

На правах рукописи

Мокшина Наталья Евгеньевна

**ТКАНЕСПЕЦИФИЧНАЯ ГАЛАКТОЗИДАЗА
РАСТИТЕЛЬНЫХ ВОЛОКОН,
ФОРМИРУЮЩИХ КЛЕТОЧНУЮ СТЕНКУ
ЖЕЛАТИНОЗНОГО ТИПА**

03.01.05 - физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Казань - 2010

Работа выполнена в лаборатории механизмов роста растительных клеток Учреждения Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Горшкова Татьяна Анатольевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Калебина Татьяна Сергеевна
(МГУ, Москва)

доктор биологических наук, профессор
Хохлова Людмила Петровна
(КГУ, Казань)

Ведущая организация:

Институт фундаментальной биологии и
биотехнологии Сибирского
Федерального университета, Красноярск

Защита состоится 28 июня 2010 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении Российской академии наук Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я 30, тел/факс (843)2927347.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН.

Автореферат разослан « » мая 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.Б. Иванова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Клеточная стенка растительных клеток выполняет многообразные функции, среди которых наиболее выраженной является механическая. При этом клеточные стенки могут не только служить статичной опорой, но и обладать свойствами, способствующими перемещению частей растения в пространстве. Такие свойства характерны для вторичных клеточных стенок желатинозного типа, которые формируются только в растительных волокнах и отличаются от классического, ксиланового, типа вторичных клеточных стенок высоким содержанием целлюлозы, продольной ориентацией ее микрофибрилл, особым составом полисахаридов матрикса и низким содержанием лигнина (Горшкова, 2007). Особый состав и структура клеточной стенки желатинозного типа обуславливают наличие контрактильных свойств, которые основаны на создании в клеточной стенке натяжения (Clair et al., 2006).

Механизм создания натяжения в клеточных стенках желатинозного типа остро дискутируется. Основные предложенные гипотезы сводятся к пассивному набуханию клеточных стенок желатинозного типа при ограничении их объема окружающими слоями ксилановой клеточной стенки (Goswami et al., 2008), или к натяжению латерально взаимодействующих микрофибрилл целлюлозы при попадании между ними полисахаридов матрикса (Mellerowicz et al., 2008). Последний механизм подразумевает, что создание натяжения в клеточной стенке основано на активных метаболических процессах. Такие процессы предполагаются, в частности, для тканеспецифичного галактана, накопление которого сопряжено с формированием вторичной клеточной стенки флоэмных волокон льна и конопли (Gorshkova et al., 1996, 2004; Gorshkova, Morvan, 2006). Этот полисахарид построен как сложный рамногалактуронан I с боковыми цепочками, состоящими, в основном, из β -(1 $\rightarrow$ 4)-связанной галактозы, составляющей основную массу полимера. После встраивания галактана в клеточную стенку происходит значительное уменьшение его молекулярной массы (Gurjanov et al., 2008), что может быть связано с укорочением боковых цепочек полимера. Гидролиз боковых цепочек галактана *in vivo* теоретически возможен в результате действия эндогенной галактозидазы и/или эндогалактаназы. Выявление и характеристика фермента, осуществляющего постсинтетические модификации тканеспецифичного галактана, позволит существенно дополнить картину процессов, происходящих при формировании вторичной клеточной стенки желатинозного типа и выявить ключевые элементы в механизмах ее функционирования.

Цель и задачи исследования. Целью работы было выявление и характеристика фермента, обеспечивающего постсинтетические модификации галактана в ходе формирования клеточной стенки желатинозного типа.

Были поставлены следующие задачи:

1. Оценить эндогалактаназную и галактозидазную активность в тканях стебля льна, содержащих волокна на разных стадиях развития.

2. Выделить и очистить фермент, идентифицировать и охарактеризовать его методами протеомики и биоинформатики.

3. Получить антитела к анализируемому белку. Установить субклеточную локализацию фермента в тканях стебля льна. Определить наличие и локализацию белка в тканях других растений, волокна которых формируют клеточную стенку желатинозного типа.

4. Охарактеризовать особенности формирования клеточной стенки желатинозного типа у трансгенных растений льна с антисмысловой конструкцией к гену выявленного фермента.

Научная новизна работы. С помощью комплекса подходов впервые охарактеризован тканеспецифичный белок волокон желатинозного типа, который идентифицирован как β -галактозидаза. Выявлена активация экспрессии гена этого фермента при переходе волокон к формированию клеточной стенки желатинозного типа. С помощью наработанных антител продемонстрирована локализация фермента во флоэмных волокнах льна, где он обнаруживается совместно с тканеспецифичным галактаном в секретируемых пузырьках аппарата Гольджи и во вторичной клеточной стенке желатинозного типа. Установлено наличие аналогичной β -галактозидазы в клеточной стенке желатинозного типа волокон растений различной таксономической принадлежности и образуемых различными меристемами, что указывает на наличие у них сходных механизмов формирования клеточных стенок желатинозного типа и существенную роль в них β -галактозидазы. Снижение уровня экспрессии тканеспецифичной β -галактозидазы путем введения антисмысловой конструкции к соответствующему гену приводит к нарушению нормального хода трансформации слоев клеточной стенки, что доказывает ключевую роль фермента в формировании ее надмолекулярной структуры и свидетельствует о необходимости активной метаболической составляющей в функционировании клеточной стенки желатинозного типа.

Научно-практическая значимость работы. Представленные в работе результаты вносят вклад в понимание механизмов образования и функционирования вторичной клеточной стенки желатинозного типа, которая характерна для многих хозяйственно ценных культур. Полученные представления об участии тканеспецифичного фермента в формировании надмолекулярной структуры клеточной стенки позволяют развить биотехнологические подходы для целенаправленного изменения свойств клеточной стенки и, следовательно, качества волокна. Разработанная совокупность подходов для идентификации, характеристики и установления роли индивидуального фермента может быть использована при исследовании других белков растительной клетки.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Исследования проводились в соответствии с планами НИР КИББ КазНЦ РАН (номер госрегистрации 0120.0 408625); частично поддержаны грантами РФФИ № 06-04-48853, № 08-04-00845, № 09-04-97038. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на итоговой научной конференции КГУ (Казань, 2005), VI съезде Общества физиологов растений России (Сыктывкар, 2007), IX Международной конференции по клеточной стенке (Копенгаген, Дания, 2007), Международной конференции «Pectins and Pectinases» (Вагенинген, Нидерланды, 2008), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), Международной конференции по растительным полисахаридам «PPW 2008» (Сигтуна, Швеция, 2008), Международном симпозиуме по углеводам «ICS 2008» (Осло, Норвегия, 2008), Гордоновской конференции по растительной клеточной стенке (Смитфилд, США, 2009), годовом собрании общества физиологов России (Апатиты, 2009), IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009), Международной конференции по растительным волокнам «Plant fibers: view of fundamental biology» (Казань, 2009), итоговых конференциях КИББ КазНЦ РАН (2009, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. В работе представлено 5 таблиц и 42 рисунка. Список литературы включает 155 источников, в том числе, 138 – иностранных.

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1.1. Объекты исследований. Объектом исследований служили растения льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) сорта Могилевский из коллекции ВНИИ льна (г. Торжок). Растения выращивали в условиях вегетационного опыта в ящиках со слоем почвы 50 см на открытом воздухе при естественном освещении и ежедневном поливе. В качестве ориентира при фиксации образцов было выбрано положение на стебле «точки слома», которая служит маркером перехода волокон от стадии интрузивного удлинения (выше «точки слома») к стадии формирования вторичной клеточной стенки (ниже «точки слома») (Gorshkova et al., 2003). В большинстве экспериментов образцы фиксировали на стадии быстрого роста растений (30-40 дней после посева), когда на стебле четко определялась «точка слома».

Для получения препаратов галактана и ассоциированного с ним белка участки стебля льна ниже «точки слома» разделяли на волокнистую и ксилемную части и использовали волокнистую часть (10 см) участков стебля. Для определения β-

галактозидазной активности с помощью *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид использовали участки стебля длиной 5 см выше и ниже «точки слома». Для обработки срезов флуорогенным субстратом и анализа методами микроскопии фиксировали участки стебля, отобранные в средней части отрезков стебля выше и ниже «точки слома».

Для установления локализации β -галактозидазы в гетерологичных растениях использовали участки из средней части стебля конопли (*Cannabis sativa* L.) (растения были выращены на экспериментальном поле НИИСХ г. Цивильска, Чувашия) и древесины натяжения тополя (*Populus tremula* L x *P. tremuloides* Michx.) (образцы были отобраны сотрудниками Университета Умеа, Швеция).

Трансгенные растения льна (семена были предоставлены сотрудниками Университета Алберты, Канада), выращивали в тех же условиях, что и немодифицированные растения. Для анализа β -галактозидазной активности, содержания свободной галактозы, фракционирования клеточной стенки, а также оценки уровня экспрессии β -галактозидазы использовали волокнистые участки стебля ниже «точки слома» длиной 15 см. Для анализа растений с помощью методов микроскопии фиксировали участки стебля длиной 0.5 см, отобранные в середине отрезка от «точки слома» до основания стебля.

Количество биологических повторностей во всех экспериментах – 3, аналитических повторов – 2-3.

1.2. Анализ низкомолекулярных углеводов. Для определения содержания свободных моносахаридов использовали супернатант гомогената тканей участков стебля льна после осаждения нерастворимого растительного материала центрифугированием (осветленный гомогенат). Моносахаридный анализ проводили без гидролиза и после гидролиза (2М ТФУ при 120°C в течение 1 ч) методом высокоэффективной анионообменной хроматографии на колонке CarboPac PA 1 (4x250 мм) с пульс-амперометрическим детектором (Dionex, США).

1.3. Измерение β -галактозидазной активности с помощью искусственных субстратов. Для определения β -галактозидазной активности в анализируемых фракциях в качестве субстрата использовали *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид. Высвобождение *o*-нитрофенола (*o*-NP) фиксировали при 420 нм на спектрофотометре (Perkin Elmer, США). Одна единица β -галактозидазной активности соответствовала количеству фермента, необходимого для гидролиза субстрата с образованием 1 нМ *o*-NP за 1 мин в условиях реакции.

Для установления β -галактозидазной активности на срезах использовали флуорогенный субстрат резорифин- β -D-галактопиранозид. Субстрат растворяли в ДМСО до 10 мМ, затем в PBS (pH 7.4). Концентрация рабочего раствора составляла 10 мкМ. Препараты просматривали на конфокальном лазерном микроскопе LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Германия). Для регистрации флуоресценции был использован HeNe-

лазер с длиной волны возбуждения 543 нм, запирающий фильтр – 560 - 615 нм.

1.4. Выделение тканеспецифичного галактана и ассоциированного с ним белка. Пробы растительного материала гомогенизировали в жидком азоте с добавлением 10 mM Na-ацетатного буфера (pH 5.5). Полимеры, попадающие в супернатант гомогената ткани, осаждали 80% этанолом. Фракцию полимеров, содержащую тканеспецифичный галактан, экстрагировали из осадка 1 мл 10 mM Na-ацетатного буфера (pH 5.5). Разделение полученной фракции проводили на колонке с сефарозой CL-4B (0.9x90 см, Pharmacia, Швеция) при 8°C. В ходе выделения галактана и ассоциированного с ним белка на всех этапах во фракции добавляли коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США). Для определения содержания углеводов во фракциях использовали фенольный метод определения моносахаридов Дюбуа (Dubois et al., 1956). Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976). Белки из препарата высокомолекулярного галактана осаждали 80% ацетоном и разделяли с помощью одномерного электрофореза.

1.5. Постановка одномерного электрофореза по Лэммли. Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в 8.5% Na-ДДС-ПААГ (Laemmli, 1970) с использованием мини-камеры VE-1M (Хеликон, Россия). Гели фиксировали, окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250.

1.6. Идентификация белков методами протеомики. После проведения одномерного электрофореза вырезанный кусочек геля подвергался трипсинолизу. Далее проводили ВЭЖХ МС/МС анализ с использованием ионной ловушки ХСТ 1100 (Agilent Technologies, США) (Hotte, Deyholos, 2008). Идентификация белка осуществлялась при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com).

1.7. Анализ аминокислотной последовательности белка с помощью методов биоинформатики. Нуклеотидную последовательность выявленного гена β -галактозидазы транслировали в программе по работе с нуклеотидными последовательностями (www.molbiol.ru/scripts/01_13.html). Поиск консервативного домена вели в базе сайта www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi. Наличие сигнального пептида устанавливали с помощью программ TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) и SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), трансмембранного домена – TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

1.8. Получение антител к выделенному белку. В качестве антигена использовали кусочки полиакриламидного геля, содержащие очищенный исследуемый белок, который вводили мышам подкожно или внутрибрюшинно. Для внутривенной реиммунизации антиген вводили после элюирования белка из кусочков геля. При введении пробы использовали коммерческий препарат ПАФ (полный адъювант Фрейнда, Gibco, США). Специфичность полученных антител подтверждали с помощью иммуноферментного анализа после переноса белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану. Фракцию растворимых белков, используемую для

сопоставления, получали путем их осаждения 80% ацетоном с 10% ТХУ из осветленного гомогената волокнистой части стебля льна.

1.9. Анализ срезов стебля растений методами микроскопии и иммуноцитохимии. Иммуноцитохимическую локализацию галактана проводили на ультратонких срезах стебля льна, конопли и древесины натяжения тополя. Фиксацию растительного материала осуществляли по стандартной методике с доработками (Vicre, 1998). В качестве первичного антитела использовали полученные поликлональные мышинные антитела N1, специфичные к β -галактозидазе, или коммерческие антитела LM5 (Plant Probes), специфичные к β -(1 $\rightarrow$ 4)-галактанам (Jones et al., 1997). Срезы просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе модели JEM-1200 EX (Япония). Для оценки толщины слоев клеточной стенки волокон делали поперечные срезы стебля толщиной 2-3 мкм на ультратоме LKB 8800. Срезы просматривали и фотографировали на конфокальном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия). Толщину слоёв клеточных стенок волокон трансгенных растений измеряли при помощи программы AimImageBrowser. Исследования с помощью микроскопии и иммуноцитохимии проводились при методической поддержке сотрудников КИББ КазНЦ РАН д.б.н. В.В. Сальникова, к.б.н. М.В. Агеевой, к.б.н. А.В. Снегиревой.

1.10. Оценка содержания мРНК методом ПЦР в реальном времени. Выделение тотальной РНК проводили с использованием кита RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). Затем с использованием обратной транскрипции нарабатывали кДНК, которую использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР в реальном времени. Амплификацию и детекцию ПЦР продуктов проводили на ICycler IQ-4 (Bio-Rad, США). Праймеры конструировали с помощью VECTOR NT18: прямой праймер 5'-GCCAGAGTGTGAAGCTAAAT-3', обратный праймер 5'-GGTTGGTGTACAAGGTGAAA-3', зонд 5'-(FAM-G)CGCCTCTG(BHQ1-T)TGGTCTTGCGA-3'.

1.11. Выделение полимеров, слабо связанных с микрофибриллами целлюлозы клеточной стенки. Из осадка, оставшегося после выделения полимеров, попадающих в супернатант при гомогенизации ткани в буфере, фракционировали клеточную стенку по методике Талмадж (Talmage et al., 1973). Фракцию полимеров, слабо связанных с целлюлозой, получали из осадка, полученного после обработки глюкоамилазой, путем кипячения в 0.5% оксалате аммония на водяной бане в течение 1 ч. Разделение полимеров, экстрагируемых оксалатом аммония, проводили на колонке с сефарозой CL-4В. Моносахаридный анализ проводили после объединения и гидролиза фракций, соответствующих высокомолекулярному пику.

Статистический анализ данных во всех экспериментах проводили с применением стандартных математических методов пакета программы Microsoft Excel-2003 (расчет среднеквадратического отклонения).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Оценка галактаназной активности в тканях стебля льна на разных стадиях развития волокон.

2.1.1. Анализ низкомолекулярных углеводов в тканях стебля льна. Одним из подходов для характеристики фермента является анализ продукта его реакции. Нами был проведен анализ содержания низкомолекулярных углеводов в участках стебля льна на разных стадиях развития флоэмных волокон. При этом имели ввиду, что в результате действия эндогалактаназы должны появляться олигомерные и мономерные

формы галактозы, а галактозидазы – только мономерные.

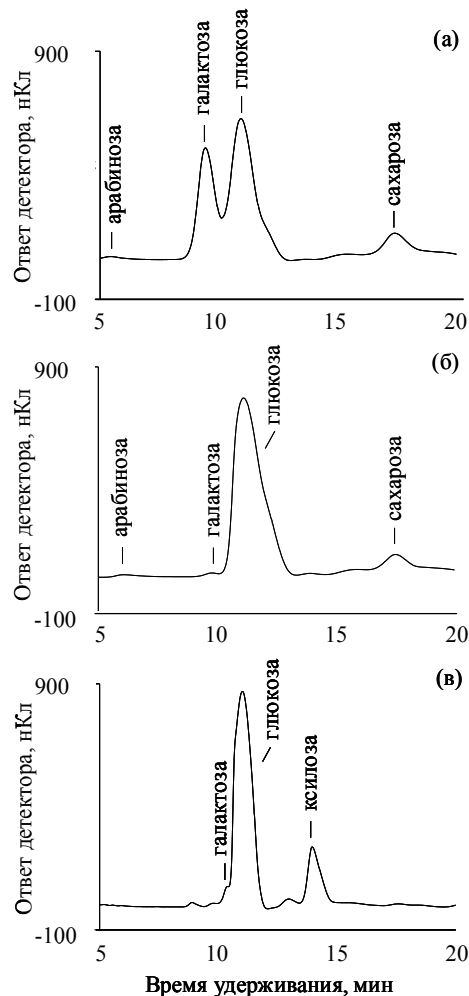


Рис. 1. Профиль элюции низкомолекулярных углеводов осветленного гомогената различных участков стебля льна после разделения на колонке CarboPac PA 1. а – волокна на стадии формирования вторичной клеточной стенки; б – волокна на стадии интрузивного роста; в – ксилемная часть стебля ниже «точки слома».

Анализ осветленных гомогенатов участков стебля льна методом высокоэффективной анионообменной хроматографии выявил несколько различных низкомолекулярных сахаров. На хроматограммах идентифицировали пики глюкозы, галактозы, сахарозы, арабинозы и ксилозы (рис. 1). В гомогенате участка стебля, где волокна приступили к формированию вторичной клеточной стенки (ниже «точки слома») (рис. 1 а), отмечали высокое, по сравнению с участком стебля, где волокна удлиняются (выше «точки слома») (рис. 1 б), содержание галактозы. При разделении участка стебля ниже «точки слома» на внутреннюю (ксилемную) и внешнюю (волокнистую), содержащую флоэмные волокна, галактозу обнаруживали именно в волокнистой части стебля, где ее пик относился к числу основных (рис. 1 а). Олигомерных форм галактозы не выявлено, о чем свидетельствовало отсутствие пиков в области выхода олигомеров, а также не изменяющаяся концентрация галактозы до и после гидролиза 2М ТФУ.

Общая концентрация галактозы в участках стебля ниже «точки слома» достигала 10.2 мМ, в верхней части стебля – 0.3 мМ; при этом концентрация других выявленных низкомолекулярных углеводов в анализируемых участках стебля существенно не отличалась.

Подобные закономерности отмечали в течение всего периода формирования волокнами вторичной клеточной стенки желатинозного типа.

Выявление в участках стебля, содержащих волокна на стадии формирования вторичной клеточной стенки, высокой концентрации мономерной галактозы и отсутствие ее олигомеров позволяет предположить наличие в тканях стебля льна ниже «точки слома» β -галактозидазной активности и отсутствие эндогалактаназной.

2.1.2. Оценка β -галактозидазной активности в тканях стебля льна с помощью искусственных субстратов. Анализ β -галактозидазной активности в участках стебля

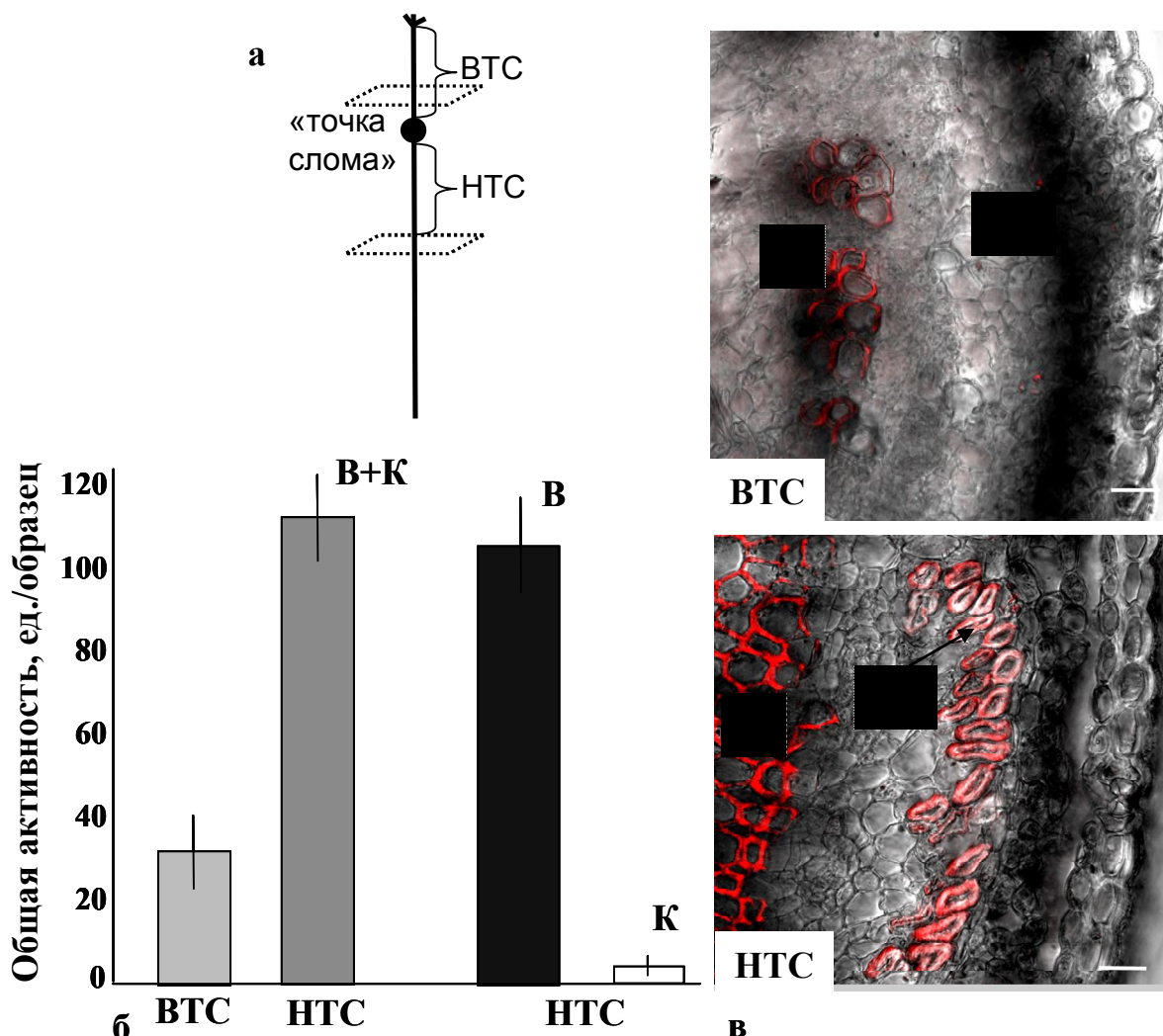


Рис. 2. Выявление β -галактозидазной активности в тканях стебля льна с помощью искусственных субстратов. а – схема фиксации растительного материала, пунктиром на стебле обозначены места поперечных срезов; б – β -галактозидазная активность в тканях стебля льна, хромогенный субстрат *o*-нитрофенил- β -галактопиранозид; в – локализация активности в тканях стебля льна, флуорогенный субстрат резорурфин- β -D-галактопиранозид. BTC – участок стебля выше «точки слома», HTC – участок стебля ниже «точки слома»; В – волокнистая часть стебля HTC, К – ксилемная часть стебля HTC; Вп – волокна с первичной клеточной стенкой BTC, Вв – волокна со вторичной клеточной стенкой HTC. Масштабная линия 20 мкм. Фото Агеевой М.В.

льна, содержащих волокна на разных стадиях развития, с помощью хромогенного субстрата (*o*-нитрофенил- β -галактопиранозид) показал (рис. 2 б), что β -галактозидазная активность (в расчете на единицу длины стебля) в несколько раз возрастает при переходе волокон от удлинения клетки к формированию вторичной клеточной стенки. При разделении участков стебля ниже «точки слома» на волокнистую и ксилемную части, практически вся активность обнаруживалась в волокнистой части (рис. 2 б).

Локализацию β -галактозидазной активности оценивали путем окрашивания поперечных срезов стебля льна флуорогенным субстратом (резорифин- β -D-галактопиранозид) с последующим анализом срезов на конфокальном микроскопе. β -Галактозидазная активность была выявлена преимущественно во флоэмных волокнах льна на стадии формирования вторичной клеточной стенки (рис. 2 в). В ксилемной части стебля проявлялось неспецифичное окрашивание, наблюдавшееся и в отсутствии субстрата.

2.2. Выявление и идентификация фермента, осуществляющего модификации тканеспецифичного галактана волокон льна.

2.2.1. Анализ β -галактозидазной активности во фракции, содержащей тканеспецифичный галактан. Одним из наиболее вероятных субстратов для действия анализируемого фермента в волокнах льна является ткане- и стадия-специфичный галактан, присутствующий в волокнах на стадии формирования вторичной клеточной стенки. Этот полимер попадает в буфер при гомогенизации тканей и, благодаря значительной молекулярной массе (700-2000 кДа), может быть отделен от других полимеров, осаждаемых из супернатанта гомогената 80% этанолом (Gorshkova et al., 1996). В связи с этим нами был проведен анализ общей и специфической β -галактозидазной активности на разных этапах выделения галактана: в осветленных гомогенатах, во фракции полимеров, осаждаемых из гомогената 80% этанолом, а также во фракции высокомолекулярного галактана.

Существенная часть общей β -галактозидазной активности была обнаружена во фракции высокомолекулярного галактана, в которой отмечали максимальное значение удельной активности (рис. 3). Профили элюции, оцененные по активности фермента и содержанию углеводов, в высокомолекулярной области имели сходный характер (рис. 4). Это побудило нас проанализировать наличие в высокомолекулярной фракции белков, оценить их количество и состав.

2.2.2. Белковый состав фракции, содержащей тканеспецифичный галактан. При анализе белков, входящих в состав высокомолекулярной фракции, методом одномерного электрофореза, было выявлено наличие доминантной полосы белка с молекулярной массой около 70 кДа.

Элюция белка в столь нехарактерной для основной массы белков области (700-2000 кДа) свидетельствует об ассоциации его с полимером, а отделение от полисахара-

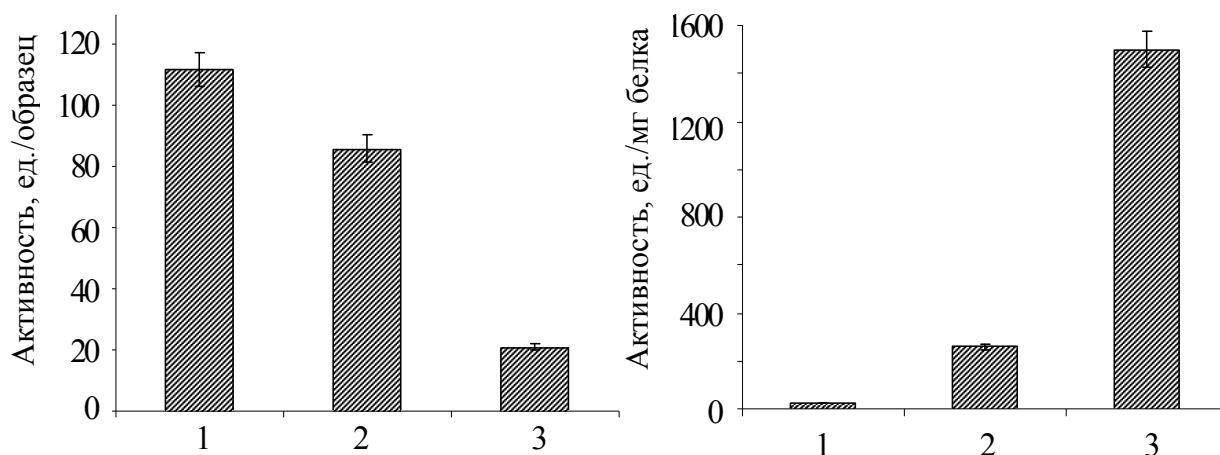


Рис. 3. β -Галактозидазная активность в участках стебля льна, содержащих волокна на стадии формирования вторичной клеточной стенки (в расчете на единицу длины стебля), субстрат *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид. Слева – общая активность в образце, справа – специфическая активность в расчете на мг белка; 1 - осветленный гомогенат, 2 – фракция полимеров, осаждаемых из гомогената 80% этанолом, 3 - фракция высокомолекулярного галактана.

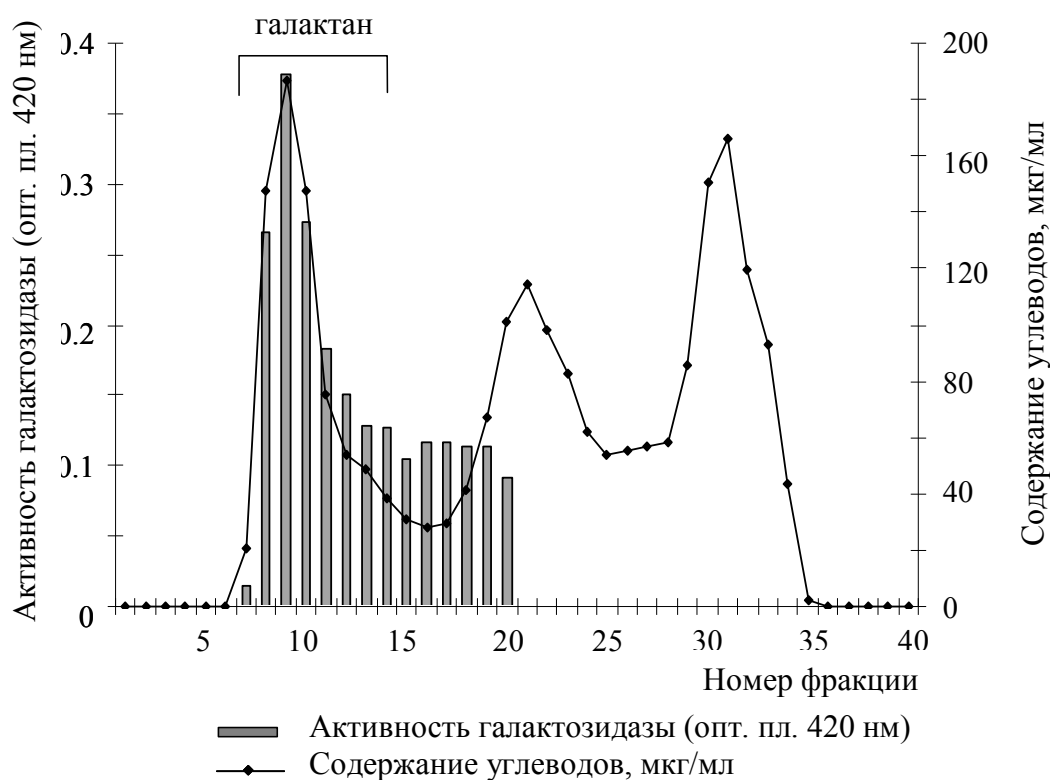


Рис. 4. Профиль элюции полимеров, осаждаемых из гомогената волокнистой части стебля льна 80% этанолом, построенный по содержанию углеводов, и активность β -галактозидазы в отдельных фракциях после хроматографирования на колонке с сефарозой CL-4B. Субстрат *o*-нитрофенил- β -галактопиранозид. В низкомолекулярной части профиля активность β -галактозидазы не оценивалась из-за возможной неспецифики ввиду окрашивания эндогенными соединениями. Объем фракций – 1.8 мл.

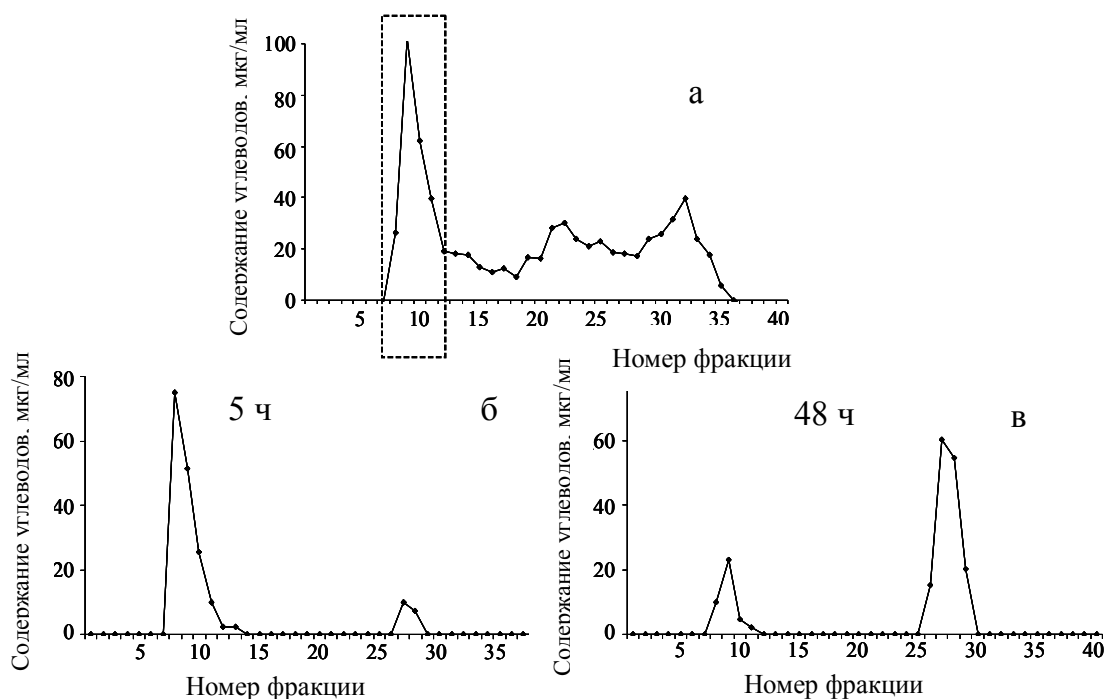


Рис. 5. Изменения в профиле элюции галактана при хроматографировании на колонке с сефарозой CL-4В после инкубации с ферментом. а – исходный профиль полимеров, осаждаемых из гомогената 80% этанолом, б – профиль элюции препарата высокомолекулярного галактана после 5 часов воздействия эндогенной β -галактозидазы, в – профиль элюции препарата высокомолекулярного галактана после 48 часов воздействия β -галактозидазы. Пунктиром отмечены фракции, соответствующие галактану, которые отбирали для инкубации с ферментом и повторного хроматографирования.

рида при обработке ионным детергентом – о нековалентном характере связи белка и галактана. Ассоциация белка с высокомолекулярным галактаном позволила отделить его от всей совокупности растворимых белков волокнистой части стебля и получить чистый препарат белка.

2.2.3. Характеристика выявленного во фракции тканеспецифичного галактана белка методами протеомики и биоинформатики. Полоса геля, соответствующая анализируемому белку, была вырезана и пептиды, содержащиеся в ней, после предварительного трипсинолиза были проанализированы с помощью масс-спектрометрии. В ходе идентификации был выявлен пептид, имеющий существенную гомологию с растительной β -галактозидазой (*Cicer arietinum* L.). Пептидов, соответствующих другим белкам, не обнаружено.

Дополнительным аргументом, позволяющим идентифицировать анализируемый белок, служит сопоставление обнаруженного олигопептида с нуклеотидной последовательностью гена β -галактозидазы льна, полный сиквенс которого был получен в ходе исследований изменения профиля экспрессии генов в тканях стебля льна при смене стадии развития волокон (нашей лабораторией совместно с коллегами

из Международного института исследований растений Вагенингена, Нидерланды). При трансляции нуклеотидной последовательности гена в аминокислотную обнаруживали фрагмент, последовательность которого совпадала с аминокислотной последовательностью фрагмента, полученного в результате трипсинолиза белка, выделенного из препарата тканеспецифичного галактана, по которому прошла идентификация.

Для подтверждения идентификации белка необходимо продемонстрировать его ферментативную активность на нативном субстрате. Для этого после фракционирования полимеров, осаждаемых из гомогената волокнистой части стебля льна 80% этанолом, на колонке с сефарозой CL-4B отбирали фракции, соответствующие времени выхода высокомолекулярного галактана, и выдерживали при 8°C в течение 5 и 48 ч, после чего проводили повторное хроматографирование. При этом в низкомолекулярной области появлялся дополнительный пик (рис. 5), моносахаридный анализ которого (без предварительного гидролиза) выявлял только мономерную галактозу. Гидролиз содержимого этого пика (2 М ТФУ, 1 ч, 120°C) не приводил ни к появлению других моносахаридов, ни к увеличению выхода галактозы. Это значит, что продуктом расщепления галактана является исключительно мономерная галактоза. Действие этого фермента выявлялось и по изменению соотношения галактозы и рамнозы в высокомолекулярном пике. Если до повторного хроматографирования это соотношение составляло 14, то через 5 ч инкубации с эндогенным ферментом снижалось до 10, а через 48 ч – до 3.

Таким образом, на основании а) выявления фрагмента белка, гомологичного β -галактозидазе, б) наличия в геноме льна соответствующего гена, экспрессия которого активируется в ходе интенсивного синтеза галактана, в) демонстрации β -галактозидазной активности с помощью искусственных субстратов, г) отщепления мономерной галактозы при гидролизе высокомолекулярного галактана, анализируемый белок может быть идентифицирован как β -галактозидаза, а тканеспецифичный галактан – как ее нативный субстрат. В ходе дальнейшей характеристики транслированной аминокислотной последовательности гена β -галактозидазы с помощью программ TargetP, SignalP, TMHMM, BLAST было установлено, что белок является секретируемым, не содержит трансмембранных доменов и последовательностей, ответственных за закрепление в эндомембранной системе, и принадлежит к семейству гликозидгидролаз GH35 по классификации CAZY (<http://www.cazy.org>).

2.3. Субклеточная локализация β -галактозидазы в тканях растений, волокна которых формируют клеточную стенку желатинозного типа.

2.3.1. Получение поликлональных антител к исследуемому белку. Для установления локализации исследуемого белка в тканях стебля льна нами были получены поликлональные мышинные антитела (N1) к исследуемому белку. Для

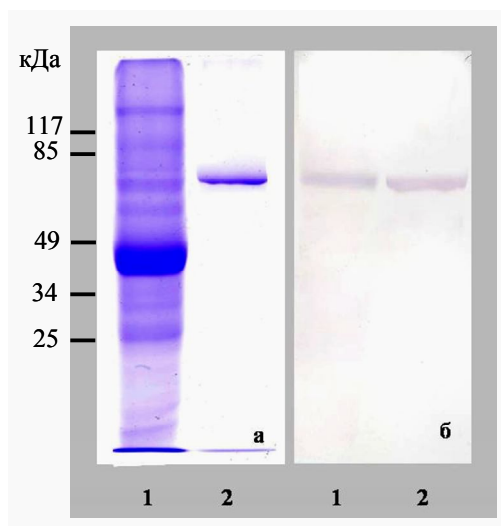


Рис. 6. Характеристика специфичности полученных антител (N1). а – электрофорез экстракта, содержащего растворимые белки волокнистой части стебля льна (1), и белка, содержащегося во фракции тканеспецифичного галактана (2), б – мембрана после вестерн-блоттинга и иммунохимической реакции с полученными поликлональными антителами.

вторичной клеточной стенки (рис. 7). Локализация белка полностью совпадала с локализацией тканеспецифичного галактана, что подтвердили двойным мечением антителами на галактан (LM5) и белок (N1) (рис. 7).

С помощью полученных нами поликлональных антител к β -галактозидазе льна было установлено наличие аналогичного фермента в тканях других растений, формирующих волокна с клеточной стенкой желатинозного типа: в первичных и вторичных флоэмных волокнах конопли и в ксилемных волокнах древесины натяжения тополя (рис. 8). При этом исследуемый белок обнаруживался только в желатинозных слоях клеточной стенки волокон и не выявлялся ни в других слоях клеточной стенки (срединной пластинке, первичной клеточной стенке, в ксилановом слое вторичной клеточной стенки), ни в клетках других тканей.

Выявление β -галактозидазы во всех проанализированных растениях, формирующих волокна с клеточной стенкой желатинозного типа, указывает на наличие сходных механизмов формирования клеточных стенок такого типа и существенную роль в них β -галактозидазы у растений различной таксономической принадлежности и у волокон, образованных различными меристемами.

оценки степени специфичности полученных антител, наряду с высокомолекулярной фракцией тканеспецифичного галактана, из которой выделяли исследуемый белок, нами была получена общая фракция растворимых белков, содержащихся в волокнистой части стебля льна (рис. 6 а, 1).

Полученные поликлональные антитела обладали высокой степенью специфичности, т.к. в ходе иммунохимической реакции с использованием полученных антител на мембране в анализируемых фракциях выявлялась одна полоса, соответствующая белку с молекулярной массой около 70 кДа (рис. 6).

2.3.2. Иммуноцитохимическая локализация β -галактозидазы в тканях стебля льна и других растений. С помощью полученных поликлональных антител установили, что обнаруженная β -галактозидаза локализована в волокнах льна, формирующих вторичную клеточную стенку, а именно – в пузырьках аппарата Гольджи и в желатинозных слоях

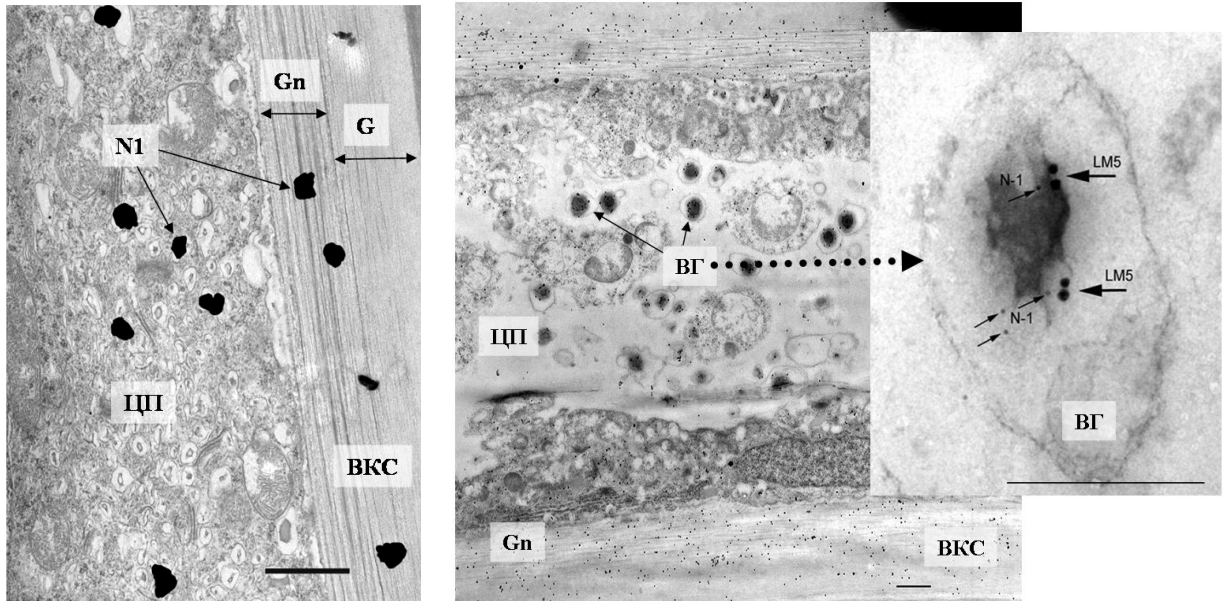


Рис. 7. Слева – иммуноцитохимическая локализация β -галактозидазы с помощью полученных антител (N1) в волокнах льна, формирующих вторичную клеточную стенку желатинозного типа. Для усиления мечения вторичные антитела дополнительно связаны с серебром. Справа – совместная локализация тканеспецифичного галактана (LM5) и идентифицированного белка (N1) во флоэмных волокнах льна, формирующих вторичную клеточную стенку желатинозного типа (для возможности различия вторичные антитела сшиты с частицами золота разного размера). ВКС – вторичная клеточная стенка, Gn – слой ВКС, ЦП – цитоплазма, ВГ – везикулы Гольджи. Масштабная линия 1 мкм. Фото Сальникова В.В.

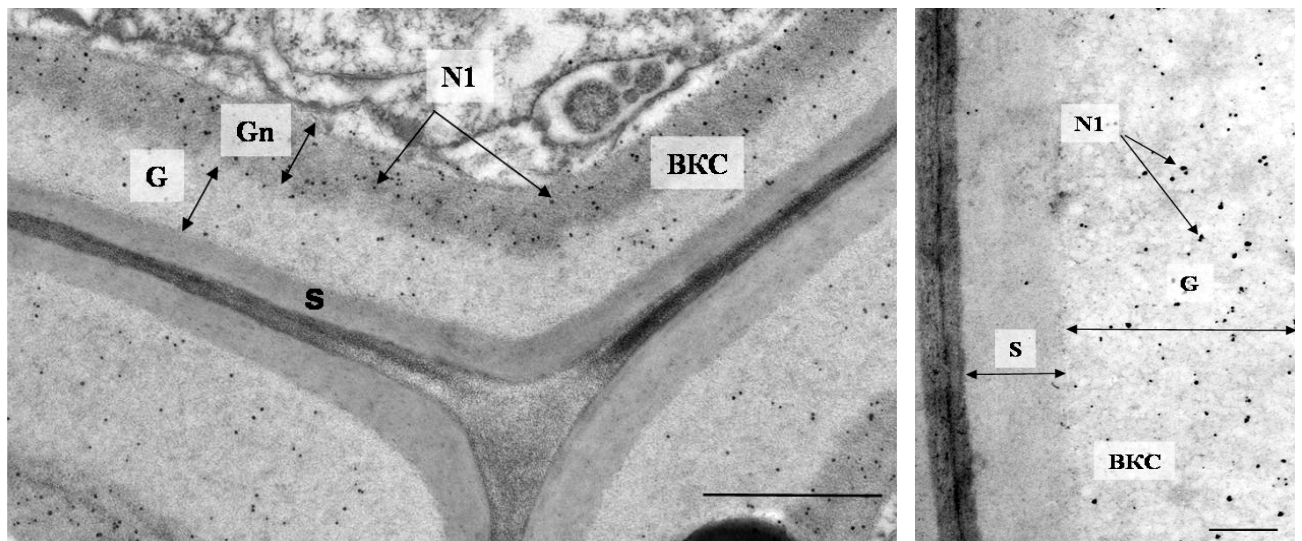


Рис. 8. Слева – локализация β -галактозидазы (N1) во флоэмных волокнах конопли (*Cannabis sativa* L.). Справа – локализация β -галактозидазы (N1) в клеточной стенке ксилемных волокон древесины натяжения тополя (*Populus tremula* L x *P. tremuloides* Michx.). ВКС – вторичная клеточная стенка, S, Gn, G – ксилановый и желатинозные слои ВКС. Масштабная линия 5 мкм. Фото Сальникова В.В.

2.4. Характеристика формирования клеточной стенки желатинозного типа у трансгенных растений льна с антисмысловой конструкцией к гену β -галактозидазы. В совместных исследованиях с коллегами из Университета Алберты

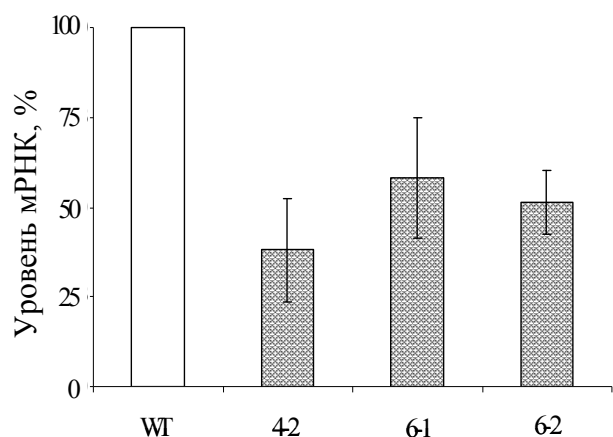


Рис. 9. Снижение уровня содержания мРНК β -галактозидазы в трансгенных линиях растений льна по сравнению с контрольными растениями (контроль принят за 100%).

Оценка экспрессии гена β -галактозидазы в участках стебля ниже «точки слома» с помощью метода ПЦР в реальном времени показала снижение содержания мРНК в трансгенных линиях растений в среднем в 2 раза по сравнению с контрольными растениями (рис. 9). Существенных фенотипических различий или особенностей в развитии у растений трансгенных линий по сравнению с контрольными растениями не наблюдали.

2.4.1. Анализ β -галактозидазной активности в трансгенных растениях льна. При оценке β -галактозидазной активности в осветленных гомогенатах волокнистой части стебля ниже «точки слома» с помощью хромогенного субстрата было выявлено снижение активности в трансгенных линиях по

(Канада), М. Roach и М. Deyholos были получены трансгенные линии льна с пониженной экспрессией гена анализируемой β -галактозидазы, а нами – проведен их анализ. Подавление экспрессии достигалось путем введения антисмысловой последовательности (340 п.о.) к участку гена, содержащему вариабельный и консервативный домены. Анализ изменений проводился на Т2 трех гомозиготных линий (4-1, 6-1, 6-2).

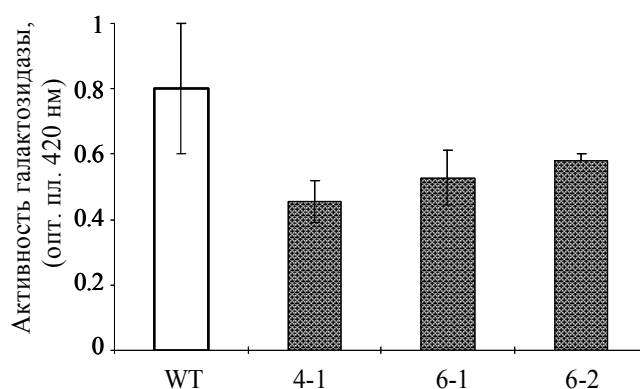


Рис. 10. β -Галактозидазная активность в волокнистой части стебля трансгенных (4-2, 6-1, 6-2) и контрольных растений льна (WT), хромогенный субстрат *o*-нитрофенил- β -галактопиранозид.

Табл. 1. Содержание свободной галактозы во флоэмной части стебля ниже «точки слома» в контрольных (WT) и трансгенных линиях растений (4-2, 6-1, 6-2)

Вариант	Свободная галактоза (мкг/г ткани)
WT	137±32
4-2	51±14
6-1	30±5
6-2	35±9

сравнению с контрольными растениями в среднем на 35 % (рис. 10).

Анализ содержания свободной галактозы в осветленном гомогенате волокнистой части стебля льна показал, что в контрольных растениях содержание свободной галактозы было в 2-4 раза выше, чем в трансгенных растениях (табл. 1). Таким образом, в анализируемых трансгенных линиях растений наблюдается подавление активности тканеспецифичной β -галактозидазы.

2.4.2. Особенности структуры клеточной стенки волокон трансгенных растений льна. В ходе анализа вторичной клеточной стенки волокон с помощью методов микроскопии были выявлены явные отличия трансгенных линий от контрольных растений.

Известно, что для вторичной клеточной стенки волокон желатинозного типа генетически не модифицированных растений льна характерна неоднородность и постсинтетическая модификация слоев (Сальников и др., 1993; Gorshkova et al., 2004, 2005). Внутренняя часть клеточной стенки имеет характерный вид, создающий впечатление рыхлой структуры. Этот слой желатинозной клеточной стенки получил название Gn (вновь отложенный). Наружная часть (слой G) имеет значительно более однородную структуру. Во всех анализируемых трансгенных линиях растений с пониженным уровнем экспрессии β -галактозидазы толщина Gn слоя оказалась больше по сравнению с контрольными растениями (рис. 11). Если доля слоя Gn от общей толщины вторичной клеточной стенки волокон в контрольных растениях составила порядка 40%, то в трансформантах – 60-70%. Следовательно, снижение уровня экспрессии тканеспецифичной β -галактозидазы в волокнах льна приводит к тому, что процесс трансформации рыхлого слоя Gn в более плотный G становится менее эффективным.

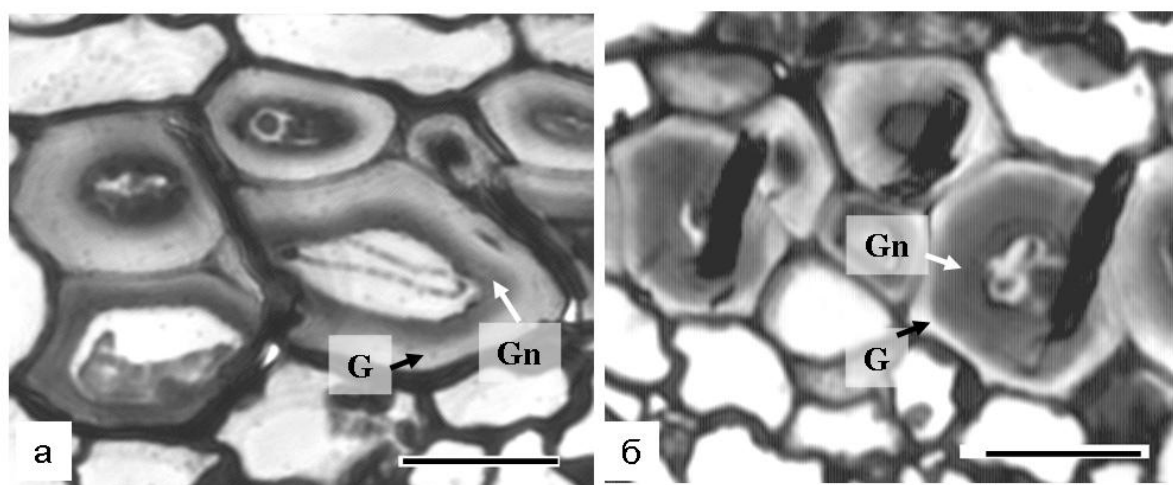


Рис. 11. Поперечный срез стебля льна ниже «точки слома». а – контрольные растения; б – трансгенная линия растений 4-2. G, Gn – слои вторичной клеточной стенки. Масштабная линия 20 мкм. Фото Снегиревой А.В.

2.4.3. Иммуноцитохимическая локализация галактана в клеточной стенке волокон трансгенных растений льна. Анализ распределения эпитопов антитела LM5 с помощью электронной микроскопии также наглядно продемонстрировал отличие в ультраструктуре слоев вторичной клеточной стенки в растениях с нормальной и пониженной β -галактозидазной активностью. Плотность распределения эпитопов для LM5 в клеточной стенке волокон трансгенных линий была выше по сравнению с контрольными растениями, как и толщина слоя клеточной стенки, в котором сосредоточено основное количество связавшихся с эпитопом антител (рис. 12).

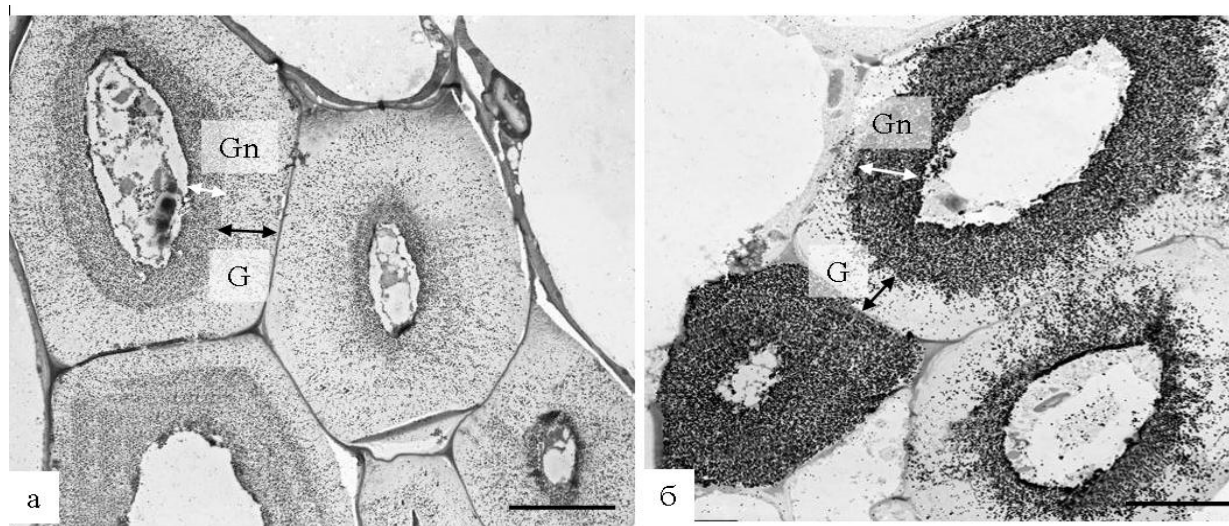


Рис. 12. Анализ распределения (1→4)-галактана (LM 5) с помощью электронной микроскопии на срезах стебля льна ниже «точки слома». а – контрольные растения, б – трансгенная линия растений 6-1. Масштабная линия 5 мкм. Фото Снегиревой А.В.

2.4.4. Содержание тканеспецифичного галактана, слабо связанного с микрофибриллами целлюлозы, в клеточной стенке трансгенных растений льна.

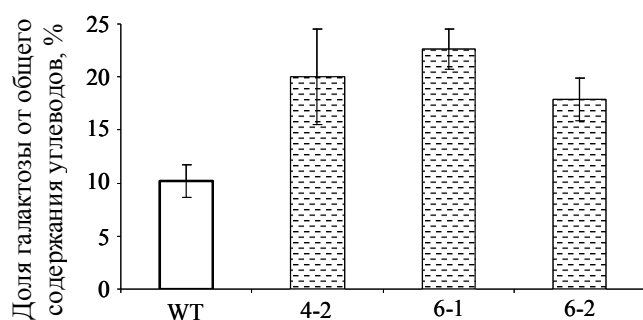


Рис. 13. Доля галактозы от общего содержания углеводов в высокомолекулярном пике после хроматографирования на колонке с сефарозой CL-4В полимеров, экстрагируемых оксалатом аммония из клеточной стенки контрольных растений (WT) и трансгенных линий льна (4-2, 6-1, 6-2).

Проанализировано содержание галактана, как доминирующего полисахарида матрикса, во фракции слабо связанных с микрофибриллами целлюлозы полимеров клеточной стенки контрольных и трансгенных растений льна. Содержание галактана оценивали по количеству галактозы в высокомолекулярном (700-2000 кДа) пике полимеров (экстракция оксалатом аммония), полученном

после их хроматографирования на колонке с сефарозой CL-4B. В клеточной стенке трансгенных растений содержание галактана, слабо связанного с целлюлозой, в 2 раза выше по сравнению с контрольными (рис. 13), что может быть напрямую связано с утолщением Gn-слоя.

Таким образом, анализ трансгенных растений льна не только подтвердил активное участие выявленной β -галактозидазы в метаболизме клеточной стенки желатинозного типа, но и представил убедительные аргументы, что для трансформации Gn-слоя в G-слой необходимо укорочение боковых цепочек тканеспецифичного галактана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в представленной работе результаты позволяют ответить на ряд вопросов, касающихся процессов формирования вторичной клеточной стенки желатинозного типа, обозначить возможные механизмы создания ее особой структуры и выявить ключевых участников этого процесса. Клеточную стенку желатинозного типа формируют только волокна - клетки с наиболее выраженной механической функцией. Создаваемое в клеточных стенках желатинозного типа натяжение необходимо для формирования ответа на различные механические стимулы. Оно способствует, например, развитию отрицательного гравитропизма при образовании реакционной древесины, или формированию устойчивости к сгибанию стебля у травянистых растений с тонким длинным стеблем.

Считается, что реализация механических свойств клеточной стенки желатинозного типа может осуществляться за счет разницы пассивного набухания желатинозного и ксиланового слоев, что связывают либо с различиями в ориентации микрофибрилл целлюлозы (Burgert et al., 2007), либо с наличием гигроскопичных полимеров матрикса (рамногалактуронан I) (Clair et al., 2008). Однако ряд данных позволяет предположить, что натяжение в клеточной стенке желатинозного типа возникает в результате латерального взаимодействия микрофибрилл целлюлозы и захвата полисахаридов матрикса (Mellerowicz et al., 2008). Было показано, что микрофибриллы целлюлозы в волокнах, формирующих клеточную стенку желатинозного типа, характеризуются большими размерами кристаллических участков, по сравнению с большинством других растительных объектов (Viëtor et al., 2002, Sturcova et al., 2004). Это дало основание предполагать наличие в желатинозных слоях латерального взаимодействия микрофибрилл целлюлозы, чему способствует их одинаковая ориентация, а также отсутствие лигнина и значительных количеств полисахаридов матрикса, разделяющих микрофибриллы друг от друга. Е. Mellerowicz с соавторами (Mellerowicz et al., 2008) высказана идея, что микрофибриллы целлюлозы, взаимодействуя латерально, «захватывают» матриксные полисахариды. Этими же авторами, применительно к желатинозным волокнам древесины,

использован термин «мускулы» на основании обнаружения у них контрактильных свойств (Clair et al., 2006). В качестве «запечатанного» полисахарида у волокон разных видов растений выступают, возможно, различные полисахариды. Присутствие в клеточной стенке желатинозного типа волокон ряда растений ткане- и стадия-специфичного галактана, обладающего особыми свойствами, метаболизм которого напрямую связан с формированием желатинозных слоев (Gorshkova, Morvan, 2006; Salnikov et al., 2008), позволяет предположить наличие активной метаболической составляющей в создании натяжения в клеточной стенке желатинозного типа ряда растений.

На основании полученных в нашей лаборатории данных по исследованию метаболизма и структуры тканеспецифичного галактана сформирована следующая гипотеза участия этого полисахарида в формировании надмолекулярной структуры клеточной стенки желатинозного типа (Биогенез растительных волокон, 2009). Тканеспецифичный галактан волокон (2000 кДа), имеющий длинные галактозные цепочки, секретируется с помощью особых производных аппарата Гольджи за пределы плазмалеммы, где встраивается между микрофибриллами целлюлозы и предотвращает их латеральное взаимодействие сразу после формирования (рис. 14). Именно эта часть галактана извлекается при экстракции оксалатом аммония и обеспечивает видимость «рыхлой» структуры недавно отложенных слоев клеточной стенки Gn. По мере развития волокна «рыхлая» структура постепенно трансформируется в более плотную (G-слой), при этом «новые» порции Gn-слоя продолжают откладываться со стороны плазмалеммы. Постепенно толщина внешнего слоя увеличивается, и в зрелом волокне Gn-слой исчезает, целиком трансформируясь в G-слой. Эти процессы сопряжены с изменением кристалличности целлюлозы и с постсинтетической модификацией тканеспецифичного галактана (Andeme-Onzighi et al., 2000; Gorshkova, Morvan, 2006). При этом модификации галактана должны проходить таким образом, чтобы появилась возможность латерального взаимодействия микрофибрилл целлюлозы. Латеральное взаимодействие микрофибрилл целлюлозы обуславливает повышение ее кристалличности и создание более плотного G-слоя.

Постсинтетическая модификация полисахарида предполагает наличие в клеточной стенке соответствующих ферментов, поиск и характеристика которых являлись задачами представленной работы. Нами было установлено присутствие в волокнах льна тканеспецифичной β -галактозидазы, секретируемой во вторичную клеточную стенку желатинозного типа. Продемонстрирована активация экспрессии гена этого фермента на соответствующей стадии развития волокон. Показано, что нативным субстратом для выявленной β -галактозидазы может служить ткане- и стадия-специфичный галактан сложной структуры.

Дополняя высказанную выше гипотезу, мы предполагаем, что после

встраивания в клеточную стенку β -галактозидаза гидролизует длинные боковые цепочки галактана, что позволяет микрофибриллам целлюлозы латерально взаимодействовать. Оставшийся между микрофибриллами «запечатанный» полисахарид приводит к их изгибу, что создает в клеточной стенке некоторое натяжение (рис. 14).

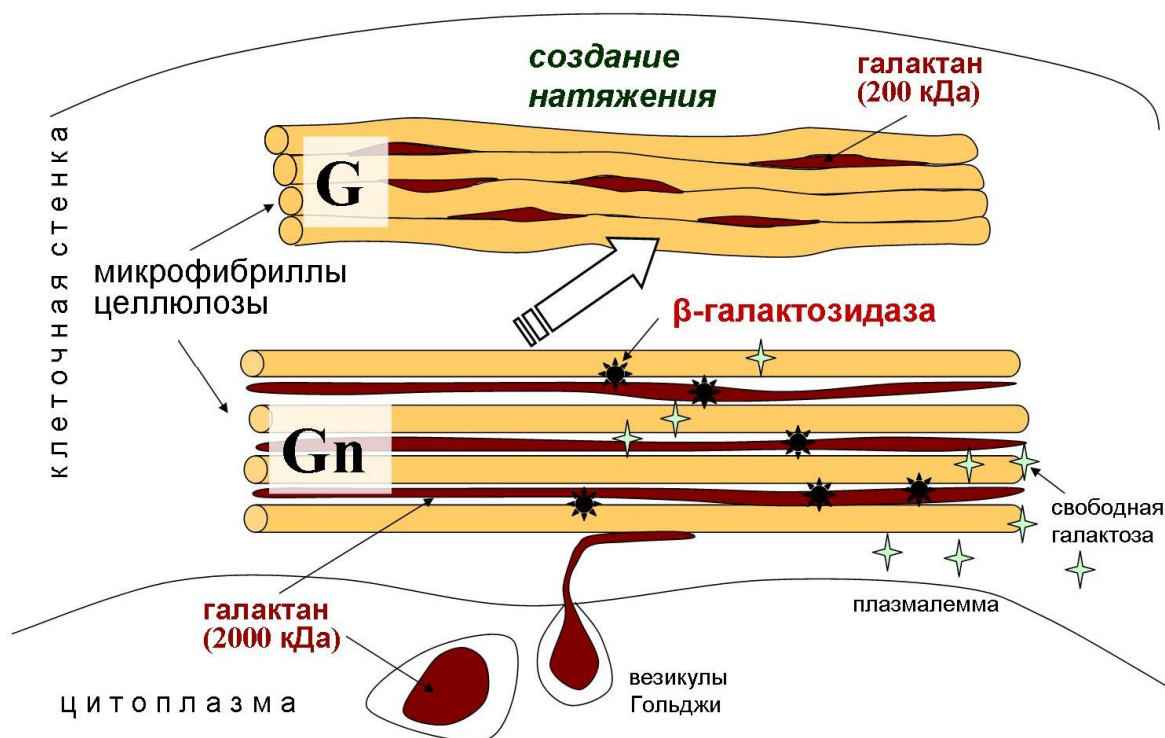


Рис. 14. Схема участия β -галактозидазы в трансформации слоев клеточной стенки желатинозного типа.

Окончательно убедиться в том, что идентифицированная β -галактозидаза участвует в модификации тканеспецифичного галактана, которая обуславливает трансформацию Gn-слоя в G-слой клеточной стенки, помог анализ изменений, происходящих в структуре клеточной стенки волокон, в которых понижена экспрессия гена этого фермента. Подавление активности β -галактозидазы приводит к нарушению нормального хода трансформации слоев клеточной стенки. Увеличение содержания в клеточной стенке волокон галактана, слабо связанного с целлюлозой, сопровождается увеличением доли Gn-слоя от общей толщины клеточной стенки в трансгенных растениях. Это доказывает, что отличительные особенности структуры Gn-слоя связаны с наличием галактана именно этой фракции. Подавление активности β -галактозидазы приводит к снижению эффективности гидролиза боковых цепочек галактана, слабо связанного с микрофибриллами целлюлозы, вследствие чего микрофибриллы целлюлозы не могут латерально взаимодействовать, а, следовательно, и формировать более плотный слой G.

Таким образом, для функционирования клеточной стенки желатинозного типа флоэмных волокон льна необходимы активные метаболические процессы, ключевым элементом которых является β -галактозидаза. Обнаружение аналогичного фермента в волокнах желатинозного типа у растений различной таксономической принадлежности и в волокнах различного происхождения говорит о наличии у них сходных механизмов формирования клеточных стенок желатинозного типа и делает выявленные на примере волокон льна закономерности более общими.

ВЫВОДЫ

1. Показано резкое увеличение β -галактозидазной активности в волокнах льна (*Linum usitatissimum* L.) при их переходе от интрузивного роста к формированию вторичной клеточной стенки желатинозного типа.

2. Выделен и очищен белок, ассоциированный с тканеспецифичным галактаном волокон льна. Анализируемый белок идентифицирован как β -галактозидаза на основании а) выявления с помощью масс-спектрометрии фрагмента белка, гомологичного β -галактозидазе, б) наличия в геноме льна соответствующего гена, экспрессия которого активируется при переходе волокон к формированию вторичной клеточной стенки желатинозного типа, в) демонстрации β -галактозидазной активности с помощью искусственных субстратов, г) отщепления мономерной галактозы от β -(1 $\rightarrow$ 4)-галактана.

3. С помощью полученных специфичных антител установлена тканевая и субклеточная локализация идентифицированной β -галактозидазы. Показана солокализация анализируемого фермента с тканеспецифичным галактаном в секретируемых пузырьках аппарата Гольджи и в клеточной стенке желатинозного типа волокон льна.

4. Установлено наличие аналогичной β -галактозидазы в волокнах растений различной таксономической принадлежности и образуемых различными меристемами: в первичных и вторичных флоэмных волокнах конопли (*Cannabis sativa* L.) и ксилемных волокнах древесины натяжения тополя (*Populus tremula* L x *P. tremuloides* Michx.). Это указывает на существование сходных механизмов формирования клеточных стенок желатинозного типа и на существенную роль в них β -галактозидазы.

5. Продемонстрировано нарушение нормального хода трансформации структуры слоев желатинозной клеточной стенки при подавлении экспрессии гена тканеспецифичной β -галактозидазы в трансгенных растениях льна. Это доказывает необходимость активных метаболических процессов для функционирования клеточной стенки желатинозного типа и ключевую роль в них идентифицированного фермента.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мокшина, Н.Е.** Характеристика выделенного из флоэмы льна-долгунца комплекса высокомолекулярного галактана с неидентифицированным белком / **Н.Е. Мокшина**, Л.О. Ягодина, Т.А. Горшкова // Сб. тез. / Пущино, 2006. – С. 84.
2. Особенности функционирования аппарата Гольджи при формировании клеточной стенки желатинозного типа / **Н.Е. Мокшина**, Т.А. Горшкова, Л.О. Ягодина, М.В. Агеева, Н.Н. Ибрагимова, В.В. Сальников, Т.Е. Чернова // Сб. тез. / С.-Пб., 2006. – С. 174.
3. Biogenesis of gelatinous type cell wall in plant fibers // T. Gorshkova, V. Salnikov, M. Ageeva, **N. Mokshina**, S. Amenitsky, N. Ibragimova / Physiologia Plantarum. Abstr. of XIth Cell Wall Meeting. / Copenhagen, 2007. – № 4. – V. 130.
4. Тканеспецифичный белок волокон с клеточной стенкой желатинозного типа / Н.Н. Ибрагимова, **Н.Е. Мокшина**, Л.О. Ягодина, В.В. Сальников, Т.А. Горшкова // Материалы докладов / Коми НЦ УрО РАН. – Сыктывкар, 2007. – С. 85-87.
5. Pectins in secondary cell walls / Т.А. Gorshkova, P.V. Mikshina, N.N. Ibragimova, **N.E. Mokshina**, O.P. Gurjanov, S.B. Chemiksova // Book of Abstract / Wageningen Academic Publishers. – Wageningen, – 2008. – P. 34.
6. **Мокшина, Н.Е.** β -Галактозидазная активность в волокнах льна, формирующих клеточную стенку желатинозного типа / **Н.Е. Мокшина**, Н.Н. Ибрагимова, Т.А. Горшкова // Сб. трудов / Изд-во Арта. – Новосибирск, 2008. – С. 490.
7. Galactosidase activity is important for the formation of secondary cell wall of gelatinous type // N.N. Ibragimova, **N.E. Mokshina**, P.V. Mikshina, S.B. Chemiksova, T.A. Gorshkova / Book of Abstract. / Sigtuna, 2008. – P. 44.
8. Ибрагимова, Н.Н. Проблемы протеомики при исследовании растительной клеточной стенки / Н.Н. Ибрагимова, **Н.Е. Мокшина**, Т.А. Горшкова // Сб. трудов / Апатиты, 2009. – С. 129-131.
9. Формирование вторичной клеточной стенки льняного волокна: особая роль β -галактозидазы / **Н.Е. Мокшина**, Н.Н. Ибрагимова, М.В. Агеева, В.В. Сальников, Т.А. Горшкова // Сб. трудов. / Апатиты, 2009. – С. 236-238.
10. Ибрагимова, Н.Н. Протеомика растительных клеточных стенок / Н.Н. Ибрагимова, **Н.Е. Мокшина**, Т.А. Горшкова // Сб. трудов / Казань, 2009. – С. 21.
11. Роль β -галактозидазы в формировании вторичной клеточной стенки растительных волокон / **Н.Е. Мокшина**, Н.Н. Ибрагимова, М.В. Агеева, В.В. Сальников, С.И. Аменицкий, Т.А. Горшкова // Сб. трудов / Казань, 2009. – С. 117.
12. Pectins in secondary cell walls: modifications during cell wall assembly and maturation / Т.А. Gorshkova, P.V. Mikshina, N.N. Ibragimova, **N.E. Mokshina**, Т.Е. Чернова, О.П. Gurjanov, S.B. Chemiksova // Pectins and Pectinases / Wageningen Academic Publishers. – 2009. – P. 149-165.
13. Свободная галактоза и галактозидазная активность в волокнах льна на разных стадиях формирования / П.В. Микшина, С.Б. Чемикосова, **Н.Е. Мокшина**, Н.Н. Ибрагимова, Т.А. Горшкова // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, №1. – С. 67-77.
14. Формирование вторичной клеточной стенки волокон // Биогенез растительных волокон / Т.А. Горшкова, О.П. Гурьянов, П.В. Микшина, Т.Е. Чернова, М.В. Агеева, В.В. Сальников, **Н.Е. Мокшина**, Н.Н. Ибрагимова, С.И. Аменицкий, С.Б. Чемикосова / под ред. Т.А. Горшковой / Наука. – 2009. – С. 91-176.
15. Ибрагимова, Н.Н. Протеомика растительных волокон // Биогенез растительных волокон / Н.Н. Ибрагимова, **Н.Е. Мокшина**, Т.А. Горшкова / под ред. Т.А. Горшковой. М.: Наука, 2009.
16. Особый тип вторичной клеточной стенки, формируемый растительными волокнами / Т.А. Горшкова, О.П. Гурьянов, П.В. Микшина, Н.Н. Ибрагимова, **Н.Е. Мокшина**, В.В. Сальников, М.В. Агеева, С.И. Аменицкий, Т.Е. Чернова, С.Б. Чемикосова // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – №3. – С. 328-341.