

На правах рукописи



Петрова Анна Андреевна

**СВОЙСТВА ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОГО РАМНОГАЛАКТУРОНАНА I,
ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ
ЖЕЛАТИНОЗНЫХ ВОЛОКОН ЛЬНА**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2015

Работа выполнена в лаборатории механизмов роста растительных клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

- Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией механизмов роста растительных клеток КИББ КазНЦ РАН, г. Казань
Горшкова Татьяна Анатольевна
- Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией растительных полисахаридов Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, г. Москва
Усов Анатолий Иванович
- кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры физиологии и биохимии растений биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, г. Санкт-Петербург
Суслов Дмитрий Владимирович
- Ведущая организация: Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар

Защита состоится 22 декабря 2015 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я 30, тел/факс (843)2927347, e-mail: dissovet@kibb.knc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН и на официальном сайте КИББ КазНЦ РАН <http://www.kibb.knc.ru>

Автореферат разослан «__» ноября 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.А. Пономарева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Рамногалактуронаны – пектиновые компоненты клеточной стенки, которая во многом определяет особенности биологии растительного организма и выполняет многочисленные функции. Функциональная специализация клеточной стенки базируется на разнообразии строения ее полимеров, в первую очередь полисахаридов. Рамногалактуронаны I относят к наиболее сложноорганизованным и вариабельным по структуре полисахаридам растительных клеточных стенок. Эти полисахариды представляют обширную группу полимеров, объединяемых на основе наличия в их структуре остова из чередующихся димеров [$\rightarrow 4$)- α -D-GalpA-(1 $\rightarrow 2$)- α -L-Rhap(1 \rightarrow)]. Разнообразие многих деталей строения этих полимеров настолько велико, что рамногалактуронаны I можно считать предельным вариантом вариабельности структуры полисахаридов. Разновидности рамногалактуронанов I уникальны не только для каждого растения, но и в различных тканях одного растения, а иногда и на разных стадиях развития одной ткани. Осознание этого разнообразия, ставшее возможным благодаря развитию методов анализа строения сложных углеводов, остро поставило вопрос об изучении взаимосвязи структуры полисахарида с его свойствами и функцией в растительном организме.

Рамногалактуронаны I, традиционно считавшиеся компонентами первичных клеточных стенок и секретируемых слизей (Carpita and Gibeaut, 1993; Caffall and Mohnen, 2009; Naran et al., 2008), обнаружены как ключевой компонент матрикса в третичной клеточной стенке (часто называемой желатинозным слоем или G-слоем) (Gur'janov et al., 2007; Горшкова и др., 2010; Mellerowicz and Gorshkova, 2012). Третичная клеточная стенка формируется только в желатинозных растительных волокнах и резко отличается от других типов клеточной стенки исключительно высоким содержанием целлюлозы (85-90%) и аксиальным расположением её микрофибрилл (Muller et al., 2006; Горшкова, 2007). Основная функция желатинозных волокон в растении заключается в поддержании и перемещении органов в пространстве, в частности, при механическом воздействии. В реализации этой функции ключевую роль играют особый состав и структура желатинозной клеточной стенки, обеспечивающие натяжение микрофибрилл целлюлозы (Clair et al., 2008). Существует гипотеза, согласно которой особые свойства желатинозных слоев формируются за счет латерального взаимодействия микрофибрилл целлюлозы при захвате ими полисахаридов матрикса (Mellerowicz et al., 2008, Mellerowicz and Gorshkova, 2012). На примере флоэмных волокон льна продемонстрировано, что в качестве полисахарида, «запечатанного» между микрофибриллами, может выступать сложный тканеспецифичный рамногалактуронан I с боковыми галактановыми цепями (Горшкова и др., 2010; Roach et al., 2011; Mellerowicz and Gorshkova, 2012). Благодаря наличию мощно развитой клеточной стенки желатинозные волокна льна можно очистить от клеток

других типов, что позволяет обойти проблему гетерогенности растительных образцов и исследовать определенный тип клеток на определенной стадии развития. Ткане- и стадияспецифичность рамногалактуронана I волокон льна, а также необычная способность сохранять гидродинамический объем при значительном уменьшении молекулярной массы (Gurjanov et al., 2008; Горшкова и др., 2010; Mikshina et al., 2012), позволяют предполагать наличие у этого полисахарида особенностей физико-химических и механических свойств. Характеристика этих параметров позволит не только конкретизировать существующую гипотезу о реализации механизма создания натяжения в растительных волокнах, но и сформировать комплекс возможных подходов для характеристики свойств сложных полисахаридов растительного происхождения, что крайне актуально как с фундаментальной, так с прикладной точек зрения.

Цель и задачи исследований. Целью работы была характеристика физико-химических и механических свойств тканеспецифичного рамногалактуронана I как ключевого компонента клеточной стенки, обеспечивающего функционирование желатинозных волокон.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать способность тканеспецифичного рамногалактуронана I флоэмных волокон льна к формированию гидрогелей; установить их упруго-пластические свойства.
2. Сопоставить поведение в концентрированных и разбавленных растворах рамногалактуронанов I с различной функциональной нагрузкой; определить гидродинамические параметры этих полимеров.
3. Выявить физико-химические характеристики рамногалактуронана I флоэмных волокон льна, сопряженные с формированием его надмолекулярной структуры.
4. Построить компьютерную модель захвата рамногалактуронана I с установленными свойствами и параметрами латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы с учетом физиологических условий в клеточной стенке.

Научная новизна работы. Охарактеризованы свойства тканеспецифичного рамногалактуронана I, участвующего в формировании третичной клеточной стенки. Впервые установлены структурные особенности рамногалактуронана I волокон льна, позволяющие этому полисахариду участвовать в создании натяжения в желатинозной клеточной стенке.

Впервые для рамногалактуронанов I, на примере рамногалактуронана I желатинозных волокон, выявлена способность к образованию прочных физических гелей. Показано, что формирование геля происходит в результате действия на полисахарид эффекта, сопряженного с движением молекул воды, более прочно удерживаемых полисахаридом по сравнению с не формирующим гель рамногалактуронаном I первичной клеточной стенки картофеля.

Установлено, что гель из рамногалактуронана I желатинозных волокон обладает гиперэластичными свойствами.

Впервые выявлена способность молекул рамногалактуронана I желатинозных волокон к самоассоциации. Продемонстрировано формирование из единичных молекул рамногалактуронана I надмолекулярных структур двух уровней: ассоциат молекул и агрегат ассоциатов молекул.

С помощью моделирования методом конечных элементов впервые рассчитано, что при захвате гиперэластичного рамногалактуронана I волокон льна латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы этот полисахарид сохраняет компактность, а не распределяется вдоль всей поверхности микрофибрилл. Показано, что такое поведение полисахарида при воздействии на систему давления, уровень которого соответствует тургорному давлению в растительной клетке, способствует повышению эффективности натяжения микрофибрилл.

Научно-практическая значимость. Полученные данные вносят существенный вклад в понимание механизма создания контрактильности растительных волокон хозяйственно ценных культур. На примере рамногалактуронана I сформирован комплекс подходов для характеристики свойств и структуры сложных полисахаридов, что открывает новые перспективы в исследовании этого класса молекул. Изучение особых свойств рамногалактуронана I и его взаимодействия с другими полисахаридами клеточной стенки вносит существенный вклад в понимание ее биомеханики и механизмов функционирования. Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в сельскохозяйственных, биологических и биотехнологических учреждениях, занимающихся исследованием растительной биомассы и биологического сырья для создания инновационных технологий, а также в учебном процессе при чтении курсов лекций по физиологии растений, гликобиологии и биофизики в ВУЗах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа проводилась с 2010 по 2015 гг. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по темам «Механизмы формирования растительной клеточной стенки – основного компонента возобновляемого сырья» (гос. регистрационный номер 0123-2014-0005), «Формирование и модификация надмолекулярной структуры растительных клеточных стенок» (гос. регистрационный номер 0120.0 408625). Исследования автора, как исполнителя данной тематики, поддержаны грантами РФФИ № 11-04-01602 «Трехмерная организация полисахаридов матрикса клеточной стенки: роль в создании натяжения в желатинозной клеточной стенке растительных волокон», № 12-04-97077 «Супрамолекулярная структура сложных полисахаридов матрикса растительных клеточных стенок: анализ с

использованием комплекса физических методов», № 12-04-31418 «Роль прочно связанных с целлюлозой полисахаридов в формировании и функционировании растительных клеточных стенок различного типа», № 14-04-31462 «Физико-механические свойства тканеспецифичных рамногалактуронанов I как основа формирования контрактильности растительных волокон». Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора, либо полученных при его непосредственном участии совместно с сотрудниками КИББ КазНЦ РАН с.н.с., к.б.н. Микшиной П.В., с.н.с., к.б.н. Идиятуллиным Б.З. (ЯМР-спектроскопия), с.н.с., к.б.н. Файзуллиным Д.А. (ИК-спектроскопия), сотрудником ИОХ РАН д.х.н., проф. Шашковым А.С. (ЯМР-спектроскопия).

Положения, выносимые на защиту.

1. Функционирование третичной клеточной стенки желатинозных волокон обусловлено взаиморасположением и свойствами входящих в ее состав полимеров.

2. Рамногалактуронаны I желатинозных волокон льна способны формировать прочные физические гели, обладающие гиперэластичными свойствами.

3. Молекулы рамногалактуронана I волокон льна обладают тремя уровнями организации, что может реализовываться за счет присутствующей в их структуре прочносвязанной воды, отсутствия фрагментов полигалактуронана в остове и особенности распределения боковых цепей на нем.

4. Попадание рамногалактуронана I с установленными свойствами между латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы приводит к созданию эффективного натяжения в клеточной стенке.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на VII съезде Общества физиологов растений России (Нижний Новгород, 2011), 21 Международном симпозиуме по гликоконъюгатам «Glyco21» (Вена, Австрия, 2011), IV Всероссийской школе-конференции «Химия и биохимия углеводов» (Саратов, 2011), Международном конгрессе по биоорганической химии «Бутлеровский конгресс» (Казань, Россия, 2011), I Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Казань, 2012), Международной школе-конференции по полисахаридам растений и водорослей «PSP 2012» (Нант, Франция, 2012), Кластере конференций по органической химии «ОргХим-2013 (Репино, 2013), XIII Международной конференции по клеточной стенке «Cell Wall Meeting» (Нант, Франция, 2013), II Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Саратов, 2014), VIII съезде Общества физиологов растений России (Петрозаводск, 2015), семинаре по моделированию клеточной стенки «Multiscale Modeling of Cell Wall Mechanics and Growth in Walled Cells» (Банф, Канада, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 работ, из которых 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы. В работе представлено 43 рисунка и 8 таблиц. Список литературы включает 231 источник; из них 211 иностранных.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследований служили растения льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) сорта Могилевский. Растения выращивали в условиях вегетационного опыта в ящиках со слоем почвы 50 см, на открытом воздухе при естественной освещенности и ежедневном поливе. Для извлечения рамногалактуронана I на этапе синтеза (до встраивания в клеточную стенку) использовали растения на стадии быстрого роста (27 дней после посева). Для извлечения рамногалактуронана I после встраивания в клеточную стенку использовали растения на стадии желтой спелости (100 дней после посева).

Выделение рамногалактуронанов I волокон льна до и после встраивания в клеточную стенку осуществляли на основе описанных ранее протоколов (Gorshkova et al., 1996; Gurjanov et al., 2008; Микшина и др., 2009). Для очистки рамногалактуронанов I от других полимеров использовали гель-проникающую хроматографию на колонке с сефарозой CL-4B (12×400 мм, Pharmacia, Швеция). В качестве стандартов использовали коммерческие препараты пуллуланов 1660, 380, 186, 100 и 48 кДа (Showa Denko, Япония). Содержание углеводов определяли с помощью фенол-сернокислого метода Дюбуа (Dubois et al., 1956). Во всех экспериментах проводили сопоставление рамногалактуронанов I волокон льна с рамногалактуронаном I первичной клеточной стенки картофеля (Megazyme, Ирландия).

Моносахаридный анализ фракций проводили после их гидролиза 2М ТФУ при 120°C в течение 1 ч методом высокоэффективной анионообменной хроматографии (HPLC) на колонке CarboPac PA-1 (4×250 мм, Dionex, США), используя импульсный амперометрический детектор (Dionex, США).

Получение гелей из рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля проводили с использованием трех подходов (Gulrez et al., 2011): 1) насыщение высушенного препарата полисахарида водой (соотношение полисахарид : вода – 4 : 1 с последующим увеличением доли воды в образце до полного растворения полисахарида); 2) нагрев раствора полисахарида при температуре 90° в течение 5 мин и охлаждение при комнатной температуре; 3) выдерживание раствора полисахарида в микроволновой печи при мощности 584 Вт в течение 1 мин и охлаждение при комнатной температуре. Эксперимент на одноосное сжатие гелей проводили с

использованием грузов различной массы (1, 2, 5, 10, 20, 100 и 200 г). Оценку изменения высоты геля проводили с помощью микрометра с цифровым отсчетным устройством (МКЦ-25-0.001, «Челябинский инструментальный завод», Россия).

Размер частиц определяли на приборе Zetasizer Nano при 30°C с использованием He–Ne лазера при длине волны 633 нм. Измерения проводили в режиме обратного рассеяния при положении детектора под углом 173°. Определение гидродинамического радиуса частиц углеводов проводили в диапазоне концентраций от 0.025 до 10 мг/мл в 10 повторностях. Анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Malvern DTS, версия 5.0.

ИК-спектры полисахаридов записывали на приборе IR Affinity1 (Shimadzu, Япония) в диапазоне 700–4000 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹, количество накоплений 128.

При проведении ЯМР-спектроскопии образцы рамногалактуронанов I и пуллуланов растворяли в D₂O (99,9% Ferak, Германия). ¹H, HSQC и DOSY спектры записывали на ЯМР-спектрометре AVANCE III 600 МГц (Bruker, Германия) при 303 К. Определение коэффициента самодиффузии для различных спектральных линий рамногалактуронана I проводили для образцов в диапазоне концентраций от 0.8 до 8.3 мг/мл. Обработку и анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Topspin 2.1 (Bruker, Германия).

Химический и ферментативный гидролиз рамногалактуронанов I проводили по описанным ранее протоколам (Deng et al., 2006; Mikshina et al., 2012).

Моделирование захвата рамногалактуронана I микрофибриллами целлюлозы проводили методом конечных элементов с использованием программной системы AnsysWorkbench 15.0. При построении модели создавали двумерную конструкцию, включающую рамногалактуронан I, расположенный между двумя микрофибриллами целлюлозы, на одну из которых оказывается давление, соответствующее тургорному давлению в клетке (0.3 МПа) (Zimmermann et al., 1980). Для целлюлозы льна использовали характеристики, представленные в литературе (Perez and Mazeau, 2005; Ioelovich, 2008; Sturcova et al., 2005; Bos, 2004). Необходимые для построения модели параметры рамногалактуронана I были получены из результатов экспериментов по одноосному сжатию и динамическому рассеянию света.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Механические свойства рамногалактуронанов I

2.1.1. Установление гелеобразующей способности рамногалактуронанов I

Принято считать, что рамногалактуронаны I, в структуре которых отсутствуют протяженные участки полигалактуроновой кислоты, гелей не формируют. Однако функционирование рамногалактуронана I желатинозных волокон в условиях высокого давления предполагает особые механические свойства этого полисахарида, отличные от традиционных вариантов рамногалактуронанов I, характерных для первичных клеточных стенок. Одним из способов

обеспечения таких свойств может быть существование этого полисахарида в форме физического геля. Анализ гелеобразующей способности рамногалактуронанов I продемонстрировал, что в случае насыщения водой сухого препарата полисахаридов и нагревания их на водяной бане гелеобразования не наблюдалось. Рамногалактуронан I желатинозных волокон обладал способностью образовывать прочные физические гели только при воздействии электромагнитного излучения. Во всех случаях для рамногалактуронана I первичной клеточной стенки клеток картофеля выявлялось только два состояния: вязкий раствор или пленка.

2.1.2. Характеристика упруго-пластических свойств гелей из рамногалактуронанов I

По результатам одноосного сжатия гелей из рамногалактуронана I волокон льна были установлены наличие упругой деформации, зависимость степени деформации этих полисахаридов от величины оказываемого на них давления (рис. 1), а также рассчитаны их модуль Юнга и коэффициент Пуассона (для геля из рамногалактуронана до встраивания в клеточную стенку 9.3 кПа и 0.495 и для геля из рамногалактуронана после встраивания в клеточную стенку 13.7 кПа и 0.483, соответственно). Данные, полученные с помощью эксперимента по одноосному сжатию (наличие упругой деформации, вогнутый характер кривых зависимости деформации от давления, низкие значения модуля Юнга и значения коэффициента Пуассона выше 0.48), свидетельствуют о том, что гели из рамногалактуронанов I волокон льна представляют собой гиперэластичный материал (Robertson et al., 2007).

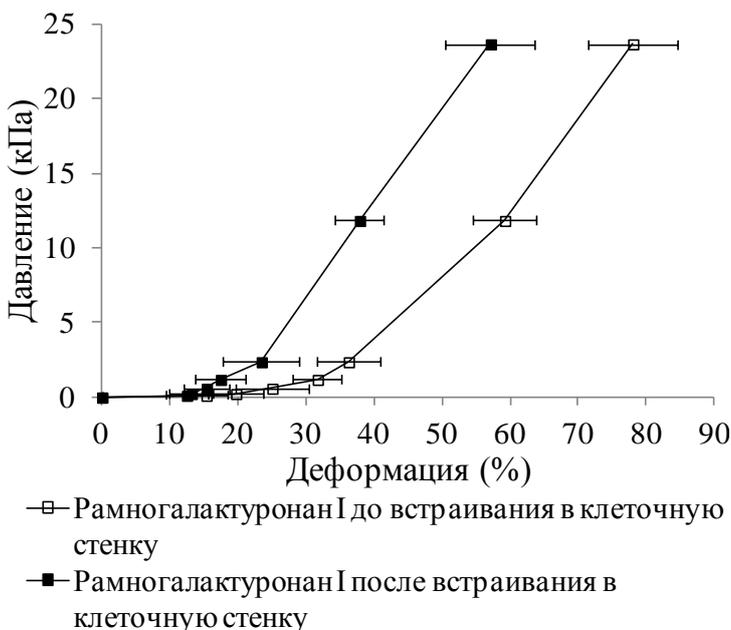


Рис. 1. Кривые зависимости деформации гелевых блоков образцов рамногалактуронанов I желатинозных волокон от давления.

Такая особенность продемонстрирована для рамногалактуронанов I впервые и, судя по всему, лежит в основе функциональной пригодности этих полисахаридов как необходимых элементов для формирования натяжения микрофибрилл целлюлозы желатинозных волокон. Обеспечивать гелеобразующую способность рамногалактуронана I могут: а) элементы структуры и особенности организации этого полисахарида; б) факторы его микроокружения, на роль ключевого из которых при формировании физических гелей используемыми в работе способами претендуют молекулы воды.

2.2.1. Гидродинамические свойства и агрегирование рамногалактуронанов I

Изучение поведения молекул в растворе проводили для четырех образцов – рамногалактуронанов I картофеля, волокон льна до и после встраивания в клеточную стенку и фрагмента (фрагмент Γ_1), полученного после гидролиза рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна галактаназой, содержащего весь остов и часть боковых цепей при соотношении Gal/Rha 1.7 (табл. 1., Gur'janov et al., 2007; Микшина и др., 2009).

Табл. 1. Моносахаридный состав рамногалактуронанов I, моль%

	Rha	Ara	Gal	Glc	GalA	Gal/Rha
РГ I картофеля	8	4	71	2	15	8.9
РГ I волокон льна до встраивания в клеточную стенку	4	2	89	1	4	22.3
РГ I клеточной стенки волокон льна	17	3	64	1	15	3.8
Фрагмент Γ_1	23	6	40	2	29	1.7

Анализ автокорреляционных функций интенсивности излучения выявил присутствие двух типов частиц для рамногалактуронана I картофеля, рамногалактуронана I волокон льна после встраивания в клеточную стенку и его фрагмента, а для рамногалактуронана I волокон льна до встраивания в клеточную стенку – трех типов частиц. Из-за сложности корректного разделения трех компонент дальнейшего анализа рамногалактуронана I волокон льна до встраивания в клеточную стенку не проводили.

При экстраполяции кривых зависимости размера частиц от концентрации образца на бесконечное разведение наименьший гидродинамический радиус (~ 3.5 нм) выявляли для частиц фрагментов рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, полученных после гидролиза полисахарида галактаназой (Γ_1); гидродинамический радиус наименьших частиц рамногалактуронана I клеточных стенок клеток картофеля и волокон льна составил порядка 24-27 нм. Для рамногалактуронана I картофеля при увеличении концентрации в растворе изменения гидродинамического радиуса не отмечалось. По мере увеличения концентрации

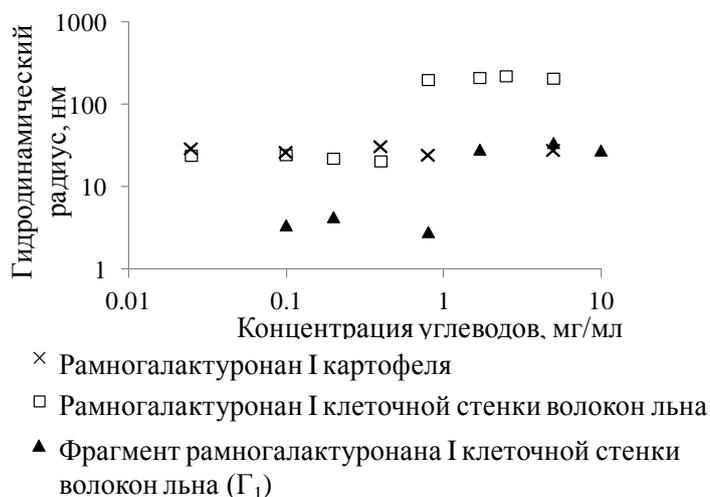


Рис. 2. Зависимость размеров частиц рамногалактуронанов I от концентрации в растворе.

частиц рамногалактуронана I волокон льна к агрегированию.

рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, также как и его фрагмента Γ_1 , наблюдался скачкообразный переход (при концентрации 0.8-1.7 мг/мл), сопровождающийся практически десятикратным увеличением размера частиц: с 3.5 нм до 30 нм – для фрагмента Γ_1 , с 24 нм до 240 нм – для рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна (рис. 2). Такой резкий переход может объясняться способностью

Таким образом, с помощью динамического рассеяния света для образцов рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна и его фрагмента, полученного после гидролиза галактаназой, было выявлено два состояния частиц. Частицы имели меньшую

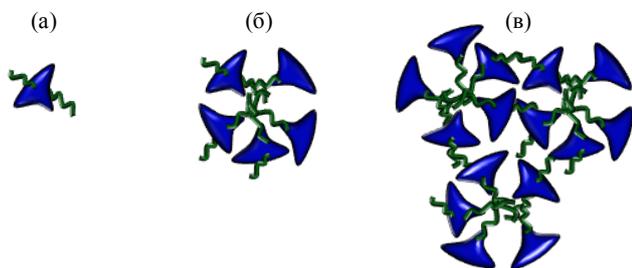


Рис. 3. Уровни пространственной организации молекул рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна: а) «элементарное звено» – только у фрагмента Γ_1 , б) «ассоциат элементарных звеньев» – разбавленные растворы рамногалактуронана I и высококонцентрированные растворы фрагмента Γ_1 , в) «агрегаты ассоциатов» – высококонцентрированные растворы рамногалактуронана I.

подвижность и, соответственно, больший гидродинамический радиус при высоких концентрациях и бóльшую подвижность и меньший гидродинамический радиус при разведении. Возможным объяснением картины, наблюдаемой при анализе рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна и фрагмента этого полисахарида методом динамического рассеяния света, может быть наличие трех уровней организации молекул (рис. 3), а переход между уровнями – участием молекул воды в формировании ассоциатов.

2.2.2. Сорбционные свойства рамногалактуронанов I по отношению к воде. Для

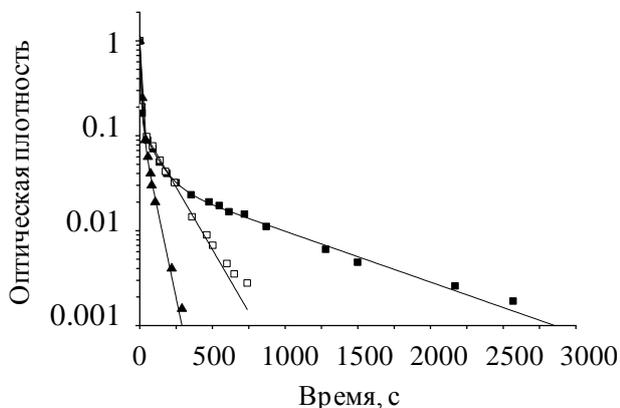


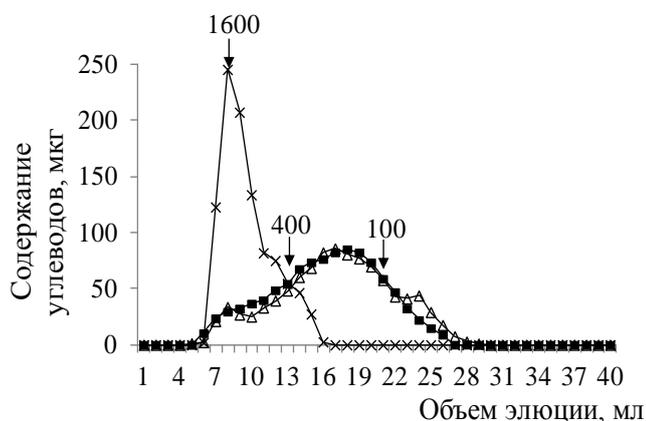
Рис. 4. Нормированные зависимости кинетики Н-D обмена по полосе 3400 см^{-1} пленок образцов: рамногалактуронан I клеточной стенки волокон льна (темные квадраты), рамногалактуронан I до встраивания в клеточную стенку волокон льна (светлые квадраты), рамногалактуронан I картофеля (треугольники). Сплошными линиями обозначены аппроксимации экспоненциальными зависимостями.

сопоставления сорбционных свойств рамногалактуронанов I, имеющих различную способность к агрегированию и гелеобразованию, по отношению к воде использовали ИК-спектроскопию. В образцах рамногалактуронанов I волокон льна относительная интенсивность сигналов легкоудаляемой воды практически одинакова, в то время как в рамногалактуронане I картофеля – значительно выше. В то же время, количество прочносвязанной воды в рамногалактуронане I картофеля меньше, чем в рамногалактуронанах I волокон льна.

Для оценки доступности ОН-групп рамногалактуронанов I растворителю определяли скорость и степень замещения протонов на дейтероны. Для рамногалактуронана I волокон льна, выделенного до встраивания в клеточную стенку, и рамногалактуронана I картофеля параметры аппроксимации кинетических

кривых Н-D обмена описываются двумя экспоненциальными компонентами, а для рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна – тремя (рис. 4). Наиболее быстро реакция обмена протонов протекает в молекулах слабосвязанной гидратной воды. Более медленный обмен характерен для ОН-групп воды и полисахарида, задействованных в образовании водородных связей. Третья, наибольшая по величине постоянная времени, наблюдается только в образце рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, описывает замещение протонов в крайне медленно обмениваемых ОН-группах и составляет порядка 10 % всех ОН-групп полисахарида.

При этом повышение степени удерживания воды рамногалактуронаном I волокон льна



- * Рамногалактуронан I волокон льна до встраивания в клеточную стенку
- Рамногалактуронан I волокон льна после встраивания в клеточную стенку
- ▲ Рамногалактуронан I картофеля

Рис. 5. Профили элюции рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля на колонке с сефарозой CL-4В. Представленные на хроматограмме профили выровнены по количеству углеводов.

образом, структуру остова этих полисахаридов. На HSQC спектре рамногалактуронана I картофеля четко выявляется наличие кросс-пика, относящегося к H1/C1 →4)-α-GalpA-(1→4)-α-GalpA-(1→ (5.08/100.8) (рис. 6а), отсутствующего на HSQC спектре рамногалактуронана I

сопряжено с увеличением прочности формируемого им геля и может быть связано с появлением в структуре образца более плотно упакованных областей.

2.2.3. Сопоставление состава и элементов структурной организации рамногалактуронанов I первичной и третичной клеточных стенок.

Несмотря на выявленное с помощью гель-фильтрации сходство рамногалактуронанов I клеточной стенки волокон льна и картофеля (рис. 5), были продемонстрированы существенные отличия, затрагивающие, главным

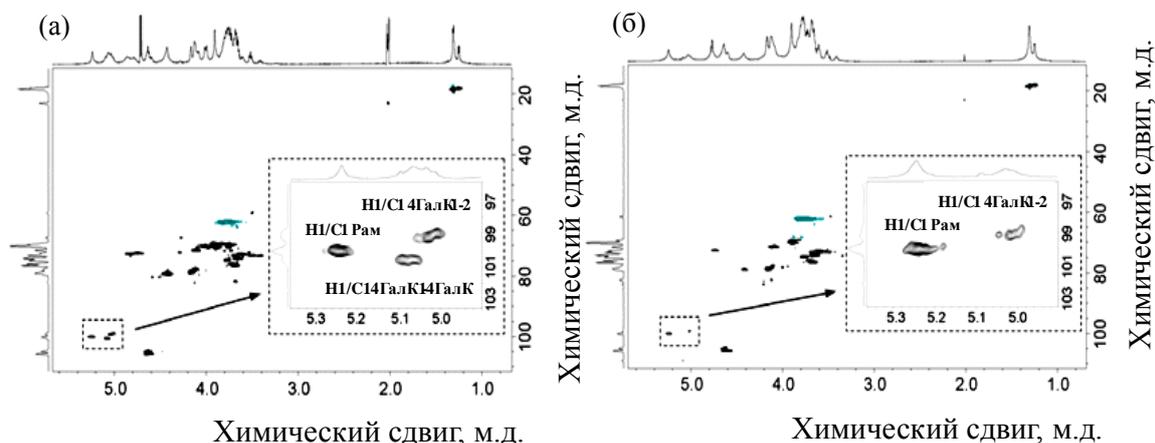


Рис. 6. HSQC ЯМР спектры рамногалактуронана I картофеля (а), рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна (б).

клеточной стенки волокон льна. Это свидетельствует об отсутствии в структуре остова рамногалактуронана I волокон льна фрагментов гомогалактуронана (рис. 6б).

Для установления степени замещения остатков рамнозы рамногалактуронанов I, а также для получения сведений о средней степени их полимеризации эти полисахариды были охарактеризованы с помощью ^1H и корреляционной (COSY) ЯМР спектроскопии (рис. 7).

Из соотношения интенсивности сигналов H6,6' остатков рамнозы рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна (рис. 7а) следует, что пропорция замещенной по О-4 положению (2,4-Rha, протоны у С6, 1.31 м.д.) и незамещенной рамнозы (2-Rha, протоны у С6, 1.24 м.д.) составляет 72% и 28%.

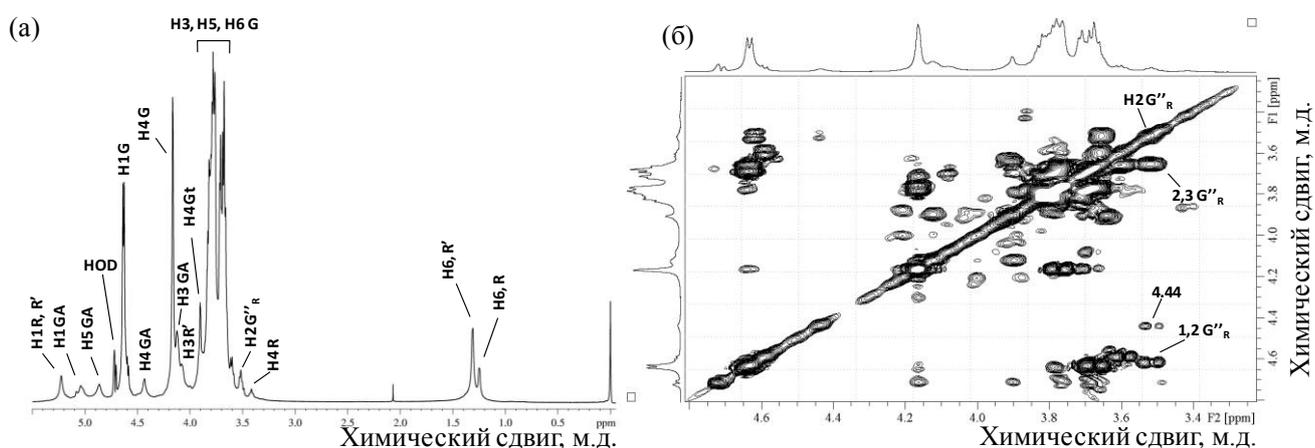


Рис. 7. ^1H ЯМР спектр (а) и фрагмент COSY спектра (б) рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна.

Судя по данным ЯМР анализа, боковые галактановые цепи рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна представлены как олигомерами из β -(1 \rightarrow 4)-связанных остатков галактопиранозы, так и единичными остатками этого моносахарида. Доля галактозы, приходящейся на замещения остатков рамнозы в виде единичного остатка может быть определена по выраженному на спектрах сигналу H2 этого остатка (3.53 м.д.) (рис. 7а). На COSY спектре (рис. 7б) видно, что в интенсивность H2 сигнала терминальной галактозы на протонном спектре (3.53 м.д.) вносят вклад две молекулярные системы. Первая система включает кросс-пики H2 этого остатка с H1 и H3 (4.59 м.д. и 3.66 м.д., соответственно), вторая – сигнал 4.44 м.д., не относящийся к галактозе. Судя по интенсивности этих сигналов, очевидно, что только 2/3 интенсивности сигнала при 3.53 м.д. приходится на H2 терминальной галактозы. Доля рамнозы, замещенной остатками терминальной галактозы, от общего количества замещенной рамнозы была оценена из отношения интенсивностей сигналов при 3.53 м.д. и 1.31 м.д. на ^1H спектре полисахарида и составила 91% от замещенных по О-4 остатков рамнозы и 66% от всех остатков рамнозы остова.

Сравнение отношения Gal/Rha, полученного из моносахаридного состава рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна и отношения интегральных величин H1

галактозы (5.37 для сигнала при 4.60 м.д.) и H1 рамнозы (1.00 для сигнала при 5.23 м.д.), выявило завышение сигналов β -(1 \rightarrow 4)-галактозы на ^1H ЯМР спектре этого полисахарида в 1.4 раза (5.37/3.8) по сравнению с сигналами остова. При введении поправочного коэффициента (1.4) было рассчитано, что доля остатков рамнозы, замещенной остатками терминальной галактозы составляет 47% от общего количества рамнозы в остове полисахарида. Доля остатков незамещенной рамнозы и рамнозы, замещенной единичным остатком галактозы составляет 75% (28+47%, соответственно). Доли рамнозы с терминальной галактозой, и, соответственно, терминальной галактозы, представляющей боковые цепи из единичного остатка, составляют по 8% (17×0.47) от всех углеводных остатков в полимере.

На основании выше приведенных данных была рассчитана средняя длина боковых олигомерных галактановых цепей рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна. Доля остатков рамнозы, замещенных олигомерными боковыми цепями, составляет 4% всех углеводных остатков в полимере; доля остатков галактозы, формирующих олигомерные боковые цепи, – 56%. Следовательно, средняя длина олигомерных галактановых боковых цепей рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна составляет 14 мономеров (56/4).

Аналогичные расчеты для рамногалактуронана I картофеля выявили (Рис. 8), что этот полисахарид содержит 20% остатков рамнозы, замещенных единичными остатками галактозы, и 57% – замещенных олигомерными галактановыми цепями, средняя длина олигомерных боковых цепей – 15 моносахаридных остатков.

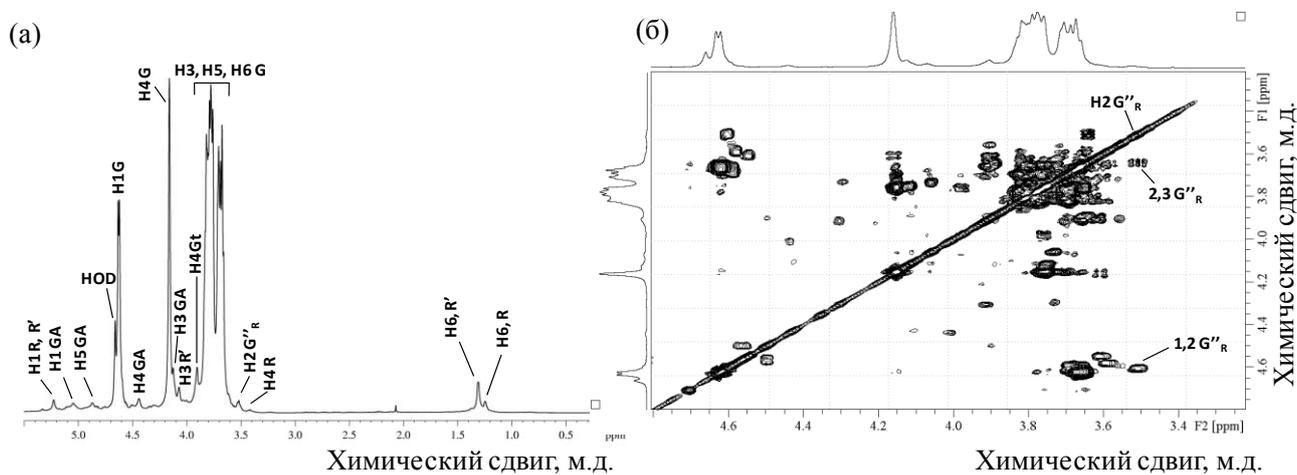


Рис. 8. ^1H ЯМР спектр (а) и фрагмент COSY спектра (б) рамногалактуронана I картофеля.

Таким образом, отсутствие в структуре остова рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна фрагментов из полигалактуроновой кислоты кардинально отличает этот полисахарид от большинства охарактеризованных рамногалактуронанов I (Talmadge et al, 1973; Lau et al., 1985; Carpita and Gibeaut, 1993; Caffall and Mohnen, 2009; Yapo, 2011) и, в частности, от рамногалактуронана I первичной клеточной стенки картофеля. Степень замещения остатков



Рис. 9. Профили элюции фрагментов, полученных после последовательного гидролиза рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля специфичными ферментами и разделения на колонке с сефарозой CL-4В. Результаты гидролиз: а) рамногалактуронана I волокон льна до встраивания в клеточную стенку, б) рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, в) рамногалактуронана I картофеля. Представленные на хроматограммах профили выравнены по количеству углеводов. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы.

рамнозы остова и средняя длина олигомерных цепей рамногалактуронанов I клеточной стенки волокон льна и картофеля сопоставима. Однако, в рамногалактуронане I картофеля доля остатков рамнозы, замещенных олигомерными боковыми цепями, более чем в два раза выше. Совокупность этих данных позволяет заключить, что, по всей видимости, существенную роль в обеспечении способности рамногалактуронана I к самоассоциации играют распределение боковых цепей на остове либо их вариабельность по длине при схожих средних показателях.

2.2.4. Анализ продуктов ферментативного и химического гидролизом рамногалактуронанов I, выделенных из первичной и третичной клеточных стенок. Причиной поддержания рамногалактуронаном I гидродинамического объема может являться наличие конформационных особенностей молекул этого полисахарида, в частности, ограничивающих доступность для фермента. Для исключения этого в работе были проведены эксперименты с последовательной обработкой рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля,

специфичными ферментами: 1) галактаназой, приводящей к удалению значительной части боковых цепей, с последующей инкубацией с рамно-галактуронангидролазой, разрушающей остов; 2) рамногалактуронангидролазой с последующей инкубацией галактаназой.

Последовательная обработка рамногалактуронанов I волокон льна специфичными ферментами приводила к существенному гидролизу этих полисахаридов (рис. 9а, б). Однако и в случае последовательной обработки рамногалактуронан гидролазой, затем галактаназой, и в случае последовательной обработки галактаназой, затем рамногалактуронангидролазой, часть полисахарида продолжала элюировать в области выхода исходного полимера. После гидролиза рамногалактуронана I картофеля специфичными ферментами в любой последовательности на хроматограммах выявлялся только один пик в низкомолекулярной области (рис. 9в).

При последовательной обработке рамногалактуронана I, выделенного до встраивания в клеточную стенку волокон льна, рамногалактуронангидролазой и галактаназой во фракции, время выхода которой приходится на высокомолекулярную область, остается всего $\frac{1}{4}$ остова и 3% боковых галактановых цепей. При предварительном отщеплении значительной части боковых цепей этого рамногалактуронана I галактаназой и последующем гидролизе остова рамногалактуронангидролазой доля остова во фрагментах, время выхода которых приходилось на область элюции исходного полисахарида, не превышала 10%, а боковые галактановые цепи содержали всего лишь 2% остатков галактозы от содержания этого моносахарида в исходном полимере (табл. 2, рис. 10).

Табл. 2. Доля моносахаридов фракций (5-11 мл элюции), полученных после последовательного гидролиза рамногалактуронана I, выделенного до встраивания в клеточную стенку волокон льна, галактаназой и рамногалактуронангидролазой (гал-за+РГ-г) и рамногалактуронангидролазой и галактаназой (РГ-г+гал-за), % от остатков моносахарида в исходном полимере

Рамногалактуронан I до встраивания в клеточную стенку волокон льна				
	доля остатков моносахарида во фрагментах, % от остатков моносахарида в исходном полимере			
	Rha	Ara	Gal	GalA
РГ-г+гал-за	25	9	3	25
гал-за+РГ-г	10	3	2	11

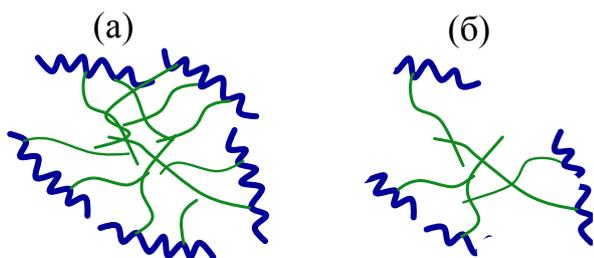


Рис. 10. Гипотетические схемы строения ассоциатов рамногалактуронанов I до ферментативной обработки (а) и после обработки галактаназой и рамногалактуронангидролазой (б).

Химический гидролиз остовов рамногалактуронанов I с помощью реакции β -элиминирования, конечным результатом оптимального проведения которого является гидролиз 70-80% остова рамногалактуронана I до димера, состоящего из остатков рамнозы и неопредельного производного галактуроновой

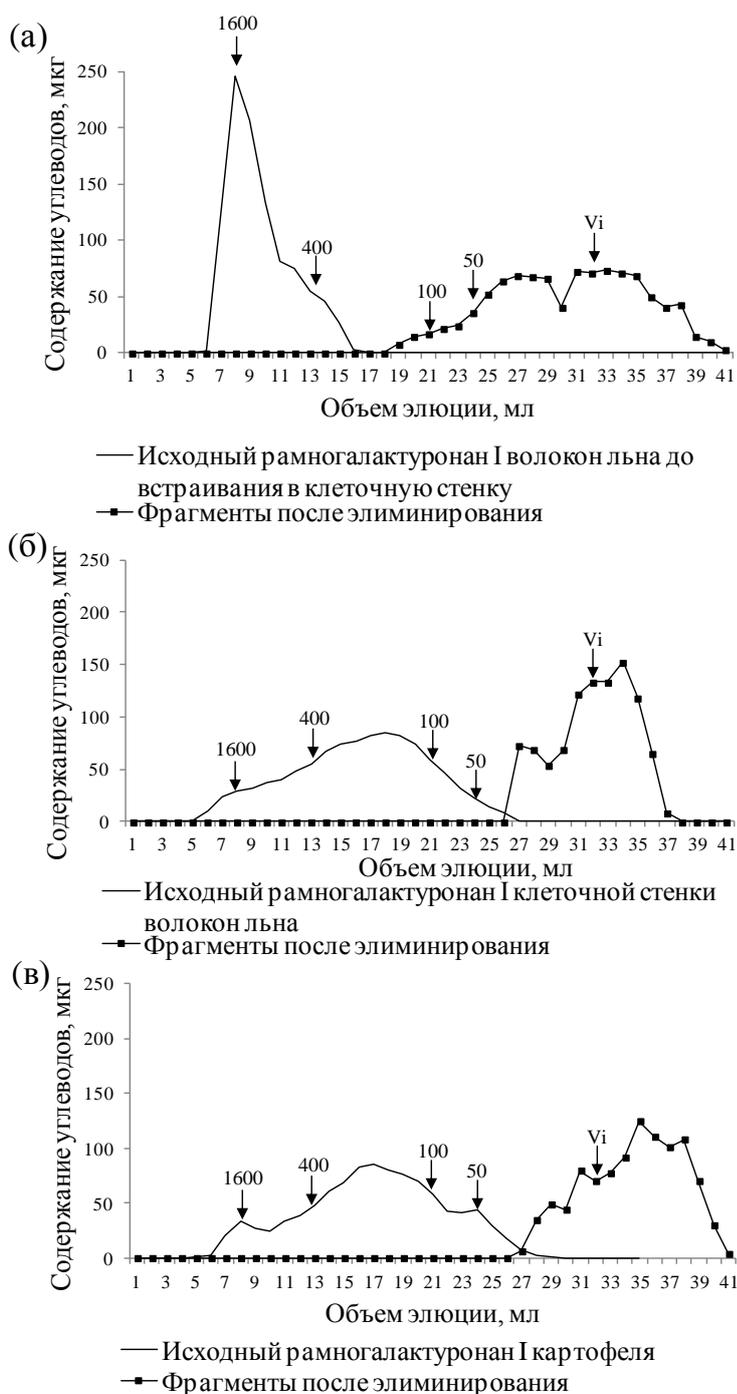


Рис. 11. Профили элюции фрагментов, полученных после химического гидролиза остовов рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля, при разделении на колонке с сефарозой CL-4В. а) Рамногалактуронан I, выделенный до встраивания в клеточную стенку волокон льна, б) рамногалактуронан I клеточной стенки волокон льна, в) рамногалактуронан I картофеля. Представленные на хроматограмме профили выравнены по количеству углеводов. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы.

кислоты (Deng et al., 2006), выявил отсутствие пиков в области элюции исходных полисахаридов (рис. 11). При этом профили низкомолекулярных продуктов гидролиза различных рамногалактуронанов I отличались. Гетерогенность остальных фрагментов, полученных в результате разрушения остовов рамногалактуронанов I, может объясняться как различной длиной боковых цепей этих полисахаридов, так и неполным гидролизом их остовов.

Утрата способности рамногалактуронана I поддерживать гидродинамический объем, сопряженная с разрушением остова, предполагает участие последнего в ее обеспечении. Это может быть связано не только с непосредственным вовлечением самого протяженного остова в формирование надмолекулярных структур рамногалактуронанов, но и, вероятно даже в большей мере, с необходимостью наличия у фрагмента, способного к самоассоциации, более чем одной галактановой цепи.

2.3. Компьютерное моделирование участия гелей из рамногалактуронана I в создании натяжения в клеточной стенке

желатинозного типа. Для проверки функциональной пригодности рамногалактуронана I

клеточной стенки волокон льна с помощью метода конечных элементов была построена модель, включающая этот полисахарид, расположенный между двумя микрофибриллами целлюлозы (рис. 12 а).

При моделировании использовали модель гиперэластичных материалов Муни-Ривлина (Коробейников, 2000; Egholm et al., 2005). Рассчитанные на основании экспериментов по одноосному сжатию геля из рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна константы Муни-Ривлина для C_{01} и C_{10} составили -395.8 Па и 2751.2 Па, соответственно. Модель состояла из трех компонентов – двух микрофибрилл целлюлозы и расположенного между ними ассоциата рамногалактуронана I с установленными параметрами (рис. 12а). Для воссоздания влияния тургора на клеточную стенку со стороны протопласта к одной из микрофибрилл было приложено давление в 0.3 МПа (Zimmermann et al., 1980). Вторая микрофибрилла была упруго зафиксирована с учетом жесткости клеточной стенки – 3.6×10^8 Н/м³. Характеристика сформированной модели с использованием принятых подходов показала, что модель и сетка являются оптимальными.

Знак показателей шкалы на рисунке определяет вид продольной деформации объектов: положительные значения показывают процесс растяжения, отрицательные – сжатия (рис. 12б). В модели концы микрофибрилл не закреплены, поэтому на концах верхней микрофибриллы при наличии между ними рамногалактуронана возникали напряжение (рис. 12в) и деформация (рис. 12г) на сжатие.

При моделировании системы оценивали деформацию микрофибриллы целлюлозы, на которую оказывали давление, и рамногалактуронана I в продольном направлении (мкм/мкм) при сдавливании между двумя микрофибриллами (рис. 12д). При деформации верхней микрофибриллы целлюлозы в продольном направлении в середине системы (рис. 12е) выявлено наличие обоих процессов. В нижней части микрофибриллы происходит деформация сжатия, а в верхней – растяжения. Такая картина обеспечена наличием между микрофибриллами рамногалактуронана с заданными упруго-пластическими свойствами.

Показатели деформации ассоциата рамногалактуронана I в продольном направлении демонстрируют, что при расположении этого полисахарида между двумя микрофибриллами целлюлозы, на одну из которых оказывается давление, соответствующее тургорному давлению в клетке, он растягивается (рис. 12з), однако его полного «сдавливания» микрофибриллами не происходит. Различия в деформации и напряжении микрофибрилл целлюлозы и рамногалактуронана I связаны с их упруго-пластическими свойствами. Деформации материалов с линейной упругостью (микрофибриллы целлюлозы) являются необратимыми, то есть после снятия нагрузки деформации не исчезают, и система приходит к новому равновесному состоянию, отличному от исходного.

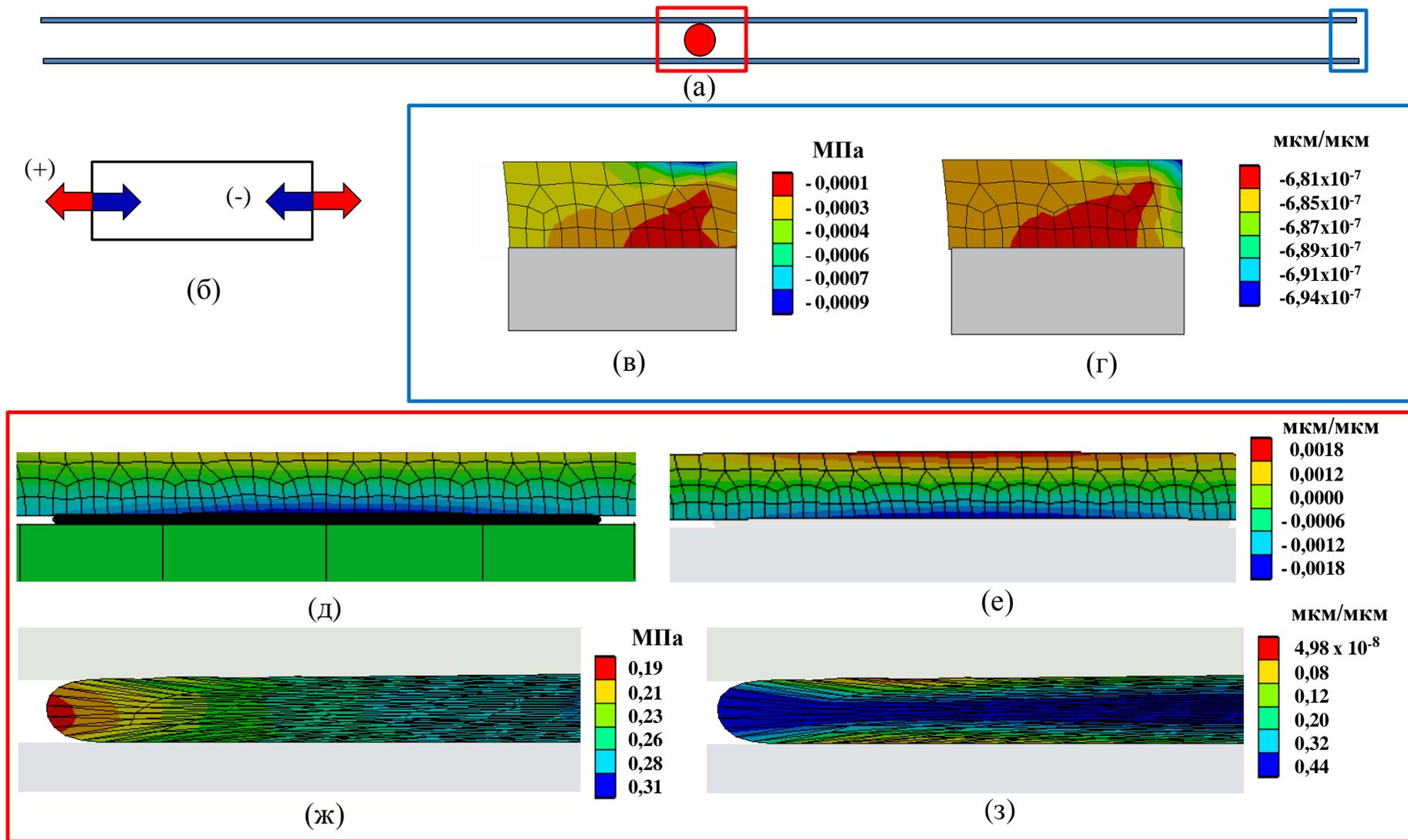


Рис. 12. Моделирование деформации рамногалактуронана I при расположении между двумя микрофибриллами целлюлозы, на одну из которых оказывается давление, соответствующее тургорному давлению в клетке: (а) исходная модельная конструкция захвата микрофибриллами целлюлозы ассоциата рамногалактуронана I, (б) вид продольной деформации (сжатие, растяжение), (в) напряжение в продольном направлении на конце верхней микрофибриллы при наличии рамногалактуронана I (в середине системы) (МПа), (г) деформация в продольном направлении на конце верхней микрофибриллы при наличии рамногалактуронана I (в середине системы) (мкм/мкм), (д) конечно-элементная модель после оказания давления, (е) деформация верхней микрофибриллы целлюлозы в продольном направлении (мкм/мкм), (ж) напряжение рамногалактуронана I в продольном направлении (МПа), (з) деформация рамногалактуронана I в продольном направлении (мкм/мкм).

Одним из подходов к верификации построенной модели может служить ее соответствие установленным фактам повышенной пористости желатинозной клеточной стенки (поры имеют форму «чернильницы») и увеличения размера пор с 2 до 50 нм при ее созревании (Clair et al., 2008; Chang et al., 2009; 2014). Для соотнесения с нашими данными мы сопоставили размеры пор, которые формируются при захвате рамногалактуронана I до встраивания в клеточную стенку и полученного из клеточной стенки зрелых волокон.

С помощью моделирования установлено, что форма одной поры, образующейся при захвате рамногалактуронана латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы, действительно, сходна с «чернильницей» (суженное начало с расширением по мере приближения к «запечатанному» полисахариду). Размер поры по длине – 30 нм (рис. 13а).

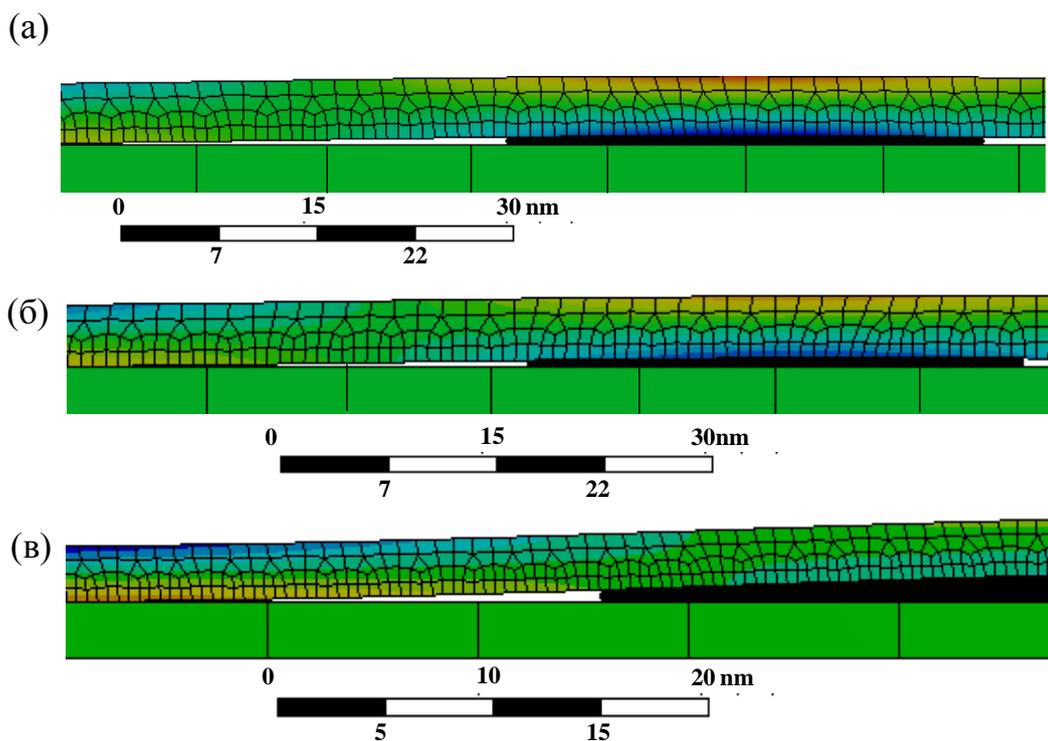


Рис. 13. Масштабное представление пор, формирующихся между микрофибриллами целлюлозы при «запечатывании» ими рамногалактуронана I после встраивания в клеточную стенку (а), до встраивания в клеточную стенку (б), для рамногалактуронана I до встраивания в клеточную стенку масштабы рассчитаны по фотографии (в).

Для характеристики динамики изменения размера пор между микрофибриллами целлюлозы при наличии распределенного между ними рамногалактуронана I в качестве исходной точки были использованы модели, включающие высокомолекулярный рамногалактуронан I до встраивания в клеточную стенку волокон льна, расположенный между, микрофибриллами целлюлозы, с аналогичными первой модели размерами (рис. 13б) и размерами, рассчитанными по результатам электронной микроскопии (по фотографии) (Salnikov et al., 2008) (рис. 13в). Исходя из экспериментов по одноосному сжатию константы Муни-Ривлина C_{01} и C_{10} составили -206.9 Па и 1742.3 Па, соответственно.

Размер поры, образующейся при наличии высокомолекулярного рамногалактуронана I с рассчитанными по фотографии параметрами между микрофибриллами целлюлозы, составил 15 нм (рис. 13в), что вдвое меньше размера пор, образуемых при захвате микрофибриллами целлюлозы рамногалактуронана I, выделяемого только после их разрушения. Во второй модели размер пор также был ниже, чем для выделенного из клеточной стенки полисахарида, и составил 19 нм (рис. 13б). Следовательно, на размер пор, формируемых при отложении клеточной стенки, влияют не столько размеры частиц захватываемого рамногалактуронана I, сколько упруго-пластические свойства полимера. Таким образом, размер пор увеличивается по мере созревания желатинозного слоя, что согласуется с результатами, полученными для желатинозных волокон древесины натяжения тополя (Chang et al., 2014).

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что рамногалактуронан I не «распластывается» вдоль поверхности микрофибрилл при воздействии на систему давления, уровень которого соответствует тургорному давлению в растительной клетке. Свойства рамногалактуронана I позволяют сохранять ему компактность, что способствует повышению эффективности натяжения микрофибрилл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на полученных в представленной работе результатах и полученных ранее данных, можно выделить следующие характеристики исследуемого тканеспецифичного рамногалактуронана I желатинозных волокон и закономерности образования надмолекулярных структур этим полимером: 1) рамногалактуронан I волокон льна способен формировать гиперэластичный гель при физиологических концентрациях (4%) в результате действия эффекта, сопряженного с движением молекул воды; 2) этот полисахарид способен самоагрегировать и обладает тремя уровнями организации молекул; 3) способность к гелеобразованию и самоагрегации связана с наличием в образце рамногалактуронана I волокон льна молекул прочно удерживаемой воды, а также с отсутствием в структуре остова этого полисахарида фрагментов полигалактуронана; 4) рамногалактуронан I волокон льна способен поддерживать гидродинамический объем при гидролизе специфичными ферментами (Gur'janov et al., 2007; Микшина, 2009; Микшина и др., 2009) вплоть до фрагментов, содержащих десятую часть остова и 2% боковых галактановых цепей от исходного полисахарида, однако теряет эту способность при полном разрушении остова; 5) надмолекулярные образования рамногалактуронана I с установленными упруго-пластическими свойствами способны выдерживать давление, соответствующее тургорному давлению в клетке, сохраняя компактность и способствуя повышению эффективности натяжения микрофибрилл.

На основе всей совокупности данных, процесс формирования надмолекулярной структуры желатинозной клеточной стенки волокон льна можно представить следующим

образом. Синтезированный в аппарате Гольджи рамногалактуронан I волокон, имеющий длинные галактановые цепи, секреторируется за пределы плазмалеммы, где встраивается между микрофибриллами целлюлозы, предотвращая их латеральное взаимодействие сразу после формирования (Микшина, 2009). По мере развития волокна «рыхлый» слой постепенно трансформируется в более «плотный» под действием β -галактозидазы, гидролизующей длинные боковые цепи рамногалактуронана I (Roach et al., 2011). При модификации рамногалактуронана I увеличивается возможность латерального взаимодействия микрофибрилл целлюлозы. Оставшийся между микрофибриллами «запечатанный» полисахарид создает в клеточной стенке натяжение микрофибрилл (Mellerowicz, Gorshkova, 2012) (рис. 14а). Отщепление боковых цепей рамногалактуронана I и сопутствующее этому процессу изменение упруго-пластических свойств этого полисахарида приводит к увеличению размера пор в желатинозной клеточной стенке (рис. 14б). Наличие особых свойств рамногалактуронана I желатинозных волокон льна, сопряженных с выполнением им функций в клеточной стенке, связано со способностью этого полисахарида к самоассоциации (рис 14в).

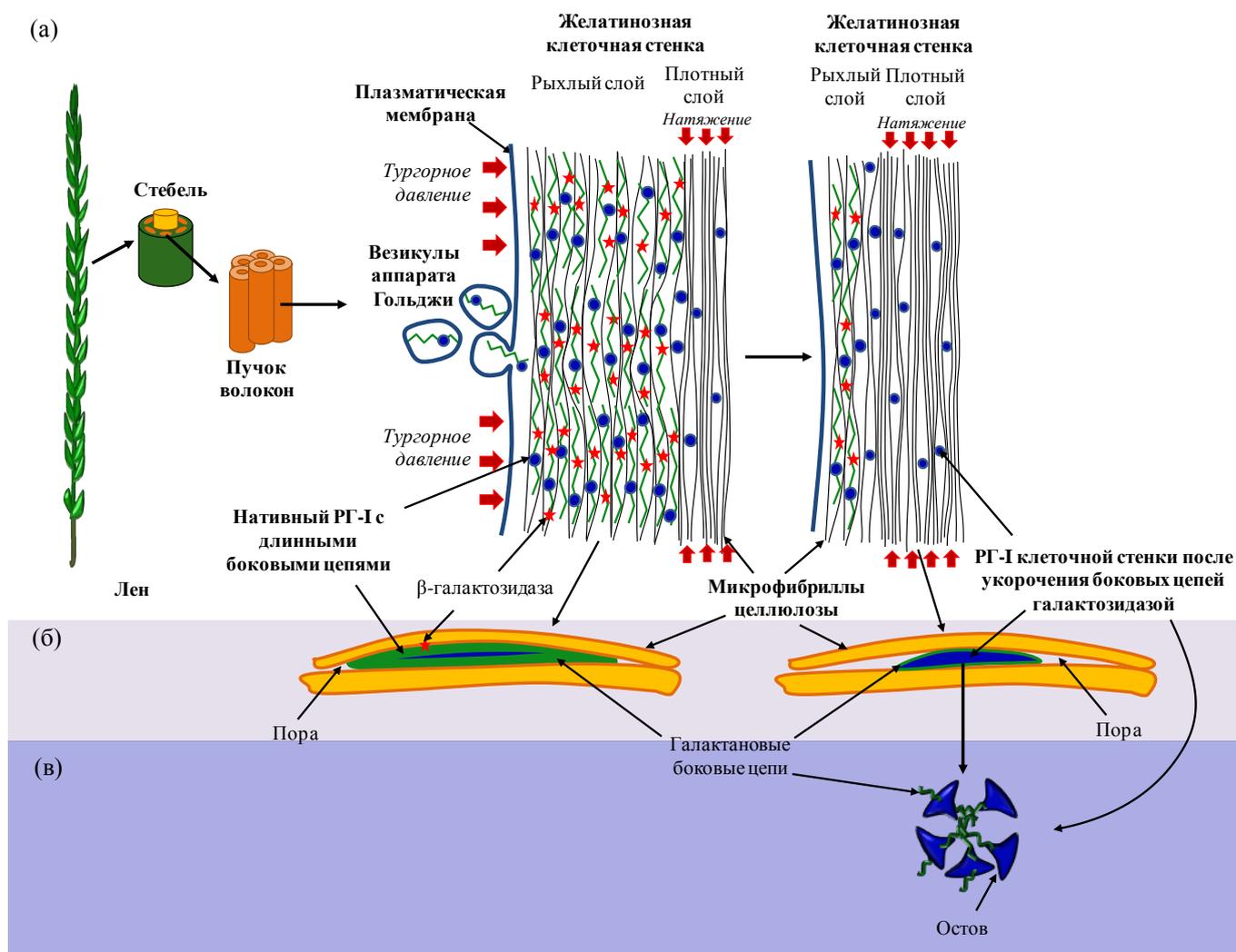


Рис. 14. Схема участия рамногалактуронана I желатинозных волокон льна в процессе формирования третичной клеточной стенки.

Полученные в настоящей работе результаты могут послужить основой для выявления закономерностей процесса формирования желатинозной клеточной стенки, а также организации надмолекулярной структуры входящих в ее состав сложных полисахаридов.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что рамногалактуронаны I третичной клеточной стенки волокон льна способны образовывать гели, обладающие гиперэластичными свойствами.
2. Показано, что рамногалактуронан I клеточной стенки волокон льна, в отличие от рамногалактуронана I первичной клеточной стенки картофеля, способен к самоассоциации и обладает тремя уровнями организации молекул (гидродинамические радиусы частиц: 3.5, 24 и 240 нм, соответственно).
3. Установлено, что в гелеобразующих образцах рамногалактуронанов I волокон льна присутствуют молекулы воды, более прочно удерживаемые полисахаридами по сравнению с не формирующим гель рамногалактуронаном I первичной клеточной стенки картофеля.
4. Показано, что значительным отличием структуры рамногалактуронана I клеточной стенки льна от рамногалактуронана I картофеля, не способного образовывать гели и ассоциаты, является отсутствие полигалактуроновой кислоты в остове рамногалактуронана I волокон льна.
5. Обнаружено, что для сохранения способности поддерживать гидродинамический объем фрагменты рамногалактуронанов I должны содержать в остове более двух углеводных остатков. Гидролиз остова рамногалактуронана I до димеров [рамноза- галактуронозная кислота] приводит к разрушению ассоциатов.
6. Показано, что рамногалактуронан I способен без потери компактности функционировать в условиях давления, соответствующему тургорному давлению в клетке, создавая эффективное натяжение микрофибрилл целлюлозы.
7. Модификация рамногалактуронана I после встраивания в клеточную стенку приводит к изменению механических свойств полисахарида. Различия в упруго-пластичных свойствах рамногалактуронана I волокон льна до и после встраивания в клеточную стенку может обуславливать изменение микроструктуры клеточной стенки по мере созревания.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Mikshina, P. V. Structural details of pectic galactan from the secondary cell walls of flax (*Linum usitatissimum* L.) phloem fibres / P. V. Mikshina, O. P. Gurjanov, F. K. Mukhitova, A. A. Petrova, A. S. Shashkov, T. A. Gorshkova // Carbohydrate Polymers. – 2012. – Vol. 87. – P. 853–861.
2. Mikshina, P. V. Physicochemical properties of complex rhamnogalacturonan I from gelatinous cell walls of flax fibers / P. V. Mikshina, B. Z. Idiyatullin, A. A. Petrova, A. S. Shashkov, Y. F. Zuev, T. A. Gorshkova // Carbohydrate Polymers. – 2015. – Vol. 117. – P. 853–861.

3. Микшина, П.В. Рамногалактуронан I желатинозных волокон льна формирует гель, обладающий гиперэластичными свойствами / П.В. Микшина, **А.А. Петрова**, Д.А. Файзуллин, Ю.Ф. Зуев, Т.А. Горшкова // Биохимия. – 2015. – Т. 80, вып. 7. – С. 1088 – 1098.
4. Микшина, П.В. Функциональное разнообразие рамногалактуронанов I / П.В. Микшина, **А.А. Петрова**, Т.А. Горшкова // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2015. – № 5. – С. 1014-1023.

Работы, опубликованные в материалах научных мероприятий

1. **Петрова, А.А.** Возможности компьютерного моделирования при установлении принципов трехмерной организации рамногалактуронана I льна / **А.А. Петрова**, П.В. Микшина, Т.А. Горшкова // IV Всерос. школа-конф. «Химия и биохимия углеводов». – Саратов, 2011. – С. 32-33.
2. **Petrova, A.** Establishment of the principles of flax rhamnogalacturonan I tree-dimensional organization by computer modeling / **A. Petrova**, P. Mikshina, T. Gorshkova // XXI International Symposium on Glycoconjugates: Glycoconjugate Journal. – Vienna, Austria, 2011 – V. 28. – P. 256.
3. Mikshina, P.V. Self-association of complex rhamnogalacturonan I / P.V. Mikshina, Yu.F. Zuev, B.Z. Idiyatullin, **А.А. Петрова**, Т.А. Gorshkova // Plant and Seaweed Polysaccharides Workshop: Program and abstracts. – Nantes, France, 2012. – P. 13.
4. **Петрова, А.А.** Установление принципов трехмерной организации рамногалактуронана I льна / **А.А. Петрова**, П.В. Микшина, Т.А. Горшкова // I Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология». Сборник материалов конференции. – Казань, 2012. С. 48.
5. Mikshina, P.V. Spatial structure of rhamnogalacturonans I / P.V. Mikshina, **А.А. Петрова**, Т.А. Gorshkova // The XIIIth Cell Wall Meeting. Book of abstract. – Nantes, 2013. – P. 1-31
6. **Петрова, А.А.** Ферментативный и химический гидролиз рамногалактуронанов I волокон льна как способ объяснения природы их особых свойств / **А.А. Петрова**, П.В. Микшина, Т.А. Горшкова // Кластер конференций по органической химии «ОргХим-2013». Тезисы докладов. – Репино, 2013. – С. 376.
7. **Петрова, А.А.** Моделирование захвата рамногалактуронана I микрофибриллами целлюлозы: конкретизация механизма создания натяжения в растительных волокнах / **А.А. Петрова**, П.В. Микшина, Т.А. Горшкова // II Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология»: Тезисы докладов. – Саратов, 2014. – С. 49.
8. Mikshina, P. Pectic polysaccharides are the key agents of plant “muscles” / P. Mikshina, **А. Petrova**, B. Idiyatullin, A.S. Shashkov, D. Faizullin, Yu. Zuev, Т.А. Gorshkova, // The 18th European Carbohydrate Symposium: Book of Abstracts. – Moscow, Russia, 2015. – P. 112.