

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ
Направление: 06.03.01– биология

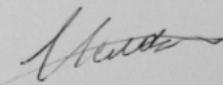
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская работа

**ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ *PESTOVACTERIUM ATROSEPTICUM*:
ВЫЯВЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРЫ И ВЫЯСНЕНИЕ
ВЛИЯНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ НА ИХ БИОСИНТЕЗ**

Работа завершена:

"30" Мая 2017 г.



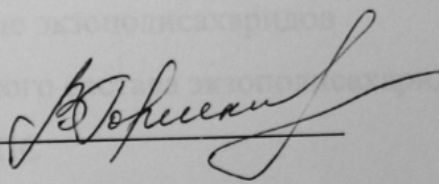
(Б.Р. Исламов)

Работа допущена к защите:

Научные руководители

к. б. н., с. н. с., ст. преп.

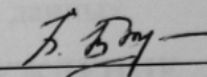
"30" Мая 2017 г.



(В.Ю. Горшков)

к.б.н., ассистент

"5" Июня 2017 г.

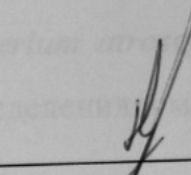


(Н.Б. Баранова)

Заведующий кафедрой

д. б. н., профессор

"__" _____ 20__ г.



(В.М. Чернов)

Казань–2017

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 7 |
| 1.1 Общее представление об экзополисахаридах | 7 |
| 1.2 Биосинтез экзополисахаридов | 9 |
| 1.3 Регуляция продукции экзополисахаридов | 13 |
| 1.4 Общая характеристика фитопатогенных пектобактерий | 14 |
| ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 21 |
| 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 21 |
| 2.1. Объект исследования. | 21 |
| 2.2 Культивирование <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043 | 21 |
| 2.3 Получение голодающих культур <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043 | 21 |
| 2.4 Оценка титра культивируемых клеток <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043 | 22 |
| 2.5 Выделение экзополисахаридов из культур дикого и мутантных штаммов <i>P. atrosepticum</i> | 22 |
| 2.6 Анализ экзополисахаридов с помощью гель-проникающей хроматографии | 23 |
| 2.7 Количественное определение экзополисахаридов | 23 |
| 2.8 Определение моносахаридного состава экзополисахаридов | 24 |
| 2.9 Установление структуры ЭПС | 25 |
| 2.10 Статистическая обработка данных | 25 |
| 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 26 |
| 3.1 Выделение экстраклеточных полисахаридов (ЭПС) из супернатантов модельных культур <i>Pectobacterium atrosepticum in vitro</i> и определение молекулярно-массового распределения и моносахаридного состава этих полимеров | 26 |
| 3.2 Установление структуры регулярного звена высокомолекулярного экстраклеточного полисахарида <i>P. atrosepticum</i> . | 30 |

3.3 Оценка влияния мутаций в генах, кодирующих синтазу ацил-гомосеринлактонов и альтернативный стресс-индуцируемый сигма-фактор RpoS, на содержание и состав ЭПС в модельных культурах

Pectobacterium atrosepticum in vitro 36

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 38

ВЫВОДЫ 39

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 42

ЭВФ – Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Л.В. – группа Lactis-Portum

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные экстраклеточные полисахариды (ЭПС) представлены разнообразными по структуре и свойствам углеводными полимерами, которые транспортируются из клеток микроорганизмов в окружающую среду. Эти полимеры могут выполнять множество функций: структурную, защитную, информационно-коммуникативную, резервную. У патогенных микроорганизмов ЭПС играют роль важных факторов вирулентности. Одним из ключевых назначений ЭПС является объединение совокупности обособленных клеток микроорганизмов в сложные 3D структуры, напоминающие ткани высших организмов. Примерами таких структур служат биопленки, микроколонии, агрегаты. Для образования таких структур необходим внеклеточный матрикс, основными компонентами которого являются ЭПС.

Синтез ЭПС контролируется разнообразными регуляторными белками и системами, что обеспечивает своевременную продукцию этих полимеров в нужном для популяции объеме. Регуляторами образования ЭПС могут служить система кворум сенсинга, система «строгого ответа», опосредуемого гуанозин тетрафосфатом, разнообразные сигма- и антисигма-факторы, двухкомпонентные регуляторные системы и т.д. Причем, у разных видов бактерий набор регуляторов, координирующих синтез ЭПС, может различаться, что, по всей видимости, диктуется разной экологией определенных таксонов микроорганизмов.

Многие фитопатогенные бактерии при взаимодействии с растениями синтезируют ЭПС, необходимые для формирования биопленок и агрегатов *in planta*, которые обеспечивают успешную колонизацию организма хозяина. Одни из наиболее вредоносных фитопатогенов в мире – пектобактерии, до недавнего времени не были охарактеризованы с точки зрения образования 3D структур в условиях организма хозяина. Поскольку основными детерминантами патогенности пектобактерий считаются ферменты, разрушающие растительную клеточную стенку, именно на этих факторах

вирулентности акцентировано основное внимание исследователей. Тем не менее, недавно было выяснено, что пектобактерии при колонизации растений формируют агрегаты, а также особые биопленкоподобные «многоклеточные» структуры – бактериальные эмболы, необходимые для эффективной колонизации растения. Но, несмотря на то, что в формировании таких структур обычно принимают участие ЭПС, исследования по выявлению и характеристике этих полимеров у пектобактерий ранее не проводились.

В связи с этим, целью настоящей работы было описание биохимических характеристик ЭПС *Pectobacterium atrosepticum* и выяснение влияния мутаций в генах, кодирующих регуляторные белки, на образование этих полимеров в бактериальных культурах *in vitro*.

В рамках указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить экстраклеточные полисахариды (ЭПС) из супернатантов модельных культур *Pectobacterium atrosepticum in vitro* и определить молекулярно-массовое распределение и моносахаридный состав этих полимеров.
2. Установить структуру регулярного звена ЭПС *P. atrosepticum* методом одно- и двумерного ЯМР.
3. Определить влияние мутаций в генах, кодирующих синтазу ацил гомосеринлактонов и альтернативный стресс-индуцируемый сигма фактор RpoS, на содержание и состав ЭПС в модельных культурах *Pectobacterium atrosepticum in vitro*.