

На правах рукописи

Микшина Полина Владимировна

**РОЛЬ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОГО ГАЛАКТАНА В
ФОРМИРОВАНИИ НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ
КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ЖЕЛАТИНОЗНОГО ТИПА**

03.00.12 - физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2009

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 химических наук, профессор
Бовин Николай Владимирович
(ИБХ РАН, Москва)

доктор биологических наук, профессор
Чиков Владимир Иванович
(КИББ КазНЦ РАН, Казань)

Ведущая организация: Уральский государственный
университет, Екатеринбург

Защита состоится 18 декабря 2009 г. в 13⁰⁰ 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 « 11 » ноября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.Б. Иванова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Растительная клеточная стенка представляет собой динамичную многокомпонентную систему, в процессе формирования которой полимеры взаимодействуют друг с другом, образуя сложную надмолекулярную структуру. Именно надмолекулярная структура клеточной стенки во многом определяет ее особенности и функции. Предполагается, что формирование надмолекулярной структуры клеточной стенки основано на спонтанном взаимодействии полисахаридов в специфических условиях периплазмы (Fry, 1988), однако конкретные процессы, сопряженные со встраиванием полисахаридов охарактеризованы крайне слабо. В основном это определяется сложным строением клеточной стенки и проблемами выделения индивидуальных полисахаридов, как до встраивания в клеточную стенку, так и из ее состава.

Уникальная возможность для подобных исследований открывается при использовании модельной системы флоэмных волокон льна. Тканеспецифичный полимер – β -1,4-галактан, построенный по типу рамногалактуронана I (Gorshkova et al., 1996; Gurjanov et al., 2007), накапливается в особых субструктурах аппарата Гольджи до встраивания в клеточную стенку (Salnikov et al., 2008), что позволяет извлекать его в количествах, достаточных для исследования структуры. В клеточной стенке этот полимер сосредоточен во фракции полисахаридов, исключительно прочно связанных с целлюлозой, для извлечения которых недавно разработан специальный протокол (Gurjanov et al., 2008). Таким образом, появилась возможность охарактеризовать процессы, происходящие при встраивании индивидуального полисахарида в клеточную стенку и в ходе ее дальнейшей модификации.

Галактан волокон льна участвует в формировании клеточной стенки желатинозного типа, которая присутствует у многих растительных волокон, в том числе в древесине натяжения и у основных лубо-волокнистых культур (Горшкова и др., 2009). Для клеточной стенки такого типа характерно наличие контрактильных свойств, которые, по современным представлениям (Clair et al., 2006; Mellerowicz et al., 2008), обеспечиваются натяжением микрофибрилл целлюлозы за счет особой надмолекулярной структуры клеточной стенки. Анализ тканеспецифичного галактана волокон льна дает возможность охарактеризовать индивидуальный полисахарид клеточной стенки, рассматривая его и как ключевой полимер матрикса клеточной стенки особого типа, и как более общий пример полисахарида клеточной стенки. Сопоставление особенностей структуры галактана до и после встраивания в клеточную стенку, а также установление последовательности и временных рамок постсинтетических модификаций этого полимера позволит охарактеризовать его роль в ходе формирования надмолекулярной структуры клеточной стенки и ее последующих изменений.

Цель и задачи исследования. Целью работы была характеристика процессов, происходящих с тканеспецифичным галактаном волокон льна при его встраивании в

клеточную стенку желатинозного типа и в ходе дальнейших модификаций ее структуры. Были поставлены следующие задачи:

1. Сопоставить состав и свойства галактана до и после встраивания в клеточную стенку.

2. Провести сравнительный анализ состава фрагментов, полученных после гидролиза галактана аппарата Гольджи и галактана клеточной стенки специфичными ферментами.

3. Выявить особенности структуры галактанов путем анализа фрагментов, полученных после частичного ферментативного гидролиза, с помощью ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

4. Проанализировать метаболизм галактана в экспериментах по изучению перераспределения метки после фотосинтеза целых растений с $^{14}\text{CO}_2$.

Научная новизна работы. Впервые охарактеризованы процессы, происходящие с индивидуальным полисахаридом при встраивании в растительную клеточную стенку в ходе ее формирования и модификации, а также установлена их последовательность и временные рамки.

Выявлено, что при встраивании галактана в клеточную стенку происходит гидролиз боковых цепочек полимера, сопровождающийся появлением большого количества свободной галактозы. Показано, что укорочение галактозных цепочек имеет избирательный характер: не все молекулы галактозы и не все боковые цепочки подвергаются гидролизу. Продемонстрировано наличие препятствий для гидролиза галактанов эндогенной галактозидазой и установлена их природа.

Выявлена способность галактана поддерживать гидродинамический объем после удаления основной части боковых цепочек полимера, что свидетельствует о высоком уровне организации структуры молекул полисахарида и делает этот полимер интересным объектом для изучения принципов построения вторичной и третичной структуры полисахаридов.

Установлено, что процесс попадания галактана во фракцию прочно связанных с целлюлозой полимеров имеет двухфазный характер: часть молекул полисахарида прочно связывается с микрофибриллами целлюлозы в момент их сборки, другая – через несколько дней после попадания в клеточную стенку, после существенного гидролиза.

Обоснована связь между структурой полисахарида и его функциональной ролью. Сформировано представление, что в ходе формирования надмолекулярной структуры клеточной стенки галактан выполняет двойную роль: создает условия для постепенного латерального взаимодействия микрофибрилл в клеточной стенке и эффективно обеспечивает их натяжение за счет способности поддерживать гидродинамический объем.

Научно-практическая значимость работы. Полученные данные вносят вклад в понимание механизмов образования и функционирования особого желатинозного

типа вторичной клеточной стенки, которая характерна для многих хозяйственно ценных культур. Сформулированные представления о роли тканеспецифичного полимера в формировании надмолекулярной структуры позволят целенаправленно влиять на свойства клеточной стенки. Выявление особых свойств галактана, позволяет рассматривать на его примере механизмы организации вторичной и третичной структуры полисахаридов, что открывает новые перспективы в изучении этого класса молекул. Разработанная совокупность подходов для характеристики структуры, свойств и метаболизма индивидуального полимера в целом растении может быть использована при исследовании других компонентов растительной клетки. Полученные результаты и методические разработки могут быть использованы в биологических, сельскохозяйственных и биотехнологических учреждениях и включены в курсы лекций по биохимии и физиологии растений, а также по общей биохимии углеводов.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. 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. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на 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), итоговых конференциях КИББ КазНЦ РАН (2008, 2009), Международной конференции по растительным волокнам «Plant fibers: view of fundamental biology» (Казань, 2009), Гордоновской конференции по растительной клеточной стенке (Смитфилд, США, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 160 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 13 таблиц и 33 рисунка. Список литературы включает 199 источников, в том числе, 182 – иностранных.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Растительный материал. Объектом исследований служили растения льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) сорта Новоторжский 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. Эксперимент начинали на стадии быстрого роста растений; средняя высота растения в этот период составляла 22 ± 2 см (27 дней после посева).

1.2. Выделение галактана до и после встраивания в клеточную стенку.

Галактан до встраивания в клеточную стенку выделяли из волокнистой части стебля как высокомолекулярный полимер, попадающий в супернатант при гомогенизации ткани в буфере. До встраивания в клеточную стенку этот полимер накапливается в цитоплазме благодаря особому ткане- и стадия-специфичному механизму секреции (Salnikov et al., 2008). Полимеры, попадающие в супернатант гомогената ткани, осаждали 80% этанолом. Высокомолекулярный галактан аппарата Гольджи (2000 кД) отделяли от других полимеров на колонке с сефарозой CL-4В (12x400 мм, Pharmacia); в качестве детектора использовали дифференциальный рефрактометр (Knauer).

В клеточной стенке галактан обнаруживали во фракции полимеров, слабо связанных с целлюлозой (экстрагируемых оксалатом аммония), и фракции полимеров, прочно связанных с целлюлозой. Для выделения галактана после встраивания в клеточную стенку проводили ее фракционирование 0.5% оксалатом аммония и 4М КОН. Оставшийся осадок использовали для выделения полисахаридов, прочно связанных с целлюлозой, и кристаллической целлюлозы. Прочно связанные с целлюлозой полимеры получали по методике (Joseleau et al., 1980) с использованием 4-метил-морфолин-N-оксида (Sigma, USA) и целлюлазы (Cellusoft-L; Novo Nordisk Bioindustrie) и по разработанной методике (Gurjanov et al., 2007) с использованием N,N-диметилацетамида, LiCl и целлюлазы. Для отделения галактана, составляющего основную массу этой фракции, от других полимеров проводили разделение на колонке с сефарозой CL-4В (12x400 мм, Pharmacia) (Gurjanov et al., 2008). Для анализа особенностей структуры прочно связанный с целлюлозой галактан выделяли из зрелых изолированных волокон.

Моносахаридный анализ фракций проводили после их гидролиза 2М ТФУ при 120°C в течение 1 ч методом высокоэффективной анионообменной хроматографии на колонке CarboPac PA 1 (4x250 мм, Dionex) с пульс-амперометрическим детектором.

1.3. Обработка галактанов ферментами. Для выявления особенностей структуры галактанов использовали высокоочищенные и хорошо охарактеризованные препараты эндо-1,4- β -D-галактаназы из *Aspergillus aculeatus* (Novo-Ferment A.G., Basel., Switzerland) (van de Vis et al., 1991) и рамногалактуроназы из *Aspergillus aculeatus* (Novo Nordisk, A/S) (Schols et al., 1990; 1994; Mutter et al., 1998), любезно предоставленные Н. Schols (Wageningen University, The Netherlands). Галактаны перед обработкой ферментами подвергали сапонификации (0.06 М NaOH, 2-3 ч при 4°C), а затем инкубировали с ферментом из расчета 25 мкг белка на 5 мг субстрата. Количество белка определяли по Бредфорд (Bradford, 1976). Инкубацию проводили в 0.03 М AcNa буфере, pH 5.0 при 40°C в течение 48 ч на термостатируемом шейкере-

инкубаторе IS-971R (Jeio Tech, Korea) при 120 об/мин. Реакцию останавливали кипячением в течение 5 мин.

Продукты гидролиза галактанов рамногалактуроназой и галактаназой обессоливали на колонке с Dowex 50wx8 (50-100 mesh) (Sigma, USA) с добавлением пиридина и хроматографировали на колонке с сефарозой CL-4B (12 x 400 мм, Pharmacia, Sweden). Элюэнт - 0.01 М пиридин - уксусная кислота или 0.1 М NaCl. Объем собираемых фракций - 1 мл. Скорость элюирования - 0.25 мл/мин. Для анализа низкомолекулярных продуктов, полученных после гидролиза галактанов галактаназой, проводили дополнительное разделение гидролизата на колонке с сефадексом G 25 (1.2 x 100 мм, BioRad, USA). Элюэнт - 0.01 М пиридин - уксусная кислота. Объем собираемых фракций - 1 мл. Скорость элюирования - 0.15 мл/мин.

Определение сахара в каждой фракции проводили по фенольному методу (Dubois et al., 1956).

1.4. ЯМР-спектроскопия. Галактаны и полученные после их гидролиза галактаназой высокомолекулярные фрагменты растворяли в D₂O (99.96 % D). ¹H-, ¹³C-спектры, а также двумерные спектры HQSC, TOCSY, DOSY записывали на ЯМР-спектрометре (Bruker Avance DPX 600) при 303 К и 333 К. В качестве внешнего стандарта использовали ацетон (2.05 м.д.).

1.5. Масс-спектрометрия. Низкомолекулярные фрагменты, полученные после обработки галактанов галактаназой после предварительной очистки на колонках с катионо- (Dowex 50wx8) и анионообменным (Dowex 1wx8) гелями, растворяли в деионизованной воде и метаноле в соотношении 1:1. Количество сахара во фракции составляло не менее 10⁻⁵ моль. Спектры записывали на масс-спектрометре Bruker Daltonics MicrOTOF Q. Тандемный масс-спектрометрический анализ ионов проводили при энергии столкновения от -5 до -20 эВ.

1.6. Постановка экспериментов с ¹⁴CO₂. Для введения ¹⁴CO₂ в растения использовали замкнутую фотосинтетическую систему, состоящую из фотосинтетической камеры, газгольдера, компрессора и поглотителя ¹⁴CO₂. Общий объем системы составлял 90 л. Растущие в почве растения целиком помещали в фотосинтетическую камеру. Внесение в систему 370 МБк NaH¹⁴CO₃ не приводило к существенному отклонению концентрации CO₂ от естественной. Время экспозиции растений с меченым субстратом составляло 40 мин. Количество растений, помещенных в фотосинтетическую камеру, рассчитывали таким образом, чтобы убыль концентрации ¹⁴CO₂ в фотосинтетической системе за время экспозиции не превысила 30%. Часть растений фиксировали жидким азотом сразу после фотосинтеза с ¹⁴CO₂, остальные – через 4 часа, 8 часов, 1сутки, 2 суток, 5 суток, 10 суток и 60 суток роста растений в отсутствие меченого субстрата. В качестве образцов для анализа отбирали участки одинаковой длины (10 см) на одной и той же высоте стебля. Для анализа использовали участок волокнистой части стебля, содержащий волокна только на стадии формирования вторичной клеточной стенки.

Независимо был проведен аналогичный эксперимент с $^{14}\text{CO}_2$, где для анализа использовали изолированные волокна. Отделение волокон от окружающих тканей проводили с помощью многократной отмычки волокнистой части стебля в 96% этаноле при мягком механическом воздействии. Степень очистки полученных волокон и их целостность оценивали с помощью светового микроскопа.

После фракционирования клеточной стенки и выделения полимеров, попадающих в супернатант гомогената ткани, по описанным выше методикам, проводили гидролиз и оценивали радиоактивность отдельных моносахаридов, в первую очередь, галактозы. Радиоактивность полимеров и моносахаридов определяли, суммируя значения, соответствующие их пикам на хроматограммах. Радиоактивность просчитывали на жидкостно-сцинтилляционном радиометре «Delta-300» (Tracer Analytic, USA).

Статистический анализ данных во всех экспериментах проводили с применением стандартных математических методов пакета программы Microsoft Excel-2003 (расчет среднеквадратического отклонения). Количество биологических повторностей в опытах - 3-4. Стандартное отклонение по выборке не превышало 5%.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Сопоставление структуры и свойств галактана волокон до и после встраивания в клеточную стенку. Анализ тканеспецифичного галактана флоэмных волокон льна до и после встраивания в клеточную стенку с помощью гелепроникающей хроматографии продемонстрировал разницу во времени выхода этих

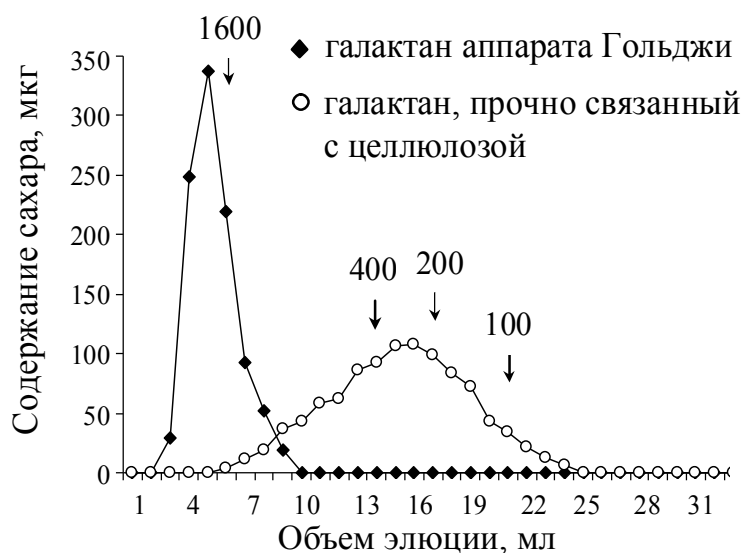


Рис. 1. Профили элюции галактана аппарата Гольджи и прочно связанного с целлюлозой галактана после разделения на колонке с сефарозой CL-4В (1.2 x 40). Представленные на хроматограмме профили выравнены по количеству сахара. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы.

полимеров: галактан аппарата Гольджи элюировал в области 2000 кД, прочно связанный с целлюлозой галактан – 100-400 кД (рис. 1), что согласуется с полученными ранее данными (Gurjanov et al., 2008). Очевидно, что подобное смещение времени выхода галактана после встраивания в клеточную стенку обусловлено постсинтетическими модификациями полимера, связанными с его функциональной ролью в формировании клеточной стенки особого типа.

Для выяснения того, какие именно модификации полисахарида приводят к подобному

смещению времени выхода, был проведен анализ структуры и свойств галактана до и после встраивания в клеточную стенку с использованием комплекса подходов и методов: 1) сопоставление галактана, выделенного до и после встраивания в клеточную стенку (моносахаридный анализ, гель-фильтрация, ЯМР-спектроскопия); 2) анализ фрагментов, полученных после гидролиза галактанов специфичными ферментами (рамногалактуроназа и галактаназы) с помощью различных видов хроматографии; 3) анализ высокомолекулярных фрагментов, полученных после гидролиза галактанов галактаназой с помощью ЯМР-спектроскопии; 4) анализ низкомолекулярных фрагментов, полученных после гидролиза галактанов галактаназой с помощью масс-спектрометрии.

Моносахаридный анализ галактанов, выделенных из гомогената ткани и из клеточной стенки показал, что состав этих полимеров был сходен и включал галактозу, рамнозу, галактуроновую кислоту, минорные количества арабинозы и глюкозы. Соотношение рамнозы и галактуроновой кислоты составляло примерно 1, что согласуется с тем, что остов данных галактанов построен по типу рамногалактуронана I (Gorshkova et al., 1996; Gurjanov et al., 2007).

В ходе встраивания галактана в клеточную стенку доля галактозы в полимере снижалась с 89% до 64%, соотношение Гал/Рам – с 22 до 4, что свидетельствует о меньшей длине боковых цепочек галактана клеточной стенки по сравнению с галактаном аппарата Гольджи, но не объясняет разницу во времени элюции этих полисахаридов.

2.1.1. Гидролиз галактанов рамногалактуроназой и галактаназой.

Основная часть фрагментов, полученных после гидролиза рамногалактуроназой высокомолекулярного галактана аппарата Гольджи (фр. 1), элюировала в области выхода полисахарида до инкубации с ферментом (рис. 2 а). Преобладающим моносахаридом в составе всех фракций была галактоза. Соотношение галактозы и рамнозы во фракциях 1 - 3 было ниже, чем в исходном полимере. Низкомолекулярные продукты гидролиза высокомолекулярного галактана аппарата Гольджи характеризовались максимальной длиной галактозных цепочек: соотношение Гал/Рам во фракции 4 составило 22, а во фракции 5 - 92.

Прочно связанный с целлюлозой галактан гидролизовался рамногалактуроназой в большей степени, чем галактан аппарата Гольджи (рис. 2 б), однако значительная часть продуктов гидролиза этого полимера (фр. 2, 3) также элюировала в области его выхода до инкубации с ферментом (рис. 2 б). При этом двумерный ЯМР-анализ не выявил нарушений в построении остова по типу рамногалактуронана I, которые могли бы служить препятствием для действия фермента. Неполный гидролиз галактанов льна рамногалактуроназой связан, по-видимому, с особенностями конформации их молекул, которые делают некоторые сайты недоступными для фермента.

Основную часть при расщеплении рамногалактуроназой прочно связанного с целлюлозой галактана составляли низкомолекулярные продукты (рис. 2 б, фр. 4, 5),

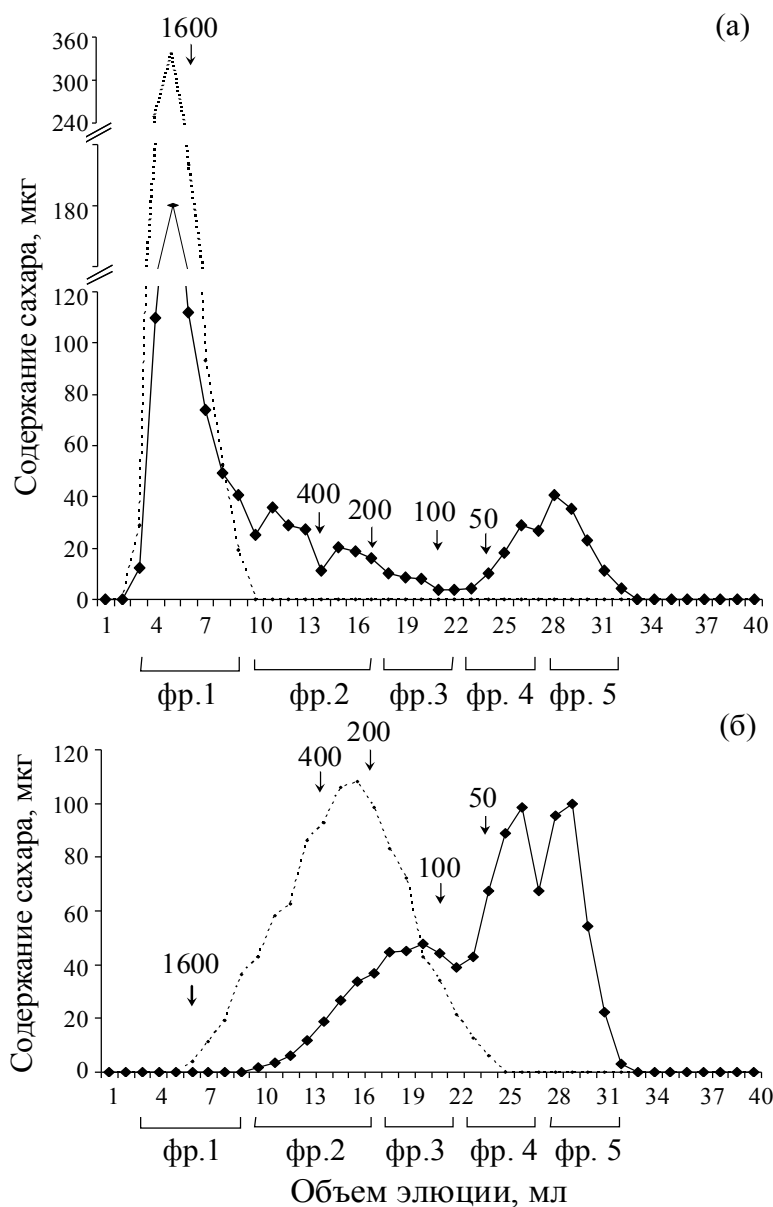


Рис. 2. Профиль элюции фрагментов, полученных после гидролиза рамногалактуроназой галактана аппарата Гольджи (а) и прочно связанного с микрофибриллами целлюлозы галактана (б), при разделении на колонке с сефарозой CL-4В (1.2 x 40). Представленные на хроматограмме профили выравнены по количеству сахара. Пунктирной линией обозначен профиль элюции полимера до инкубации с ферментом. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы.

полисахарида имел место, но не приводил к изменению положения пика на профиле элюции, что свидетельствует о способности полимера поддерживать гидродинамический объем, величина которого и обуславливает время выхода полимера при гель-фильтрации, после удаления значительной части боковых цепочек. Это говорит о наличии у галактанов льна высоких уровней организации структуры, и дает возможность на их примере изучать основы формирования вторичной и третич-

элюирующие в той же области, что и продукты гидролиза галактана аппарата Гольджи, хотя соотношение Гал/Рам в этих фракциях не превышало трех.

Гидролиз галактанов рамногалактуроназой вывил: а) присутствие длинных (около сотни галактозных остатков) боковых цепочек у галактана аппарата Гольджи; б) наличие препятствий для гидролиза ферментом; в) отсутствие прямой связи времени выхода фрагментов с их молекулярной массой.

Профиль элюции продуктов гидролиза галактанов галактаназой можно разделить на две части (рис. 3). Основная доля продуктов элюировала в низкомолекулярной области (<50 кД). Другая часть фрагментов, несмотря на существенный гидролиз полимеров, по-прежнему, выходила в области их элюции до обработки ферментом (рис. 3). При этом соотношение Гал/Рам в высокомолекулярной области падало до 1.7. Таким образом, гидролиз

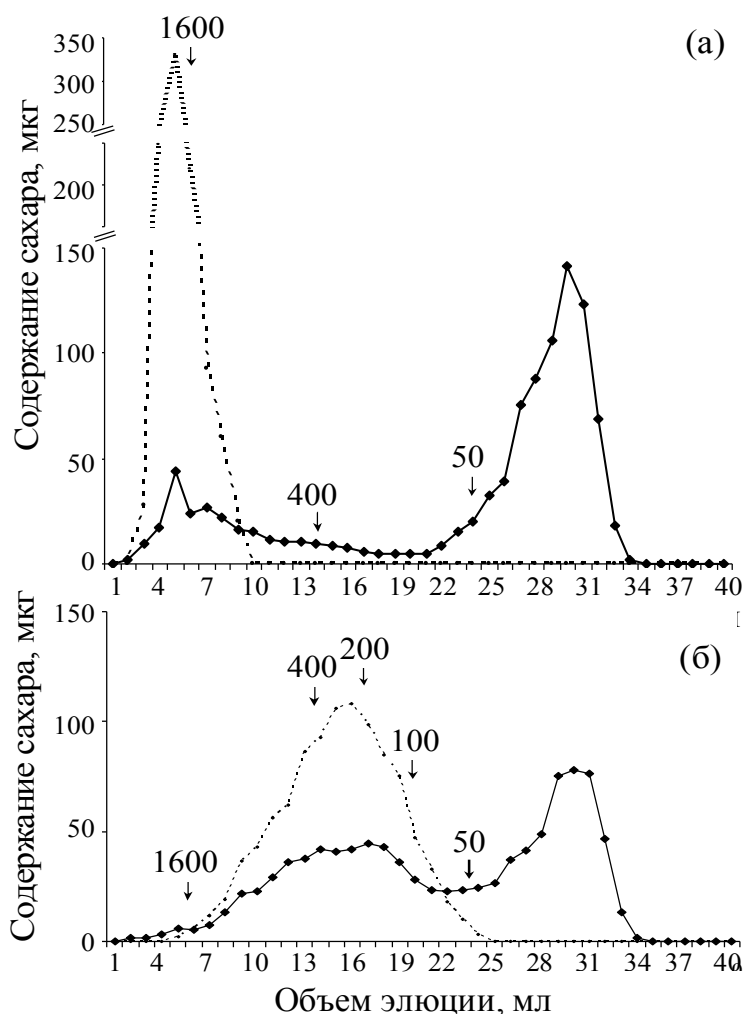


Рис. 3. Профили элюции галактана аппарата Гольджи (а) и прочно связанного с целлюлозой галактана (б) до и после обработки галактаназой, полученные при разделении на колонке с сефарозой 4В (1.2 x 40). После обработки галактаназой представлена повторная хроматография гидролизата. Представленные на хроматограмме профили выравнены по количеству сахара. Пунктирной линией обозначен профиль элюции полимера до инкубации с ферментом. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы.

2.1.2. Анализ особенностей структуры высокомолекулярных фрагментов галактанов с помощью ЯМР-спектроскопии. Преобладающими на спектрах высокомолекулярных фрагментов галактана, полученных после действия галактаназы, были сигналы Н2, Н3, Н5, Н6 галактозы (3.68-3.78 м.д.), сигнал Н4 1→4-связанной галактозы (4.16) и Н4 терминальной галактозы (3.91 м.д.) (рис. 4). Увеличение сигнала метильной группы неразветвленной рамнозы (1.24) и его соотношения с сигналом метильной группы разветвленной рамнозы (1.31), а также появление сигнала Н4 неразветвленной рамнозы (3.41) на спектре галактана клеточной стенки

ной структуры полисахаридов.

Гидролиз галактанов галактаназой выявил: а) способность этих полимеров поддерживать гидродинамический объем после удаления значительной части галактозных цепочек; б) наличие препятствий для гидролиза этим ферментом.

Для дальнейшего анализа использовали высокомолекулярные и низкомолекулярные фракции, полученные после разделения продуктов гидролиза галактанов галактаназой на колонке с сефадексом G 25. Моносахаридный состав выявил, что в высокомолекулярные фракции попадает остов полимера; соотношение Гал/Рам во фракциях, полученных после гидролиза галактана до и после встраивания в клеточную стенку было одинаковым и составило 1.7. Низкомолекулярные фрагменты включали в основном галактозу (87-98%), арабинозу (1-11%), глюкозу (до 1%). Степень полимеризации низкомолекулярных фрагментов превышала характерную для действия галактаназы.

(рис. 4 б), свидетельствует о полном гидролизе некоторых боковых цепочек *in vivo*.

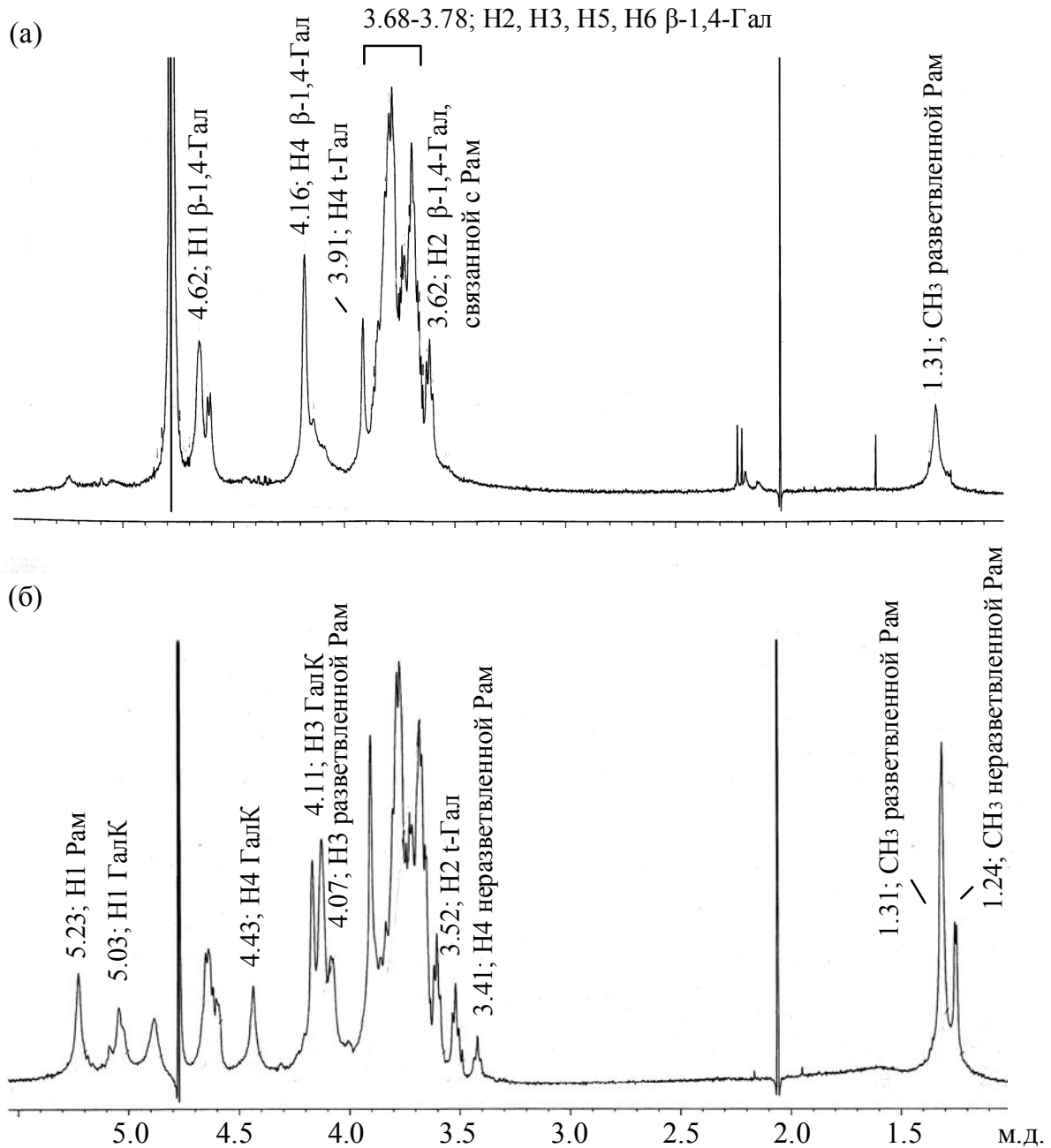


Рис. 4. ^1H ЯМР спектры высокомолекулярной фракции, полученной после гидролиза галактаназой галактана аппарата Гольджи (а) и прочно связанного с целлюлозой галактана (б). Фракции получены после разделения продуктов гидролиза на колонке с сефадексом G 25.

Обращает на себя внимание, что при одинаковом соотношении Гал/Рам в анализируемых фрагментах галактанов, сигналы остова визуализировались на спектрах в разной степени. К таким сигналам можно отнести H1 рамнозы (5.23) и H1, H3, H4 галактуроновой кислоты (5.03, 4.11, 4.43) и H3 разветвленной рамнозы (4.07) (рис. 4). Достаточно четкие пики моносахаридов остова присутствовали на спектре фракции, полученной после гидролиза прочно связанного с целлюлозой галактана (рис. 4 б). На спектре этой фракции галактана аппарата Гольджи они практически не обнаруживались (рис. 4 а).

Анализ галактанов и фрагментов их гидролиза галактаназой с помощью диффузионно-упорядоченной ЯМР-спектроскопии выявил, что в пределах одного полимера подвижность участков остова с длинными β -галактозными цепочками и без них может различаться довольно существенно. У прочно связанного с целлюлозой галактана коэффициент диффузии для участков с галактозными цепочками равен 1.1×10^{-11} м²/с, а для участков без них – 2.3×10^{-11} м²/с. Разница в подвижности участков остова в пределах одного полисахарида может свидетельствовать о блочном строении полимерной цепи, где участки с достаточно длинными галактозными цепочками и одиночными остатками галактозы (и/или полным отсутствием разветвления рамнозы) достаточно протяженные.

ЯМР-анализ фрагментов галактанов, полученных после гидролиза галактаназой показал: а) наличие процесса укорочения боковых цепочек полимера при/после встраивания в клеточную стенку; б) различную степень гидролиза галактозных звеньев: часть цепочек удаляется полностью, некоторые цепочки остаются достаточно длинными в) сложную (вероятно, блочную) организацию молекул полисахарида.

2.1.3. Анализ низкомолекулярных фрагментов с помощью масс-спектрометрии. Идентифицированный с помощью масс-спектрометрии состав низкомолекулярных фрагментов, полученных после гидролиза галактаназой галактана, выделенного до и после встраивания в клеточную стенку, был сходен. На

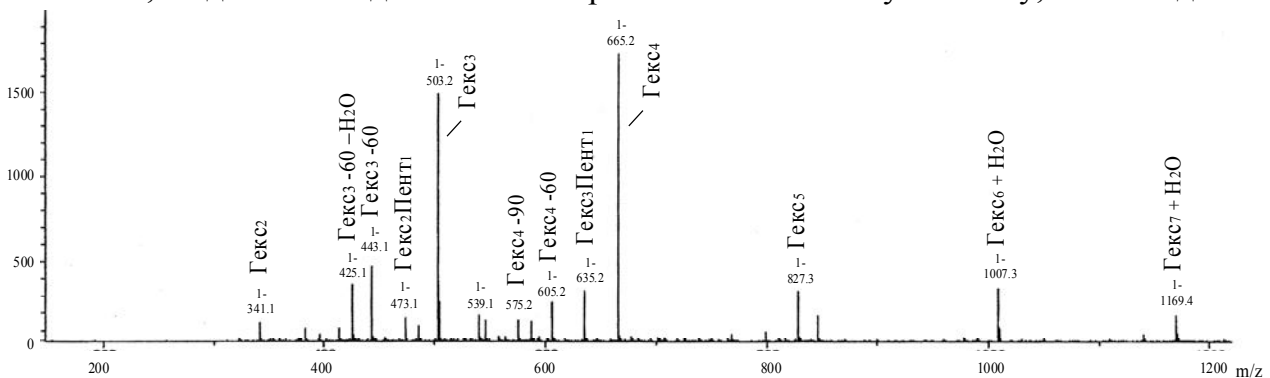


Рис. 5. Масс-спектр низкомолекулярных фрагментов, полученных после гидролиза галактаназой галактана, прочно связанного с целлюлозой.

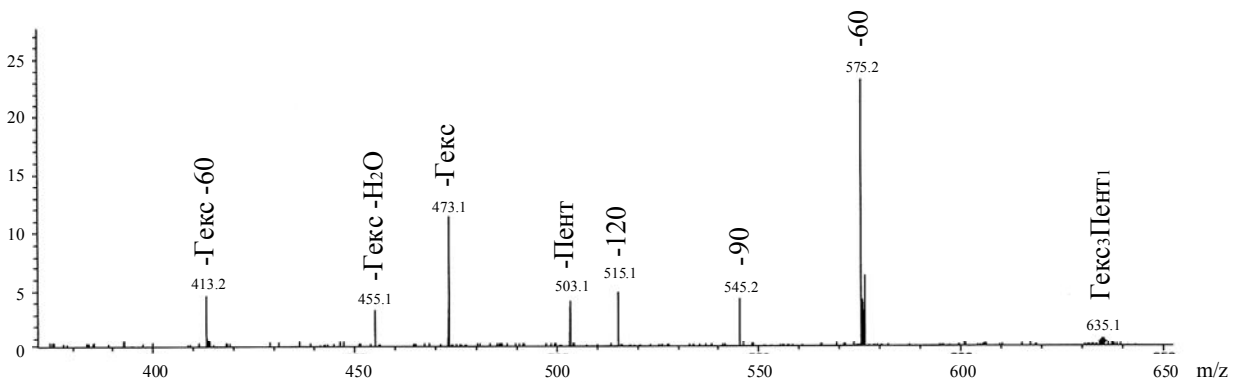


Рис. 6. Масс-спектр продуктов распада иона 635.1^{1-} у низкомолекулярных фрагментов, полученных после гидролиза галактаназой галактана, прочно связанного с целлюлозой (тандемная масс-спектрометрия, энергия столкновения -5 эВ).

спектрах выявлено два ряда продуктов: ряд олигомеров гексоз Гекс_n и гексоз с пентозой Гекс_nПент₁ (рис. 5, 6). При n>5 эти олигомеры часто выявлялись в форме аддуктов с водой (рис. 5). Фрагментов, содержащих более одной пентозы, не обнаружено. Моносахаридный анализ показал, что единственной пентозой в составе низкомолекулярных фракций является арабиноза.

При тандемной масс-спектрометрии на спектрах продуктов распада обнаруживался сигнал -90 (например, 545.2 на рис. 6). Этот сигнал относится к иону, образуемому при распаде моносахаридного цикла при наличии 1→6-связи (^{0,3}A-распад) (Domon, Costello, 1988). Отличный от β-1→4-тип связи и включение в структуру галактозной цепочки арабинозы может выступать в качестве препятствий для гидролиза боковых цепочек эндогенной галактозидазой.

2.2. Исследование метаболизма галактана в экспериментах с ¹⁴CO₂.

Используемая в работе модельная система обеспечила возможность исследования в интактном растении метаболизма индивидуального полисахарида клеточной стенки в определенном типе клеток на определенной стадии их развития без вмешательства в естественный ход процессов. Совокупность этих характеристик делает проведенные исследования единственными в своем роде.

Для исследования метаболизма галактана были проведены комплексные исследования основных галактозосодержащих фракций клетки: 1) галактана аппарата Гольджи; 2) галактозосодержащих фракций клеточной стенки; 3) низкомолекулярных углеводов, включая возможные продукты гидролиза галактана. При анализе основное внимание было уделено галактозе, поскольку именно этот моносахарид составляет до 90% галактана.

Табл. 1. Радиоактивность галактозы (Бк/см) и соотношение абсолютной и удельной радиоактивности галактозы и рамнозы в галактане аппарата Гольджи волокнистой части стебля сразу после 40-минутного фотосинтеза растений льна с ¹⁴CO₂ и после различных периодов роста в отсутствие радиоактивного субстрата

Время	Радиоактивность		Уд. радиоактивность
	Галактоза	Гал/Рам	Гал/Рам
40 мин	5.0±0.8	15.2±2.0	1.5±0.2
4 ч	31.2±0.8	15.6±0.9	1.2±0.1
8 ч	80.5±11.2	15.9±1.1	1.2±0.2
1 сут.	90.3±10.2	14.3±0.1	1.1±0.1
2 сут.	119.5±11.2	12.8±0.1	1.2±0.1
5 сут.	22.2±0.2	8.9±0.5	1.1±0.0
10 сут.	3.3±0.8	6.7±1.5	1.1±0.1
60 сут.	1.3±0.0	4.0±0.0	1.7±0.3

2.2.1. Радиоактивность высокомолекулярного галактана аппарата Гольджи.

Динамика радиоактивности галактана, попадающего в супернатант при гомогенизации ткани, характерна для промежуточного соединения и соответствует динамике радиоактивности полисахарида аппарата Гольджи, который в ходе эксперимента постепенно встраивается в клеточную стенку. Включение метки в галактозу галактана наблюдалось сразу после экспозиции с меченым субстратом, затем постепенно нарастало, ко 2-м

суткам роста растений в отсутствие радиоактивного субстрата достигало максимума, после чего медленно снижалось (табл. 1). Соотношение галактозы и рамнозы сохранялось одним и тем же до двух суток (и по радиоактивности и по содержанию), затем постепенно снижалось (табл. 1). Соотношение удельной радиоактивности галактозы и рамнозы в высокомолекулярном галактане аппарата Гольджи практически не изменялось на протяжении всего эксперимента (табл. 1). Это говорит о том, что галактан уходит из фракции полимеров, попадающих в супернатант гомогената ткани, как единое целое без предварительного расщепления, а также, что снижение Гал/Рам в галактане аппарата Гольджи со временем не связано с гидролизом этого полимера.

2.2.2. Радиоактивность галактозосодержащих полисахаридов клеточной стенки волокнистой части стебля льна. Моносахаридный состав фракций клеточной стенки волокнистой части стебля льна выявил, что галактоза содержится в двух фракциях: во фракции слабо связанных с целлюлозой полимеров (экстрагируемых оксалатом аммония) (до 1 мкг/см) и во фракции полимеров, прочно связанных с целлюлозой (до 0.9 мкг/см). Для анализа галактозосодержащих полимеров клеточной стенки проводили ее фракционирование, затем гидролизовали полисахариды полученных фракций и оценивали радиоактивность и содержание в них отдельных моносахаридов, в первую очередь, галактозы.

2.2.2.1. Полимеры, слабо связанные с микрофибриллами целлюлозы.

Включение метки в галактозу полимеров, экстрагируемых оксалатом аммония, происходило сразу после экспозиции с $^{14}\text{CO}_2$, затем постепенно нарастало, достигая максимума, в период с 8 часов до 2 суток, а затем многократно снижалось (рис. 7 а). Соотношение радиоактивности галактозы полимеров этой фракции и целлюлозы, динамика радиоактивности которой характерна для неметаболизируемого полисахарида, было максимальным в начале эксперимента и постепенно снижалось со временем (рис. 7 б). Такая динамика радиоактивности указывает на то, что галактан со временем исчезает из фракции полимеров, экстрагируемых оксалатом аммония и, скорее всего, будет обнаруживаться в других фракциях клеточной стенки или в продуктах гидролиза полисахарида.

Соотношение радиоактивности Гал/Рам было максимальным через 4 часа роста растений в отсутствие меченого субстрата и существенно снижалось со временем. Это свидетельствует об укорочении боковых цепочек галактана в то время, когда он находится во фракции полимеров, экстрагируемых оксалатом аммония.

2.2.2.2. Полимеры, прочно связанные с микрофибриллами целлюлозы.

Динамика радиоактивности галактозы в полимерах, прочно связанных с целлюлозой, имела двухфазный характер. Меченая галактоза обнаруживалась в этой фракции сразу после экспозиции с радиоактивным субстратом, через 4 часа наблюдалось ее значительное увеличение, затем радиоактивность галактозы оставалась постоянной, а, начиная со 2-х суток и до конца эксперимента, происходил ее дополнительный и

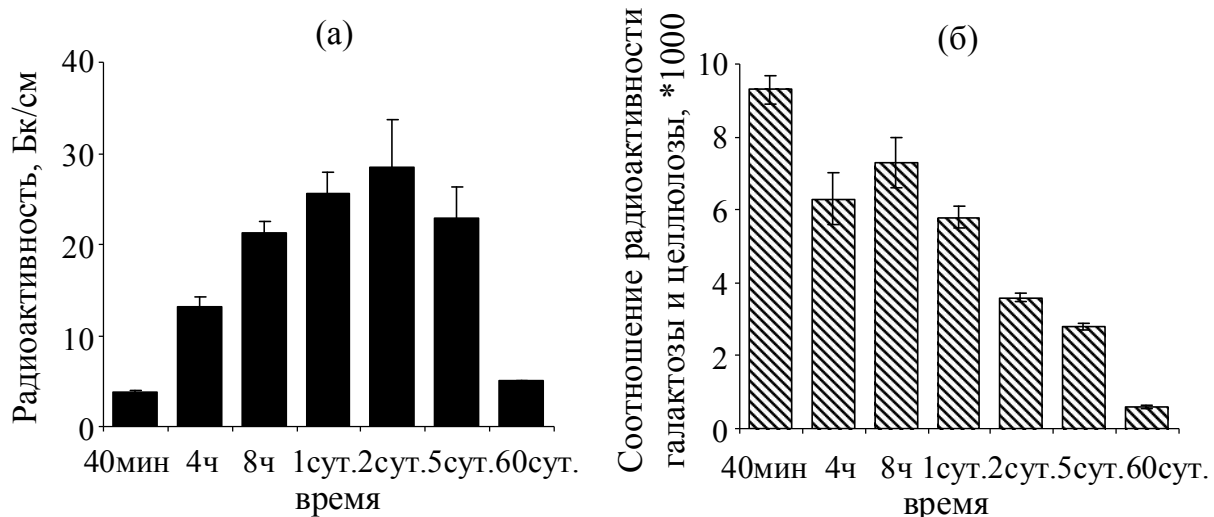


Рис. 7. Радиоактивность галактозы полимеров, слабо связанных с целлюлозой, выделенных из клеточной стенки волокнистой части стебля (а), и ее соотношение с радиоактивностью целлюлозы (б) сразу после фотосинтеза с $^{14}\text{CO}_2$ и после различных периодов роста растений в отсутствие радиоактивного субстрата.

существенный прирост (рис. 8 а). Двухфазный характер встраивания галактозо-содержащих полимеров наглядно демонстрируется и при оценке соотношения радиоактивности галактозы и целлюлозы (рис. 8 б). Это соотношение сначала убывало, достигая минимальных значений на вторые сутки, а, начиная с 5 суток, наблюдалось его резкое увеличение (рис. 8 б).

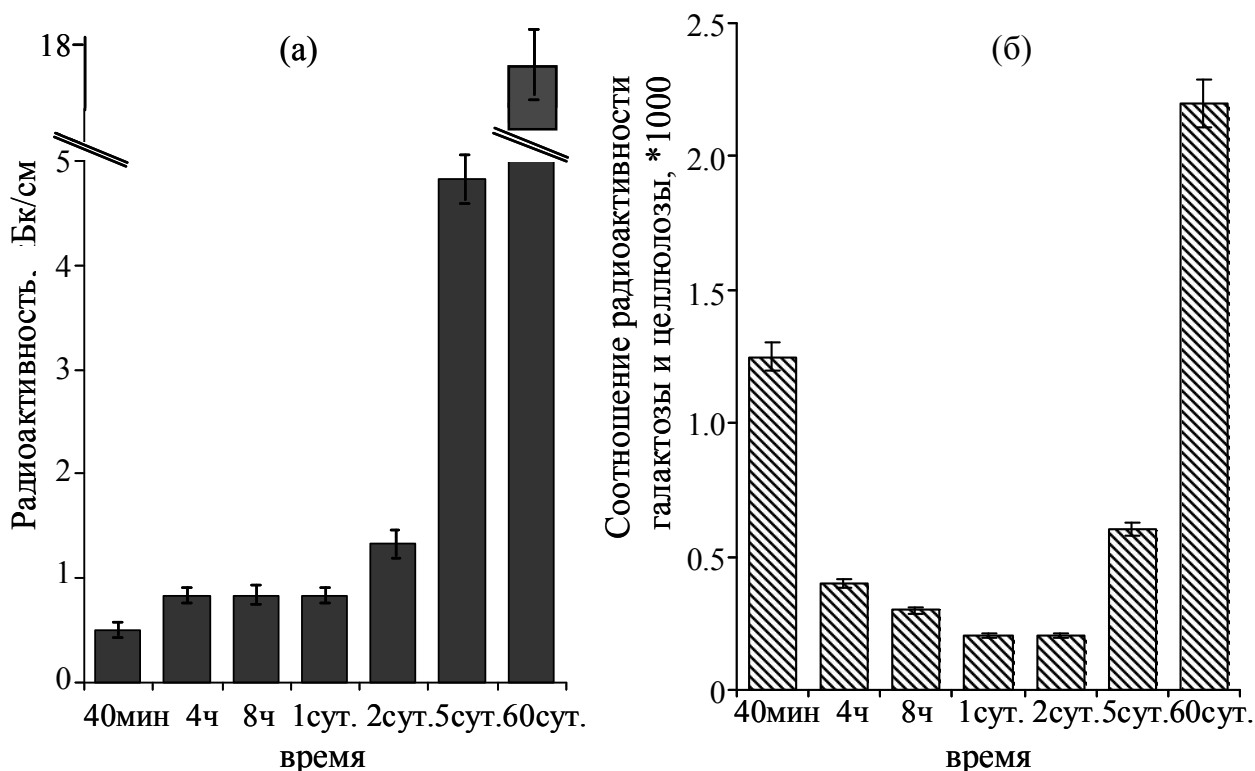


Рис. 8. Радиоактивность галактозы полимеров, прочно связанных с целлюлозой, выделенных из клеточной стенки волокнистой части стебля (а) и ее соотношение с радиоактивностью целлюлозы (б) сразу после фотосинтеза с $^{14}\text{CO}_2$ и после различных периодов роста растений в отсутствие радиоактивного субстрата.

Сопоставление динамики радиоактивности галактозы в полимерах, экстрагируемых оксалатом аммония и прочно связанных с целлюлозой, выявило их «зеркальный» характер на поздних стадиях эксперимента (рис. 7, 8). Это позволяет предполагать переход галактана из первой фракции во вторую, предваряемый, судя по снижению соотношения радиоактивности галактозы и рамнозы во фракции слабо связанных с целлюлозой полимеров, укорачиванием боковых цепочек полисахарида.

2.2.2.3. Радиоактивность галактозосодержащих полимеров изолированных волокон. Интерпретация данных, полученных при исследовании полисахаридов после встраивания в клеточную стенку при использовании в качестве анализируемых образцов волокнистой части стебля, не может быть четкой из-за присутствия в образце клеток других тканей, в которых так же могут присутствовать галактозосодержащие полимеры. Решить эту проблему позволяет возможность отделения волокон от окружающих тканей, что обеспечивается особой механической прочностью пучков волокон. Поэтому для анализа полимеров клеточной стенки нами был проведен дополнительный эксперимент с $^{14}\text{CO}_2$, в котором в качестве исследуемых образцов использовали изолированные волокна.

Основные результаты, полученные при анализе фракций клеточных стенок изолированных волокон, подтвердили закономерности, выявленные на волокнистой части стебля. В частности, отмечается проходящая через пик и убывающая со временем динамика радиоактивности галактозы в слабо связанных с целлюлозой полимерах и двухфазный характер включения метки в полимеры, прочно связанные с целлюлозой. В этом эксперименте проведено разделение фракций полимеров клеточной стенки на колонке с сефарозой CL-4В.

Табл. 2. Соотношение радиоактивности галактозы и рамнозы высокомолекулярного галактана, слабо связанного с целлюлозой, и прочно связанного с целлюлозой галактана клеточной стенки изолированных волокон, сразу после 40-минутного фотосинтеза растений льна с $^{14}\text{CO}_2$ и после различных периодов роста растений в отсутствие радиоактивного субстрата

Время	Высокомолекулярный галактан, слабо связанный с целлюлозой	Галактан, прочно связанный с целлюлозой
40 мин	12.4±0.2	8.2±0.0
8 ч	6.2±0.2	8.2±0.1
2 сут.	6.2±0.1	8.3±0.1
5 сут.	5.7±0.3	5.3±0.0
60 сут.	3.6±0.1	4.8±0.0

Профиль элюции (по радиоактивности) фракции слабо связанных с целлюлозой полимеров отличался от профиля фракции прочно связанных с целлюлозой полимеров наличием пика в высокомолекулярной области (2000 кД). Время элюции этого пика и характерное соотношение Гал/Рам (табл. 2) позволили идентифицировать его как галактан, сходный с высокомолекулярным галактаном аппарата Гольджи, в котором соотношение радиоактивности Гал/Рам в начальной временной точке в этом эксперименте составляло 11.5±0.9. Высокомоле-

кулярный пик на профиле фракции полимеров, экстрагируемых оксалатом аммония, идентифицировался сразу после фотосинтеза растений с $^{14}\text{CO}_2$. Соотношение радиоактивности Гал/Рам в нем в это время было максимальным и снижалось в ходе эксперимента (табл. 2). При этом не происходило изменения времени выхода полимера при гель-хроматографии, как и в случае обработки выделенного галактана галактаназой (рис. 3).

На профиле элюции полимеров, прочно связанных с целлюлозой, высокомолекулярный пик отсутствовал во всех временных точках. 70% меченой галактозы полимеров, прочно связанных с целлюлозой, выделенных из клеточной стенки изолированных волокон, детектировалось в области 100-400 кД, то есть в той же области, что и галактан, прочно связанный с целлюлозой (рис. 1). Соотношение радиоактивности Гал/Рам прочно связанных с целлюлозой полимеров до двух суток оставалось постоянным и составляло порядка 8, начиная с 5 суток, и до конца эксперимента происходило снижение соотношения этих моносахаридов (табл. 2). Это значит, что на второй фазе включения метки в галактан, прочно связанный с целлюлозой, в эту фракцию попадали молекулы с более короткими боковыми цепочками, чем в первые сутки эксперимента.

Эти результаты свидетельствуют о том, что та часть галактана, которая связывается с микрофибриллами целлюлозы в момент их сборки, не подвергается столь сильному гидролизу галактозидазой, как высокомолекулярный галактан, попадающий во фракцию, экстрагируемую оксалатом аммония. Снижение соотношения радиоактивности Гал/Рам во фракции прочно связанных с целлюлозой полимеров на второй фазе встраивания в нее галактана связано с попаданием в эту фракцию модифицированного полимера, экстрагируемого ранее оксалатом аммония. При этом обращает на себя внимание тот факт, что при взаимодействии с целлюлозой галактан с любым соотношением Гал/Рам, на любой стадии эксперимента, включая начальные, сразу становился более низкомолекулярным. Это означает, что при взаимодействии галактана с целлюлозой происходит изменение конформации молекул галактана или разборка полимера на составляющие блоки при их перассоциации с молекулами целлюлозы.

2.2.3. Состав и радиоактивность низкомолекулярных сахаров волокнистой части стебля. В осветленных гомогенатах волокнистой части стебля льна были обнаружены такие низкомолекулярные нефосфорилированные сахара как глюкоза, галактоза, сахароза, следовые количества арабинозы и ксилозы; рамноза и галактуроновая кислота полностью отсутствовали. Из возможных продуктов гидролиза галактана выявлялась только мономерная галактоза. Она присутствовала в значительных количествах (до десяти мМ) только в участках стебля, содержащих волокна на стадии формирования вторичной клеточной стенки. Олигомерных форм галактозы не выявлено. Динамика радиоактивности свободной галактозы отличалась

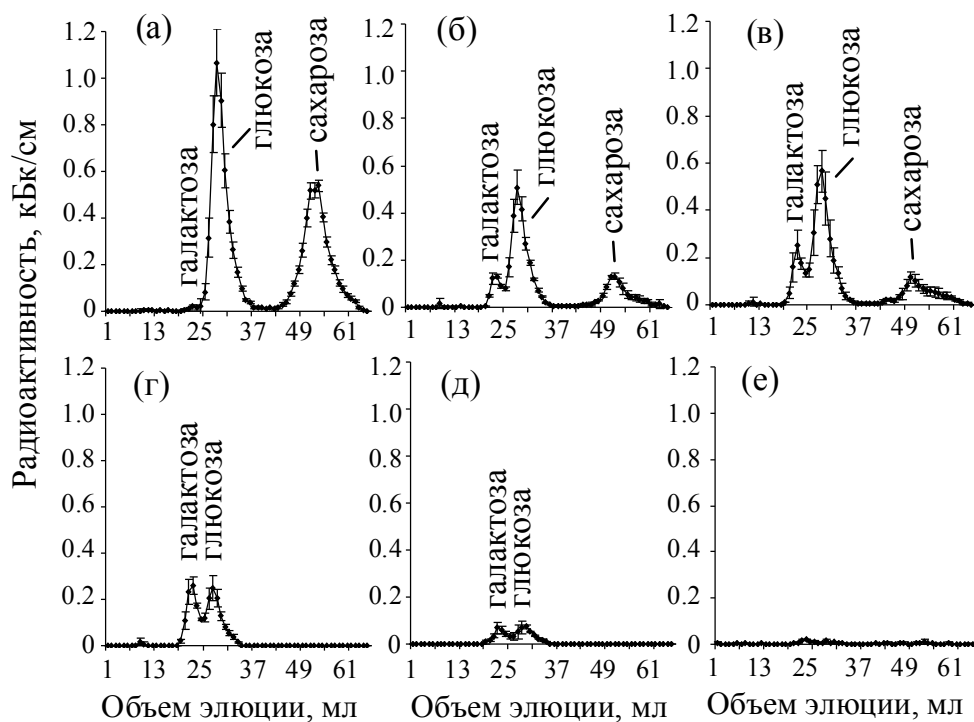


Рис. 9. Радиоактивность свободных сахаров в осветленном гомогенате волокнистой части стебля. а – через 40 минут экспозиции интактных растений с $^{14}\text{CO}_2$; б-е – через 4 часа, 8 часов, 2 суток, 5 суток и 10 суток роста растений в естественных условиях в отсутствии радиоактивного субстрата.

происхождение этого моносахарида в результате гидролитических процессов. Отсутствие меченой свободной галактозы в участках стебля, содержащих интрузивно растущие волокна, позволяет связывать ее происхождение с гидролизом галактана. Мономерная галактоза в значительных концентрациях может быть важным элементом специфического микроокружения полисахаридов при их взаимодействии в ходе формирования надмолекулярной структуры клеточной стенки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на полученных в представленной работе результатах и полученных ранее данных, можно выделить следующие характеристики исследуемого галактана: 1) это тканеспецифичный полимер флоэмных волокон льна, формирующих вторичную клеточную стенку желатинозного типа (Gorshkova et al., 1996, 2004); 2) существует особый тип секреции этого полисахарида, позволяющий накапливать содержимое пузырьков аппарата Гольджи и при его выплескивании за пределы плазмалеммы покрывать значительные участки периплазмы (Salnikov et al., 2008); 3) галактан имеет остов из рамногалактуронана I и разнообразные по структуре боковые цепочки, состоящие, в основном, из β -(1→4)-галактозных звеньев (Gorshkova et al., 1996; Gurjanov et al., 2007); длина некоторых боковых цепочек насчитывает, по крайней мере, сотню остатков галактозы; 4) в клеточной стенке зрелых волокон основная часть галактана прочно связана с микрофибриллами целлюлозы (Gurjanov et

от динамики радиоактивности первичных продуктов фотосинтеза (глюкозы и сахарозы).

Включение метки в галактозу проходило через максимум, при этом сразу после фотосинтеза растений с $^{14}\text{CO}_2$ меченая свободная галактоза отсутствовала (рис. 9). Такая динамика радиоактивности указывает на

al., 2008); 5) галактан обладает характерным свойством – поддерживать гидродинамический объем при удалении значительной части боковых цепочек; 6) при взаимодействии с целлюлозой галактан изменяет конформацию и/или разбирается на блоки, о чем свидетельствует сравнение профилей элюции полисахарида, выделенного до встраивания в клеточную стенку или из фракции, экстрагируемой оксалатом аммония, и полученного из фракции полимеров, прочно связанных с целлюлозой; 7) динамика взаимодействия галактана с целлюлозой носит двухфазный характер; часть молекул галактана связывается с микрофибриллами сразу после секреции за пределы плазмалеммы, другая – после отщепления значительной части боковых галактозных цепочек; 8) в ткани присутствуют значительные количества свободной галактозы, появляющейся в результате частичного гидролиза галактана; 9) в структуре галактана имеются препятствия для полного гидролиза боковых цепочек эндогенной β -(1 \rightarrow 4)-галактозидазой.

На основании этой совокупности данных, процесс формирования надмолекулярной структуры клеточной стенки желатинозного типа в волокнах льна можно представить следующим образом. Ключевыми «игроками» являются микрофибриллы целлюлозы и тканеспецифичный галактан, обладающий особыми свойствами, основанными, по-видимому, на существовании высоких уровней организации структуры молекулы.

Синтезированный в аппарате Гольджи галактан секретруется за пределы плазмалеммы; при этом используется особый тип секреции, обеспечивающий покрытие существенной площади периплазматического пространства (рис. 10 а). Эта картина имеет некоторое сходство с наблюдаемой у волосков семян хлопчатника, где на этапе формирования вторичной клеточной стенки в периплазматическое пространство откладывается слой каллозы, постоянно подвергающийся обновлению (Maltby et al., 1979, Salnikov et al., 2005). Для клеточных стенок и у желатинозных волокон, и у волосков семян хлопчатника характерно очень высокое содержание целлюлозы (85-95%), то есть очень низкое содержание иных полимеров. У таких клеток, интенсивно формирующих клеточную стенку и, соответственно, имеющих на плазмалемме высокую плотность целлюлозосинтазных комплексов, существует вероятность для латерального взаимодействия микрофибрилл, или даже индивидуальных молекул целлюлозы, сформированных различными целлюлозосинтазными комплексами. В этом случае, мог бы сформироваться протяженный кристалл, который лишил бы микрофибриллы их индивидуальности и препятствовал бы построению необходимой структуры клеточной стенки.

Наличие слоя полисахаридов матрикса в периплазматическом пространстве, по-видимому, связано с необходимостью разделения между собой микрофибрилл целлюлозы для предотвращения их латерального взаимодействия сразу после формирования. У волосков семян хлопчатника именно такую роль, с нашей точки

зрения, играет каллоза – наиболее «легко» синтезируемый полисахарид матрикса, образование которого происходит на плазмалемме и не требует участия аппарата Гольджи.

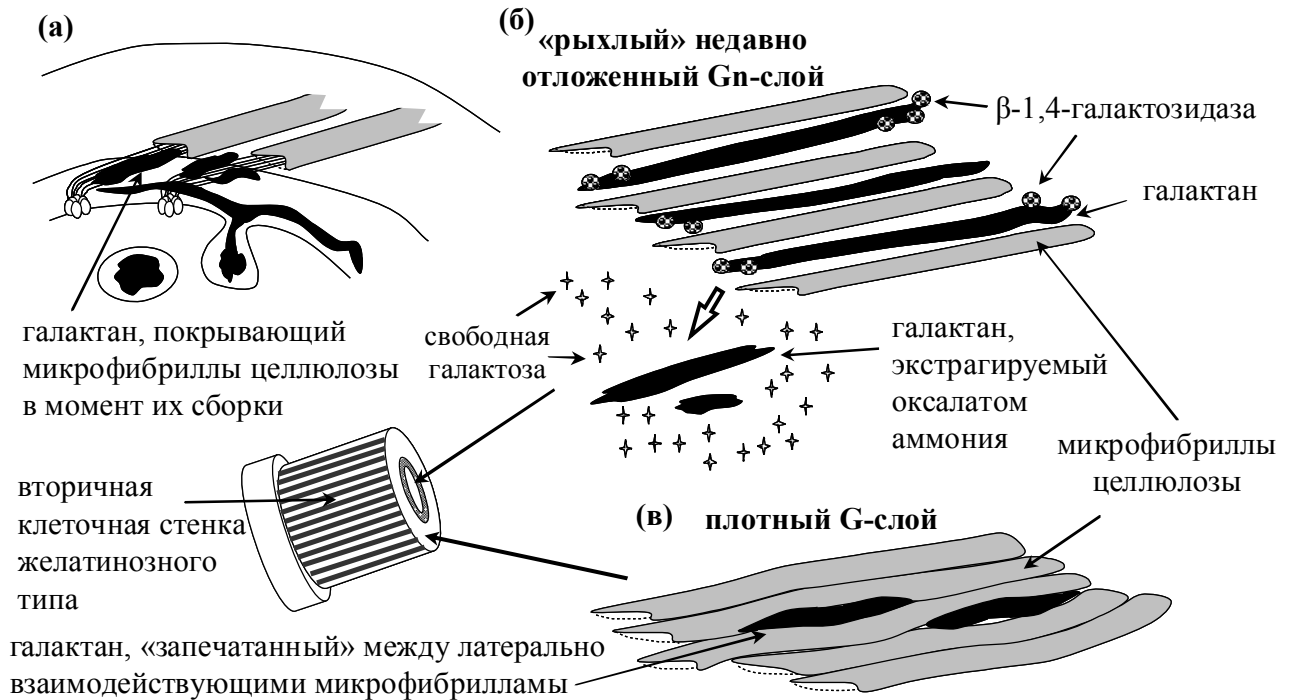


Рис. 10. Последовательные этапы участия галактана в формировании надмолекулярной структуры клеточной стенки желатинозного типа.

В желатинозных волокнах подобную роль играет тканеспецифичный галактан, точнее, – его длинные галактозные цепочки. Полимер с протяженными боковыми цепочками покрывает значительную площадь поверхности микрофибрилл, предотвращая, тем самым, их латеральное взаимодействие сразу после сборки. При этом часть молекул галактана захватывается формирующимися микрофибриллами, сразу попадая во фракцию прочно связанных с целлюлозой полимеров. Существенных модификаций, связанных с укорочением боковых цепочек этого галактана не происходит (соотношение Гал/Рам существенно не снижается), хотя при взаимодействии с целлюлозой галактан изменяет конформацию, о чем свидетельствует его элюция в более низкомолекулярной области при гель-фильтрации.

В отличие от каллозы волосков семян хлопчатника, галактан волокон льна выполняет и другую роль – с его участием создается натяжение микрофибрилл целлюлозы, обеспечивая реализацию функции G-слоев. Эту роль играет основная часть молекул галактана, которая не связывается сразу с целлюлозой и сначала попадает при фракционировании клеточной стенки во фракцию полимеров, экстрагируемых оксалатом аммония. Именно эта часть молекул галактана обеспечивает видимость «рыхлой» структуры недавно отложенных слоев клеточной стенки, наблюдаемой на электронномикроскопических снимках (рис. 10 б).

Молекулы галактана, находящиеся во фракции полимеров, слабо связанных с микрофибриллами целлюлозы, доступны для действия галактозидазы. Гидролиз боковых цепочек галактана, в результате которого появляется свободная галактоза, уменьшает площадь покрытия им микрофибрилл целлюлозы и делает возможным их латеральное взаимодействие (рис. 10 в). При этом между микрофибриллами “захлопывается” дополнительная порция галактана, что приводит к попаданию дополнительных количеств галактана во фракцию полимеров, прочно связанных с целлюлозой, соответствуя второй фазе возрастания метки в ней.

Идея о наличии латерального взаимодействия микрофибрилл была высказана в работе E. Mellerowicz с соавторами (2008), на основании увеличенных размеров кристаллитов в клеточных стенках желатинозного типа (Muller et al., 2006). Присутствие между микрофибриллами целлюлозы «запечатанного» полисахарида приводит к некоторому их изгибу и создает натяжение, которое и лежит в основе особых механических свойств желатинозных волокон.

Латеральное взаимодействие микрофибрилл в ходе формирования надмолекулярной структуры клеточной стенки волокон льна сопровождается увеличением доли кристаллической целлюлозы и созданием однородной плотной структуры клеточной стенки. Способность галактана поддерживать гидродинамический объем способствует, вероятно, созданию натяжения в клеточной стенке при латеральном взаимодействии микрофибрилл и, в конечном счете, выполнению волокнами своей механической функции.

Свободная галактоза, образовавшаяся при тримминговании цепочек галактана, вряд ли распределена равномерно по всей клетке, а, скорее всего, скапливается за пределами плазмалеммы. Возможно, что она играет роль при связывании галактозных боковых цепочек молекул галактана между собой или с целлюлозой, поскольку известно, что низкомолекулярные сахара в высокой концентрации могут способствовать образованию связей между нейтральными полисахаридами, усиливая гидрофобные взаимодействия (Grosso et al., 2000).

Ткане- и стадия-специфичность галактана желатинозных волокон заставляет предположить у него наличие особых свойств. Между тем, построенный по сходному принципу полисахарид (остов из рамногалактуронана I и боковые цепочки из β -(1→4)-галактозы), присутствует и в других типах клеточных стенок (Fry, 1988). Особые свойства полимера льна четко проявлялись при гидролизе специфичными ферментами, расщепляющими β -(1→4)-связи галактозы: β -1,4-эндогалактаназой или β -1,4-галактозидазой. Несмотря на значительное снижение содержания галактозы, полисахарид выявлялся на профиле элюции в том же месте, что и до обработки ферментом; то есть галактан волокон с клеточной стенкой желатинозного типа может поддерживать гидродинамический объем даже после удаления значительной части боковых цепочек. Эти факты, безусловно, свидетельствуют об особенностях трехмерной организации галактана льна и делают его интересным объектом для

изучения основ формирования вторичной и третичной структуры полисахаридов. Эта тематика разработана в мире чрезвычайно слабо, поэтому необычные свойства галактана желатинозных волокон требуют дальнейшего изучения как в плане выявления конкретных факторов, их обеспечивающих, так и в плане использования этих свойств в прикладных целях.

ВЫВОДЫ

1. Сформирована совокупность подходов, позволяющих охарактеризовать свойства и проанализировать метаболизм индивидуального полисахарида клеточной стенки в определенном типе клеток на определенной стадии их развития без вмешательства в естественный ход процессов.
2. При сопоставлении структуры галактана до и после встраивания в клеточную стенку обнаружено, что в ходе формирования надмолекулярной структуры клеточной стенки происходит два основных процесса: укорочение боковых цепочек полимера и изменение конформации молекулы, что сопровождается увеличением времени элюции при гель-фильтрации.
3. Установлено, что гидролиз галактозных цепочек галактана *in vitro* имеет избирательный характер. Часть цепочек отщепляется полностью, другая – подвергается незначительному гидролизу, либо не модифицируется вовсе. Различная степень гидролиза боковых цепочек объясняется как присутствием в их структуре препятствий для действия эндогенной β -1,4-галактозидазы (единичный остаток арабинозы, другие типы связи между остатками галактозы), так и конформационными особенностями организации молекул полимера.
4. Показана способность галактана льна поддерживать гидродинамический объем после удаления основной части галактозных цепочек при воздействии галактаназы или галактозидазы.
5. В экспериментах по изучению прераспределения метки после фотосинтеза целых растений с $^{14}\text{CO}_2$ впервые установлено, что при встраивании галактана в клеточную стенку его связывание с микрофибриллами целлюлозы имеет двухфазный характер: часть молекул галактана оказывается прочно связанной с целлюлозой сразу после секреции за пределы плазмалеммы; основная часть молекул этого полимера начинает связываться с целлюлозой через несколько суток.
6. Показано, что вторая фаза связывания галактана с микрофибриллами целлюлозы обеспечивается переходом молекул галактана из фракции, экстрагируемой оксалатом аммония. Этот переход предваряется удалением значительной части боковых цепочек.
7. Впервые обнаружено, что в волокнах на стадии формирования вторичной клеточной стенки содержится свободная галактоза в значительных концентрациях. Динамика ее радиоактивности резко отличается от динамики радиоактивности первичных продуктов фотосинтеза и свидетельствует о том, что она образуется в результате частичного гидролиза галактана клеточной стенки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гурьянов, О.П. Анализ метаболизма индивидуального полимера клеточной стенки: тканеспецифичный галактан волокон льна / О.П. Гурьянов, С.Б. Чемикосова, **П.В. Микшина**, Т.Е. Чернова, Т.А. Горшкова // Материалы докладов / Коми НЦ УрО РАН. – Сыктывкар, 2007. – С. 56.
2. Gurjanov, O. Tissue-specific galactan in secondary cell wall of gelatinous type / O. Gurjanov, T. Chernova, S. Chemikosova, **P. Mikshina**, T. Gorshkova // Abstract / Physiologia Plantarum. –2007. –V. 130. – № 4. – 157.
3. Gorshkova, T.A. Pectins in secondary cell walls / T.A. Gorshkova, **P.V. Mikshina**, N.N. Ibragimova, N.E. Mokshina, O.P. Gurjanov, S.B. Chemikosova // Book of Abstract / Wageningen Academic Publishers. – Wageningen, – 2008. – P. 34.
4. **Микшина, П.В.** Свободная галактоза на разных стадиях формирования флоэмных волокон льна-долгунца / П.В. Микшина, С.Б. Чемикосова, Т.А. Горшкова // Сб. трудов / Изд-во Арта. – Новосибирск, 2008. – С. 489.
5. Gorshkova, T.A. Plant cell wall polysaccharides: modifications during formation of supramolecular structure / T.A. Gorshkova, **P.V. Mikshina**, O.P. Gurjanov, S.B. Chemikosova // Book of Abstract / Oslo, 2008. – F-O007.
6. Gorshkova, T.A. Non-cellulosic polysaccharides in secondary cell walls of plant fibers / T.A. Gorshkova, O.P. Gurjanov, **P.V. Mikshina**, S.B. Chemikosova // Book of Abstract / Sigtuna, 2008. – P. 8.
7. Ibragimova, N.N. Beta-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. Chemikosova, T.A. Gorshkova // Book of Abstract / Sigtuna, 2008. – P. 44.
8. **Микшина, П.В.** Свободные сахара на разных стадиях формирования флоэмных волокон льна – долгунца в pulse-chase экспериментах / П.В. Микшина, С.Б. Чемикосова, Т.А. Горшкова // Сборник материалов докладов/ Изд-во Уральского университета. – Екатеринбург, 2008. – С. 282-283.
9. Gorshkova, T.A. Pectins in secondary cell walls: modifications during cell wall assembly and maturation / T.A. Gorshkova, **P.V. Mikshina**, N.N. Ibragimova, N.E. Mokshina, Т.Е. Чернова, O.P. Gurjanov, S.B. Chemikosova // Pectins and Pectinases / Wageningen Academic Publishers. – 2009. – P. 149-165.
10. **Микшина, П.В.** 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.
11. Горшкова, Т.А. 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.
12. Горшкова, Т.А. Формирование надмолекулярной структуры растительной клеточной стенки / Т.А. Горшкова, **П.В. Микшина**, О.П. Гурьянов, С.Б. Чемикосова // Биохимия. – 2010. – Т.75, № 2. (в печати).