

Влияние изолектинов *Phaseolus vulgaris* на спонтанный мутагенез у rec^+ и rec^- мутантов *Bacillus subtilis*

И. С. Карпова, Н. В. Корецкая, Т. Н. Тихонова, О. В. Пидпала, Л. Л. Лукаш

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

*На основе штамма *B. subtilis* SB25 и его производного *recP149* с нарушенной системой репарации/рекомбинации разработана чувствительная тест-система для выявления воздействий изолектинов фасоли обыкновенной (РНА) на уровне генома по определению числа trp^+ и his^+ ревертантов. Показано, что добавление лектина приводит к различным эффектам в зависимости от структуры и молекулярной организации изоформы, концентрации препарата, маркера и генотипа тест-объекта. Только РНА-Р, который содержит набор всех изоформ лектина, обладает способностью достоверно повышать выход trp^+ ревертантов. Нечувствительность мутанта *recP149* к такому воздействию указывает на посредничество системы репарации/рекомбинации в проявлении генетических эффектов РНА.*

Введение. Лектины — углеводсвязывающие вещества белковой природы (белки или гликопротеины) отличаются необычайно широким спектром биологической активности, благодаря чему находят применение в самых различных областях биохимии, биотехнологии, медицины и сельского хозяйства: при выделении и очистке гликоконъюгатов, гормонов, компонентов клеточных мембран и органелл; для типирования и сортировки клеток в микробиологии, иммунологии, нейробиологии, онкологии; в качестве митогенов, иммуномодуляторов и иммунотоксинов [1—3]. Особого внимания заслуживает идея использовать лектины как фармакологически активные препараты [4—7]. За рубежом уже накоплен опыт успешного применения лектина омелы белой при лечении некоторых онкологических заболеваний [5].

Повсеместное распространение лектинов в природе от вирусов и бактерий до человека указывает на их фундаментальную роль в процессах жизнедеятельности, которая во многом остается неизвестной. Предполагается, что лектины осуществляют регуляторные функции, действуя через рецепторы

клеточных мембран. Перспектива использования лектинов в медицинской практике ставит задачу исследования феноменологии и возможных механизмов их генетического действия, до настоящего времени практически не изученных. Показано противоопухолевое и антимуtagenное действие фитогемагглютина (РНА) из семян фасоли (*Phaseolus vulgaris*) у высших животных и человека, которое, по мнению авторов, опосредовано иммунной системой [8, 13]. Вместе с тем имеются данные о стимуляции деления соматических клеток млекопитающих с помощью РНА, опухолевых в том числе [10, 11]. Ранее нами было показано, что галактозоспецифичный лектин из соцветий бузины черной в зависимости от дозы мог повышать или снижать частоту спонтанного и индуцированного алкилирующим агентом N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином мутагенеза в культуре клеток китайского хомячка [12].

Большая сложность эукариотических организмов и высокая стоимость экспериментов с ними делают обоснованной цель данной работы — разработать простую бактериальную модель для тестирования генетического действия лектинов из пищевых и лекарственных растений и выяснения возможных механизмов такого действия.

Материалы и методы. Мы модифицировали близкий аналог теста Эймса — *rec*-test, базирующийся на изменении чувствительности *rec*-мутантов сенной палочки (*B. subtilis*) к мутагенным воздействиям [14]. Генетическую активность коммерческих препаратов РНА («ЛЕКТИНОТЕСТ», Украина) тестировали по возникновению реверсий от ауксотрофности к прототрофности. Объектом исследования служили два изогенных мутанта *B. subtilis* из международного реестра, любезно предоставленные профессором А. А. Прозоровым и сотр. (Институт общей генетики РАН, Москва): SB25 (*hisH2 trpC2*) и *recP*, содержащий помимо ауксотрофных маркеров мутацию *rec149* с плейотропным действием, влияющую на процесс рекомбинации [15]. Бактерии культивировали на жидких и агаризованных средах по методу [16]. Полноценной средой для определения выживания служил 1,5 %-й агар на основе аминокептида, разведенного средой Спицайзена в соотношении 1:3 с добавлением Mg^{2+} (1 мМ) и глюкозы (0,4 %). Селективная полутвердая (1 % агара) солевая среда содержала необходимую аминокислоту в конечной концентрации 50 мкг/мл. Ввиду повышенной изменчивости *rec* штамма перед проведением эксперимента музейную культуру паспортизовали, отбирали три типичные колонии и суммарно высевали на поверхность 3 %-го скошенного триптозного агара, инкубировали при температуре 37 °С в течение ночи. Культуру смывали буфером Спицайзена, с помощью нефелометра стандартизовали по мутности до титра $1 \cdot 10^8$, смешивали с раствором лектина в 0,15 М NaCl в соотношении 1:1 по объему и инкубировали (30 мин, 37 °С) при осторожном встряхивании. Клетки разводили буферной средой Спицайзена и высевали параллельно на минимальную селективную среду для выявления ревертантов и на полноценную среду — для определения общей жизнеспособности. Число колоний на полноценной среде учитывали спустя 18 ч, а число колоний ревертантов — спустя 48 ч роста при 37 °С. Достоверность отличий оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Используемые нами изоформы РНА являются тетрамерами, состоящими из субъединиц двух типов: РНА-Е (эритроцитарный) состоит из четырех субъединиц Е-типа и способен вызывать агглютинацию эритроцитов человека и некоторых животных; РНА-Л (лейкоцитарный) состоит из четырех субъединиц L-типа, способен агглютинировать лейкоциты и вызывать blastotransformation. РНА-Р — суммарный препарат, содержит смесь пяти различных изолектинов: Е4, Е3L, Е2L2, ЕL3 и L4 [17]. Мажорный компо-

нент — гетерополимер, имеющий структуру E2L2, с молекулярной массой 118 кДа. Полипептидная последовательность субъединиц L- и E-типа различается всего по семи аминокислотным остаткам. Принципиальные различия связаны с углеводным компонентом, определяющим тропность молекулы к соответствующему адресату: клеточной мембране, внеклеточному матриксу, ткани или органу [18].

Как видно из данных, представленных на рис. 1, изоформы РНА значительно различаются по способности оказывать токсический эффект, регистрируемый по снижению выживаемости клеток *B. subtilis* на полноценной среде. Так, РНА-Л во всем диапазоне использованных концентраций токсическим действием не обладает. Напротив, эритроцитарный РНА-Е уже в наименьшей концентрации снижает число жизнеспособных клеток на 90 %, причем этот результат от дальнейшего повышения дозы не зависит. Для РНА-Р характерно колебание значений. Для низких концентраций отмечено некоторое снижение выживаемости, затем в области от 1 до 10 мкг/мл идет подъем, после чего следует спад. Возможно, субъединицы РНА-Е и РНА-Л проявляют разнонаправленное действие на бактериальную клетку. В этом случае конечный результат будет зависеть от соотношения изоформ в препарате.

Результаты изучения влияния различных молекулярных форм лектина *P. vulgaris* на возникновение спонтанных реверсий по двум точечным маркерам *hisH2* и *trpC2* представлены на рис. 2.

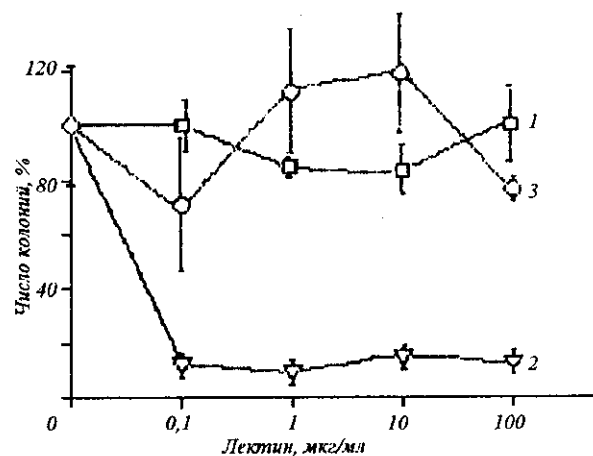


Рис. 1. Влияние изоформ РНА на выживание клеток *B. subtilis* на полноценной агаризованной среде, штамм SB25 *rec*⁺: 1 — РНА-Л; 2 — РНА-Е; 3 — РНА-Р

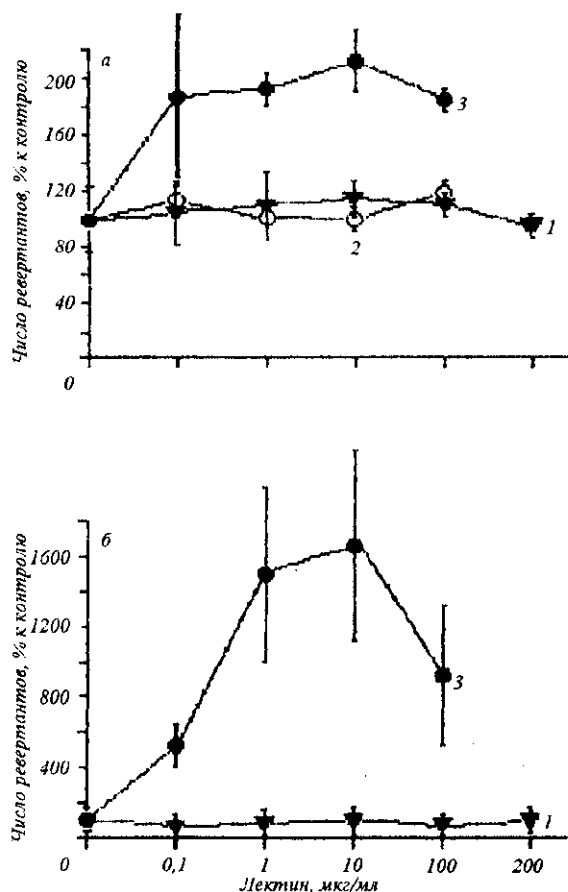


Рис. 2. Влияние изоформ РНА на возникновение his^+ (а) и trp^+ (б) реверсий у штамма *B. subtilis* SB25 rec^+ : 1 — РНА-Л; 2 — РНА-Е; 3 — РНА-Р

Оказалось, что изоформы лектина, представленные субъединицами только одного типа — Е4 или L4, во всем диапазоне концентраций не оказывают достоверного влияния на процесс спонтанного ревертирования. Однако в случае препарата РНА-Р, содержащего комбинированные гетеротетрамеры, появляется способность достоверно и воспроизводимо повышать выход спонтанных реверсий. При этом отмечается определенная специфичность воздействия. В случае ревертабельного гистидинового маркера имеет место увеличение числа ревертантов в 1,5–2,0 раза уже при наименьшей из концентраций — 0,1 мкг/мл. Повышение дозы до 100 мкг/мл было неэффективным. В случае триптофанового маркера (рис. 2, б) выход реверсий с увеличением дозы нелинейно возрастал в 18–20 раз, а по

достижении концентрации 100 мкг/мл — достоверно снижался. Причина такой избирательности может быть связана с природой первичной точечной мутации. Последнее время в составе лектинов находят ДНК-связывающие домены, обладающие сродством к определенным нуклеотидам [19]. Кроме того, известно неравномерное распределение скорости репарации ДНК вдоль генома в зависимости от транскрипционной активности гена [20]. Среди веществ, способных модулировать мутационный процесс, есть соединения, влияющие на ошибки репарации и репликации ДНК [8, 21]. В случае РНА-Р как комплексного белкового препарата следует предположить также действие, опосредованное ферментными системами репликации/репарации/рекомбинации. В пользу такого предположения свидетельствует факт слабой чувствительности мутанта *recP*, имеющего повреждение в одном из звеньев системы репарации/рекомбинации (предположительно затрагивающего функцию топоизомеразы) к воздействию РНА-Р (рис. 3, а, б). Так, число ревертантов по гистидину у мутанта *recP149* практически не возрастало, а по триптофану увеличивалось в 2 раза лишь при высоких дозах — 10 и 100 мкг/мл, что на порядок ниже эффективности препарата в случае *rec⁺* штамма.

Таким образом, культура *B. subtilis* SB25 и производный от нее мутант *recP149* с нарушенной системой репарации/рекомбинации обнаруживают различную реакцию на добавление изоформ лектина, выделенного из семян *P. vulgaris* (РНА). Эффект зависит от структуры (L- или Е-форма) и молекулярной организации (гомо- или гетеротетрамеры) лектина, концентрации препарата, маркера, по которому ведется селекция ревертантов, и генотипа тест-объекта (нормальная или дефектная система репарации/рекомбинации). Лейкоцитарная форма лектина — РНА-Л не проявляет достоверного воздействия; эритроцитарная форма — РНА-Е оказывает цитотоксическое действие; препарат РНА-Р (содержит все возможные сочетания субъединиц L- и Е-типов) в зависимости от дозы может незначительно влиять на выживаемость, но при этом существенно и достоверно возрастает частота *trp⁺* и гораздо в меньшей степени — *his⁺* ревертантов. Очевидно, сочетание субъединиц различного типа придает молекуле новые свойства, которыми не обладают гомополимеры Е- и L-типов. Нечувствительность мутанта *recP149* к добавлению препарата РНА-Р указывает на то, что в реализации генетического воздействия лектина необходимо посредничество системы репарации/рекомбинации. Из этого следует, что данная тест-система может быть использована не только для скрининга мута-

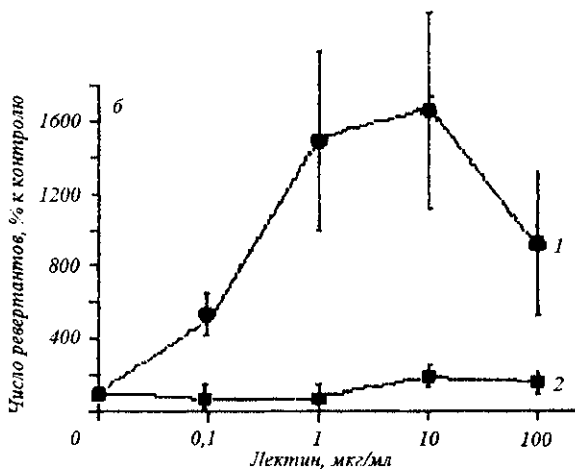
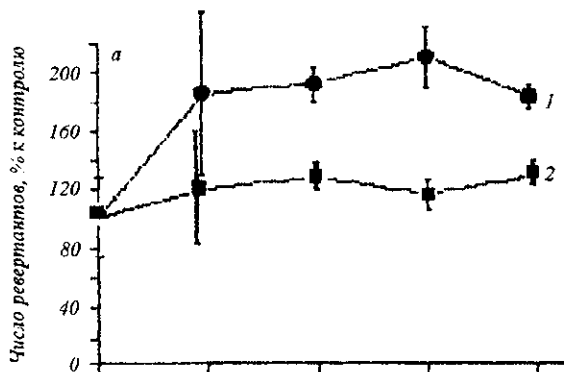


Рис. 3. Влияние РНА-Р на возникновение his^+ (а) и trp^+ (б) реверсий уштаммов *B. subtilis* SB25 rec^+ и $recP149\ rec^-$: 1 — rec^+ ; 2 — rec^-

ций, но и для выявления потенциальных партнеров взаимодействия лектин—белок и лектин—ДНК. Это, в свою очередь, открывает подходы к управлению мутационным процессом с помощью биологически активных веществ.

I. S. Karpova, N. V. Koretskaya, T. N. Tykhonova, O. V. Pidpala, L. L. Lukash

Effect of *Phaseolus vulgaris* isolectins on spontaneous mutability of *Bacillus subtilis* rec^+ and rec^- strains

Summary

The *Bacillus subtilis* strain SB25 and its recombination deficient derivative $recP149$ are sensitive to reveal the different effects of *Phaseolus vulgaris* isolectins (PHA) on the survival and mutability of bacteria. These effects depend on the lectin structure and

molecular organization, its concentration, the marker under study and genotype of test-bacteria (repair-proficient or deficient). PHA-L has no significant effects on this system; PHA-E demonstrates high cytotoxic properties; PHA-P preparation which contains all possible combinations of L-type and E-type subunits influences the survival and significantly — the number of trp^- but not his^+ revertants. The recombination-deficient strain $recP149$ is almost insensitive to PHA-P addition indicating that the repair process is necessary for the final genetic effect. *B. subtilis* and its rec^- derivatives are suitable not only for the mutagenicity screening but also for further study of the lectin-protein and lectin-DNA interactions and their genetic consequences for living cells.

I. С. Карпова, Н. В. Корецька, Т. М. Тихонова, О. В. Підпала, Л. Л. Лукаш

Вплив ізолектинів *Phaseolus vulgaris* на спонтанний мутагенез у rec^+ та rec^- мутантів *Bacillus subtilis*

Резюме

Показано, що лінія *B. subtilis* SB25 та похідний від неї мутант $recP149$ з порушеною системою рекомбінації є чутливими щодо виявлення різного впливу ізолектинів з *P. vulgaris* (РНА) на виживання та мутабільність бактерій. Характер впливу залежить від структури та молекулярної організації лектину, його концентрації, досліджуваного маркера та генотипу тест-бактерії (нормальна чи порушена система репарації). РНА-Л не має чіткого впливу на досліджувану систему; РНА-Е виявляє цитотоксичну дію; препарат РНА-Р, який містить усі можливі комбінації субодиниць L- та E-типів, децю впливає на виживання та вірогідно підвищує кількість trp^- ревертантів на фоні слабкої дії на кількість his^+ ревертантів. Штамм $recP149$ з порушеною системою рекомбінації є нечутливим до дії препарату РНА-Р, що вказує на необхідність залучення системи репарації для реалізації генетичного впливу. Таким чином, тест-культура *B. subtilis* та її rec^- похідні є перспективними не лише для виявлення мутагенної дії, але й для подальших досліджень взаємодій лектин—білок та лектин—ДНК та їхніх генетичних наслідків для клітин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Луцки А. Д., Детьок Е. С., Луцки М. Д. Лектины в гистохимии.—Львів: Вища школа, 1989.—144 с.
- Подгорский В. С., Коваленко Э. А., Симоненко И. А. Лектины бактерий.—Киев: Наук. думка, 1992.—202 с.
- Gabius H.-J. Animal lectins // Eur. J. Biochem.—1997.—243, N 2.—P. 543—576.
- Гольнская Е. Л., Погорелая Н. Ф., Макаренко В. И. Лектины как возможное фармакологически активное начало у некоторых лекарственных растений // Изучение и применение лектинов. Лектины в биологии и медицине: Уч. записки Тартус. ун-та.—Тарту, 1989.—Вып. 870.—С. 212—217.
- Gabius S., Kayser K., Bovin N. V., Yamazaki N., Kojima N., Kaltner H., Gabius H.-J. Endogenous lectins and neoglycoconjugates: a sweet approach to tumor diagnosis and targeted drug delivery // Eur. J. Pharm. Biopharm.—1996.—42, N 2.—P. 250—261.
- Тимошенко А. В. Гликобиология и биомедицинское применение лектинов // Вестник БГУ. Сер. 2. Химия, биология, география.—1997.—№ 2.—С. 38—47.
- Карпова И. С., Корецкая Н. В., Римша В. М. Лектины лекарственных растений как фармакологически активные вещества // Кліні. фармація.—1999.—3, № 2.—С. 148—150.
- Лукаш Л. Л. Мутагенез і антимутагенез — протилежно

- спрямовані процеси, що визначають рівень генетичної мінливості та стабільності // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 6.—С. 500—511.
9. Лалчев Ст. Цитогенетическая оценка антимуtagenной активности препарата РНА *in vivo* // Современ. медицина.—1987.—38, № 12.—С. 14—16.
 10. Banwell J. G., Howard R., Kabir I., Adrian T. E., Diamond R. H., Abramowski C. Small intestinal growth caused by feeding red kidney bean phytohaemagglutinin lectin to rats // Gastroenterology.—1995.—104, N 4.—P. 1669—1677.
 11. Koninkx J. F. J. G., Hendriks H. G. C. J. M., van Rossum J. M. A., van den Ingh T. S. G. A. M., Nouwen J. M. V. M. Interaction of legume lectins with the cellular metabolism of differentiated Caco-2 cells // Gastroenterology.—1992.—102, N 4.—P. 1516—1523.
 12. Лукаш Л. Л., Карпова И. С., Мирошниченко О. С., Тихонова Т. Н., Лыло В. В., Манько В. Г., Сухорада Е. М., Гольнская Е. Л. Влияние лектина соцветий *Symbiscus nigra* на спонтанный и индуцированный алкилирующим агентом мутагенез в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика.—1997.—31, № 5.—С. 52—60.
 13. Чекова В. В., Засухина Г. Д. Стимуляция интерфероном репаративного синтеза ДНК в клетках человека с ингибированной системой репарации // Докл. АН СССР.—1989.—№ 5.—С. 1238—1240.
 14. Kada T., Sadaie Y., Sakamoto Y. *Bacillus subtilis* repair test // Handbook of mutagenicity test procedures / Eds B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel.—Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier, 1984.—P. 13—31.
 15. Башкиров В. И., Хасанов Ф. К., Лакомова Н. М. Незаконная рекомбинация и амплификация у *Bacillus subtilis* // Молекулярные механизмы генетических процессов.—М.: Наука, 1990.—С. 237—243.
 16. Прозоров А. А. Трансформация у бактерий.—М.: Наука, 1988.—256 с.
 17. Leavitt R. D., Felsted R. L., Bachur N. R. Biological and biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins // J. Biol. Chem.—1977.—252, N .—P. 2961—2966.
 18. Miller J. B., Hsu R., Heinrikson R., Yachnin S. Extensive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1975.—72.—P. 1388—1391.
 19. Лахтин В. М. Молекулярная организация лектинов // Молекуляр. биология.—1994.—28, № 2.—С. 245—272.
 20. Жестяников В. Д., Игушева О. А. Связь транскрипции и репарации радиоиндуцируемых повреждений ДНК // Радиацион. биология. Радиозэкология.—1997.—37, № 4.—С. 549—555.
 21. Барляк И. Р., Исаева А. В. Анимутагенные и генопротекторные свойства препаратов растительного происхождения // Цитология и генетика.—1994.—28, № 3.—С. 3—17.

УДК 575.224.42, 577.11.112
Надійшла до редакції 24.07.2000