

Позаклітинні лектини сапрофітної бактерії *Bacillus subtilis* та її мутантів

І. С. Карпова, Е. О. Коваленко¹, Н. В. Корецька, К. І. Гетьман¹

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

*Досліджено вплив генетичних особливостей штамів *B. subtilis* на динаміку біосинтезу позаклітинних лектинів. Спектри позаклітинних білків усіх досліджених штамів містили дев'ять основних компонентів, але в різних кількісних співвідношеннях. На момент максимальної лектинової активності в культуральному середовищі штаму дикого типу переважають низькомолекулярні білки з молекулярною масою (м. м.) від 23 до 10 кДа, а у мутантів — більш інтенсивно виражені білки з м. м. 70,4—59,0 кДа, що може свідчити про утворення агрегатів. Показано, що мутаційні порушення метаболізму амінокислот і структури білка, який бере участь у реплікативних та репаративних процесах, призводять до міжштамових відмінностей у продукуванні і вивільненні позаклітинних лектинів.*

Вступ. Лектини складають особливий клас неферментних білків неіммунної природи, мікробного, рослинного або тваринного походження, здатних до специфічного розпізнавання та нековалентного зв'язування цукрів, а також вуглеводних залишків у складі субклітинних структур, зокрема, поверхневих рецепторів клітинних мембран [1, 2]. В усіх живих організмів біологічні реакції за участі 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 (регуляція поділу клітин, міграція лейкоцитів, секреція цитокінів мононуклеарами, апоптоз тощо) [1—4].

Інтерес до лектинів базується на широкому спектрі їхньої дії. Традиційним є використання лектинів як молекулярних зондів при вивченні структури і функціонування мембран найрізноманітніших клітин у нормі та при патологічних станах.

Останнім часом лектини досліджуються як фармакологічно активні реагенти з діагностичними, антивірусними, імуномодулюючими та протипухлинними властивостями [5, 6]. Перспективними у цьому відношенні є нещодавно відкриті лектини сапрофітних бацил, для яких показано направлену дію на імунну відповідь макроорганізму та на індукцію гама-інтерферону [2, 7]. Технологічною перевагою даної групи мікроорганізмів є здатність синтезувати позаклітинні лектини з високим виходом у культуральне середовище. Серед них добре досліджені екзолектини *B. subtilis* srr., які розподіляються на дві групи за молекулярною масою та вуглеводною специфічністю. Першу групу складають білки з молекулярною масою (м. м.) 19—26 кДа та спорідненістю до обох типів сіалових і уронових кислот та фруктозо-1,6-дифосфату. До другої групи належать низькомолекулярні лектини (м. м. яких 7,7—10,0 кДа) з більш вузькою вуглеводною специфічністю, а саме: до N-ацетилнейрамінової та D-глюкуронової кислот. Обидва типи лектинів є глікополімерами, здатними утворювати агрегати з м. м. 77—260 кДа [7].

Раніше було визначено, що біосинтез лектинів бактеріями *B. subtilis* залежить як від зовнішніх

факторів (температура, рН, склад середовища, особливо від джерела вуглецю), так і від особливостей штаму. Певні вуглеводи могли індукувати синтез лектинів у одних штамів і блокувати — у інших. Проте пошук генів, які контролюють біосинтез лектинів, а також дослідження впливу на цей процес відомих генів у *B. subtilis* не проводили. Необхідність подібних досліджень випливає з перспектив практичного використання бактеріальних лектинів як більш доступних та незатратних реагентів у порівнянні з лектинами рослинного походження.

У теоретичному відношенні важливо виявити зв'язок лектинів з основними метаболічними процесами клітини та їхню можливу роль у регуляції фізіологічних функцій бактеріальної популяції.

Метою нашої роботи було вивчення впливу двох біохімічних мутацій, а також мутації в гені *recE*, продукт якого входить до реплікативно/репаративного комплексу, на біосинтез позаклітинних лектинів у динаміці росту культури.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження слугували три культури *B. subtilis*: штам В-7014 з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України, ізольований із шлунково-кишкового тракту новонародженого теляти [7]; ізогенні штами BD170 (*rec+*) та BD224 (*recE*) з Міжнародної колекції (Колумбус, США [8]), одержані від професора Прозорова (НДІ «Генетика» РАН, Москва). Два останніх штами несуть біохімічні мутації в генах *thr-5* (треонінсинтаза) та *trpC2* (індол-гліцерол-фосфатсинтаза). Штам BD224 додатково має мутацію в гені *recE*, продукт якого є аналогом RecA білка кишкової палички, що входить до комплексу, залученого до реплікації, рекомбінації та репарації.

Бактерії культивували в колбах Ерленмейера об'ємом 0,25 л (0,1 л середовища) на качалках (160 об/хв) при температурі 37 °С у середовищі Гаузе з 1,0 %-м вмістом галактози як джерела вуглецю [9]. Посівним матеріалом слугували культури, які вирощували на 3 %-му триптозному агарі «Difco» (США) протягом ночі при 37 °С. У день досліду клітини змивали та стандартизували за показниками нефелометру таким чином, щоб оптична густина відповідала $1 \cdot 10^7$ клітин в 1 мл. Через певні проміжки часу у різних фазах росту відбирали проби культури об'ємом 1 мл. Бактеріальні клітини відділяли від культурального середовища центрифугуванням при 6000 g упродовж 20 хв та тричі відмивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР). Проби культурального середовища та відповідний осад клітин зберігали при температурі -18 °С.

Активність лектинів визначали в реакції гемаглютинації (ГАА) з еритроцитами кроля, обробленими трипсином та фіксованими глутаровим альдегідом, у серії двократних розведень в полістиролових мікропланшетах з U-подібними лунками при кімнатній температурі. Для цього зразки культурального середовища та осаду бактеріальних клітин швидко розморожували на водяній бані при 37 °С. У випадку розчинної форми лектину в першу лунку планшета, яка містила 50 мкл ЗФР, вносили 50 мкл культурального середовища і по закінченні титрування в кожну лунку додавали 50 мкл 2 %-ї суспензії еритроцитів кроля. Аналогічно визначали ГАА поверхневої форми лектину. В цьому варіанті до осаду клітин додавали 100—300 мкл ЗФР залежно від показників нефелометру у певній точці кривої росту для одержання стандартизованої суспензії з титром $1 \cdot 10^9$ клітин в 1 мл. Одержану суспензію клітин титрували, як описано вище. ГАА розчинної та поверхневої форм лектину визначали за останнім розведенням, де ще спостерігається реакція гемаглютинації після 30—40 хв інкубації з еритроцитами кроля, представленим як \log_2 титру досліджуваної проби [7, 9].

Електрофоретичний аналіз білків проводили у системі ПААГ—SDS за Леммлі [10, 11] з використанням 10 %-го гелю. Для відокремлення периферичних білків, нековалентно зв'язаних з поверхнею мембрани, емпірично підбирали м'які умови, за яких ще не відбувається лізису. До осаду клітин додавали буфер для зразків (250 мМ трис-НСl, рН 6,8, сахароза — 10 %; SDS — 5 %; бета-меркаптоетанол — 5 %; фарба — 0,01 %-й бромфеноловий синій) об'ємом 100—300 мкл, щоб одержати стандартизовану суспензію з титром $1 \cdot 10^9$. Проби активно перемішували протягом 1 хв на струшувачі для пробірок (тип ВП) при частоті 5—6 тис. об/хв і витримували упродовж 20 хв при кімнатній температурі. Далі проби кип'ятили на водяній бані (5 хв) та центрифугували при 6000 g протягом 5 хв. Супернатант об'ємом 20 мкл вносили в комірки 4,5 % концентрувального гелю під електродний буфер. Зразки готували безпосередньо перед електрофоретичним дослідженням і не зберігали. Приготування зразків культурального середовища відрізнялося тим, що матеріал розводили згаданим буфером у співвідношенні 1:3 безпосередньо перед кип'ятінням.

Білкові фракції візуалізували фарбуванням гелів 0,25 % Кумасі блакитним R-250 («Serva», Німеччина). Для визначення молекулярних мас використовували такі маркерні білки: альбумін сироватки бика (68,0 кДа), лізоцим (14,4 кДа) («Sigma», США) та мономерні форми комерційних лек-

тинів («ЛЕКТИНОТЕСТ», Україна) — конканавалін А (ConA), 26,0 кДа, та лектин зародків пшениці (WGA) — 36,0 кДа.

Для проведення порівняльного аналізу складу позаклітинних білків використовували денситограми цифрового зображення гелів («Kodak», США, CD-50), одержані за комп'ютерною програмою Image for Windows.

Результати і обговорення. При культивуванні штаму дикого типу *B. subtilis* В-7014 у середині фази логарифмічного росту з'являється поверхнева форма лектину, активність якої ілюструється кривою з двома максимумами (рис. 1, а). Розчинна форма лектину виникає у фазі сповільненого росту. З цього моменту і до середини стаціонарної фази обидві форми лектинів існують одночасно, але зміна їхньої активності має різнонаправлений характер. Наростання активності розчинної форми до максимуму через 24 год росту супроводжується падінням активності поверхневої форми до нульового значення. У пізній стаціонарній фазі знову зростає активність поверхневої форми і відповідно зменшується така розчинної форми. Ця картина створює враження фазозалежного переходу зв'язаної форми екзолектину у розчинну і навпаки.

В ауксотрофного мутанта BD170 (*rec+*) (рис. 1, б) обидві форми лектинів з'являються одночасно в середині фази логарифмічного росту, після чого активність поверхневої форми тримається приблизно на одному рівні, а активність розчинної форми зростає, проходить через максимум на початку фази відмирання (48 год) і знижується до рівня поверхневої форми. У штаму BD224 (*recE*) (рис. 1, в) першою з'являється поверхнева форма. Її активність досягає максимуму на середині фази логарифмічного росту і поступово знижується. Невисока активність вільної форми реєструється на дві години пізніше і тримається на цьому рівні до початку фази відмирання, після чого різко зростає, досягаючи високого титру.

Отже, всі досліджені культури проявили здатність до біосинтезу лектинів, але динаміка і фазо-специфічність утворення розчинної та поверхневої форм має виражені штамові відмінності.

Електрофоретичний аналіз білків культурального середовища штаму дикого типу *B. subtilis* В-7014, одержаного в момент максимальної гемаглютинуючої активності, дозволяє зареєструвати як мінімум дев'ять білкових зон з різною молекулярною масою, оптична густина яких відображена на денситограмі окремими піками (рис. 2, а). Окрему групу утворюють білки з м. м. від 70,4 до 59,0 кДа (піки № 1—4). Чітко також виражений мажорний компонент з м. м. 19—23 кДа (пік № 8), який

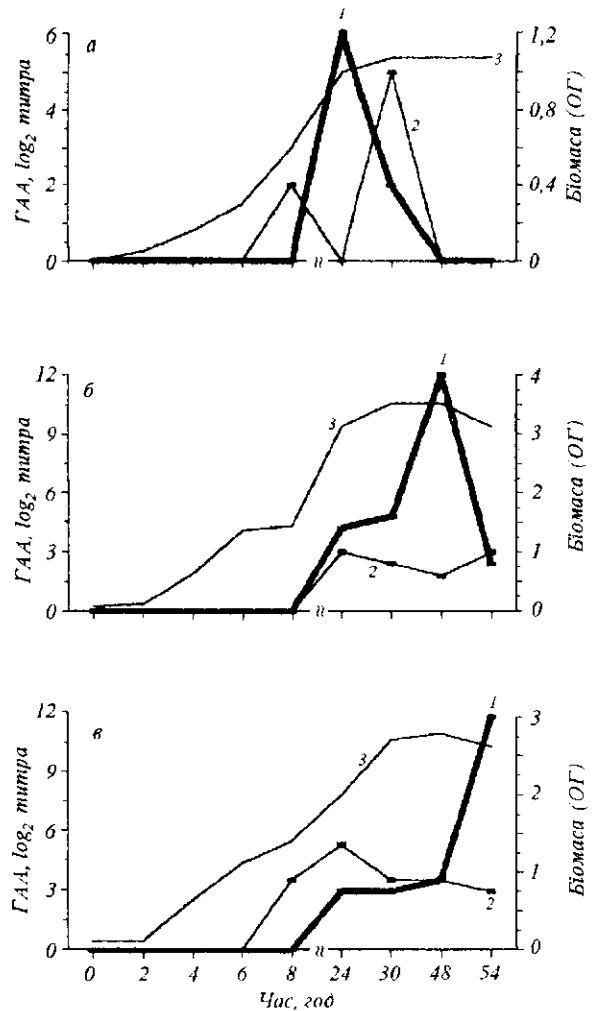


Рис. 1. Активність лектинів у динаміці росту штамів *B. subtilis* на середовищі Гаузе: а — штам 6681MB; б — штам BD170 (*rec+*); в — штам BD224 (*recE*) (1 — гемаглютинуюча активність (ГАА) позаклітинних лектинів; 2 — ГАА поверхневих лектинів; 3 — біомаса, ОГ (оптична густина))

можна співвіднести з екзолектинами *B. subtilis* spp. першої групи та умовно позначити Л1. Аналогічно білкова зона від 10 кДа і нижче збігається з екзолектинами другої групи, відповідно Л2. Очевидно, що в даного штаму сумарний вміст низькомолекулярних білків типу Л1 та Л2 значно переважає такий для білків з більшою м. м. (70,4—59,0 кДа). Між групою високомолекулярних білків і піком Л1 знаходиться проміжна зона з гетерогенним матеріалом 48,0—34,0 кДа, що має на денситограмі складний контур з трьома підйомами (піки № 5—7).

Білковий профіль культурального середовища

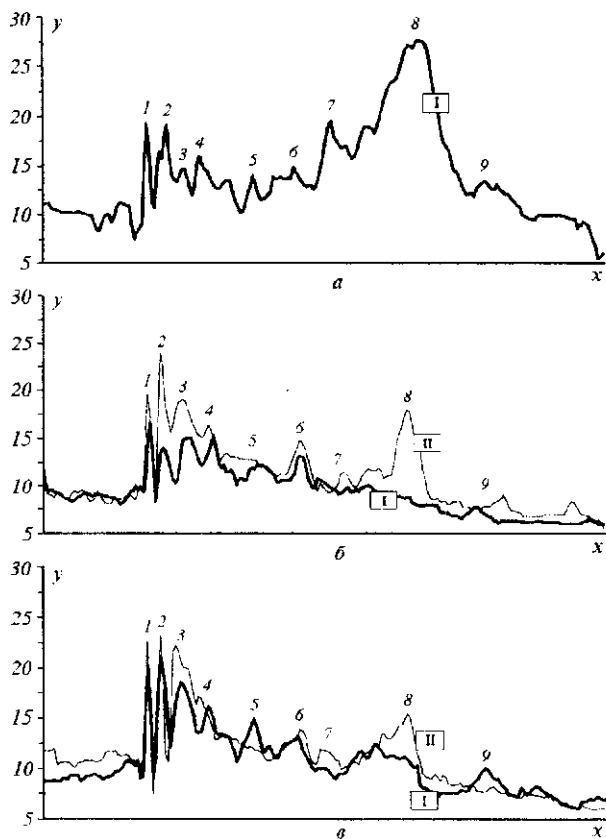


Рис. 2. Денситограма електрофорезу позаклітинних білків *B. subtilis* на стадії максимальної гемаглютинуючої активності: а — штам 6681MB; б — штам BD170 (*rec+*); в — штам BD224 (*recE*) (I — білки культурального середовища; II — поверхневі білки; x — довжина пробігу; y — абсорбція; 1—9 — піки мажорних білків)

обох досліджених мутантів (рис. 2, б, в) відрізняється від такого для штаму дикого типу перш за все відсутністю мажорного піка Л1. Спостерігається також перегрупування компонентів проміжної зони, де пік № 7 згладжується, область піків № 5 та 6 змінює контур, особливо у мутанта BD224 (*recE*). В цілому серед позаклітинних білків культурального середовища мутантів помітне переважання групи високомолекулярних білків (70,4—59,0 кДа).

Білки, що зберігають контакт з поверхнею клітини, у досліджених мутантів мають свої особливості. В обох мутантів чітко виражений компонент Л1, а також пік № 7, але відсутній пік у зоні, що відповідає Л2. Можна відмітити також перегрупування матеріалу в області від 62,7—48,0 кДа, що має вигляд злиття трьох сусідніх піків № 3—5, яке особливо виражене у штаму BD224 (*recE*).

Якщо лектинову активність позаклітинних білків пов'язати з низькомолекулярними компонента-

ми, то у штаму дикого типу в момент максимальної гемаглютинуючої активності в культуральному середовищі присутні обидва екзолектини (Л1 і Л2), причому Л1 є домінуючим. Відсутність мажорного компонента Л1 у культуральному середовищі мутантів можна пояснити його міцнішим зв'язком з клітинною поверхнею або утворенням високомолекулярних агрегатів. Так, білок 48—50 кДа, виражений піком № 5, гіпотетично може бути димером Л1, а група білків 70,4—59,0 кДа — агрегатами вищого порядку. Це характерно для лектинів, які легко утворюють комплекси з гомологічними та гетерологічними молекулами.

Виявлені міжштамові відмінності можуть визначатися опосередкованим впливом мутацій на клітинний цикл бактерій. Ауксотрофність мутантів за треоніном і триптофаном — структурними елементами пептидів та білків, які можуть слугувати донорами азоту та використовуватися в процесі глюконеогенезу, очевидно, призводить до зростання періоду генерації, як це видно з різного нахилу кривих на стадії логарифмічного росту. Мутант BD224 (*recE*), крім ауксотрофних маркерів, несе додаткову мутацію, що впливає на такі важливі генетичні процеси, як реплікація/рекомбінація/репарація. Можливо, це є причиною значної затримки вивільнення лектинів з клітин у культуральне середовище та змін профілю позаклітинних білків за рахунок збільшення кількості високомолекулярних компонентів 70,4—62,7 кДа.

Отже, попередніми роботами було показано залежність процесу утворення екзолектинів *B. subtilis* spp. від впливу зовнішніх факторів [2, 7, 9]. У даній роботі нами продемонстровано, що зміни внутрішніх процесів внаслідок мутаційних порушень метаболізму суттєво впливають на динаміку синтезу екзолектинів представниками цього виду бактерій.

Висновки. 1. Динаміка біосинтезу позаклітинних лектинів *B. subtilis* spp. залежить від генетичних особливостей бактерій: порушення метаболізму амінокислот (штам BD170) та відсутність білка, що бере участь у реплікативних та репаративних процесах (штам BD224), призводять до значної затримки періоду максимального вивільнення лектинів у культуральне середовище. Гемаглютинуюча активність при цьому не лише зберігається, але й підвищується.

2. У штаму дикого типу поверхнева та розчинна форми лектинів координовано з'являються та зникають на різних фазах росту. У мутантів така узгодженість порушується: активність розчинної форми зростає, а поверхневої — залишається на одному рівні.

3. Усі досліджені штами синтезують як мінімум дев'ять основних позаклітинних білків, два з яких відповідають описаним раніше лектинам Л1 та Л2. В культуральному середовищі мутантів змінюється співвідношення білкових компонентів за рахунок молекул з більшою молекулярною масою, що може свідчити на користь агрегації низькомолекулярних фракцій. При цьому у мутантів білок типу Л1 до кінця росту зберігає зв'язок з клітинною поверхнею.

4. Ефект мутацій на продукцію лектинів вірогідно опосередкований їхнім впливом на процес росту і поділу клітин, котрий залежить від правильного функціонування зв'язаного з мембраною реплікативного комплексу.

I. S. Karpova, E. A. Kovalenko, N. V. Koretskaya, E. I. Getman

Extracellular lectins of saprophytic bacteria *Bacillus subtilis* and its mutants

Summary

The influence of genotype of *B. subtilis* strains on the dynamics of extracellular lectins biosynthesis was studied. The spectrum of extracellular proteins presented in all strains under study contains nine main components though in different proportion. The maximum of lectin activity in the culture liquid of the wild type strain coincides with predominance of low molecular weight proteins about 23 to 10 kDa, while in mutant strains the most intensively expressed proteins have molecular weight of 70.4–59.0 kDa, that may be due to the aggregate formation. It was shown that mutational changes in the aminoacid pathways as well as changes in the structure of protein participating in replication and reparation resulted in strain differences in the production and release of lectins.

I. S. Karpova, E. A. Kovalenko, N. V. Koretskaya, E. I. Getman

Внеклеточные лектины сапрофитной бактерии *Bacillus subtilis* и ее мутантов

Резюме

Исследовано влияние генетических особенностей штаммов *B. subtilis* на динамику биосинтеза внеклеточных лектинов. Спектры внеклеточных белков всех исследуемых штаммов содержали девять основных компонентов, но в разных количествен-

ных соотношениях. К моменту достижения максимальной лектиновой активности в культуральной среде штамма дико-го типа преобладают низкомолекулярные белки от 23 до 10 кДа, а у мутантов — более интенсивно выражены белки с молекулярной массой 70,4–59,0 кДа, что может свидетельствовать о формировании агрегатов. Показано, что мутационные нарушения метаболизма аминокислот, а также структуры белка, участвующего в репликативных и репаративных процессах, приводят к междуштаммовым различиям в продуцировании и высвобождении внеклеточных лектинов.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Луцки М. Д., Панасюк Е. Н., Луцки А. Д. Лектины.— Львов: Вища школа, 1981.—152 с.
2. Подгорский В. С., Коваленко Э. А., Симоненко И. А. Лектины бактерий.—Киев: Наук. думка, 1992.—202 с.
3. Тимошенко А. В. Гликобиология и биомедицинское применение лектинов // Вестн. БГУ. Сер. 2.—1997.—№ 2.—С. 38—47.
4. Gabius H. J. Animal lectins // Eur. J. Biochem.—1997.—245.—Р. 543—576.
5. Van Damme J. M., Peumans W. J., Pustai A., Bardocz S. Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications.—Chichester etc.: John Wiley and Sons, 1998.—451 p.
6. Карпова И. С., Корецкая Н. В., Римина В. М. Лектины лекарственных растений как фармакологически активные вещества // Клінічна фармація.—1999.—3, № 2.—С. 148—150.
7. Коваленко Е. О. Позаклітинні лектини бактерій роду *Bacillus*: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук.—Київ, 1999.—36 с.
8. *Bacillus* genetic stock center. Strains and data.—Columbus, 1989.
9. Подгорский В. С., Коваленко Э. А., Гетьман Е. И., Выюницкая В. А. Влияние условий культивирования на продуцирование лектинов некоторыми представителями бактерий рода *Bacillus* // Микробиол. журн.—1989.—51, № 6.—С. 30—34.
10. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.—Р. 680—685.
11. Михальський Л. О., Фуртат І. М., Дем'яненко Ф. П., Костючик А. А. Електрофоретичні спектри білків клітинної стінки як один із критеріїв ідентифікації та класифікації коринебактерій // Укр. біохім. журн.—2001.—73, № 3.—С. 63—70.

УДК 547.96

Надійшла до редакції 23.01.03