

УДК:577.57.021+577.1

І. С. Карпова¹, д-р біол. наук, ст. наук. співроб., **Е. О. Коваленко**², д-р біол. наук, ст. наук. співроб., **Л. І. Пальчиковська**¹, канд. біол. наук, ст. наук. співроб., **Н. В. Корецька**¹, канд. біол. наук, наук. співроб., **М. О. Платонов**¹, наук. співроб., **С. Б. Зелений**¹, наук. співроб., **К. І. Гетьман**², **О. В. Сашук**², асп., **В. С. Підгорський**², акад., д-р біол. наук

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна;

² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, 003680, Україна.

ДОСЛІДЖЕННЯ МОЖЛИВИХ МЕХАНІЗМІВ ДІЇ ЛЕКТИНУ *BACILLUS SUBTILIS* З ВИКОРИСТАННЯМ КОМПОЗИТНИХ БІОРЕГУЛЯТОРІВ — ПОХІДНИХ ФЕНАЗИН-1-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ

Показана спроможність лектинів модулювати цитостатичну дію біорегуляторів. Модулюючий ефект рослинних лектинів в системі *B. subtilis* виявлений у штаму з непошкодженою системою репарації/рекомбінації, але відсутній у мутанта, котрий не продукує власний лектин. За даними автофокусування препарат екзолектину *B. subtilis* містив дві молекулярні форми, які відрізнялися за фізико-хімічними та біологічними характеристиками. Лужна форма лектину в умовах *in vitro* повністю інгібувала процес транскрипції за участі ДНК-залежної РНК-полімерази фага T7.

Ключові слова: *Bacillus subtilis*, мутанти, лектин, ізолектини, автофокусування.

Загальною характеристикою більшості білків є їх властивість специфічно взаємодіяти з різноманітними речовинами. Відомими прикладами можуть слугувати антитіла, що зв'язують антигени, ферменти, що взаємодіють з субстратами та інгібіторами, а також біологічно активні білки — лектини, які здатні вибірково та зворотно зв'язувати вуглеводи та вуглеводмісні біополімери без порушення їх хімічної структури. У всіх живих організмів біологічні реакції за участю лектинів поділяються на два типи: перший — безпосередня взаємодія з відповідними вуглеводними залишками, котра призводить до реакції аглютинації, адгезії або преципітації; другий — опосередкований сигнальний вплив, який індукує складний ланцюг метаболічних перетворень [1–5].

Порівняно із значним прогресом у дослідженні лектинів патогенних мікроорганізмів лектини сапрофітних мікроорганізмів на сьогодні вивчені недостатньо. Встановлена їх участь у процесах міжклітинного розпізнавання, адгезії та регуляції росту на клітин-

ному та популяційному рівнях [3, 6]. Дані щодо механізмів дії лектинів непатогенних мікроорганізмів відсутні.

В останній час увагу вчених привертають представники сапрофітних бактерій роду *Bacillus*, у яких відкрито здатність до синтезу позаклітинних лектинів з різноманітними медико-біологічними властивостями [3, 6, 7]. Метою даної роботи був пошук невідомих клітинних мішеней, чутливих до дії згаданих лектинів, з використанням в якості інструментів нового класу синтетичних біорегуляторів, сконструйованих на основі феназин-1-карбонової кислоти.

Матеріали і методи

Тест-культурами у дослідженні сумісного впливу лектинів та синтетичних біорегуляторів слугували два ізогенних штами *B. subtilis*: біохімічний мутант SB25(*rec*⁺) за геном *hisH* (гістидин-фосфат-амінотрансферази) і геном *trpC2* (індол-гліцерол-фосфатсинтетази), а також штам *recP* (*rec*⁻), що додатково має мутацію *rec149*, яка впливає на процес рекомбінації та репарації. Умови вирощування та стандартизації тест-культур, склад розчинів та ростових середовищ, а також послідовність додавання реагентів були описані раніше [8]. В роботі була досліджена дія комерційних лектинів рослинного походження ("ЛЕКТИНОТЕСТ", Львів, Україна), а також препарат власного екзолектину *B. subtilis* штаму В-7014 [3, 6]. В якості інструментів (індикаторів) були використані синтетичні біорегулятори: феназин, феназин-1-карбонова кислота (ФКК-1) та сконструйовані на основі ФКК-1 кон'югати з 6-азацитозинном та 6-азаурацилом.

Сумісну дію лектинів та феназину і його похідних досліджували *in vivo* дифузним методом [9]. Свіжі розчини лектинів у стерильному 0,15 М NaCl доводили до концентрації 200 мкг/мл і з'єднували з рівним об'ємом (100 мкл) стандартизованої культури бактерій в епандорфі, струшували 30 секунд, інкубували протягом 30 хв при 37°C та висівали по 100 мкл на чашки Петрі з повноцінним агаризованим середовищем. В контроль замість лектину додавали відповідний об'єм 0,15 М NaCl. Стокові розчини синтетичних біорегуляторів у диметилсульфоксиді (ДМСО) розводили стерильною водою до концентрації 1 мг/мл, наносили крапельно шпательом по 10 мкл на поверхню щойно засіяного бактеріями агару. Чашки інкубували при 37°C протягом 24 годин та визначали діаметри зон інгібування росту за допомогою мікрометра. Мірою впливу лектинів на бактеріостатичний ефект композитів слугувала різниця між діаметром зон пригнічення росту необробленої культури (контроль) та культури, яка оброблена лектином. Отримані результати виражали в абсолютних значеннях (мкм) та процентах. Дані незалежних експериментів у трьох повторностях обробляли з використанням комп'ютерної програми Qauttro Pro для Windows.

Схема одержання бактерійного екзолектину описана раніше [3, 6]. Подальшу очистку та характеристику гемаглютинуючої субстан-

ції провадили за допомогою електрофокусування без додавання амфолітів за методом, що одержав назву автофокусування [10] з нашими модифікаціями. Частково очищений за допомогою ступінчастого висолювання сульфатом амонію та ліофілізований препарат лектину (1 г) розчиняли в 600 мл 0,015 М NaCl. За умов режиму стабілізації напруги — 220 V створювався стартовий струм 7–10 mA, котрий у ході експерименту поступово знижувався до 2 mA. Автофокусування проводили у два етапи. На першому етапі в комірчастій камері невеликого об'єму (120 мл) протягом 3–5 год формували градієнт рН в діапазоні від кислих (рН = 1,0–1,2) до лужних (рН = 10,0–12,0) значень. На другому етапі автофокусування в кожну комірку аналогічної камери більшого об'єму (500 мл) вносили по 5 мл матеріалу з різними значеннями рН, одержаного на першому етапі автофокусування, і заповнювали камеру рештою вихідного розчину. При цьому розділення та очистка компонентів відбувалися значно швидше, ніж за використанням авторської методики. По закінченню автофокусування досліджували гемаглютинуючу активність (ГАА) [2] та загальну кількість білка в кожній фракції спектрофотометричним методом.

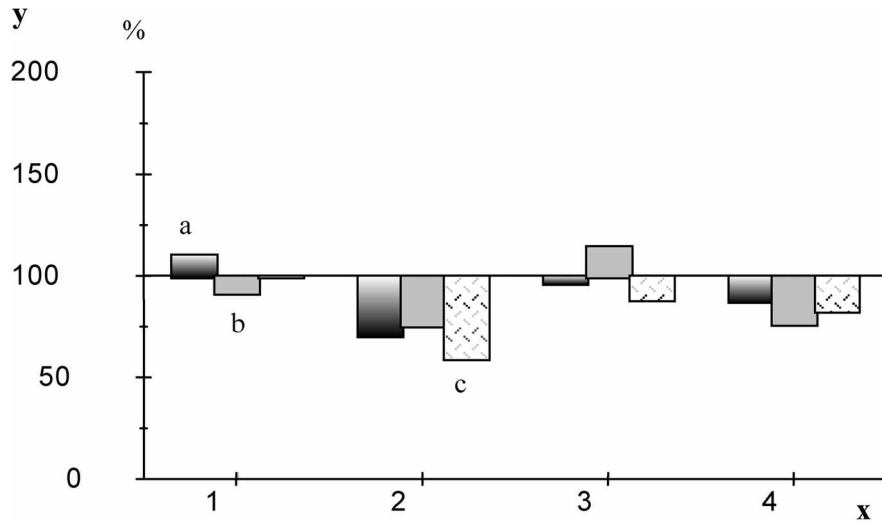
Експерименти по визначенню впливу екзолектину *B. subtilis* на процес транскрипції *in vitro* провадили із залученням ДНК-залежної РНК-полімерази бактеріофага T7 [11–13]. До лінеаризованої ДНК плазміди *pTZ19R*, котра слугувала матрицею, додавали буфер з трис-HCl та MgCl₂ (MDTT) рН 7,5, інгібітор РНКаз, нуклеозидтрифосфати (АТР, ГТР, СТР, ТТР) та РНК-полімеразу фага T7 (FERMENTAS, Литва). Лектиновмісну фракцію після визначення концентрації білка розчиняли у воді до концентрації 10 мкг/мл та вводили перед додаванням РНК-полімерази фага T7. Кінцеву реакційну суміш (20 мкл) інкубували протягом 1 год при температурі 37°C. Реакцію транскрипції зупиняли заморожуванням при –20°C. Отримані продукти транскрипції візуалізували за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі з додаванням 0,5 мкг/мл бромистого етидію.

Кількісну оцінку синтезованих РНК-продуктів здійснювали з використанням програмних пакетів "Sigma Plot 5.0" і "Origin 5.0" для Windows.

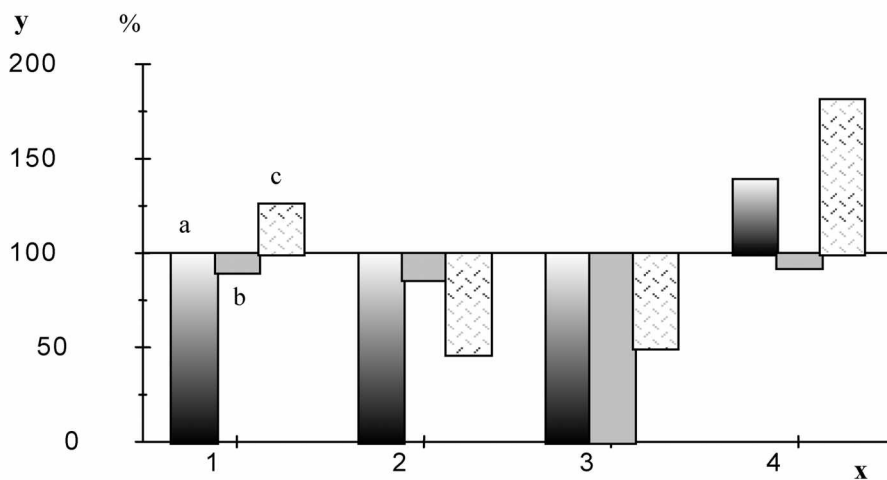
Результати та їх обговорення

Використані лектини рослинного походження належали до представників трьох найбільш поширених структурних класів, а саме: лектинів бобових — ConA, хітинзв'язувальних лектинів — WGA та лектинів — інгібіторів білкового синтезу типу RIP-2 — SNA [13]. Структура власного позаклітинного лектину *B. subtilis* досі невідома.

Як видно з даних рис. 1, після обробки лектинами результат сумісної дії з композитними біорегуляторами змінювався і для



a



б

Рис. 1. Вплив рослинних лектинів на прояв цитостатичної дії композитних біорегуляторів в залежності від генотипу тест-культури:

A — *rec⁻* (SB25), B — *rec⁻* (*recP*).

Лектини: а — ConA; б — WGA; с — SNA. x — біорегулятори: 1 — феназин; 2 — ФКК-1; 3 — кон'югат ФКК-1 і азаурацилу; 4 — кон'югат ФКК-1 і азацитозину; y — зона пригнічення росту у % до контролю

кожного лектину мав певні особливості. Манозоспецифічний лектин ConA повністю блокував дію феназину, в той час як інші два використаних лектини (WGA і SNA) суттєво не впливали на бактеріостатичні властивості феназину.

Щодо дії феназин-1-карбонової кислоти (ФКК-1), то слід відмітити, що досліджені лектини проявляли вірогідне (ConA) або слабе (SNA) блокування її бактеріостатичного ефекту.

Утворення кон'югату ФКК-1 з 6-азаурацилом призвело до втрати цитостатичної дії препарату на штам *rec⁺*, оброблений всіма дослідженими лектинами. В разі клітин штаму *rec⁻* подібний антагоністичний ефект лектинів не спостерігався.

При застосуванні іншого кон'югату ФКК-1 — з 6-азацитозинном — направленість дії лектинів ConA та SNA змінилась в бік підсилення його цитостатичного ефекту у штаму *rec⁺*. Щодо мутанта *rec⁻*, то він також виявився нечутливим до сумісної дії лектину з кон'югатом.

Раніше нами було показано, що штам *rec⁻*, на відміну від штаму *rec⁺* та штаму *B. subtilis* В-7014 не синтезує власний лектин [7]. Проте яким чином може впливати цей лектин на досліджувані процеси, залишилося не з'ясованим.

Враховуючи одержані дані стосовно здатності ФКК-1 та її похідних пригнічувати процес транскрипції *in vitro*, в подальших дослідках з'ясовували, чи може власний лектин *B. subtilis* також впливати на цей процес [11, 12].

Для цього було проведено фракціонування препарату лектину за допомогою методу автофокусування. Як видно з даних рис. 2, препарат екзолектину містить як мінімум дві різні молекулярні форми, що відрізняються за сумарним зарядом: кислу форму, яка рухається до аноду, локалізується при значеннях рН близько 3,0 і співпадає з максимальним вмістом загального білка в досліджуваних пробах (рис. 3), та лужну, що рухається до катоду і зосереджується в діапазоні рН 7,5. Перша форма аглютинуює еритроцити кроля і в більшій мірі еритроцити барана. Друга молекулярна форма аглютинуює виключно еритроцити кроля. Одержані результати, як і наші попередні досліді, свідчать про множинність молекулярних форм позаклітинних лектинів бактерій *Bacillus* [8] та узгоджуються з даними літератури відносно спектра різних молекулярних форм лектинів, ізольованих з інших природних джерел [4, 5].

Вивченню впливу екзолектину *B. subtilis* на процес транскрипції передувало дослідження дії різних концентрацій комерційних рослинних лектинів на синтез РНК *in vitro* (рис. 4). В ході експерименту вдалося встановити, що всі три використані рослинні лектини при концентрації 1 мкг/мл та WGA в концентрації 10 мкг/мл не впливали на синтез мРНК, а в концентрації 10–100 мкг/мл неспецифічно стимулювали процес транскрипції.

Враховуючи виявлені нами відмінності у фізико-хімічних та біологічних характеристиках різних молекулярних форм екзолектину

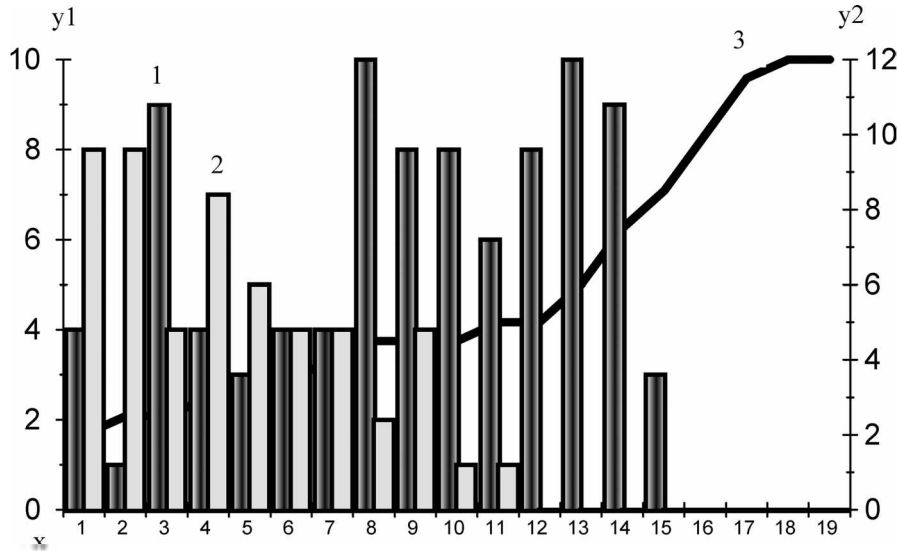


Рис. 2. Гемаглютинуюча активність фракцій екзолектину *B. subtilis*, що сформувалися в процесі автофокусування за відсутності комерційних амфолітів-носіїв

1 — реакція з еритроцитами кроля; 2 — реакція з еритроцитами барана; 3 — градієнт рН; x — № фракції; y1 — ГАА, log₂ титру; y2 — рН.

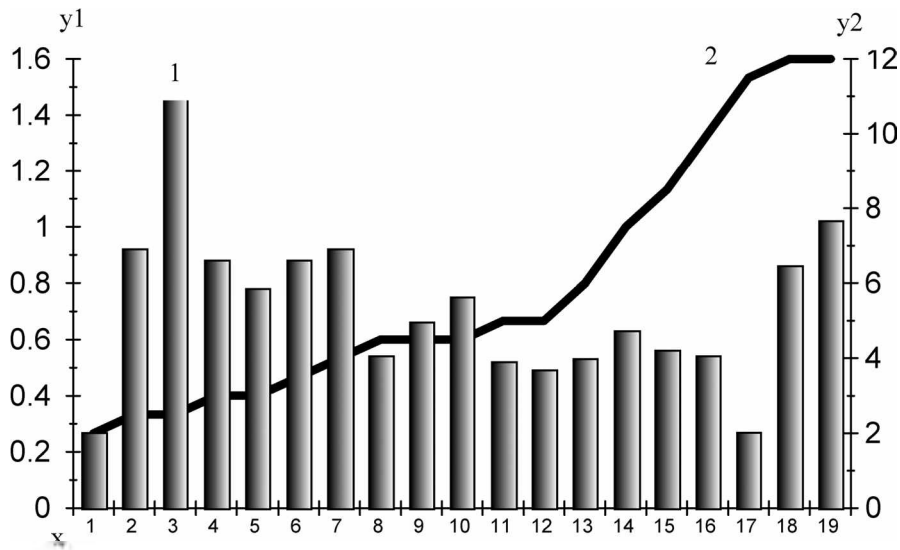


Рис. 3. Вміст білка у фракціях екзолектину *B. subtilis*, що сформувалися за умов автофокусування

1 — УФ абсорбція при 280 нм; 2 — градієнт рН; x — № фракції; y1 — УФ абсорбція при 280 нм; y2 — рН.

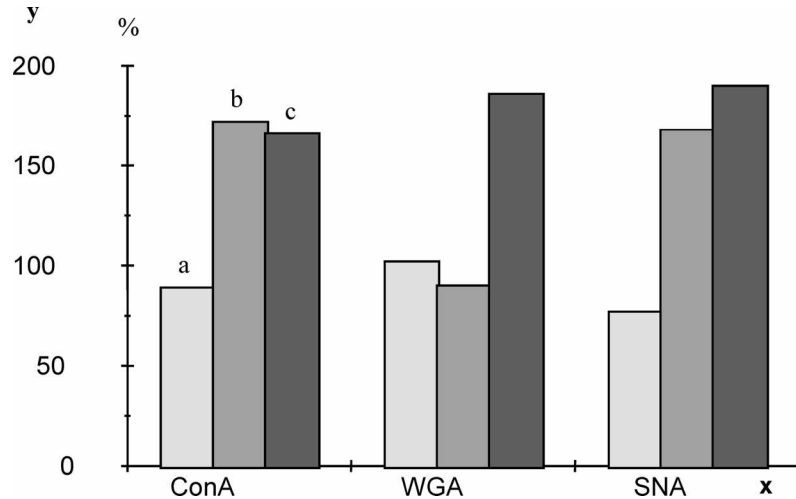


Рис. 4. Вплив рослинних лектинів у концентрації 1мкг/мл (а), 10 мкг/мл (b) та 100 мкг/мл (c) на синтез мРНК *in vitro*

x — лектини; y — продукт транскрипції *in vitro* у % до контролю

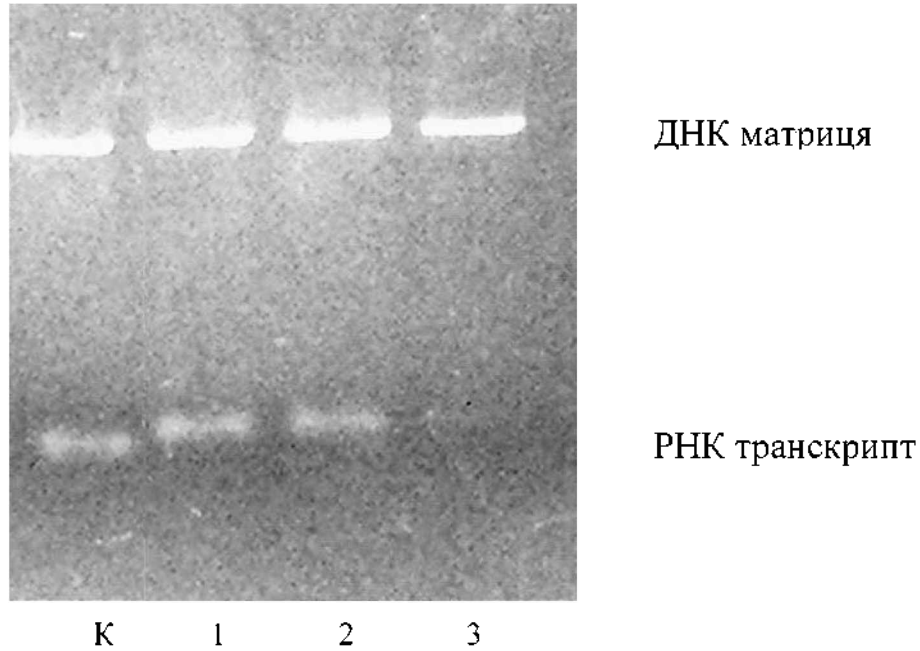
B. subtilis, а саме: розподіл в електричному полі, рівень їх гемаглютинуючої активності та спорідненість до еритроцитів різної видової належності, обидві форми — кисла та лужна — були досліджені окремо в реакції інгібування транскрипції *in vitro*. Для порівняння була вивчена також проміжна слабокисла форма, що в однаковому ступені аглютинувала як еритроцити кроля, так і еритроцити барана.

Виявилось, що одержані молекулярні форми лектину по-різному впливають на вихід РНК-продукту транскрипції *in vitro* (рис. 5). Кисла форма виявляла тенденцію до незначної активації (на 10%) утворення транскриптів, слабокисла форма не мала вірогідного впливу на даний процес, в той час як лужна форма повністю блокувала процес транскрипції з плазмідного промотора.

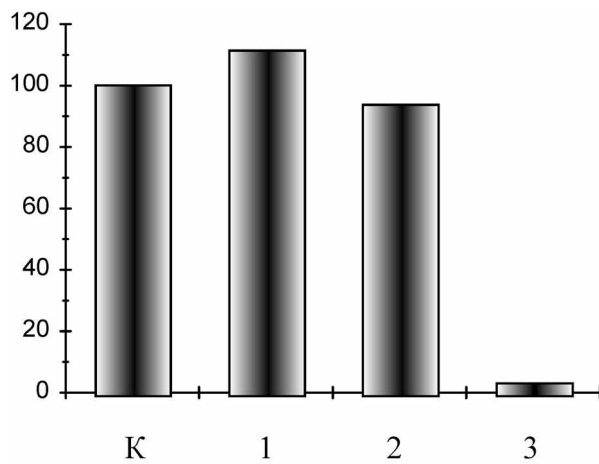
Одержані дані дають можливість стверджувати, що структурна множинність молекулярних форм лектинів *B. subtilis* є основою різнонаправленої регуляторної дії на важливі внутрішньоклітинні процеси, зокрема на процес транскрипції.

Висновки

1. Показано спроможність лектинів різного походження модулювати цитостатичну дію біорегуляторів — похідних феназину, що залежить як від структури лектину, так і від структури низькомолекулярного партнера.
2. Модулюючий ефект лектинів рослинного походження в системі *B. subtilis* спостерігається лише у штаму з неушкодженою



a



б

Рис. 5. Електрофореграма (а) та денситограма (в) продуктів транскрипції *in vitro* за наявності у середовищі різних молекулярних форм лектину *B. subtilis*.

Молекулярні форми лектину: 1 — кисла (рН 3,0); 2 — слабокисла (рН 4,5); 3 — лужна (рН 7,5); К — (контроль) — повний транскрипт, отриманий за відсутності лектину

- системою репарації/рекомбінації і втрачається у мутанта, котрий не продукує власний лектин.
3. Препарат власного екзолектину *B. subtilis* містить як мінімум дві різні молекулярні форми (кислу та лужну), які відрізняються фізико-хімічними та біологічними характеристиками.
 4. Одна з цих молекулярних форм (а саме лужна) *in vitro* повністю інгібує процес транскрипції РНК-полімеразою фага Т7.
 5. Екзолектин *B. subtilis* можна вважати можливим модулятором та посередником впливу рослинних лектинів на клітини бактерій. Зазначені впливи, ймовірно, здійснюються на рівні транскрипції.

Література

1. Гольинская Е. Л., Позорелая Н. Ф., Макаренко В. И. Изучение и применение лектинов., Т. 2. Лектины в биологии и медицине. // Уч. зап. Тарт. ун-та. — 1989. — Вып. 870. — С. 212–217.
2. Луцки М. Д., Панасюк Е. Н., Луцки А. Д. Лектины. — Львов: Вища школа, 1981. — 152 с.
3. Подгорский В. С., Коваленко Э. А., Симоненко И. А. Лектины бактерий. — К.: Наук. думка, 1992. — 202 с.
4. Lis H., Sharon N. Lectins. — Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.-2003. — 440 p.
5. Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications / J. M. Van Damme, W. J. Peumans, A. Pustai, S. Bardocz. — Chichester etc.: John Wiley and Sons. — 1998. — 451 p.
6. Коваленко Е. О. Позаклітинні лектини бактерій роду *Bacillus*: Автореф. дис... док. біол. наук. — К., 1999. — 36 с.
7. Участь лектинів сапрофітних бактерій *Bacillus subtilis* у репаративних процесах / В. С. Підгорський, І. С. Карпова, Е. О. Коваленко, Н. В. Корецька, К. І. Гетьман, С. Ю. Римар // Доповіді НАНУ — 2005. — № 1. — С. 154–158.
8. Карпова І. С., Корецька Н. В., Кочубей Т. О. Здатність лектинів модулювати дію антибіотиків на ріст мутантів *Bacillus subtilis* // Укр. біохім. журн. — 2005. — Т. 77, № 3. — С. 136–141.
9. Kada T., Sadaie Y., Sakamoto Y. Handbook of mutagenicity test procedures // Ed. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel. — Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier. — 1984. — P. 13–31.
10. Sova O. Autofocusing — a method for isoelectric focusing without carrier ampholytes // J. of Chromatography. — 1985. — 320. — P. 15–22.
11. Костіна В. Г., Алексеева І. В., Пальчиковська Л. Г. Синтез нових 2',3'-дидезоксипохідних 6-азациитидину — потенційних інгібіторів репродукції ретровірусів // Біополімери і клітина. — 2001. — Т. 17, № 6. — С. 560–564.
12. N1-глікозидні аналоги 6-азациитидину. Цитотоксична дія та вплив на транскрипцію *in vitro* / Л. Г. Пальчиковська, Л. В. Гарманчук, І. В. Алексеева, Л. С. Усенко, Т. С. Шестакова, Г. І. Соляник, А. Д. Швед, В. Ф. Чехун // Біополімери і клітина. — 2005. — Т. 21, № 5. — С. 433–439.
13. Inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase *in vitro* transcription by DNA-binding pyrooolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines / M. S. Puvvada, S. A. Forrow, J. A. Hartley, P. Stephenson, I. Gibson, T. C. Jenkins, D. E. Thurston // Biochem. — 1997. — Vol. 36, N 3. — P. 2478–2484.

И. С. Карпова¹, Э. А. Коваленко², Л. Г. Пальчиковская¹,
Н. В. Корецкая¹, М. А. Платонов¹, С. Б. Зеленый¹, Е. И. Гетьман²,
Е. В. Сацук², В. С. Подгорский²

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина;

² Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ
ЛЕКТИНА *BACILLUS SUBTILIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
КОМПОЗИТНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ — ПРОИЗВОДНЫХ
ФЕНАЗИН-1-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

Резюме

Показана способность лектинов модулировать цитостатическое действие биорегуляторов. Модулирующий эффект растительных лектинов в системе *B. subtilis* выявлен у штамма с неповрежденной системой репарации/рекомбинации, но отсутствовал у мутанта, который не синтезирует собственный лектин. По данным автофокусирования препарат экзолектина *B. subtilis* содержал две молекулярные формы, которые отличались по физико-химическим и биологическим показателям. Щелочная форма полностью ингибировала процесс транскрипции *in vitro* при участии ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага Т7.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, мутанты, лектин, изолектины, автофокусирование.

I. Karpova¹, E. Kovalenko², L. Palchikovska¹, N. Koretska¹,
M. Platonov¹, S. Zeleny¹, K. Getman², O. Sashchuk², V. Pidgorsky²

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Science of Ukraine,
Kyiv;

² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Science of Ukraine,
Kyiv

**INVESTIGATION OF POSSIBLE ACTION MECHANISMS
OF *BACILLUS SUBTILIS* LECTIN WITH COMPOSITE
BIOREGULATORS, PHENAZINE-1-CARBOXYLIC ACID DERIVATIVES**

Summary

It was shown the ability of lectins to modulate the cytostatic action of bioregulators. Ascertained modulatory effect of plant lectins was observed in strains with intact repair/recombination system, and it was absent in the mutant strain in system *B. subtilis* not synthesized its own lectin. *B. subtilis* exolectin preparation contains two molecular forms in accordance with auto focusing data. These lectin forms differ in physical-chemical and biological signs from each other. It is discovered the alkaline forms inhibit transcription *in vitro* with bacteriophage T7 DNA-dependent RNA-polymerase completely.

Keywords: *Bacillus subtilis*, mutants, lectin, isolectins, autofocusing.