

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

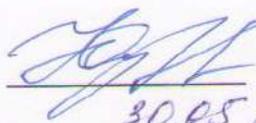
Кафедра биохимии и биофизики

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА И ГЕННОГО
КЛАСТЕРА БИОСИНТЕЗА O-АНТИГЕНА ПОЧВЕННЫХ
АССОЦИАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM PALUSTRE* B2

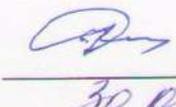
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Кондюриной Натальи Кирилловны

Научный руководитель:
канд. биол. наук, доцент


Ю.П. Федоненко
30.05.2023

Научный консультант:
канд. биол. наук, с.н.с.


Е.Н. Сигида
30.05.2023

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,
док. биол. наук., проф.


С.А. Коннова
30.05.2023

Саратов 2023

Введение. Грамотрицательные альфа-протеобактерии рода *Azospirillum* широко распространены в ассоциациях с дикими и культурными злаками в различных климатических зонах. Это модельные объекты активно изучаемых растительно-микробных взаимодействий. С каждым годом список видов азоспирилл пополняется благодаря выделению новых представителей. На сегодняшний день род *Azospirillum* включает 28 видов.

Начальные стадии формирования ассоциаций на корнях растений, как и иные взаимодействия с макро- и микроорганизмами, реализуются с участием компонентов поверхности бактериальных клеток, в том числе липополисахаридов (ЛПС) и капсульных полисахаридов (КПС), гликополимеров, являющихся преобладающими компонентами внешней мембраны грамотрицательных бактерий. ЛПС – амфифильные макромолекулы, состоящие из гидрофобного липида А и гидрофильной полисахаридной части, представленной коровым олигосахаридом и О-специфическим полисахаридом (ОПС, О-антигеном). ОПС – наиболее вариабельная часть молекулы ЛПС, ответственная за взаимодействие с рецепторами и антигенные свойства. В свою очередь КПС азоспирилл является экстраклеточной формой ЛПС, продуцируемой бактериями в комплексе с белками-поринами, и в пределах одного штамма структуры, как правило, идентичны.

Исследования гликополимеров поверхности азоспирилл активно ведутся на протяжении более 30 лет, однако механизм действия этих макромолекул в процессе взаимодействия данных бактерий с другими организмами ещё не выяснен полностью. В связи с этим, необходимость накопления сведений об особенностях структурной организации и функциональной активности ЛПС и КПС *Azospirillum* остается актуальной.

Помимо установления структурно-функциональных особенностей данных макромолекул представляет интерес характеристика генных кластеров, ответственных за их биосинтез. В то время как для патогенных бактерий генные кластеры биосинтеза эндотоксинов изучены достаточно

подробно, в отношении азоспирилл подобных данных недостаточно. Исследование кластеров генов, ответственных за биосинтез О-антигенов, позволит получить сведения, ценные для таксономической классификации *Azospirillum*, а также дающие возможность проследить пути эволюции данных микроорганизмов.

Целью настоящей работы являлась характеристика структуры ЛПС бактерий типового штамма *A. palustre* В2, состава генного кластера, ответственного за его биосинтез, а также определение биологической активности ЛПС в отношении проростков пшеницы *Triticum aestivum* L.

Для достижения цели были поставлены и решались следующие задачи:

1. получить препаративные количества очищенного ЛПС *A. palustre* В2, охарактеризовать его биополимерный состав;
2. выделить из ЛПС О-антиген и установить структуру его повторяющегося звена;
3. провести биоинформатический анализ генов, вовлечённых в биосинтез О-антигена *A. palustre* В2;
4. оценить влияние ЛПС исследуемого штамма на проростки пшеницы *Triticum aestivum* L.

Основное содержание работы. Культивирование бактерий осуществляли при встряхивании в термостатируемых условиях (28°C, 180 об/мин). Осаждение клеток осуществляли на центрифуге Allegra X-30R (Beckman Coulter, США). Для концентрации растворов использовали вакуумный испаритель Laborota 4000 (Heidolph, Германия). Препараты гликополимеров и полисахариды лиофилизировали на приборе Bench Top 2K (VirTis, США). Гель-хроматографию осуществляли на колонке (54×3 см) с носителем Sephadex G-50 Fine (GE Healthcare, США). Детекцию элюции осуществляли с помощью рефрактометрического детектора 2142 (LKB, Швеция). Спектрофотометрический анализ проводили на приборе Specord 40 (Analytik Jena AG, Германия). Для гидролиза использовали твердотельный термостат Barnstead (Lab-Line, США). Образцы ЛПС растворяли с помощью

ультразвуковой бани Elmasonic S10H (Elma, Германия). Электрофорез проводили в камере для вертикального электрофореза VE-20 (Helicon, Россия). Для приготовления растворов использовали магнитные мешалки C-MAG HS 7 control (IKA, Германия) и MSH-300 (Biosan, Латвия). Водородный показатель растворов измеряли рН-метром PB-11 (Sartorius, Испания). Анализ моносахаридного состава и абсолютных конфигураций сахаров, состав жирных кислот липидов А определяли методом ГЖХ с использованием хроматографов Hewlett-Packard 7820A (Hewlett-Packard, США), GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабжённых капиллярными колонками EQUITY-1 (Supelco, Германия), DB-5 (Agilent, США). ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре DRX-600 (Bruker, Германия), для сбора и обработки данных использовали программу TOPSPIN 2.1.

Высушивание и термообработку посуды осуществляли в термошкафу SNOL 67/350 (SNOL, Литва). Оптическую плотность образцов в иммуноферментном анализе (ИФА) измеряли на микропланшетном фотометре Multiskan Ascent (Thermo Electron, Китай), полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010. Гены биосинтеза О-антигена извлекали из полногеномных сиквенсов при помощи инструмента BLASTn. Изображение генного кластера получали с помощью визуализатора Easyfig версии 2.2.5.

Экстракцией горячим водным фенолом бескапсульных сухих бактериальных клеток *A. palustre* В2 был получен ЛПС, выход которого после удаления из экстракта балластных белков, диализа и лиофилизации составил 8% от массы сухих клеток. Для полученного препарата ЛПС был охарактеризован биополимерный состав, данные о котором представлены в таблице 1.

Высокое содержание углеводного компонента, наличие 3-гидроксилированных жирных кислот и Kdo – маркерных соединений ЛПС, свидетельствует о чистоте выделенного препарата. При колориметрическом анализе методом Бредфорда было показано наличие незначительной примеси

белка в препарате ЛПС. Однако дальнейшие анализы методом электрофореза не подтвердили данного факта.

Таблица 1 – Биополимерный состав ЛПС *A. palustre* В2

Компоненты	Содержание, %
белки	4,8±0,1
углеводы	58±1,2
Кдо	0,7±0,05
D-глюкоза	25*
L-рамноза	75*
3-гидрокситетрадекановая кислота	46**
3-гидроксигексадекановая кислота	31**
гексадекановая кислота	4,5**
гексадеценная кислота	6,2**
октадеценная кислота	7,3**
другие кислоты	6**

Примечания – в таблице указано содержание к массе ЛПС; * - содержание к массе ОПС, ** - относительное содержание к сумме всех выявленных ЖК липида А.

В липидном компоненте исследуемого ЛПС было выявлено преобладание 3-гидрокситетрадекановой и 3-гидроксигексадекановой кислот, содержание которых составило около 80% всех МЭЖК. В значительно меньшем количестве были выявлены другие кислоты, содержание которых составляло 4,5-7,3 % всех выявленных методом ГЖХ МЭЖК. Подобный состав жирных кислот характерен и для других представителей *Azospirillum* spp. и является одним из хемотаксономических признаков, поскольку липид А – наиболее консервативный элемент ЛПС и чаще всего сохраняет свой состав в пределах бактериального рода.

В составе ОПС были идентифицированы два преобладающих нейтральных моносахарида – D-глюкоза и L-рамноза, соотношение которых составляло 1:3. Состав и соотношение моносахаридных остатков в ОПС штамма *A. palustre* B2 схожи с таковыми бактерий р. *Azospirillum*, отнесённых к серогруппе III.

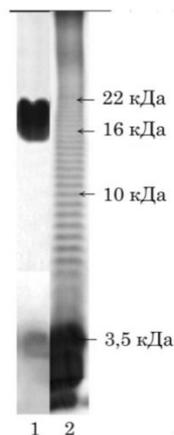
Анализ электрофоретического разделения выделенного препарата ЛПС после визуализации окрашиванием азотнокислым серебром с предварительным периодатным окислением позволяет говорить о преобладании S-форм молекул, для которых характерно наличие всех трех компонентов (липида А, корового олигосахарида, О-антигена). На представленной на рисунке 6 электрофореграмме визуализируется значительный высокомолекулярный пул молекул ЛПС и небольшое количество низкомолекулярных фракций. Эти данные хорошо согласуются с результатами спектрофотометрического определения общего содержания углеводов (~ 60 %) в анализируемом ЛПС.

На следующем этапе работы была проведена деградация ЛПС в мягких кислотных условиях, которая позволила провести разделение липидного и углеводного фрагментов полимера. Гидрофобная часть молекул ЛПС в виде нерастворимого в воде осадка была получена центрифугированием гидролизата. Водорастворимая углеводная часть ЛПС (коровый олигосахарид, замещенный полисахаридными цепями) была фракционирована на колонке с Sephadex G50 (рисунок 7).

По результатам разделения была собрана высокомолекулярная фракция ОПС, сконцентрирована и лиофилизирована. Выход ОПС составил 36,3 % от массы ЛПС. Моносахаридный анализ ОПС выявил присутствие двух моносахаридов, ранее выявленных в ЛПС и в том же соотношении.

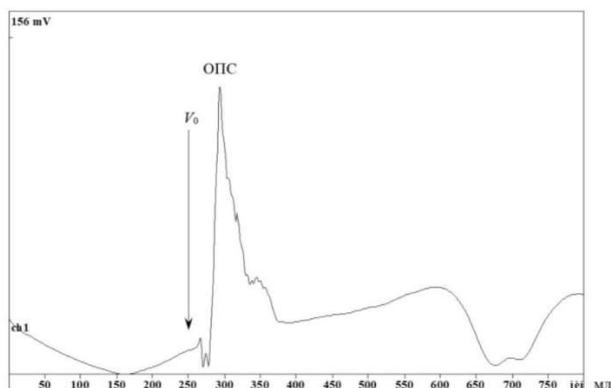
Установление структуры повторяющегося звена ОПС проводили с использованием ^1H и ^{13}C ЯМР-спектromетрии. Отнесение сигналов одно- и двумерных спектров ЯМР (таблица 2) показало, что ОПС *A. palustre* B2 состоит из разветвленных тетрасахаридных повторяющихся звеньев, с тремя

остатками α -L-рамнозы в основной цепи, причем один из которых ацетилирован во втором положении, и остатком β -D-Glcp – в боковой (рисунок 8).



A. palustre B2 (1), *P. putida* TSh-18 (2)

Рисунок 6 – Электрофореграмма препаратов ЛПС в 13.5%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия



I_0 – нулевой объем колонки

Рисунок 7 – Профиль элюции углеводной части ЛПС *A. palustre* B2 на колонке с Sephadex-G50 с рефрактометрическим детектором

^1H -ЯМР-спектр содержал пять сигналов в слабopольной области при δ 4,63–5,24, сигналы метильных групп рамнозы при δ 1,26–1,32, сигнал О-ацетильной группы при δ 2,21 и сигналы протонов моносахаридных циклов при δ 3,31–4,39. ^{13}C -ЯМР-спектр содержал сигналы четырех аномеров при δ 99.8–105.3, сигналы метильных групп рамнозы при δ 17,8–18,0, сигнал

О-ацетильной группы при δ 22,2 (CH₃), δ 175,5 (CO), сигнал CH₂OH-группы при δ 62,2 и сигналы углерода моносахаридных циклов при δ 70,3–81,3. Отсутствие в спектре сигналов углерода моносахаридных циклов в области δ 83–88 свидетельствовало о пиранозной форме моносахаридных остатков.

Сигналы ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектров были отнесены с применением 2D-спектров ЯМР (гомоядерные эксперименты ¹H, ¹H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерные эксперименты ¹H, ¹³C HSQC и HMBC). На основании внутризвеньевых корреляций H, H и H, C и констант спин-спинового взаимодействия ³J_{H,H} были идентифицированы спин-спиновые системы четырех моносахаридов: **A**, **B** и **C**, имеющих *манно*-конфигурацию, и **D**, имеющего *глюко*-конфигурацию. Спектр TOCSY продемонстрировал наличие H1/H2 и H2/H3 – H-6 кросс-пиков для остатков **A–C** и H1/H2 – H-6 кросс-пики для остатка **D**. Сигналы внутри каждой спин-спиновой системы были отнесены с помощью спектров COSY.

Альфа-конфигурация остатков **A–C** и бета-конфигурация остатка **D** были установлены на основании характеристических химических сдвигов сигналов C-5 при сравнении с литературными данными [83].

Позиции замещения моносахаридов были установлены на основании сдвига в слабое поле сигналов C2 и C3 остатка **A**, C-3 остатков **B** и **C** по сравнению с соответствующими незамещенными моносахаридами. Химические сдвиги C2–C6 остатка **D** были близки к таковым *O*-метил- β -Glcр [83] и указывали на то, что остаток **D** занимает терминальное положение в боковой цепи. Последовательность моносахаридов была установлена на основании спектров ROESY, которые демонстрировали межзвеньевые корреляции между аномерными протонами и протонами при трансгликозидных связях: **A** H1/**B** H3 при δ 5,11/3,74; **B** H1/**C** H3 при δ 5,03/4,04, **C** H1/**A** H2 при δ 5,24/4,39, **D** H1/**A** H3 при δ 4,63/4,03. В спектрах ¹H- и ¹³C-НМВС наблюдались соответствующие корреляции между аномерными протонами и атомами углерода при гликозидной связи: **A** H1/**B** C3 при δ 5,11/78,6; **B** H1/**C** C3 при δ 5,03/77,0, **C** H1/**A** C2 при δ 5,24/78,5, **D** H1/**A** C3 при δ 4,63/81,3.

На основании интегральной интенсивности сигналов аномерного протона остатка С с ацетильной и без ацетильной групп (δ_H 5,13 м.д.) степень ацетилирования остатка С составила ~75%.

Таблица 2 – Данные 1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров ОПС *A. palustre* В2 (химические сдвиги, м.д.)

Моносахаридный остаток	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 (6a; 6b) C6
$\rightarrow 2,3$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow A	5,11 102,2	4,39 78,5	4,03 81,3	3,64 72,4	3,88 70,3	1,32 18,0
$\rightarrow 3$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow B	5,03 103,3	4,08 71,1	3,74 78,6	3,55 72,7	3,72 70,7	1,28 17,9
$\rightarrow 3$ - α -L-Rhap2OAc-(1 \rightarrow C	5,24 99,8	5,30 73,0	4,04 77,0	3,61 73,1	3,81 70,6	1,26 17,8
β -D-Glcp-(1 \rightarrow D	4,63 105,3	3,35 74,9	3,48 76,9	3,31 71,0	3,42 77,1	3,61; 3,90 62,2

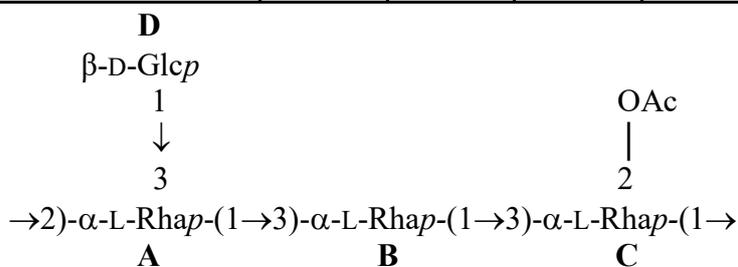


Рисунок 8 – Структура повторяющегося звена О-антигена ЛПС *A. palustre* В2

Подобные структуры повторяющихся звеньев ОПС были установлены ранее для ряда штаммов азоспирилл, отнесенных к серогруппе III. Проведенные исследования структуры ОПС *A. palustre* В2 позволили предположить его серологическое родство с азоспириллами серогруппы III, что было далее подтверждено серией иммунохимических тестов. В радиальной иммунодиффузии наблюдалась полоса преципитации, свидетельствующая о взаимодействии антиген-антитело между препаратом ЛПС *A. palustre* В2 и антителами к ЛПБК *A. lipoferum* Sp59b (рисунок 9 (а)), что подтверждало их гомологию. ИФА также показал высокое сродство упомянутых антител к ЛПС *A. palustre* В2 (рисунок 9(б)).

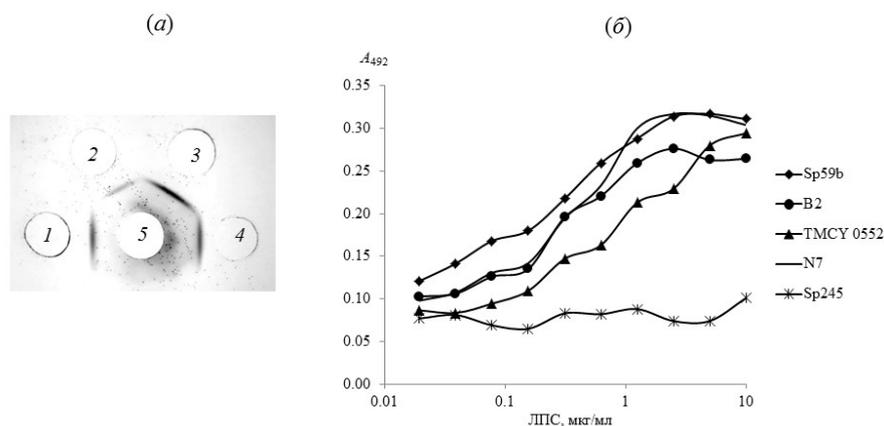


Рисунок 9 — Результат двойной радиальной иммунодиффузии ЛПС *Azospirillum* spp. с антителами к ЛПБК *A. lipoferum* Sp59b (5) (а); результат иммуноферментного анализа (б)

Рисунок 9 — Результат двойной радиальной иммунодиффузии ЛПС *Azospirillum* spp.

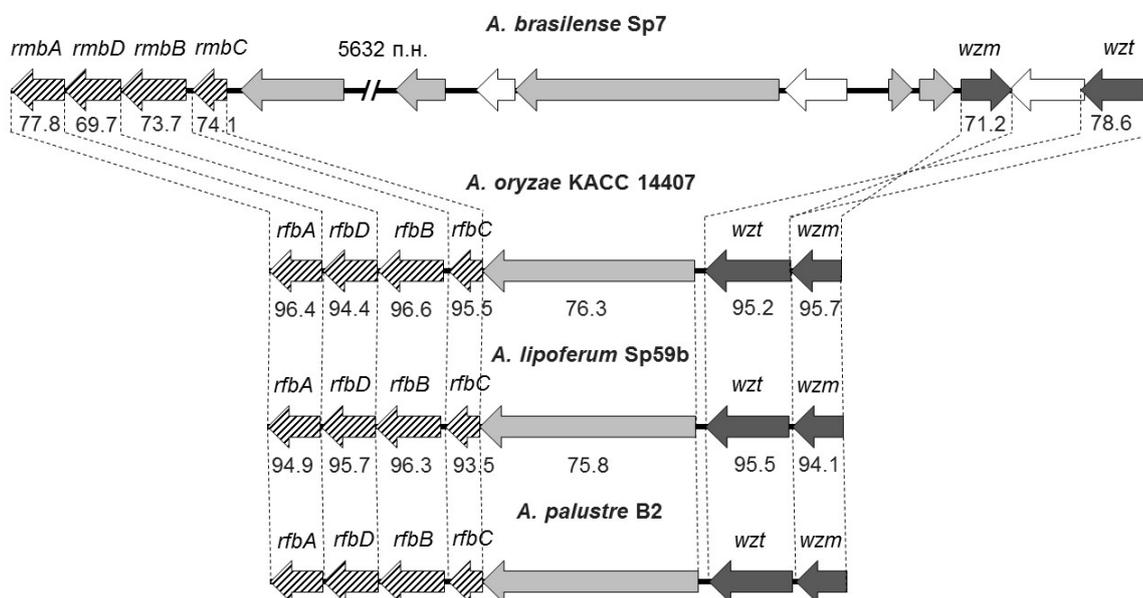
Идентичность структуры О-антигенов часто коррелирует с гомологией генов, ответственных за их биосинтез. Для подтверждения данного предположения был осуществлен биоинформатический анализ генов, обеспечивающих биосинтез О-антигена *A. palustre* B2, в ходе которого была выявлена высокая гомология с аналогичными генами *A. lipoferum* Sp59b и *A. oryzae* КАСС 14407, принадлежащих к серогруппе III (рисунок 10).

Буквенные обозначения генов приведены в соответствии с данными GenBank. Численно отмечена степень соответствия генов в процентном отношении.

В ходе биологических экспериментов с молодыми проростками пшеницы был установлен факт биологической активности ЛПС *A. palustre* B2 в отношении растений. Был снят ряд морфологических и биохимических показателей, свидетельствующих о развитии ответной реакции растения на присутствие в среде ЛПС (таблица 3; рисунок 11).

Был отмечен ряд морфологических ответных реакций, выраженный в увеличении средних значений длины побегов, корней и первого настоящего листа в опытной группе по сравнению с контролем. Также в экспериментальной группе наблюдалось увеличение сырой массы надземных и подземных органов и площади поверхности первого настоящего зелёного

листа. Значительного влияния ЛПС на среднее количество корней и длину coleoptilia проростков выявлено не было.



Примечание – заштрихованные стрелки – гены синтеза L-рамнозы, серые – гликозилтрансферазы, тёмно-серые – гены процессинга, белые – гены с неизвестными функциями

Рисунок 10 – Расположение кластеров генов биосинтеза L-рамнана

Таблица 3 – Морфометрические и физиолого-биохимические показатели семидневных проростков пшеницы *T. aestivum* L. сорта Саратовская 58

Параметры	ЛПС <i>A. palustre</i> B2(T)	Контроль
Длина побега, мм	133,4±9,23	94±17,56
Длина coleoptilia, мм	28,7±4,62	27,9±2,64
Длина первого настоящего листа, мм	107±11,2	65,3±16,9
Площадь первого настоящего листа, см ²	5,7±0,76	3,55 ±1
Количество корней, шт	3±0,67	3,3±0,48
Длина корней, мм	51,48±19,02	38,24±15,76
Сырая масса побега, г	0,8±0,09	0,65±0,06
Сырая масса корней, г	0,2±0,05	0,14±0,02

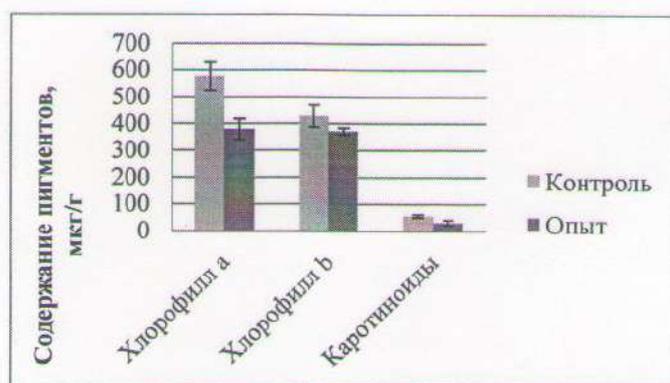


Рисунок 11 – Изменение содержания пигментов в первых настоящих листьях семидневных растений пшеницы *T. aestivum* L. сорта Саратовская 58 при добавлении ЛПС *A. palustre* B2

Не менее выраженной была и ответная реакция растений в виде снижения содержания пигментов (каротиноидов, хлорофиллов а и b) в первых настоящих листьях в проростках, культивированных с добавлением ЛПС. Можно выдвинуть предположение, что подобные результаты опосредованы адаптивными процессами, протекающими в растениях, и активизацией каскадов биохимических реакций, запускаемых молекулами ЛПС, и, возможно, ответственных за формирование иммунного ответа.

Заключение: В ходе данной работы был получен очищенный препарат ЛПС нового вида азоспирилл – *A. palustre* B2, охарактеризован его биополимерный состав и биологическая активность в отношении проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. Показано, что структура повторяющегося звена его О-антигена идентична таковой другим штаммам азоспирилл, отнесенным к серогруппе III. Данные проведённого биоинформатического анализа генного кластера биосинтеза ОПС согласуются с результатами структурных исследований и демонстрируют высокий уровень гомологии с аналогичными генами бактерий-представителей серогруппы III – *A. lipoferum* Sp59b и *A. oryzae* KACC 14407.

Handwritten signature
30.05.2023