

Дис.

СОБОЛЕВА
Елена Федоровна

**АГГЛЮТИНИНЫ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* 252
И ИХ РОЛЬ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ
С РАСТЕНИЯМИ**

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов, 1998

2

Работа выполнена в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской Академии Наук (ИБФРМ РАН г. Саратов).

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

Карпунина Л.Е

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
старший научный сотрудник

Щербаков А.А

академик АЕ, доктор медицинских наук,
профессор

Куляш Ю.В.

Ведущая организация: Саратовский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского

Защита состоится " 27 " октября 1998 г. в 10⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 074.32.01 при Российском научно-исследовательском противочумном институте "Микроб" (410005, г.Саратов, ул.Университетская, 46)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке РНИПЧИ "Микроб"

Автореферат разослан «17 » сентября 1998 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Корнеев Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Биологическая фиксация азота является одной из актуальных проблем современной биологии. Усвоение бобовыми растениями биологического азота оказывает положительное влияние на рост, развитие, в конечном счете, на урожайность ценных сельскохозяйственных культур таких как горох, фасоль, соя, клевер, люцерна, люпин, являющихся основным источником пищевого и кормового белка. В связи с этим симбиотическое сообщество бобовых растений с клубеньковыми бактериями, в котором и осуществляется процесс фиксации азота, изучается очень интенсивно. Одним из перспективных подходов в понимании формирования симбиоза является изучение тонких молекулярно-биохимических механизмов взаимодействия бактериальных и растительных клеток на ранних этапах формирования симбиотической системы.

В литературе, по проблеме бобово-ризобиального симбиоза, сложилось общее представление о молекулярных механизмах "узнавания" симбионтов, в которых ведущая роль отводится лектин-углеводным взаимодействиям (Dazzo F. et al., 1975; Dazzo F. et al., 1977). Однако, до сих пор, практически всех публикациях изучаются только растительные лектины, бактериальная же клетка выступает в качестве носителя углеводных рецепторов (Ливинич Л.И., 1979; Ливинич Л.И. с соав., 1982; Dazzo F.B. et al., 1980; Dool B.B. et al., 1974). А между тем, обнаружение агглютинирующих белков на поверхности ризобий (Neumann W. 1968; Kijne J.W. et al., 1983) дает возможность предположить более активную роль компонентов бактериальной поверхности в процессах, вносящих свой вклад в эффективность взаимодействия бактерий с растением-хозяином. Изучение агглютининов у ризобий могло бы способствовать более полному пониманию молекулярных основ межклеточных и межвидовых взаимодействиях, а также внести определенный вклад в фундаментальные исследования физиологической роли агглютининов ризобий в бобово-ризобиальной системе.

Поскольку углевод-белковое узнавание играет ведущую роль в формировании многоклеточных организмов и межвидовых сообществ как паразитических, так и симбиотических (Ливинич Л.И., 1979), исследование белковых агглютининов (лектинов) как компонентов узнающей системы имеет большое биологическое значение.

Цель и задачи исследования. Цель работы состояла в выделении, исследовании физико-химических свойств белков-агглютининов клеточной

поверхности бактерий *Rhizobium leguminosarum* 252, и изучении их роли в взаимодействии с растениями. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Выделить агглютинины *R. leguminosarum* 252 и изучить их физические химические свойства.
2. Получить мутант, дефектный по гемагглютинирующей активности.
3. Определить роль агглютининов в прикреплении ризобий к корням гороха.
4. Изучить взаимодействие агглютининов ризобий с фракциями корней гороха и с лектином корней гороха, пшеницы.
5. Выявить влияние агглютининов *R. leguminosarum* 252 на функционирование гидролитических и дыхательных ферментов корней проростков гороха.

Научная новизна. Впервые с клеточной поверхности почвенных азотфиксирующих симбиотических бактерий *Rhizobium leguminosarum* 252 выделены белки-агглютинины, несвязанные с какими-либо филаментами.

Были изучены некоторые физико-химические свойства агглютининов *leguminosarum* 252.

Показано, что агглютинины ризобий могут играть роль адгезинов на начальных этапах формирования симбиотической системы "растение – бактерия".

Получен мутант *R. leguminosarum* 252/7, дефектный по гемагглютинирующей активности.

Установлено взаимодействие агглютининов *R. leguminosarum* 252 с фракциями корней проростков гороха и лектинами корней гороха и пшеницы.

Выявлены рецепторы, ответственные за связывание с агглютинами ризобий.

Обнаружено влияние агглютининов *R. leguminosarum* 252 на активность гидролитических и дыхательных ферментов растительной клетки.

Практическая значимость. Одним из перспективных направлений решения ряда экономических и экологических проблем современного сельского хозяйства, является возможность замены минеральных удобрений бактериальными, что требует более глубокого и всестороннего изучения взаимодействия растений с микроорганизмами.

Процесс прикрепления (адгезия) ризобий к корням бобовых является первым этапом в многоступенчатом инфекционном процессе, ведущим к азотфиксирующему симбиозу, от эффективности которого, в конечном итс

висит урожайность ценных бобовых культур. Кроме того, изучение и понимание молекулярных основ этого процесса поможет не только в получении роших урожаев, но и в защите растений от инфекции.

Изучение агглютининов ризобий может способствовать дальнейшему пониманию молекулярных основ взаимодействия "бактерия-растение", актерия-бактерия", а так же внести определенный вклад в фундаментальные исследования физиологической и функциональной роли лектинов в сай бактериальной клетке.

Материалы диссертационной работы нашли применение при подготовке ограмм спецкурса "Взаимоотношение растений и микроорганизмов" и ецпрактикума "Методы препаративной биохимии" для студентов дневного зечернего отделений биологического факультета Саратовского госунивертета им. Н.Г.Чернышевского.

Результаты диссертационной работы использованы при подготовке курвых и дипломных работ студентами биологического факультета СГУ.

Полученные препараты агглютининов *R. leguminosarum* 252 используются и проведении плановых научно-исследовательских работ в лаборатории зиологии растительной клетки ИБФРМ РАН.

Применение и использование материалов диссертации подтверждается ответствующими актами.

На защиту выносятся следующие основные положения:

Выделение и изучение физико-химических свойств агглютининов *R. leguminosarum* 252.

Определение роли белков-агглютининов в процессе прикрепления ризо-биальных клеток к корням гороха.

Выявление взаимодействия агглютининов с фракциями корней проростков гороха и лектинами корней растений.

Обнаружение бактериальных и растительных рецепторов агглютининов *R. leguminosarum* 252.

Влияние агглютининов *R. leguminosarum* 252 на активность гидролитических и дыхательных ферментов растительной клетки.

Работа выполнена в лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН в соответствии с плановой тематикой "Физиолого-биохимическая роль белков-лютининов клеточной поверхности бактерий" (№ гос. регистрации 310022283).

Апробация работы. Основные результаты и положения работы пред-влялись на Международном Рабочем совещании по ассоциативному

взаимодействию азотфиксирующих бактерий с растениями (Саратов, Рос 1995); Второй Европейской конференции по азотфиксации (Познань, Польша 1996); Втором съезде Биохимического общества РАН (Москва, Россия 1997); Международной лектинозой конференции "Interlec – 17" (Вюрцбург, Германия 1997) и на отчетных конференциях ИБФРМ РАН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ в отечественной и зарубежной печати.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 7 глав, включающих обзор литературы, описания материалов и методов следования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованных литературных источников. Работа изложена на 119 страницах, иллюстрирована 24 рисунками и содержит таблиц. Список использованных литературных источников включает 172 наименования, в том числе 124 зарубежных.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Литературный обзор представлен в первой главе, где дано общее понятие о агглютиназах (лектинах) бактерий. Рассмотрено участие лектин растений в углевод-белковом взаимодействии. Обсуждена роль бактериальных агглютининов в процессе взаимодействия бактерий с растениями

Материалы и методы

Объектом исследований служил штамм *Rhizobium leguminosarum* viciae 252, полученный из Всесоюзной коллекции *Rhizobium* ВНИИСХМ Санкт-Петербург, Пушкин) и мутант этого штамма *Rhizobium leguminosarum* 252/7, дефектный по гемагглютинирующей активности, полученный нами совместно с лабораторией генетики микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов).

Культуру *R. leguminosarum* 252 и *R. leguminosarum* 252/7 выращивали при 28°C в течение 3-х суток на жидкой синтетической среде Ковалевс (Ковалевская Т.М., 1984). Для культивирования штаммов бактерий использовали также гороховую среду (Ежов Г.И., 1981).

Белки-агглютинины выделяли с бактериальной поверхности трижды мытых 0,15 М физиологическим раствором клеток ризобий (6000g по 10 мин по методу Эшдата (Eshdat Y. et al., 1978).

Очистку белков проводили гель-фильтрацией на колонке, используя нель Toyopearl HW-55. В качестве элюэнта использовали ацетатный буфер pH=3,6-3,8 (0,2 М). Выход белковых фракций регистрировали на приборе Uvicord S-II (LKB) при 278 нм. Содержание белка определяли по методу Эдфорда (Bradford M.A., 1976).

Гемагглютинирующую активность белков определяли реакцией гемагглютинации с самопроизвольным осаждением эритроцитов (Lis H., 1972).

Молекулярные массы белков определяли с помощью диск-электрофореза в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) (Laemmli V., 1970). Белки окрашивали 0,2% раствором Кумасси Brilliant Blue G250 (Гааль Э. с соав., 1982) или 0,1% раствором серебра (Блохин Д.Ю., 1982).

Аминокислотный состав белков и аминокислотного сахара определяли на аминокислотном анализаторе ААА-339 (ЧССР) (Под ред. В.Г. Конарева., 1973).

Моносахаридный состав изучали методом газожидкостной хроматографии (Dishe Z., 1947).

Для определения специфичности агглютининов применяли метод подавления его активности углеводами (Луцик М.Д. с соав., 1981). В работе использовали 28 углеводов (0,3 М) фирмы "Serva".

Оценку адгезивных свойств бактериальных клеток на эритроцитах крови человека проводили по методу Брилиса (Брилис В.И. с соав., 1986).

Изучение адгезии клеток ризобий на корнях проростков гороха сорта Улазский юбилейный, проводили изотопным методом с использованием ^{14}C глюкозы. Счет радиоактивности вели в толуол-тритоновом сцинтилляторе (Остерман Л.А. 1983) жидкостным сцинтиляционным счетчиком 1211 ж-Beta (LKB-Wallac). Количество бактериальных клеток определяли с помощью спектрофлуориметрического метода (Shchyogolev S. Yu. et al., 1981). Фракцию экзокомпонентов получали методом мягкого фосфатно-солевого отмывания с корней проростков гороха. Мембранную фракцию получали отмыванием корней проростков с помощью кварцевого песка, удаления растворимых белков и дальнейшей экстракцией 1%-м раствором тритон-Х-100 (Полевой В.В. с соав., 1978).

Взаимодействие бактериального агглютинина с ризобийными полисахаридами изучали методом интерфазных колец преципитации в геле (Kato et al., 1980).

Антитела к агглютининам *R. leguminosarum* 252 получали путем иммунизации кроликов. При этом вводили подкожно в 6 точек спины 40-50 мкг/мл

препарата агглютинина в смеси с равным объемом адъюванта Фрей (Berquist N. et al., 1970).

Реакцию иммунодота проводили на нитроцеллюлозных фильтре (диаметр пор 1.5 мкм, "Synpor") (Егоров А.Н. с соав., 1991) с использованием коллоидного золота диаметром 10-30 нм, стабилизированного протеином (Bogatyrev V.A. et al., 1992).

Для переноса белков с гелевой пластинки на нитроцеллюлозный мембранный фильтр использовали метод электроблоттинга (Burnett W.N., 1981).

Получение мутанта штамма *R. leguminosarum* 252 осуществляли химическим мутагенезом, используя нитрозогуанидин (Adelberg E.A. et al., 1965).

Суммарную активность протеолитических ферментов определяли по методу Preston et al. (Ермаков А.И., 1987).

β -Глюкозидазная активность была определена по методу Ki-Sun Kwon и Sun Kwon et al., 1978).

Определение малатдегидрогеназной активности проводили по методу Е.Г. Сальковой и Ю.В. Звягинцевой (Ермакова А.И. 1987).

Определение активности НАДН-дегидрогеназы проводили по методу Левинского (Полевой В.В. с соав., 1986).

Определение активности сукцинат- и лактатдегидрогеназ проводили по методу Сысоева А.Ф и Красной Т.С. (Плешков Б.П., 1985).

Результаты экспериментов подвергали статистической обработке (Ойлер И.А. 1960).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Физико-химические свойства агглютининов *Rhizobium leguminosarum* 252

Используя методы белковой химии с поверхности клеток *leguminosarum* 252 были выделены два белка, обладающие гемагглютинирующей активностью, условно обозначенные нами как R₁ и R₂ с молекулярными массами 47 и 45 кДа (рис. 1). Как было ранее показано, агглютинины *leguminosarum* 252 располагаются равномерно по всей поверхности бактериальной клетки и не связаны с какими-либо фибриллярными структурами (Карпунина Л.В. с соав., 1995).

Агглютинины по своей природе являются гликопротеинами. Аминогруппный состав характеризовался большим содержанием кислых аминокислот и отсутствием цистина и качественно не отличался друг от друга.

Основными идентифицируемыми компонентами углеводной части обоих агглютининов были глюкоза, галактоза, манноза и глюкозамин.

Несмотря на широкий спектр применяемых углеводов специфичность к простым углеводам не была обнаружена.

В связи с поиском возможных рецепторов для агглютининов ризобий изучали способность агглютининов, на примере R_1 , взаимодействовать с неклеточными полисахаридами и липополисахаридами, находящимися на поверхности *R. leguminosarum* 252.

Явно выраженные кольца преципитации были обнаружены через сутки при взаимодействии агглютинина R_1 как с липополисахаридами, так и нефракционированными экзогликанами (рис. 1).

Таким образом, проведенные исследования показали, что рецепторами изобиальных агглютининов являются не простые сахара или ди- и трисахариды, а углеводы более сложного строения, в частности полисахариды тех

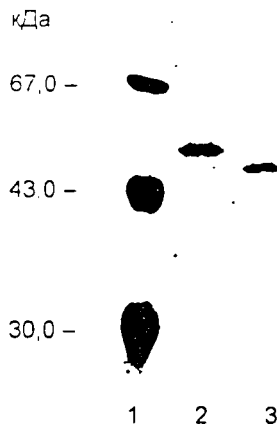


Рис. 1 Электрофореграмма агглютининов *R. leguminosarum* 252:

- 1 – белки-маркеры: BSA (67 кДа), овальбумин (43 кДа), карбоангидраза (30 кДа);
2 – агглютинин R_1 ;
3 – агглютинин R_2 .

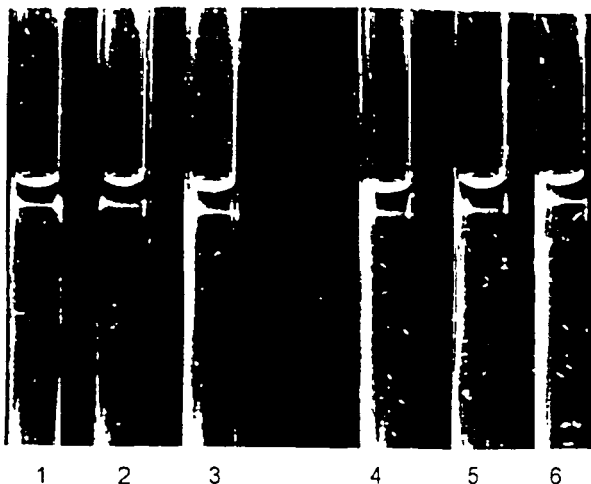


Рис. 2 Взаимодействие агглютинина R_1 *R. leguminosarum* 252 с нефракционированными экзогликанами (1, 2, 3) и липополисахаридами (4, 5, 6) этого же штамма. Верхняя водная фаза – раствор агглютинина R_1 : (мкг/мл) 1, 4 – 500, 2, 5 – 250, 3, 6 – 125, нижняя гелевая фаза – желатин (3%) и створ полисахарида (1 мг/мл) в соотношении 1:1

же ризобиальных клеток, из которых были выделены агглютинины.

2. Характеристика мутантных клеток *R. leguminosarum* 252/7, дефектных по гемагглютинирующей активности

Для выяснения роли агглютининов в процессах, происходящих при взаимодействии бактерий с растениями, предполагалось получение мутант-дефектного по гемагглютинирующей активности. Такие клетки ризобий были получены из штамма *R. leguminosarum* 252 с помощью нитрозогуанидина обозначены как *R. leguminosarum* 252/7.

Отсутствие гемагглютинирующей активности у клеток мутантного штамма мы первоначально связывали с отсутствием агглютининов на их поверхности. Однако этот факт не нашел подтверждения в наших дальнейших исследованиях. С поверхности клеток *R. leguminosarum* 252/7 были выделены два белка, условно обозначенные как R'₁ и R'₂. По белковому профилю и по времени выхода с колонки белки мутантного штамма совпадали с агглютинином родительского штамма R₁ и R₂. По данным диск-электрофореза в 10% ПААГ с SDS была установлена молекулярная масса, которая, как оказалось, была идентична молекулярной массе агглютининов клеточной поверхности родительского штамма и равнялась соответственно 47 и 45 кДа. Отсутствие гемагглютинирующей активности у мутантных клеток, как видно, не было связано с отсутствием агглютининов на их поверхности, а происходило, возможно, либо за счет каких-то структурных изменений в этих белках, что, конечно, в конечном счете, приводило к утрате их основного биологического свойства способности к агглютинации, либо причиной потери агглютинирующей активности могло стать блокирование углеводсвязывающих сайтов другими биологическими структурами.

В пользу первого предположения говорят данные аминокислотного состава этих соединений. Сравнительным анализом аминокислотного состава агглютининов родительского и мутантного штамма выявлены, наряду с их сходством, и некоторые различия. Сходным являлось большое содержание серина, глицина, лейцина, небольшое содержание аргинина, отсутствие цистина. Как агглютинины исходного штамма, так и агглютинины мутанта содержали в своем составе большое количество кислых аминокислот. Однако агглютинины *R. leguminosarum* 252 содержали в 2 раза меньше глутаминовой кислоты, чем белки *R. leguminosarum* 252/7, и в 1,5 раза меньше аспарагиновой кислоты. Различие проявлялось в отсутствии метионина и тирозина в агглютинах мутантного штамма.

В пользу второго предположения говорят исследования "смывов", образуемых в первых стадиях выделения агглютининов с поверхности клеток ризобий при обработке клеток фосфатно-солевым буфером pH=7,2. Методом гель-электрофореза градиенте 7,5-15% ПААГ с SDS в "смыве" клеток родительского штамма была обнаружена белковая полоса, которая отсутствовала в "смыве" клеток мутантного штамма. (рис. 3). Роль этого белка пока неизвестна, но поскольку он выходит достаточно легко в "промывные воды" после грубой очистки клеточной поверхности исходного штамма и остается на поверхности мутантных клеток, то, возможно, находясь на внешней мембране, он образует комплекс с агглютинином и блокирует тем самым его агглютинирующие свойства.



Рис. 3 Электрофореграмма "смыва" с клеток:

1 – *R. leguminosarum* 2527,
2 – *R. leguminosarum* 252.

Изучение роли агглютининов *Rhizobium leguminosarum* 252 в адгезии к корням проростков гороха

В настоящее время для многих почвенных бактерий *Klebsiella*, *seudomonas*, в том числе и *Rhizobium* (Heumann W., 1968; Kijne J., 1983; aahtela K. et al., 1985), достаточно хорошо известно, что пили бактерий, играют роль адгезинов в прикреплении бактерий к растениям. Относительно агглютининов почвенных азотфиксирующих бактерий, непилевого происхождения, таких сведений имеется немного (Smit G. et al., 1989) и они не вскрывают в полной мере значения этих белков.

Как показали электронно-микроскопические исследования на поверхности клеток *Rhizobium leguminosarum* 252, выращенных при 28°C, было обнаружено значительное количество пилей. В то время как при 11°C клетки либо не имели пилей, либо их было незначительное количество.

При изучении адгезии ризобияльных клеток, выращенных в разном температурном режиме, к эритроцитам крови человека было установлено, что присутствие пилей или их незначительное количество при 11°C не приводило отсутствию адгезии, а наоборот, индекс адгезивности микроорганизмов был больше, чем при температурном режиме 28°C (4,4 и 3,4 соответственно). Эти данные хорошо коррелировали с гемагглютинирующей активностью ризоби-

альных клеток, которая при 11°C была выше, нежели при оптимальной температуре 28°C. Титр агглютинации различался в два раза.

Процесс адгезии не ингибировался также маннозой и галактозой, являющимися специфическими гаптенами к адгезинам пилийного происхождения.

Полученные результаты позволили говорить о том, что в адгезии ризобий альных клеток могли участвовать агглютинины непиллийного происхождения.

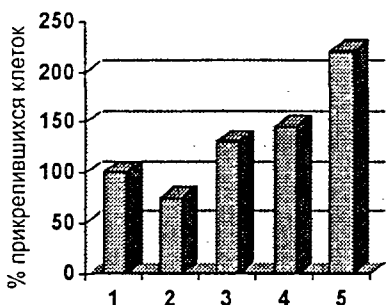


Рис. 4 Прикрепление клеток *R. leguminosarum* 252 к корням проростков гороха: 1 – корни без предобработки; корни после обработки: 2 – агглютинином *R. leguminosarum* 252 (R_1), 3 – BSA, 4 – Con A, 5 – лектином *Bacillus polymyxa* 1460 (L_1)

При выяснении роли агглютининов в прикреплении клеток ризобий к корням проростков гороха использовали изотопный метод. Результаты проведенных экспериментов показали, что клетки ризобий адсорбировались на корнях проростков гороха. Было замечено, что предварительная обработка корней агглютинином (R_1) *leguminosarum* 252 приводила к уменьшению адсорбированных бактерий на корнях гороха. В контрольных вариантах при обработке корней BSA, конканавалином (ConA), лектином *Bacillus polymyxa* 1460 ингибирования прикрепления ризобий к корням гороха не наблюдалось (рис. 4).

Таким образом, экспериментально показано, что агглютинины ризобий расположенные на внешней мембране, выполняют роль адгезинов в процессе прикрепления бактерий к корням растений. Подтверждают это и эксперименты проводимые с мутантными клетками.

Изучение изотопным методом прикрепления клеток мутантного штамма дефектного по геагглютинирующей активности к корням гороха показали, что, как и клетки родительского штамма, они также адсорбировались на корнях, однако количество их было в 2,6 раза меньше, чем клеток родительского штамма (табл. 1). Отсутствие агглютинирующей активности у клеток ризобий, как оказалось, сказывалось на их прикреплении к корням растений, что

Таблица
Количество клеток *R. leguminosarum* 252 и *R. leguminosarum* 252/7, прикрепившихся к корням проростков гороха

Штаммы	Количество прикрепившихся клеток $M \pm m$	P
<i>R. leguminosarum</i> 252	$0,31 \times 10^5 \pm 0,05 \times 10^5$	–
<i>R. leguminosarum</i> 252/7	$0,12 \times 10^5 \pm 0,03 \times 10^5$	< 0,01

позволяет говорить о том, что в адгезивном процессе, наряду с различными поверхностными структурами бактерий и растений в прикреплении клеток ризобий к корням проростков гороха, важную роль играют и агглютинины, локализованные на клеточной поверхности этих бактерий.

4. Взаимодействие агглютининов ризобий с фракциями корней гороха

Участие агглютининов в проявлении адгезивных свойств бактерий позволило предположить определенную роль бактериальных лектинов в процессах межклеточных взаимодействий по отношению к растительным корням.

В связи с поиском возможных рецепторов со стороны макросимбионта мы изучали способность агглютининов – R_1 и R_2 взаимодействовать с фракцией экзокомпонентов (Фэ) и с мембранной фракцией (Фм) корней гороха.

Проведенные исследования методом иммунодота показали, что агглюнины *R. leguminosarum* 252 взаимодействуют как с фракцией экзокомпонентов, так и с мембранной фракцией корней проростков гороха.

Дальнейшими экспериментами были выявлены белки фракций проростков корней гороха, ответственные за связывание с агглютинами *R. leguminosarum* 252 (рис. 5, 6).

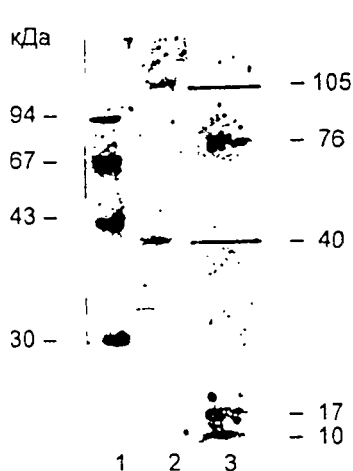


Рис. 5 Белки фракции экзокомпонентов корней проростков гороха, взаимодействующие с агглютинами *R. leguminosarum* 252.

1 – белки-маркеры: фосфорилаза (94 кДа), BSA – (67 кДа), овальбумин (43 кДа), карбангидраза (30 кДа)

2 – белки фракции, взаимодействующие с R_1 .

3 – белки фракции, взаимодействующие с R_2

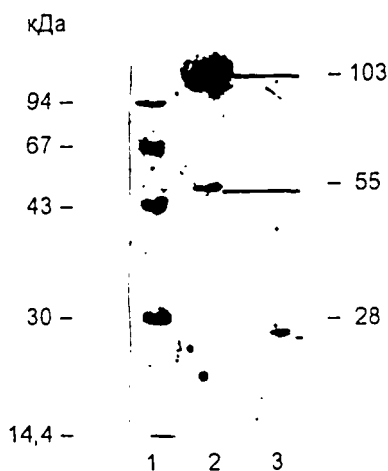


Рис. 6 Белки мембранной фракции корней проростков гороха, взаимодействующие с агглютинами *R. leguminosarum* 252.

1 – белки-маркеры: фосфорилаза (94 кДа), BSA – (67 кДа), овальбумин (43 кДа), карбангидраза (30 кДа), L-лактальбумин (14,4 кДа)

2 – белки фракции, взаимодействующие с R_1 .

3 – белки фракции, взаимодействующие с R_2

В результате проведенных опытов было выявлено, что из фракции экзокомпонентов с R_1 взаимодействовали белки с молекулярными массами 40 и 105 кДа; с R_2 – 10, 17, 76 кДа. Из мембранной фракции с R_1 взаимодействовали белки с молекулярными массами 55, 103 кДа; с R_2 – 28 кДа.

Мы полагаем, что способность бактериальных агглютининов взаимодействовать с растительными белками может приводить к образованию ассоциативных связей (мостиков) между растением-хозяином и микросимбионтом.

5. Взаимодействие агглютининов ризобий с лектинами корней гороха и пшеницы

Симбиотические взаимодействия между бобовыми растениями и ризобийными клетками изучаются давно, и долгое время существовала точка зрения, что клетки ризобии не способны к успешному взаимодействию с поверхностью однодольных растений. И только в последнее время появились немногочисленные публикации, показывающие отсутствие узкой специфичности у ризобий, и роль поверхностных белков в этом взаимодействии (Smit G., Logman T. et al., 1989). Smit с соав. (Smit G., Kijne J. et al., 1989) считают, что белок рикадгезин, локализованный на поверхности бактерий семейства *Rhizobiaceae* и ответственный за первый этап прикрепления к кончику корневого волоска бобовых растений, принимает участие в специфическом прикреплении к кончикам корневых волосков однодольных растений – пшеницы, ячменя.



Рис. 7 Взаимодействие агглютининов *R. leguminosarum* 252 R_1 (a), R_2 (b) с лектином корней гороха и R_1 (c), R_2 (d) с лектином корней пшеницы

Наши исследования также показали возможность взаимодействия ризобийных агглютининов как с лектином растения-хозяина (гороха), так и с лектином пшеницы (рис. 7).

Вышеизложенные сведения указывают на то, что взаимодействие между растением и бактериями на начальных этапах инфицирования необходимо рассматривать как многоступенчатый процесс, состоящий из серии чередующихся взаимодействий, которые определяются не только узнающей способностью растений, но и бактерий.

6. Изучение влияния агглютининов *R. leguminosarum* 252 на активность некоторых гидролитических ферментов растительной клетки

Физиологическая роль бактериальных лектинов, как показывают работы последних лет, не сводится только к функциям адгезинов. В литературе встречаются сведения о взаимодействии лектинов с ферментами.

При формировании бобово-ризобияльного симбиоза, как известно, одним из важнейших этапов является проникновение ризобий в инфекционную нить. Условием проникновения является размягчение стенок корневых волосков бобовых растений (Ljunggren H. et al., 1961; Fahraens G. et al., 1959). Электронно-микроскопические исследования позволили обнаружить четкие зоны гидролиза клеточной стенки с адсорбированными ризобиями в месте инфекции (Callaham D.A. et al., 1981).

Агглютинины ризобий как было нами ранее показано (Karpunina L.V. et al., 1997), способны уменьшать в различной степени активность ряда гидролитических ферментов в самой бактериальной клетке.

Вполне возможно, что при взаимодействии бактериальных клеток с бобовыми, агглютинины ризобий, локализованные на поверхности наружной мембраны бактерий, могут функционировать как эффекторы некоторых гидролитических ферментов и в растительной клетке.

Проведены исследования по изучению влияния агглютининов ризобий на β -глюкозидазу и протеолитическую активности корней проростков гороха (табл. 2).

Таблица 2

Влияние агглютининов *R. leguminosarum* 252 на активность гидролитических ферментов корней проростков гороха

Ферменты	Контроль	Опыт			
		R ₁	P	R ₂	P
		M \pm m		M \pm m	
протеолитические (мг ала/мин/мг)	0,012 \pm 0,0018	0,022 \pm 0,0023	<0,01	0,020 \pm 0,0024	<0,05
β -глюкозидаза (мМ/мин/мг)	0,003 \pm 0,0004	0,006 \pm 0,0005	<0,001	0,005 \pm 0,0003	<0,001

Как видно из приведенных в таблице экспериментальных данных, агглютинины *R. leguminosarum* 252 увеличивали активность β -глюкозидазы и суммарную протеолитическую активность корней проростков гороха. Таким образом, не исключается возможность того, что агглютинины ризобий, находящиеся на поверхности ризобияльных бактерий, являются своеобразными

активаторами некоторых гидролитических ферментов растительной клетки тем самым способствуя проникновению ризобияльной клетки в ткани растения при формировании бобово-ризобияльного симбиоза.

7. Изучение влияния агглютининов *R. leguminosarum* 252 на активность дегидрогеназ растительной клетки

Формирование бобово-ризобияльного симбиоза предусматривает структурное и функциональное взаимодействие бактериальной и растительной клеток. Способность агглютининов ризобий взаимодействовать с белками мембранной фракции клеток корней проростков гороха позволило нам предположить, что возможно агглютинины ризобий способны оказывать какое-то влияние на функциональное состояние мембраны растительной клетки. Одним из критериев, характеризующих состояние мембранного аппарата растительной клетки, может являться определение активности некоторых мембранно-связанных дыхательных ферментов, например, дегидрогеназ (табл 3).

Определение активности малат-, лактат-, НАДН-дегидрогеназ в корнях проростков гороха показало, что инкубация корней с агглютинами как с R_1 так и с R_2 не приводит к заметному изменению активности этих ферментов. Полученные данные указывают на отсутствие каких-либо действий агглютининов ризобий на эти ферменты.

Таблица 3

Влияние агглютининов *R. leguminosarum* 252 на активность дегидрогеназ корней проростков гороха

Ферменты	Контроль $M \pm m$	Опыт			
		R_1	P	R_2	P
		$M \pm m$		$M \pm m$	
Малатдегидрогеназа ($\Delta E/\text{мин}/\text{мг}$)	$0,022 \pm 0,004$	$0,020 \pm 0,004$	$>0,1$	$0,030 \pm 0,007$	$>0,1$
Лактатдегидрогеназа ($\text{мМ}/\text{мин}/\text{мг}$)	$0,007 \pm 0,0007$	$0,007 \pm 0,0004$	$>0,1$	$0,006 \pm 0,0005$	$>0,1$
НАДН-дегидрогеназа ($\Delta E/\text{мин}/\text{мг}$)	$0,002 \pm 0,0003$	$0,002 \pm 0,0004$	$>0,1$	$0,003 \pm 0,0005$	$>0,1$
Сукцинатдегидрогеназа ($\text{мМ}/\text{мин}/\text{мг}$)	$0,006 \pm 0,0008$	$0,020 \pm 0,005$	$<0,02$	$0,010 \pm 0,001$	$<0,02$

При исследовании ферментативной активности сукцинатдегидрогеназы в корнях проростков гороха инкубированных с R_1 и R_2 нами было обнаружено достоверное увеличение активности этого фермента. Активность сукцинат

дегидрогеназы в корнях проростков гороха инкубированных с R_1 была в 3,3 раза, с R_2 в 1,7 раза выше по сравнению с контролем.

Увеличение активности сукцинатдегидрогеназы может свидетельствовать об увеличении функциональной активности митохондрий, поскольку из литературных данных известно, что сукцинатдегидрогеназа является единственным из ферментов цикла трикарбоновых кислот локализованный на внутренней мембране митохондрий (Игамбердиев А.У. с соав., 1994). Данное действие агглютининов аналогично действию белков теплового шока, которые значительно увеличивали функциональную активность митохондрий при действии высоких температур на растение (Войников В.К. с соав., 1988).

ВЫВОДЫ

1. С поверхности почвенных азотфиксирующих бактерий *R. leguminosarum* 252 выделены два агглютинина с молекулярными массами 47 и 45 кДа, являющиеся по своей природе гликопротеинами. Аминокислотный состав характеризуется большим содержанием кислых аминокислот и отсутствием цистина. В состав углеводной части агглютининов входят глюкоза, манноза, галактоза и глюкозамин.
2. Показано, что агглютинины *R. leguminosarum* 252 принимают участие в прикреплении бактерий к корням гороха. Доказательством участия агглютининов ризобий в качестве адгезинов являются исследования проводимые с клетками мутантного штамма, дефектного по гемагглютинирующей активности. Изотопным методом выявлено снижение количества прикрепившихся мутантных клеток в 2,6 раза по сравнению с клетками родительского штамма.
3. Обнаружено взаимодействие агглютининов *R. leguminosarum* 252 с фракцией экзокомпонентов и мембранной фракцией корней проростков гороха, выявлены растительные белки, ответственные за связывание с бактериальными агглютинами.
4. Установлено, что агглютинины ризобий обладают способностью связываться не только с лектином растения-хозяина, но и с лектином пшеницы.
5. Впервые показано, что агглютинины *R. leguminosarum* 252 оказывают влияние на активность гидролитических ферментов и маркерных мембранных дегидрогеназ. В корнях проростков гороха, инкубированных с агглютинами, обнаружено достоверное увеличение протеолитиче-

ской и β -глюкозидазной активностей и значительное возрастание активности сукцинатдегидрогеназы растительной клетки.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Карпунина Л.В., Никитина В.Е., Колтунова Е.Ф., Косенко Л.В., Пацева М.А., Чернева И.Н. Взаимодействие агглютинина *Rhizobium leguminosarum* 252 с ауто- и растительными рецепторами // Микробиологический журнал, 1995, т.57, №1. С.64-70.
2. Карпунина Л.В., Савенкова Н.Н., Владимировна М.В., Колтунова Е.Ф., Никитина В.Е. Агглютинины *Rhizobium leguminosarum* и их роль во взаимодействии с растениями // Известия РАН. Серия биологическая 1996, № 6, С.698- 704.
3. Karpunina L.V., Pronina O.A., Soboleva E.F., Nikitina V.E. Study of the functions of Rhizobium agglutinins // Program Abstr. 2nd European Nitrogen Fixation Conference & NATO. Advanced Research Workshop. September 8-13, 1996, Poznan, Poland, P. 137.
4. Соболева Е.Ф., Карпунина Л.В. Участие агглютининов *Rhizobium leguminosarum* 252 в адгезивном процессе // "Проблемы общей биологии и прикладной экологии" Сборник трудов молодых ученых. Под. ред В.Г. Шляхтина, СГУ. Вып. №1, 1997. С.13-15.
5. Соболева Е.Ф., Карпунина Л.В., Никитина В.Е. Влияние белков-агглютининов *Rhizobium leguminosarum* 252 на активность сукцинатдегидрогеназы корней гороха // Тезисы стендовых сообщений. Второй съезд Биохимического общества РАН. 19-23 мая 1997, Москва. С.234.
6. Karpunina L.V., Soboleva E.F., Pronina O.A. Study of the effect of *Rhizobium leguminosarum* 252 agglutinins on the activities of certain hydrolytic enzymes // Interlec-17. 17th International Lectin Meeting Würzburg (Germany), September 24-27, 1997. P. 16.
7. Карпунина Л.В., Пономарева Е.Г., Соболева Е.Ф., Никитина В.Е. Изучение бактерицидных и фунгицидных свойств белков-агглютининов (лектинов) почвенных азотфиксирующих бактерий // Биотехнология 1997. №3. С.10-13.