

## II ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

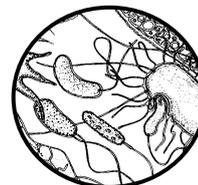


VII САТЕЛЛИТНАЯ ВСЕРОССИЙСКАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ  
«СТРАТЕГИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И РАСТЕНИЙ С ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДОЙ:  
УГЛЕВОДНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ В МЕЖОРГАНИЗМЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ»

7-11 июля 2014 г., Саратов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН  
Учебно-научный центр физико-химической биологии СГУ и ИБФРМ РАН  
При поддержке Российского фонда фундаментальных исследований

## II ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ



VII САТЕЛЛИТНАЯ ВСЕРОССИЙСКАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ  
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ  
«СТРАТЕГИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И РАСТЕНИЙ С  
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДОЙ: УГЛЕВОДНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ В  
МЕЖОРГАНИЗМЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ»

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

7-11 июля 2014 г.  
Саратов

2014

УДК 577.11; 577.114  
ББК 28.4; 28.57  
Ф94

Ф94 **Фундаментальная гликобиология:** Материалы конференции /  
II Всероссийская конференция. Саратов, 7-11 июля 2014. – Саратов:  
ООО «Ракурс», 2014. – 136 с.

**ISBN 978-5-9999-2102-4**

Сборник включает тезисы докладов участников конференции, организованной Институтом биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Работы посвящены рассмотрению актуальных проблем современной гликологии: изучению структуры и функций, иммунохимии углеводов и гликоконъюгатов; развитию методической базы исследования углеводов; синтетической химии моно-, олиго- и полисахаридов; вопросам биотехнологии углеводов; молекулярным основам метаболизма и регуляции углеводного обмена.

Материалы представляют интерес для специалистов, работающих в области химии биополимеров, микробиологии и биохимии растений и микроорганизмов.

Тезисы издаются в авторской редакции.

УДК 577.11; 577.114  
ББК 28.4; 28.57

Организационный комитет выражает благодарность за оказанную поддержку:  
Институту биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН  
Совету молодых ученых ИБФРМ РАН  
УНЦ физико-химической биологии при СГУ и ИБФРМ РАН  
Компаниям Eppendorf, SkyGen, Галахим и Диа-М.

Мероприятие проведено при финансовой поддержке  
Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-20094).

Уважаемые коллеги!

Сотрудники Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук рады приветствовать вас в нашем городе и надеются на то, что ваше пребывание здесь будет приятным и полезным для дальнейшего развития гликобиологии – удивительно интересной части биохимии и биоорганической химии, имеющей огромное значение для развития современной биотехнологии, медицины и многих отраслей промышленности.

Мы с удовлетворением отмечаем, что с 1985 года и по сей день с разными временными интервалами ИБФРМ РАН проводил конференции и рабочие совещания по самым разнообразным аспектам углеводной тематики. Идея организации на берегах Волги постоянно действующих мероприятий, связанных с научными и образовательными аспектами изучения химии и биохимии углеводов, в свое время была реализована благодаря активной поддержке академика Николая Константиновича Кочеткова и сотрудников лаборатории химии углеводов, которой он в то время руководил. Самое деятельное участие в организации и работе этих мероприятий в Саратове принимали доктора наук Владимир Николаевич Шibaев, Анатолий Иванович Усов, Александр Степанович Шашков, Юрий Александрович Книрель и многие другие. География участников этих конференций всегда была очень обширной и по сути дела охватывает разнообразные научные школы от Владивостока до Киева и Кишинева.

Как правило, научные совещания открывали путь в науку молодым ученым, для чего они часто сопровождались организацией сателлитных школ для молодежи. Что и имеет место в данном случае, когда конференция по фундаментальным проблемам гликобиологии сопровождается проведением ставшей традиционной школы-конференции «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Углеводные детерминанты в межорганизменных взаимодействиях».

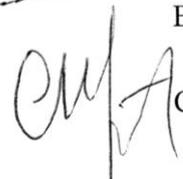
Следует особо отметить важную организующую роль в подобных мероприятиях академика Юрия Семеновича Оводова и его коллег, с которым мы успели продуктивно обсудить и детали настоящей конференции, а также его идею создания в стране научной программы «Гликология», которую он продвигал с большим энтузиазмом...

Быстро меняются времена, меняются люди, активно интересующиеся проблемами гликобиологии, и отрадно, что интерес к этой увлекательной части биологических знаний не только не угасает, но и растет, несмотря на сложный период развития науки в нашей стране.

Мы искренне благодарим всех участников конференции и школы за их активное участие в этих мероприятиях и желаем всем успехов, здоровья и счастья!

Заведующий лабораторией биохимии  
Заслуженный деятель науки РФ, д.б.н., профессор

Директор ИБФРМ РАН  
д.х.н., профессор

  
  
В.В. Игнатов  
С.Ю. Щеголев

## **Сопредседатели Оргкомитета**

**Щёголев Сергей Юрьевич, д.х.н., профессор,**

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов;

**Игнатов Владимир Владимирович, д.б.н., профессор, засл. деятель науки РФ,**

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов;

## **Программный комитет**

**Бовин Николай Владимирович, д.х.н., профессор,**

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва;

**Горшкова Татьяна Анатольевна, д.б.н., профессор,**

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань;

**Ермак Ирина Михайловна, д.х.н., профессор,**

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова РАН, г. Владивосток;

**Калебина Татьяна Сергеевна, д.б.н., профессор,**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва;

**Книрель Юрий Александрович, д.х.н., профессор,**

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, г. Москва;

**Командрова Надежда Алексеевна, к.х.н., доцент,**

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова РАН, г. Владивосток;

**Коннова Светлана Анатольевна, д.б.н., профессор,**

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов;

**Лукьянов Павел Александрович, д.х.н., профессор,**

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова РАН, г. Владивосток;

**Нифантьев Николай Эдуардович, член-корреспондент РАН,**

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, г. Москва;

**Оводов Юрий Семенович, академик РАН,**

Институт физиологии КомиНЦ УрО РАН, г. Сыктывкар;

**Попов Сергей Владимирович, д.б.н., доцент,**

Институт физиологии КомиНЦ УрО РАН, г. Сыктывкар;

**Усов Анатолий Иванович, д.х.н., профессор,**

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, г. Москва;

## **Локальный комитет**

Гринёв Вячеслав Сергеевич, к.х.н.

Красов Александр Игоревич, к.б.н.

Сигида Елена Николаевна

Суркина Алина Камильевна

Федоненко Юлия Петровна, к.б.н., доцент

Широков Александр Александрович, к.б.н.

## **ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ**

## **ЧТО УЗНАЮТ ГАЛЕКТИНЫ НА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДАХ?**

*Бовин Н.В.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). Москва.

bovin@carb.ibch.ru

Известно, что вирус гриппа связывается с сиалогликанами на поверхности клеток-хозяев. Согласно последним данным в инициацию вирусной инфекции также вовлечены дополнительные мишени. Следует отметить, что нейраминидаза вируса гриппа обеспечивает чрезвычайно высокую плотность терминальных галактозных остатков (лучше сказать терминаций Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) на поверхности вирионов, что дает замечательную возможность высокоаффинного взаимодействия вируса гриппа с галектинами клеток млекопитающих (лектинами, связывающимися с  $\beta$ -галактозидами). Были изучены шесть штаммов вируса гриппа, три клеточных линии (в качестве клеток-хозяев) и панель члечовеческих и куриных галектинов. Действительно, галектины дозозависимо промотировали связывание, но не влияли на стадию интернализации. Галектины способны восстановить способность вируса гриппа инфицировать десиалированные клетки до уровня типичного для полностью сиалилированных вирусов. Скорость адгезии (ее рост) зависит как от структуры гликана и природы конкретного галектина. Наиболее интригующей оказалась маскировка галектинами антигенных детерминант на поверхности вируса: связывание естественных антител против вируса гриппа дозозависимо снижается в присутствии галектинов, в то время как функциональная активность вирусных гемагглютиниана и нейраминидазы остается неизменной. То есть, вирус гриппа адаптировался к «хозяину» таким образом, что галектины хозяина, связываясь с определенным образом организованными на вирионе гликанами, работают против хозяина. Мы надеемся, что фундаментальные знания об особенностях структурной организации гликанов на поверхности вируса гриппа дадут толчок к разработке новых терапевтических стратегий.

## **О ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПОЛИСАХАРИДОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ РАСТЕНИЙ**

Горшкова Т.А.

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра  
Российской академии наук. Казань.

gorshkova@mail.knc.ru

В клеточной стенке высших растений представлено около 10 типов полисахаридных остовов, декорирование которых различными заместителями приводит к формированию бесконечного множества углеводных структур. На основании одной базовой структуры остова растение формирует полимеры с совершенно разными свойствами и функциями, которые активно «эксплуатируются» в ходе развития индивидуального растения. Каждый из примерно 40 типов клеток, существующих в растительных организмах, характеризуется особым набором и строением полисахаридов клеточной стенки. Тончайшие изменения их структуры сопровождают все этапы развития растительного организма.

Структура полисахаридов не кодируется непосредственно в геноме, и, как следствие, существует некоторая вариабельность многих параметров их строения (молекулярная масса, длина и расположение боковых цепей, наличие модифицирующих групп и т.д.). Однако вариабельность строения полисахаридов клеточной стенки ограничена их «функциональной пригодностью». Следовательно, носителем функциональной специфичности полисахаридов оказывается не конкретная молекула, а определенный тип молекул, что коренным образом отличает ситуацию от наблюдаемой для олигомерных структур, для которых, как правило, наблюдается жесткая зависимость между структурой и функцией, как в случае олигосахаринов.

«Типовые» характеристики полисахаридов определяются, вероятно, параметрами пространственной организации и способностью к образованию надмолекулярных комплексов. В отличие от белков и нуклеиновых кислот, для которых хорошо изучены принципы соответствия первичной последовательности мономеров и формируемой трехмерной структуры, детерминанты пространственной организации и физико-химических свойств полисахаридов остаются, во многом, не выясненными. Понимание функциональной нагрузки полисахаридов, выявление границ вариабельности их структуры, определяющих функциональную пригодность, резко ограничены отсутствием целостных представлений о структурных детерминантах различных свойств. В докладе будут представлены проблемы и подходы для исследования функциональной специфичности полисахаридов.

Работа поддержана грантами РФФИ 12-04-97077 и 14-04-01591.

## СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ КРАСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ – КАРРАГИНАНЫ: СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ МЕДИЦИНСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

*Посвящается памяти основателя химии углеводов на Дальнем Востоке  
дорогого Учителя академика Юрия Семеновича Оводова.*

*Ермак И.М., Бянкина А.О., Соколова Е.В.*

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН.  
Владивосток.

Морские организмы являются источником интересных по структуре и биологической активности нейтральных и ионных полисахаридов, которые обладают широким спектром физиологической активности и могут находить широкое использование в медицинской практике благодаря их безопасности, биосовместимости и нетоксичности. Из красных водорослей семейств *Gigartinales*, *Tichocarpaceae*, *Phyllophoraceae* выделены и комплексно изучены каррагинаны различных структурных типов, в том числе гибридной структуры. Условия обитания макрофитов и переход водоросли из одной стадии развития в другую сопровождаются изменениями в структуре синтезируемого каррагинана. Структурные особенности каррагинанов определяют их физико-химические свойства и надмолекулярную организацию, что показано методами электрокинетических и вискозиметрических измерений, светорассеяния, электронной и атомно-силовой микроскопии. Исследуемые каррагинаны проявляют иммуномодулирующую активность, стимулируя синтез цитокинов мононуклеарными клетками крови человека. Каррагинаны с низкой степенью сульфатирования и гибридной структурой обладают избирательным действием, усиливая синтез противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и не проявляя активности в отношении индукции синтеза провоспалительных ФНО $\alpha$  и ИЛ-6 цитокинов, в то время как высокосульфатированные каррагинаны показывают выраженное воздействие на макрофаги, активируя процесс формирования активных форм кислорода. Антикоагулирующее и противовирусное действие каррагинанов определяется степенью их сульфатирования, однако не является простой функцией заряда молекул, а зависит во многом от строения углеводной цепи и расположения сульфатных групп, молекулярной массы и концентрации полисахарида. Каррагинаны проявляют защитный эффект против повреждающего действия эндотоксина грамотрицательных бактерий. Полиэлектролитные комплексы, разработанные на основе каррагинанов, обладают гастропротекторным действием. Полученные в экспериментах *in vitro* и *in vivo* данные по физиологической активности каррагинанов открывают перспективы их использования в медицинской практике.

## СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЛЮКАНТРАНСФЕРАЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ГРИБОВ

Калебина Т.С.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,  
биологический факультет. Москва.

kalebina@gmail.com

Глюкан – основной структурный полисахарид клеточной стенки многих грибов, – будучи синтезирован ферментным комплексом, локализованным в цитоплазматической мембране, поступает в периплазматическое пространство и затем в клеточную стенку (КС). Дальнейшие превращения молекулы глюкана осуществляются глюкантрансферазами, способными гидролизовать и модифицировать этот линейный полисахарид: помимо разветвления и внесения различных типов связи в глюкан, данные ферменты закрепляют на нем функционально значимые молекулы белков путем ковалентного связывания с глюканом [1]. От работы глюкантрансфераз зависит прочность клеточной стенки, а также ее метаболическая активность. Возможность клетки регулировать активность ферментов, локализованных в КС, ограничена условиями, в которых они функционируют. В докладе будут охарактеризованы структурные особенности глюкантрансфераз КС и предложена модель регуляции активности этих ферментов у дрожжей [2–5].

Работа поддержана грантами РФФИ (10-04-01821-а, 14-04-01187 а),  
Госконтрактом Минобрнауки (16.740.11.0478)

1. Калебина, Кулаев (2001) *Успехи биологической химии*. 41:105–130.
2. Плотникова и др. (2006) *Доклады академии наук*. 409(6): 828–831.
3. Kalebina *et al.* (2008) *Prion*. 2(2):91–96.
4. Горковский и др. (2009) *Биохимия*. 74: 1498–1505.
5. Bezsonov *et al.* (2013) *Prion*. 7(2):175–184.

# РАСЩЕПЛЕНИЕ КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ *Acinetobacter baumannii* СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ХВОСТОВЫМИ ДЕПОЛИМЕРАЗАМИ ЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ

*Книрель Ю.А.<sup>1</sup>, Сенченкова С.Н.<sup>1</sup>, Шапков А.С.<sup>1</sup>, Чижев А.О.<sup>1</sup>, Шнейдер М.М.<sup>2</sup>, Мирошников К.А.<sup>2</sup>, Попова А.В.<sup>3</sup>, Воложанцев Н.В.<sup>3</sup>, Buth S.<sup>4</sup>, Leiman P.<sup>4</sup>*

<sup>1</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Москва.

<sup>3</sup> Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Оболенск, Московская обл.

<sup>4</sup> École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Lausanne, Switzerland.

uknirel@gmail.com

Роль *Acinetobacter baumannii* как возбудителя внутрибольничных инфекций постоянно возрастает во всем мире; число летальных исходов составляет от 20% до 54%. Одним из факторов вирулентности *A. baumannii* являются капсульные полисахариды (КПС). В связи с высокой устойчивостью *A. baumannii* к антибиотикам перспективной является фаготерапия, основанная на инфицировании бактериальных клеток бактериофагами и их последующем лизисе. Фаги узнают КПС и перед инфицированием расщепляют его специфической хвостовой деполимеразой. С целью разработки биохимических основ фаготипирования и фаготерапии мы изучили механизмы расщепления КПС двух штаммов *A. baumannii* рекомбинантными фаговыми деполимеразами. Строение продуктов устанавливали с помощью спектроскопии <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения. Деполимераза фага FriI гидролизовала КПС штамма 28 по гликозидной связи остатка QuiNAc4NAc и приводила в основном к нонасахариду, состоящему из трех повторяющихся звеньев КПС (схема). Лиаза фага AP22 расщепляла КПС штамма 1053 по механизму β-элиминирования от остатка ManNAcA, давая в основном трисахарид, соответствующий одному повторяющемуся звену КПС. Структуры обеих деполимераз и комплекса лиазы фага AP22 с трисахаридным продуктом расщепления КПС штамма 1053 установлены рентгеноструктурным анализом.

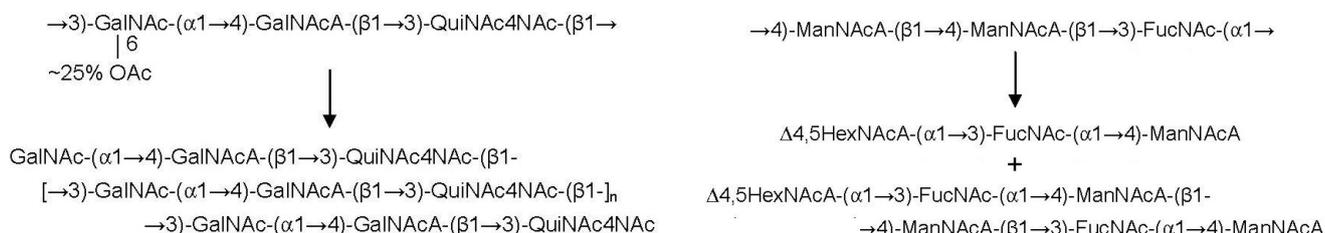


Схема. Деполимеризация КПС *A. baumannii* 28 хвостовой гидролазой фага FriI (слева) и КПС *A. baumannii* 1053 хвостовой лиазой фага AP22 (справа). Δ4,5HexNAcA, 2-ацетамидо-2,4-дидезокси-L-эритро-гекс-4-енурононовая кислота); n = 1 (основной продукт), 0, 2-4 (минорные продукты).

## **СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ О-АНТИГЕНОВ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МОРСКИХ ПРОТЕОБАКТЕРИЙ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**

*Командрова Н.А., Томищ С.В., Кокоулин М.С., Пислягин Е.А.*

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова

Дальневосточного отделения Российской академии наук. Владивосток.

komand@piboc.dvo.ru

Микроорганизмы являются важным компонентом морских экосистем, обладают широким спектром физиологических адаптационных механизмов и синтезируют широкий спектр биологически активных соединений. Морские микроорганизмы, находясь в весьма специфических условиях обитания, отличаются от наземных форм рядом приспособительных особенностей. Прежде всего, это относится к клеточной стенке бактерий, которая играет определяющую роль во взаимодействии микроорганизма с окружающей средой.

Изучены липополисахариды из морских грамотрицательных бактерий родов *Idiomarina*, *Rheinheimera*, *Arenibacter*, *Cellulophaga* и *Echinicola*. Установлены полные структуры их антигенных полисахаридов. Исследования показали, что морские грамотрицательные бактерии выше указанных родов продуцируют поверхностные О-антигены уникального строения. Все О-специфические полисахариды имеют кислый характер, содержат необычные и редко встречающиеся моносахариды, высшие сахара, а также компоненты неуглеводной природы. Проведено исследование цитотоксической и иммуномодулирующей активностей выделенных липополисахаридов. Показано, что все исследованные соединения в диапазоне концентраций до 100 мкг/мл не обладают цитотоксической активностью в отношении лимфоцитов селезенки мыши. Установлено, что липополисахариды стимулируют синтез активных форм кислорода и усиливают лизосомальную активность в перитониальных макрофагах мыши. Установлена дозо-зависимая характеристика их активности.

Работа поддержана грантом РФФИ (12-04-00938).

## ФЛАВОНОИДЫ РАСТЕНИЙ И ГЛИКАНЫ БАКТЕРИЙ В СИМБИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ

*Коннова С.А.<sup>1</sup>, Каневский М.В.<sup>1</sup>, Федоненко Ю.П.<sup>2</sup>, Игнатов В.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов

Konnovasa@yandex.ru

Флавоноиды – широко распространённые фенилпропаноидные метаболиты растений. Биосинтез и аккумуляция флавоноидов специфичны для определённых типов клеток. Они неравномерно распределяются по длине корня, например, накапливаются в клетках корневого кончика и чехлика, экскретируются в корневые экссудаты, и эти процессы регулируются внешними факторами [1]. Данные о содержании флавоноидов в ризосфере существенно разнятся в различных публикациях и определяются типом растения, способом экстракции и присутствием микроорганизмов, разрушающих флавоноиды, которые могут, тем не менее, персистировать в ризосфере до 72 часов. Для ряда ризосферных бактерий флавоноиды являются аттрактантами, проявляют способность к специфической индукции симбиотических отношений и патогенеза, и также откликаются на сигнальные молекулы, участвующие в этих процессах. Известно, что флавоноиды активируют экспрессию более 100 генов ризобактерий, которые важны для растительно-микробных взаимодействий, включая гены, ответственные за формирование биоплёнок, агрегацию бактерий, биосинтез экзополисахаридов. Наиболее исследованы механизмы участия флавоноидов в бобово-ризобиальном и актиноризальном симбиозах, где они определяют специфичность формирования симбиотических пар. Показано, что флавоноиды могут регулировать активность генов синтеза экзополисахаридов, индуцирующих защитные реакции растений [2]. Получены результаты, указывающие на влияние комплекса фенольных соединений из экссудатов корней пшеницы и отдельных препаратов флавоноидов на физико-химические свойства поверхности ассоциативных ризобактерий, химический состав и структуру липополисахаридов их внешней мембраны [3].

Работа частично поддержана РФФИ (проект 14-0-01658а).

1. Cesco *et al.* (2010). *Plant Soil*. 329: 1–25.
2. Dunn *et al.* (1992) *FEMS Microbiol. Lett.* 97: 107–112.
3. Каневский и др. (2014) *Микробиология*. 83(2): 143–151.

## ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОСПАЕЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕКТИНОВЫХ ГЕЛЕЙ

*Попова Г.Ю., Никитина И.Р., Латкин Д.С., Попов С.В.*  
Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.  
popov@physiol.komisc.ru

Борьба с послеоперационным спаечным процессом и его осложнениями остается одной из актуальных проблем общей хирургии. В последние годы большое внимание уделяется разработке барьерных материалов, препятствующих спаечному процессу за счет разобщения раневых поверхностей. Цель работы – выявить пектиновые гели, ингибирующие спайкообразование в брюшной полости у крыс.

Спаечный процесс в брюшной полости моделировали путем травматического повреждения поверхности слепой кишки и прилежащего участка брюшной стенки. Площадь раневой поверхности составляла 2–2.5 см<sup>2</sup>. Через 7 дней проводили повторную лапаротомию и визуально оценивали образование спаек по 5-ти балльной системе.

Обнаружено, что у всех контрольных животных между поврежденными участками формируются плотные спайки с планарным прикреплением ( $4.0 \pm 0.5$  балла). Установлено, что обработка раневых поверхностей гелями ряда пектинов ингибирует развитие спаек: спайки отсутствуют или представляют собой тонкие пленки, которые легко разрываются. Выраженность спаечного процесса составила  $1.0 \pm 1.2$ ,  $1.8 \pm 1.3$ ,  $2.2 \pm 1.6$  и  $2.0 \pm 1.6$  балла ( $p < 0.01$ ,  $n = 5$ ) при применении гелей, полученных из пектина сливы, клюквы, брусники и амидированного цитрусового пектина, соответственно. Гели, полученные из пектинов яблок и томатов, не влияют на спайкообразование. Установлено, что внутрибрюшинное введение пектиновых гелей вызывает лейкоцитарную реакцию, которая в целом не отличается от реакции на введение соответствующих пектиновых растворов. Остатков гелевого материала в брюшной полости к этому времени не обнаруживается, что свидетельствует о биodeградируемости исследованных образцов. Показано, что пектиновые гели обладают антиадгезионными свойствами. Количество фибробластов линии NIH/3T3, адгезированных на поверхности гелей, снижено в пять раз по сравнению с адгезией в контрольных условиях. В тоже время пектиновые гели не влияют на жизнеспособность клеток.

Таким образом, выявлены пектиновые гели, ингибирующие спайкообразование в брюшной полости. Полученные данные открывают перспективу конструирования гелевых структур на основе пектинов с целью создания новых барьерных материалов для хирургии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума УрО РАН «Молекулярная и клеточная биология (№12-П-4-1033).

## СУЛЬФАТИРОВАННЫЙ КСИЛОФУКАН ИЗ БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ *Punctaria plantaginea* – НОВЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ФУКОИДАНОВ

Усов А.И., Билан М.И., Шашков А.С.

Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН. Москва.

Тихоокеанская бурая водоросль *Punctaria plantaginea* (Roth) Greville, представитель порядка Ectocarpales, семейства Chordariaceae, обладает уникальным полисахаридным составом. Содержание фукоидана в ней превышает содержание альгината (для большинства бурых водорослей наблюдается обратное соотношение этих полисахаридов), а резервным полисахаридом, вместо обычного ламинарана, служит новый для бурых водорослей линейный (1→6)-β-D-глюкопиранан [1]. Фукоидан содержит фукозу, ксилозу и сульфат в мольном соотношении 5 : 2 : 3 и также представляет собой новый тип сульфатированного полисахарида бурых водорослей. Его строение было изучено химическими методами (метилированием и периодатным окислением в варианте расщепления по Смиту до и после десульфатирования) в сочетании с ИК- и ЯМР-спектроскопией. Показано [2], что молекулы полисахарида содержат главную цепь, построенную из (1→3)-связанных остатков α-L-фукопиранозы, две трети которых сульфатированы по положениям 2 с образованием трисахаридных повторяющихся звеньев →3)-α-L-Fucp2S-(1→3)-α-L-Fucp2S-(1→3)-α-L-Fucp-(1→. Структурная регулярность кора полимерных молекул замаскирована случайным распределением нессульфатированных остатков β-D-ксилопиранозы, которые занимают положения 4 в значительной части сульфатированных и нессульфатированных остатков фукозы главной цепи. Необычное положение полос поглощения сульфата в ИК-спектрах и ряда сигналов в спектрах ЯМР фукоидана, по-видимому, связано с искажениями стандартной кресловидной конформации остатков фукозы под влиянием множественного замещения.

1. Билан и др. (2014) *Изв. АН, сер.хим.*, в печати.
2. Bilan *et al.* (2014) *Carbohydr. Res.*, submitted.

## НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА ВОДНЫХ СИСТЕМ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

*Бурыгин Г.Л., Сигида Е.Н., Федоненко Ю.П., Хлебцов Б.Н., Щёголев С.Ю.*  
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.  
su@ibppm.sgu.ru

Рассматриваются процессы образования надмолекулярных структур в водных системах *in vitro* бактериальных липополисахаридов (ЛПС). Обсуждаются их физико-химические механизмы и методы исследования.

В качестве примера приведены результаты анализа образования надмолекулярных частиц (НМЧ) в водных растворах ЛПС ряда штаммов бактерий рода *Azospirillum*, проведенного в интервале температуры 0–60 °С при фиксированной концентрации ЛПС 2 мг/мл с применением методов динамического рассеяния света (ДРС) и атомно-силовой микроскопии.

Установлены температурные границы, в которых отмечен переход от скачкообразного изменения интенсивности рассеянного света (при фиксированном угле рассеяния) на графиках ее зависимости от температуры и значительной гетерогенности системы по размерам частиц к более сглаженному характеру этой зависимости, делающему возможным корректное определение размера НМЧ (предположительно образовавшейся мицеллярной фазы) методом ДРС. Для каждого температурного интервала относительной стабильности оптических характеристик определены средний размер и степень полидисперсности образовавшихся взвесей НМЧ, показавшие существенную зависимость от штаммовой принадлежности ЛПС. Установлено, что для сравнительной оценки значений числовой концентрации НМЧ и массово-объемной концентрации полимерного вещества во взвеси исследованных водных систем ЛПС азоспирилл могут быть использованы соотношения [1, 2], полученные в приближении оптически мягких релеевских частиц. Интерпретация результатов проведена в предположении, что при достижении определенных значений температуры в исследованных системах возникают однослойные мицеллы, размер и концентрация которых зависит от особенностей химического строения ЛПС, выделенного из разных штаммов азоспирилл.

Работа поддержана грантом РФФИ (14-04-01658).

1. Щёголев С.Ю. (1999) *Дис. ... д-ра хим. наук*: 144–146.
2. Shchyogolev S.Yu. (1999) *J. Biomed. Opt.* 4(4): 490–503.

## **УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ**

## НОВЫЕ БЕЗБЕНЗИЛЬНЫЕ ГЛИКОЗИЛ ДОНОРЫ ДЛЯ СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОГО 1,2-ЦИС-ФУКОЗИЛИРОВАНИЯ

*Абронина П.И., Зинин А.И., Малышева Н.Н., Чижов А.О., Кононов Л.О.*

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

Polina-Abronina@Yandex.ru

Ранее было обнаружено влияние удаленного соучастия бензоильных защитных групп при О-3 и О-4 в 2-О-бензильных гликозил донорах на результат стереоселективного 1,2-*цис*-L-фукозилирования [1]. Недавно мы разработали новый безбензильный подход для стереоселективного построения 1,2-*цис*-гликозидных связей при синтезе олигоарабинофуранозидов *Mycobacterium tuberculosis* [2,3]. Как часть нашего исследования, направленного на синтез олигосахаридных фрагментов О-антигенного полисахарида ризобактерии *Azospirillum brasilense* Sp7 мы предложили использовать в 1,2-*цис*-фукозилировании новые гликозил доноры на основе альфа-L-тиофукозида с несоучаствующей триизопропилсилильной группой при О-2, а также бензоильными и трифторацетильными группами в 3-О и 4-О положениях. Новые фукозил доноры показали высокую стереоселективность 1,2-*цис*-L-фукозилирования в гликозилировании 4-ОН положения гликозида глюкозамина с 4-(2-хлорэтокси)фенильным (СЕР)-агликоном.

1. Gerbst *et al.* (2001) *J. Carbohydr. Chem.* 20: 821–831.
2. Fedina *et al.* (2012) *Carbohydr. Res.* 357: 62–67.
3. Abronina *et al.* (2014) *Carbohydr. Res.* submitted.

## ФУКОЗОСПЕЦИФИЧНЫЙ ЛЕКТИН АЗОСПИРИЛЛ КАК СИГНАЛЬНАЯ МОЛЕКУЛА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С РАСТЕНИЯМИ

*Аленькина С.А., Богатырев В.А., Никитина В.Е.*

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.

alenkina@ibppm.sgu.ru

В последние годы лектины бактериального происхождения претендуют на весьма важную и многообразную роль в формировании и успешном функционировании растительно-микробных сообществ.

Фукозоспецифичный лектин ассоциативных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 является гликопротеином с молекулярной массой 36 кДа и участвует в адгезии к корням проростков пшеницы [1, 2].

С помощью флуоресцентной микроскопии было показано, что лектин обнаруживается исключительно на внешней стороне плазматической мембраны и не способен проникать в клетки растения.

Показана способность лектина *A. brasilense* Sp7 вызывать индукцию аденилатциклазной, NO-синтазной, НАДФН-оксидазной, Са-фосфоинозитольной, липоксигеназной сигнальных систем корней пшеницы в процессе узнавания на начальных стадиях формирования растительно-бактериальной ассоциации.

Исследование взаимодействия лектина азоспирилл с корнями проростков пшеницы показало, что он способен вызывать целый спектр изменений в метаболизме растительной клетки – стимулирует прорастание семян, связанное с изменением митотического состояния растительных клеток [3].

Обнаружена модифицирующая способность лектинов по отношению к активности  $\alpha$ -, $\beta$ -глюкозидаз,  $\beta$ -галактозидазы корней проростков пшеницы. Показано, что наибольшее влияние лектин оказывал на ферменты фракции экзокомпонентов, что является логичным, так как именно в этой фракции находится наибольшее количество рецепторов для лектинов бактерий [4].

Кроме того, была продемонстрирована способность лектина вызывать индукцию активности ферментов пектинолитического комплекса растительной клетки, вызывающих распад полимеров клеточной стенки, являющихся местом первого контакта бактерий и растения-хозяина, причем наибольший эффект наблюдался по отношению к полигалактуроназе.

Полученные результаты вносят коррективы в систему взглядов по лектин-углеводным взаимодействиям, реализуемым при возникновении азотфиксирующих симбиозов с учетом роли бактериальных лектинов.

1. Никитина и др. (1994) *Биохимия*. 59 (5): 656–662.
2. Никитина и др. (1996) *Микробиология*. 65 (2): 165–170.
3. Никитина и др. (2004) *Известия АН. Серия биологическая*. 4: 431–435.
4. Никитина и др. (1996) *Микробиология*. 65 (2): 165–170.

## ЛЕКТИН ПШЕНИЦЫ АЗП – ФАКТОР, УСКОРЯЮЩИЙ ВЫХОД БАКТЕРИИ *Azospirillum brasilense* ИЗ СОСТОЯНИЯ ПОКОЯ

*Антонюк Л.П., Кушнерук М.А., Славкина Е.А.*

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.  
Ant306@ibppm.sgu.ru

Лектины – белки и гликопротеины, способные обратимо и специфично связываться с углеводными фрагментами гликоконъюгатов – являются во многих случаях биологически активными веществами (БАВ) с широким спектром действия. У растений пшеницы *Triticum aestivum* имеется несколько лектинов, наиболее значимым из которых является, по совокупности имеющихся данных, агглютинин зародышей пшеницы (АЗП). Этот белок, аналогично другим экскретируемым растительным лектинам, входит в состав корневых выделений и связывается с обитающими на корнях пшеницы бактериями. Ранее было показано, что АЗП при взаимодействии с клетками микросимбионта пшеницы *Azospirillum brasilense* Sp245 проявляет свойства БАВ, стимулируя процессы, значимые для формирования и функционирования симбиоза (азотфиксацию, синтез бактериями фитогормона ИУК, клеточное деление и др.) [1]. Задачей данной работы была проверка предположения о способности АЗП ускорять выход *A. brasilense* из состояния покоя.

Эксперименты проводили с двумя типами жидких покоящихся культур *A. brasilense* Sp245: (i) полученными в естественном цикле старения (возраст бактерий – более 6 лет, содержание жизнеспособных клеток – не менее  $10^3$  кл./мл) и (ii) с перешедшими в покой под действием комплексного стресса. Во втором случае азоспириллы утрачивали способность к размножению на твердых средах, т.е. содержали жизнеспособные, но некультивируемые клетки (ЖНК) [2]. Установлено, что способность АЗП к стимуляции выхода азоспириллы из состояния покоя носит дозо-зависимый характер. Наиболее выраженный эффект – «взрыв» размножения бактерий – наблюдался при  $10^{-10}$  М АЗП в среде и использовании состоящей из ЖНК культуры *A. brasilense*, в то время как в контроле бактерии оставались в состоянии покоя. Лектин индуцировал переход азоспирил к размножению и при концентрации  $10^{-9}$  М, однако при  $10^{-11}$ – $10^{-12}$  М был не активен. Показано также, что присутствие в среде АЗП приводит к сокращению лаг-фазы переходящей к размножению культуры. Предполагается, что способность лектина пшеницы ускорять переход *A. brasilense* от покоя к размножению может реализовываться в естественных условиях и давать азоспириллам конкурентные преимущества при колонизации растения-хозяина.

1. Антонюк Л.П. (2005) В кн. «Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями». М.: Наука, С. 118–159.
2. Кушнерук и др. (2013) *Микробиология*. 82 (5): 563–570.

## БИОСИНТЕЗ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Бакланов Е.С.<sup>1,2</sup>, Суховских А.В.<sup>1,2</sup>, Цидулко А.Ю.<sup>1</sup>, Кунин И.С.<sup>3</sup>,  
Айдагулова С.В.<sup>4</sup>, Григорьева Э.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН. Новосибирск.

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет. Новосибирск.

<sup>3</sup> Городская клиническая больница №1. Новосибирск.

<sup>4</sup> Новосибирский государственный медицинский университет. Новосибирск.

Evg.Bakl@gmail.com

Рак предстательной железы человека является наиболее частым злокачественным заболеванием после рака легких и занимает второе место по числу смертей среди мужчин. Маркеров диагностики и агрессивности рака предстательной железы недостаточно. Одно из таких направлений поиска новых маркеров – это гликомаркеры, к которым относятся гликозаминогликаны. Из литературных данных известно, что в опухолевых клетках и тканях изменяется содержание гликозаминогликанов и их степень сульфатирования [1, 2]. Возможно, это связано с изменениями в системе биосинтеза гликозаминогликанов в опухолях.

Нами была исследована транскрипционная активность системы биосинтеза и содержание ГАГ в нормальных и опухолевых клетках и тканях предстательной железы человека. Было показано, что опухолевые клетки предстательной железы человека различной степени агрессивности обладают различной активностью системы биосинтеза ГАГ, что коррелирует с содержанием ГАГ на поверхности культивируемых клеток *in vitro*. В опухолях предстательной железы человека *in vivo* происходит значительное снижение транскрипционной активности системы биосинтеза ГАГ, что может объясняться снижением способности фибробластов внеклеточного матрикса синтезировать ГАГ. Также была определена общая концентрация гликозаминогликанов в опухолевой ткани предстательной железы человека – 2,89 мкг/(мг ткани) и оценена средняя степень сульфатирования гликозаминогликанов – 0,89–1,36 сульфатных групп на один дисахарид углеводной цепи гликозаминогликанов.

Таким образом, изменения в системе биосинтеза, содержании и составе ГАГ в опухолях предстательной железы человека потенциально могут быть использованы в качестве дополнительных маркеров при диагностике рака предстательной железы.

Работа поддержана грантами РФФИ (12-04-01657а).

1. Mikami *et al.* (2001) *Jpn. J. Cancer Res.* 92 (10): 1062–1073.

2. Tsara *et al.* (2002) *Anticancer Res.* 22 (5): 2893–2898.

# ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ $\beta$ -КСИЛОЗИДАЗЫ ИЗ *Aspergillus Awamori X-100* В *Pichia pastoris* И ИММОБИЛИЗАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА СОВМЕСТНО С КСИЛАЗОЙ GRINDAMYL H121 НА ПОЛИМЕТАКРИЛАТНЫХ МОНОЛИТНЫХ КОЛОННАХ ДЛЯ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ КСИЛОЗЫ

*Бобров К.С.*<sup>1</sup>, *Волокитина М.В.*<sup>2</sup>, *Влах Е.Г.*<sup>3</sup>, *Кульминская А.А.*<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт», Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова. Гатчина.

<sup>2</sup> Институт высокомолекулярных соединений РАН. Санкт-Петербург.

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Химический факультет. Санкт-Петербург.

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский государственный политехнический университет.

Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций, кафедра «Медицинская физика». Санкт-Петербург.

bobrov@omrb.pnpi.spb.ru

Гликозидная связь является одной из наиболее прочных связей, существующих в природе. Гликозидгидролазы способны ускорить гидролиз гликозидной связи более чем в  $10^7$  раз и являются одними из наиболее эффективных катализаторов. Ксилан – основной структурный полисахарид клеток растений. Основными компонентами ксиланолитической системы являются эндо-ксилазы, гидролизующие ксилан до коротких ксилоолигосахаридов, и  $\beta$ -ксилозидазы, расщепляющие короткие ксилоолигосахариды до ксилозы.

Ксилоолигосахариды и ксилоза имеют широкое применение в пищевой промышленности при получении пищевых волокон, ксилита, ароматических продуктов или кормов для животных. Одним из наиболее удобных и экологических методов производства ксилоолигосахаридов и ксилозы является ферментативная деградация ксилана при использовании гетерогенных биокатализаторов. Однако успешная реализация преимуществ гетерогенного биокатализа во многом определяется методом и условиями иммобилизации фермента, а также природой и свойствами твердого носителя.

В данной работе были проведены клонирование грибной  $\beta$ -ксилозидазы из *Asp. awamori X-100* и ее иммобилизация совместно с ксилазой *Grindamyl H121* на поверхности современных стационарных фаз – макропористых монолитных материалов. Были определены кинетические параметры деградации ксилана с помощью полученных проточных гетерогенных биокатализаторов, а также разработана методика ВЭЖХ анализа продуктов гидролиза ксилана. В качестве стационарной фазы для хроматографического анализа использовали коммерческий монолитный анионообменный диск, что, впоследствии, позволило также осуществить процесс комбинирования каталитического процесса с on-line анализом получаемых продуктов.

Работа выполнена при финансовой поддержке СПбГУ (грант 0.37.682.2013).

## СОВМЕСТНОЕ ИНКУБИРОВАНИЕ БАКТЕРИОФАГА БИМ BV-53 И ЛПС БАКТЕРИИ-ХОЗЯИНА *Pseudomonas fluorescens* БИМ B-582

Бондаревич Н.В., Новик Г.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси. Минск.

natal-vasilna@rambler.ru

В основе механизма заражения бактериальной клетки бактериофагом лежит взаимодействие вирусной частицы с вторичным рецептором клеточной стенки бактерии – липополисахаридом (ЛПС) для грамотрицательных бактерий и пептидогликаном и тейхоевыми кислотами для грамположительных. Результатом адсорбции является расщепление углеводных связей специфичным ферментом хвостовой части бактериофага.

Каталитическая активность вирусных ферментов представляет интерес для биохимических манипуляций с бактериальными полисахаридами. Бактериальные олигосахариды при конъюгации с белком или в чистом виде применяются в качестве вакцин. С помощью ферментативной фрагментации молекул полисахаридов можно провести анализ структуры исходного полимера. Энзиматическое расщепление является мягким способом получения искомым углеводных остатков и конкурирует с универсальным методом кислотного гидролиза.

Целью работы было установление ферментативной активности нативных фаговых частиц при совместном инкубировании бактериофага БИМ BV-53 и ЛПС бактерии-хозяина *Pseudomonas fluorescens* БИМ B-582 Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

В ходе эксперимента ЛПС были выделены водно-бутаноловым методом [1]. Очистка лизата бактериофага осуществлялась методами высаливания и ультрацентрифугирования [2]. Измерение кинематической вязкости смеси бактериофага и ЛПС проводилось с помощью капиллярного вискозиметра. Оценка восстанавливающего потенциала смеси осуществлялась по методу [3].

В результате проведенного исследования было показано, что при совместном инкубировании бактериофага BV-53 и ЛПС клеточной стенки бактерии-хозяина вязкость испытуемой смеси в течение часа инкубирования снижается, что объяснимо распадом полимерных молекул на олиго- и мономеры. Восстанавливающая способность раствора при этом возрастает, что свидетельствует о появлении в смеси восстанавливающих сахаров.

Таким образом, в работе демонстрируется наличие ферментативной активности у нативных фаговых частиц, что позволяет в лабораторных условиях поддерживать естественное стабильное состояние фермента в ассоциации с вирусной частицей.

1. Morrison *et al.* (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 2911–2919.
2. Габрилович (1968) *Практическое пособие по бактериофагии*. Мн.: 24, 27–28.
3. Jayanthi *et al.* (2011) *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (3): 126–128.

## СИНТЕЗ $\alpha$ -ГАЛАКТОБИОЗИДОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ СВЯЗЕЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ИССЛЕДОВАНИЯХ РЕГИОСЕЛЕКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА $\alpha$ -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ИЗ *Thermotoga maritima*

*Борисова А.С., Иванен Д.Р., Бобров К.С., Энейская Е.В., Кульминская А.А., Шабалин К.С.*

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова. Гатчина.  
annsbor@gmail.com

Функции углеводов в природе обусловлены разнообразием типов гликозидных связей, соответственно, синтез гликоконъюгатов представляет собой обширную задачу с различными целями. Углеводные соединения с альфа-связями востребованы, главным образом, в медицине, являясь важными составляющими широко распространенных бактериальных полисахаридов, таких как экстрацеллюлярные полисахариды (EPS) и липополисахариды (LPS), а так же О-гликопротеинов. Большинство природных  $\alpha$ -галактозных остатков имеют  $\alpha$ 1,6-связь, которая наиболее стабильна с точки зрения термодинамики, в то время как у млекопитающих антигены группы крови содержат  $\alpha$ 1,3-связь в концевых соединениях, и эволюционно этот тип связи встречается крайне редко.

В настоящем исследовании представлен термодинамический подход для изучения региоселективности фермента  $\alpha$ -галактозидазы (EC 3.2.1.22) из *Thermotoga maritima* в реакциях гидролиза и трансгликозилирования галактобиозидов с различными типами  $\alpha$ -О-гликозидной связи.

Галактобиозиды с типами связей  $\alpha$ 1,2-,  $\alpha$ 1,3-,  $\alpha$ 1,4- и  $\alpha$ 1,6- были химически синтезированы и идентифицированы методами ЯМР-спектроскопии для определения региоселективности фермента в реакции гидролиза, наряду с натуральными субстратами. Также было показано, что фермент способен синтезировать дигалактозиды с различными типами связи в реакции трансгликозилирования, сопровождающей гидролиз модельного субстрата *para*-нитрофенил-гактопиранозида. Количественное определение концентрации *para*-нитрофенил-дигалактозидов в реакционной смеси методами ЯМР-спектроскопии и анализ кинетических кривых формирования и гидролиза данных соединений позволили изучить термодинамику гидролиза и образования гликозидной связи в ферментативных реакциях. Значение  $\Delta G$  для  $\alpha$ 1,3-связи оказалось немного больше, чем для других типов связей, в то время как разница скоростей гидролиза этой связи была значительно выше по сравнению с остальными галактобиозидами. Относительные значения свободной энергии переходного состояния были вычислены на основе данных по скоростям формирования различных галактобиозидов в реакции трансгликозилирования.

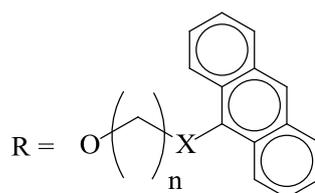
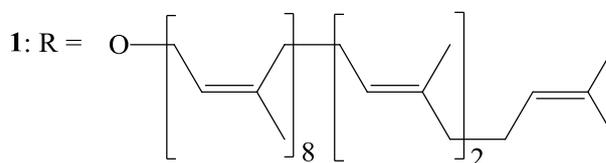
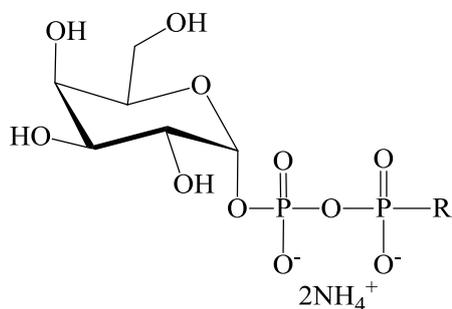
Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-08-00813-а).

# СИНТЕЗ АНАЛОГОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ УНДЕКАПРЕНИЛДИФОСФОГАЛАКТОЗЫ, СОДЕРЖАЩИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНУЮ МЕТКУ

*Винникова А.Н., Демирова К.А., Дружинина Т.Н., Веселовский В.В.*  
Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.  
anvinnikova89@gmail.com

Ундекапренилфосфат и ундекапренилдифосфосахара представляют собой уникальные природные соединения, которые принимают участие в построении ряда углеводсодержащих биополимеров, в число которых входят О-специфические полисахариды (О-антигены) грамотрицательных бактерий [1]. Их структура определяет специфичность иммунного ответа высших животных и человека на инфекцию, в том числе образование защитных О-антител. Изучение биосинтеза О-антигенов имеет первостепенное значение для поиска способов преодоления приобретенной резистентности штаммов болезнетворных бактерий к известным антибиотикам. Сравнительно недавно было обнаружено, что при изучении некоторых гликозилтрансфераз в субстрате-акцепторе, липофильный олигоизопреновый остаток, может быть успешно заменен на ундецильный, содержащий в  $\omega$ -конце фенокси группу [2], поглощающую в УФ-свете, или флуоресцентную антраценилметокси группу [3,4].

## Схема



- 2: n = 1; X = -CH<sub>2</sub>-  
3: n = 6; X = -O-CH<sub>2</sub>-  
4: n = 11; X = -O-  
5: n = 16; X = -O-

В настоящей работе представлен синтез четырех новых аналогов **2–5** бактериальной ундекапренилдифосфогалактозы **1** (см. схему), принимающей участие в биосинтезе ряда О-антигенов, в том числе О-антигенов *Salmonella newport*. Полученные аналоги различаются длиной углеводородной цепи и содержат флуоресцентную группу – остаток антрацена.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00358.

1. Lennarz, Scher (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 265: 417–441.
2. Montoya-Peleaz *et al.* (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15: 1205–1211.
3. Vinnikova *et al.* (2013) *Carbohydr. Res.* 366: 17–24.
4. Винникова и др. (2013) *Биоорг. химия.* 39 (1): 99–104.

## ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПЕКТИНОВЫХ ГЕЛЕЙ

Головченко В.В.<sup>1</sup>, Витязев Ф.В.<sup>1</sup>, Патова О.А.<sup>1</sup>, Михалева Н.Я.<sup>1</sup>,  
Истомина Е.И.<sup>2</sup>, Герцен Н.В.<sup>3</sup>, Вальшев А.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.

<sup>2</sup> Институт химии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.

<sup>3</sup> Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН. Оренбург.  
rodefex@mail.ru

Гели на основе полимеров широко используются для производства лекарственных препаратов и клинической практике восстановительной, пластической и абдоминальной хирургии. При этом гели, применяемые в медицине, должны иметь определенную текстуру, механические свойства, обладать биосовместимостью и не стимулировать рост патогенных микроорганизмов. Пектины образуют устойчивые гели и благодаря низкой токсичности, являются перспективными веществами для создания на их основе материалов, предназначенных для исправления косметических или функциональных дефектов. В данной работе проведено сравнительное исследование морфологии пектиновых гелей, полученных разными способами, и изучены их антибактериальные свойства. Для приготовления гелей использовали 1–2% растворы пектинов с различным строением углеводных цепей, выделенные из бадана толстолистного *Bergenia crassifolia*, ряски малой *Lemna minor*, рдеста плавающего *Potamogeton natans*, борщевика Сосновского *Heracleum sosnowskyi*, сабельника болотного *Comarum palustre*, пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* и капусты белокочанной *Brassica oleracea*, с Mw более 300 кДа, карбонат кальция и хлорид кальция (конц. 2.5–100.0 мМ). Изучение морфологии полученных гелей проводили методом сканирующей электронной микроскопии, для чего исследовали поверхность торцевого среза лиофильно высушенных образцов. Показано, что при прочих равных условиях использование хлорида или карбоната кальция приводит к формированию гелей с разной структурой и разными морфологическими характеристиками. Изучение антибактериальных свойств гидрогели показало, что через 24–72 ч после внесения и инкубации суспензии микроорганизмов видимого роста колоний микроорганизмов на их поверхности не наблюдается. Полученные результаты открывают перспективу использования гидрогелей на основе пектинов для медицинского назначения.

Работа поддержана программой интеграционных проектов фундаментальных научных исследований, выполняемых совместно с сотрудниками институтов УрО РАН (проект № 12-И-4-2052).

## **ОЛИГО-, ПОЛИАМИНОСАХАРИДЫ С ЭЛИСИТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ КАК ОДНА ИЗ ВОЗМОЖНЫХ АЛЬТЕРНАТИВ ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ**

*Светлой памяти проф. И.Н.Рубана посвящается*

*Воропаева Н.Л., Варламов В.П.<sup>1</sup>, Карпачев В.В., Фиговский О.Л.<sup>2</sup>*

ГНУ ВНИИ рапса Россельхозакадемии.

<sup>1</sup> Центр «Биоинженерия» РАН. Москва.

<sup>2</sup> Nanotech Industries, Inc. Daly City, Ca, USA.

bionanotex\_1@mail.ru; margarita\_48\_83@mail.ru

Перспективность применения химических индукторов болезнеустойчивости сельскохозяйственных растений в интегрированной системе защиты в настоящее время не вызывает сомнений. Исследованиями последних лет показано, что олигохитозан индуцирует иммунитет более 25 видов растений по отношению к более 30 разновидностям заболеваний. При этом большой интерес представляют исследования по разработке различных новых препаративных форм применения элиситоров и определению их места в интегрированной системе защиты растений. С практической точки зрения представляется важным изучение смесей индукторов с традиционными фунгицидами и протравителями.

Нами на протяжении многих лет проводятся исследования по изучению влияния олиго-, полиаминосахаридов – производных хитозана, обладающих элиситорной активностью, в составе физиологически активных полифункциональных (нано)чипов, на рост, развитие, устойчивость к болезням и вредителям, а также урожайность различных сельскохозяйственных культур. При этом разработаны для предпосевной обработки семян как экологически чистые (нано)чипы на основе новых функциональных (нано)материалов, имеющие в своем составе только производные природных минералов и полисахаридов (целлюлозы и хитина), так и экологически безопасные (нано)чипы, в которые дополнительно введены препараты с фунгицидной и бактерицидной активностями со сниженными в 2–10 раз нормами расхода химических средств защиты растений. Эффективность их апробирована в течение 2006–2013 гг. на различных сельскохозяйственных культурах (рис, пшеница, овес, ячмень, кукуруза, хлопчатник, соя, маш, рапс, сурепица, сахарная свекла и др.) и выявлено, что применение элиситоров в составе (нано)чипов способствует увеличению урожайности и улучшению качества получаемой продукции. Таким образом, проведенный анализ материалов, опубликованных отечественными и зарубежными авторами, и собственные исследования, касающиеся разработки и применения новых форм химических индукторов, позволяет рассматривать их как одну из возможных альтернатив химическим средствам защиты растений.

## ПЕКТИНОВЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ОБЪЕКТЫ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

*Головченко В.В., Патова О.А., Оводов Ю.С.*

Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.

lemnan@mail.ru

Пектиновые полисахариды (пектиновые вещества, пектины) представляют собой биополимеры растительного происхождения. Являясь компонентами растительных клеток, они выполняют разнообразные биологические функции в различные периоды роста и развития растений. Пектиновые полисахариды характеризуются широким спектром физиологического действия, проявляя антидотное, гипополидемическое, иммуномодулирующее, противоопухолевое, противовоспалительное, антиоксидантное действие. Благодаря своим гелеобразующим свойствам, они получили широкое применение в различных областях народного хозяйства, включая фармацевтическую, пищевую, нефтедобывающую, текстильную промышленности. В основе функциональных свойств пектиновых полисахаридов лежит структурная организация их макромолекул. Несмотря на значительные успехи в области структурных исследований полисахаридов, сложный и нерегулярный характер построения углеводных цепей пектиновых макромолекул не позволяет считать их структуру установленной. К настоящему времени накоплена значительная информация по строению блоков, входящих в состав пектиновых полисахаридов, и показано, что строение разветвленных областей пектиновых макромолекул крайне неоднородно в зависимости от источника выделения. Остается не выясненным порядок и тип соединения структурных детерминант в пектиновой макромолекуле. Выдвигаются новые гипотезы и предлагаются новые модели построения углеводной цепи пектинов. Много вопросов, связанных со структурой пектиновых полисахаридов, определяющей функции этих биополимеров в растениях и их физиологическое действие на организм, остаются нерешенными и обуславливают то повышенное внимание, которое уделяется учеными разных специальностей и направлений всестороннему изучению пектиновых полисахаридов. Установление структуры пектинов позволит выяснить взаимосвязь «структура–активность», «структура–свойство», химизм взаимодействия макромолекул пектинов с клеткой или с ее компонентами, что является одной из фундаментальных проблем биоорганической химии. Данный аспект биоорганической химии приобретает все большее практическое значение и открывает возможности создания оптимально активных соединений определенного типа действия или определенных свойств.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант 12-04-00150-а), Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

## ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ПОВЕРХНОСТНЫМ АНТИГЕНАМ *Yersinia pseudotuberculosis*

Дудина Л.Г.<sup>1,2</sup>, Бывалов А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Вятский государственный университет. Киров.

<sup>2</sup> Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.

pecdew@mail.ru

Получен набор гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МКАт) к поверхностным антигенам бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* – возбудителю псевдотуберкулеза, сапрозоонозной инфекции, природные очаги которой расположены во многих регионах России. В ходе работы было проведено исследование иммунохимической активности МКАт девяти линий (МКАт1-9) методами иммуноферментного анализа (ИФА) и иммуноблотинга. Было показано, что имеющиеся МКАт можно разделить на две группы: МКАт1-4 и МКАт5-9. МКАт1-4 практически не выявляют ни клетки *Yersinia pestis* – вида, близкородственного *Y. pseudotuberculosis*, ни выделенный из них препарат липополисахарида (ЛПС). Эти МКАт идентифицируют, по-видимому, видоспецифические эпитопы на поверхностных структурах бактериальных клеток *Y. pseudotuberculosis*, равно как и на выделенных из них препаратах ЛПС. Обработка периодатом натрия антигенных препаратов (клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температурах 10 и 37 °С, а также полученных из них ЛПС) приводит к существенному падению оптической плотности по сравнению с необработанными препаратами, что указывает на полисахаридную природу эпитопов, с которыми взаимодействуют МКАт1-4. Результаты иммуноблотинга свидетельствуют о том, что МКАт1-4 взаимодействуют с О-боковыми цепями ЛПС *Y. pseudotuberculosis* и не выявляют препараты ЛПС, выделенные из бактерий *Y. pestis* и *Escherichia coli*. В ИФА МКАт5-9 гораздо эффективнее взаимодействуют с клетками *Y. pseudotuberculosis*, полученными при температуре 37 °С, и с клетками *Y. pestis*, по сравнению с клетками *Y. pseudotuberculosis*, выращенными при температуре 10 °С. Обработка антигенных препаратов периодатом натрия приводит к существенному повышению оптической плотности в ИФА с МКАт этих пяти линий, по сравнению с необработанными препаратами. Обратное, ингибирующее действие оказывает обработка бактериальных клеток протеиназой К. Данные ИФА и иммуноблотинга позволяют предположить, что эпитопы, с которыми взаимодействуют МКАт5-9 имеют белковую природу и являются родоспецифическими, а МКАт6 и 8 – общими и для семейства энтеробактерий.

Работа поддержана грантом Программы Президиума РАН №5 «Фундаментальные науки – медицине» №12-П-4-1051, а также грантом на НИР по заданию №2014/66 на выполнение государственных работ в сфере научной деятельности в рамках базовой части государственного задания Минобрнауки России.

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ РИЗОБАКТЕРИЙ *Paenibacillus polymyxa*

*Егоренкова И.В., Трегубова К.В., Игнатов В.В.*

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.  
room406@ibppm.sgu.ru

*Paenibacillus polymyxa*, непатогенные формирующие эндоспоры ризобактерии, являются одними из наиболее интересных в промышленном отношении факультативных анаэробных бактерий. Для *P. polymyxa* характерны такие свойства как фиксация азота, фитостимуляция; продукция антибиотиков, ферментов, экзополисахаридов (ЭПС), обладающих рядом уникальных свойств. В докладе кратко представлено описание современного состояния исследований *P. polymyxa*, их экологии, биотехнологического потенциала и механизмов стимулирующего действия на растения. Особое внимание уделено структурно-функциональной характеристике ЭПС данных бактерий, их широкому использованию в биоиндустрии [1].

Бактериальные ПС нашли применение в областях: природопользования (биодегранты для очищения почв, загрязненных нефтяными отходами), нефтяной промышленности (повышение эффективности нефтедобычи), металлургии (участие в процессах добычи, переработки и обогащения руд), пищевого производства (эмульгаторы, биопленки, загустители), медицине (продолжитель действия лекарственных веществ, компонент медицинских препаратов), с/х (повышение урожайности культур [2].

В качестве примера приведены данные по применению ЭПС<sub>88А</sub> в хлебопечении, а также в качестве полимерного агента для приготовления буровых растворов и консервации скважин [3]. Показано стимулирующее влияние ЭПС<sub>1465</sub> на ранние этапы развития пшеницы Саратовская 29 и высокая активность данных препаратов по отношению к анионным пероксидазам в тканях проростков пшеницы [4], а также иммуномодулирующее действие ЭПС<sub>1465</sub> [5]. Отмечено участие экзогликанов *P. polymyxa* в индукции деформаций корневых волосков и колонизации корней пшеницы [6], а также в формировании биопленок, что, по мнению ряда исследователей, имеет определяющее значение в увеличении сопротивляемости растений биотическим и абиотическим стрессам. Продолжаются исследования ЭПС ряда штаммов *P. polymyxa* и обсуждаются сферы возможного применения данных биополимеров.

1. Yegorenkova (2013) *In: Maheshwari DK et al. (eds) Bacteria in agrobiolology: crop productivity, vol. 7. Springer-Verlag, Berlin, 401–437.*
2. Lal and Tabacchioni (2009) *Indian. J. Microbiol.* 49: 2–10.
3. Матора и др. (1992) *Прикладная биохимия и микробиология.* 28: 731–737.
4. Егоренкова и др. (2011) *Сб. науч. тр. «Вавиловские чтения – 2011».* 192–193.
5. Фомина и др. (2009) *Сб. мат. Всероссийской молодежной выставки-конкурса прикладных исследований, изобретений и инноваций.* 86.
6. Yegorenkova et al. (2013) *Curr. Microbiol.* 66: 481–486.

# СИНТЕТИЧЕСКИЕ БЛОКАТОРЫ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

*Емельянов В.В.<sup>1</sup>, Саватеева Е.А.<sup>1</sup>, Сидорова Л.П.<sup>1</sup>, Булавинцева Т.С.<sup>2</sup>, Гетте И.Ф.<sup>2</sup>, Данилова И.Г.<sup>2</sup>, Максимова Н.Е.<sup>1</sup>, Мочульская Н.Н.<sup>1</sup>, Черешнев В.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина. Екатеринбург.

<sup>2</sup> Институт иммунологии и физиологии УрО РАН. Екатеринбург.  
evvd@list.ru

Неферментативное гликозилирование белков (НГБ) вовлечено в механизмы развития различных заболеваний человека. Наибольший вклад НГБ вносит в патогенез сахарного диабета (СД). Имеются сведения о способности тиолов и производных гуанидина блокировать реакцию НГБ [1]. В терапии СД успешно применяют препараты липоевой кислоты и диметилбигуанид метформин. Однако не изучен вопрос о способности других синтетических производных гуанидина и серусодержащих соединений, трансформирующихся в тиольные производные, блокировать НГБ при экспериментальном СД.

Установлено, что ряд синтетических гетероциклических соединений (производных 1,3,4-тиадиазина и 2-гуанидинтиазола) ингибирует НГБ в модельной системе *in vitro*. Реакцию НГБ моделировали в растворе, содержащем бычий сывороточный альбумин, глюкозу и тестируемое вещество. Способность веществ блокировать реакцию НГБ оценивали по снижению накопления начального продукта НГБ фруктозамина, по сравнению с контрольной пробой, не содержащей тестируемого вещества. Наилучшей способностью блокировать НГБ обладали производные 1,3,4-тиадиазина, имевшие в положении 2 гетероцикла морфолин или иной кислородсодержащий заместитель в, а также фенил в положении-5. В механизме данного действия возможно имеет значение трансформация 1,3,4-тиадиазинов в результате сужения цикла в SH-производные [2], которые связывают глюкозу и карбонильные интермедиаты НГБ. Вещества – лидеры скрининга *in vitro* проявляли противодиабетическую активность на модели аллоксанового СД у крыс. Введение производных 1,3,4-тиадиазина приводило к снижению гипергликемии, концентраций гликозилированных белков в крови, печени и почках животных. Производные 2-гуанидинтиазола при аллоксановом СД не влияли на выраженность гипергликемии, но снижали концентрацию гликозилированных белков в крови и органах крыс. Таким образом, полученные результаты обосновывают актуальность дальнейшего поиска блокаторов НГБ для экспериментальной терапии СД среди синтетических соединений – производных 1,3,4-тиадиазина и 2-гуанидинтиазола.

1. Емельянов и др. (2010) *Вопросы биол., мед. и фарм. химии*. 1: 3–15.
2. Перова и др. (1994) *Журнал орг. химии*. 30(10): 1560–1565.

## ОБРАЗОВАНИЕ И ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА 5-ГИДРОКСИ-2-ПИРРОЛИДОН- $\beta$ -ГЛЮКОПИРАНОЗИДА В РАСТЕНИЯХ ГОРОХА

Ершова А.Н.

Воронежский государственный педагогический университет. Воронеж.  
aershova@vspu.ac.ru

В растениях гороха был обнаружен специфический гликозид, который после выделения и очистки был идентифицирован как 5-гидрокси-2-пирролидон- $\beta$ -глюкопиранозид и совпадал по данным УФ- и ИК-спектрофотометрии, температуре плавления, продуктам гидролиза с изосукцинимид- $\beta$ -гликозидом (ИС-гликозид), обнаруженным в этом растении [1]. С использованием различных  $^{14}\text{C}$  аминокислот было установлено, что агликоном ИС-гликозида является циклическое производное непротеиногенной гамма-аминомасляной кислоты [2]. Показано, что ИС-гликозид обладал биологической активностью адаптогенного типа (авторское свидетельство N 784051). Исследовали внутриклеточную локализацию, пути и ферменты метаболизации ИС-гликозида в растениях гороха

Обнаружено, что ИС-гликозид был локализован в вакуоле, где его содержание составляло 78% клеточного фонда. Основным местом локализации агликона ИС-гликозида служила цитоплазма, где содержалось 83% этого соединения. При действии фитогормонов кинетина и эпибрассинолида синтез ИС-гликозида усиливался, что увеличивало его содержание в тканях проростков на 30% и 11% соответственно. Уровень агликона и эндогенной глюкозы в клетках при этом снижался.

С использованием  $^{14}\text{C}$ -ИС-гликозида показано, что это соединение активно метаболизируется в клетках, поставляя глюкозу для синтеза веществ клеточных стенок, образования этил- $\beta$ -глюкозида, а также для дыхательного обмена. При этом наибольшая удельная радиоактивность обнаруживалась в сукцинате и ГАМК, Агликон также включался в метаболизм аминокислот и органических кислот, о чем свидетельствовало быстрое поступление метки из агликона в ГАМК, глутамат и аланин.

Проведено выделение, очистка и изучение свойств  $\beta$ -глюкозидазы, участвующей в катаболизме ИС-гликозида в растениях гороха. Показано, что фермент представлен цитоплазматической и связанной с клеточными стенками молекулярными формами. Установлено, что в ходе онтогенеза наибольшая активность в проростках принадлежала цитоплазматической форме фермента. Определены физико-химические и кинетические характеристики фермента, показано наличие трансгликозидазной активности фермента по отношению к низкомолекулярным спиртам.

1. Liu, Castelfranco (1970) *Plant Physiol.* 40 (6): 1261–1268.
2. Ershova (1996) *Plant Physiol. Biochem. Special issue:* 196.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ *Pectobacterium atrosepticum*

Исламов Б.Р.<sup>1,2</sup>, Горшков В.Ю.<sup>1,2</sup>, Петрова О.Е.<sup>1</sup>, Микушина П.В.<sup>1</sup>, Бурьгин Г.Л.<sup>3</sup>, Сальников В.В.<sup>1</sup>, Агеева М.В.<sup>1</sup>, Гоголев Ю.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН. Казань.

<sup>2</sup> Казанский федеральный университет. Казань.

<sup>3</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов. bah-islam80@mail.ru

Экзополисахариды (ЭПС) бактерий составляют группу полимеров, разнообразных по структуре, свойствам и функциям. Они защищают микроорганизмы от неблагоприятных факторов, обеспечивают адгезию и агрегацию клеток и формирование биопленок. Вирулентность целого ряда фитопатогенных бактерий во многом связывают с синтезом ЭПС. Для *Pectobacterium atrosepticum* (*Pba*) – возбудителя перенхимных гнилей, в том числе заболевания «черная ножка» картофеля, ЭПС не охарактеризованы. Для этого патогена была продемонстрирована способность к образованию «многоклеточных» биопленко-подобных структур (бактериальных эмбол) при колонизации ксилемных сосудов растения. Это создало предпосылки для поиска и характеристики ЭПС у этого микроорганизма.

Поскольку синтез ЭПС может активироваться в стрессовых условиях, для получения ЭПС микроорганизмы инкубировали в условиях голода и оценивали динамику этих полимеров в бактериальных культурах. На хроматограммах супернатантов культур было выявлено две фракции, время удерживания которых соответствовало 400 (эпсА) и 30–50 (эпсБ) кДа. С помощью ионообменной хроматографии был определен их моносахаридный состав. Количественное соотношение эпсА/эпсБ менялось в зависимости от стадии развития культур. При длительном голодании (до трех лет) сохранялись только более высокомолекулярные полисахариды (400 кДа).

На высокомолекулярные полисахариды были получены поликлональные антитела, которые были использованы для детекции эпсА в тканях растений, инфицированных *Pba*. Эпитопы эпсА были выявлены в ксилемных сосудах при формировании в них бактериальных эмбол.

Таким образом, нами выявлены и частично охарактеризованы ЭПС у *Pba*. Они представляют собой две группы полимеров, различающихся по молекулярной массе и моносахаридному составу. Их образование в стрессовых условиях, по всей видимости, указывает на протекторную функцию этих полимеров. Кроме того, обнаруженные ЭПС, вероятно, служат факторами вирулентности этих бактерий, поскольку синтезируются микроорганизмами *in planta* при колонизации ксилемных сосудов растения-хозяина.

Исследования поддержаны грантами РФФИ № 14-04-01750 и 14-04-01828.

## ОСОБЕННОСТИ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ И МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЛПС БАКТЕРИЙ РОДА *Azospirillum*, ВЫРАЩЕННЫХ В ПРИСУТСТВИИ ФЛАВОНОИДОВ

*Каневский М.В.*<sup>1,2</sup>, *Петрунина А.А.*<sup>1</sup>, *Федоненко Ю.П.*<sup>2</sup>, *Коннова С.А.*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского. Саратов.

<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.  
matvejkanev@mail.ru

При формировании бобово-ризобияльного симбиоза показано, что под влиянием флавоноидов растений изменяется состав и структура липополисахаридов (ЛПС) – основных компонентов внешней мембраны бактерий, для которых известно непосредственное участие в процессе инокуляции корней растений [1, 2]. Влияние флавоновых веществ на продукцию и свойства ЛПС бактерий рода *Azospirillum* – ассоциативных азотфиксаторов – изучено недостаточно. Целью настоящей работы было выявление изменений антигенного состава и макромолекулярной организации ЛПС азоспирилл под влиянием флавоноидов кверцетина и рутина – распространённых метаболитов злаковых растений [3].

Бактерии культивировали на жидкой синтетической среде с малатом натрия в присутствии флавоноидов. ЛПС экстрагировали из сырой биомассы ЭДТА-содержащим буфером. Экстракты подвергали протеиназной обработке и последующему электрофоретическому разделению. Визуализацию результатов осуществляли окрашиванием нитратом серебра с предварительным периодатным окислением.

Культивирование *A. lipoferum* Sp59b и *A. brasilense* Sp7, Sp245 и SR55 в присутствии флавоноидов приводило к увеличению гетерогенности препаратов ЛПС и, в ряде случаев, к изменению соотношения фракций S- и R-форм молекул ЛПС. Так для *A. brasilense* SR55, выращенных в присутствии кверцетина, отмечено существенное возрастание доли высокомолекулярных фракций ЛПС, а наличие рутина в среде культивирования бактерий оказывало противоположное действие. Для всех бактериальных культур, выращенных в присутствии флавоноидов, отмечено снижение сродства ЛПС к гомологичным анти-ЛПС-антителам исходных культур, выращенных в стандартных условиях.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект 14-04-01658).

1. Broughton *et al.* (2006) *J Bacteriol.* 88(10): 3654–3663.
2. Fraysse *et al.* (2002) *Glycobiology* 12(11): 741–748.
3. Cesco *et al.* (2012) *Biol. Fert. Soils* 48: 123–149.

## УЧАСТИЕ ГЛЮКАНА СО СМЕШАННЫМ ТИПОМ СВЯЗЕЙ И ГЛЮКУРОНОАРАБИНОКСИЛАНА В РЕАЛИЗАЦИИ РОСТА РАСТЯЖЕНИЕМ В КОРНЕ КУКУРУЗЫ

*Козлова Л.В., Агеева М.В., Ибрагимова Н.Н., Микшина М.П., Горшкова Т.А.*

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра

Российской академии наук. Казань.

bbinb@bk.ru

Растениям присущ уникальный тип роста – рост растяжением. В настоящее время основным регулятором этого процесса считается архитектура клеточной стенки. При этом, несмотря на существование разнообразных моделей строения клеточных стенок, точное взаиморасположение микрофибрилл целлюлозы и матричных полисахаридов, а также механизмы участия этого комплекса в процессе роста остаются не до конца выясненными. Целью представляемой работы было установление соответствия между тонкой структурой клеточных стенок злаков и этапами роста растяжением. Объектом исследования служили участки первичного корня проростков кукурузы, клетки в которых находились на разных стадиях развития. Биохимический анализ фракций клеточных стенок, полученных в результате последовательной обработки растительного материала специфическими гликан-гидралазами и химическими агентами, был дополнен иммунохимическим детектированием *in situ* эпитопов матричных полисахаридов на поперечных срезах корня. Клеточные стенки кукурузы в качестве основных полисахаридов матрикса содержат глюкан со смешанным типом связей и глюкуроноарабиноксилан.

Молекулы глюкуроноарабиноксилана представляют собой остов из  $\beta$ -(1,4)-связанных остатков D-Xylp, который может быть замещен в O(3) или одновременно в O(3) и O(2) позициях остатками Ara6f, Glc3pA и пр. Согласно нашим данным каждая молекула этого полисахарида имеет в своем составе три домена, различающихся по строению и функциям. Пропорции доменов изменяются в ходе роста растяжением. Один из доменов в клеточных стенках кукурузы маскируется глюканом со смешанным типом связей. Этот полисахарид представляет собой неразветвленный гомополимер из остатков Glc3p, соединенных  $\beta$ -(1,4) или  $\beta$ -(1,3) связями. Полученные нами результаты поддерживают гипотезу о желеобразном состоянии глюкана со смешанным типом связей в клеточных стенках. Обнаруженное изменение тонкой структуры полисахарида в ходе роста растяжением (снижение частоты  $\beta$ -(1,3) связей) может сказываться на механических свойствах этого геля. Данные, вкратце описанные выше, позволили нам построить новую модель архитектуры клеточных стенок II типа (присущих однодольным) и ее изменений, сопровождающих рост растяжением.

Работа была частично поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (№ гранта 14-04-01002).



## ПОЧЕМУ ВАЖНО «ПРАВИЛЬНО» СМЕШИВАТЬ РЕАГЕНТЫ?

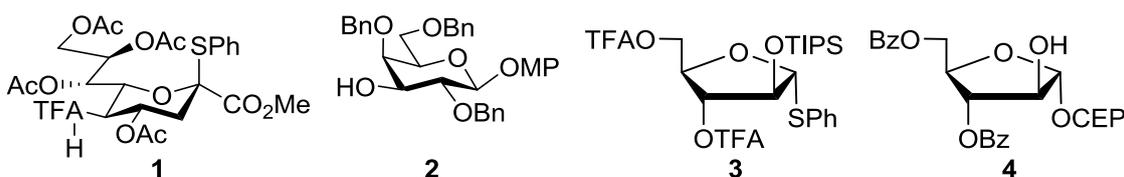
Кононов Л.О.<sup>1</sup>, Орлова А.В.<sup>1</sup>, Малышева Н.Н.<sup>1</sup>, Федина К.Г.<sup>1,2</sup>, Абронина П.И.<sup>1</sup>,  
Зинин А.И.<sup>1</sup>, Торгов В.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

<sup>2</sup> Высший химический колледж РАН. Москва.

leonid.kononov@gmail.com

Недавно было показано [1], что способ смешения реагентов может оказывать большее влияние на результат гликозилирования, чем структура молекул гликозил-донора. В данном сообщении будут приведены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что этот эффект может быть связан с различиями в строении супрамеров [2, 3], которые присутствуют в растворах, полученных при смешении различными способами. Супрамерный анализ [2, 3] с помощью поляриметрии выявил, что смеси (1:1) гликозил-донора и гликозил-акцептора (**1** + **2** или **3** + **4**), приготовленные с помощью проточного микромиксера Comet X-01 (серия 1), содержат супрамеры, отличающиеся по строению от супрамеров, которые присутствуют в растворах этих же реагентов, но приготовленных обычным образом в колбе (серия 2). Поскольку супрамеры различного строения имеют различные химические свойства [2], не удивительно, что добавление (в колбе) промотора (NIS-TfOH или NIS-AgOTf) к этим смесям инициировало реакции гликозилирования, которые различались для серий 1 и 2. Так, заметно отличались стереоселективность ( $\beta/\alpha$ ) и выход ( $Y$ ) образовавшегося дисахарида, время реакции ( $t$ ) и (для реакции **3** + **4**) температура ( $T$ ), при которой начинается гликозилирование. Полученные результаты могут быть важны для выяснения механизма стереоконтроля, повышения воспроизводимости и поиска новых путей оптимизации реакций гликозилирования.



Работа поддержана грантами РФФИ (11-03-00918, 13-03-00666).

1. Uchinashi *et al.* (2011) *Org. Biomol. Chem.* 9: 7243–7248.
2. Kononov (2013) in: *Advances in Chemistry Research*, Ed. J. C. Taylor, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, Vol. 18, Ch. 4, pp. 143–178 (open access: [https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=41681](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=41681)).
3. Orlova *et al.* (2014) *ChemPhysChem* 15: 195–207.

## **КАРБОНИЛЬНЫЙ СТРЕСС В ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ ОРГАНИЗМАХ. ОБРАЗОВАНИЕ ГЛИКИРОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ЛЕГОГЛОБИНА В КЛЕТКАХ *Escherichia coli***

*Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф.*  
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН. Москва.  
rizobium@yandex.ru

Карбонильный стресс – это избыточное образование активных карбонильных соединений (АКС), альдегидов и кетонов, которые взаимодействуют с аминокруппами белков и нуклеиновых кислот (реакция Майара). Такое неферментативное гликирование биополимеров приводит к их фрагментации, сшивке и образованию связанных конечных продуктов гликирования (КПГ), вследствие чего нарушаются их структура и функции. Неферментативное гликирование достаточно хорошо изучено в эукариотических организмах. В настоящее время имеются доказательства, что бактерии, аналогично эукариотическим клеткам, страдают от повреждений, вызванных гликированием. Впервые неферментативное гликирование белков в бактериальной клетке было показано в 2001 г. болгарскими исследователями, которые из клеток *E. coli* выделили рекомбинантный  $\gamma$ -интерферон человек с измененными свойствами, характерными для неферментативно гликированных белков. Мы также получили гликированный рекомбинантный левоглобин сои при его экспрессии в клетках *E. coli*. Для того, чтобы при физиологических условиях образовались связанные с белками КПГ, необходимы высокие концентрации АКС и длительное время контакта этих АКС с биополимерами. Образование гликированных белков в быстроделющихся клетках *E. coli* является следствием накопления АКС внутри клетки. Наиболее активным гликирующим агентом является  $\alpha$ -кетоальдегид – метилглиоксаль (МГ). В прокариотах существует ферментативная система образования МГ из дигидроксиацетонфосфата и глиоксалазная система, превращающая токсичный для клеток МГ в лактат. При дисбалансе метаболических путей гликолиза, возникающем при усиленном потреблении углеводов, может происходить избыточное образование МГ и, как следствие, развитие карбонильного стресса. Этот путь генерации МГ считается основным. Однако неферментативное гликирование в *E. coli* в нашем и в других случаях происходило при выращивании этих клеток на среде LB, богатой аминокислотами и пептидами, что наводит на мысль о существовании иного пути образования АКС. Мы предполагаем, что наиболее опасным для бактерий может быть аминокетон – интермедиат катаболизма треонина и образующиеся при его ферментативном и неферментативном окислении МГ и свободнорадикальные продукты, в том числе супероксидный анион-радикал.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты №№ 12-04-01809 и 14-04-01710).

## СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СУЛЬФАТИРОВАННОГО ПОЛИСАХАРИДА КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *Ahnfeltiopsis flabelliformis*

Кравченко А.О., Анастюк С.Д., Исаков В.В., Соколова Е.В., Глазунов В.П., Ермак И.М.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,  
Дальневосточное отделение Российской академии наук. Владивосток.  
kravchenko\_25.89@mail.ru

Каррагинаны – семейство водорастворимых анионных полисахаридов красных водорослей, в основе структуры которых лежит повторяющееся дисахаридное звено, состоящее из остатков D-галактозы и ее производных, соединенных регулярно чередующимися  $\alpha$ -(1→3) and  $\beta$ -(1→4) гликозидными связями. Структура полисахаридов зависит от видовой принадлежности водоросли, стадии ее жизненного цикла и условий обитания.

Водоросль *A. flabelliformis* (семейство Phyllophoraceae) образует обширные популяции в дальневосточных морях России и может, согласно литературным данным, содержать полисахариды с необычной структурой. Данная работа посвящена изучению структуры полисахаридов, выделенных из стерильной и репродуктивной водорослей *A. flabelliformis*.

Прикрепленная форма *A. flabelliformis*, представленная стерильными растениями и карпоспорофитами, собрана в б. Троицы (Японское море). Полисахариды были экстрагированы из водоросли после предварительного извлечения пигментов и разделены на желирующие и нежелирующие типы. Исследуемые полисахариды содержат преимущественно желирующие фракции, основными компонентами которой являются галактоза и 3,6-ангидрогалактоза. Согласно данным ИК- и ЯМР спектроскопии, а также масс-спектрометрии, желирующий полисахарид из стерильной водоросли представляет собой  $\kappa/\beta$ -каррагинан с соотношением звеньев  $\kappa$ - и  $\beta$ -типа 3:1 и содержит минорные количества  $\iota$ - и  $\gamma$ -каррагинанов. Результаты ESI MS/MS показали, что ксилоза присутствует в полисахариде в качестве заместителя одной из гидроксильных групп галактозы. В отличие от полисахарида из стерильной формы, желирующий полисахарид, выделенный из карпоспорофитов *A. flabelliformis*, по данным ИК- и ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии, представляет собой  $\iota/\kappa$ -каррагинан с соотношением звеньев  $\iota$ - и  $\kappa$ -типа 70 : 30. Ферментативное расщепление полисахарида  $\iota$ -каррагиназой, полученной из *Alteromonas fortis*, подтверждает данные спектроскопии и свидетельствует о том, что полимерная цепь этого каррагинана состоит из  $\iota$ -,  $\iota$ - $\iota$  и  $\kappa$ - $\iota$  звеньев. Исследуемые полисахариды обладают антикоагулирующей активностью, воздействуя главным образом на внутренний путь коагуляции, и оказывают иммуностимулирующее действие.

Работа поддержана грантом по программе Дальний Восток.

## ЛЕКТИНЫ СЕМЯН ЛЬНА МАСЛИЧНОГО И ИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

*Левчук А.Н., Лях В.А.*

Запорожский национальный университет. Запорожье.

anna.levchuck@yandex.ua

Лектинами называют белки или гликопротеины, способные распознавать и избирательно связывать углеводы, расположенные на поверхности клеток [1]. В связи с этим они нашли широкое применение в различных отраслях биологии и медицины. Однако их физиологическая роль в самом растении изучена недостаточно. Наибольшее количество этих белков находится в семенах, поэтому именно эта часть растения является наиболее перспективной для их получения [2]. В связи с этим актуальным является выделение лектинов из семян и установление их физиологических функций в растении. По общепринятым методикам [2] лектины выделяют из обезжиренных семян масличных культур путём экстракции солевыми растворами. Однако, известно, что гидролитические ферменты могут проявлять лектиновую активность [3].

Лён является важной масличной культурой [4]. Ранее нами было установлено, что препарат кислой липазы семян льна масличного проявляет лектиновую активность [5], на основе чего сделано предположение, что липаза и лектин образуют лектин-липолитический ферментный комплекс, локализованный в жировой фракции и принимающий участие в утилизации запасных жиров при прорастании семян льна масличного. Поэтому целью работы было количественное выделение и характеристика лектиноподобных белков льна масличного из 2 фракций семян: обезжиренного остатка и жирового слоя.

В результате исследований нами было обнаружено, что в семенах льна масличного присутствуют 2 группы лектиноподобных белков, одна из которых локализуется в жировом слое, а вторая – в обезжиренном остатке. Количественно существенно преобладали лектиноподобные белки обезжиренного остатка, однако по уровню активности такого распределения обнаружено не было – он зависел от уровня масличности семян: у высокомасличных генотипов более активными были лектиноподобные белки обезжиренного остатка, а у низкомасличных – лектиноподобные белки жирового слоя. Независимо от локализации и генотипа лектиноподобные белки семян льна масличного в больших концентрациях вызывали гемолиз и были маннозоспецифичными, а лектиноподобные белки жировой фракции проявляли способность распознавать ещё и углеводы группы галактозы. Таким образом, выделенные нами из разных фракций семян лектиноподобные белки являются не изоформами одного лектина, а различными молекулами лектинов.

1. Антонюк (2005) *Лектини та їх сировинні джерела.* – Л.: Основа. – 554 с.
2. Луцик и др. (1981) *Лектины* – Львов: Вища школа. – 156 с.
3. Феоктісов и др. (2002) *Физиол. и биох. культ. раст.* 34 (3): 260–263.
4. Лях и др. (2005) *Ботанические и цитогенетические...: монография.* – Запорожье: ЗНУ, 182 с.
5. Левчук и др. (2012) *Вісник ОНУ. Біологія.* 12 (2): 45–49.

## ВЫСОКОРАЗВЕТВЛЕННЫЙ АРАБИНАН ИЗ ДРЕВЕСНОЙ ЗЕЛЕНИ *Abies sibirica* L.

Макарова Е.Н., Шахматов Е.Г.

Институт химии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.  
makarowa.elena-ma@ya.ru

Из древесной зелени *A. sibirica* был выделен высокоразветвленный арабинан (84% Ara,  $M_w \sim 9,4$  кДа). Он был отделен от кислых пектиновых полисахаридов с помощью анионообменной хроматографии. Главная углеводная цепь арабинана представлена, главным образом, участками RG-I с высоким содержанием остатков рамнозы (~50%), замещенных боковыми углеводными цепями, которые в основном состоят из остатков 1,5- $\alpha$ -L-Araf, 1,3,5-ди-О-, и 1,2,3,5-три-О-замещенной  $\alpha$ -L-Araf, что свидетельствует о присутствии высокоразветвленного 1,5- $\alpha$ -L-арабинана; а также остатками 1,4- $\beta$ -D-Galp, вероятно, указывающими на присутствие AG-I или 1,4-галактана, но в значительно меньшем количестве, чем арабинан. Соотношение интегральных интенсивностей N1 спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР остатков T- $\alpha$ -L-Araf : 1,5- $\alpha$ -L-Araf : 1,2,3,5- $\alpha$ -L-Araf : 1,3,5- $\alpha$ -L-Araf : 1,3- $\alpha$ -L-Araf : 1,2,5- $\alpha$ -L-Araf составляет 10.2 : 10.5 : 2.9 : 2.9 : 2.0 : 1.0. Таким образом, среди вышеперечисленных остатков Araf, преобладающими являются остатки терминальной  $\alpha$ -L-Araf ~ 34 % и 1,5-связанной  $\alpha$ -L-Araf ~ 35%, при этом средняя длина олигомерных цепей из остатков 1,5- $\alpha$ -L-Araf составляет ~ 17 мономеров, а средняя длина кора арабинана, состоящего из остатков 1,5- $\alpha$ -L-Araf, 1,3,5- $\alpha$ -L-Araf, 1,2,5- $\alpha$ -L-Araf, 1,2,3,5- $\alpha$ -L-Araf составляет ~ 29 мономеров, предполагая, что ко всем остаткам 1,2,4-ди-О-замещенной  $\alpha$ -L-Rhap присоединены остатки  $\alpha$ -L-Araf.

Впервые для полисахаридов пихты были обнаружены остатки терминальной  $\beta$ -L-Araf, находящиеся на невосстанавливающих концах боковых цепей. Анализ литературных и наших данных позволяет предположить, что это может быть отличительной особенностью полисахаридов хвойных растений.

Из испытуемых полисахаридов наибольшее ростостимулирующее влияние (всхожесть и скорость прорастания семян, рост проростков и корней пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L., овса *Avena sativa* L. и ржи посевной *Secale cereale* L.) оказывает полисахарид, содержащий, только линейную область, представленную  $\alpha$ -1,4-D-галактопиранозилуронаном.

Авторы глубоко признательны Е.А. Михайловой (Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН) за исследование биологической активности полисахаридов; Ф.В. Тоукачу (Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (ИОХ РАН) за ценные советы, консультации и помощь в выполнении работы.

Работа выполнена при поддержке совместного проекта фундаментальных исследований № 12-С-3-1007, выполняемого ИХ Коми НЦ УрО РАН совместно с ИПХЭТ СО РАН.

## НЕОГЛИКОЛИПИДЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДУЛЬНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Маслов М.А., Морозова Н.Г.

Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова. Москва.  
mamaslov@mail.ru

Для развития новой области медицины – генной терапии – необходимо создавать стабильные, безопасные и эффективные системы доставки терапевтических нуклеиновых кислот (НК). Использование катионных липосом в качестве таких систем является одним из перспективных подходов. Широкое развитие этого подхода в настоящее время сдерживается благодаря существованию различных биологических барьеров, одним из которых является низкая специфичность липосом к клетками-мишенями. Биологические барьеры могут быть преодолены с помощью модульных липидных систем доставки (МЛСД) НК, которые представляют собой самособирающийся транспортный контейнер, построенный из ковалентно несвязанных друг с другом липофильных модулей. Одним из важнейших органов-мишеней, для которых разрабатываются МЛСД, является печень. Гепатоциты экспрессируют асиалогликопротеиновые рецепторы, распознающие терминальные остатки D-галактозы или N-ацетил-D-галактозамина, поэтому специфическую доставку НК в этот орган можно осуществить с помощью МЛСД, содержащих неогликолипиды в качестве адресного модуля.

Нами разработаны подходы и осуществлен синтез новых нейтральных моно- и бивалентных неогалактолипидов с использованием различных типов полифункциональных матриц, спейсерных и линкерных групп. Получены адресные МЛТС, содержащие синтезированные неогалактолипиды, исследовано их связывание с углеводузнающим лектином  $RCA_{120}$  и установлена зависимость эффективности данного процесса от строения гликолипидов и их количественного содержания в составе МЛТС. Выявлены эффективные адресные МЛТС, перспективные для дальнейших исследований *in vitro* и *in vivo*.

Работа поддержана грантом РФФИ (13-04-40183 комфи).

## ПЕКТИНЫ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНКАХ: НОВЫЕ АСПЕКТЫ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ

Микишина П.В.

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук. Казань.

maximus22@list.ru

Пектины – один из ключевых многофункциональных классов полисахаридов растительных клеточных стенок, отличающийся высокой сложностью строения. Химическая природа пектинов (высокомолекулярные гетерополисахариды, основу которых составляют производные полигалактуроновой кислоты) особых дискуссий не вызывает, однако в отношении структурной со-локализации отдельных типов пектиновых веществ (гомогалактуронан, рамногалактуронаны I и II, ксилогалактуронан и апиогалактуронан) до сих пор нет общепринятого мнения: существует несколько, в том числе кардинально отличающихся, моделей [см. обзор 1].

Пектиновые вещества рассматривают преимущественно как компоненты первичных клеточных стенок, где им на фоне широкого разнообразия функций отводят, прежде всего, роль своеобразного «клея», соединяющего соседние клетки, а также особых факторов, определяющих пористость клеточной стенки и ее ионообменные свойства. Это согласовано с описанными физико-химическими свойствами пектинов, в частности, такими как формирование гелей и высокая водоудерживающая способность. Кратко формулируя традиционное представление о структуре и функции пектинов, можно заключить, что это полисахариды, формирующие специфический матрикс клеточной стенки, обуславливающий ее структурообразующую, обменную и регуляторную функции.

В докладе на примере сложного рамногалактуронана I третичной (желатинозной) клеточной стенки волокон льна будут продемонстрированы новые аспекты структурно-физической организации и функциональных возможностей пектинов. Представленные новые аспекты базируются на: а) установленной с применением комплементарных диффузионных техник способности этого полисахарида образовывать надмолекулярные комплексы особого типа, позволяющие полимеру сохранять гидродинамический объем при уменьшении молекулярной массы; б) сопряжении такой организации с реализацией механизма формирования контрактивных свойств желатинозных волокон, что добавляет к широкому списку функций пектинов участие в функционировании растительных «мускулов», обеспечивающих передвижение растений и стабилизацию положения их органов в пространстве.

Работа поддержана грантами РФФИ (14-04-31462, 12-04-97077).

1. Yapo (2011) *Carbohydr. Polymers*. 86 (2): 373–385.

## МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ТРЕТИЧНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ РАСТЕНИЙ

Мокишина Н.Е., Горшков О.В., Горшкова Т.А.

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра  
Российской академии наук. Казань.

natalali@list.ru

Формирование растительной клеточной стенки – крайне сложный для исследования процесс, многие аспекты которого далеки от понимания; клеточная стенка выступает настоящим «камнем преткновения» для молекулярных биологов, пытающихся идентифицировать гены, кодирующие ферменты синтеза отдельных связей в полимерах. Все растительные клетки формируют первичную клеточную стенку (I или II типа – в зависимости от состава связующих гликанов). Многие типы растительных клеток (механические ткани, сосуды) способны формировать вторичную клеточную стенку ксиланового типа, для которого характерно спиральное расположение микрофибрилл целлюлозы, доминирование ксилана в нецеллюлозном матриксе, высокая степень лигнификации. Растительные волокна способны формировать, помимо вторичной, еще и третичную (желатинозную) клеточную стенку, которая отличается от ксиланового высоким содержанием целлюлозы, продольной ориентацией ее микрофибрилл, особым составом полисахаридов матрикса и низким содержанием лигнина.

Ранее было установлено, что в ходе синтеза первичной и вторичной клеточной стенки экспрессируются гены различных изоформ целлюлозосинтаз [1]. Таким образом, можно говорить о четком различии в механизмах формирования первичной и вторичной клеточных стенок, в то время как о существовании какой-либо специализации в синтезе вторичной и третичной клеточных стенок (ксиланового и желатинозного) ничего неизвестно. Нами был проведен поиск последовательностей генов целлюлозосинтаз в геноме льна и проведена оценка их дифференциальной экспрессии в различных тканях стебля льна, содержащих различные типы клеточных стенок. Показано, что при синтезе третичной клеточной стенки повышается экспрессия целлюлозосинтазных генов, специфичных для синтеза вторичной клеточной стенки: *CesA4*, *CesA7*, *CesA8*. Проведен филогенетический анализ выявленных изоформ *CesAs* растений льна. Охарактеризована дифференциальная экспрессия генов, задействованных в синтезе целлюлозы и матриксных полисахаридов: хитиназоподобных (*Ctl*) и целлюлозосинтазоподобных белков (*Csl*). Среди них выявлены гены, активирующие экспрессию при переходе волокон к синтезу третичной клеточной стенки.

Работа поддержана грантом РФФИ (14-04-01778).

1. Somerville C. (2006). *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 22: 53–78.

## **β-КСИЛАНАЗЫ СЕМЕЙСТВА GH10 ГЛИКОЗИЛ-ГИДРОЛАЗ: ЭВОЛЮЦИОННЫЙ ВЗГЛЯД**

Наумов Д.Г.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Москва.  
daniil\_naumoff@yahoo.com

Гликозил-гидролазы (К.Ф. 3.2.1) – обширная группа ферментов, катализирующих гликолитическое расщепление *O*-гликозидной связи. На основе гомологии каталитических доменов все гликозил-гидролазы отнесены в базе данных CAZy (<http://www.cazy.org/>) к 133 семействам (GH1–GH133). На более высоком иерархическом уровне часть семейств объединена в кланы. Каталитические домены четырёх кланов (GH-A, GH-D, GH-H и GH-K) имеют пространственную структуру в виде ТИМ-бочонка. К клану GH-A наряду с другими относится и семейство GH10, объединяющее по данным базы данных CAZy 1678 белков различного происхождения. Среди биохимически охарактеризованных представителей этого семейства обнаружены ферменты с двумя типами энзиматических активностей: *эндо*-1,4-β-ксилаказы (К.Ф. 3.2.1.8) и *эндо*-1,3-β-ксилаказы (К.Ф. 3.2.1.32). Проведённый нами скрининг базы данных NCBI с помощью 32 разных доменов семейства GH10 позволил более чем удвоить этот список. Парное сравнение GH10-доменов выявило исключительно большую роль горизонтальных переносов в процессе эволюции соответствующих генов. Белки планктомицетов – функционально мало исследованного отдела бактерий – легко могут быть разбиты на две чётко обособленных группы на основании уровня сходства аминокислотных последовательностей. Одна из них включает строго по одному белку из каждого гетеротрофного планктомицета, а вторая представлена лишь у некоторых организмов, но, как правило, в виде нескольких паралогов. Филогенетический анализ белков семейства GH10 подтвердил многочисленность горизонтальных переносов в процессе эволюции их генов в живых организмах самых разных таксонов. При этом белки планктомицетов первой группы образовали самостоятельный стабильный кластер на филогенетическом древе, строение которого хорошо согласуется с таксономической принадлежностью соответствующих бактерий (т.е. с филогенией генов 16S рРНК). Это свидетельствует о вертикальном наследовании соответствующих генов. Планктомицетные белки второй группы образуют общий кластер с белками из ряда других организмов, что указывает на появление их генов в результате целой серии независимых горизонтальных переносов. Полученные результаты говорят в пользу того, что планктомицетные белки семейства GH10 из разных групп выполняют в организме различающиеся функции: белки первой группы строго необходимы для жизнедеятельности почти всех планктомицетов, в то время как потребность в белках второй группы возникает при обитании в определённых экологических нишах и, как правило, приводит к накоплению нескольких паралогов.

# НЕОБЫЧНАЯ БИМОДАЛЬНАЯ РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ГЛИКОЗИЛ-ДОНОРА В РАЗНЫХ ОБЛАСТЯХ КОНЦЕНТРАЦИЙ: ОБРАЗОВАНИЕ СУПРАМЕРОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

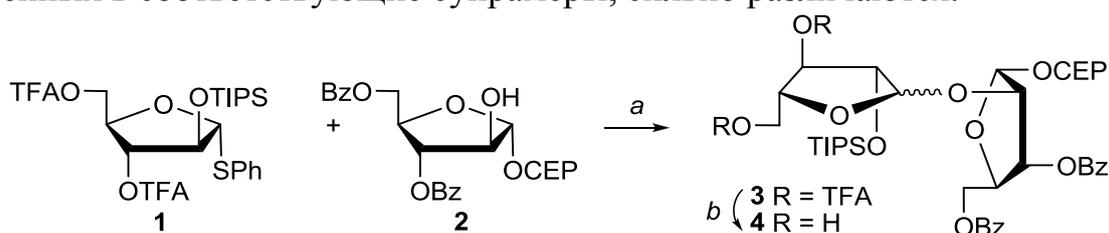
Федина К.Г.<sup>1,2</sup>, Орлова А.В.<sup>1</sup>, Абронина П.И.<sup>1</sup>, Чижов А.О.<sup>1</sup>, Торгов В.И.<sup>1</sup>, Кононов Л.О.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

<sup>2</sup> Высший химический колледж РАН. Москва.

zzzoka@gmail.com

Варьирование концентрации гликозил-донора **1** (0.001–0.1 М) заметно влияет на параметры и результаты гликозилирования гликозил-акцептора **2**. Так, например: (а) температура  $T$ , при которой начинается реакция, меняется от минус 23 °С до +7 °С, (б) время реакции изменяется от 1.5 ч до 3 сут, (в) выход образующегося дисахарида **4** меняется от 14% до 82%. При концентрациях больше 0.01 М эти параметры, так же как и удельное оптическое вращение [1] растворов гликозил-донора, не зависят от концентрации. Возможно, в данной области концентраций образуются супрамеры [1] гликозил-донора сходного строения (и потому с близкой реакционной способностью), но отличающиеся от супрамеров, которые образуются в более разбавленных растворах. Зависимость концентрации от стереоселективности ( $\beta/\alpha = 1.16 : 1 - 2.5 : 1$ ) имеет максимум при 0.01 М концентрации. График в координатах Эйринга (зависимость  $\ln(\beta/\alpha)$  от  $1/T$ , где  $T$  – температура, при которой начинается и проводится гликозилирование) [2] представляет собой комбинацию двух прямых линий с температурой инверсии  $T_{inv} = 254$  К, отвечающей 0.01 М концентрации. Можно сделать вывод, что эта точка разделяет области концентраций, в которых активационные параметры молекул гликозил-донора, встроенных в соответствующие супрамеры, сильно различаются.



**Реагенты и условия:** *a.* NIS, AgOTf, ClCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl, MS 4Å; *b.* NEt<sub>3</sub>, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. TIPS = (i-Pr)<sub>3</sub>Si, TFA = CF<sub>3</sub>CO, CEP = 4-(ClCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.

Работа поддержана грантами РФФИ (11-03-00918, 13-03-00666).

1. Kononov (2013) in: *Advances in Chemistry Research*, Ed. J. C. Taylor, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, Vol. 18, Ch. 4, pp. 143–178 (open access: [https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=41681](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=41681)).
2. Cainelli *et al.* (2009) *Chem. Soc. Rev.* 38: 990–1001.

## ПЕКТИНЫ ЗАЩИЩАЮТ ОТ ЭНДОТОКСЕМИИ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Падерин Н.М.

Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Сыктывкар.

paderin\_nm@mail.ru

Инфекция, повреждение или психологический стресс вызывают стимуляцию иммунной системы, при которой провоспалительные цитокины воздействуют на клетки нервной системы [5], что, например, проявляется в общей слабости, повышенная утомляемости, нарушении сна и ухудшении аппетита [1]. Пектины, в том числе использованный в исследовании пектин, обладают противовоспалительным эффектом [2-4]. Таким образом, цель – определить влияние пектинов на поведенческие реакции мышей при эндотоксемии, вызванной иммобилизационным стрессом.

В исследовании был использован низкоэтерифицированный пектин CU701 производства фирмы Herbstreith & Fox. Иммобилизационный стресс у мышей вызывали путем помещения животных в хорошо вентилируемые прозрачные пластиковые пробирки объемом 50 мл. Пектин вводили перорально в дозе 50 мг/кг перорально за сутки до индукции стресса. Контрольные мыши получали воду. Через 3 или 18 часов у животных определяли поведенческие реакции, а так же производили забор крови из воротной вены печени. В плазме крови из воротной вены определяли концентрацию липополисахарида с помощью ЛАЛ-теста. Статистическую обработку производили при помощи критерия Манна-Уитни, данные выражали как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

При экспериментальной модели психологического стресса, вызванного обездвиживанием, через 3 часа концентрация липополисахарида в крови мышей многократно увеличивается. А через 18 часов иммобилизации наблюдается ухудшение поведенческих реакций.

Использованный в исследовании низкоэтерифицированный цитрусовый пектин, предотвратил эндотоксемию, вызванную иммобилизационным стрессом. Концентрация липополисахарида в крови мышей, получивших пектин, была сравнима с концентрацией липополисахарида в крови нативных животных. Мыши, получившие пектин, показывали более активные поведенческие реакции.

Таким образом, пектины защищают от эндотоксемии, вызванной стрессом, и предотвращают ухудшение поведенческих реакций.

1. Dantzer *et al.* (2008) *Nature Reviews*. 9: 46–57.
2. Ovodova *et al.* (2009) *Food Chemistry*. 119: 610–615.
3. Popov *et al.* (2007) *Phytother. Res.* 21: 609–614.
4. Popov *et al.* (2013) *Biomed. Prev. Nutr.* 3: 59–63.
5. Yirmiya *et al.* (2011) *Brain, Behavior, and Immunity*. 25: 181–213.

## **ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ПЕКТИНОВ НА ИХ ГЕЛЕОБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА**

*Патова О.А.<sup>1</sup>, Головченко В.В.<sup>1</sup>, Витязев Ф.В.<sup>1</sup>, Михалева Н.Я.<sup>1</sup>,  
Истомина Е.И.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.

<sup>2</sup> Институт химии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.

pat@physiol.komisc.ru

Большинство функциональных свойств пектины проявляют в гелеобразном состоянии. Наиболее подробно процесс образования пектиновых гелей и их физико-химические свойства изучены на примере коммерческих образцов, которые преимущественно представляют собой галактуронаны. Согласно модели, описывающей механизм гелеобразования пектинов в присутствии катионов двухвалентных металлов, депротонированные карбоксильные группы двух остатков кислоты одного участка углеводной цепи полисахарида за счет ионных связей образуют отрицательно заряженную гидрофильную полость, размеры которой соответствуют размеру катиона. Образующаяся гидрофильная полость стабилизируется за счет Ван-дер-ваальсовых, водородных и электростатических взаимодействий. Далее происходит сшивание двух параллельных полисахаридных цепей в димеры по типу «egg-box», которые формируют связывающие участки в сети геля. Поэтому одним из главных факторов, влияющих на процесс гелеобразования пектинов в присутствии ионов металлов, является количество и распределение неэтерифицированных остатков галактурононовой кислоты. В то же время пектины характеризуются значительной сложностью и динамичностью строения углеводной цепи. Поэтому предполагается, что на процесс гелеобразования и на физико-химические свойства пектинового гелевого матрикса оказывают совокупное влияние такие структурные характеристики, как количество и распределение метилэтерифицированных остатков галактурононовой кислоты, тип построения линейных и разветвленных областей, степень разветвленности главной и боковых углеводных цепей, молекулярно-массовые характеристики. Для определения влияния строения углеводной цепи пектинов на процесс их гелеобразования были исследованы реологические свойства и морфология гелевых систем на основе пектиновых полисахаридов различной структуры в присутствии ионов кальция. Исследовано влияние концентрации ионов кальция, напряжения сдвига, температуры на морфологию и структуру пектиновых гелей.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

# ПОЛУЧЕНИЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА СЕРОСОДЕРЖАЩИХ МОНОТЕРПЕНОИДОВ С МОНОСАХАРИДНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ

*Пестова С.В.<sup>1</sup>, Изместьев Е.С., Шевченко О.Г.<sup>2</sup>, Рубцова С.А., Кучин А.В.*

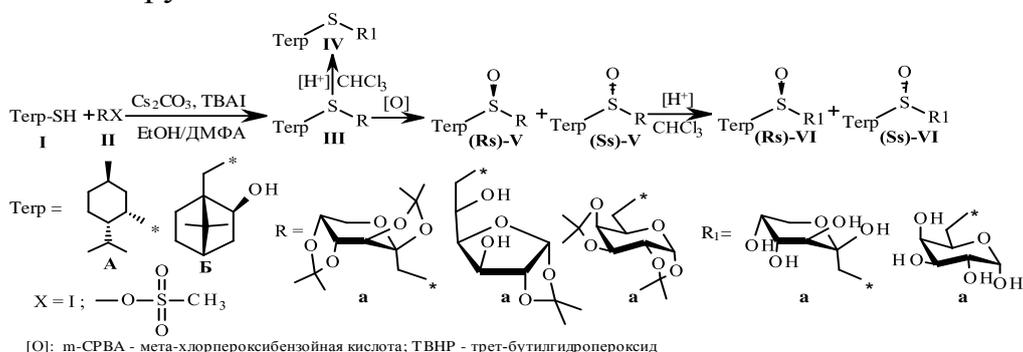
<sup>1</sup> Институт химии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.

<sup>2</sup> Институт биологии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.

pestova-sv@chemi.komisc.ru

Известно, что серосодержащие соединения благодаря наличию атома серы, способного вступать в реакции окисления, могут проявлять антиоксидантные (АО) свойства. Однако часто эти соединения, являются токсичными, что существенно сужает круг их использования в фармакологии. В связи с необходимостью разработки методов получения биологически активных соединений, имеющих в составе кроме атома серы природные не токсичные или слаботоксичные фрагменты, нами впервые проведен синтез сульфидов, содержащих терпеновый и углеводный фрагменты.

На основе тиолов **IA**, **IB**, 6-дезоксидо-1,2:3,4-ди-О-изопропилиден-β-D-фруктопиранозы **IIa** (X = I), 6-дезоксидо-1,2:3,4-ди-О-изопропилиден-α-D-галактопиранозы **IIb** (X = I) и 6-метил-1,2-моноацетонглюкофуранозы **IIc** (X=Ms) синтезированы сульфиды общей формулой **III**, проведено их окисление до сульфоксидов **V** и последующее снятие изопропилиденовой защиты гидроксильных групп.



Проведено исследование токсичности, мембранопротекторных (МП) и АО свойств полученных сероорганических соединений различной структуры в концентрации 100 мкМ на модели H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- и ААРН-индуцированного гемолиза эритроцитов крови. Анализ гемолитической активности выявил только три высокотоксичных соединения – **IIIa**, **IIIb**, **IIIc**, по отношению к эритроцитам крови млекопитающих. У остальных была проведена оценка МП и АО активности. Наиболее высокими они были для соединений на основе галакто- и фруктопиранозы – **(R<sub>s</sub>)-VAb**, **IIIbB**, **(R<sub>s</sub>)-VbB**, **(R<sub>s</sub>)-VIAb**, **(S<sub>s</sub>)-VIAd**, **(S<sub>s</sub>)-VIAg**, **IVAg**.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №13-03-01312\_a) и Уральского отделения РАН (проект №12-У-3-1015).

# **МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАХВАТА РАМНОГАЛАКТУРОНАНА I МИКРОФИБРИЛЛАМИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ: КОНКРЕТИЗАЦИЯ МЕХАНИЗМА СОЗДАНИЯ НАТЯЖЕНИЯ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ВОЛОКНАХ**

*Петрова А.А., Мишкина П.В., Горшкова Т.А.*

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН. Казань.  
anna.an.petrova@gmail.com

Основная функция желатинозных волокон в растении заключается в поддержании и перемещении органов в пространстве, в частности, при необходимости выдерживать высокие нагрузки и механическом стрессе. В реализации этой функции ключевую роль играют особый состав и структура желатинозной клеточной стенки, обеспечивающие ее контрактильные свойства. Существует гипотеза, согласно которой контрактильные свойства в желатинозных слоях формируются за счет натяжения латерально взаимодействующих микрофибрилл целлюлозы при захвате ими полисахаридов матрикса [1]. На примере флоэмных волокон льна было продемонстрировано, что в качестве полисахарида, «запечатанного» между микрофибриллами, может выступать сложный рамногалактуронан I с боковыми галактозными цепями [2]. Однако остается неизвестным, какими физико-механическими свойствами должен обладать полисахарид матрикса для обеспечения высокой эффективности натяжения микрофибрилл, неясны оптимальные для создания натяжения параметры микрофибрилл целлюлозы (длина и толщина), ничего неизвестно о распределении полисахаридов матрикса между микрофибриллами, а также необходимая сила натяжения для реализации этого механизма.

С помощью метода конечных элементов в программном обеспечении Ansys, позволяющего проводить расчет статических, динамических, электрических, термических и других видов анализа, нами была построена модель захвата рамногалактуронана I микрофибриллами целлюлозы. Для построения были использованы данные для рамногалактуронана I, полученные с помощью ЯМР-спекроскопии и динамического рассеяния света, а также модули Юнга и коэффициенты Пуассона для микрофибрилл целлюлозы, полученные из литературных источников. Оптимизация модели позволила рассчитать общую деформацию микрофибрилл целлюлозы и рамногалактуронана I, а также оценить зависимость эффективности натяжения от физико-механических параметров исследуемых объектов.

Работа поддержана грантами РФФИ (14-04-31462, 12-04-97077).

## СИНТЕЗ МИМЕТИКОВ ЛИПОАРАБИНОМАННАНА МИКОБАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ЛИНЕЙНЫХ ОЛИГОМЕРОВ D-АРАБИНОФУРАНОЗЫ.

*Подвальный Н.М.<sup>1</sup>, Панова М.В.<sup>1,2</sup>, Чижов А.О.<sup>1</sup>, Здоровенко Э.Л.<sup>1</sup>, Зинин А.И.<sup>1</sup>, Торгов В.И.<sup>1</sup>, Кононов Л.О.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

<sup>2</sup> Высший химический колледж РАН. Москва.

[nmpodvalnyy@gmail.com](mailto:nmpodvalnyy@gmail.com)

При реакции 3-*O*-ацильных производных 1,2,5-ортобензоата β-D-арабинофуранозы с силиловым эфиром 4-(2-хлорэтокси)фенола [1], а также самим 4-(2-хлорэтокси)фенолом в условиях катализа SnCl<sub>4</sub> в дихлорметане происходит образование линейных α1→5 связанных олигомеров арабинофуранозы, содержащих 4-(2-хлорэтокси)фенильный агликон. Предположительно, реакция проходит по известному [2, 3] механизму катионной полимеризации ортоэфиров сахаров. Полученные олигосахариды можно рассматривать как содержащие преспейсер синтетические блоки – предшественники арабинанов микобактерий, их фрагментов и родственных полисахаридов. На основе смеси олигомер-гомологов арабинофуранозы (продукта олигомеризации 3-*O*-бензоильного производного 1,2,5-ортобензоата β-D-арабинофуранозы, DP<sub>n</sub> = 14) после двух последовательных стадий гликозилирования и удаления защитных групп был получен линейный спейсированный олигосахарид, содержащий на невосстанавливаемом конце β1→2 связанный остаток арабинофуранозы и родственный терминальному участку липоарабиноманнана микобактерий (ЛММ).

В результате совместной олигомеризации 3-*O*-бензоил- и 3-*O*-хлорацетил-1,2,5-ортобензоатов β-D-арабинофуранозы была получена смесь линейных олигосахаридов с нерегулярно расположенными остатками арабинофуранозы, содержащими 3-*O*-хлорацетильные группы. После их удаления и гликозилирования освободившихся гидроксильных групп дисахаридными гликозил-донорами для создания боковых ответвлений был получен разветвленный спейсированный миметик ЛММ нерегулярного строения.

После удаления защитных групп и замены атома хлора в агликоне на азидную группу (превращенную далее в аминогруппу) получены спейсированные олигосахариды, готовые к конъюгации с носителями для испытания конъюгатов в качестве потенциальных агентов для диагностики микобактериозов.

Работа поддержана грантами РФФИ (13-03-00666, 14-03-31479) и грантом Президента России (МК-6405.2014.3).

1. Подвальный и др. (2014) *Изв. АН, Сер. хим.* (2): 497–500.
2. Bochkov *et al.* (1975) *Carbohydr. Res.* 43: 35–41.
3. Hori *et al.* (2000) *Macromolecules* 33: 1148–1151.

## НОВЫЕ ГЛИКОПЕПТИДЫ ИЗ ЦВЕТКОВ ОДУВАНЧИКА (*Taraxacum officinale*): ВЫДЕЛЕНИЕ, СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Рогожин Е.А.<sup>1</sup>, Астафьева А.А.<sup>1</sup>, Одинцова Т.И.<sup>2</sup>, Козлов С.А.<sup>1</sup>, Гришин Е.В.<sup>1</sup>,  
Егоров Ц.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Москва.

<sup>2</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Москва.

rea21@list.ru

Растения демонстрируют многоуровневую систему защиты от различных патогенов и вредителей. Рецепторы на поверхности растительной клетки воспринимают сигнальные молекулы от специфических и неспецифических патогенов, а также от своих собственных поврежденных клеток. Распознавание таких молекул является основным фактором, запускающим иммунную систему растений путем регуляции экспрессии соответствующих генов.

В рамках данной работы два гомологичных пептида, ТоНур1 и ТоНур2, показавшие отсутствие сходства по аминокислотной последовательности ко всем известным белкам были выделены из цветков *T. officinale* посредством многостадийной жидкостной хроматографии. Аминокислотный и масс-спектрометрический анализ показал, что данные пептиды представляют собой уникальную структуру: они не имеют цистеинов, богаты остатками пролина/гидроксипролина, а также содержат гликозидные связи с остатками пентоз. Полные первичные структуры для обоих пептидов были установлены комбинацией методов автоматического секвенирования по Эдману и *de novo* секвенирования посредством метода CID и HCD тандемной масс-спектрометрии. Установлено, что ТоНур2 состоит из 35 аминокислотных остатков, содержит 18 остатков пролина, 8 из которых гидроксильированы. Выделенные пептиды проявляют узкоспецифичную антимикробную активность против грибных фитопатогенов и подавляют рост колоний грамположительных и грамотрицательных бактерий. Также было показано, что остатки сахаров в молекулах не имеют значительной роли для структуры пептидов, однако важны для проявления антимикробной активности. В дополнение к антимикробной, данные гликопептиды обладают также сигнальной активностью. Уникальные структурные и функциональные особенности пептида ТоНур2 могут являться основой для выделения нового семейства растительных пептидов с двойным действием (антимикробным и сигнальным).

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-00190-а, государственным контрактом Министерства образования и науки РФ ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России 2009-2013 гг.» (№ 16.740.11.0424).

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ПОЛИСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСА СУЛЬФАТИРОВАННОЙ ЛИСТВЕННОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ГЛИКОЗИЛГИДРОЛАЗАМИ

*Синельников И.Г., Тышкунова И.В., Аксенов А.С., Чухчин Д.Г., Новожилов Е.В.*  
Северный (Арктический) федеральный университет. Архангельск.  
sinelnikov.i@list.ru

Одним из ключевых направлений получения глюкозы и других моносахаридов из целлюлозосодержащих материалов (ЦСМ) является ферментативный гидролиз полисахаридного комплекса растительного происхождения. Использование в качестве субстратов доступных ЦСМ, не требующих дополнительной подготовки, является актуальным. Целью данной работы является получение кинетических закономерностей и изучение морфологических изменений структуры волокон при ферментативном гидролизе гликозилгидролазами сульфатированной лиственной целлюлозы – крупнотоннажного продукта химико-лесного комплекса.

В исследованиях использовали промышленный образец влажной небеленой сульфатированной лиственной целлюлозы (содержание целлюлозы 75%, пентозанов 18%). Ферментативную обработку проводили комплексным препаратом гликозилгидролаз на основе гриба *Penicillium verruculosum* [1] в условиях: температура 50 °С, рН 5,0 (0,1 М ацетатный буферный раствор), концентрация целлюлозы 50 г/л, расход ферментов – 10 мг на 1 г субстрата в пересчете на белок. Степень гидролиза определяли по концентрации восстанавливающих сахаров (ВС, по Шомоди-Нельсону) и глюкозы (глюкозооксидазный метод).

Ферментативная деструкция целлюлозы и гемицеллюлоз протекает с наибольшей скоростью первые 12 часов. На начальном этапе гидролиза происходит увеличение степени кристалличности полисахаридного субстрата, но уже через 20 часов наблюдается его снижение на 10%. Исследования на электронном микроскопе показали, что деструкция волокон целлюлазами и ксиланазами сопровождается существенными структурно-морфологическими изменениями. Наиболее доступны для действия ферментов первичная оболочка Р и слои вторичной оболочки клеточной стенки: наружный слой S<sub>1</sub> и прилегающий к полости клетки внутренний слой S<sub>3</sub>. Они первыми подвергаются действию ферментов, однако вследствие особенностей состава и строения являются достаточно устойчивыми к деструкции и частично сохраняются после ферментативного гидролиза. Наиболее значительно разрушается средний самый массивный слой S<sub>2</sub>. В результате по истечении 48 часов концентрация глюкозы составила 26 г/л, ВС – 32 г/л. Степень конверсии является высокой (выход глюкозы – 62% от теоретического), небольшое содержание остаточного лигнина (2%) существенно не снижает активность гликозилгидролаз.

1. Morozova *et al.* (2010) *Biotechnol. J.* 5: 871–880.

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГЛИКОЗИДАЗ ИЗ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 И *Arenibacter latericius* 426, ИНАКТИВИРУЮЩИХ СЕРОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ А- И В-ЭРИТРОЦИТОВ

Слепченко Л.В., Голотин В.А., Балабанова Л.А., Бакунина И.Ю., Рассказов В.А.  
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова  
Дальневосточного отделения Российской академии наук. Владивосток.  
Lubov99d@mail.ru

На основе коммерческой плазмиды рЕТ-40b(+) (Novagen) сконструированы плазмиды 40Gal и 40NaGal, определяющие синтез  $\alpha$ -галактозидазы из морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 и  $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидазы из морской бактерии *Arenibacter latericius* КММ 426<sup>T</sup>, соответственно. Конструкции включают полноразмерные структурные гены гликозидаз, адаптированные по N-концу для экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Получены трансгенные штаммы *E. coli* Rosetta(DE3)/40Gal и *E. coli* Rosetta(DE3)/40NaGal, являющиеся продуцентами рекомбинантных гликозидаз. В условиях экспрессии рекомбинантных плазмид при температуре 16 °С, концентрации индуктора экспрессии 0,2 мМ и времени культивирования 12 ч выход рекомбинантного белка достигал 10 мг в перерасчете на 1 л культуры. Разработаны процедуры очистки рекомбинантных гликозидаз, с помощью анионообменной, металоаффинной хроматографий и гель-фильтрации. Методом <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопии показано, что рекомбинантные гликозидазы катализируют гидролиз O-гликозидной связи с сохранением стереохимической конфигурации аномерного атома, однако реализуют различные механизмы гидролиза, характерные для 36 ( $\alpha$ -галактозидаза) и 109 ( $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидаза) семейств гликозидгидролаз. Очищенные рекомбинантные гликозидазы, как и природные ферменты, снижают серологическую активность А- и В-эритроцитов при рН 7.0, что делает их в перспективе пригодными для конверсии А-, В- и АВ-эритроцитов в эритроциты группы 0.

Работа поддержана грантом РФФИ 13-04-00806, программой «Дальний Восток» 12-III-A-05-019 и 09-I-P22-05.

## СРАВНЕНИЕ УДЕРЖИВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ У ПЕКТИНОВЫХ ГРАНУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НЕКОММЕРЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ПОЛИСАХАРИДОВ

Смирнов В.В.

Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН.

Сыктывкар.

smirnov@physiol.komisc.ru

Известно, что пектиновые гранулы, полученные с помощью ионотропного желирования растворов коммерческих пектинов, устойчивы к действию гастральной среды, но имеют высокую скорость высвобождения низкомолекулярных веществ [1]. Цель исследования заключалась в выявлении пектиновых полисахаридов, образующих гранулы с высокой удерживающей способностью. Для этого в работе были использованы 10 некоммерческих пектинов, обладающих существенным отличием по составу и структуре углеводной цепи. Феруловая кислота служила модельным лекарственным соединением. Получение и загрузку гранул проводили по методу, описанному в работе Sriamornsak P. [2].

Установлено, что растворы пектинов образуют в хлориде кальция многообразные по форме и массе влажные гранулы. Выявлено, что чем больше масса влажных гранул, тем выше степень загрузки (7.1–15.4 мг вещества/г сухих гранул). С помощью электронной микроскопии показано, что у сухих гранул, загруженных феруловой кислотой, присутствуют включения кристаллической формы. Установлено, что в растворе, имитирующем гастральную среду, полученные гранулы высвобождают половину содержащейся в них феруловой кислоты за 5–15 мин, а 80% за 20 мин и более. Наименьшая скорость высвобождения феруловой кислоты у пектинов хвощей. Предположено, что выход фенольной кислоты детерминирован степенью набухания гранул в растворе, что подтверждается при сравнении данных со степенью усыхания влажных частиц. Обнаружено, что гранулы, полученные из пектинов бадана, ряски и сабельника, имеют менее 100% выхода феруловой кислоты, что может быть обусловлено сорбцией пектинами феруловой кислоты.

Согласно полученным данным *in vitro* выявлены два пектина с высокой удерживающей способностью, которые отличаются от коммерческого образца меньшей степенью метилэтерифицирования.

Работа поддержана конкурсом инновационных проектов молодых ученых и аспирантов УрО РАН.

1. Sriamornsak (2011) *Expert Opinion on Drug Delivery*. 8: 1009–1023.
2. Sriamornsak (2010) *AAPS PharmSciTech*. 11: 1315–1319.

## СТРУКТУРНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТОЧНЫХ СТЕНКАХ ОПОСРЕДУЮТ ЭФФЕКТ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА ГРАВИТРОПИЗМ ГИПОКОТИЛЕЙ АРАБИДОПСИСА

*Суслов Д.В.<sup>1</sup>, Ванденбуше Ф.<sup>2</sup>, Функе Н.<sup>3</sup>, Рупрехт К.<sup>3</sup>, Иваков А.<sup>3</sup>, Виссенберг К.<sup>4</sup>, Перссон С.<sup>3</sup>, Ван Дер Стратен Д.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет. Санкт-Петербург.

<sup>2</sup> Университет Гента. Гент.

<sup>3</sup> Институт Макса Планка молекулярной физиологии растений. Потсдам.

<sup>4</sup> Университет Антверпена. Антверпен.

souslov@mail.ru

Гравитропизмом называют направленный рост органов растения относительно вектора силы тяжести. Обнаружили, что фитогормоны brassinosteroids являются негативными регуляторами гравитропизма этиолированных гипокотилей арабидопсиса, действующими через изменение механических свойств клеточных стенок. У растений, выращенных на горизонтальных чашках Петри в присутствии 24-эпибрассинолида (ЭБЛ, 100 нМ), гипокотили лежали на поверхности агара, демонстрируя нарушение гравитропизма. Клеточные стенки данного органа имели повышенную растяжимость *in vitro*, измеренную методом крипа при рН 6, свидетельствуя об их недостаточной механической прочности для поддержания собственного веса гипокотилей. ЭБЛ не влиял на моносахаридный состав клеточных стенок, но нарушал ориентацию микрофибрилл целлюлозы в наружной эпидермальной клеточной стенке. Это может объяснить эффект ЭБЛ на гравитропизм, поскольку нарушения ориентации микрофибрилл у растений дикого типа, обработанных оризалином (250 нМ), или у мутантов *rom2-4* также уменьшают процентную долю вертикально растущих гипокотилей.

Брассиназол (БРЗ, 1 мкМ), ингибитор биосинтеза brassinosteroids, увеличивал долю вертикально растущих гипокотилей до 100% по сравнению с 70–80% в необработанном контроле, что коррелировало с увеличением прочности их клеточных стенок. БРЗ стимулировал гравитропизм независимо от ориентации целлюлозы: и у растений дикого типа, обработанных оризалином, и у мутантов *rom2-4* он увеличивал долю вертикально растущих гипокотилей до 100%. Эффект БРЗ на гравитропизм сопровождался уменьшением содержания кристаллической целлюлозы и маннозы и увеличением содержания нецеллюлозной глюкозы, что согласуется с влиянием на маннаны и ксилоглюканы матрикса клеточных стенок и/или с изменением кристалличности целлюлозы. Таким образом, противоположные эффекты ЭБЛ и БРЗ на гравитропизм опосредованы разными механизмами, влияющими на механические свойства клеточных стенок.

Работа поддержана грантом DAAD 2012 г. по программе «Дмитрий Менделеев» и грантом РФФИ (14-04-01624).

## РОЛЬ РАСТВОРИМЫХ УГЛЕВОДОВ ЦИТОЗОЛЯ ГРИБОВ В ОТВЕТЕ НА ТЕПЛОВЫЙ ШОК

Терёшина В.М.<sup>1</sup>, Меморская А.С.<sup>1</sup>, Януцевич Е.В.<sup>2</sup>, Гроза Н.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Москва.

<sup>2</sup> Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова. Москва.

v.m.tereshina@inbox.ru

Тепловой шок (ТШ) у грибов приводит к остановке ростовых процессов и запуску защитной комплексной системы, включающей синтез белков теплового шока, трегалозы, ферментов антиоксидантной защиты, изменение состава мембран и состояния воды. Кроме того, следствием ТШ является феномен приобретенной термоустойчивости – организмы после обработки ТШ становятся устойчивыми к летальному ТШ. Нами высказана гипотеза о защите мембран в состоянии ТШ с помощью мембраностабилизирующих соединений – трегалозы, гликолипидов, стероидов и т.д.

Целью работы было изучение состава углеводов цитозоля при длительном ТШ у мезофильных и термофильных грибов.

На примере мезофильного аскомицетного гриба *Aspergillus niger* было показано, что в оптимальных тепловых условиях углеводы цитозоля представлены глюкозой, трегалозой и сахароспиртами: маннитом, арабитом, эритритом и глицерином. Однако в этих условиях в динамике роста, как в трофофазе, так и в идиофазе, содержание трегалозы не превышает 0,5% от сухой массы, тогда как в после 3ч ТШ содержание этого дисахарида в трофофазе достигает 6%, а в идиофазе – 3%. Причем уровень трегалозы поддерживается постоянным при ТШ в течение 9 ч.

Модель термофильных грибов интересна с точки зрения теории термофилии и изучения механизмов адаптации к ТШ, так как термофилы способны оптимально расти в условиях теплового шока для мезофильных грибов. Но неизвестно, свойствен ли термофилам феномен приобретенной термоустойчивости и не изучен их ответ на ТШ. На примере трех термофильных грибов *Myceliophthora thermophila*, *Rhizomucor miehei* and *Rhizomucor tauricus* было показано, что в оптимальных условиях эти грибы содержат 8–10% трегалозы, причем уровень этого дисахарида поддерживается высоким как в трофо-, так и в идиофазе. ТШ в течение 1 ч не вызывает увеличения уровня трегалозы, а продолжение ТШ в течение 3 ч приводит к существенному снижению ее содержания. При этом выявлено, что у термофилов обработка ТШ не приводит к приобретению термоустойчивости к летальному ТШ.

Таким образом, выявлены принципиальные отличия в ответе мезофильных и термофильных грибов на ТШ, продемонстрирована роль трегалозы в термофилии и в приобретении термоустойчивости.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-00732.

## НОВЫЕ СТРУКТУРЫ ГЛИКОПОЛИМЕРОВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК АКТИНОБАКТЕРИЙ

Тулская Е.М.<sup>1</sup>, Стрешинская Г.М.<sup>1</sup>, Потехина Н.В.<sup>1</sup>, Шашков А.С.<sup>2</sup>,  
Сенченкова С.Н.<sup>2</sup>, Дмитренко А.С.<sup>2</sup>, Барышникова Л.М.<sup>3</sup>, Дорофеева Л.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Москва.

<sup>2</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

<sup>3</sup> Институт физиологии и биохимии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Пушкино-на-Оке.  
em\_tulskaya@mail.ru

Исследования многочисленных видов родов класса Actinobacteria показали, что их представители содержат в клеточных стенках гликополимеры различных классов: тейхоевые кислоты, поли(гликозилфосфаты), тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты, нейтральные и кислые полисахариды [1, 2]. Обсуждаются структуры гликополимеров, описанные впервые.

1) Нейтральные полисахариды: галактан с шестью остатками  $\alpha$ -D-Galf в повторяющемся звене с различной локализацией гликозидных связей между остатками Galf (*Geodermatophilus obscurus* ssp. *obscurus*); галактан с 1→6-связанными остатками  $\beta$ -D-Galp, замещенными по O2  $\alpha$ -D-GlcpNAc3NAc (*Arthrobacter* sp).

2) Кислый полисахарид: 4,6-пирувилированный галактан с 1→3-связанными остатками  $\beta$ -D-Galp (*Nocardioides* sp. и *Promicromonospora citrea*).

3) Тейхуроновые кислоты с линейной структурой цепи и гетерогенными повторяющимися звеньями, состоящими из остатков  $\alpha$ -D-Glcp и статистически чередующихся остатков диаминоуроновых кислот с D-манно-, L-гуло- и D-глюко-конфигурацией, образующихся в процессе биосинтеза полимеров при эпимеризации остатков с манно-конфигурацией по C5 и C2 соответственно (*Actinoplanes lobatus*, *A. regularis*, *A. auranticolor*).

4) Тейхулозоновые кислоты с линейной структурой цепи, гетерогенными повторяющимися звеньями, включающими остатки  $\alpha$ -Kdn и нейтрального моносахарида (Galp или Glcp). Кроме того, остатки Kdn могут быть нестехиометрически замещены по O4 остатками  $\alpha$ -D-GlcpNAc/метильными группами (*Streptomyces coelicolor* M145) или без заместителей (*Streptomyces albus*; *Arthrobacter* spp.).

Полученные данные расширяют представления о многообразии органического мира и биосинтетическом потенциале микроорганизмов.

Работа поддержана грантами РФФИ (13-04-00447 и 12-04-01730).

1. Тульская и др. (2011) *Биохимия*. 76 (7): 904–913.

2. Potekhina et al. (2011) *Methods in Microbiology, Academic Press: Elsevier*, 38, 132–164.

## СТРУКТУРНАЯ И СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM*

*Федоненко Ю.П., Сигида Е.Н., Коннова С.А.\*, Игнатов В.В.*

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.

\*Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского. Саратов.

room308@ibppm.sgu.ru

Липополисахариды (ЛПС), являясь одним из основных конструктивных компонентов клеточной поверхности грамотрицательных бактерий, принимают непосредственное участие в контактных взаимодействиях с различными объектами окружающей среды, в том числе с микро- и макроорганизмами. Амфифильные молекулы ЛПС состоят из трех частей: гидрофобного домена – липида А, корового олигосахарида и ориентированного наружу О-специфического полисахарида (ОПС), в котором локализованы антигенные детерминанты, обуславливающие серологическую специфичность бактерий.

С использованием анти-ЛПС-антител более 30 штаммов почвенных азотфиксирующих бактерий р. *Azospirillum* были отнесены к трем серогруппам. Для выявления химической основы серологического родства азоспирилл нами были проведены исследования состава и строения их ЛПС. Для всех исследуемых ЛПС с использованием SDS-PAGE электрофореза была показана гетерогенная природа при доминировании S-форм молекул. В составе липида А преобладали 3-гидрокситетрадекановая, 3-гидроксигексадекановая, гексадекановая и октадеценновая кислоты, соотношение которых варьировало в разных штаммах.

Структуру повторяющихся звеньев ОПС определяли на основании данных химических анализов и одно- и двумерной спектроскопии <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР. Было показано, что штаммы р. *Azospirillum*, отнесенные к серогруппе I, продуцируют линейные D-рамнанные ОПС с идентичной структурой повторяющихся звеньев. В составе ОПС азоспирилл серогруппы III был выявлен общий трисахаридный L-рамнанный фрагмент, который, вероятнее всего, ответственен за обнаруженные серологические перекрестные реакции. Гетерогенность серогруппы II *Azospirillum* spp. обусловлена распространенным среди штаммов этой группы присутствием двух типов повторяющихся звеньев в ОПС, их различным соотношением, а также наличием нестехиометрического метилирования и/или ацетилирования отдельных моносахаридных остатков в составе ОПС.

Работа частично поддержана РФФИ (проект 14-04-01658а).

## **АНТИУГЛЕВОДНЫЕ АНТИТЕЛА МЫШЕЙ-ГНОТОБИОТОВ КАК РЕЗУЛЬТАТ КОЛОНИЗАЦИИ РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ БАКТЕРИЙ**

*Хасбиуллина Н.Р.<sup>1</sup>, Новаковский М.Е.<sup>1</sup>, Шилова Н.В.<sup>1</sup>, Бликст О.<sup>2</sup>,  
Книрель Ю.А.<sup>3</sup>, Бовин Н.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Москва.

<sup>2</sup> Институт клеточной и молекулярной медицины. Копенгаген. Дания.

<sup>3</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

Влияние многообразия представителей микробного сообщества, населяющего полости тела человека и животных, на развитие и функционирование иммунной системы в последние десятилетия приобретает особое значение в связи с увеличением числа людей, страдающих от тех или иных последствий дисбаланса в составе микрофлоры. В то же время взаимоотношения макро- и микроорганизмов, носящих в нормальном физиологическом состоянии характер симбиоза, могут пролить свет на ряд фундаментальных вопросов, в том числе и на происхождение естественных антител. Модельные организмы – мыши и другие животные – стерильные, с индуцированными патологиями, с целенаправленно измененным генотипом активно используются в изучении влияния микрофлоры на иммунную систему.

В нашем исследовании мыши линии Swiss Webster, рожденные и выращенные в стерильных условиях, были колонизированы различными видами и сочетаниями видов микроорганизмов – представителей микрофлоры млекопитающих. С использованием гликоципа, содержащего более 530 гликанов, включая 147 полисахаридов бактериальных клеток, были определены репертуары антител мышей. По результатам работы были сделаны выводы, во-первых, о влиянии микрофлоры непосредственно на количество детектированных в сыворотке крови антител, во-вторых, о важности видового разнообразия в процессе колонизации полостей тела, и, в-третьих, о влиянии доступности бактериальных антигенов в системе распознавания иммунной системы и ее последующей реакции.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 13-04-00549 А.

## СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МУЛЬТИДОТ АНАЛИЗ БАКТЕРИЙ РОДА *Azospirillum*

Широков А.А., Буданова А.А., Панфилова Е.В., Щёголев С.Ю., Матора Л.Ю.  
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН.  
alex@ibppm.ru

Работа посвящена проблеме совершенствования методов исследования поверхностных структур почвенных микроорганизмов на примере ризосферных бактерий рода *Azospirillum*. Поверхностные клеточные структуры играют важную роль в процессах формирования симбиотических взаимодействий. Различия в составе и структуре этих молекул в значительной степени влияют на процессы узнавания участников ассоциации. Поэтому поиск новых и модификация существующих методов выявления серологических особенностей бактерий, формирующих симбиотические отношения с растениями, представляется весьма актуальной задачей. Одним из популярных инструментов современных иммунохимических исследований являются наночастицы, обычно используемые в качестве метки. Создание композитных наночастиц с различным соотношением металлов открывает дополнительные перспективы для развития методов исследования поверхностных антигенных структур.

Целью настоящей работы являлась модификация мультицветного дот-анализа с использованием композитных наночастиц для проведения мультицветного серологического анализа I, II и III серотипа почвенных бактерий рода *Azospirillum*. Для иммуномечения бактериальных клеток использовали поликлональные кроличьи антитела к липополисахаридам штаммов *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и *A. lipoferum* Sp59b (относящихся к I, II и III серотипу соответственно), меченные золото-серебряными наноклетками.

В данной работе нам удалось впервые одновременно оценить серологическую принадлежность более 20 штаммов серовариантов трёх разных серотипов бактерий рода *Azospirillum* с применением модификации мультицветного дот-анализа. Полученные результаты могут быть использованы при серотипировании и изучении поверхностных структур азоспирилл.

## НЕФЕРМЕНТАТИВНОЕ ГЛИКИРОВАНИЕ И ОКСИД АЗОТА

*Шумаев К.Б.<sup>1</sup>, Космачевская О.В.<sup>1</sup>, Пугаченко И.С.<sup>2</sup>, Харитонов Е.В.<sup>2</sup>,  
Топунов А.Ф.<sup>1</sup>, Рууге Э.К.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН. Москва.

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова. Москва.  
tomorov@mail.ru

Неферментативное гликирование, как и действие активных форм кислорода и азота, может приводить к необратимой модификации и инактивации различных биополимеров. Известно, что активные карбонильные соединения вызывающие неферментативное гликирование накапливаются в организме млекопитающих при диабетической гипергликемии. В условиях такого «карбонильного стресса» нарушается функционирование оксида азота (NO) в качестве сигнальной и регуляторной молекулы [1]. Включение в динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) стабилизирует оксид азот, в том числе предотвращает быстрое снижение концентрации NO в реакции с супероксидным радикалом [2]. В то же время реакции неферментативного гликирования с участием наиболее реакционноспособного дикарбонильного соединения – метилглиоксаля (МГ) сопровождаются усилением продукции супероксидного радикала [3].

Нами с помощью спектроскопии ЭПР было проведено исследование действие МГ на связанные с аминокислотами ДНКЖ. Показано, что образование ДНКЖ, связанных с гистидином, ингибируется при взаимодействии МГ с этой аминокислотой. В то же время продукты реакции МГ с лизином, в отличие от нативной аминокислоты, могут участвовать в формировании парамагнитных ДНКЖ. Предполагают, что в живых системах наиболее распространены ДНКЖ, содержащие тиолы [2]. В связи с этим интересно, что в реакции между МГ и цистеиновыми ДНКЖ образуется новый тип ДНКЖ. Мы полагаем, что в комплексах, лигандами которых являются модифицированные лизин или цистеин, железо координировано с азотом оснований Шиффа, образующихся в реакции аминокислот с карбонильными группами МГ. Установлено, что ДНКЖ, содержащие модифицированный цистеин, обладают сосудорасширяющим и антиоксидантным действием. Обнаружено также, что ДНКЖ, содержащие модифицированные аминокислоты, разрушаются под действием супероксида, который продуцируется в ходе реакций неферментативного гликирования. Таким образом, в условиях «карбонильного стресса» на метаболизм оксида азота может влиять не только неферментативное гликирование белков, но и модификация низкомолекулярных комплексов NO.

Работа поддержана грантами РФФИ (№12-04-01246, 12-04-01809, 13-04-00967, 14-04-01710).

1. Dhar *et al.* (2010) *British J. Pharmacol.* 161(8): 1843–1856.
2. Vanin (2008) *Nitric Oxide.* 21(1): 1–13.
3. Шумаев и др. (2009) *Биохимия.* 74(4): 568–574.

## **СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ**

## СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПЕКТИНОВ И РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИХ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

*Витязев Ф.В., Головченко В.В., Патова О.А., Михалева Н.Я.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар  
rodefex@mail.ru

Пектины представляют собой отрицательно заряженные биополимеры с нерегулярной структурой, относящиеся к классу растительных полисахаридов [1]. Интерес исследователей к изучению пектинов во многом обусловлен их способностью к образованию вязких растворов, благодаря которой они нашли применение в различных областях пищевой промышленности. Вязкость растворов пектинов зависит не только от концентрации полисахарида, ионной силы и рН раствора, но и от строения пектиновых макромолекул: количества и распределения метилэтерифицированных остатков галактуроновой кислоты, длины, типа и степени разветвленности углеводных цепей [2].

С целью выяснения влияния функциональных групп на реологические свойства пектинов, было проведено сульфатирование пектиновых полисахаридов, главным компонентом углеводной цепи которых является низко метилэтерифицированный галактуронан, – пектины бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* и рдеста плавающего *Potamogeton natans*.

Показано, что в процессе сульфатирования пектинов происходит разрушение углеводных цепей, состоящих как из остатков галактуроновой кислоты, так и остатков нейтральных моносахаридов, в результате увеличивается полидисперсность полисахаридов. Методом мембранной ультрафильтрации (размер пор соответствует молекулам с Mw 300 и 100 кДа) получен набор сульфатированных производных пектинов с близким моносахаридным составом, но с разной молекулярной массой. Полученные сульфатированные производные пектинов отличаются по степени замещения (0.2 - 2.0). Выявлено, что введение сульфатных групп в макромолекулы пектинов приводит к изменению реологических характеристик их водных растворов, в частности к увеличению растворимости в воде. Наибольшей растворимостью обладают производные, содержащие наибольшее количество сульфатных групп. Водные растворы сульфатированных производных пектинов с высокой степенью замещения характеризуются более низкими значениями вязкости по сравнению с растворами исходных полисахаридов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-31669.

1. Оводов (2009) *Биоорган. химия*. 35(3): 293-310.
2. Донченко (2000). *М.: ДеЛи*. 256с.

## ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА *Rhizobium leguminosarum* К7

Байдылдаева Ж.А.

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК. Алматы.  
Казахстан.

zhanka\_007@mail.ru

Объектом исследований являлся штамм клубеньковых бактерий гороха *Rhizobium leguminosarum* К7. Штамм получен из почв Казахстана и отобран по производственно – ценным показателям (конкурентной и азотфиксирующей способности) для разработки новой серии биопрепаратов «Ризовит-АКС».

Целью работы был подбор и оптимизация состава питательной среды для культивирования штамма *Rhizobium leguminosarum* К7.

Рост и накопление биомассы штамма *Rhizobium leguminosarum* К7 изучали на 10 средах: среде с 3% кукурузным экстрактом, Исварана, Лазарева, с бобовым отваром, Грэхема, Фреда, Норриса, МРС, Мазэ, минимальной среде. Источники углерода вносили в питательную среду в концентрациях, (г/л): 2.0; 4.0; 6.0; 8.0; 10.0; микроэлементы – 0.005; 0.01; 0.02; 0.04; CaCO<sub>3</sub> – 2.0; 4.0; 6.0; 8.0 и NaCl – 0.2; 0.4; 0.6; 0.8. Среда Фреда, Лазарева, Норриса, минимальная среда, среда с 3% кукурузным экстрактом в меньшей степени обеспечивают рост штамма *Rhizobium leguminosarum* К7. Наиболее оптимальными для роста штамма К7, являются среды с бобовым отваром, Исварана, Грэхема, Мазэ и МРС. При культивировании исследуемого штамма на этих средах величина титра составляла  $1.4 \pm 0.12 \times 10^7$ – $1.6 \pm 0.22 \times 10^9$  КОЕ/мл. Наиболее оптимальной для роста штамма К7 является среда с бобовым отваром, на которой титр клеток достигает  $1.6 \pm 0.22 \times 10^9$  КОЕ/мл. На фоне среды с бобовым отваром изучено влияние источников углерода, неорганических солей и микроэлементов на рост штамма К7 и накопление его биомассы. Установлено, что наиболее оптимальным источником углерода для роста штамма К7 является сахароза в концентрации 8.0 г/л. Ряд солей (CaCO<sub>3</sub>, MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> × 4 H<sub>2</sub>O) стимулировали накопление биомассы штамма К7 до  $10^9$ – $10^{10}$  КОЕ/мл. В результате проведенных исследований разработана модифицированная среда с бобовым отваром, в состав которой введена сахароза в концентрации 8.0 г/л и CaCO<sub>3</sub> в концентрации 4.0 г/л. Накопление биомассы клубеньковых бактерий гороха *Rhizobium leguminosarum* К7 на данной среде составляет  $3.6 \times 10^{10}$  КОЕ/мл.

## ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ГЛЮКАНАЗЫ И ХИТИНАЗЫ, УЧАСТВУЮЩИХ В ИЗМЕНЕНИИ ПОЛИСАХАРИДОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ В ПРОЦЕССЕ МОРФОГЕНЕЗА *Lentinus edodes*

*Ветчинкина Е.П.<sup>1</sup>, Горшков В.Ю.<sup>2</sup>, Гоголев Ю.В.<sup>2</sup>, Никитина В.Е.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.

<sup>2</sup> Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН. Казань.

elenavetrus@yandex.ru

Базидиальные грибы синтезируют ферменты глюканазы и хитиназы, необходимые для морфогенеза клеточной стенки. Это сложная, биохимически и морфологически динамичная структура, изменение состава и строения которой приводит к цитодифференцировке, отвечающей определенному функциональному значению: вегетативному росту, освоению пространства; способности защищать от неблагоприятных условий окружающей среды и патогенов, образовывать морфоструктуры и базидиомы. Клеточная стенка базидиомицетов содержит большое количество хитина, образующего комплексы с  $\beta$ -глюканами. Глюканы, наряду с хитином, являются преобладающими полисахаридами данной структуры и, как предполагают, ответственны за форму и жесткость стенки грибных гиф. Исследование биосинтеза компонентов клеточной стенки доказывает, что хитин, глюканы и гликопротеины связаны вместе поперечными ковалентными связями, и такое соединение является динамичным процессом.

В нашем исследовании, на примере базидиомицета *Lentinus edodes* установлено, что уровень экспрессии гена глюканазы *exg1*, также как и хитиназы *chi*, был наиболее высоким на стадиях мицелиальной пленки, уплотненного мицелия и примордиев. Модель роста клеточной стенки грибов предусматривает определенную роль литических ферментов в поддержании баланса между синтезом и лизисом ее компонентов. В базидиомах и плотных мицелиальных образованиях хитина намного больше, чем в вегетативном мицелии, что, исходя из экспериментальных данных, приводит к повышенному синтезу хитиназ и глюканаз. Это говорит в пользу совместной работы данных ферментов в непрерывной перестройке полисахаридов клеточной стенки при растяжении и слиянии грибных гиф и образовании морфоструктур.

Эти данные были подтверждены электронно-микроскопическими исследованиями. У мицелиальной пленки, в отличие от тонкостенных гиф вегетативного мицелия, происходит сильное утолщение клеточной стенки, очень развит электронно-плотный слой, состоящий большей частью из фибрилл хитина. А на стадии примордиев, встречается большое количество «опорных» гиф, клеточная стенка которых очень толстая.

Таким образом, многократное повышение экспрессии генов *exg1* и *chi*, говорит о важной роли внутриклеточных глюканаз и хитиназ при цитодифференцировке клеточной стенки в процессах уплотнения, растяжения и слияния гиф, необходимых для образования морфоструктур макромицетов.

## ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЕ ГЛИКИРОВАНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ СТАРЕНИЯ БЕЛКОВ

Сорокина И.А., Вечканов Е.М., Лукаш А.И.

Южный федеральный университет. Ростов-на-Дону.

emvechkanov@sfedu.ru

В регуляции катаболизма белков ведущая роль принадлежит неферментативным модификациям, возникших в ходе эволюции протеомов как универсальные механизмы, обеспечивающие деградацию дефектных белков, накопление которых, в свою очередь, может вызвать самые разнообразные нарушения жизнедеятельности организма.

В настоящей работе рассмотрены две неферментативные посттрансляционные модификации – гликирование и дезамидирование некоторых белков. Реакция гликирования заключается во взаимодействии восстанавливающей формы свободной глюкозы с  $\text{NH}_2$ -группой лизина, амидной группой аспарагина и  $\text{OH}$ -группами серина и треонина. Гликирование характерно для большинства белков и происходит при нормальном состоянии организма. Развитие патологических состояний, сопровождающихся гипергликемией, способствует интенсификации процесса гликирования. Показано усиление гликирования гемоглобина, белков плазмы крови, коллагена, белков хрусталика глаза и других белков при сахарном диабете. В то же время глюкоза является естественным метаболитом большинства форм живой материи, что даёт основание считать гликирование универсальной модификацией, вызывающей серьёзные структурные и функциональные изменения белков.

Другой важнейшей неферментативной модификацией является гидролиз амидов (дезамидирование) аспарагина и глутамина полипептидной цепи. Аналогично гликированию, дезамидирование происходит не только в экстремальных условиях, но и при нормальном функционировании организма и может рассматриваться как одна из возможных причин инактивации белков *in vivo* и *in vitro*.

В цикле работ, проведенных на базе лаборатории биохимии и микробиологии ЮФУ, на ряде модельных белков ( $\gamma$ -глобулин, сывороточный альбумин, инсулин, алкогольдегидрогеназа) установлена взаимосвязь гликирования и дезамидирования при инкубации модельных белков в растворах глюкозы различной концентрации, а также определена степень корреляции гликирования и амидированности альбумина плазмы крови молодых и старых доноров в норме и при сахарном диабете.

1. Robinson N., Robinson A. Molecular clocks. Deamidation asparaginyl and glutaminyl residues in peptides and proteins // Althouse Presse USA. – 2004.
2. Ahmed *et al.* (2005) *Diabetologia*. 48: 1590–1603.

## **ВЛИЯНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИ- И ОЛИГОСАХАРИДОВ НА МОРФОГЕНЕЗ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ**

*Arabidopsis thaliana* (Heynh.)

*Галицкая А.А., Наумова Т.С., Орлов В.П., Селиванова О.Г., Селиванов Н.Ю., Соколова М.К., Соколов О.И.*

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.

Проведено исследование влияния пектинового полисахарида, его олигомерных фрагментов, полученных методом ограниченного ферментолита, и моногалактуроновой кислоты на морфометрические параметры клеток суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana* (Heynh.)

Для оценки морфологических изменений суспензию клеток инкубировали в присутствии полигалактуроновой кислоты, пектиновых олигосахаридов и моногалактуроновой кислоты в течение 2-х суток. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые без добавления эффекторов.

Показано, что внесение препаратов пектиновых поли- и олигосахаридов в суспензионную культуру клеток арабидопсиса приводит к обесцвечиванию клеток суспензии, а также к формированию многоклеточных агрегатов, вызывая, возможно, стимуляцию биосинтеза полимеров клеточной стенки. Наиболее выраженный эффект вызывал препарат пектиновых олигосахаридов. В тоже время, добавление моногалактуроновой кислоты не вызывало значимых изменений морфометрических параметров культуры.

Интересные данные получены при исследовании морфологии клеток и трехмерной организации цитоскелета с применением флуоресцентных цитохимических и иммунохимических зондов и конфокальной микроскопии. Показано, что добавление полигалактуроновой кислоты на ранних стадиях роста (1–3 сутки) ингибирует растяжение клеток, что приводит к образованию клеток округлой формы. Отмечено также уменьшение размеров клеток (на 15%). Препараты пектиновых олигосахаридов и особенно полигалактуроновой кислоты приводили к образованию многоклеточных агрегатов, что косвенно может свидетельствовать об активации ростовых и пролиферативных процессов. Одним из возможных механизмов может служить взаимодействие поли- и олигосахаридов с поверхностью клеточной стенки, модификация ее структуры и стимуляция межклеточного взаимодействия, приводящая к образованию многоклеточных кластеров, обеспечивающих более интенсивный рост культуры.

Таким образом, суспензионная культура недифференцированных клеток *A. thaliana* (Heynh.) формирует четкий морфологический ответ на воздействие пектиновых компонентов, имеющих одинаковую химическую природу, но различающихся степенью полимеризации. Показано, что наибольшей активностью обладают олигосахаридные фрагменты, полученные путем ферментативной деградации полигалактуроновой кислоты.

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АРАБИНОФУРАНОЗИДАЗ В ПЕРВИЧНОМ КОРНЕ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

*Горшков О.В., Мокина Н.Е., Козлова Л.В., Горшкова Т.А.*

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра  
Российской академии наук. Казань.

[o\\_gorshkov@mail.ru](mailto:o_gorshkov@mail.ru)

Наличие клеточной стенки и способность к росту растяжением – это фундаментальные особенности растительных организмов, тесно связанные друг с другом. На многих однодольных растениях показано соответствие стадии роста растяжением коэффициенту Ara/Xyl [1], отражающему молярное соотношение арабинозы и ксилозы, – моносахаридов, преимущественно принадлежащих глюкуроарабиноксилану. Остов этого полисахарида представлен  $\beta$ -(1,4)-связанными остатками Xylp, а основным заместителем служат остатки Araf. При этом снижение коэффициента в ходе роста растяжением может свидетельствовать о действии специфических гликозидаз, способных гидролизовать концевые Araf остатки [2]. В связи с этим актуальными представляются поиск генов арабинофуранозидаз и оценка их дифференциальной экспрессии с целью выявления стадия-специфичных ферментов, участвующих в метаболизме глюкуроноарабиноксилана – ключевой гемицеллюлозы первичных клеточных стенок II типа.

Согласно данным Phytozome (<http://www.phytozome.net>), геном кукурузы (*Zea mays*) содержит восемь ОРС, которые могут быть идентифицированы как гены арабинофуранозидаз, вследствие наличия в аминокислотных последовательностях соответствующих белков  $\alpha$ -L-арабинофуранозидазного домена, ответственного за гидролиз невосстанавливающих  $\alpha$ -L-Araf остатков. В работе были использованы фрагменты растущего корня проростков кукурузы, содержащие клетки на разных этапах роста растяжением (меристема, зона растяжения и зона клеток, закончивших растяжение), и зона корневого чехлика. Оценка динамики экспрессии целевых генов свидетельствует о возрастании уровня экспрессии большинства генов в зоне растяжения и зоне клеток, закончивших растяжение. При этом максимальный уровень экспрессии (в 6 и более раз) в данных зонах отмечен для генов ZM3G120132 и ZM2G180889. Ген ZM2G077299, единственный из всех, проявил максимальный уровень экспрессии в зоне корневого чехлика. Таким образом, выявление направленной модуляции экспрессии в зоне растяжения может определять функциональную значимость соответствующих генов в модификации свойств клеточной стенки в процессе роста растяжением.

Работа поддержана грантом РФФИ (14-04-01002).

1. Горшкова и др. (2013) *Биохимия* 78: 1068–1088.
2. Козлова и др. (2012) *Биохимия* 77: 501–511.

## МАЛДИ-МС ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И СТРОЕНИЯ ЛИПИДА А, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЛПС *Azospirillum irakense* КВС1

Гринёв В.С.<sup>1</sup>, Суркина А.К.<sup>1</sup>, Федоненко Ю.П.<sup>1</sup>, Коннова С.А.<sup>1,2</sup>, Игнатов В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.

<sup>2</sup> Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского. Саратов.

grinev@ibppm.sgu.ru

Ранее были установлены структуры О-специфического полисахарида (ОПС) липополисахарида (ЛПС) *Azospirillum irakense* КВС1, а также дана иммунохимическая характеристика капсульного полисахарида (КПС), структура которого оказалась идентичной ОПС [1]. Состав и строение липида А ЛПС *A. irakense* КВС1 остаются неустановленными. Известно, что степень О- и N-ацилирования липида А является критически важным параметром для взаимодействия этих молекул с TLR4 рецепторами на мембране иммунокомпетентных клеток. Исследование структуры липида А осложняется его естественной гетерогенностью, свойственной почвенным бактериям.

Методом МАЛДИ-МС проведено структурное исследование препарата липида А, полученного в результате мягкого кислотного гидролиза 2% АсОН в течение 4 ч ЛПС. Спектры были зарегистрированы в режиме рефлектрона при детектировании положительных и отрицательных ионов на МАЛДИ масс-спектрометре АВ Sciex TOF/TOF 5800 (США). Масс-спектры препарата липида А содержали три группы сигналов, отвечающих фракциям липида А с разной степенью ацилирования – пента- (псевдомолекулярные ионы  $[M - H]^-$  с  $m/z$  1642.18 Да и 1562.16 Да, соответствующие ди- и монофосфорилированной формам), тетра- (1335.94 Да) и триацилированные (1109.73 Да) формы, отличающиеся по массе на 226 Да. Методом ГЖХ был определен жирнокислотный состав ЛПС, который показал присутствие кислот 3-ОН-С16:0, 3-ОН-С14:0 и С12:0 в качестве основных компонентов с приблизительным мольным соотношением 5 : 3 : 1 соответственно. На основании данных ГЖХ и МС было высказано предположение о строении липида А. Углеводный остов исходной формы состоит из двух дифосфорилированных по положениям 1 и 4'  $\beta$ -(1,6)-связанных молекул глюкозамина. Присутствие остатков фосфорной кислоты было подтверждено элементным анализом и характерным элиминированием фрагмента  $PO_3H$  с  $m/z$  80 Да в масс-спектрах. Дисахаридный фрагмент идентичен по строению с липидами А бактерий *Pseudomonas* и *Enterobacteriaceae* [2]. Анализ масс-спектров показал, что N-связанными остатками жирных кислот являются два остатка 3-ОН-С16:0, в то время как два 3-ОН-С14:0 и один С12:0 являются О-связанными.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект 14-04-01658).

1. Fedonenko *et al.* (2013) *Curr. Microbiol.* 67: 234–239.

2. Karunaratne *et al.* (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 299 (2): 368–376.

## СОЗДАНИЕ ПЛЕНОЧНОГО ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ

*Денисова М.Н., Бухарова Е.Н., Рысмухамбетова Г.Е., Карпунина Л.В.*  
Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова.  
Саратов.  
demashka28@mail.ru

Пленочные покрытия находят широкое применение в различных отраслях народного хозяйства: пищевой промышленности, медицине и др. Значительное внимание в последние годы уделяется пленочным покрытиям, созданным на основе полисахаридов микробного происхождения.

Создано пленочное покрытие, где в качестве основного компонента использовали экзополисахарид (ЭПС) *Xanthomonas campestris* В 610/1. Продуцент был получен нами ранее [1] и задепонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов, № ВКМ В-2655D.

Было рассмотрено несколько вариантов состава пленочного покрытия с различным соотношением концентраций полисахаридов (карбоксиметилцеллюлоза и ЭПС *Xanthomonas campestris* В 610/1) в растворе. Подобрано оптимальное соотношение компонентов. Созданное пленочное покрытие имеет хорошие показатели растяжимости; по сравнению с полиэтиленовой пленкой имеет большую толщину, но менее хорошие прочностные показатели; нетоксичное; экологически безопасное [2]; биоразлагаемое.

Разработанное нами пленочное покрытие возможно использовать в пищевых и медицинских целях, а также в качестве влагоудерживающего средства.

1. Рысмухамбетова и др. (2008) *Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова*. 4: 42–45.
2. Денисова и др. (2013) *Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: Мат. Междн. научн.-практ. конф.* 184–185.

## СОСТАВ И СООТНОШЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТАХ ГЛИКОПОЛИМЕРОВ ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИЙ *Azospirillum brasilense* ПРИ ВАРЬИРОВАНИИ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Евстигнеева С.С.<sup>1</sup>, Федоненко Ю.П.<sup>1</sup>, Коннова С.А.<sup>1,2</sup>, Игнатов В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.

<sup>2</sup> Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского. Саратов.  
room308@ibppm.sgu.ru

Капсульные полисахариды и липополисахариды (ЛПС) diaзотрофных грамотрицательных ассоциативных ризобактерий р. *Azospirillum* принимают непосредственное участие в их взаимодействии с различными биотическими и абиотическими факторами окружающей среды.

Проведены исследования состава и соотношения жирных кислот (ЖК) липидов А ЛПС и гликополимеров капсульного материала – липополисахарид-белковых комплексов (ЛПБК) бактерий *A. brasilense* Sp7, Sp245 и SR80, выращенных при варьировании длительности культивирования (24 ч или 120 ч), источника углерода (яблочная кислота или фруктоза), соотношения углерода к азоту (С/Н 3 : 1 или 40 : 1) в жидких средах, а также на агаризованной малатно-солевой среде (72 ч).

Исследуемые модификации условий культивирования трёх штаммов *A. brasilense* показали постоянство качественного состава маркерных ЖК (3-гидрокситетрадекановой, 3-гидроксигексадекановой и октадеценовой) в ЛПС и ЛПБК за одним исключением: впервые установлено, что выращивание бактерий на агаризованной среде индуцирует появление ундекановой кислоты в липидных компонентах ЛПБК. Для штамма SR80 при увеличении продолжительности роста, а также смене источника углерода и повышении С/Н в среде, как в ЛПС, так и в ЛПБК соотношение гидрокси/непредельная ЖК возросло в два и три раза соответственно. Также установлено, что для липидов А ЛПС штаммов Sp7 и Sp245 характерно выравнивание содержания гидрокси- и непредельной ЖК при увеличении продолжительности выращивания до 120 ч, независимо от С/Н и природы источника углерода в среде. Для ЛПБК бактерий *A. brasilense* Sp7, рост которых осуществлялся в среде с фруктозой при С/Н 40 : 1 на протяжении 120 ч, наблюдалось увеличение относительного содержания гидроксикислот по отношению к непредельной ЖК (~9 : 1). Возможно это связано с экскрецией ЛПС в капсульный материал в ходе роста бактерий, в то время как по мере перехода культуры на стационарную фазу развития популяции в мембране происходил биосинтез модифицированного липида А, что указывает на фазу роста культуры, как один из определяющих факторов, который влияет на строение липидного якоря ЛПС азоспирилл.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ (проект 14-04-01658).

## ИММУНОТРОПНЫЕ И АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА СОЛЕЙ ПОЛИ-( $\beta$ -1,4)-2-АМИНО-2-ДЕЗОКСИ-D-ГЛЮКОЗЫ

*Зудина И.В., Шиповская А.Б., Фомина В.И., Островский Н.В.*

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского. Саратов.  
ivzudina@mail.ru

Как показывает медицинская практика, ликвидация инфекционного агента с помощью различных антибактериальных средств не всегда приводит к быстрому и полному выздоровлению. На наш взгляд, фармацевтическое ингибирование или контроль клеточных сигнальных путей развития воспалительной реакции может оказаться более эффективной стратегией при лечении многих заболеваний. В связи с этим исследования были сосредоточены на изучении молекулярных механизмов действия солей поли-( $\beta$ -1,4)-2-амино-2-дезоксид-глюкозы (хитозана) и оценке перспектив их применения в медицине и ветеринарии в качестве активных антимикробных и иммуностимулирующих биоматериалов.

Использовали образцы хитозана с разными среднемолекулярной массой (39 и 200 кДа) и степенью деацетилирования (79 и 82 мольн. %) (ЗАО «Биопрогресс», РФ). Для получения солей хитозана выбраны фармакопейные органические кислоты: аскорбиновая, гликолевая, молочная, уксусная, соляная. Антибактериальную активность полученных солей определяли *in vitro* на модели тест-штаммов грампозитивных и грамотрицательных бактерий. Иммуностимулирующее и противовоспалительное действия изучали *in vivo* на животной модели (белые мыши, крысы, кролики) и в клинике при лечении ран и воспалительных заболеваний различной этиологии. Уровни про- и противовоспалительных цитокинов в биологических жидкостях оценивали методом ИФА.

Исследования солей хитозана *in vitro* выявили штаммовые различия в ингибировании роста бактерий. В экспериментах на животных установлено, что материалы из ацетата хитозана устраняют микробные клетки в местах поранения не только благодаря антимикробным свойствам полимера, но и в результате его способности активировать эффекторы врожденного иммунитета. Показано, что аскорбат-гидрохлорид хитозана обладает ярко выраженным противовоспалительным действием, молекулярный механизм которого, по всей видимости, сходен с таковым у антимикробных поликатионных белков – дефензинов  $\beta$ . Применение данных солей в терапии ряда воспалительных заболеваний слизистых оболочек полости рта и нижнего отдела мочеполового тракта приводило к стремительному снижению уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ ) в биологических жидкостях пациентов, что сопровождалось быстрым купированием воспалительного процесса. Обнаружено, что аскорбат-, гликолят-, лактат- и ацетат-гидрохлорид хитозана способны оказывать разнонаправленные эффекты на реакции клеточного иммунного ответа. Полученные результаты позволяют отнести препараты на основе солей хитозана к группе биомиметических материалов.

## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ-ДИССИПОТРОФОВ

*Кичемазова Н.В., Бухарова Е.Н., Карпунина Л.В.*

Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова.

Саратов.

natali8519@mail.ru

В настоящее время в современной биотехнологии и микробиологии остается актуальной задача поиска новых микроорганизмов-продуцентов экзополисахаридов (ЭПС) с разнообразными, в том числе уникальными свойствами.

Особый интерес у исследователей представляют ЭПС малоизученных бактерий. Одной из таких групп являются бактерии-диссипотрофы. Эти микроорганизмы участвуют в начальной стадии разложения древесины, где концентрация легкодоступных питательных веществ невысока. Культуры диссипотрофных бактерий *Xanthobacter xylophilus* Z-0055 и *Ancylobacter abiegnus* Z-0056 были выделены из гниющей древесины ели Северных болот России в 2009 г. и предоставлены нам лабораторией реликтовых микробных сообществ Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН.

Была проведена оптимизация условий культивирования с целью повышения продукции ЭПС; отработана схема выделения для каждого полисахарида; изучены их некоторые физико-химические и биологические свойства. Показано, что ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 состоит из двух фракций: нейтральной и кислой в равном соотношении с молекулярными массами 10-20 кДа и 30-40 кДа соответственно. Нейтральная фракция ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 представлена глюкозой, галактозой и маннозой в соотношении 1 : 2 : 2, кислая фракция – ксилозой, галактозой и глюкуроновой кислотой в соотношении 2 : 1 : 1. Обнаружено, что ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 имеет в составе: глюкозу, маннозу, галактуроновую кислоту в соотношении 1 : 2 : 2. Молекулярная масса этого ЭПС составила 10-20 кДа. Динамическая вязкость 1% растворов ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 при +25 °С составляет 58 мПа·с и 52 Па·с соответственно. Установлено, что добавление этих ЭПС в питательную среду в концентрации 1 г/л усиливает рост бактерий сходных местообитаний, а в концентрациях 0.25 г/л, 0.5 г/л и 1 г/л оказывают положительный эффект и на рост некоторых других бактерий. ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 проявляют токсичное действие в отношении простейших в концентрации 1 г/л. В дозах 0.06 и 3 г на 1 кг массы тела животного ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 оказывает слаботоксичное действие на белых мышей. ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 относится к практически безвредным веществам, однако в больших дозах (3 г/кг) влияет на лимфо- и кровообращение.

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦЕЛЛОБИОГИДРОЛАЗЫ ИЗ *G. candidum* ЗС

Борисова А.С.<sup>1,2</sup>, Бобров К.С.<sup>1</sup>, Энейская Е.В.<sup>1</sup>, Кульминская А.А.<sup>1,3</sup>, Sandgren M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова. Гатчина.

<sup>2</sup> Шведский сельскохозяйственный университет. Уппсала, Швеция.

<sup>3</sup> Кафедра медицинской физики, Санкт-Петербургский государственный политехнический университет. Санкт-Петербург.

annsbor@gmail.com

Биополимер целлюлоза является основным компонентом клеточных стенок растений и, соответственно, самым распространенным биополимером на земле. В природе деградация целлюлозной биомассы осуществляется сложным комплексом взаимодействующих ферментов. Целлобиогидролазы являются ключевыми ферментами в этой смеси и необходимы для эффективной и быстрой деградации кристаллической целлюлозы.

Данная работа посвящена структурно-функциональным исследованиям целлюлоз-деградирующего фермента (ЕС 3.2.1.176) из грибного штамма *G. candidum* ЗС, эволюционно значительно удаленного от прочих грибных источников, секретирующих ферменты 7-ого семейства гликозидгидролаз. В данном аспекте секвенирование генома *G. candidum* и определение гена, кодирующего данный фермент, представляло собой важную фундаментальную задачу. Структурно-функциональные исследования фермента включили как кристаллизацию белка, решение и анализ структуры фермента, так и биохимические исследования, в ходе которых были получены кинетические параметры реакции гидролиза данным ферментом ряда природных и синтетических субстратов. Трехмерная кристаллическая структура каталитического домена фермента целлобиогидролазы была решена методом молекулярного замещения с использованием 3D-модели целлюлазы из 7-ого семейства, имеющейся в базе данных RCSB PDB (Protein Data Bank), с разрешением 1.7 Å. Основываясь на полученных данных, а также на результатах секвенирования генома *G. candidum* ЗС, был определен ген целлобиогидролазы, имеющий размер 4708 п.н. Ген включал в себя 1 интрон размером 66 п.н. и кодировал фермент целлобиогидролазу, состоящую из 536 аминокислот, включая сигнальный пептид размером 17 аминокислот. На основе структурных и биохимических исследований, представленных в работе, фермент целлобиогидролаза из *G. candidum* ЗС оказался весьма эффективным по сравнению с опубликованными данными по активности иных целлобиогидролаз 7-ого семейства.

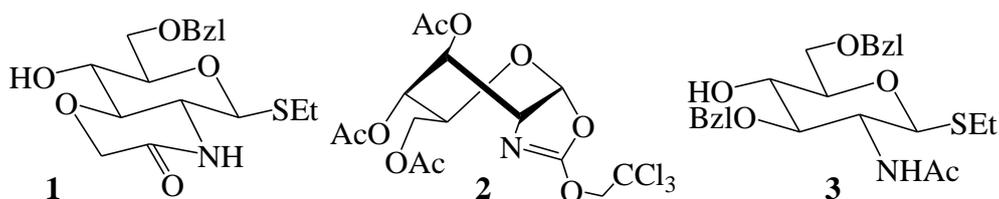
Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-08-01041-а).

## НОВОЕ РЕАКЦИОННОСПОСОБНОЕ 4-ОН ГЛИКОЗИЛ-АКЦЕПТОРНОЕ ПРОИЗВОДНОЕ D-ГЛЮКОЗАМИНА

*Пертель С.С., Ульянов С.А., Серый С.А., Какаян Е.С.*

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского. Симферополь.  
sergepertel@yahoo.com

Гликозил-акцепторные производные на основе N-ацетил-D-глюкозамина, в особенности 4-ОН гликозил-акцепторы, проявляют чрезвычайно низкую реакционную способность по сравнению с соответствующими производными нейтральных сахаров [1]. Поскольку реакционноспособные 4-ОН гликозил-акцепторные производные D-глюкозамина необходимы для получения широкого ряда биологически важных олигосахаридов, в частности хитоолигосахаридов и гликопептидных фрагментов бактериального пептидогликана, в последнее время было предложено несколько подходов к синтезу подобных акцепторов. Crich *et al.* [2] впервые синтезировали оксазолидинон-защищенные производные N-ацетил-D-глюкозамина и продемонстрировали их высокую реакционную способность в качестве 4-ОН гликозил-акцепторов. Для изучения взаимосвязи между структурой и реакционной способностью подобных углеводных спиртов, а также для получения нового активного гликозил-акцептора, мы попробовали синтезировать 4-ОН производное D-глюкозамина **1**, содержащее циклическую N-защитную группу, имеющую структуру лактама нормурамовой кислоты. Для оценки реакционной способности этого акцептора мы использовали трихлорэтоксидоксазолин **2**, являющийся реакционноспособным гликозил-донором в условиях протонного катализа [3]. Показано, что гликозил-акцептор **1**, в отличие от N-ацетилированного акцептора **3**, легко взаимодействует с донором **2** в присутствии перхлората симм-коллиндиния в практически нейтральной среде при комнатной температуре, образуя соответствующий  $\beta(1\rightarrow4)$ -связанный дисахарид с высоким выходом. Эти результаты свидетельствуют о том, что циклические N-защитные группировки лактамного типа могут эффективно использоваться для получения высокорекционноспособных 4-ОН гликозил-акцепторных производных D-глюкозамина.



1. Crich *et al.* (2001) *J. Am. Chem. Soc.* 123: 6819–6825.
2. Crich *et al.* (2003) *Org. Lett.* 5: 1297–1300.
3. Pertel *et al.* (2012) *Carbohydr. Res.* 356: 172–179.

## БИБЛИОТЕКА АМИНИРОВАННЫХ ФУКООЛИГОСАХАРИДОВ

*Пискарев В.Е.<sup>1</sup>, Лихошерстов Л.М.<sup>2</sup>, Новикова О.С.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН.  
Москва.

<sup>2</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

piskarev@ineos.ac.ru

Действием карбамата аммония на серию фукоолигосахаридов (ФОС) грудного молока (2'-фукозиллактоза, 3-фукозиллактоза, дифукозиллактоза, лакто-N-фукопентаозы I, II и III, лакто-N-дифукогексаозы I и II, монофукозиллакто-N-гексаозы I, II и III, дифукозиллакто-N-гексаозы a, b и c, дифукозиллакто-N-неогексаоза, дифукозил-*пара*-лакто-N-гексаоза, дифукозил-*пара*-лакто-N-неогексаоза, монофукозил(1-2)*изо*лакто-N-октаоза, монофукозил(1-3)*изо*лакто-N-октаоза, дифукозил(1-2,1-2)*изо*лакто-октаоза)

были получены соответствующие  $\beta$ -гликозиламины. После ацилирования активированными эфирами N-t-BOC-Gly или Cbz-Gly и снятия защиты были выделены индивидуальные ФОС-Gly в миллиграммовых количествах с выходом 70-80%. Аналогично были получены другие производные.

Из главного двухантенного десиализованного ( $\alpha$ 1-6)-фукозилированного N-гликана – NA2F-Gly.

Из N-дисахарида Fuc $\alpha$ 1-2Gal были получены глицильные производные, соответствующие четырем изомерам дисахарида ( $\alpha/\beta$ -фуранозы и  $\alpha/\beta$ -пиранозы).

Из синтетических ФОС Fuc $\alpha$ 1-6GlcNAc, Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc и Fuc $\alpha$ 1-[Fuc $\alpha$ 1-3]-6GlcNAc были получены Fuc $\alpha$ 1-6GlcNAc $\beta$ 1-Gly, Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-Gly и Fuc $\alpha$ 1-[Fuc $\alpha$ 1-3]-6GlcNAc $\beta$ 1-Gly, моделирующие фукозилированный узел связи ряда N-гликопротеинов животных, растений и насекомых соответственно.

Настоящая библиотека включает около 30 аминированных ФОС, содержащих основные фукоантигены – H, H тип 1, H тип 6, Le<sup>a</sup>, Le<sup>x</sup>, Le<sup>b</sup>, глюкоаналоги Le<sup>x</sup> и Le<sup>y</sup>, их различные двумерные и кластерные формы, а также фукозилированные фрагменты кора N-гликанов, и может найти разнообразное применение для исследования фуколектинов. Часть этих производных использовали для изучения норовирусов [1].

Модификацией нефукозилорванных коровых олигосахаридов грудного молока (лактоза, лакто-N-тетраоза, лакто-N-неотетраоза, лакто-N-гексаоза, лакто-N-неогексаоза, лакто-N-изооктаоза) были получены аналогичные глицильные производные, которые могут быть использованы для анализа галектинов.

1. Shang *et al.* (2013) *Glycobiology*. 23(12): 1491–1498.

## **ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА ORAQUE-2 НА СИНТЕЗ КРАХМАЛА В ЗЕРНЕ КУКУРУЗЫ**

*Плотников В.К., Рядчиков В.Г.*

Кубанский государственный аграрный университет. Краснодар.  
vkrbio21@mail.ru

Важнейшей проблемой животноводства России является недостаточная сбалансированность кормов по незаменимым аминокислотам. В первую очередь это касается зерна кукурузы, запасные белки которой практически не содержат лизина и триптофана. Выход из этой ситуации представляется возможным путём использования в селекции растений мутаций, изменяющих белковый и аминокислотный состав зерна [1].

В 2014 году исполняется 50 лет исследованию биохимических и молекулярно-биологических механизмов формирования высоколизинового синдрома в зерне кукурузы под влиянием мутации регуляторного гена *oraque-2*. За эти годы в разных странах мира исследователями выделены и секвенированы многие гены запасных белков кукурузы – зеинов, сам ген *oraque-2*, гены многих ферментов, в том числе и ответственных за синтез крахмала. Показано, что нарушение синтеза крахмала приводит к снижению синтеза запасных белков, что вероятно связано с отрицательным влиянием свободной сахарозы на стабильность мембраносвязанных полисом, синтезирующих зеин в созревающем зерне [2].

Эта мутация определяет существенное повышение содержания лизина и триптофана в зерне кукурузы и соответственное улучшение его питательных свойств. Однако практическое использование высоколизинового кукурузы затруднено в связи с ухудшением физических свойств зерна новой кукурузы, которые в значительной мере определяются количеством и качеством крахмала. В зерне мутанта *oraque-2* снижена активность ряда ферментов как осуществляющих превращение лизина в глутамин, так и синтеза крахмала, что, по нашему мнению, связано со значительным снижением времени жизни короткоживущих мРНК этих ферментов в условиях повышенной РНК-азной активности, имеющей место в зерне мутанта. Это обуславливает: с одной стороны – повышение питательных свойств зерна, но с другой стороны – ограничивает возможности длительного хранения зерна в связи с его ломкостью и высокой степенью поражаемости бактериями и грибами [2].

Дальнейшие исследования взаимосвязи синтеза крахмала и запасных белков в созревающем зерне помогут найти альтернативные пути улучшения питательности зерна кукурузы.

1. Рядчиков В.Г. и др. (2013) *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. 88:433–472.
2. Плотников В.К. (2009) *Биология РНК зерновых культур*, 375 с.

## КАКОВА РОЛЬ ВОДОРАСТВОРИМОГО КРАХМАЛА В ФОРМИРОВАНИИ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ?

*Евтушенко Я.Ю., Салфетников А.А., Ренко Н.В., Плотников В.К.*

Кубанский государственный аграрный университет. Краснодар.

vkrbio21@mail.ru

Экспериментально установлена взаимосвязь между морозоустойчивостью сортов озимого ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и водоудерживающей способностью (гигроскопичностью) шрота зрелого ячменя. На примере более 50 сортов показано, что чем выше морозоустойчивость сорта, тем меньший объём надосадочной жидкости может быть получен при экстракции шрота ячменя раствором, содержащим катионы магния ( $Mg^{++}$ ) [1].

Результаты сравнительных исследований морозоустойчивости по степени выживания растений при промораживании в морозильных камерах и по степени гигроскопичности зрелого зерна показали, что эти два метода оценки морозоустойчивости дают весьма близкие данные. Вместе с тем, по простоте и низким экономическим затратам предлагаемый метод оценки морозоустойчивости существенно превосходит метод прямого промораживания растений [2].

У сортов озимой мягкой пшеницы подобной выраженной закономерности не наблюдалось, что, вероятно, объясняется разными молекулярными механизмами формирования морозоустойчивости растений пшеницы и ячменя. Анализ научной литературы показал [3], что повышенная гигроскопичность шрота зерна ячменя, вероятно, связана с относительно высоким содержанием в его зерне так называемого «водорастворимого крахмала» – полисахаридов  $\beta$ -(1,3; 1,4)-D-глюканов. Они являются главным растворимым компонентом пищевых волокон зерновых культур. По их содержанию ячмень и овёс являются рекордсменами среди культурных зерновых злаков. Величина этого показателя качества зерна у пшеницы и ячменя составляет, соответственно 0,6 и 4,2%. Этим, вероятно, и объясняется обнаруженное нами различие по гигроскопичности шрота зерна пшеницы и ячменя. Целое зерно ячменя в среднем содержит 3–9%  $\beta$ -глюканов.

По-видимому, именно способность растений определённого генотипа (сорта) к синтезу и накоплению  $\beta$ -глюканов определяет их морозоустойчивость, так как повышенное содержание водорастворимого крахмала в цитоплазме клеток вегетирующего растения снижает температуру замерзания воды. Эти особенности растений отражаются на содержании  $\beta$ -глюканов в зрелом зерне. Исследования в этом направлении позволят понять природу морозоустойчивости озимого ячменя.

1. Плотников и др. (2012) *Физиология растений*. 2: 316–319.
2. Плотников и др. (2013) Патент РФ № 2479991.
3. Полонский, Сумина // <http://www.kgau.ru/konferenc/2010/b4.doc>.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО СПОСОБА ЭКСТРАКЦИИ ПЕКТИНОВ ИЗ БОРЩЕВИКА СОСНОВСКОГО *Heracleum Sosnovskyi*

Пономарева С.А., Головченко В.В., Патова О.А., Витязев Ф.В., Оводов Ю.С.

Институт физиологии, Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.

Ponomareva.Svetlana.88@mail.ru

Борщевик Сосновского *Heracleum Sosnovskyi* в 70–80 гг. культивировали как силосную культуру. Он получил широкое повсеместное распространение. Впоследствии от его применения в сельском хозяйстве отказались, и растение постепенно переместилось в дикую природу, засеая берега водоемов, пустыри, полосы отвода дорог, необрабатываемые участки полей. Пока единственным методом борьбы с растением является его уничтожение. Однако было показано, что в состав борщевика входят ценные компоненты, в частности, в его составе обнаружены пектины, обладающие противовоспалительной активностью. Их содержание в растении достигает 10%, поэтому борщевик вполне может служить прекрасным материалом для получения физиологически активных биополимеров. Для разработки оптимального метода экстракции пектинов из борщевика, позволяющего получить конечный продукт с максимальным выходом и с наименьшим количеством сопутствующих примесей, использовали свежую, сухую, замороженную биомассу, варьировали условиями экстракции: температурой, рН, продолжительностью процесса. Экстракция включала несколько последовательных этапов: предварительную обработку биомассы формалином для удаления пигментов, кумаринов и ряда примесей; обработку биомассы раствором соляной кислоты для разрушения связей в протопектине образованных посредством катионов поливалентных металлов; экстракцию пектинов водным раствором оксалата аммония. В результате установлено, что выходы пектинов из свежей биомассы составляют от 7 до 10%, из сухой – от 5 до 7% , из замороженной – от 3 до 5% при рН раствора соляной кислоты 0.7 и 4.0 соответственно. Показано, что увеличение температуры при предварительной обработке биомассы и продолжительность экстракции не влияют на выход и на состав экстрагируемых фракций. Пектины, полученные из свежей и сухой биомассы, характеризуются гомогенностью, высокой молекулярной массой  $M_w$  более 300 кДа, высокими значениями характеристической вязкости растворов  $[\eta] = 1.8 \text{ см}^3/\text{г}$ . Из сухой и замороженной биомассы экстрагируется большое количество неорганических примесей, содержание которых достигает 2% и белковых компонентов (до 5%). Для всех фракций характерна низкая степень метилэтерификации остатков галактуроновой кислоты (не более 13).

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, Программы интеграционных проектов фундаментальных научных исследований проект № 12-И-4-2052, гранта РФФИ № 12-14-00150.

## ГЛИКОЗИЛ-1-ФОСФАТНЫЕ ПОЛИМЕРЫ АКТИНОМИЦЕТОВ

Потехина Н.В.<sup>1</sup>, Стрешинская Г.М.<sup>1</sup>, Тульская Е.М.<sup>1</sup>, Шашков А.С.<sup>2</sup>,  
Сенченкова С.Н.<sup>2</sup>, Дмитренко А.С.<sup>2</sup>, Барышникова Л.М.<sup>3</sup>, Дорофеева Л.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Москва.

<sup>2</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

<sup>3</sup> Институт физиологии и биохимии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Пущино-на-Оке.  
potekhina56@mail.ru

В клеточных стенках актиномицетов помимо широко распространенных тейхоевых кислот иногда встречаются фосфатсодержащие полимеры другой природы – поли(гликозилфосфаты) (ГФП). ГФП содержат в повторяющемся звене дисахаридфосфат, в котором одним из мономеров является N-ацетилованный остаток аминасахарида. К настоящему времени эти полимеры найдены у небольшой группы видов актиномицетов:

◆ -6)-β-D-ManpNAc-(1→3)-α-D-GlcpNAc-(1-P-, у *Actinoplanes* sp. ИНА 3697;

◆ -6)-α-D-GlcpNH<sub>2</sub><sup>+</sup>-(1→6)-α-D-GlcpNAc-(Б 1-P-, у ряда стрептомицетов группы *Streptoverticillium*;

◆ -6)-α-D-Galp-(1→6)-α-D-GlcpNAc-(1-P-, у *Streptomyces thermoviolaceus* ВКМ Ас-1857<sup>T</sup> и группа штаммов *S. coelicolor*;

◆ два различных по структуре ГФП – с разветвленным и линейным повторяющимся звеном: -4)-α-[β-D-GlcpNAc-(1→3)]-D-Glcp-(1-P- и -4)-β-D-GlcpNAc-(1→6)-α-D-GlcpNAc-(1-P- (часть β-GlcpNAc несёт по ОЗ остатки янтарной кислоты) соответственно, у *Brevibacterium linens* ВКМ Ас-2159;

◆ -6)-α-D-GalpNAc-(1→6)-α-D-GlcpNAc-(1-P-, у *Arthrobacter protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>T</sup> и *A. crystallopoietes* ВКМ Ас-1107<sup>T</sup>;

◆ -6)-β-D-GlcpNAc-(1→3)-α-D-Galp-(1-P- у *Arthrobacter* sp. ВКМ Ас-2549 и ВКМ Ас-2550;

◆ необычный полимер поли(гексасахарид-1-фосфат) из клеточной стенки *Arthrobacter uratoxydans* ВКМ Ас-1979<sup>T</sup> сочетал особенности ГФП и тейхуроновой кислоты: -6)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Manp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→4)-α-D-GlcpNAc-6-OAc<sub>(0,7)</sub>-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→4)-α-D-GlcpA-(1-P-.

ГФП могут являться единственным полимером клеточной стенки (стрептовертициллы), но, как правило, присутствуют наряду с тейхоевыми или тейхулозоновыми кислотами. ГФП рассматриваются как аналоги тейхоевых кислот и, возможно, в связи с этим редко встречаются в клеточных стенках актиномицетов.

Работа поддержана грантом РФФИ (13-04-00447).

## ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНА *Paenibacillus polymyxa* НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ ЖИВОТНЫХ

Проскуракова М.В.<sup>1</sup>, Карпунина Л.В.<sup>1</sup>, Сметанина М.Д.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Саратов.

<sup>2</sup> Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского. Саратов. proma89@mail.ru

Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), играя важную роль в нормальном функционировании клетки, выступают как клеточные звенья ответной реакции организма на стрессорные состояния. Исследования последних лет свидетельствуют, что лектины, и, в частности, бактериальные лектины, оказывают существенное влияние на метаболизм живой клетки, обладая иммуномодулирующим, противоопухолевым, митогенным действием. Изучали влияние лектина ЛШ *Paenibacillus polymyxa* 1460 на антиоксидантную систему самцов белых крыс при стрессировании плаванием. Лектин ЛШ вводили крысам по 2 мкг на животное интраперитонеально в течение 3 суток. Через сутки после введения лектина применяли тест принудительного не избегаемого плавания («forced swimming») при температуре воды 25 °С, регистрируя время плавания животных.

Было установлено, что интенсивная физическая нагрузка (плавание) приводит к активации процессов ПОЛ. Происходило снижение количества первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов на 20%, с одновременным нарастанием концентрации малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах. Наряду с этим наблюдалось снижение активности каталазы и пероксидазы на 41% и 30% соответственно относительно показателей контрольной группы животных. При предварительном введении крысам лектина происходило восстановление содержания МДА и увеличение активности каталазы после плавания.

Таким образом, данные результаты позволяют говорить о том, что лектин ЛШ *P. polymyxa* 1460 благоприятно воздействует на организм животных, приводя показатели ПОЛ при плавании к норме, проявляет антиоксидантные свойства и способствует устойчивости организма в условиях стресса.

## АКТИВИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ НА ИОННЫЕ КАНАЛЫ НЕЙРОНАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ

Прошева В.И., Вислобоков А.И.<sup>1</sup>

Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.

V.Prosheva@physiol.komisc.ru

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова. Санкт-Петербург.

vislobokov@yandex.ru

Изучали влияние растительных полисахаридов из пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L. (пектиновый полисахарид танацетан), из каллусной культуры смолевки обыкновенной *Oberna behen* (L.) I (кислый арабиногалактан и пектиновый полисахарид силенан), из каллусной культуры ряски малой *Lemna minor* L. (арабиногалактан и пектиновый полисахарид лемнан), из лука репчатого *Allium cepa* L. (пектиновый полисахарид аллиуман) на ионные каналы мембраны изолированных нервных клеток моллюска *Lymnaea stagnalis*. Использовали метод фиксации потенциала. Установлено, что изученные полисахариды в концентрациях 0.1–100 мкг/мл неизбирательно активируют выходящий калиевый и входящие натриевый и кальциевые ионные токи (слабо дозозависимо и обратимо увеличивают их амплитуду на 2–10%). Изученные вещества не изменяют кинетику развития ионных токов. Отсутствие избирательности действия исследованных соединений позволяет говорить о неспецифическом механизме активации ими ионных токов мембраны нейронов.

## ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ФЛАГЕЛЛИНОВ ГАЛОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ

Пятибратов М.Г., Сюткин А.С., Федоров О.В.

Институт белка РАН. Пушкино.

bratov@vega.protres.ru

Гликопротеин S-слоя и флагеллины галоархей были первыми белками прокариот, для которых было продемонстрировано наличие гликозилирования. В дальнейшем гликозилирование было обнаружено и среди бактериальных белков, однако эта посттрансляционная модификация гораздо более распространена среди архей, чем у бактерий [1]. В настоящее время известны полные геномные последовательности более 90 галофильных архей, однако структура ассоциированных с флагеллинами углеводов определена только для *Halobacterium salinarum* и *Haloferax volcanii*. В обоих случаях наблюдалось N-гликозилирование, однако структура связанных гликанов существенно отличается [2]. Нарушение гликозилирования флагеллинов *H. volcanii* приводит к прекращению синтеза жгутиков [3]. Подавляющее большинство аминокислотных последовательностей известных архейных флагеллинов содержат канонические сайты N-гликозилирования N-X-S(T). Мы исследовали субъединичный состав жгутиков ряда галофильных архей (*Natrialba magadii*, *Halorubrum lacusprofundi*, *Halorubrum saccharovororum*, *Haloarcula hispanica*, *Haloarcula marismortui*) и методами специфического окрашивания показали наличие гликозилирования их флагеллинов [4]. Интересно, что аминокислотные последовательности флагеллинов *H. hispanica* и *H. marismortui* не содержат канонических сайтов N-гликозилирования. Однако по результатам окрашивания реагентом Шиффа и CNH-анализа эти белки гликозилированы. Возможно, что в данном случае имеет место N-гликозилирование по неканоническим сайтам. Описаны случаи нестандартного гликозилирования у эукариот [5], но для архей подобные факты пока не известны. Возможно также гликозилирование по O-типу: в случае подтверждения это будет первым подобным случаем для флагеллинов архей. Мы идентифицировали несколько форм флагеллина *H. lacusprofundi*, соотношение между которыми изменяется в зависимости от температуры культивирования. Мы полагаем, что различия между этими формами связаны с различным гликозилированием, а их наличие может быть необходимым для спирализации филамента жгутика.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-01604-а.

1. Yurist-Doutsch *et al.* (2008) *Mol. Microbiol.* 68: 1079–1084.
2. Jarrell *et al.* (2010) *Int. J. Microbiol.* Article ID 470138.
3. Tripepi *et al.* (2012) *J. Bacteriol.* 194: 4876–4887.
4. Сюткин и др. (2012) *Микробиология.* 81: 620–629.
5. Valliere-Douglass *et al.* (2010) *J. Biol. Chem.* 285: 16012–16022.

## ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ГЛЮКАНТРАНСФЕРАЗЫ Bgl2p ИЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae* К ФИБРИЛЛООБРАЗОВАНИЮ

*Рекстина В.В.*<sup>1</sup>, *Безсонов Е.Е.*<sup>1</sup>, *Гроенинг М.*<sup>2</sup>, *Галзитская О.В.*<sup>3</sup>, *Зиганшин Р.Х.*<sup>4</sup>, *Кудряшова И.Б.*<sup>1</sup>, *Кузнецов С.А.*<sup>5</sup>, *Калейбина Т.С.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет. Москва.

<sup>2</sup> Department of Pharmacy, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen. Copenhagen.

<sup>3</sup> Институт белка Российской академии наук. Пущино.

<sup>4</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Москва.

<sup>5</sup> Institute of Biological Science, University of Rostock. Rostock.  
vrexтина@gmail.com

Глюкантрансфераза Bgl2p – мажорный, консервативный, конститутивный белок клеточной стенки (КС) многих видов дрожжей [1], является одним из основных ферментов, формирующих глюкановый каркас КС [2]. Известно, что Bgl2p способен формировать амилоидные фибриллы [3], и очень прочно удерживается в КС, возможно, за счёт образования сети таких фибрилл. В настоящий момент отсутствуют данные о наличии корреляции между процессом амилоидообразования Bgl2p и его способностью удерживаться в КС. Используя пептиды, синтезированные согласно предсказанным нами амилоидогенным аминокислотным последовательностям Bgl2p, как модельную систему для изучения амилоидообразования белка, нами был разработан новый способ экстракции исследуемой глюкантрансферазы из КС *S.cerevisiae* [4]. В сообщении будут представлены данные по динамике экстракции Bgl2p из КС с течением времени, влияние на этот процесс компонентов экстрагирующего раствора, значений рН и температуры экстракции, характеризующие этот способ. С использованием методов конфокальной флуоресцентной и трансмиссионной электронной микроскопии будут показаны особенности морфологии фибрилл Bgl2p при разных значениях рН. Полученные в работе данные свидетельствуют о наличии положительной корреляции между процессом амилоидообразования и способностью Bgl2p удерживаться в КС.

Работа поддержана грантом РФФИ (10-04-01821).

1. Klebl, Tanner (1989) *J. Bacteriol.* 171: 6259–6264.
2. Плотникова и др. (2006) *Доклады академии наук.* 409: 828–831.
3. Kalebina *et al.* (2008) *Prion.* 2(2): 91–96.
4. Bezsonov *et al.* (2013) *Prion.* 7(2): 175–184.

## **ВЛИЯНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИ- И ОЛИГОСАХАРИДОВ НА СОСТАВ ПОВЕРХНОСТНОГО И ЭКСТРАКЛЕТОЧНОГО ПРОТЕОМОВ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ *Arabidopsis thaliana* (Heynh.)**

Галицкая А.А., Наумова Т.С., Орлов В.П., Селиванова О.Г., Селиванов Н.Ю., Соколова М.К., Соколов О.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.

Несмотря на бурное развитие протеомики, наименее исследованным аспектом действия пектиновых поли- и олигосахаридов является динамика протеома поверхности растительных клеток в ответ на их воздействие. Основной методической проблемой анализа экстраклеточного протеома является сложность количественного выделения белков без контаминации внутриклеточными полипептидами.

Разработанный нами метод экстракции с использованием дезоксихолата натрия показал высокую эффективность и для выделения полипептидов экстраклеточного и поверхностного протеомов из суспензионной культуры растительных клеток *Arabidopsis thaliana* (Heynh.). Метод позволяет количественно экстрагировать и преципитировать экстраклеточные минорные белки, присутствующие в низких концентрациях (1–2 нг/мл), а также экстрагировать полипептиды, ассоциированные с матриксом клеточной стенки без дегградации плазмалеммы растительных клеток.

Исследовано влияние пектиновых полисахаридов различного состава и структуры на спектр поверхностных и экстраклеточных белков суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana* (Heynh.).

Показаны изменения в полипептидном спектре как поверхностных, так и экстраклеточных белков. При культивировании в присутствии галактуроновой кислоты отмечается снижение концентрации поверхностных полипептидов, но не наблюдается качественного изменения в белковом спектре. При культивировании в присутствии олигосахаридов спектр как экстраклеточных, так и поверхностных полипептидов суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana* (Heynh.) демонстрирует уменьшение и общей концентрации белков, и количества полипептидов в спектре. Вероятно, это связано с проявлением ингибирующего действия пектиновых олигосахаридов как физиологических медиаторов растительных клеток.

## **ДИНАМИКА СОСТАВА ПОВЕРХНОСТНЫХ И ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ КЛЕТОК РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ *Azospirillum brasilense* ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИ- И ОЛИГО-САХАРИДОВ.**

Галицкая А.А., Наумова Т.С., Орлов В.П., Селиванова О.Г., Селиванов Н.Ю., Соколов О.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.

Проведен сравнительный анализ различных методов мягкой экстракции поверхностных белков ассоциативных бактерий *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7 и Sp245. Показано, что дезоксихолат Na позволяет количественно экстрагировать поверхностные белки, ассоциированные с поверхностью бактериальных клеток, и обеспечивает при этом сохранение их нативности в процессе длительной экстракции.

Полученные препараты поверхностных белков позволяют надежно идентифицировать разные штаммы *A. brasilense*, как по набору доминирующих полипептидов, так и по минорным компонентам. Использование дезоксихолата Na позволило получить и анализировать препараты экстраклеточных полипептидов из культуральной среды даже при очень низких концентрациях полипептидов (0,1–1 мкг/мл).

Проведено исследование влияния пектиновых поли- и олиго-сахаридов на спектр поверхностных и экстраклеточных белков ризосферных бактерий *A. brasilense*. Для этого бактерии рода *Azospirillum*, штаммы Sp7 и Sp245, выращивали в колбах на минеральной среде в присутствии углеводных эффекторов в течение суток. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые без добавления эффекторов.

Показано выраженное ингибирующее действие пектиновых поли- и олиго-сахаридов на рост культур бактерий *A. brasilense* штамма Sp245. Препараты высокополимерного цитрусового пектина и олигосахариды вызывали значительное снижение продукции поверхностных полипептидов у штамма Sp245. Выявлена специфическая стимуляция биосинтеза отдельных полипептидов в присутствии моногалактуроновой кислоты. Кроме того, изменения наблюдались и в полипептидном спектре экстраклеточных белков. Исследованные штаммы бактерий продемонстрировали качественно различные изменения на воздействие пектиновых компонентов.

Важно отметить различное влияние препаратов нативного пектина и полигалактуроновой кислоты на состав поверхностных и экстраклеточных белков клеток бактерий. Предположительно, основой различий активности пектиновых полимеров может являться присутствие в их структуре нейтральных олигосахаридов и этерифицированной формы галактуроновой кислоты. В то время как различие эффектов вызываемых ими может определяться различием механизмов рецепции моногалактуроновой кислоты и пектиновых поли- и олигосахаридов клетками бактерий.

## НОВЫЕ ПУТИ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДИВЕРСИФИКАЦИИ О-АНТИГЕННЫХ ФОРМ *Shigella flexneri* – ВОЗБУДИТЕЛЯ ШИГЕЛЛЕЗА

Сенченкова С.Н.<sup>1</sup>, Шашков А.С.<sup>1</sup>, Книрель Ю.А.<sup>1</sup>, Ху J.<sup>2</sup>, Sun Q.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

<sup>2</sup> National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, China CDC. Changping. Beijing. China.

sen@ioc.ac.ru

Ежегодно в мире регистрируется 164.7 млн. случаев бактериальной дизентерии или шигеллеза с 1.1 млн. смертельных исходов. Болезнь, вызываемая шигеллами Флекснера (до 60% всех шигеллезов), является одной из самых распространенных бактериальных кишечных инфекций в мире. Серологическая гетерогенность шигелл Флекснера определяется вариациями строения О-антигена (полисахаридной цепи липополисахарида). У большинства грамотрицательных бактерий разнообразие О-антигенных форм, рассматриваемое как один из факторов вирулентности, обусловлено полиморфизмом генного кластера их биосинтеза, однако у шигелл Флекснера имеется только два типа генных кластеров и соответственно две базовые структуры О-антигена: одна для серотипа 6 и другая для остальных 15 серотипов (1a-5a, 1b-5b, 1c=7a, 1d, 7b, X и Y). Многообразие О-антигенов во второй группе связано с участием в их биосинтезе генов семи профагов, модифицирующих базовую структуру  $\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{III}}-(1\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{II}}-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{I}}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow$  путем О-ацетилирования остатка Rha<sup>I</sup> в положение 2 и/или глюкозилирования одного или двух моносахаридов в различные положения.

Мы обнаружили два новых типа структурной модификации О-антигена шигелл Флекснера: О-ацетилирование остатка Rha<sup>III</sup> в положение 3 (основной вариант) или 4 (минорный вариант) и фосфорилирование фосфоэтанолламином остатков Rha<sup>II</sup> и/или Rha<sup>III</sup> в положение 3. О-Ацетилирование Rha<sup>III</sup> зависит от гена *oacB*, который является гомологом гена *oacA*, ответственного за О-ацетилирование Rha<sup>I</sup>, однако находится не в профаге, а рядом с ним в транспозон-подобной структуре. Полиморфный ген, кодирующий фосфоэтанолламин-трансферазу для фосфорилирования остатков Rha<sup>II</sup> и Rha<sup>III</sup>, найден в плазмиде длиной 6,85 п.н. Эти подвижные генетические элементы опосредуют новые дополнительные механизмы сероконверсии шигелл Флекснера. Серологический скрининг с помощью а) полученной нами абсорбированной антисыворотки к О-фактору 9, связанному с 3/4-О-ацетилированной Rha<sup>III</sup>, и б) моноклонального антитела IV-1 (Reagensia AB, Швеция), узнающего, как показано нами, 3-(2-аминоэтилфосфо)-рамнозу, выявил широкую распространенность О-антигенов с новыми типами модификаций среди клинических изолятов шигелл Флекснера. На основании этих данных предложено расширить схему типирования шигелл Флекснера до 23 серотипов, добавив в нее три серотипа с фосфорилированными антигенами (4av, Xv и Yv) и разбив серотипы 1a, 2a, 5a и Y на О-фактор 9-положительные и -отрицательные сероварианты.

# СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ *Azospirillum brasilense*, СОДЕРЖАЩИХ 3-АЦЕТАМИДО-3-ДЕЗОКСИФУКОЗУ

*Сигида Е.Н.<sup>1</sup>, Федоненко Ю.П.<sup>1</sup>, Шашков А.С.<sup>2</sup>, Здоровенко Э.Л.<sup>2</sup>,  
Коннова С.А.<sup>1</sup>, Игнатов В.В.<sup>1</sup>, Книрель Ю.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.

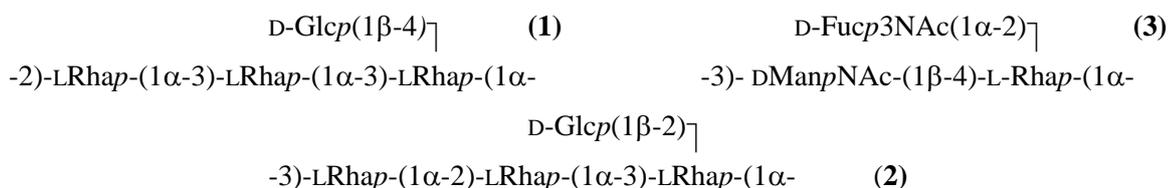
<sup>2</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

<sup>3</sup> Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского. Саратов.  
si\_elena@mail.ru

Свободноживущие почвенные бактерии рода *Azospirillum* являются ассоциантами важнейших кормовых и злаковых культур. Непосредственное участие в образовании ассоциаций принимают углеводсодержащие гликополимеры бактерий, в том числе липополисахариды (ЛПС), преобладающие во внешнем слое наружной мембраны.

В результате мягкой кислотной деградации ЛПС бактерий *A. brasilense* Sp246, SpBr14 и Jm125A2 и последующей гель-фильтрации на Sephadex G-50 были получены О-специфические полисахариды (ОПС).

На основании анализа моносахаридного состава, абсолютных конфигураций сахаров, ГЖХ-масс-спектрометрии, 1D и 2D <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C спектроскопии ЯМР было установлено, что ОПС исследуемых культур характеризовались наличием двух типов повторяющихся звеньев (ОПС I и ОПС II), причем структуры ОПС у штаммов Sp246 и SpBr14 были идентичны. ОПС I изучаемых бактерий представляли собой глюкорамнаны (**1** – в ОПС Sp246 и SpBr14; **2** – в ОПС Jm125A2), распространенные у азоспирилл, отнесенных к серогруппе III [1]. Ранее наличие повторяющегося звена **1** было установлено для ОПС *A. brasilense* 54, а звена **2** – для ОПС *A. brasilense* S17. Характерной особенностью ОПС II обоих штаммов являлось наличие латеральной Fuc3NAc, обнаруженной в ОПС азоспирилл впервые, однако часто встречающейся в составе таковых у почвенных бактерий *Pseudomonas syringae* [2]. Структура **3** ОПС II *A. brasilense* Sp246 и SpBr14 была установлена после распада по Смитсу исходного ОПС. Структура ОПС II штамма Jm125A2 к настоящему моменту не определена, однако в его составе выявлены GlcNAc и Rha, помимо Fuc3NAc.



Работа поддержана грантом РФФИ (14-04-01658).

1. Федоненко и др. (2011) *Биохимия*. 76 (7): 967–982.
2. Здоровенко и Здоровенко. (2010) *Микробиология*. 79 (1): 52–62.

## ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ НА ПОЛИСАХАРИДНЫЕ АНТИГЕНЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ КОЛОНИЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ РИЗОБАКТЕРИЙ ПРИ КОМБИНИРОВАННОЙ ИНОКУЛЯЦИИ ИМИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

*Трегубова К.В., Бурыгин Г.Л., Егоренкова И.В., Матора Л.Ю., Игнатов В.В.*  
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.  
room406@ibppm.sgu.ru

В последние десятилетия для стимуляции роста и повышения урожая с/х растений широко применяется комбинированная инокуляция ассоциативными бактериями, обладающими высокой азотфиксирующей активностью, устойчивостью к условиям внешней среды и конкурентоспособностью по отношению к естественной микрофлоре. Ключевым моментом в установлении ассоциативных взаимоотношений в системе «растение-микроорганизм» является этап колонизации корней бактериями. Выявляющие системы на основе специфичных антител (Ат) представляют собой весьма удобное средство мониторинга разнообразных микроорганизмов.

Цель данной работы состояла в оценке способности бактерий *Paenibacillus polymyxa* 1465 и *Azospirillum brasilense* Sp245 к колонизации корней в условиях совместной инокуляции ими проростков пшеницы с использованием поликлональных антител на ЭПС<sub>1465</sub> и ЛПС<sub>245</sub>.

Методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с Ат на ЭПС<sub>1465</sub> и ЛПС<sub>245</sub> исследована динамика численности данных бактерий на корнях при комбинированной инокуляции проростков пшеницы *Triticum aestivum* сорта Саратовская 29. Ранее ИФА успешно применялся для выявления *Azospirillum* в почве [1] и для оценки способности *P. polymyxa* к колонизации корней пшеницы [2]. По данным ИФА, азоспириллы при комбинированной инокуляции демонстрируют положительную динамику прикрепления при сравнении 3 ч и 24 ч контакта, аналогичную таковой при отдельной инокуляции корней, о чем можно судить по увеличению количества выявляемых ЛПС-детерминант. Сравнение результатов инокуляции корней смесью бактерий и чистой культурой *Azospirillum* показало для последних преимущество комбинированной инокуляции. Преимущество совместной инокуляции для *Paenibacillus*, оцениваемое по уровню выявления их ЭПС, зафиксировано только после 3 ч контакта бактерий с корнями. Методом иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием Alexa Fluor 532-меченных антител и специфических Ат на ЭПС<sub>1465</sub> и ЛПС<sub>245</sub> выявлены сайты прикрепления бактерий при совместной инокуляции и установлено, что исследуемые бактерии колонизируют сходные регионы корня, в результате чего могут конкурировать между собой за места прикрепления.

1. Красов и др. (2009) *Микробиология*. 78: 662–666.
2. Yegorenkova et al. (2010) *Curr. Microbiol.* 61: 376–380.

## ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА АЗОТА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ БЕРЕЗЫ НА УГЛЕВОДНЫЙ ОБМЕН

Фасхиев В.Н.<sup>1,2</sup>, Лебедев В.Г.<sup>2</sup>, Осинов В.И.<sup>3</sup>, Шестибратов К.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Пущинский государственный естественно-научный институт (ПущГЕНИ).  
Пущино.

<sup>2</sup> Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН). Пущино.

<sup>3</sup> Университет Турку. Турку. Финляндия.  
vfaskhiev@ya.ru

Азот является одним из важнейших питательных элементов и его недостаток в почве часто является лимитирующим фактором для роста и развития растений. Глутаминсинтетаза считается ключевым ферментом азотного метаболизма растений и усиление ее активности методами генной инженерии может привести к повышению эффективности использования азота. С целью повышения продуктивности древесных растений нами были получены трансгенные растения двух генотипов березы *Betula pubescens*, экспрессирующие рекомбинантный ген цитозольной формы глутаминсинтетазы сосны GS1. Учитывая тесную связь азотного метаболизма с углеродным обменом, а также с биосинтезом фенилпропаноидов и образованием клеточной стенки, мы предположили возможность модификации в таких растениях углеводного метаболизма. Для проверки этой гипотезы нами был проведен анализ метаболома контрольной и двух трансгенных линий березы методом УЭЖХ-МС. Результаты показали увеличение у трансгенных растений содержания сахарозы и мальтозы (в 1.2 и 1.5 раз, соответственно), что может свидетельствовать о повышенной продуктивности фотосинтеза. Несколько полученных линий березы значительно (в 1.5–2 раза) отставали в росте и имели плакучий фенотип кроны. Анализ содержания целлюлозы не выявил отличий от контроля трансгенной линии, полученной на основе генотипа бп4а, тогда как «карликовые» растения другого генотипа, бп3ф1, показали повышенные по сравнению с нетрансгенным контролем уровни холоцеллюлозы (72% и 68%) и альфа-целлюлозы (45% и 41%). Для выяснения причин изменений, выявленных у трансгенных растений березы с геном GS1, необходимы более детальные биохимические исследования.

## ТАНДЕМНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ СПЕЙСЕРИРОВАННЫХ ГЛИКОКОНЬЮГАТОВ

*Чижов А.О., Аргунов Д.А., Карелин А.А., Комарова Б.С., Крылов В.Б., Сухова Е.В., Хатунцева Е.А., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э.*

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

chizhov@ioc.ac.ru

Измерены и интерпретированы масс-спектры ЭРИ высокого разрешения положительных и отрицательных ионов (МС и МС/МС) биотинилированных спейсерированных гексаэтиленгликолем (ГЭГ) углеводных молекулярных зондов, несущих углеводные фрагменты (в том числе и биологически функциональные, напр., углеводный фрагмент HNK-1 и его несультатированный аналог [1], синтез и применение см. [2]); 14 примеров. Для нейтральных гликоконъюгатов в масс-спектрах положительных ионов наблюдали ионы  $[M + H]^+$ ,  $[M + NH_4]^+$ ,  $[M + Na]^+$ ,  $[M + K]^+$ ,  $[M + 2Na - H]^+$ ,  $[M + 2Na]^{2+}$ ,  $[M + Na + K]^{2+}$  и др., в масс-спектрах отрицательных ионов присутствовали ионы  $[M - H]^-$ ,  $[M - 2H]^{2-}$  и др. Масс-спектры второго порядка положительных ионов имели различную структуру в зависимости от величины заряда исходного иона, от присоединённого иона (ионов), состава и последовательности звеньев в углеводном фрагменте, но наиболее интенсивные пики (две серии) были обусловлены фрагментами, возникающими в результате последовательного разрыва гликозидных связей с локализацией заряда либо на «невосстанавливаемом» конце (В-серия, [3]), либо на «восстанавливаемом» конце (У-серия, [3]). Неожиданные пики  $m/z$  530.2475  $[C_{22}H_{41}N_3O_8SNa]^+$  и  $m/z$  276.6161  $[C_{22}H_{41}N_3O_8SNa_2]^{2+}$  были отнесены к продуктам фрагментации цепи ГЭГ (разрыв связи С—О у наиболее удалённого от биотинового фрагмента атома кислорода). Другие фрагментные ионы, которые были бы легче вышеупомянутых на разность  $(C_2H_4O)_n$ , отсутствуют. Подобная фрагментация была отмечена для всех несультатированных биотинилированных гликозидов с ГЭГ-спейсером, что даёт основание считать этот тип фрагментации характеристическим для подобных молекулярных зондов.

Работа поддержана грантами РФФИ (14-03-31636-мол-а и 14-03-31583-мол-а).

1. (a) Chizhov *et al.* *Russian-Indian Symposium on Glycosciences*, Moscow, June 13-16, 2011. Book of abstracts, (б) Чижов и др. *V Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и её прикладные проблемы»*. Сб. тезисов докладов. Москва, 08-11 окт. 2013, 86.
2. Tsvetkov *et al.* (2012) *J. Am. Chem. Soc.* 134 (1): 426–435.
3. Domon, Costello (1988) *Glycoconjugate J.* 5 (4): 397–409.

## ВЛИЯНИЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ НА ДИНАМИКУ АКТИВНОСТИ ЛЕКТИНОВ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ СТЕВИОЗИДА

*Шаймуллина Г.Х., Хусаинова Р.Р., Грошева Е.А., Невмержицкая Ю.Ю.*

Казанский (Приволжский) федеральный университет. Казань.

gulnazshajmullina@yandex.ru

Развитие грибных заболеваний пшеницы сопровождается патологическими изменениями биохимических показателей. Регуляторы роста с фунгицидными свойствами предположительно вносят вклад в защитную систему растений.

Объектом исследования служили 7-суточные проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Омская 33, выращенные в водопроводной воде и растворе стевиозида  $10^{-8}$  М. Инокуляцию проростков в суспензии спор грибов *Fusarium (F.) oxysporum* Schlectend.:Fr. и *Aspergillus niger* проводили в течение 1 часа, с последующим отбором первой пробы для определения активности растворимых и связанных с клеточной стенкой лектинов. Образцы отбирали через каждые 24 ч (на протяжении 4 суток). Лектины экстрагировали по методу, описанному в ранее опубликованной работе [1].

Активность растворимых лектинов при действии фитопатогенов носила фазный характер. Причем в ответ на *Fusarium spp.* активность была выше, что может свидетельствовать о вовлечении растворимых лектинов в ответную реакцию растений на инфицирование. Предобработка семян пшеницы раствором стевиозида уменьшила активность растворимых лектинов на действие *Fusarium spp.* Вариант с грибом *Aspergillus niger* показал увеличение активности к 8 и 10 суткам.

Инфицирование *Fusarium spp.* вызвало подавление активности лектинов клеточной стенки вплоть до 9-х суток, после которого происходило значительное повышение активности этой группы белков. Можно предположить, что более поздние изменения активности лектинов отражают симптомы болезни, т.е. коррелируют с восприимчивостью растений. При действии *Aspergillus niger* активность лектинов связанных с клеточной стенкой, увеличившаяся к 8-ым суткам, шла на значительное понижение.

Растения, выращенные в растворе стевиозида, имели меньшую ответную реакцию лектинов клеточной стенки на инфицирование *Fusarium spp.* в течение всего эксперимента. Возможно, стевиозид оказал протекторное действие на растения пшеницы при патогенезе фитопатогенными грибами.

1. Тимофеева и др. (2010) *Физиология растений*. 57 (2): 209–216.

## ПОЛИСАХАРИДЫ ЕЛИ ФИНСКОЙ *P. fennica*

Шахматов Е.Г., Макарова Е.Н.

Институт химии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар.

e-mail: shachmatow-eg@ya.ru

Измельченную обезжиренную древесную зелень ели (отбирали с  $>> 10$  растущих деревьев ежемесячно) последовательно экстрагировали дист. водой ( $PF_W$ ), раствором  $HCl$  ( $pH \sim 4$ )  $PF_A$ , раствором оксалата аммония ( $PF_O$ ), раствором  $KOH$  ( $PF_K$ ), раствором  $NaOH$  ( $PF_N$ ). Показано, что в древесной зелени ели присутствуют, главным образом, полисахариды  $PF_W$ ,  $PF_O$ ,  $PF_K$  и  $PF_N$ , содержание которых зависит от интенсивности ростовых и экспортных процессов, происходящих в растении в зависимости от его вегетационного периода, их выходы варьируют от 2 до 11%. Полисахарид  $PF_A$  является минорным по выходу (1–2%).

Установлено, что в состав углеводных цепей полисахаридов  $PF_W$ ,  $PF_A$ ,  $PF_O$  входят, главным образом, остатки гликуроновых кислот, Gal, Ara и Rha, что предполагает наличие пектиновых полисахаридов и арабиногалактанов; а также содержится значительное количество Man и Glc, это может указывать на наличие водорастворимого глюкоманнана или галактоглюкоманнана, относящихся к классу связующих гликанов. Главными компонентами углеводных цепей связующих гликанов  $PF_K$  являются остатки Xyl, Glc и гликуроновых кислот, что, вероятно, указывает на их принадлежность к классу глюкуроноксианов и глюканов. В углеводной цепи полисахарида  $PF_N$  присутствуют главным образом, остатки Man и Glc, в связи с чем, он отнесен к классу щелочерастворимых глюкоманнанов.

Методом спектроскопии ЯМР исследована структура высокоразветвленного арабинана, выделенного из древесной зелени ели раствором  $HCl$ . Установлено, что линейная область полисахарида представлена участками частично метилэтерифицированного галактуронана (СМ 29%), а разветвленная область представлена участками частично 2-О- и/или 3-О-ацетилованного RG-I. Боковые углеводные цепи разветвленной области образованы, главным образом, остатками терминальной, 1,5-О-, 1,3,5-ди-О- и 1,2,3,5-три-О-замещенной  $\alpha$ -L-Araf, свидетельствующими о присутствии высокоразветвленного 1,5- $\alpha$ -L-арабинана. Впервые для полисахаридов ели были обнаружены остатки терминальной  $\beta$ -L-Araf, находящиеся на невозстанавливающих концах боковых цепей.

Наличие остатков 1,4- $\beta$ -D-Manp, 1,4- $\beta$ -D-3-ОAc-Manp (СА  $\sim 47\%$ ) и 1,4- $\beta$ -D-Glcp в небольших количествах, указывает, на присутствие полисахаридов класса глюкоманнанов.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ОХИМ РАН № 7 проект 12-Т-3-1018.

## СТРОЕНИЕ КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ *Acinetobacter baumannii* – ВОЗБУДИТЕЛЯ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Шапков А.С.<sup>1</sup>, Сенченкова С.Н.<sup>1</sup>, Книрель Ю.А.<sup>1</sup>, Шнейдер М.М.<sup>2</sup>,  
Мирошников К.А.<sup>2</sup>, Попова А.В.<sup>3</sup>, Воложанцев Н.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Москва.

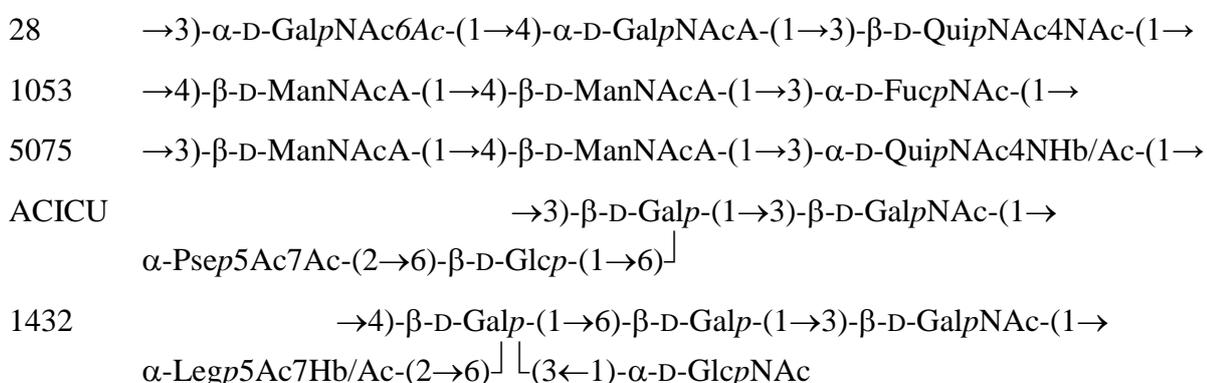
<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Москва.

<sup>3</sup> Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Оболенск.

shash@ioc.ac.ru

Множественная устойчивость к антибиотикам и способность персистировать в течение длительного времени приводит к все возрастающему распространению *Acinetobacter baumannii* в стационарах лечебных учреждениях, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Число летальных исходов в результате инфекций *A. baumannii* существенно превышает уровень смертности при поражении другими грамотрицательными бактериями. Одним из факторов вирулентности *A. baumannii* являются капсульные полисахариды (КПС), образующие толстый вязкий слой вокруг клетки. Тонкая структура КПС определяет специфичность узнавания *A. baumannii* клетками иммунной системы и бактериофагами и может служить основой для типирования штаммов. Выявлено не менее 90 типов генных локусов КПС *A. baumannii*, тогда как строение полисахаридов установлено только для 19 штаммов.

В настоящей работе с помощью химических методов и спектроскопии <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР установлены структуры КПС еще 5 штаммов *A. baumannii* (28, 1053, 1432, 5075 и ACICU). Все изученные полисахариды являются кислыми и построены из линейных трисахаридных или разветвленных тетра- или пентасахаридных повторяющихся звеньев. В их составе обнаружены ацильные [ацетильные (Ac) или 3-гидроксибутаноильные (Hb)] производные D-фукозамина, 2,4-диамино-2,4,6-тридезоксид-D-глюкозы (бациллозамина, QuiN4N), D-маннозаминуроновой, D-галактозаминуроновой, псевдаминовой (Pse) и легионаминовой (Leg) кислот.



Доступные в базах данных нуклеотидные последовательности генных локусов КПС штаммов 5075 и ACICU соответствуют установленным структурам.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *Fusarium proliferatum* LE1 (RCAM02409), СЕКРЕТИРУЮЩЕГО ФЕРМЕНТЫ $\alpha$ -L-ФУКОЗИДАЗУ И АРИЛСУЛЬФАТАЗУ. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ $\alpha$ -L-ФУКОЗИДАЗЫ

*Швецова С.В.*<sup>1,3</sup>, *Журишкина Е.В.*<sup>1</sup>, *Бобров К.С.*<sup>1</sup>, *Гагжаева Т.Ю.*<sup>2</sup>,  
*Энейская Е.В.*<sup>1</sup>, *Кульминская А.А.*<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова. Гатчина.

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений.

Пушкин.

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный политехнический университет.

Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций, Кафедра медицинской физики. Санкт-Петербург.

shvetsova@omrb.pnpi.spb.ru

Нами выделен и идентифицирован новый штамм мицелиального гриба *Fusarium proliferatum* LE1 (RCAM02409), способный секретировать ферменты фукоидан-гидролизующего комплекса. Штамм LE1 (RCAM02409) был идентифицирован на основе анализа морфологических признаков и последовательности *ITS*-области рибосомальной ДНК. При глубинном культивировании *F. proliferatum* LE1 (RCAM02409) на среде, содержащей смесь измельченных бурых водорослей *Laminaria digitata* и *Fucus vesiculosus* в качестве источника фукоидана, индуцируется секреция  $\alpha$ -L-фукозидазы и арилсульфатазы, способных расщеплять модельные субстраты *para*-нитрофенил- $\alpha$ -L-фукопиранозид и *para*-нитрофенил-сульфат, соответственно. Показано, что максимум  $\alpha$ -L-фукозидазной активности детектируется в культуральной среде на 5-е сутки, а арилсульфатазной – на 8–10-е. Дополнительно штамм исследован на наличие прочих гликозидгидролизующих ферментов в этих же условиях.

Были подобраны условия культивирования исследуемого штамма *F. proliferatum* LE1 (RCAM02409), при которых выход  $\alpha$ -L-фукозидазы является максимальным. Разработана схема выделения и очистки этого фермента. В результате нами получен очищенный препарат  $\alpha$ -L-фукозидазы с молекулярной массой 54–60 кДа. Определены кинетические параметры  $\alpha$ -L-фукозидазы в гидролизе различных фукозосодержащих олигосахаридов. Обнаружена трансгликозилирующая способность со спиртами исследуемого фермента.

# НОВЫЕ ГЛИКОГЛИЦЕРОЛИПИДЫ – ИНДУКТОРЫ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

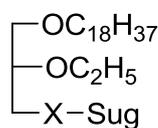
Шмендель Е.В.<sup>1</sup>, Тимофеев Г.А.<sup>1</sup>, Морозова Н.Г.<sup>1</sup>, Маслов М.А.<sup>1</sup>, Маркова А.А.<sup>2</sup>, Кубасова Т.С.<sup>2</sup>, Штиль А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Московский университет тонких химических технологий им.

М.В. Ломоносова. Москва.

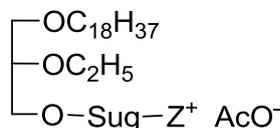
<sup>2</sup> Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН. Москва.  
ngmoroz@mail.ru

Алкильные гликоглицеролипиды (GAELs) – перспективные антинеопластические агенты, лишенные многих недостатков традиционных противоопухолевых препаратов: мутагенности, иммуногенности, низкой селективности [1]. GAELs способны ингибировать миграцию и инвазию, блокировать метастазирование. Важно, что указанные соединения практически не вызывают гемолиз, в отличие от испытываемого в клинике фосфорсодержащего глицеролипида – эдельфозина. Модификация базовой гликозилдиглицеридной структуры достигалась варьированием структурных элементов молекулы: типа углеводного остатка и катионной «головки», спейсера между диглицеридным остовом и углеводным звеном, типа химической связи между спейсером и диглицеридом, а также способом сборки молекулы. Спейсер вводился для изучения адресного потенциала углеводного остатка (нацеленной доставки GAELs в углевод-узнающие опухолевые клетки). GAELs **3** синтезированы на основе разработанного в нашей лаборатории прототипа – алкильного глицеролипида *rac-N*-{5-[(3-октадецилокси-2-этилокси)проп-1-ил]оксипентаноил}-*N*-метил-имидазолийиодида [2]. Скрининг цитотоксичности новых нейтральных (**1**) и катионных (**2**, **3**) GAELs на линиях опухолевых клеток человека выявил лидерные соединения – производные маннозы и галактозы. Эти соединения показали высокую преимущественную активность для опухолевых клеток при минимальном повреждении неопухолевых.



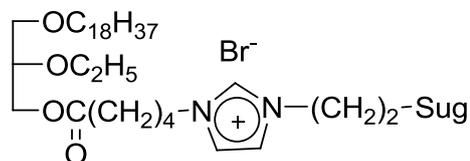
**1**

Sug = Gal, Man, Lac,  
GlcNAc, GalNAc  
X = O; OC(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>,  
n = 2, 3, 4



**2**

Sug = Gal, Man, Lac  
Z = Py, Melm



**3**

Sug = Glc, Gal, Man

1. Samadder *et al.* (2011) *Anticancer Res.* 31 (11): 3809.
2. Плявник и др. (2011) *Биоорг. химия.* 37(4): 552.
3. Маркова и др. (2011) *Клин. онкогематол.* 5 (2): 141.

## СТРУКТУРЫ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ АЗОСПИРИЛЛ, ОПОСРЕДУЮЩИЕ ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК

Шумилова Е.М., Шелудько А.В., Филипьева Ю.А., Пономарева Е.Г.,  
Петрова Л.П., Никитина В.Е.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов  
shel71@yandex.ru

Биопленка является пространственно и метаболически структурированным сообществом бактерий, заключенных в матрикс, прикрепленных друг к другу и к поверхности раздела фаз. В зависимости от состава среды культивирования и степени гидрофобности колонизируемой поверхности прикрепление бактерий *A. brasilense* Sp245 в пленках опосредуют структуры, чувствительные к действию протеаз или содержащие углеводы. У клеток, сформировавших биопленки, обнаружена способность к агглютинации трипсинизированных эритроцитов. Подобную активность клеток Sp245 может определять гемагглютинин со сродством к ЛПБК (липополисахарид-белковый комплекс капсулы) и ЛПС (мембранный липополисахарид) данного штамма, опосредующий межклеточные контакты, реализуемые при коллективной подвижности азоспирилл. Утрата мутантом штамма Sp245 полярного и латерального жгутиков в результате инактивации хромосомной копии гена *flhB*, кодирующего компонент жгутикового экспортного аппарата, сказывается на способности бактерий формировать биопленки на разделе «жидкая-плотная среда». Начальные этапы формирования биопленки – прикрепление и адгезия клеток на поверхности протекают независимо от синтеза бактериями флагеллы. Однако толщина «зрелых» пленок мутанта, лишённого жгутиков, существенно уступает показателям родительского штамма. Образование пленок клетками мутанта восприимчиво к действию сил гидродинамического сдвига. В случае штамма Sp245 клетки с полярным жгутиком обнаружены при атомно-силовой микроскопии «зрелых» нативных биопленок.

## ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ НА ПРОДУЦИРОВАНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРОЙ *Silene vulgaris*

*Юзыпчук А.А., Гюнтер Е.А.*

Институт физиологии Коми НЦ Уральского отделения РАН. Сыктывкар.  
a.yuzpchunk@yandex.ru, gunter@physiol.komisc.ru

Одним из главных факторов, необходимых для нормального роста и развития растений, является кальций, он играет важную роль в регуляции большинства физиологических процессов. Ионы кальция, встроенные в сеть пектиновых молекул, формируют вместе с ними структуру, повышающую прочность клеточной стенки растения. Данная работа посвящена изучению взаимосвязи между концентрацией кальция в среде и количественным и качественным составом растительных полисахаридов. Из каллусной культуры смолевки обыкновенной *S. vulgaris*, выращенной на средах с концентрациями кальция ( $\text{CaCl}_2$ ) 1 мМ, 3 мМ (контроль), 5 мМ и 7 мМ, получены пектин (SVC) и кислый арабиногалактан (AG). Показано, что изменение концентрации кальция в среде не влияет на выход и содержание SVC и AG на литр среды. В моносахаридном составе всех фракций арабиногалактанов преобладают остатки галактозы (38–44%), арабинозы (8–11%) и галактуроновой кислоты (5–13%). При снижении концентрации кальция до 1 мМ и при увеличении до 5–7 мМ содержание остатков галактуроновой кислоты в AG уменьшается по сравнению с контролем в 2,5, 1,5 и 1,2 раза соответственно. С увеличением концентрации кальция до 7 мМ содержание белка в AG возрастает в 1,4 раза. Повышение содержания кальция в среде от 1 мМ до 5 мМ вызывает увеличение количества остатков галактозы в 1,2 раза. С помощью ультрафильтрации установлено, что AG являются гетерогенными по молекулярным массам, в составе которых доминируют фрагменты с  $M_w > 300$  кДа (61–86%) и присутствуют фрагменты с  $M_w 100$ –300 кДа (6–16%) и 50–100 кДа (1–13%). Установлено, что в пектине SVC доминируют остатки галактуроновой кислоты (55–72%), галактозы (8–9%) и арабинозы (7%). При уменьшении концентрации кальция в среде до 1 мМ и при увеличении до 5 мМ по сравнению с контролем отмечено снижение количества остатков галактуроновой кислоты в SVC в 1,3 и 1,2 раза соответственно. Изменение концентрации кальция в среде существенно не влияет на содержание остатков галактозы и арабинозы в SVC. В результате ультрафильтрации установлено, что в составе SVC преобладают фрагменты с  $M_w > 300$  кДа и присутствуют минорные фрагменты с  $M_w 100$ –300 кДа (5–7%) и  $M_w 50$ –100 кДа (1–5%). Таким образом, установлено, что при варьировании концентрации кальция в среде снижается содержание остатков галактуроновой кислоты в пектине и арабиногалактане и изменяется молекулярно-массовое распределение полисахаридов.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН (проекты № 12-С-4-1006 и 12-Р-4-1033).

## ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ПРЕСНОВОДНЫХ РАСТЕНИЙ

*Патова О.А., Головченко В.В., Витязев Ф.В., Попов С.В.*

ФГБУН Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар

pat@physiol.komisc.ru

К настоящему времени выяснены основные черты химического строения большого числа пектинов самых различных наземных растений. Немногочисленные исследования пектиновых полисахаридов высших морских (сем. *Zosteraceae*) и пресноводных растений (*Lemna minor*) показали, что данные полисахариды также отличаются сложной и своеобразной структурой.

Известно, что пектины характеризуются широким спектром физиологического действия, проявляя иммуномодулирующее, противоопухолевое, противовоспалительное, антиоксидантное действие. Ранее нами показано, что противовоспалительная активность пектинов при пероральном введении обусловлена наличием углеводной цепи, представленной галактуронаном или рамногалактуронаном. Поэтому большой интерес представляет поиск растений, содержащих высокомолекулярные галактуронаны.

Нами проведено выделение и структурное исследование пектинов ряда пресноводных растений европейского Севера России, произрастающих на поверхности и в толще воды: *Menyanthes trifoliata*, *Potamogeton lucens*, *P. perfoliatus*, *P. natans*, *L. gibba*, *Stratiotes aloides*, *Butomus umbellatus*. В результате показано, что большинство из них являются высокомолекулярными полимерами с высоким содержанием остатков галактуронової кислоты. Исследована способность пектиновых полисахаридов, выделенных из пресноводных растений, изменять функциональную активность фагоцитирующих клеток – нейтрофилов и макрофагов, при пероральном введении. Выявлены пектины, обладающие иммуносупрессорной активностью. Установлено, что пектины *P. natans*, *P. perfoliatus*, отличающиеся высоким содержанием остатков галактуронової кислоты, ингибируют активность лейкоцитов, как при длительном, так и при однократном введении, что приводит к подавлению антиген-специфичного иммунного ответа.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 12-04-00150-а.

## **ЗАОЧНЫЕ УЧАСТНИКИ**

## **ВЛИЯНИЕ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНАЗЫ EU 293132.1 В ПАТОСИСТЕМАХ «*Triticum aestivum* – *Bipolaris sorokiniana*», «*Triticum aestivum* – *Septoria nodorum*»**

Ахатова А.Р., Касимова Р.И., Яруллина Л.Г.

Институт биохимии и генетики УНЦ РАН. Уфа.

akhatova.a@yandex.ru

Эффективными элиситорами защитных реакций растений являются полисахаридные компоненты клеточных стенок фитопатогенов – хитоолигосахариды (ХОС) [1]. В индукции развития ответных реакций растительных клеток важным показателем является степень ацетилирования (СА) ХОС. ХОС активируют транскрипцию генов PR-белков, в частности ингибиторов протеиназ, действие которых направлено на подавление активности протеолитических ферментов, секретируемых патогеном. Учитывая многообразие пищевой специализации патогенов, весьма важным является изучение роли СА ХОС в активации гена ингибитора протеиназы в тканях на фоне заражения растений патогенами разной трофности.

В данной работе анализировали воздействие ХОС со СА 30% и 65% на экспрессию гена ингибитора протеиназы EU 293132.1 в растениях пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Жница при инфицировании патогенами с некротрофным (*Bipolaris sorokiniana*) и гембиотрофным (*Septoria nodorum*) типом паразитизма. Заражение пшеницы *B. sorokiniana* вызывали путем полива основания стеблей 5-суточных проростков суспензией конидий гриба в воде из расчета  $10^6$  спор/мл. Отрезки листьев 7-суточных проростков инокулировали суспензией пикноспор *S. nodorum* ( $10^6$  спор/мл). ХОС со СА 30% и 65% в концентрации 1 мг/л использовали для полусухой обработки семян пшеницы из расчета 20 мкл/г. В контроле семена обрабатывали водой. На 3, 6, 9 сутки после заражения *B. sorokiniana* и через 24, 48, 72 ч после инокуляции спорами *S. nodorum* оценивали влияние ХОС на экспрессию гена ингибитора протеиназы.

Выявлено, что предпосевная обработка семян ХОС негативно отражалась на росте и развитии возбудителей болезней в растительных тканях. При этом обнаружено повышение экспрессии гена ингибитора протеиназы и активности кодируемого им белкового продукта как в патосистеме «*T. aestivum*–*S. nodorum*», так и «*T. aestivum*–*B. sorokiniana*». Однако, при инфицировании *S. nodorum* более значительным индуцирующим эффектом на экспрессию гена EU 293132.1 оказывали ХОС со СА 30%, а при заражении *B. sorokiniana* – ХОС со СА 65%. Полученные данные указывают на важную роль СА ХОС в проявлении их элиситорного эффекта в зависимости от пищевой специализации патогена.

1. Тарчевский И.А. Сигнальные системы растений. М.: Наука, 2002. – 294 с.

## ЛЕКТИНЫ ГРИБОВ СВИНУШКИ ТОНКОЙ И МИЦЕНЫ ЧИСТОЙ: ОЧИСТКА, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ В ГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

*Антонюк Р.В., Луцик А.Д.*

Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого.

Львов, Украина.

Rostyslaviuslc@mail.ua

Лектины нашли применение в гистохимических исследованиях для изучения углеводных остатков на поверхности живых клеток и тканей. Для этой цели необходимы лектины с хорошо охарактеризованной углеводной специфичностью и высокой селективностью.

Нами из плодовых тел грибов свинушки тонкой (*Paxillus involutus* (Fr.) Fr) и мицены чистой (*Muscena pura* /Fr./ Kumm.) были очищены лектины, изучена их углеводная специфичность, некоторые физико-химические свойства и возможности применения в гистохимических исследованиях [1, 2].

Особенностью лектина мицены чистой является сильное взаимодействие с щелочной фосфатазой – она была наивысшей среди 20 исследованных лектинов. На основании изучения взаимодействия лектина с гликопротеинами установлено, что важная роль принадлежит дисахаридным звеньям GlcNAc $\beta$ (1-2)Man $\beta$ (1-6) или GlcNAc $\beta$ (1-2)Man $\beta$ (1-2), которые не обязательно являются терминальными. Эти углеводные цепи – составная часть щелочной фосфатазы, но рецепторы для связывания лектина мицены в тканях представлены также другими гликоконъюгатами, что было показано на примере связывания с тканями тонкой кишки плода теленка и почки крысы.

Лектин свинушки тонкой взаимодействовал лишь с N-ацетиллактозамином и с гликопротеинами, содержащими в своем составе эти цепи. При исследовании связывания лектина свинушки с гистологическими структурами тканей крысы обнаружено, что практически отсутствуют рецепторы лектина в сердце и надпочечниках. Выявлены структуры, связывающие лектин в толстом и тонком кишечнике; отмечено окрашивание протоков слюнных желез при отсутствии лектиновых рецепторов в клетках ацинусов, наличие рецепторов лектина в ядрах мезагиоцитов и подоцитов, окрашивания перинуклеарных структур клеток Пуркинье. В то же время лектин свинушки выраженно окрашивает структуры соединительной ткани. Обнаружено подобие связывания лектина свинушки тонкой и лектина клещевины обыкновенной (*Ricinus communis*, RCA-120. В то же время, хотя оба лектина лучше всего взаимодействуют с N-ацетиллактозамином, присоединение к нему не только  $\alpha$ LFuc, но и  $\alpha$ DGal лишает такую структуру активности для лектина свинушки тонкой и не влияет на взаимодействие с лектином клещевины обыкновенной.

1. Антонюк и др. (2009) *Биополимеры и клетка*. 25(6): 466–475.

2. Antonyuk *et al.* (2014) *Romanian J. Morph. Embryol.* (in press).

## **КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИИ АБК, АЗП И ДЕГИДРИНОВ В ЗАРОДЫШАХ ПШЕНИЦЫ В ХОДЕ СОЗРЕВАНИЯ**

*Безрукова М.В., Фатхутдинова Р.А., Мурзабаев А.Р., Аллагулова Ч.Р., Шакирова Ф.М.*

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук. Уфа.  
lectin@anrb.ru

Агглютинин зародыша пшеницы (АЗП) является характерным для зародышей пшеницы белком, массированный синтез и накопление которого наблюдается при обезвоживании семян в ходе их созревания. Этот процесс, как известно, находится под контролем АБК, поэтому не удивительно, что ген АЗП относится к АБК-контролируемым генам. АБК-регулируемыми являются также дегидрины, относящиеся к разряду белков позднего эмбриогенеза, которым отводится важная роль в защите биополимеров и клеточных структур в процессе дегидратации при созревании семян.

В работе впервые представлены результаты комплексного иммуногистохимического анализа распределения АБК, АЗП и дегидринов в тканях зародышей мягкой пшеницы сорта Башкирская 26 в ходе эмбриогенеза с помощью конфокального микроскопа LSM5 (Carl Zeiss, Германия) с использованием вторичных антикроличьих антител DyLight® 633 (Agrisera, Швеция) при возбуждающей длине света 633 нм с применением барьерного фильтра LP 650 после отражения через дихроичное зеркало NFT 545.

Обнаружено, что иммуногистохимическое распределение АЗП и дегидринов в формирующемся зародыше коррелирует с распределением АБК в тканях в исследуемые фазы эмбриогенеза.

АЗП задействован в инициации деления клеток в формирующемся зародыше, в связи с этим он преимущественно детектировался в клетках основной меристемы – колеоризе и эпибласте, где также наблюдалась максимальная локализация АБК. Меньшая по интенсивности иммунофлуоресценция АЗП и АБК регистрировалась в области корневого чехлика, формирующейся сосудистой системе центрального цилиндра и зародышевой почечке. В то же время дегидрины в отличие от АЗП и АБК распределялись диффузно в колеоризе, эпибласте, зародышевых листьях и колеоптиле, при этом выявлено, что в ходе естественного обезвоживания семян в ходе созревания иммунофлуоресценция дегидринов усиливалась.

Полученные данные позволили визуализировать взаимосвязь АЗП и дегидринов в обеспечении нормального протекания эмбриогенеза и роль АБК в регуляции этого процесса.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00731.

## ЛЕКТИНЫ ПОЧВЕННЫХ СТРЕПТОМИЦЕТОВ – АНТАГОНИСТОВ ФИТОПАТОГЕНОВ

*Белявская Л.А., Коваленко Э.А., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А.*

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины.  
Киев, Украина.

bilyuvskal@gmail.com

Проблема инфекционных болезней растений, приводящая к потерям урожая и ограничению объемов производства сельскохозяйственных культур, не нова, но в последнее время приобретает глобальный характер. Поэтому для современных фитосанитарных технологий весьма перспективным является создание высокоэффективных биопрепаратов на основе биологически активных метаболитов микроорганизмов.

Для успешного применения метаболитных препаратов в защите растений необходимо как выделение новых продуцентов, так и более детальное изучение их биосинтетического потенциала.

В последние годы значительно возрос интерес к лектинам и агглютинидам бактерий, играющим важную роль во взаимодействии «патоген–хозяин». В настоящее время остаются недостаточно изученными лектины почвенных актинобактерий рода *Streptomyces* – продуцентов комплекса биологически активных веществ.

Целью данной работы было изучение способности почвенных стрептомицетов образовывать лектины и определение их углеводной специфичности.

Объектами исследования были выделенные сотрудниками отдела общей и почвенной микробиологии ИМВ НАНУ из почвы штаммы *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179, *S. netropsis* УКМ Ас-2186 и *S. violaceus* УКМ Ас-2191. На основании супернатанта культуральной жидкости (СКЖ) и этанольных экстрактов биомассы этих продуцентов были созданы метаболитные препараты (МП) Аверком, Фитовит и Виолар соответственно, которые в лабораторных условиях продемонстрировали высокую фунгицидную, бактерицидную и нематоцидную активности.

В результате проведенных исследований гемагглютинирующая активность была обнаружена как в СКЖ исследуемых стрептомицетов выращенных на полноценной и синтетической средах, так и в МП созданных на их основе. Титр гемагглютинации колебался от 1 : 4 – 1 : 64 для СКЖ и 1 : 16 – 1 : 256 для МП, что дает право предположить наличие лектинов в этих субстанциях. В реакции ингибирования гемагглютинации установлена углеводная специфичность лектинов СКЖ и МП к L-фукозе, D-галактозе, D-глюкозе, D-маннозе в пределах 4.68-9.32 мМ.

Выявленная способность стрептомицетов антагонистов образовывать лектины с определенной углеводной специфичностью дает основание предполагать участие этих метаболитных препаратов в молекулярно-биохимических взаимодействиях фитопатогена и растения.

## ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПРИРОДНЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ СТАРЕНИИ ОРГАНИЗМА

*Бондаренко Т.И.<sup>1</sup>, Майборода Е.А.<sup>1</sup>, Михалева И.И.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Южный федеральный университет. Ростов-на-Дону.

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии РАН им. акад. М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова. Москва.

tomabon@yandex.ru

Разработка и изучение фармакологических средств коррекции возрастных изменений, которые позволяют предупредить преждевременное старение, развитие возраст-ассоциированных патологий (сахарного диабета, атеросклероза и др.) и улучшить при этом качество жизни, является актуальной задачей современной биомедицины и фармакологии. В этом плане особый интерес представляют синтетический аналог дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП), имеющий следующую первичную структуру WAGGDASGE. Показан широкий спектр его биологических эффектов, в том числе геропротекторный [1], молекулярные механизмы реализации которого пока не известны, и их изучение представляет несомненный интерес.

Целью нашей работы явилось изучение влияния ДСИП на уровень глюкозы в плазме крови и гликозилированного гемоглобина в эритроцитах крыс разного возраста. Эксперимент выполнен на белых крысах-самцах в возрасте 2–24 мес. Подопытным животным 4–24 мес. возраста ежемесячно, начиная с 2-х мес., курсами по 5 последовательных дней подкожно вводили ДСИП в дозе 100 мкг/кг массы тела животного. Для интактных 4–24 мес. крыс контролем служили 2 мес. животные, для животных с введением ДСИП – интактные животные соответствующего возраста.

Нами установлено, что максимальное повышение уровня глюкозы в плазме крови крыс имеет место в позднем онтогенезе – 20, 22 и 24 мес. Существуют данные о том, что избыток глюкозы действует как патогенетический и способствующий старению (pro-ageing) фактор [2]. Неэнзиматическое гликозилирование биомолекул становится все более важной областью в изучении диабета и процесса нормального старения [3]. Количество гликозилированного гемоглобина находится в прямой зависимости от уровня глюкозы в крови. Нами показано повышение данного показателя у 8–24 мес. крыс в среднем на 16.1–79.0% по сравнению с 2-х мес. животными.

ДСИП, проявляя гипогликемическое действие, таким образом, предотвращает неферментативное гликозилирование белков, обеспечивая снижение количества дефектных белковых молекул при старении организма.

1. Popovich *et al.* (2003) *Mech. Ageing. Dev.* 124(6): 721–731.
2. Kassi *et al.* (2008) *J. Cell. Mol. Med.* 12: 1194–1198.
3. Faccihini *et al.* (2000) *Free Radical. Biol. Med.* 29: 1302–1306.

## УРОВЕНЬ ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА И СЕРОГЛИКОИДОВ В КРОВИ КРЫС ПРИ АЛИМЕНТАРНОЙ БЕЛКОВОЙ ДЕПРИВАЦИИ

*Копыльчук Г.П., Бучковская И.М., Скрипник М.Г., Николаев Р.А.*  
Черновицкий национальный университет им. Юрия Федьковича. Черновцы.  
ivannabuchkovska@mail.ru

Известно, что уровни гликопротеиновых комплексов крови выявляют ответ организма на действие стрессоров и развитие патологических процессов. Определение концентрации гликозилированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>) является показателем метаболического контроля сахарного диабета, геморрагической анемии, а также заболеваний печени. Кроме того, некоторые авторы считают, что существует прямая зависимость между содержанием серомукоидов в сыворотке крови и реактивностью организма [1].

С целью исследования уровня глюкозы, гликозилированного гемоглобина и серогликоидов в крови при алиментарной белковой недостаточности опытных животных в течение 28 дней удерживали на полусинтетическом низкопротеиновом рационе (1/3 от общепринятой суточной нормы белка).

Результаты исследований показали, что в сыворотке крови крыс, содержащихся на малобелковой диете, наблюдается снижение уровня глюкозы в 2 раза по сравнению с показателями контрольной группы животных. Вероятно, данный факт связан со снижением скорости глюконеогенеза в печени вследствие недостаточности предшественников-аминокислот. В тоже время в гемолизате эритроцитов нами отмечено достоверное повышение уровня гликозилированного гемоглобина по сравнению с контролем. Известно, что HbA<sub>1c</sub> вследствие прочной связи с кислородом трудно отдает его тканям. Повышение его содержания в крови приводит к возникновению тканевой гипоксии и развития ангиопатий, что связано с недостаточным насыщением кислородом базальных мембран сосудов. Очевидно, при белковой недостаточности избыток HbA<sub>1c</sub> вызывает нарушение транспорта кислорода и усиливает микроциркуляторные расстройства [2].

Фракция углеводно-белковых комплексов, включающая в себя наибольшее количество углеводов – серогликоиды – очень тонко реагирует на многие заболевания своей концентрацией в крови. Увеличение их уровня происходит при любых стрессовых ситуациях и мобилизации резервов. В наших исследованиях показано повышение уровня серогликоидов в сыворотке крови крыс, находящихся на низкопротеиновой диете, в 1.4 раза по сравнению с показателями контроля, что, вероятно, свидетельствует о развитии воспалительных или некробиотических процессов.

1. Weykamp *et al.* (2009) *J. Diabetes Sci. Technol.* 3(3): 439–445.
2. Wang *et al.* (2013) *Nanoscale.* 5: 7349–7355.

## ЛЕКТИН ИЗ МИДИИ *Mytilus trossulus* – ПРЕДСТАВИТЕЛЬ НОВОГО СЕМЕЙСТВА Gal/GalNAc-СПЕЦИФИЧНЫХ ЛЕКТИНОВ

Чикаловец И.В.<sup>1,2</sup>, Черников О.В.<sup>1</sup>, Ковальчук С.Н.<sup>1</sup>, Литовченко А.П.<sup>1,2</sup>, Молчанова В.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова. Владивосток.

<sup>2</sup> Дальневосточный федеральный университет. Владивосток.  
ivchik6@mail.ru

Ранее из мидии *Mytilus trossulus* был выделен и частично охарактеризован Gal/GalNAc-специфичный лектин (MTL) [1]. По физико-химическим свойствам, специфичности и перекрестной реактивности он оказался близок к лектинам из мидий *Crenomytilus grayanus* (CGL) и *Mytilus galloprovincialis* (MytiLec), которые не имеют значительной структурной гомологии ни с одним из охарактеризованных белков [2]. Методами молекулярной биологии была установлена первичная структура MTL. Поиск и анализ гомологичных последовательностей выявил, что единственными известными на сегодняшний день структурными гомологами MTL являются CGL (87% идентичности и 91% гомологии) и MytiLec (90% идентичности и 94% гомологии). Вероятно, MTL является третьим членом нового класса лектинов, наряду с CGL и MytiLec.

Изучена пространственная организация MTL. Результаты УФ- и КД-спектроскопии показали, что характерным признаком структурной организации лектина является преобладание бета-структуры: 39.9% –  $\beta$ -структура, 21.5% –  $\beta$ -изгиб, 6% –  $\alpha$ -структура и 32.6% – неупорядоченная форма. Расчеты, полученные с помощью сервера Phyre2, дают следующее содержание канонических структур: 50%  $\beta$ -структуры, 3%  $\alpha$ -спиралей и 47% неупорядоченной формы, что согласуется с данными КД-спектроскопии. Предсказание третичной структуры с использованием этого же сервера показало, что MTL имеет тип укладки, называемый « $\beta$ -трилистник».

Для выяснения функции MTL в организме мидии методом ПЦР в реальном времени был определен уровень экспрессии гена лектин в различных органах. Найдено, что наибольшее содержание мРНК наблюдается в мантии, где уровень экспрессии был в 52 раза выше, чем в гемоцитах. В это же время, уровень экспрессии в гепатопанкреасе, жабрах и мускуле был меньше в 5 и 8 раз, чем в гемоцитах и гонадах соответственно. Вероятно, лектин участвует в предотвращении заражения животных, т.к. мантия постоянно омывается морской водой, которая содержит болезнетворные микроорганизмы и загрязнители.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 12-04-00862, 14-04-10095 К)

1. Чикаловец и др. (2012) *Химия природ. соед.* 6: 933–936.
2. Kovalchuk *et al.* (2013) *Fish Shellfish Immunol.* 35: 1320–1324.

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ КРАХМАЛА И БЕЛКА В РАЗЛИЧНЫХ СОРТАХ РИСА

Жукова Н.И., Цой Е.А., Систерова А.В.

Дальневосточный федеральный университет, Школа педагогики. Уссурийск.  
zhukova-45@mail.ru

Одним из основных показателей пищевого качества риса является количественное соотношение в нем содержания крахмала и белка, которое зависит от сортовых особенностей растений, климатических факторов и условий выращивания. Крахмал представляет собой смесь двух фракций: растворимой в воде амилозы – внутренняя часть крахмального зерна (20–30%) и нерастворимого амилопектина – оболочка крахмального зерна (70–80%). Амилоза составляет меньшую часть крахмального зерна риса, но именно она, а не амилопектин, определяет его основные свойства – способность зерен к набуханию и стабилизации вязкости клейстеров. Белок в рисовой крупе составляет 5–13% от сухого вещества.

Целью настоящего исследования было определение количественного содержания составных частей крахмала (амилозы и амилопектина) и белка для выявления качества зерна Приморских сортов риса. Объектом изучения явились сухие семена пяти районированных в Приморском научно-исследовательском институте сельского хозяйства РАСХН сортов риса.

Работу вели с зерновкой, которую обрушивали, снимали цветковую оболочку, измельчали в лабораторной мельнице. Определение количества крахмала производили по Н.И. Проскурякову и А.Н. Кожевниковой [1]. Количественное содержание амилозы в пробе определяли по методу Джулиано [2]. Массовую долю белка измеряли биуретовым методом в модификации Дженнинга [1]. В зерне рассматриваемых сортов риса прослеживается корреляция между количеством белка и крахмала. Так рис сорта Приозерный 61 содержит наименьшие количества белка и крахмала (7.5% и 63.0% соответственно), а рис сорта Луговой – наибольшие (9.0% и 67.0% соответственно). Однако относительная изменчивость содержания белка выражена несколько слабее, составляющей крахмала – амилозы. По количественному содержанию амилозы все исследуемые сорта можно отнести к группе низкоамилозных (от 10,8 до 15.2%). Известно, что при производстве детского питания необходима крупа, полученная из сортов риса с лёгкой усвояемостью питательных веществ, – это глютинозные сорта риса, т.е. сорта с наименьшим содержанием амилозы. Таковыми являются сорта риса Дарий 23 (10.8%) и Луговой (11.6%). К сортам, обладающим наибольшей питательной ценностью, можно отнести сорта риса с наивысшим содержанием амилозы Приозерный 61 (15.2%) и Ханкайский 52 (14.4%).

1. Методы биохимических исследований растений / Под ред. Л. И. Ермакова. - Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
2. Juliano (1971) *Cer. Sci. Today*. 16 (10): 334–340.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ $\beta$ -ГЛЮКОЗИДАЗЫ РАСТЕНИЙ ГОРОХА: ВЫДЕЛЕНИЕ, СВОЙСТВА, РОЛЬ ПРИ АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ

*Фатуллаева А.С., Ершова А.Н.*

Воронежский государственный педагогический университет. Воронеж.

*aynur\_fatullaeva@mail.ru*

В растениях гороха обнаружена  $\beta$ -глюкозидаза (КФ 3.2.1.21), участвующая в расщеплении ИС-гликозида [1], представленная цитоплазматической и связанными с клеточными стенками молекулярными формами [2]. Адсорбированную форму фермента выделяли из фракций клеточных стенок проростков гороха 0.2 М фосфатно-цитратным буфером рН 6.0, а ионосвязанную форму – 1 М NaCl. Активность  $\beta$ -глюкозидазы определяли с р-НФГ и выражали в Е/мг белка. Методами дифференциального центрифугирования, высаливания сульфатом аммония и гель-хроматографии на G-25 и G-100 были получены электрофоретически гомогенные препараты адсорбированной формы (степень очистки 62.5, активность 906.25 Е/мг белка) и ионосвязанной формы (степень очистки 85.7, активность 329.1 Е/мг белка). Установлено, что при действии на растения гипоксии (6 часов) не изменялись объемы и скорость элюции ферментных препаратов с хроматографических колонок, а также величины Rf при нативном электрофорезе. Электрофорез с SDS показал, что обе формы  $\beta$ -глюкозидазы являлись мономерами с  $M_r$  42 кДа (адсорбированная) и  $M_r$  30.9 кДа (ионосвязанная). Температурный оптимум для обеих молекулярных форм фермента был равен +37 °С, а рН-оптимум – 4.8 и 4.6 соответственно. При действии гипоксического стресса на проростки отмечался сдвиг оптимумов рН для адсорбированной формы с 4.8 до 4.6, а для ионосвязанной с 4.6 до 4.3.  $\beta$ -Глюкозидаза не расщепляла  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактопиранозиды, но гидролизовала 1-4 и 1-6 связи в  $\beta$ -D-глюкопиранозидах (салицин, ИС-гликозид, метил- $\beta$ -D-гликозид), ди- и полисахаридах. В условиях гипоксии наблюдалось увеличение скорости расщепления р-НФГ, ИС-гликозида, целлобиозы, что отражалось на величинах  $K_m$  и  $V_{max}$ . При этом увеличивалась устойчивость  $\beta$ -глюкозидазы к действию пероксида водорода (0.5 мМ), накапливающегося при гипоксии. Возрастала и трансгликозидазная активность обеих молекулярных форм фермента в присутствии бутанола. У аэрируемых растений она проявлялась и в присутствии этанола и пропанола. Полученные данные показали, что при гипоксии у проростков существенно изменялись физико-химические свойства связанных с клеточной стенкой молекулярных форм фермента, что играет важную роль в процессах адаптации растений.

1. Ершова А.Н., Баркалова О.Н. (2011) *Прикл. биохим. микробиол.* 47: 258–267.
2. Ершова А.Н., Фатуллаева А.С. (2012) *Сорбционн. и хроматограф. процессы.* 12: 958–965.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К ЛИПОПОЛИСАХАРИДУ У ЛЮДЕЙ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ТУЛЯРЕМИИ

Ляпина А.М.<sup>1</sup>, Хижнякова М.А.<sup>1</sup>, Федорова В.А.<sup>1</sup>, Мотин В.Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт Россельхозакадемии. Саратов.

<sup>2</sup> Университет Техаса, Медицинский Факультет. Галвестон, США.  
feodorovav@mail.ru

Несмотря на то, что многие исследователи показали продолжительное сохранение поствакцинального иммунитета при иммунизации против туляремии, ревакцинация вакциной живой туляремийной сухой, согласно инструкциям, проводится каждые пять лет. В то же время, многократное введение вакцины может вызывать гиперактивацию или, наоборот, угнетение иммунной системы вакцинированного.

Целью данной работы была оценка специфического гуморального иммунного ответа у вакцинированных против туляремии и анализ факторов, влияющих на его формирование (кратность вакцинации, продолжительность периода после последнего введения вакцины, контакт с *F. tularensis* и ее антигенами). Для этого в непрямом ТИФА определяли специфические антитела к иммунодоминантному антигену туляремийного микроба – липополисахариду (ЛПС), выделенному из бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, в сыворотках 11 вакцинированных доноров и 2 не вакцинированных доноров контрольной группы. Вакцинированные доноры были разделены на группы по кратности вакцинаций и сроку после последнего введения вакцины: i) 1 вакцинация и 9–10 лет после последней иммунизации, ii) 1 вакцинация и 14–15 лет, iii) 2 вакцинации, 29–30 лет, iv) 4–5 вакцинаций, 15–20 лет, v) 6–7 вакцинаций, 3–4 года после последней иммунизации.

Специфические антитела были зарегистрированы у всех вакцинированных доноров в диапазоне титров 1 : 400 – 1 : 6400, тогда как у контрольных доноров антитела к ЛПС не определялись или были не выше титра 1 : 200. При этом у вакцинированных доноров не было отмечено выраженного увеличения/снижения титров в зависимости от кратности вакцинации: 1 : 400–1 : 6400 в группах с однократным введением вакцины, 1 : 800 – 1 : 6400 – у многократно (2–7 раз) вакцинированных против туляремии. Продолжительный контакт с патогеном (работа с возбудителем туляремии или его антигенами) или его отсутствие также не оказывали выраженного влияния на уровень специфического гуморального ответа. В то же время титры антител имели тенденцию к некоторому снижению по прошествии 29–30 лет после последнего введения вакцины и регистрировались на уровне 1 : 800, что свидетельствует о чрезвычайно длительной циркуляции антител у вакцинированных и важной роли ЛПС туляремийного микроба в формировании стойкого иммунитета против туляремии.

## СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИРОДНОГО ПОЛИСАХАРИДА ИЗ *Radix Astragali*

Генералов Е.А.

МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики.

Москва.

Generals1179@gmail.com

Углеводы являются важнейшим классом биологических молекул и обладают массой полезных биологических свойств [1]. Несмотря на очевидный интерес ученых к данной проблеме остается много нетривиальных вопросов и задач: механизм действия, установление структуры, выделение активной части, очистка и др.

Основные задачи данной работы: определение биологической активности полисахарида молекулярной массой 5–10 кДа, выделенного из *Radix Astragali*, установление моносахаридного состава и спектральных характеристик полисахарида, стимулирующего прорастание семян, рост и устойчивость растений к патогенам.

Моносахаридный анализ проводился с использованием стандартного метода ВЭЖХ. Для изучения спектральных характеристик использовался спектрофотометр RAffinity-1 FTIR. Образцы исследовали в диапазоне от 4000 до 400 см<sup>-1</sup>. Биологическая активность изучалась на следующих сортах семян: огурцы (*Cucumis sativus L.*), кукуруза (*Zea mays L.*), соя (*Glycine max L.*).

Проведенное исследование показало, что моносахаридный состав полисахарида: GalA – 19.2%, Rha – 20%, Glc – 15%, Gal – 25%. Количество углеводов в молекуле не менее 80%, белков – 5%.

Наличие сильного поглощения на 1042 см<sup>-1</sup>, среднего поглощения на 1379 см<sup>-1</sup>, поглощений на 833, 880, 920 см<sup>-1</sup> и 1454 см<sup>-1</sup> в ИК-спектре означает, что в веществе присутствует галакторамноглюкан [2]. В ИК-спектре углевода присутствуют характерные для полисахаридных структур полосы поглощения [3].

При применении полисахарида в методе «с увлажнением» процент всхожести семян на 1.5 сутки увеличился по сравнению с контролем: для семян огурцов с 20 до 100%, кукурузы с 16 до 87%, сои с 23 до 94%. Длина корня измерялась на 6 сутки. Помимо увеличения длины корня, наблюдалось увеличение опушенности и мочковатости. Для огурцов удлинение составило до 2.1 раза, для кукурузы – до 2.4 раз, для сои до 1.9 раза.

Полисахарид является галакторамноглюканом, способен стимулировать прорастание семян и увеличивать длину корневой системы.

1. Генералов (2014) *Биофизика*. 2.
2. Kasurakova *et al.* (2000) *Carbohydrate Polymers*. 43: 195–203.
3. Sekkal *et al.* (1995) *J. Mol. Struct.* 349: 349.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ ИЗОМАЛЬТУЛОЗЫ С ПРЕБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

*Гойкалова О.Ю., Корнеева О.С.*

Воронежский государственный университет инженерных технологий. Воронеж.

Проблема получения безвредных натуральных сахарозаменителей с пребиотическими свойствами с целью создания функциональных продуктов питания является одной из важнейших медико-социальных проблем профилактики и лечения различных заболеваний. Изомальтулоза (6-О- $\alpha$ -D-глюкопиранозид-D-фруктоза) – редуцирующий дисахарид, молекулярная масса, вкус и внешний вид которой схожи с сахарозой. Основными факторами, определяющими растущий интерес к изомальтулозе, являются низкий гликемический индекс (2 ед.), низкая калорийность (2 ккал/г), безвредность для организма, некариогенность, отсутствие постороннего или горького привкуса, натуральное происхождение. На кафедре биохимии и биотехнологии ВГУИТ разработана биотехнология изомальтулозы с применением высокоактивного фермента бактериального происхождения [1]. В результате скрининга был выбран продуцент изомальтулозосинтазы – бактерии рода *Erwinia*, каталитическая активность фермента – 3000 Е/г, что в 20–30 раз превышает значение таковой среди известных продуцентов фермента. Подобраны оптимальные условия для глубинного культивирования бактерий и биосинтеза ими изомальтулозосинтазы, что позволило увеличить исходный уровень активности фермента в 1,5–2 раза. Разработана схема очистки изомальтулозосинтазы, при которой удельная активность фермента составляет 3560 Е/мг белка. Установлены оптимальные значения рН и температуры изомальтулозосинтазы. Разработаны рациональные условия процесса биотрансформации сахарозы свекловичного происхождения, а также тростникового сахара-сырца с использованием изомальтулозосинтазы, позволяющие увеличить выход изомальтулозы до 92–95%. Выявлено, что культивирование бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum in vitro* на среде с содержанием изомальтулозы отличается высокой активностью их роста, уровнем накопления биомассы, продукцией органических кислот, что свидетельствует о пребиотических свойствах данного заменителя сахара [2]. В результате проведенной работы получен натуральный заменитель сахара из источников растительного сырья, биотехнология которого может быть положена в основу его промышленного производства.

1. Корнеева, Божко. (2009) *Вестник ОГУ*. 4: 130–134.
2. Корнеева и др. (2008) *Биотехнология*. 2: 46–50.

## СПОСОБ АНАЛИЗА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК С МАКРОМОЛЕКУЛАМИ

Жданов Р.И., Ибрагимова М.Я.

Казанский (Приволжский) федеральный университет. Казань.  
zrenad@gmail.com

Мы предлагаем новый способ качественного и количественного анализа липидов, прочно связанных с геномной ДНК, заключающийся в том, что на надмолекулярный комплекс ДНК, представляющий собой комплекс, состоящий из четырех типов биомакромолекул, последовательно действуют гидролизующими ферментами и проводят жирнокислотный анализ липидной фракции [1].

О свойствах таких надмолекулярных комплексов геномной ДНК известно, что ДНК в них характеризуется высокой молекулярной массой, и состоят они, по крайней мере, из четырех типов биомакромолекул: РНК (10–15 весовых %), белков (1–3 %), липидов (1–3 %), остальное представляет собой ДНК.

В настоящее время известен ряд биохимических методов выделения природных надмолекулярных комплексов ДНК-липиды из различных источников, а именно: фенольный метод с использованием экстракции примесей насыщенным водным раствором фенола и детергентный метод выделения фракции липидов прочно связанных с ДНК без использования фенола [2].

В работе мы исследовали природу взаимодействия комплексов липидов и ДНК. С этой целью выделяли фракции липидов связанные с прокариотической ДНК, а именно – фракцию слабо- и фракцию прочно связанных с ДНК липидов и исследовали жирнокислотный состав прочно связанной фракции.

Мы предлагаем новый биохимический подход – обработку препарата нкДНК, выделенного из *Pseudomonas aurantiaca*, параллельно различными ферментами, гидролизующими или ДНК, или РНК, или белки (протеиназа К).

Выявили, в частности, что основными компонентами жирнокислотного состава ДНК-связанных липидов препарата геномной ДНК, выделенного детергентным методом, являются кислоты – 16:0, 18:0 и 10:0, а 11:0 2ОН, 13:1 и 13:0 2ОН кислоты содержатся в меньшем количестве. Гидроксикислоты – 11:0 2ОН и 13:0 2ОН входят в состав липидов, связанных с белками; 14:1ω5с – связанных с белками и РНК, а 15:1ω8с – связанными с ДНК.

Полученные результаты впоследствии могут быть использованы при разработке новых методов диагностики заболеваний по липидному коду ДНК пациента или при разработке новых типов лекарственных средств.

Работа поддержана грантами РФФИ 12-03-97089-р\_поволжье\_a (2012–2014), К(П)ФУ – Минобрнауки РФ, тема № бюджет Ф11-02 (2011); К(П)ФУ – Минобрнауки РФ, тема № гос. рег. 021000026, № бюджет 12-26 (13-64), НД02, ВД 0210 (2012–2014).

1. Жданов и др. (2014) Патент РФ № 2506314 от 10.02.2014 г.

2. Zhdanov *et al.* (2006) *FEMS Microbiol. Lett.* 265: 151–158.

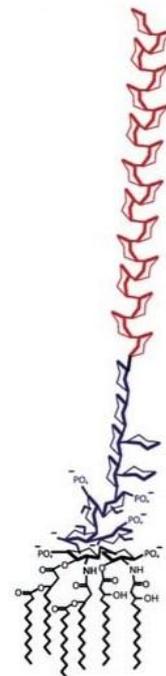
## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КДО В СОСТАВЕ НЕТОКСИЧНЫХ И ТОКСИЧНЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

*Кабанов Д.С., Зубова С.В., Прохоренко И.Р.*

Институт фундаментальных проблем биологии РАН. Пущино.

kabanovd1@rambler.ru

В настоящее время в мировой литературе активно рассматривается возможность участия 2-кето-3-дезоксиктулозоновой кислоты (КДО) как самостоятельной биологически активной структуры в составе липополисахаридов (ЛПС, эндотоксины), влияющей на ответы клеток врождённого и приобретённого иммунитета [1]. Наличие заместителей в КДО может влиять на ее биологическую активность. Эндотоксины различаются по составу О-антигена, олигосахарида кора, липида А и количеством КДО [2]. В связи с этим нами был проведён сравнительный анализ спектральных характеристик хромофоров, образующихся при взаимодействии продуктов окисления КДО с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [3; 4], нетоксичного ЛПС из *Rhodobacter capsulatus* PG (ЛПС<sub>Rb.cap</sub>) [5] и токсичных ЛПС из *Escherichia coli* (ЛПС<sub>E. coli</sub>) и из *Salmonella typhimurium* (ЛПС<sub>Salm</sub>). В качестве стандарта использовался коммерческий препарат КДО (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub>·NH<sub>3</sub>). Максимум поглощения хромофора, образующегося при мягком кислотном гидролизе ЛПС<sub>Rb. cap</sub>, регистрировался при 550 нм и был спектрально идентичен стандарту КДО. При окислении токсичных ЛПС максимум поглощения хромофора смещался в коротковолновую область до 534 нм. Относительная массовая доля КДО в ЛПС<sub>Rb. cap</sub> меньше, чем в ЛПС<sub>E. coli</sub> и ЛПС<sub>Salm</sub>. Известно, что в состав ЛПС<sub>Rb. cap</sub> входят сиаловые кислоты [6], которые также образуют хромофор при реакции с ТБК. Однако, вклад сиаловой кислоты в интенсивность поглощения хромофора только 5–9 % от такового для КДО [4]. Для образования хромофора при реакции с ТБК гидроксильные группы КДО в положениях О-4 и О-5 должны быть свободными [7]. Если в положении О-5 находится заместитель (Нер, Ман), то положения О-4, О-6 и О-7 должны быть свободными [7]. Из полученных данных следует, что КДО в ЛПС<sub>Rb. cap</sub>, связанная с липидом А и внутренним кором, не имеет заместителей.



1. Krishnan and Choi (2012) *Genomics Inform.* 10: 153–166.
2. Lodowska *et al.* (2009) *Polish J. Microbiol.* 58: 21–27.
3. Osborn (1963) *PNAS USA* 50: 499–506.
4. Karkhanis *et al.* (1978) *Anal. Biochem.* 85: 595–601.
5. Прохоренко и др. (2005) *ДАН* 402 (6): 838–840.
6. Книрель и др. (1993) *Биохимия.* 58 (2): 182–201.
7. Charon *et al.* (1972) *Eur. J. Biochem.* 29: 184–187.

## ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРЕ ПЛАЗМИДЫ AZOBR\_p6 У МУТАНТОВ БАКТЕРИИ *Azospirillum brasilense* Sp245 ПО ОБРАЗОВАНИЮ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА I И СВЯЗЫВАЮЩИХ КАЛЬКОФЛУОР ПОЛИСАХАРИДОВ

*Кацы Е.И.*<sup>1</sup>, *Прилипов А.Г.*<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Саратов.

<sup>2</sup> НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава РФ. Москва. ei\_katsy@mail.ru

Азоспириллы распространены в разнообразных местообитаниях, в том числе, в фитосфере. Известно, что гликополимеры важны для поддержания структурно-функциональной целостности бактерий и их взаимодействий с другими организмами. У бактерий штамма *A. brasilense* Sp245, крупный геном которого почти полностью секвенирован [1], выявлены липополисахариды LpsI и LpsII с гомополимерным O-полисахаридом (ОПС) [2] и тонкими различиями в структуре/заряде ОПС и/или кора [3, 4]. Капсульные полисахариды и экзополисахариды азоспирилл связывают краситель калькофлуор, что облегчает идентификацию мутантов по их продукции (Cal<sup>-</sup> фенотип) [3]. Все репликоны штамма Sp245 содержат предсказанные гены синтеза гликополимеров, но своеобразным резервуаром таких генов оказалась плаزمида AZOBR\_p6 [1] (a.k.a. 120-МДа плазмиды, или p120 [5]). Необходимы экспериментальные данные о конкретной роли плазмидных локусов в образовании мажорных гликополимеров азоспирилл. Поэтому целью настоящей работы явился анализ изменений в структуре AZOBR\_p6 у инсерционных мутантов [3] штамма Sp245, утративших LpsI с негативным зарядом углеводной части. Установлено, что у LpsI<sup>-</sup> мутанта KM348 инактивирован ген AZOBR\_p60094, кодирующий белок с консервативным доменом GT1\_LPS\_heptosyltransferase, характерным для ферментов синтеза внутреннего кора Lps (cd03789) (YP\_004987638). У LpsI<sup>-</sup> Cal<sup>-</sup> мутанта KM252 инактивирован ген AZOBR\_p60120, кодирующий белок с доменами WcaA/GT2\_RfbC\_Mx\_like и Glyco\_tranf\_2\_3/GT-A (YP004987664). По-видимому, эта гликозилтрансфераза участвует в синтезе и Lps, и полисахаридов, связывающих калькофлуор.

1. Wisniewski-Dyé *et al.* (2011) *PLoS Genet.* 7: e1002430.
2. Fedonenko *et al.* (2002) *Carbohydr. Res.* 337: 869–872.
3. Katzy *et al.* (1998) *Plasmid.* 40: 73–83.
4. Fedonenko *et al.* (2004) *Microbiology.* 73: 180–187.
5. Katsy *et al.* (2010) *Microbiology.* 79: 216–222.

## **ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА УГЛЕВОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ХЛОПКОВОЙ ТЛИ**

*Калимбетова Р.Ю., Воропаева Н.Л., Константинова Л.Г.*

Каракалпакский государственный университет им. Бердаха. Республика Каракалпакстан. Нукус.

Rayhan\_67@mail.ru

Хлопчатник – самая распространенная техническая культура в Узбекистане. Новейшие подходы к возделыванию этой культуры включают разработку комплексных агрохимических приемов, в том числе применение современных средств защиты растений. Тем не менее, проблемы, связанные с жизнедеятельностью насекомых-вредителей, вызывающих формирование клейкости волокна сырца, являются причиной существенного снижения урожайности культуры хлопчатника и, как следствие, приводят к большим экономическим потерям.

В процессе роста и развития растения хлопчатника выделяют ряд метаболитов, в том числе производные липидов, белков и углеводов, которые, в свою очередь, являются благоприятной средой для развития различных групп микроорганизмов и насекомых-вредителей. При этом образуются так называемые «ловушки», в которых формируется своеобразный биоценоз – симбиотическое сообщество растений, микроорганизмов и хлопковой тли.

Исследования процессов, связанных с формированием «ловушек», химического состава метаболитов, выделяемых микроорганизмами и тлями, анализ микробиоты, характерной для экосистемы, являются чрезвычайно актуальными.

При образовании «ловушек» на хлопчатнике под воздействием тлей определяющее значение для формирования видового разнообразия и успешного развития микробиоценоза имеет состав метаболитов, выделяемых насекомыми, и продуктов деструкции растительного материала. При этом существенный вред растениям хлопчатника и качеству волокна хлопка-сырца наносят непосредственно микроорганизмы.

В данной работе представлены результаты исследования метаболитов углеводной природы в выделениях тлей на растениях хлопчатника. На количественное содержание и соотношение отдельных углеводов в выделениях тлей существенно влияли возраст, условия питания, конкретный экотоп тли на растении и ряд других факторов. В целом группа углеводов превалировала над другими метаболитами и составляла до 90% от всех выявляемых веществ. В ходе хроматографического анализа в выделениях тли нами были выявлены: рамноза, ксилоза, фруктоза, глюкоза, сахароза, мальтоза, лактоза.

## ФИТОЛЕКТИНЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

*Канделинская О.Л.<sup>1</sup>, Грищенко Е.Р.<sup>1</sup>, Шуканова Н.А.<sup>2</sup>, Молчан М.М.<sup>2</sup>,  
Кухарева Л.В.<sup>3</sup>, Белый П.Н.<sup>3</sup>, Кот А.А.<sup>3</sup>, Разлуцкий В.И.<sup>4</sup>*

<sup>1</sup> Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси. Минск.

<sup>2</sup> Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Минск.

<sup>3</sup> Центральный ботанический сад НАН Беларуси. Минск.

<sup>4</sup> Научно-практический центр по биоресурсам НАН Беларуси. Минск.

okandy@yandex.ru

Необходимость разработки высокочувствительных методов диагностики онкологических заболеваний не вызывает сомнений. Особый интерес в этом плане представляет исследование специфических изменений белок-углеводных взаимодействий при онкотрансформации, поскольку существует взаимосвязь между биологическими особенностями трансформированных клеток, в частности, степенью их адгезивных и миграционных свойств, и молекулярным строением рецепторов. Предполагается, что структура и свойства гликоконъюгатов, как важнейшей составляющей клеточных рецепторов, имеют определенное значение для диагностики онкологических заболеваний. Так, избыточное сиалирование поверхности опухолевых клеток сопряжено со снижением их адгезивных свойств, и коррелирует с уровнем метастазирования опухолей [1].

Целью работы являлась разработка подходов для использования гликопротеидов семейства фитолектинов в качестве возможных маркеров структурных особенностей рецепторного аппарата клеток при онкотрансформации. Для этого исследовали характер взаимодействия лектинов гороха посевного, арахиса, зародышей пшеницы («Лектинотест», Львов) и выделенного нами Man/Glc-специфичного лектина из аира – *Acorus calamus* L. [2] с клетками рака молочной железы человека (РМЖ) люминального Б, Нер-позитивного, базальноподобного подтипов, которые характеризуются наличием или отсутствием рецепторов эстрогенов (ER), прогестерона (PR) и показателя онкогена Her-2/neu, по активности в них фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) [3].

Установлено, что уровень лектин-индуцированного ингибирования активности АХЭ значительно варьировал в зависимости от молекулярно-генетического подтипа опухоли и углеводной специфичности лектинов. Обсуждаются возможные механизмы ингибирования АХЭ фитолектинами и подходы для их использования в комплексной диагностике РМЖ.

Работа поддержана грантом БРФФИ № Б13-143.

1. Пашенко и др. (2002) *Онкология*. 4(1): 21–24.
2. Bains *et al.* (2005) *Int. Immunopharmacol.* 5(9): 1470–1478.
3. Ruiz-Espejo *et al.* (2002) *Breast cancer research and treatment*. 72: 11–22.

## LECTINS AS PUTATIVE DNA-PROTECTIVE SUBSTANCES

*Lylo V.V., Karpova I.S., Kotsarenko K.V., Ruban T.A., Macewicz L.L., Lukash L.L.*  
Institute of Molecular Biology and Genetics NASU. Kiev, Ukraine.  
karpova\_is@mail.ru

Genomes of living organisms are constantly affected by exogenous and endogenous factors, which lead to generating cytotoxic, carcinogenic and/or mutagenic DNA lesions. However cells possess a number of protective mechanisms directed against DNA damage. On the other hand many natural compounds are known as antimutagenic agents preventing changes in DNA by different mechanisms including modulation of DNA repair function. Recently the carbohydrates are in focus of glycodeception being the carriers of crucial information essential for the development, differentiation, proliferation, intercellular interaction and other fundamental functions in cells and complex organisms [1]. So, lectins, a very large group of universally occurring cell-agglutinating proteins that recognize and specifically bind to carbohydrates /glycoconjugates, are considered to be regulators of wide spectrum of processes based on carbohydrate-protein recognition [2].

The aim of our work is to investigate one of the poor studied aspects of lectin effect, namely their possible influence on DNA repair system. As a model the repair enzyme O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) was used. It plays a key role in the repair of primary DNA damages caused by alkylating compounds [3].

The commercial preparations (Lectinotest, Lviv, Ukraine) of animal (perch eggs lectin PFA-F) and plant (elderberry bark lectin SNA-I, lentil seed lectin LCA) origin were used as modulators of *MGMT* gene expression in human cells *in vitro*. The following cell cultures were used: non-tumor fibroblast-like (4BL), and larynx cancer standard (Hep2) cell lines. *MGMT* gene expression at a protein level was studied by Western blot analysis. Lectins studied were both animal and plant origins. All of them were shown to modulate the expression of proteins recognizable by anti-MGMT monoclonal antibodies. The result depended on a cell line, lectin origin and its concentration. In non-tumor cells all the lectins studied were shown to enhance the level of the MGMT proteins. The most significant effect was detected in LCA-treated cells, and the least one in SNA-I-treated cells. 4BL cells having induced secondary genomic instability were shown to be more sensitive to SNA-I modulating action. However, in malignant cells both up- and downregulating effects of SNA-I lectin was described. SNA-I at high (2-80 mkg/ml) concentrations caused the substantial increase of MGMT expression level and suppressed it at low (0.2 mkg/ml) concentration. So SNA-I is perspective for futrther study as potential drug in anti-tumor therapy optimization schemes.

1. The Sugar Code: Fundamentals of Glycosciences (ed. by H.J. Gabius) Wiley-Blackwell; 2011, 597 p.
2. Лахтин и др. (2009) *Вестник Российской АМН*. 3: 36–43.
3. Pegg (2011) *Chem. Res. in toxicol.* 24(5): 618–639.

## ТЕРМОДИНАМИКА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ И ПРОЦЕССА ИХ ПЛАСТИФИКАЦИИ

*Каптанов Е.А., Урьяш В.Ф., Кокурина Н.Ю., Ларина В.Н.*

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Научно-исследовательский институт химии. Нижний Новгород.  
su2101@rambler.ru

Методами низкотемпературной адиабатной калориметрии, калориметрии сгорания и дифференциального термического анализа (ДТА) измерена теплоемкость в области 6(10)–330 К, рассчитаны термодинамические характеристики (энтальпия, энтропия и функция Гиббса) в области от  $T \rightarrow 0$  К до 330 К, определена стандартная энтальпия сгорания, рассчитана стандартная энтальпия образования и определены температура релаксационных и фазовых переходов целлюлозы и ее производных в области 80–600 К. Исследованы следующие углеводы: древесная и микрокристаллическая хлопковая целлюлоза, ацетаты целлюлозы разной степени ацетилирования, нитраты целлюлозы хлопковой и древесной с различным содержанием азота, агар, агароза, крахмал, амилоза, амилопектин, пектин, инулин, хитин крабовый полученный из панциря крабов различных семейств (*Atelecyclidae*, *Litodidae*, *Majidae*, *Oregoniidae*) и *Paralithodes camtchaticus* на разных стадиях развития краба, а также грибной хитин из плодовых тел гриба вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*, класс *Basidiomycetes*), полученный из хитина хитозан.

У целлюлозы и ее производных обнаружен спектр релаксационных переходов – два температурных интервала стеклования ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ),  $\beta$ - и  $\gamma$ -переходы. Они обусловлены сложной молекулярной и надмолекулярной структурой изученных полисахаридов, которые содержат аморфные и высокоупорядоченные микрообласти.  $\beta$ -Переход связан с либрацией пиранозных колец вокруг глюкозидных связей, а  $\gamma$ -переход – с колебаниями боковых привесков к основной цепи. Температуры их релаксационных переходов повышаются пропорционально содержанию ацетатных и нитрогрупп, а также зависят от вида исходного сырья. В хитине они изменяются в зависимости от видоспецифичности семейств крабов, стадий их развития и возраста грибов.

Пластификаторы (вода, эфиры фталевой кислоты, касторовое масло, бетулин и др.) оказывают влияние на температуры релаксационных переходов полисахаридов. Калориметрическим методом по энтальпии плавления фазы пластификаторов, не растворившихся в полимере, определили предел их растворимости в полисахаридах. Построены и проанализированы диаграммы физических состояний систем полисахарид–пластификатор.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №14-04-01871-а.

# ISOLATION, IDENTIFICATION AND PREDICTION OF POSSIBLE ROLE IN HUMAN HEALTH OF GLYCOPOLYMERS FROM *Saccharomyces cerevisiae* BIM Y-195 INTERACTING SELECTIVELY WITH HUMAN SERUM ANTIBODIES AGAINST THYROID ANTIGENS

Kiseleva E.P.,<sup>1</sup> Mikhailopulo K.I.,<sup>1</sup> Novik G.I.,<sup>2</sup> Zdrovenko E.L.,<sup>3</sup> Shashkov A.S.,<sup>3</sup>  
Knirel Y.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus. Minsk.

<sup>2</sup>Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus. Minsk.

<sup>3</sup>N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences. Moscow.

epkiseleva@yandex.ru

Earlier, we have found that some non-protein biopolymers (BPs) of a biotechnologically promising strain of wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* BIM Y-195 interact selectively with human serum autoantibodies to thyroid peroxidase (anti-TPO) and thyroglobulin (anti-Tg) in the presence of an excess of other human immunoglobulins and compete with natural antigens for the binding of anti-TPO and anti-Tg in ELISA [1]. Since anti-TPO and anti-Tg are well known serological markers of autoimmune thyroid diseases (ATD), our data [1] suggest a possible role of the BPs in ATD pathogenesis/treatment.

In this work, a cell-wall free fraction of *S. cerevisiae* BIM Y-195 was used for isolation of the BPs interacting selectively with anti-TPO (BP<sub>anti-TPO</sub>) and anti-Tg (BP<sub>anti-Tg</sub>). The fraction was obtained by sonication of yeast cells followed by high speed centrifugation. The crude BP<sub>anti-TPO</sub> and BP<sub>anti-Tg</sub> were isolated by affinity chromatography with either anti-TPO or anti-Tg autoantibodies, respectively, and fractionated by gel filtration on TSK HW-40 with refractometric detection. The ELISA data suggest that 5000-7000-Da fractions of crude BP<sub>anti-TPO</sub> and BP<sub>anti-Tg</sub> contain BP<sub>anti-TPO</sub> and BP<sub>anti-Tg</sub>, respectively. Analysis by two-dimensional NMR spectroscopy, including a <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-heteronuclear single-quantum coherence experiment, indicated that both substances are linear  $\alpha$ -1,6-glucans. The data obtained demonstrate an immunological similarity of the protein thyroid antigens and glycopolymers of *S. cerevisiae* BIM Y-195 and suggest a possible role of the wine yeast either in pathogenesis of ATD (induction of autoimmunity via the molecular mimicry mechanism, as it was shown for pathogenic bacteria/viruses [2]) or ATD treatment via binding of anti-TPO and anti-Tg autoantibodies implicated in thyroid gland destruction [3].

This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant X10P-130) and Russian Foundation for Basic Research (grant RFBR-BEL\_A No. 10-04-90047)

1. Kiseleva *et al.* (2012) *Vesti NAN Belarusi, ser. chem. sc.* (4): 112–117 (in Russ.).
2. Tozzoli *et al.* (2008) *Autoimmun. Rev.* 8(2): 112–115.
3. Rebuffat *et al.* (2008) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(3): 929–934.

## АНАЛИЗ ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ГЛИКОНАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ БЛАГОРОДНЫХ МЕТАЛЛОВ

*Самойлова Н.А., Пискарев В.Е., Краюхина М.А.*

Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова РАН.

Москва.

kmalexster@gmail.com

Специфические оптические свойства наночастиц золота и серебра открывают возможности для создания высокочувствительных биоселективных элементов, в частности, биоспецифических сенсоров на основе металлополимерных гликонаночастиц, с целью их дальнейшего использования в биомедицине для изучения углевод-белкового взаимодействия, в том числе для идентификации лектинов клеточной поверхности, а также в различных вариантах иммуноанализа.

Наиболее эффективное связывание углеводов с лектинами достигается за счет поливалентного взаимодействия углеводного кластера с олигомерными белковыми субъединицами в составе лектина. Такие кластеры могут образовываться при получении гликонаночастиц на основе гликосинтонов и различных синтетических полимеров и биополимеров.

В настоящей работе были получены плазмонно-резонансные гликонаночастицы благородных металлов (золота, серебра), стабилизированные и функционализированные неогликоконъюгатами на основе полимеров.

В качестве полимеров были выбраны: белок – альбумин, а также синтетические биосовместимые сополимеры малеиновой кислоты с N-винилпирролидоном и этиленом (МК-сополимеры). Достоинством выбранных полимеров является их доступность, способность к образованию различного рода ионных и координационных связей, а также простота их химической модификации. Неогликоконъюгаты были синтезированы путем введения ряда аминофункционализированных моно- и олигосахаридов (аминогликосинтонов) в структуру альбумина и сополимеров малеиновой кислоты.

На основе неогликоконъюгатов нами были синтезированы гликонаночастицы золота и серебра, содержащие углеводные детерминанты ряда лектинов ( $\beta$ -D-Gal,  $\beta$ -D-GlcNAc, а также фукоантигены – Н тип 1, Н тип 6, Le<sup>x</sup> и Le<sup>b</sup>). Показано связывание гликонаночастиц с рядом известных лектинов (лектин проростков пшеницы, картофеля, арахиса, клещевины), а также изучено взаимодействие с различными малоисследованными фуколектинами (окуня, судака, ряда грибов).

## ОЛИГОСАХАРИНЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ РАСТЕНИЙ – РЕГУЛЯТОРЫ ПРОЦЕССА КОРНЕОБРАЗОВАНИЯ

Ларская И.А.

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН.  
Казань.

pzl@mail.ru

Клеточные стенки растений являются продуцентами большого количества низкомолекулярных соединений, которые могут функционировать как сигнальные молекулы. Одними из них являются олигосахарины – фрагменты полисахаридов клеточных стенок, которые участвуют в различных физиологических процессах, включая рост, развитие, устойчивость к биотическим и абиотическим факторам, а также регуляция морфогенетических реакций. Однако большинство эффектов, вызванных действием олигосахаридов, описаны для фрагментов, полученных искусственно путем синтеза, либо при гидролизе предварительно выделенных клеточных стенок. В коллективе была разработана методика извлечения олигосахаридов природного происхождения из проростков гороха. В результате многоступенчатой хроматографической очистки были получены нейтральные олигосахариды, имеющие степень полимеризации 10–12 и состоящие преимущественно из арабинозы, глюкозы и галактозы. Полученные фрагменты стимулировали образование адвентивных корней на разных модельных системах: сегментах гипокотилей гречихи, эксплантах из листьев табака, отсеченных корнях кукурузы. Различные комбинации по времени и порядку внесения олигосахарина (5 мкг/мл) и ИУК (3 мкМ) в среду культивирования позволили выявить временные интервалы в процессе формирования корней, отличающиеся дифференциальной чувствительностью к этим эффекторам. Их протяженность зависела от типа экспланта и составляла от нескольких часов (сегменты гипокотилей гречихи) до нескольких дней (экспланты из листьев табака). Наибольший эффект олигосахарина наблюдался при краткосрочной обработке им эксплантов до добавления гормона, в период, когда экспланты наименее чувствительны к ИУК. С использованием трансгенных (*rolB::GUS*) растений табака было показано, что добавление олигосахарина в среду культивирования до гормона вызывало повышение пика GUS-активности (глюкуронидаза) и сокращало время его появления. Поскольку активность фермента является строго ИУК-индуцируемой и отражает чувствительность клеток к ауксину, то наблюдаемый эффект демонстрирует усиление ответной реакции на гормон клеток, предобработанных олигосахаридом еще до появления первых видимых корней.

Обсуждаются возможные механизмы взаимодействия ИУК и олигосахарина в процессе формирования корней.

Работа поддержана Грантом РФФИ (14-04-01591).

## ПРОТИВОСТОЯНИЕ МИКРОБНЫХ ПУЛОВ В БИОТОПАХ ЧЕЛОВЕКА НА ПРИМЕРЕ БАКТЕРИЙ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ТИПА И УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ: ОБЗОР СОБСТВЕННЫХ РАБОТ

Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Лахтин В.М., Байракова А.Л., Алешкин В.А.

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского. Москва.

lakhtinv@yandex.ru

Глубина устойчивости/«буферная емкость» биотопов (способность микробиоценозов быстро возвращаться в норму при дисбалансах, дисбиозах и болезнях) в сочетании с оценкой влияния антимикробных агентов (антибиотиков, про/симбиотических клеток, узнающих метаболитов культур) являются важными прогностическими факторами успешной профилактики или терапии, ускорения реабилитации. *Цель* – разработать экспериментальные подходы (в том числе на основе собственных предложенных концепций), провести анализ внутримикробиоценозных потенциальных противоборствующих взаимоотношений на примере системы «Лактобациллы+Кандиды» биотопов человека, оценить перспективы (в том числе сформулировать стратегии). *Результаты*. Исследовали урогенитальный и прямокишечный биотопы. Проведен родовой (надвидовой), видовой и штаммовый анализы противостоящих друг другу биотопных компартментов пробиотической направленности (лактобациллы *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. brevis*; лектины пробиотических бактерий [ЛПБ] человека) и условно-патогенного (кандиды *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*). Разработаны подходы с использованием пролонгированного холодового стресса с истощением культур гриба (кандид), алгоритма взаимосвязанности ранжирований разных параметров (роста и раннего биопленкообразования в микропанели, эффективности диск-антимикотиков/ЛПБ; для штаммов/видов/рода, лактобацилл, кандид, их смесей, неограниченного числа пар «лактобациллы+кандиды» в микропанели). Предложены обоснованные концепции: поведение дрожжеподобных грибов как коммуникативных тел (области благополучного и неблагополучного выживания, сенсорность пограничных зон, моно- и мультицентровость, ландшафтная симметрия и асимметрия, образная преемственная память, универсальность бинарного ответа «Лакуны–Валы», непрерывность лизиса сплошного массива, распространение сигналов во взаимонаправлениях Центр–Периферия и неравнозначная передача по/против часовой стрелки в периметрических/круговых направлениях, биоритмический микосимбиоз); ЛПБ как имитаторы пробиотиков, члены функционального суперсемейства симбиотических лектинов микроорганизмов, члены нового класса деструкторов биопленок условных патогенов, дистанционные альтернативные антимикотики с мультисинергистическим действием (между типами ЛПБ, между ЛПБ и классическими антибиотиками). Выявлены коммуникативные штаммы лактобацилл и кандид. Предложены противо-грибковые/кандидные стратегии.

## ЛЕКТИНОВЫЕ СИСТЕМЫ В РАСПОЗНАВАНИИ ПОЛИМЕРНЫХ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ ГЛИКОКОНЬЮГАТОВ С ИЗВЕСТНОЙ СТРУКТУРОЙ. ОБЗОР СОБСТВЕННЫХ РАБОТ

Лахтин М.В.<sup>1</sup>, Афанасьев С.С.<sup>1</sup>, Лахтин В.М.<sup>1</sup>, Алешкин В.А.<sup>1</sup>, Корсун В.Ф.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского. Москва.

<sup>2</sup> Институт фитотерапии. Москва.

lakhtinv@yandex.ru

*Цель* – разработать теоретические и экспериментальные подходы (в том числе на основе собственных предложенных концепций), провести анализ и оценить перспективы в направлении изучения взаимодействий систем лектинов (СЛ) и гликоконъюгатов (ГК) на примерах Л пробиотических бактерий и высших растений (ЛПБ и ЛВР), белковогормональных СЛ – С эритропоэтина (ЭПО), псевдополисахаридов (ППС) и псевдополиантигенов (ППА), псевдополи(пептидогликанов) ([www.lectinity.com](http://www.lectinity.com)). *Результаты*. Предложены обоснованные концепции: ассиметричный Л как активный/ векторный, Л как направленная/векторная СЛ, Л как каскад, Л как изменчивый направленный комплекс/ансамбль с переключенными/модулированными и новыми активностями; действие СЛ по принципам демаскирования Л и инициирования ГК-мишенью). Разработаны подходы к получению и анализу хемилюминесцентных кинетических картин узнавания в режиме реального времени в системах СЛ-ГК (дот-блотовый анализ, блотовый после разделения СЛ ИЭФ в пластине ПААГ; оптимизированный блотовый [0.005;% твин вместо БСА; промывки при повышенных температурах; запись хемисигнала «с нуля через максимум до исчезновения»], реконструирование картин частей блота). Исследованы взаимодействие ГК с Л бифидобактерий и лактобацилл, Л из ВР медицинского значения ([www.fitokor.ru](http://www.fitokor.ru)), эндогенными и рекомбинантными С множественных форм ЭПО человека. Выявлены СЛ: слоевые/градиентные/поверхностные/внеклеточные, с низким/высоким сродством к гидрофобным фазам, мажорные и минорные, узнающие сходные/различные/ уникальные ГК, ранжированные по сродству к СЛ ППС (D-Man-alfa-, D-Man-6-P-, L-Fuc-alfa-, D-GalNAc-beta/alfa-), ППА (A<sub>di</sub>-, F<sub>s</sub>-, T-), псевдополи(пептидогликаны)-связывающие, одновременно узнающие/связывающие несколько типов ГК; распознающие ГК с экспонированными в кластерах коротких антенн/ответвлений моно/ди/олигосахаридными терминальными остатками GalNAc в ППА. Установлены: полное рассасывание ЛПБ/ЛВР-иницированных (цито)агглютинатов (зависит от типа ППС[их смеси]/клеток/Л, оптимизации условий) после добавления ГК (1-5 мкг/мл); необходимость применения рабочих концентраций (соответствуют субцитотагглютинирующим дозам, для регистрации узнающих активностей в дот-блотовом анализе), в зависимости от препарата Л; синергизм ГК в узнавании Л-клеточных мишеней и твердофазных СЛ; ГК-антиоксидантная защита иммуносборков, синергизм ГК и МАТ (ЭПО). Перспективы – в развитии анализа системного узнавания био/синтетическими препаратами Л/СЛ и ГК/С ГК (культур, на твердых и в жидких фазах).

## ИНТЕГРАЛЬНАЯ СХЕМА МЕТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДОВ

Малыгин А.Г.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН. Москва.

agmalygin@mail.ru

На схеме [1] представлена сеть реакций метаболизма моносахаридов, в которой систематизация природных моносахаридов по числу карбоксильных групп и атомов углерода в молекулах совмещена с систематизацией по сходству изомерных структур, образуемых оптически активными атомами углерода. В результате сформирована прямоугольная система координат. Ее вертикальную ось составляют приведенные слева названия рядов моносахаридов. В нижней части расположены ряды моносахаридов с L (левой) конфигурацией гидроксильной группы у предпоследнего атома углерода в скелете молекул. В верхней части – ряды моносахаридов с D (правой) конфигурацией гидроксильной группы у того же атома в скелете молекул. Верхние и нижние ряды разделены центральным рядом, включающим моносахариды, двууглеродные фрагменты на концах молекул которых либо оптически неактивны, либо являются оптическими антиподами по отношению друг к другу. L и D ряды подразделяются на три типа: составленные моносахаридами, не содержащими карбоксильных групп, моносахаридами с одной карбоксильной группой и моносахаридами с двумя карбоксильными группами. Горизонтальную ось составляют обозначения, указывающие на число атомов углерода и конфигурацию гидроксильных групп у внутренних атомов углерода в молекулах моносахаридов. Прямоугольная система координат делает схему удобным учебным и справочным пособием при рассмотрении метаболизма с позиций структурной теории органической химии [2]. Регулярная структура схемы может служить основой для рациональной систематизации закономерно связанной с метаболизмом информации. Схемой удобно пользоваться при планировании перестроек метаболизма методами геной инженерии. Периодичность структуры схемы позволяет предсказывать не только отдельные моносахариды и катализируемые ферментами реакции, отсутствие которых нарушает ее структуру, но и осуществлять прогноз в отношении систематически связанной с метаболизмом информации.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-01615а и грантом Программы Президиума РАН П-25.

1. Малыгин А.Г. Метаболизм углеводов (периодическая схема). 2012, М.: ИНБИ РАН. 1 л. формат А1 в суперобложке.
2. Малыгин А.Г. (2013) *Биохимия*. 78(4): 559–561.

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА НАКОПЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР РЯДА РАСТЕНИЙ

*Дурнев Е.А., Литвинец С.Г., Злобин А.А., Мартинсон Е.А.*

Вятский государственный университет. Киров.

biotech.vgu@gmail.com

Культуры изолированных клеток и тканей являются удобными модельными объектами для изучения биосинтеза фитополисахаридов, их состава, свойств и особенностей строения углеводных цепей.

Изменяя условия культивирования, можно в известных пределах изменять характеристики пектиновых полисахаридов (или проводить модификацию) *in vivo* для определения детерминированности их физиологической активности особенностями строения углеводных цепей.

Изучено влияние источников углеродного питания и фитогормонов в составе среды на накопление водорастворимых полисахаридов в каллусных тканях стебля рябины обыкновенной *Sorbus aucuparia* L., бодяка обыкновенного *Cirsium arvense* L., лебеды раскидистой *Atriplex patula* L.

Культивирование каллуса стебля рябины на питательных средах, содержащих рамнозу и галактозу (по 15 г/л), а также сахарозу (10 и 50 г/л) приводит к снижению в составе сорбанов SAIIc остатков рамнозы, т.е. происходит синтез менее разветвленных пектиновых полисахаридов.

Определен состав экзополисахаридов и водорастворимых полисахаридов в клеточной массе суспензионных культур стебля рябины обыкновенной и листа бодяка полевого. Переход к суспензионному культивированию клеток вызывает значительное снижение степени метилэтерифицирования пектиновых полисахаридов и оказывает влияние на состав моносахаридов сорбанов и циризианов, а также фракций растворимых полисахаридов.

Содержание остатков рамнозы (0.4–0.6%) в сорбанах каллуса рябины обыкновенной не зависит от состава среды, а главными нейтральными моносахаридными остатками в них являются остатки галактозы (3.9–8.0%) и арабинозы (3.0–7.2%). Причем их максимальное содержание в SAcII из каллуса, выращенного на среде с сахарозой (15 г/л) и галактозой (15 г/л). Влияние содержания фитогормонов в среде MS на состав полисахаридов SAIc и SAIIc каллуса стебля рябины проявляется следующим образом: наибольшее количество остатков глюкуроновой кислоты (до 14%) накапливается в сорбанах SAcI при культивировании каллуса на среде с высоким (2.0 мг/л) содержанием 2,4-Д, а галактуроновой кислоты (до 75%) в сорбанах SAcII – на среде с максимальным содержанием как 2,4-Д, так и 6-БАП.

Работа поддержана грантом РФФИ (12-04-97056).

## УГЛЕВОДНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛЕКТИНОВ КАК ФАКТОР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАСТЕНИЯ И ПАТОГЕНА

*Адамовская В.Г., Молодченкова О.О.*

Селекционно-генетический институт-Национальный центр семеноведения и сортоизучения. Одесса.

olgamolod@ukr.net

Лектины найдены в составе 200 видов растений, в том числе в растительных мембранах [1]. В настоящее время в литературе активно обсуждается возможность их участия в распознавании растением патогенных микроорганизмов и регуляции клеточных процессов [2]. Основой биологической активности лектинов является их участие в углеводно-белковых взаимодействиях и для качественной характеристики этих белков исследуется их углеводная специфичность.

Анализ изучения активности и углеводной специфичности лектинов зародышей и клеточных стенок растений зерновых культур в динамике прорастания при инфицировании возбудителями фузариоза показал наличие разнохарактерной направленности их изменений в зависимости от устойчивости генотипов к патогену, которая генетически детерминирована.

Для устойчивых сортов и линий зерновых культур характерно более значительное (в 4–5 раз) по сравнению с восприимчивыми увеличение активности лектинов клеточных стенок проростков и повышение или сохранение на уровне контроля их сродства к аминосохарам и D-фруктозо-6-фосфату при заражении возбудителями фузариоза.

Полученные результаты дают основание полагать, что взаимодействие плазмалеммы клеток растений с гликоконъюгатами мицелия возбудителя фузариоза происходит, по всей видимости, по типу лектин-углеводного взаимодействия. Возможно, что патоген активировывает синтез лектинов, являющихся рецепторами гликоконъюгатов патогена, что повышает чувствительность растительной клетки в распознавании микроорганизмов, обеспечивая прочный межклеточный контакт, необходимый для развития защитных реакций растения в ответ на инфицирование фитопатогенами.

1. Антонюк (2005) Львів: ПП «Кварт»: 554 с.

2. Любимова и др.(1988) *Прикладная биохимия и микробиология*. 24 (1): 110–117.

## ГЕНДЕРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ЭКСПРЕССИИ ГЕНА CD38 У БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ

*Перенков А.Д.<sup>1</sup>, Новиков Д.В.<sup>1</sup>, Алясова А.В.<sup>2</sup>, Дронова И.М.<sup>1</sup>, Новиков В.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> НИИ молекулярной биологии и региональной биологии ННГУ им Н.И. Лобачевского. Нижний Новгород.

<sup>2</sup> Нижегородская государственная медицинская академия. Нижний Новгород.  
perenkov@yandex.ru

**Введение:** Ген CD38 кодирует две формы мРНК CD38 – полноразмерную и альтернативную. У альтернативной формы делегирован третий экзон, что приводит к сбою рамки считывания. Белковый продукт гена обладает энзиматической активностью в отношении цАДФ-рибозы. CD38 играет важнейшую роль в активации, пролиферации, адгезии и хемотаксисе клеток иммунной системы. Экспрессия белка CD38 на мембране клеток используется в качестве прогностического и диагностического маркера при лейкомиях, миеломе и хроническом лимфолейкозе.

**Цель:** сопоставить уровень мРНК и белка CD38 у доноров и больных раком толстой кишки с полом.

**Материалы и методы:** В работе использовали 86 образцов периферической крови здоровых доноров и 90 образца крови больных раком толстой кишки. Уровень мРНК CD38 исследовали с помощью мультиплексного «TaqMan» варианта ПЦР в реальном времени, относительно референтного гена убиквитина С. Сывороточный уровень растворимой молекулы CD38 изучали методом ИФА с помощью моноклональных антител ИКО-20.

**Результаты:** Уровень полноразмерной формы мРНК CD38 во всех исследуемых образцах крови был выше альтернативной. У здоровых доноров и больных раком толстой кишки, у мужчин и женщин уровень полноразмерной и альтернативной форм мРНК CD38 статистически не отличается. Исследовали коэффициенты отношения уровней мРНК полноразмерной формы к альтернативной у мужчин и женщин. У здоровых мужчин и женщин коэффициент отношения уровней мРНК CD38 был практически одинаковым и равнялся в среднем  $K = 5.0$ , а у больных различался в 1.2 раза ( $p < 0.05$ ) и составил 8.0 и 10.0, соответственно. Сывороточный уровень растворимых молекул CD38 не отличался у доноров и больных, мужчин и женщин. Наши данные показали, что при опухолевом процессе у женщин повышен коэффициент отношения уровня полноразмерной формы мРНК к альтернативной форме в сравнении с мужчинами. Известно, что иммунная система мужчин и женщин отличается по интенсивности ответа на антигенные раздражители. Так, например, женщины более устойчивы к некоторым инфекциям, и чаще страдают аутоиммунными заболеваниями. Показано, что женские половые гормоны способны изменять активность клеточного звена иммунитета в зависимости от менструального цикла. Таким образом, наши данные находятся в соответствии с литературными и отражают особенности реакции женского организма на опухоль.

## СИНТЕЗ ПОЛИ- И ОЛИГОСАХАРИДОВ С УЧАСТИЕМ $\beta$ -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ДРОЖЖЕВОГО ГРИБА *Cryptococcus flavescens*

Сапунова Л.И.<sup>1</sup>, Костеневич А.А.<sup>1</sup>, Тамкович И.О.<sup>1</sup>, Кулиш С.А.<sup>1</sup>,  
Долженкова Е.А.<sup>2</sup>, Шарейко Н.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси. Минск.

<sup>2</sup> Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины. Витебск.

leonida@mbio.bas-net.by

$\beta$ -Галактозидаза (лактаза,  $\beta$ -D-галактозид-галактогидролаза, КФ 3.2.1.23) катализирует реакции гидролиза и трансгликозилирования  $\beta$ -D-галактозидов, включая лактозу, с образованием  $\beta$ -D-галактозы и ее олигомеров. Галактоолигосахариды различной степени полимеризации обладают пребиотическим действием и вместо антибиотиков используются в качестве пищевых и кормовых добавок, нормализующих состав микрофлоры кишечника человека и животных и предупреждающих развитие заболеваний их желудочно-кишечного тракта.

Видовой состав микроорганизмов, продуцирующих  $\beta$ -галактозидазу трансгалактозилирующего действия, весьма разнообразен. Среди дрожжей этим свойством обладают представители рр. *Brettanomyces*, *Bullera* (*Sporobolomyces*), *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluveromyces*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharopolyspora*, *Sirobasidium*, *Sporobolomyces*, *Sterigmatomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon* и др. Однако невысокий уровень синтеза фермента исключает возможность использования большинства из них для синтеза галактоолигосахаридов *in vivo*, что особенно целесообразно при получении пребиотиков кормового назначения.

Ранее нами выделен из почвы и селективирован новый высокотехнологичный штамм дрожжей *Cryptococcus flavescens* 1 – морфологически, биохимически и генетически стабильный продуцент клеточносвязанной  $\beta$ -галактозидазы. Впервые показано, что полученный штамм при выращивании в питательной среде относительно простого состава характеризуется уникальным для микроорганизмов свойством синтеза галактоолигосахаридов и внеклеточных полисахаридов в рамках одного технологического процесса.

Таким образом, продукция  $\beta$ -галактозидазы, *in vivo* катализирующей реакцию гидролиза лактозы и синтеза галактоолигосахаридов пребиотического действия, а также образование внеклеточных полисахаридов, обладающих пребиотическим, антиоксидантным, иммуномодулирующим, противовирусным и противомикробным действием, выраженной гипополипидемической (гипохолестеринемической), энтеросорбционной активностью, обуславливают перспективность использования селективированного нами штамма дрожжей *Cryptococcus flavescens* 1 для производства биологически активных добавок комплексного действия.

## УЧАСТИЕ САХАРОВ В АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЕ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Синькевич М.С.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Москва.  
sinkevich\_m@mail.ru

Как известно, при гипотермии растворимые углеводы (сахара) имеют несколько функций: антифризную, осморегуляторную и другие. При этом для теплолюбивых и, в меньшей степени, для холодостойких растений важным фактором повреждения при снижении температуры является окислительный стресс. При этом считается, что антиоксидантная система холодостойких растений более эффективна, но причины этого обычно не рассматриваются. Мы изучали связь устойчивости к низкотемпературному окислительному стрессу и содержания сахаров на примере типичного представителя холодостойких растений – картофеля (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée), выращенного в культуре *in vitro* до 42-дневного возраста. Для получения различий в содержании сахаров, было использовано три подхода: 1) трансформация геном инвертазы дрожжей, 2) выращивание на средах с повышенным содержанием сахаров, и 3) длительное адаптирующее воздействие.

Действие охлаждения продемонстрировало, что у обогащенных сахарами растений, уровень интенсивности ПОЛ был ниже, чем у контрольных, притом, что скорость генерации  $O_2^-$  была, наоборот, выше. В то же время, активности ключевых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаз гваякола и аскорбата) оказались не выше, чем у контрольных растений. Поскольку антиоксидантная система состоит не только из ферментов, но и из низкомолекулярных соединений, есть все основания предполагать более развитую низкомолекулярную составляющую у обогащенных сахарами растений. Для того чтобы вычленить роль сахаров в противодействии окислительному стрессу из остальных их функций при гипотермии мы использовали химические индукторы, такие как паракват и радикал  $OH^\cdot$ , генерируемый реакционной системой Фентона. При химической индукции окислительного стресса интенсивность ПОЛ была снова ниже у обогащенных сахарами растений, при повышенной у них же скорости образования  $O_2^-$ . Так как не существует ферментативной защиты от радикала  $OH^\cdot$ , эта разница обеспечивалась низкомолекулярной составляющей защиты.

Различные литературные источники [1, 2] указывают, что сахара обладают неспецифическими антиоксидантными свойствами, что может объяснить перехват наиболее короткоживущих радикалов в условиях стресса.

1. Morelli *et al.* (2003) *J. Agric. Food Chem.* 51: 7418–7425.
2. Аверьянов, Лапикова (1989) *Биохимия.* 54: 1646–1651.

## УГЛЕВОДСОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ В ЯДЕ *Agkistrodon halys halys*. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ.

Шкинева М.А.<sup>1</sup>, Юнусова Э.С.<sup>2</sup>, Садыков Э.С.<sup>2</sup>, Шкинев А.В.<sup>2</sup>,  
Султаналиева Н.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра эндокринологии и диабетологии МСУ им. А.И. Евдокимова МЗ РФ. Москва.

<sup>2</sup> Отдел биохимии Института биорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз. Республика Узбекистан. Ташкент.  
toyalasunya@mail.ru

Из яда щитомордника (DEAE Sephadex A-50) получена очищенная фракция (IX) оксидазы L-аминокислот (ЛАО), содержащая, наряду с искомым ферментом,  $\beta$ -фибриногеназу (энзим ингибировался только ФМСФ). ЛАО образована компонентами с мол. массой около 110 кДа, разделяющимися при электрофорезе в денатурирующих условиях на фрагменты меньшей мол. массы, что согласуется с имеющимися в литературе данными для ЛАО из ядов змей рода *Agkistrodon* [1].

Яд щитомордника и выделенная фракция ЛАО подавляли рост только грамотрицательных микроорганизмов *St. aureus* (Рег. № 004134 и 003594, штаммы ATCC 25923 и Wood-46 соответственно).

Из того же яда сочетанием методов белковой химии (Sephadex G-100, DEAE A-50, TSK HW-55, Q-Sepharose и HA-Ultrogel) выделен гликопротеин (3% нейтральных сахаров,  $pI=3.9-4.1$ ) ПС-4-1 с мол. массой 34–36 кДа (SDS-электрофорез, нативные условия) и 8–9 кДа (денатурирующие условия). По биологическому действию гликопротеин оказался ингибитором агонист-индуцируемой агрегации тромбоцитов человека. Он также оказывал цитотоксическое и апоптоз-индуцирующее действие на культурах клеток рака молочной железы и лимфоцитов периферической крови больных колоректальным раком. Так, ПС-4-1 ингибировал адреналин- и АДФ-индуцируемую агрегацию с  $IC_{50} = 0.4 \mu\text{g/ml}$ . В дозе 100 мкг/ $6 \times 10^6$  клеток гликопротеин вызывал гибель 71% клеток рака груди (в том числе апоптоз – 2%). На лимфоцитах больных колоректальным раком ПС-4-1 (20 мкг /  $2.6 \times 10^6$  клеток) вызвал гибель 44% лимфоцитов, включая апоптоз (16%).

Полученные данные свидетельствуют о присутствии в яде *A. h. halys* антимикробных и антитромботических компонентов, эффективно подавляющих агрегационные функции Тб, а также обладающих существенной противоопухолевой и апоптоз-индуцирующей активностью. Последующие исследования этих природных гликозилированных ферментов и неэнзиматических белков послужат основой при разработке эффективных средств лечения сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний.

1. Guo *et al.* (2012) *Toxicon*. 60: 302–311.

## ВЛИЯНИЕ СТЕВИОЛ-ГЛИКОЗИДОВ НА ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ ЛЕКТИНОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ

*Огороднова У.А., Стробыкина А.С., Невмержицкая Ю.Ю.*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, кафедра физиологии и биохимии растений, Казань.

uliana\_ogo@mail.ru

Приоритетной задачей современного растениеводства является поиск экологически безопасных регуляторов роста и развития растений. Поэтому большого внимания заслуживают различные природные соединения, часто обладающие специфической биологической активностью. К ним относится дитерпеноид стевиол, выделенный из *Stevia rebaudiana*. Стевиол имеет структурные сходства с гибберелловой кислотой и является агликоном гликозидов стевии.

В связи с этим целью нашей работы было изучение влияния стевиол-гликозидов на полипептидный состав белков клеточной стенки и активность лектинов растений яровой пшеницы сорта Омская 33.

Гель-фильтрационное разделение белков клеточной стенки у проростков пшеницы, выращенных на растворах стевиозида, ребаудиозида А и комплексного препарата гликозидов стевии «Sweta» в концентрации  $10^{-8}$  М показало, что стевиол-гликозиды приводили к уменьшению количества лектиновых белков клеточной стенки. При этом все стевиол-гликозиды вызывали появление нового лектина 31 кД. Полученные данные могут свидетельствовать об участии этого лектина в регуляции ростовых процессов у растений яровой пшеницы.

Изучение активности лектинов показало, что стевиозид повышал активность растворимых лектинов в концентрациях  $10^{-7}$  М –  $10^{-9}$  М. Активность лектинов клеточной стенки под влиянием стевиозида в концентрации  $10^{-8}$  М не изменялась, а в концентрациях  $10^{-6}$  М,  $10^{-7}$  М и  $10^{-9}$  М ингибировалась. Влияние ребаудиозида А и ферментативно гликозилированного экстракта стевии «Sweta» на активность растворимых лектинов было аналогично варианту со стевиозидом (соединения увеличивали активность этих белков в концентрациях  $10^{-7}$  М –  $10^{-9}$  М). На активность лектинов клеточной стенки дитерпеновые гликозиды влияли по-разному: ребаудиозид А уменьшал активность лектинов, связанных с клеточной стенкой, в концентрациях  $10^{-7}$  М –  $10^{-9}$  М, а «Sweta», представляющая собой смесь гликозидов стевии, основным компонентом которой является ребаудиозид А, повышала их активность в концентрациях  $10^{-6}$  –  $10^{-8}$  М. Изменение активности и содержания фитоагглютининов может являться одним из механизмов действия веществ гормональной природы, т.к. есть данные о способности лектинов связываться с фитогормонами. Можно предположить, что комплекс лектины - фитогормоны участвует в запасании гормонов и регуляции роста растений [1].

1. Oliveria, B.H. *et al.* (2008) *Phytochemistry* 69:1528–1533.

## ЕСТЕСТВЕННЫЕ АНТИУГЛЕВОДНЫЕ АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА К 4'-*O-Su-LacdiNAc* И РОДСТВЕННЫМ ГЛИКАНАМ

*Доброчаева К.Л., Бовин Н.В.*

ФГБУН Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

kira.dobrochaeva@gmail.com

Наличие на нейраминидазе вируса гриппа штамма A/Tokyo/3/67 (H2N2) [1] уникального и поэтому потенциально иммуногенного эпитопа 4'-*O-Su-LacdiNAc* (4'*SuLdN*) – с одной стороны, и с другой стороны – высокий титр естественных антител (еАТ) к родственному эпитопу 4'-*O-Su-LacNAc* (4'*SuLN*) [2], стимулировали изучение антител этого семейства. У человека 4'*SuLdN* встречается на углеводных цепях ряда гликопротеинов (гипофизарных гормонов, проопиеломеланокортине и ряде протеаз), а 4'*SuLN* по литературным данным - не встречается. Для выделения еАТ мы использовали комплексный иммуноглобулиновый препарат (КИП) - иммуноглобулиновая фракция от тысячи и более здоровых доноров. Методом аффинной хроматографии на сорбенте, где спейсерированный олигосахарид иммобилизован на полиакриламиде и через него на сефарозе (*OS-PAA-Seph*) из КИП были получены АТ к 4'*SuLdN*. Оказалось, что это *IgM* АТ, и по результатам прямого связывания в иммуноферментном анализе (ИФА) они кроме 4'*SuLdN* взаимодействуют с *LdN* и 3'*Su-*, 6'*Su -LdN*, а также с 4'*Su-* и 4',6'*diSuLN*, т.е. полиспецифичны или представляют собой смесь субпопуляций АТ. По данным ингибиторного ИФА, только 4'*SuLdN* в свободной форме препятствовал связыванию этой фракции АТ с *OS*. Условная константа аффинности для 50% ингибирования связывания данных АТ с иммобилизованными *OS*,  $K_a=0.55110^3\text{M}^{-1}$ . Пропуская КИП последовательно через сорбенты с различными гаптенами (последовательность *OS: LN- 4'SuLMLdN- 3'SuLdN-4'SuLdN-*) и получая, после каждой хроматографии фракцию специфичных еАТ и КИП истощенный по соответствующим АТ, мы выделили моноспецифическую фракцию анти 4'*SuLdN* АТ,  $K_a=0.49110^3\text{M}^{-1}$ . Полученные антитела были пробиотинилированы без потери специфичности, что открывает возможность иммуногистологических и клеточных исследований. Антитела, полученные на промежуточных стадиях хроматографирования КИП, также были проанализированы методом ИФА. АТ к 4'*SuLN* (*IgM*), специфично связываются с *LN* и его 4'*Su-* и 4',6'*diSu* производными. АТ, полученные из КИП последовательной хроматографией на сорбентах с *LN- 4'SuLN-PAA-Seph*, связываются только с 4'*Su-* и 4',6'*diSu-LN*. Во всех случаях связывание ингибировалось 4'*SuLN* и 4',6'*diSuLN* в свободной форме, диапазон  $K_a= 0.63-0.65 110^3\text{M}^{-1}$ . Следующий этап нашей работы заключался в выделении АТ к 4'*SuLdN* из сыворотки здоровых доноров и людей, переболевших гриппом. Предварительно мы можем сказать о том, что соотношение субпопуляций антител, специфично взаимодействующих с *LdN* и *LN* и их сульфопроизводными количественно и качественно отличаются у здоровых людей и людей переболевшим гриппом.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 13-04-00549а.

1. Varghese *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 221: 473-486.

2. Huflejt, M. E. *et al.* (2009) *Molecular Immunology.* 46 (15): 3037-3039.

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Buth S.	10	Бовин Н.В.	6, 59, 131
Karpova I.S.	116	Богатырев В.А.	18
Kiseleva E.P.	118	Бондаревич Н.В.	22
Knirel Y.A.	118	Бондаренко Т.И.	103
Kotsarenko K.V.	116	Борисова А.С.	23, 73
Leiman P.	10	Булавинцева Т.С.	30
Lukash L.L.	116	Бурыгин Г.Л.	15, 32, 88
Lylo V.V.	116	Бухарова Е.Н.	69, 72
Macewicz L.L.	116	Бучковская И.М.	104
Mikhailopulo K.I.	118	Бывалов А.А.	28
Novik G.I.	118	Бянкина А.О.	8
Ruban T.A.	116	Вальшев А.В.	25
Sandgren M.	73	Ван Дер Стратен Д.	55
Shashkov A.S.	118	Ванденбуше Ф.	55
Sun Q.	86	Варламов В.П.	26
Xu J.	86	Веселовский В.В.	24
Zdorovenko E.L.	118	Ветчинкина Е.П.	64
Абронина П.И.	17, 36, 45	Вечканов Е.М.	65
Агеева М.В.	32, 34	Винникова А.Н.	24
Адамовская В.Г.	125	Вислобоков А.И.	81
Айдагулова С.В.	20	Виссенберг К.	55
Аксенов А.С.	52	Витязев Ф.В.	25, 47, 62, 78, 98
Аленькина С.А.	18	Влах Е.Г.	21
Алешкин В.А.	121, 122	Воложанцев Н.В.	10, 93
Аллагулова Ч.Р.	101	Волокитина М.В.	21
Алясова А.В.	126	Воропаева Н.Л.	26, 114
Анастюк С.Д.	38	Гагкаева Т.Ю.	94
Антонюк Л.П.	19	Галзитская О.В.	83
Антонюк Р.В.	100	Галицкая А.А.	66, 84, 85
Аргунов Д.А.	90	Генералов Е.А.	109
Астафьева А.А.	51	Герцен Н.В.	25
Афанасьев С.С.	121, 122	Гетте И.Ф.	30
Ахатова А.Р.	99	Глазунов В.П.	38
Байдильдаева Ж.А.	63	Гоголев Ю.В.	32, 64
Байракова А.Л.	121	Гойкалова О.Ю.	110
Бакланов Е.С.	20	Головченко В.В.	25, 27, 47, 62, 78, 98
Бакунина И.Ю.	53	Голотин В.А.	53
Балабанова Л.А.	53	Горшков В.Ю.	32, 64
Барышникова Л.М.	57, 79	Горшков О.В.	43, 67
Безрукова М.В.	101	Горшкова Т.А.	7, 34, 43, 49, 67
Безсонов Е.Е.	83	Григорьева Э.В.	20
Белый П.Н.	115	Гринёв В.С.	68
Белявская Л.А.	102	Гришин Е.В.	51
Билан М.И.	14		
Бликст О.	59		
Бобров К.С.	21, 23, 73, 94		

Грищенко Е.Р.	115	Канделинская О.Л.	115
Гроенинг М.	83	Каневский М.В.	12, 33
Гроза Н.В.	56	Карелин А.А.	90
Грошева Е.А.	91	Карпачев В.В.	26
Гюнтер Е.А.	97	Карпунина Л.В.	69, 72, 80
Данилова И.Г.	30	Касимова Р.И.	99
Демирова К.А.	24	Кацы Е.И.	113
Денисова М.Н.	69	Каштанов Е.А.	117
Дмитренко А.С.	57, 79	Кичемазова Н.В.	72
Доброчаева К.Л.	131	Книрель Ю.А.	10, 59, 86, 87, 93
Долженкова Е.А.	127	Коваленко Э.А.	102
Дорофеева Л.В.	57, 79	Ковальчук С.Н.	105
Дронова И.М.	126	Козлов С.А.	51
<u>Дружинина Т.Н.</u>	24	Козлова Л.В.	34, 67
Дудина Л.Г.	28	Козырицкая В.Е.	102
Дурнев Е.А.	124	Кокоулин М.С.	11, 35
Евстигнеева С.С.	70	Кокурина Н.Ю.	117
Евтушенко Я.Ю.	77	Командрома Н.А.	11, 35
Егоренкова И.В.	29, 88	Комарова Б.С.	90
<u>Егоров Ц.А.</u>	51	Коннова С.А.	12, 33, 58, 68, 70, 87
Емельянов В.В.	30	Кононов Л.О.	17, 36, 45, 50
Ермак И.М.	8, 38	Константинова Л.Г.	114
Ершова А.Н.	31, 107	Копыльчук Г.П.	104
Жданов Р.И.	111	Корнеева О.С.	110
Жукова Н.И.	106	Корсун В.Ф.	122
Журишкина Е.В.	94	Космачевская О.В.	37, 61
Здоровенко Э.Л.	50, 87	Костеневич А.А.	127
Зиганшин Р.Х.	83	Кот А.А.	115
Зинин А.И.	17, 36, 50	Кравченко А.О.	38
Злобин А.А.	124	Краюхина М.А.	119
Зубова С.В.	112	Крылов В.Б.	90
Зудина И.В.	71	Кубасова Т.С.	95
Ибрагимова М.Я.	111	Кудряшова И.Б.	83
Ибрагимова Н.Н.	34	Кузнецов С.А.	83
Иваков А.	55	Кулиш С.А.	127
Иванен Д.Р.	23	Кульминская А.А.	21, 23, 73, 94
Игнатов В.В.	12, 29, 58, 68, 70, 87, 88	Кунин И.С.	20
Измestъев Е.С.	48	Кухарева Л.В.	115
Исаков В.В.	38	Кучин А.В.	48
Исламов Б.Р.	32	Кушнерук М.А.	19
Истомина Е.И.	25, 47	Ларина В.Н.	117
Иутинская Г.А.	102	Ларская И.А.	120
Кабанов Д.С.	112	Латкин Д.С.	13
Какаян Е.С.	74	Лахтин В.М.	121, 122
Калебина Т.С.	9, 83	Лахтин М.В.	121, 122
Калимбетова Р.Ю.	114	Лебедев В.Г.	89
Калиновский А.И.	35		

Левчук А.Н.	39	Орлова А.В.	36, 45
Литвинец С.Г.	124	Осипов В.И.	89
Литовченко А.П.	105	Островский Н.В.	71
Лихошерстов Л.М.	75	Падерин Н.М.	46
Лукаш А.И.	65	Панова М.В.	50
Луцик А.Д.	100	Патова О.А.	25, 27, 47, 62, 78, 98
Ляпина А.М.	108	Перенков А.Д.	126
Лях В.А.	39	Перссон С.	55
Майборода Е.А.	103	Пертель С.С.	74
Макарова Е.Н.	40, 92	Пестова С.В.	48
Максимова Н.Е.	30	Петрова А.А.	49
Малыгин А.Г.	123	Петрова Л.П.	96
Мальшева Н.Н.	17, 36	Петрова О.Е.	34
Маркова А.А.	95	Петрунина А.А.	33
Мартинсон Е.А.	124	Пискарев В.Е.	75, 119
Маслов М.А.	41, 95	Пислягин Е.А.	11
Матора Л.Ю.	60, 88	Плотников В.К.	76, 77
Меморская А.С.	56	Подвальный Н.М.	50
Микшина М.П.	34	Пономарева Е.Г.	96
Микшина П.В.	32, 42, 49	Пономарева С.А.	78
Мирошников К.А.	10, 93	Попов С.В.	13, 62, 98
Михалева И.И.	103	Попова А.В.	10, 93
Михалева Н.Я.	25, 47, 62	Попова Г.Ю.	13
Мокшина Н.Е.	43, 67	Потехина Н.В.	57, 79
Молодченкова О.О.	125	Прилипов А.Г.	113
Молчан М.М.	115	Проскуракова М.В.	80
Молчанова В.И.	105	Прохоренко И.Р.	112
Морозова Н.Г.	41, 95	Прошева В.И.	81
Мотин В.Л.	108	Пугаченко И.С.	61
Мочульская Н.Н.	30	Пятибратов М.Г.	82
Мурзабаев А.Р.	101	Разлуцкий В.И.	115
Наумов Д.Г.	44	Рассказов В.А.	53
Наумова Т.С.	66, 84, 85	Рекстина В.В.	83
Невмержицкая Ю.Ю.	91, 130	Репко Н.В.	77
Никитина В.Е.	18, 64, 96	Рогожин Е.А.	51
Никитина И.Р.	13	Рубцова С.А.	48
Николаев Р.А.	104	Рупрехт К.	55
Нифантьев Н.Э.	90	Рууге Э.К.	61
Новаковский М.Е.	59	Рысмухамбетова Г.Е.	69
Новик Г.И.	22	Рядчиков В.Г.	76
Новиков В.В.	126	Саватеева Е.А.	30
Новиков Д.В.	126	Садыков Э.С.	129
Новикова О.С.	75	Салфетников А.А.	77
Новожилов Е.В.	52	Сальников В.В.	32
Оводов Ю.С.	27, 78	Самойлова Н.А.	119
Огороднова У.А.	130	Сапунова Л.И.	127
Одинцова Т.И.	51	Селиванов Н.Ю.	66, 84, 85
Орлов В.П.	66, 84, 85		

Селиванова О.Г.	66, 84, 85	Филипъчева Ю.А.	96
Сенченкова С.Н.	10, 57, 79, 86, 93	Фомина В.И.	71
Серый С.А.	74	Функе Н.	55
Сигида Е.Н.	15, 57, 87	Харитонова Е.В.	61
Сидорова Л.П.	30	Хасбиуллина Н.Р.	59
Синельников И.Г.	52	Хатунцева Е.А.	90
Синькевич М.С.	131	Хижнякова М.А.	108
Систерова А.В.	106	Хлебцов Б.Н.	15
Скрипник М.Г.	104	Хусаинова Р.Р.	91
Славкина Е.А.	19	Цветков Ю.Е.	90
Слепченко Л.В.	53	Цидулко А.Ю.	20
Сметанина М.Д.	80	Цой Е.А.	106
Смирнов В.В.	54	Черешнев В.А.	30
Соколов О.И.	66, 84, 85	Черников О.В.	105
Соколова Е.В.	8, 38	Чижов А.О.	10, 17, 45, 50, 90
Соколова М.К.	66, 84	Чикаловец И.В.	105
Сорокина И.А.	65	Чухчин Д.Г.	57
Стрешинская Г.М.	57, 79	Шабалин К.С.	23
Стробыкина А.С.		Шаймуллина Г.Х.	91
Султаналиева Н.М.	129	Шакирова Ф.М.	101
Суркина А.К.	68	Шарейко Н.А.	127
Суслов Д.В.	55	Шахматов Е.Г.	40, 92
Сухова Е.В.	90	Шашков А.С.	10, 14, 57, 79, 86, 87, 93
Суховских А.В.	20	Швецова С.В.	94
Сюткин А.С.	82	Шевченко О.Г.	52
Тамкович И.О.	127	Шелудько А.В.	96
Терёшина В.М.	56	Шестибратов К.А.	89
Тимофеев Г.А.	95	Шилова Н.В.	59
Томшич С.В.	11, 35	Шиповская А.Б.	71
Топунов А.Ф.	37, 61	Широков А.А.	60
Торгов В.И.	36, 45, 50	Шкинев А.В.	129
Трегубова К.В.	29, 88	Шкинева М.А.	129
Тульская Е.М.	57, 79	Шмендель Е.В.	95
Тышкунова И.В.	52	Шнейдер М.М.	10, 93
Ульянцев С.А.	74	Штиль А.А.	95
Урьяш В.Ф.	117	Шуканова Н.А.	117
Усов А.И.	14	Шумаев К.Б.	37, 61
Фасхиев В.Н.	89	Шумилова Е.М.	96
Фатуллаева А.С.	107	Щеголев С.Ю.	15
Фатхутдинова Р.А.	101	Энейская Е.В.	23, 73, 94
Федина К.Г.	36, 45	Юзыпчук А.А.	97
Федоненко Ю.П.	12, 17, 35, 58, 68, 70, 87	Юнусова Э.С.	129
Федоров О.В.	82	Януцевич Е.В.	56
Федорова В.А.	108	Яруллина Л.Г.	9
Фиговский О.Л.	26		

Компания **Eppendorf** разрабатывает, производит и поставляет оборудование и расходные материалы для научно-исследовательских лабораторий.

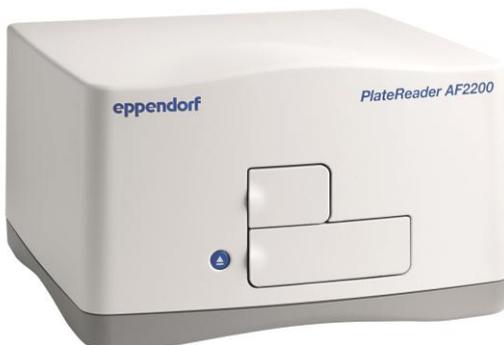
Продуктовая линейка Eppendorf включает дозаторы, диспенсеры, центрифуги, расходные материалы, низкотемпературные морозильники, ферментеры, биореакторы, CO<sub>2</sub> инкубаторы и шейкеры. Помимо этого, Eppendorf предлагает оборудование для спектрофотометрии, системы автоматического дозирования, полный спектр оборудования для ПЦР-лабораторий (классическая ПЦР), микроманипуляторы и электропораторы для работы с клетками. Компания Eppendorf была основана в Гамбурге в 1945 году и имеет представительства в 24 странах, а также дистрибьюторов во всем мире.

Мы с удовольствием расскажем подробнее о некотором оборудовании:

**Eppendorf BioSpectrometers** - это компактные спектрофотометры, позволяющие проводить измерения в УФ и видимом диапазоне, а также измерять флуоресценцию. В диапазоне длин волн от 200 нм до 830 нм Вы можете записывать спектры, а также производить измерения при выбранной длине волны. BioSpectrometer kinetic имеет термостатируемую ячейку (+20 °C - +42 °C), что позволяет измерять скорости фермент-субстратных взаимодействий. BioSpectrometer fluorescence позволяет производить измерения с использованием флуоресцентных красителей.



**Eppendorf PlateReader AF2200** специально создан для работы в УФ и видимом диапазоне и измерения флуоресценции в планшетном формате. Мы предлагаем Вам воспользоваться



предустановленными методиками или же создать собственные протоколы для самых разных областей применения. Вы можете выбрать между стандартными комбинациями светофильтров или сконструировать набор светофильтров, отвечающий Вашим требованиям. Мы предлагаем Вам возможность работать с 6 - 384-луночными планшетами, а также проводить измерения в микрообъеме, используя наш планшет Eppendorf  $\mu$ Plate G0.5.

**Расходные материалы DNA/ Protein LoBind** имеют особенную гидрофильную поверхность, гарантирующую существенное снижение адсорбции образцов ДНК и белков на стенках пробирок и планшетов. Материал LoBind гарантирует максимальную сохранность образца для получения лучших результатов анализов. При производстве расходных материалов LoBind мы не используем поверхностное покрытие (например, силиконовое) для минимизации риска воздействия на образец.



## Решения для Вашей успешной работы

- **Наборы для выделения и очистки нуклеиновых кислот и белков**
  - геномной, бактериальной, вирусной и плазмидной ДНК
  - суммарной, матричной, микро и вирусной РНК
  - белков с полигистидиновой последовательностью или глутатион-S-трансферазой
- **Реактивы для ПЦР и иммунологических исследований**
- **Реагенты для гель-электрофореза и вестерн-блоттинга**
- **Оборудование для лаборатории**
  - системы для гель-электрофореза
  - шейкеры
  - микроскопы
  - морозильные камеры
  - термостаты
  - спектрофотометры
  - центрифуги
  - концентраторы
- **Стеклянная посуда**
- **Лабораторный пластик**



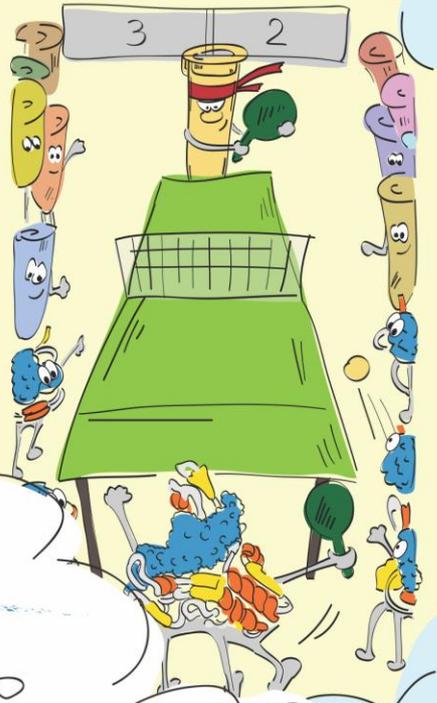
Пластик



Сервисное обслуживание



Ферменты для работы с ДНК/РНК



[www.SkyGen.com](http://www.SkyGen.com)



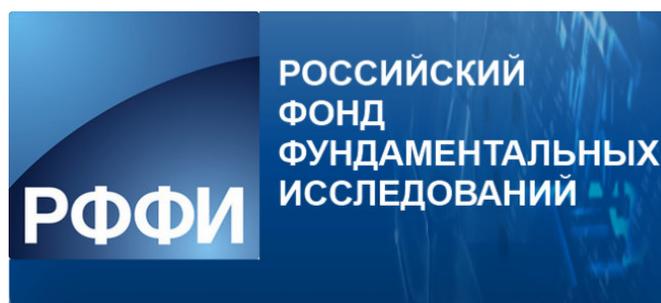
Автоматизация



Общелaborаторное оборудование



*Российская Академия Наук*



**ependorf**

