

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет

На правах рукописи

Лазарева Екатерина Алексеевна

Лектины оболочки пыльцевого зерна *Nicotiana tabacum* L.
и их роль в активации прорастания

Специальность 03.00.12 — физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2009

Работа выполнена на кафедре физиологии растений Биологического факультета
Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Ермаков Игорь Павлович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Ковалёва Лидия Валентиновна

кандидат биологических наук, доцент

Глазунова Клавдия Павловна

Ведущая организация:

**Главный Ботанический сад имени Н.В. Цицина
Российской Академии Наук**

Защита состоится 11 декабря 2009 г. в 15.30 на заседании Диссертационного совета Д 501.001.46 при Московском Государственном Университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, к. 12, Биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

Факс: (495)939-43-09.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «_____» «_____» 2009 года

Учёный секретарь

Диссертационного совета,

Кандидат биологических наук



М.А. Гусаковская

Актуальность. В современных исследованиях механизмов регуляции развития растительных клеток большое внимание уделяют сигнальным системам, которые обеспечивают запуск морфогенетических программ внеклеточными лигандами (Hiscock, Allen, 2008). Поведение мужского гаметофита покрытосеменных растений, в том числе на этапе его перехода в активное физиологическое состояние в прогамную фазу оплодотворения, включает подобные механизмы. При этом важную роль играют белки и пептиды, которые диффундируют из пыльцевого зерна в окружающую среду. Они участвуют в процессах взаимодействия пыльцевых зёрен друг с другом и с клетками рыльца, но вместе с тем с помощью таких лигандов вегетативная клетка и пыльцевая трубка могут осуществлять мониторинг своего состояния и готовности к выполнению своих функций.

Особый класс белков, которые могут выступать в качестве внеклеточных лигандов, составляют лектины — белки, специфически и обратимо взаимодействующие с углеводными детерминантами без их модификации. Исследования последних лет, проведенные на клетках животных, показали, что лектины участвуют в контроле внутриклеточного транспорта и эндоцитоза, регулируют процессы адгезии (межклеточные и клетки к её матриксу), узнавания и миграции клеток, осуществляют позитивный и негативный контроль ростовых процессов и тем самым контролируют дифференциацию тканей и органов (Gabijs et al., 2004). Быстрое накопление знаний в области исследования лектинов животных привело к формированию концепции "углеводного кода". Сформулирована новая парадигма поливалентных белок-углеводных взаимодействий с образованием супрамолекулярных ансамблей, осуществляющих трансдукцию сигналов (Garner, Baum, 2008).

Вопрос о роли лектинов в регуляции прорастания пыльцевого зерна до настоящего времени не решён, хотя уже давно обсуждается в литературе (Southworth, 1975; Dumas et al., 1984). Данные о влиянии экзогенных лектинов на прорастание немногочисленны и противоречивы. Вопрос об эндогенных лектинах пыльцевого зерна почти не изучен. Есть сведения о лектинах, прочно связанных с оболочкой (Carratu, Giannattasio, 1990; Ковалева и др., 1999). Однако с точки

зрения участия в запуске прорастания, наибольший интерес представляют подвижные белки внеклеточного матрикса, которые могли бы взаимодействовать с гликопротеинами плазмалеммы.

Цели и задачи исследования. Цель работы — выявить водорастворимые лектины оболочки и установить их роль в регуляции активации и прорастания пыльцевого зерна на примере *Nicotiana tabacum* L.

Для её достижения были поставлены следующие **задачи**.

- Изучение действия экзогенного лектина конканавалина А (Кон А) на активацию и прорастание пыльцы.
- Изучение роли водорастворимых компонентов оболочки (диффузатов) пыльцевого зерна табака в регуляции запуска его прорастания.
- Выявление лектинов в составе диффузатов оболочки методом гемагглютинации.
- Выделение лектинов из диффузатов оболочки пыльцевого зерна методом аффинной хроматографии.
- Изучение действия выделенных лектинов на запуск активации и прорастание пыльцевого зерна.

Научная новизна. Впервые обнаружено действие экзогенного лектина на величину мембранного потенциала и внутриклеточный рН растительной клетки. Установлена взаимосвязь между прорастанием пыльцевого зерна и гиперполяризацией плазмалеммы его вегетативной клетки.

Показано, что диффузаты оболочки пыльцевого зерна включают лектины, существенно влияющие на активацию и прорастание пыльцы. Эти эндогенные регуляторные лектины впервые выделены и охарактеризованы.

Практическая значимость работы. Представленная работа является фундаментальным исследованием сложной системы регуляции прорастания пыльцевого зерна. Полученные данные могут быть использованы для разработки подходов к оптимизации условий опыления у сельскохозяйственных растений

с целью повышения их продуктивности. Результаты работы могут быть использованы в курсах лекций по физиологии и эмбриологии растений.

Апробация работы. Материалы диссертации обсуждались на семинарах кафедры физиологии растений, доложены на международных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2003, 2004, 2006); на V и VI съездах общества физиологов растений (Пенза, 2003; Сыктывкар, 2007); на IV международной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2005); на I международной школе для молодых учёных «Эмбриология и Биотехнология» (Санкт-Петербург, 2005); на XIX Международном конгрессе по половому размножению растений «From gametes to genes» (Будапешт, 2006); на II и III международных школах для молодых учёных «Эмбриология, Генетика и Биотехнология» (Уфа, 2007; Саратов, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего работ (из них на иностранных языках). Работа изложена на страницах, содержит в экспериментальной части 3 таблицы и 15 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрена роль пептидов и белков оболочки пыльцевого зерна в его прорастании и во взаимодействии пыльцевых зёрен между собой и с клетками пестика. Обсуждены функции лектинов у растений. Проанализированы работы, посвященные изучению влияния лектинов на прорастание пыльцы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись пыльцевые зёрна табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana SR1. Растения выращивали в климатической камере (25°C, 16-часовой световой день). Собранную пыльцу хранили при –20°C. Жизнеспособность пыльцевых зёрен контролировали, окрашивая их флуоресцеиндиацетатом.

Диффузаты (водорастворимые компоненты) оболочки пыльцевых зёрен получали, инкубируя пыльцевые зёрна, предварительно промытые гексаном, в среде прорастания (СП), которая включала 1,6 мМ H_3BO_3 , 3 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,8 мМ MgSO_4 и 1 мМ KNO_3 в 25 мМ Mes-Трис-буфере или 20 мМ Трис- HCl -буфере (рН 5,9). Продолжительность инкубации составляла 15 мин при 0°C. После чего отделяли диффузаты от клеток центрифугированием и последующей фильтрацией через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Контрольные измерения активности цитозольного фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (спектрофотометрия при $\lambda = 340$ нм) подтвердили отсутствие белков цитозоля в составе диффузатов.

Метод гемагглютинации с эритроцитами кролика использовали для выявления лектиновой активности. Реакцию агглютинации проводили в иммунологических плашках с U-образными лунками. Лектиновую активность определяли визуально по степени агглютинации. Для установления углеводной специфичности лектинов диффузатов пробы предварительно инкубировали с тестируемым углеводом, после чего к пробе добавляли эритроциты.

Выделение лектинов из диффузатов проводили на колонках методом аффинной хроматографии на двух сорбентах: сефадексе G-200 и α ,D-метилманнопиранозиде, иммобилизованном на агарозе (ММП-Агароза). Элюцию белков, связавшихся с сефадексом, проводили при рН 2,0 (30 мМ HCl). Белки, связавшиеся с ММП-Агарозой, элюировали 0,5 М ММП. Концентрацию белка во фракциях и диффузатах определяли флуориметрически с использованием красителя на белок NanoOrange или метода дот-блот с окрашиванием белков, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране, кумасси R-350.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (ДДС-ПААГ) проводили в соответствии с методом Лэммли (Laemmli, 1970). Полученные гели окрашивали 0,4 % раствором AgNO_3 . Анализ гелей проводили с использованием программы OneDscan.

Пыльцевые зёрна культивировали в жидкой СП, которая была дополнена 10 % сахарозой. Для выявления действия диффузатов и выделенных лектинов оболочки на активацию и прорастание пыльцы в качестве тест-культуры использовали суспензии с низкой концентрацией клеток (770 кл./мл). Такие культуры характеризуются низким прорастанием и способны реагировать на действие ростовых факторов стимуляцией прорастания (Chen et al., 2000). В качестве контроля использовали культуру с высокой их концентрацией (10^5 кл./мл). Действие конканавалина А на пыльцу изучали в культуре с концентрацией 10^5 кл./мл. Число проросших пыльцевых зёрен оценивали через 1 ч после гидратации.

Величину внутриклеточного рН и мембранный потенциал вегетативной клетки пыльцевого зерна определяли методами количественной флуоресцентной микроскопии. Пыльцевые зёрна окрашивали потенциал-зависимым анионным красителем DiBAC₄(3) (бис-(1,3-дибутилбарбитуровой кислоты) триметин оксонол) в течение 10 мин. Расчёт абсолютного значения мембранного потенциала (E) проводили по формуле $E = (RT/F) \cdot \ln(I/I_0)$, где I – интенсивность флуоресценции пыльцевого зерна в исследуемой пробе; I_0 – интенсивность флуоресценции клеток, полностью деполяризованных посредством фиксации (по Emri et al., 1998 с модификациями). Для определения величины внутриклеточного рН использовали краситель-индикатор рН BCECF-AM (ацетоксиметилового эфира 2',7'-бис-(2-карбоксиэтил)-5(и-6)-карбокси-флуоресцеин). Оценивали отношение (R) интенсивностей рН-зависимой ($\lambda_{\text{возб}} = 494$ нм) к рН-независимой ($\lambda_{\text{возб}} = 445$ нм) флуоресценции окрашенных пыльцевых зёрен. Калибровочную кривую, связывающую величину R и рН, строили, используя раствор BCECF в буфере с диапазоном значений рН от 6,0 до 7,6 (Матвеева и др., 2003).

Цитологический анализ проводили с использованием моторизованного микроскопа AxioPlan2 imaging MOT, оснащенного цифровой камерой AxioCam HRC. Получение и анализ изображений осуществляли с помощью пакета программ AxioVision 4.5. Часть данных получена на микроскопе Leitz-Orthoplan, снабжённом блоком PLOEMOPAK.

Статистическая обработка данных. Все опыты проводили не менее чем в пяти повторностях. Достоверность различий рассчитывали с помощью t -критерия Стьюдента ($p < 0,01$ или $p < 0,05$). На рисунках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Действие Кон А на прорастание и активацию пыльцевого зерна

Пыльцевые зёрна инкубировали с экзогенным лектином Кон А в течение 10 мин, после чего их отмывали и культивировали в среде без Кон А. Такое кратковременное воздействие Кон А на начальном этапе активации стимулировало прорастание пыльцевых зёрен (**Рис. 1**). С увеличением концентрации Кон А его эффект постепенно возрастал. Данный эффект был обусловлен специфическим связыванием лектина с углеводными детерминантами, поскольку конкурентный сахар 0,1 М α ,D-метил-маннопиранозид (ММП) подавлял действие Кон А (100 мкг/мл) на прорастание на 90 %.

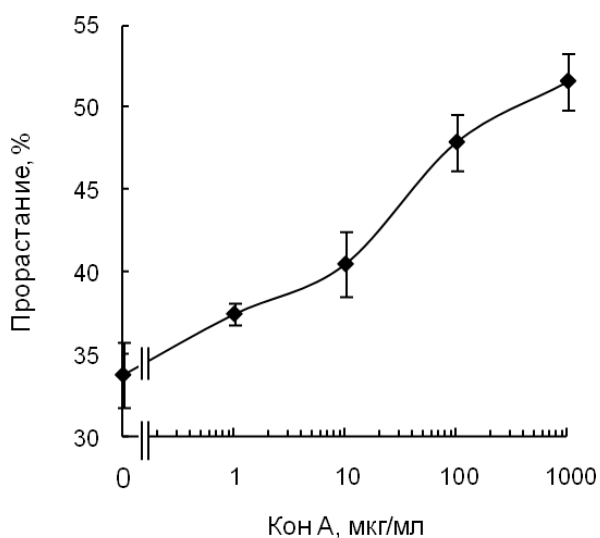


Рис. 1. Влияние Кон А на прорастание пыльцевых зёрен табака.

Таким образом, стимулирующее действие Кон А на прорастание реализуется, по-видимому, на начальном этапе активации. Этот вывод был подтверждён при изучении действия Кон А на такие показатели активации пыльцевого зерна, как гиперполяризация плазмалеммы и увеличение внутриклеточного рН, которые, наряду с интенсификацией дыхания, реорганизацией внутриклеточных структур, активацией ферментных систем и транспортных процессов, определяют функциональную активацию клетки при выходе из состояния покоя (Матвеева и др. 2003; Брейгина и др., 2009).

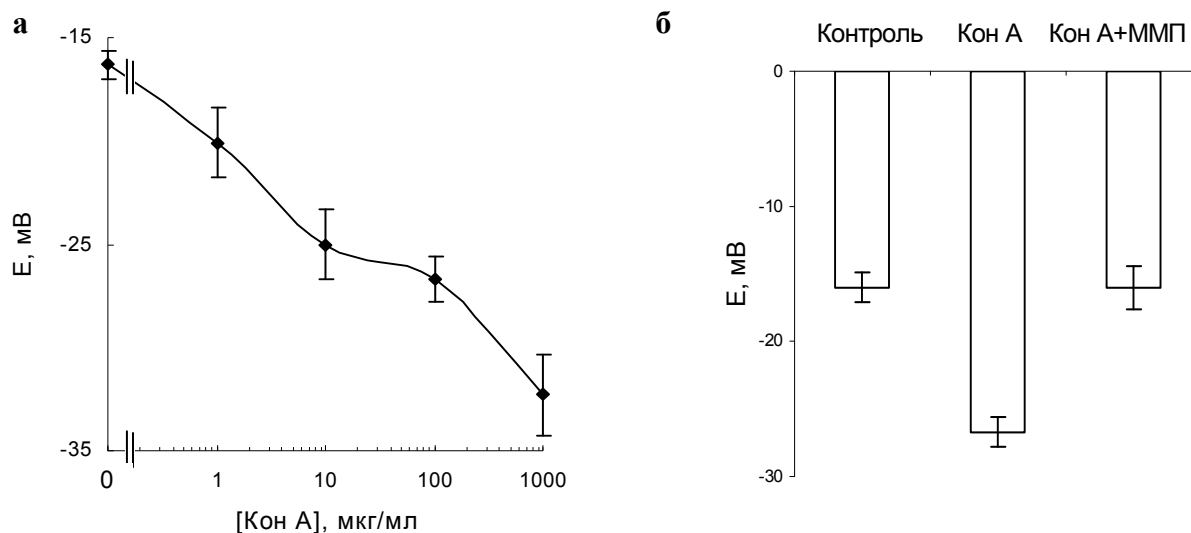


Рис. 2. Влияние Кон А на величину мембранного потенциала вегетативной клетки пыльцевого зерна:

(а) гиперполяризация плазмалеммы вегетативной клетки пыльцевого зерна в зависимости от концентрации Кон А;

(б) подавление эффекта Кон А (100 мкг/мл) в присутствии ММП (0,1 М).

Пыльцевые зёрна культивировали в присутствии Кон А в течение 10 мин, одновременно окрашивая их потенциал-зависимым флуоресцентным красителем DiBAC₄(3). Полученные препараты микроскопировали. Показано, что Кон А вызывает гиперполяризацию плазмалеммы (**Рис. 2 а**).

С увеличением концентрации Кон А происходило постепенное снижение мембранного потенциала вплоть до -32 мВ при концентрации Кон А 1 мг/мл, что в 2 раза превышает значение в контроле (-16 мВ). Изменения мембранного потенциала в зависимости от концентрации Кон А (**Рис. 2 а**) зеркально отражали влияние этого лектина на прорастание (**Рис. 1**): коэффициент корреляции между величиной мембранного потенциала и числом проросших пыльцевых зёрен $r = -0,96$ ($p < 0,01$).

Эффект Кон А был специфичным, поскольку присутствие в среде инкубации 0,1 М ММП полностью снимало его влияние на мембранный потенциал (**Рис. 2 б**).

Аналогичным образом нами было изучено влияние кратковременного воздействия Кон А (5 мин) на величину внутриклеточного рН вегетативной клетки пыльцевого зерна, которую оценивали с помощью красителя индикатора рН

ВСЕСФ-АМ. Кон А (100 мкг/мл) вызывал возрастание этой величины на 0,3 ед. по сравнению с контролем (**Рис. 3**). ММП (0,1 М) и в этом случае полностью подавлял действие Кон А.

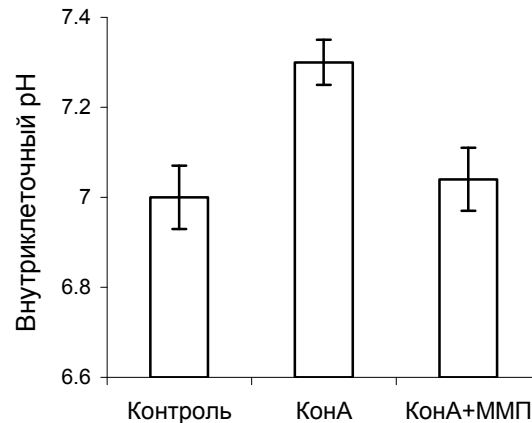


Рис. 3. Влияние Кон А (100 мкг/мл) на величину внутриклеточного рН вегетативной клетки пыльцевого зерна и подавление эффекта Кон А в присутствии ММП (0,1 М).

Таким образом, проведённые эксперименты показали, что экзогенный глюкозо/маннозо-специфичный лектин Кон А стимулирует активацию и прорастание пыльцевого зерна табака. Эти результаты хорошо соотносятся с данными о том, что Кон А вызывает активацию клеток животных, наиболее ранними проявлениями которой являются гиперполяризация плазмалеммы (Tatham, Delves, 1984) и увеличение внутриклеточного рН (Hesketh et al., 1985). Рассмотренные результаты демонстрируют участие в запуске прорастания пыльцы гликоконъюгатов плазмалеммы, с которыми могут взаимодействовать лектины — экзогенный Кон А или гипотетические эндогенные лектины оболочки. Выявление этих лектинов стало целью нашей дальнейшей работы.

2. Действие диффузатов оболочки на активацию и прорастание пыльцевого зерна

Анализ действия диффузатов на тест-культуры с низкой концентрацией пыльцевых зёрен выявил их влияние на прорастание (**Рис. 4, 5**). В первой серии опытов диффузаты присутствовали в среде на протяжении всего периода инкубации (1 ч) (**Рис. 4**). При этом был обнаружен выраженный оптимум

количества диффузатов в среде (26 мкг белка/мл), при котором они эффективно стимулировали прорастание. В дальнейшем мы использовали диффузаты в концентрации от 20 до 30 мкг белка/мл. Высокие концентрации диффузатов в среде (100 мкг белка/мл) практически полностью подавляли прорастание.

Таким образом, в составе диффузатов из оболочек пыльцы присутствуют физиологически активные вещества. Предположив, что их действие на прорастание реализуется на начальном этапе активации пыльцевого зерна, мы использовали ранее разработанные в модельных экспериментах с Кон А подходы для проверки этой гипотезы.

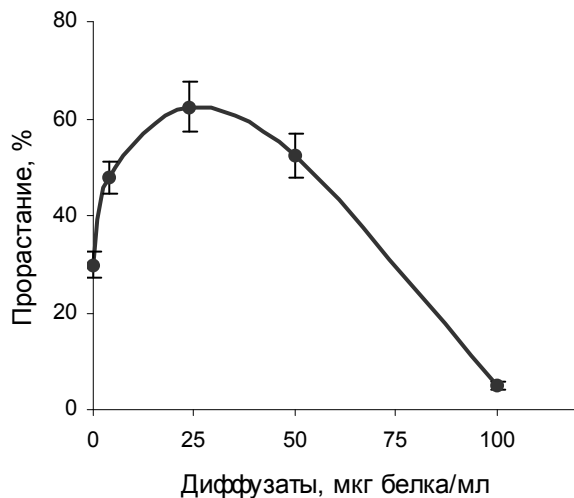


Рис. 4. Влияние диффузатов оболочек на прорастание пыльцевых зёрен. Длительное воздействие диффузатами (1 ч).

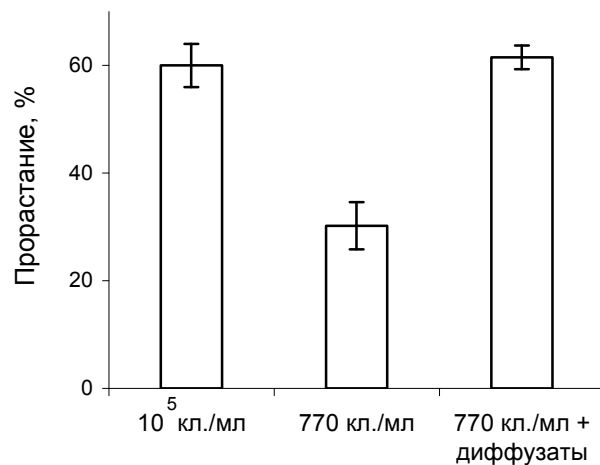


Рис. 5. Действие диффузатов оболочки на прорастание пыльцевых зёрен. Кратковременное воздействие диффузатами (10 мин).

Пыльцевые зёрна культивировали с диффузатами (21 мкг белка/мл) в течение 10 мин, после чего их переносили в среду без диффузатов. Из результатов, представленных на **рисунке 5**, видно, что такое воздействие на тест-культуру приводило к двукратному увеличению числа проросших пыльцевых зёрен, тем самым достигался уровень прорастания в контроле с высокой концентрацией клеток. Таким образом, и кратковременное (**Рис. 5**), и длительное (**Рис. 4**) воздействие диффузатами стимулировало прорастание пыльцевых зёрен в равной мере. Из этого следует, что стимулирующий эффект

диффузатов на прорастание определяется их действием на ранние стадии активации.

Ранее на пыльце петунии уже наблюдали стимулирующий эффект диффузатов на прорастание пыльцы (Kirby, Vasil, 1979). Полученные нами данные подтверждают эти данные и уточняют время действия диффузатов — это ранний этап активации пыльцевого зерна. Вместе с тем, мы можем исключить из рассмотрения белки трифины, поскольку в наших опытах трифина была удалена до начала эксперимента.

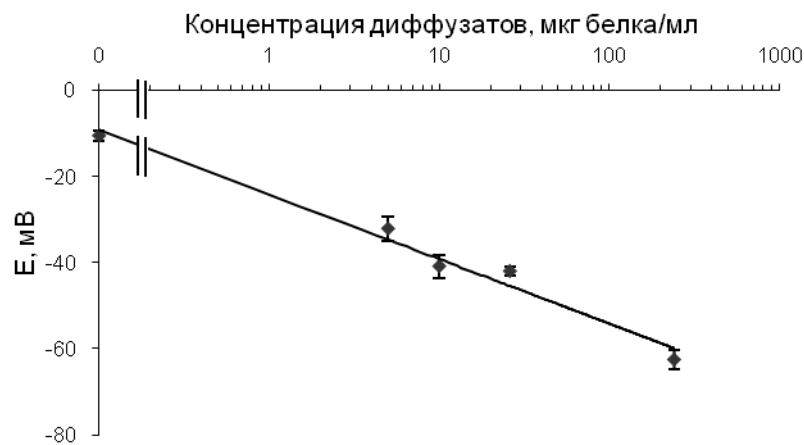


Рис. 6. Влияние диффузатов оболочки на величину мембранного потенциала вегетативной клетки пыльцевого зерна.

Для выявления действия диффузатов на величину мембранного потенциала плазмалеммы вегетативной клетки их добавляли в тест-культуру пыльцевых зёрен одновременно с потенциал-зависимым красителем DiBAC₄(3). После 10 мин инкубации обнаруживалась гиперполяризация плазмалеммы, степень которой росла с увеличением концентрации диффузатов, достигая -63 мВ при концентрации диффузатов 240 мкг белка/мл (**Рис. 6**). Стоит отметить, что диффузаты в концентрации более 100 мкг белка/мл практически полностью подавляли прорастание пыльцы (**Рис. 4**). Для того, чтобы ответить на вопрос, связано ли это с нарушением ионного гомеостаза, действием ингибиторов прорастания, присутствующих в составе диффузатов, или иными причинами, необходимы дополнительные исследования.

Таким образом, нами впервые получены данные, свидетельствующие о наличии в оболочке пыльцевого зерна регуляторных факторов, стимулирующих его активацию. Данные о действии диффузатов на величину мембранного потенциала плазмалеммы вегетативной клетки позволяют предполагать, что они могут напрямую или опосредованно модулировать работу её ион-транспортных белков.

Изменения мембранного потенциала строго контролируются клеткой и определяются активностью ион-транспортных систем плазмалеммы. Экзогенные лектины, в частности Кон А, способны влиять на ионные потоки и вызывать гиперполяризацию плазмалеммы клеток животных (Mahaut-Smith et al., 1991; Lai et al., 2003; Wang et al., 2006). В основе обусловленной действием Кон А и диффузатами гиперполяризации, возможно, лежат сходные механизмы регуляции, основанные на лектин-углеводных взаимодействиях. Обнаруженное в данной работе сходство эффектов Кон А и диффузатов позволяет предположить наличие в составе диффузатов лектинов, сходных с Кон А по углеводной специфичности и действию на прорастание пыльцы.

3. Выявление лектинов в диффузатах

Для выявления лектиновой активности диффузатов использовали общепринятый метод гемагглютинации, в основе которого лежит способность поливалентных лектинов взаимодействовать с гликанами на поверхности эритроцитов млекопитающих, в результате чего происходит их «склеивание». Оседая на дно U-образной лунки, такие сшитые лектинами клетки формируют диффузное пятно, тогда как в отсутствие лектина клетки собираются в компактную точечную структуру.

Использование этого метода позволило выявить присутствие лектинов в диффузатах (**Табл. 1**). Эффект постепенно снижался по мере разведения пробы и полностью исчезал при концентрации 50 мкг белка/мл. Способность диффузатов агглютинировать эритроциты позволяет предполагать наличие в их составе поливалентных лектинов (моновалентные лектины не способны к агглютинации) (Gabius et al., 2004).

Агглютинирующую активность, наряду с лектинами, проявляют танины (в пыльце не обнаружены), некоторые фенолы, липиды и некоторые ионы двухвалентных металлов (Gabijs et al., 2004). Для того чтобы выявить возможный вклад в гемагглютинацию низкомолекулярных веществ, диффузаты фракционировали методом ультрафильтрации с порогом разделения 10 кДа. Было обнаружено, что низкомолекулярная компонента диффузатов не способна к агглютинации.

Табл. 1. Выявление лектиновой активности пыльцевых диффузатов в тесте гемагглютинации и обнаружение в их числе гликопротеинов, образующих комплекс с экзогенным лектином Кон А, неактивный в этом тесте.

Анализируемая проба	Концентрация белка в серии двукратных разведений диффузатов, мкг/мл					
	800	400	200	100	50	0
Диффузаты	+++	+++	++	+	—	—
Диффузаты + Кон А (5 мкг/мл)	+++	+++	++	—	+	+++

+++ — максимальная лектиновая активность, — — отсутствие агглютинации

Попытка выявить углеводную специфичность изучаемых лектинов, подобрав сахарид, способный подавить вызванную ими агглютинацию эритроцитов, не дала положительного результата. Мы исследовали действие ММП, глюкозы, арабинозы, галактозы, рамнозы, сахарозы, лактозы, раффинозы, взятых в концентрации 0,1 М, смеси двух сахаров (глюкоза и ММП), а также водорастворимого декстрана (50 мг/мл). Однако ни один из указанных углеводов не подавлял лектиновую активность диффузатов.

Отрицательные результаты определения углеводной специфичности можно объяснить присутствием в диффузатах нескольких лектинов с различной специфичностью или же тем, что эти лектины специфичны к сложным гликанам. Ранее были обнаружены прочно связанные с оболочками пыльцевого зерна лектины, которые существенно различались по углеводной специфичности. Некоторые из них специфически взаимодействовали с гликопротеинами (муцином, тиреоглобулином и фетуином) и не проявляли сродства к моно- и дисахаридам (Carratú, Giannattasio, 1990). Другие лектины были специфичны

к D-глюкозе и некоторым другим простым сахарам (Ковалева и др., 1999). Углеводную специфичность лектина, секретируемого пыльцевой трубкой табака, при тестировании моно- и дисахаридов установить не удалось (Ильченко, 1988).

Для последующей идентификации выявленных лектинов, а также для дальнейшей работы с ними важно знать, являются ли они гликопротеинами. Ответ на этот вопрос был получен в результате изучения взаимодействия диффузатов с Кон А, который прочно связывается гликанами гликопротеинов (Gabiuis et al., 2004). С этой целью к диффузатам добавляли Кон А и оценивали лектиновую активность полученной смеси (**Табл. 1**). В диапазоне концентраций диффузатов в пробах от 800 до 200 мкг белка/мл добавление Кон А не влияло на агглютинацию. Однако при разведении диффузатов до концентрации 100 мкг/мл агглютинирующая активность смеси снижалась. Это означает, что все лектины диффузатов связались с Кон А с образованием комплекса, неспособного агглютинировать эритроциты. При дальнейшем разведении пробы, как и следовало ожидать, проявлялась агглютинирующая способность Кон А. Полученные данные свидетельствуют о том, что выявленные в составе диффузатов лектины являются гликопротеинами, в состав которых входят остатки глюкозы и/или маннозы.

Эксперименты с очисткой диффузатов от гликопротеинов на колонке с Кон А, иммобилизованном на сефарозе 4В (Кон А-сефароза), подтвердили этот вывод. В результате связывания с Кон А диффузаты (200 мкг белка/мл), прошедшие через колонку, полностью теряли способность агглютинировать эритроциты (**Рис. 7**).

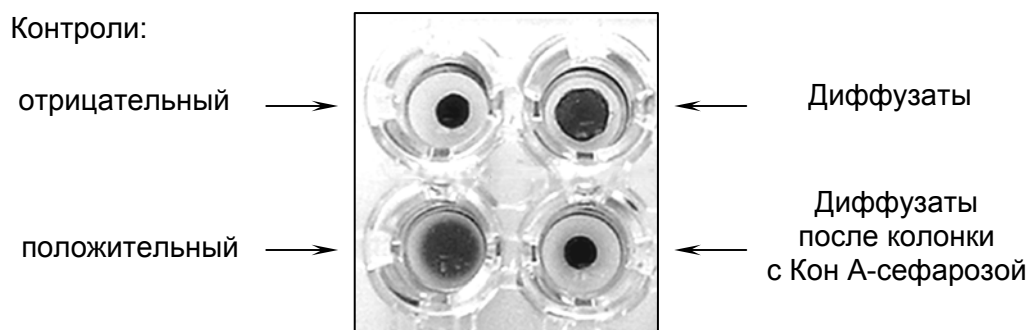


Рис. 7. Исследование агглютинирующей активности диффузатов, прошедших через колонку с Кон А-сефарозой. Отрицательный контроль на аутоагглютинацию – раствор 150 мМ NaCl (рН 7.0). Положительный контроль – Кон А (5 мкг/мл).

Таким образом, в результате анализа легковымываемых белков оболочки пыльцевого зерна обнаружены эндогенные поливалентные лектины, являющиеся гликопротеинами.

4. Выделение водорастворимых лектинов оболочки пыльцевого зерна методом аффинной хроматографии и анализ их действия на активацию и прорастание

Метод аффинной хроматографии позволяет осуществить быстрое выделение лектинов на углевод-презентирующих носителях, в том числе из неочищенного материала. В качестве аффинных сорбентов были выбраны сефадекс G-200 (декстран с низкой степенью сшивки) и ММП-Агароза (ММП, иммобилизованный на агарозе). Эти сорбенты часто применяют для выделения глюкозо/маннозо-специфичных лектинов (Gabiús et al., 2004; Bezerra et al., 2006).

Выделение лектинов на сефадексе G-200 и их анализ

В ходе процедуры выделения лектинов диффузаты наносили на колонку, после чего колонку промывали и элюировали связавшиеся белки. Предварительные эксперименты показали непригодность D-глюкозы (0,2 и 0,5 М) для элюции. Возможно, искомые лектины проявляют специфичность к более крупным олигосахаридным фрагментам в составе сефадекса. Декстран — высокомолекулярный гомополимер D-глюкозы с разнообразным количеством боковых цепей, присоединенных через α -1,2, α -1,3 или α -1,4 связи, что усложняет поиск конкурентного сахара. В таких случаях для элюции нередко используют растворы с низкими значениями pH (Gabiús et al., 2004). В настоящей работе белки, связавшиеся с сефадексом, элюировали 30 мМ HCl (pH 2,0).

Характерная кривая выделения лектинов представлена на рисунке 8 а. Лектины элюировались в виде одного пика. Их массовая доля составляла 4–5 % от общего количества белка, нанесённого на колонку. Таким образом, в оболочках 1 мг негидратированных пыльцевых зёрен содержится как минимум 0,02 мкг водорастворимых лектинов, проявляющих сродство к декстрану.

Электрофоретический анализ фракции выделенных лектинов в 11 % ДДС-ПААГ (Рис. 8 б) показал наличие в её составе пяти белков с молекулярными

массами 64, 58, 51, 50 и 35 кДа. Разнообразие белкового состава нефракционированных диффузатов иллюстрирует дорожка 1 на том же рисунке. Сопоставление этих двух белковых проб позволяет говорить о достаточно высокой избирательности очистки белков на сефадексе.

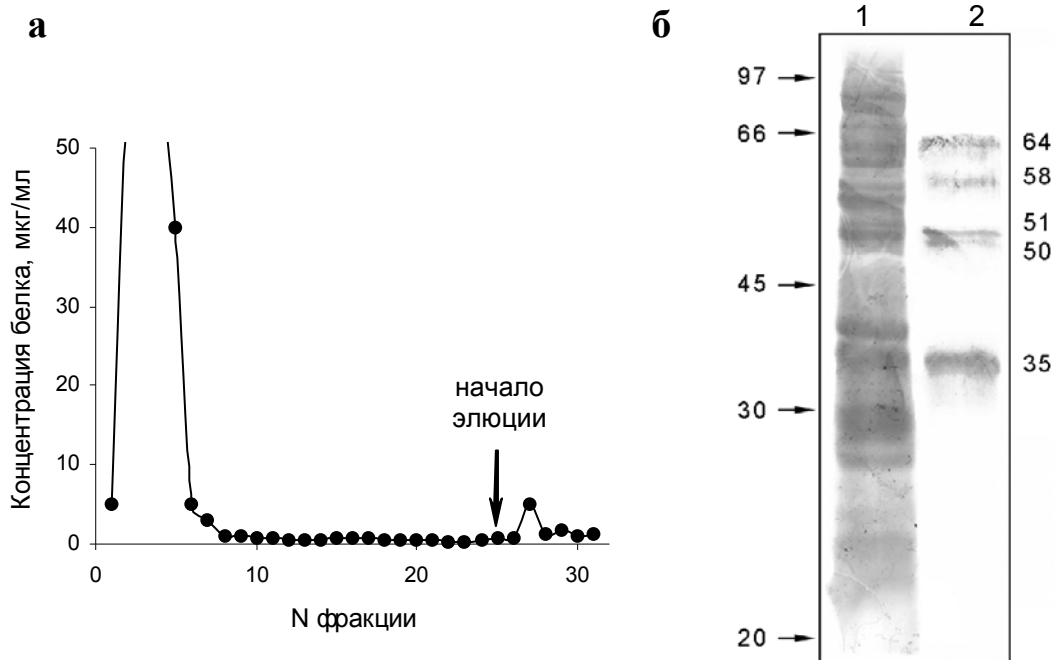


Рис. 8. Очистка лектинов, присутствующих в диффузатах оболочки пыльцевого зерна, с помощью сефадекса G-200:

(а) выход белковых фракций при аффинной хроматографии диффузатов;
 (б) электрофоретический анализ фракции выделенных лектинов; дорожка 1 – диффузаты; дорожка 2 – выделенные лектины (фракция № 27); справа указаны рассчитанные молекулярные массы лектинов (кДа); слева – положение белков-маркеров (кДа).

Анализ этой фракции показал, что очищенные на сефадексе белки при условии высокого их разведения агглютинируют эритроциты (Табл. 2). Возможно, это связано с тем, что в составе фракции элюируются лектины гликопротеиновой природы, способные к самоингибированию при высоких концентрациях. Эти данные свидетельствуют о том, что в результате очистки на сефадексе получены поливалентные лектины.

Табл. 2. Выявление лектиновой активности декстран-специфичных белков.

Анализируемая проба	Концентрация лектинов, мкг/мл				
	2	1	0,5	0,25	0,13
Декстран-специфичные лектины	—	—	—	++	—

+++ — максимальная лектиновая активность, — — отсутствие агглютинации

С использованием тест-культуры с низкой концентрацией клеток установлено, что белки, очищенные на сефадексе, способны стимулировать прорастание (**Рис. 9 а**) и влиять на величину мембранного потенциала вегетативной клетки (**Рис. 9 б**). Гиперполяризация плазмалеммы возрастала с увеличением концентрации белка в пробе.

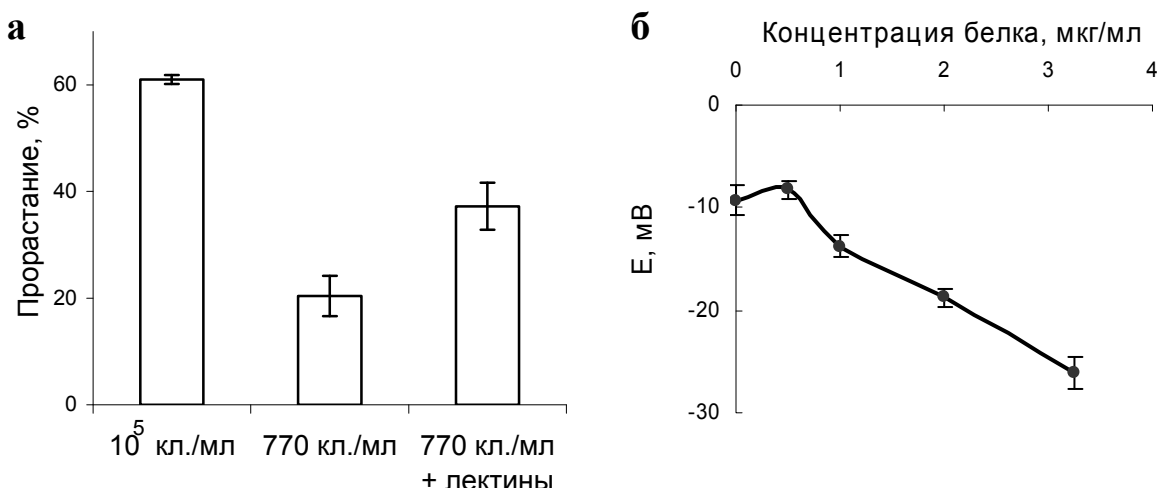


Рис. 9. Действие декстран-специфичных лектинов на прорастание пыльцевых зёрен (**а**) и величину мембранного потенциала вегетативной клетки пыльцевого зерна (**б**).

Выделение лектинов на колонке с ММП-Агарозой и анализ их действия на прорастание

В результате специфической элюции белков, связавшихся с ММП-Агарозой, с помощью 0,5 М ММП, была получена фракция лектинов, вышедших с колонки в виде одного пика (№ 32) (**Рис. 10 а**). Массовая доля этих маннозо-специфичных

лектинов по отношению ко всему внесённому на колонку белку составляла около 0,5 %.

Электрофоретический анализ данной лектиновой фракции в градиентном 8–25 % ДДС-ПААГ показал наличие в её составе 3 белков (**Рис. 10 б**, дорожка 2), молекулярные массы которых составляли 58, 69 и 74 кДа. Сравнивая белковый состав фракции, выделенной на сефадексе (**Рис. 8**), и фракции маннозо-специфичных лектинов (**Рис. 10**), следует отметить белок 58 кДа, возможно, общий для этих фракций, т.е. проявляющий сродство и к маннозе, и к декстрану.

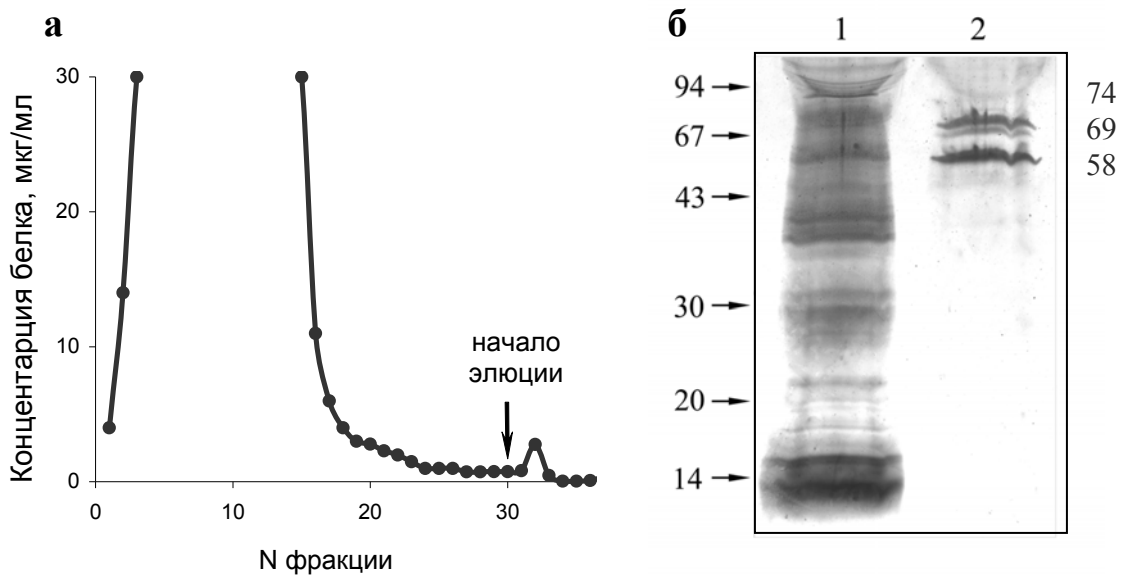


Рис. 10. Фракционирование диффузатов оболочки пыльцевого зерна методом аффинной хроматографии на колонке с ММП-Агарозой (**а**) и электрофоретический анализ маннозо-специфичных лектинов (**б**).

Дорожка 1 — диффузаты; дорожка 2 — фракция лектинов (№ 32).

Справа указаны рассчитанные молекулярные массы лектинов (кДа).

Слева — положение белков-маркеров (кДа).

Влияние маннозо-специфичных лектинов на прорастание пыльцевого зерна

Маннозо-специфичные лектины стимулировали прорастание пыльцы (**Рис. 11 а**). Как и нефракционированные диффузаты, они оказывали двухфазное действие на этот процесс. Однако концентрация белка, оптимальная для стимулирования прорастания, для диффузатов была в 100 раз больше, чем для

маннозо-специфичных лектинов (26 и 0,2 мкг белка/мл, соответственно) (Рис. 4 и 11 а). Эти лектины выступали как эффективный стимулирующий агент, увеличивая прорастание до 49 %, что сопоставимо с уровнем прорастания в культуре с высокой концентрацией клеток (62 %).

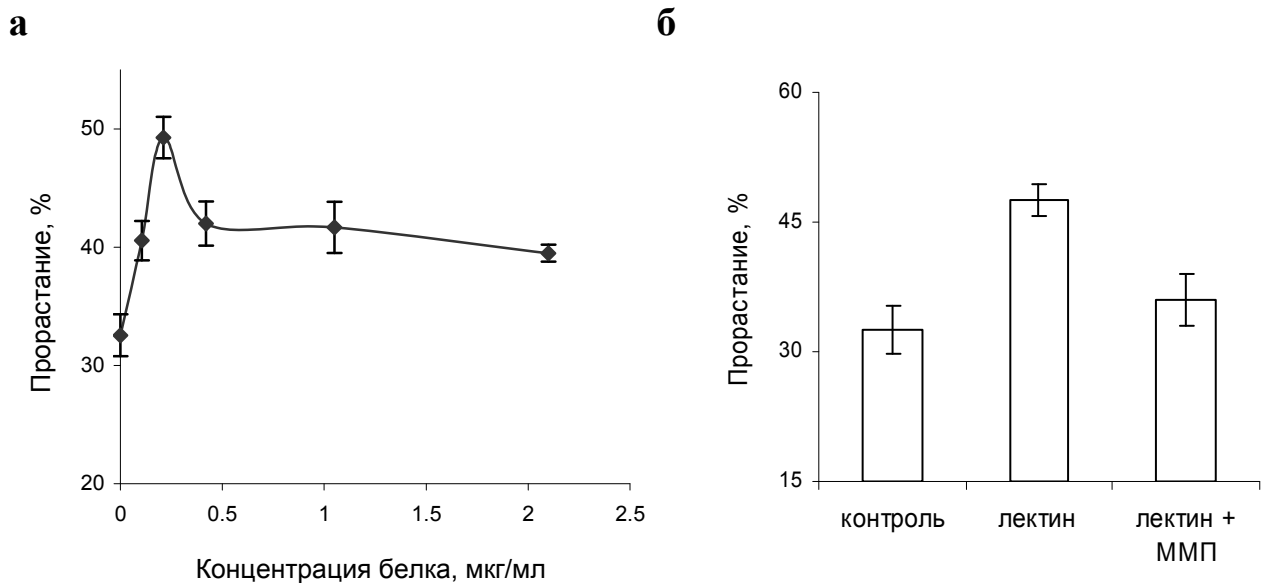


Рис. 11. Влияние маннозо-специфичных лектинов на прорастание пыльцевых зёрен в тест-культуре (а) и подавление эффекта лектинов в присутствии ММП (0,3 М) (б).

В экспериментах с предварительной инкубацией маннозо-специфичных лектинов (0,2 мкг/мл) в присутствии 0,3 М ММП было обнаружено блокирование их стимулирующего действия на прорастание пыльцы (Рис. 11 б). Это позволяет сделать вывод о том, что способность выделенных маннозо-специфичных лектинов стимулировать прорастание определяется их специфическим взаимодействием с соответствующими углеводными детерминантами, локализованными предположительно на поверхности плазмалеммы.

Механизм действия обнаруженных лектинов на активацию и прорастание пыльцы нуждается в дальнейшем изучении. Можно предположить, что взаимодействие подвижных лектинов оболочки пыльцевого зерна с плазмалеммой его вегетативной клетки модулирует работу ион-транспортирующих белков плазмалеммы или запускает сигнальные каскады, подобно тому, как это происходит в клетках животных (Hsu et al., 2009; Garner, Baum, 2008).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Более 100 лет прошло с момента открытия в семенах бобовых белков, способных агглютинировать эритроциты (Sharon, Lis, 2004). В настоящее время, в основном, благодаря исследованиям лектинов животных, представления об их функциональной значимости существенно расширились. Стала очевидной их роль в распознавании углеводных сигналов как эндогенной, так и экзогенной природы (Gabius et al., 2008). Однако роль белок-углеводных взаимодействий в физиологических процессах у растений по-прежнему остается мало изученной (De Hoff, 2009).

В настоящей работе установлено участие эндогенных лектинов в регуляции ключевого этапа жизни мужского гаметофита — его прорастания. Участие белок-углеводных взаимодействий в данном процессе ранее было показано с помощью экзогенных лектинов (Southworth, 1975; Knox et al., 1976). Эти представления были дополнены в настоящей работе. Установлено, что лектин Кон А специфически взаимодействует с углеводными детерминантами плазмалеммы вегетативной клетки пыльцевого зерна и вызывает её гиперполяризацию и увеличение внутриклеточного pH. Вследствие этого возрастает эффективность прорастания пыльцы.

Нами впервые обнаружены эндогенные лектины, диффундирующие из оболочки пыльцевого зерна в процессе его гидратации. Эти лектины сходны с Кон А по углеводной специфичности и аналогичным образом действуют на мембранный потенциал вегетативной клетки и прорастание пыльцы. Показано, что эти эффекты обусловлены специфическим взаимодействием лектинов с углеводными детерминантами, по-видимому, теми же, с которыми взаимодействует Кон А.

В данной работе впервые представлены результаты, свидетельствующие об участии лектинов в реализации популяционного эффекта, который оказывает существенное влияние на прорастание пыльцы в условиях *in vivo* и *in vitro*. Известно, что этот эффект играет важную роль и в поведении культур соматических клеток растений (Vasil, 2008). В этой связи заслуживает рассмотрения вопрос об универсальности механизмов регуляции ростовых процессов, использующих лектины.

ВЫВОДЫ

1. Исследовано стимулирующее действие экзогенного лектина конканавалина А на активацию и прорастание пыльцы табака *in vitro*. Методами флуоресцентной микроскопии установлено, что на начальном этапе активации пыльцевого зерна этот лектин вызывает увеличение внутриклеточного рН и гиперполяризацию плазмалеммы его вегетативной клетки. Выявлена взаимосвязь между действием конканавалина А на величину мембранного потенциала этой клетки и эффективностью прорастания пыльцевых зёрен. Все указанные эффекты конканавалина А полностью блокировал конкурентный сахар метил- α -D-маннопиранозид, что свидетельствует о специфическом взаимодействии данного лектина с углеводными детерминантами, предположительно гликоконъюгатами плазмалеммы.

2. Исследовано действие веществ оболочки пыльцевого зерна, легковымываемых в водной среде, на суспензионные культуры пыльцевых зёрен, в которых эффективность прорастания существенно снижена вследствие уменьшения концентрации клеток в суспензии. Установлено, что легковымываемые вещества оболочки восстанавливают способность пыльцы к прорастанию. Эффект этих диффузатов проявлялся также в гиперполяризации плазмалеммы вегетативной клетки пыльцевого зерна на начальном этапе его активации. В результате очистки на сефадексе выделена смесь белков 64, 58, 51, 50 и 35 кДа, аналогичным образом действующая на активацию и прорастание пыльцы, а методом гемагглютинации подтверждено присутствие в указанной смеси белков лектинов.

3. Методом аффинной хроматографии выделены в виде единичного пика маннозо-специфичные лектины, легковымываемые из оболочки пыльцевого зерна. По данным электрофоретического анализа, молекулярные массы этих белков составляли 58, 69 и 74 кДа. Эта фракция стимулировала прорастание в культурах с низкой концентрацией клеток. Показано, что данный эффект обусловлен специфическим взаимодействием лектинов с углеводными детерминантами.

4. Полученные результаты впервые выявили участие углеводных детерминант плазмалеммы вегетативной клетки пыльцевого зерна и эндогенных лектинов его оболочки в регуляции ростовой функции. Эти лектины диффундируют в окружающую среду в процессе гидратации пыльцевых зёрен и могут опосредовать их взаимодействия между собой и с клетками рыльца.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации соискателей учёной степени кандидата наук

1. Матвеева Н.П., Андреюк Д.С., Лазарева Е.А., Ермаков И.П. Влияние конканавалина А на величину мембранного потенциала и внутриклеточный рН в процессе активации пыльцевого зерна табака *in vitro* // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 4. стр. 549–554.
2. Матвеева Н.П., Лазарева Е.А., Ключник Т.П., Зозуля С.А., Ермаков И.П. Выявление лектинов оболочки пыльцевого зерна *Nicotiana tabacum* L, стимулирующих прорастание *in vitro* // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 5. стр. 699–706.

II. Прочие публикации

3. Лазарева Е.А. Флуориметрическое изучение изменений мембранного потенциала на начальном этапе прорастания пыльцевого зерна табака // Материалы X междунар. конф студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2003», 15-18 апреля 2003 г., Москва, стр. 27–28.
4. Лазарева Е.А. Измерение величины мембранного потенциала вегетативной клетки пыльцевого зерна // V Съезд общества физиологов растений России, Тезисы докладов Междунар. конф. «Физиология растений – основа фитобиотехнологии», Пенза, 15-21 сентября 2003 г., стр. 121.
5. Лазарева Е.А. Роль внеклеточных лектинов в регуляции прорастания пыльцевого зерна табака // Тезисы докладов XI междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2004», 12-15 апреля 2004 г., Москва, стр. 83.

6. Лазарева Е.А., Матвеева Н.П., Ермаков И.П. Лектины оболочек пыльцевого зерна табака // Материалы IV междунар. научной конф. «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» г. Минск, 26-28 октября 2005 г., стр. 132-133.
7. Лазарева Е.А. Водорастворимые лектины оболочек пыльцевого зерна табака // Программа и тезисы I Междунар. Школы для Молодых Ученых «Эмбриология и Биотехнология» 4-9 декабря 2005 г., Санкт-Петербург, стр. 44.
8. Лазарева Е.А. Краснолобова С.А. Выявление стимулирующих прорастание лектинов в оболочке пыльцевого зерна табака // Тезисы докладов XIII междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006», 12-15 апреля 2006 г., Москва, стр. 134–135.
9. Lazareva E.A., Matveyeva N.P., Yermakov I.P. Pollen wall lectins contribute to germination *in vitro* // XIXth International Congress on Sexual Plant Reproduction «From gametes to genes» organized by the Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences under the auspices of the International Association of Sexual Plant Reproduction Research (IASPRR), July 11-15, 2006, Budapest, Hungary, P. 172–173.
10. Лазарева Е.А., Матвеева Н.П., Ермаков И.П. Участие лектинов оболочки пыльцевого зерна в запуске прорастания // VI Съезд общества физиологов растений России, Тезисы докладов Междунар. конф. «Современная физиология растений: от молекул до экосистем», 18-24 июня 2007 г., г. Сыктывкар, часть первая, стр. 315–316.
11. Лазарева Е.А., Матвеева Н.П., Ермаков И.П. Лектины оболочек пыльцевого зерна табака и их роль в регуляции прорастания // Тезисы докладов II Междунар. Школы молодых учёных «Эмбриология, генетика и биотехнология» Уфа, 3-7 декабря, 2007 г., стр. 80–82.
12. Лазарева Е.А., Филимонова М.В. Роль лектинов оболочки в активации и прорастании пыльцевого зерна табака // Тезисы докладов III Междунар. школы молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология», г. Саратов, 29 июня-3 июля 2009 г., стр. 66–68.