лежит образование мультивалентных комплексов пектиновых фрагментов с ионами кальция. Связывание метки с поверхностью клеток характеризуется избирательностью.

Применение данной метки для исследования поверхности клеток арабидопсиса показало наличие большого количества сайтов связывания и их различное распределение у клеток с различной степенью растяжения, что подтверждает роль пектиновых полимеров в управлении ростовыми процессами на клеточном уровне у растений.

Данный метод является перспективным для детального исследования процессов динамики полисахаридного состава и функциональной активности клеточной стенки в клетках растений.

ВЫВОДЫ

1. Методом ограниченного ферментолита с использованием иммобилизованной на золотых наночастицах пектиназы и последующим фракционированием получены препараты высоко- и низкомолекулярных олигосахаридов.
2. С использованием amino-окси-активированных флюорохромов получены флуоресцентные метки для исследования специфичности межмолекулярного взаимодействия типа «пектин-пектин» в клеточной стенке растений.
3. Показана специфичность взаимодействия меченых олигосахаридов пектина с отдельными сайтами связывания на поверхности клеток суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana*.
4. Показано наличие большого количества сайтов связывания и их различное распределение у клеток с различной степенью растяжения, что подтверждает роль пектиновых полимеров в управлении ростовыми процессами на клеточном уровне у растений.

