

Академік НАН України В. С. Підгорський, Е. О. Коваленко,  
І. С. Карпова, О. В. Сащук, Н. В. Корецька, К. І. Гетьман

## Вплив генотипу мутантів *Bacillus subtilis* на синтез лектинів з використанням різних джерел вуглецю

Досліджено вплив генотипу мутантів *Bacillus subtilis* у порівнянні з природним штамом *B. subtilis* на синтез лектинів вільної та зв'язаної форм з використанням середовищ з різними джерелами вуглецю: глюкозою, галактозою та лактозою. Найістотніші міжштамові особливості зафіксовано на середовищі з галактозою: рівень продукування лектинів або підвищувався до 64 разів, або зменшувався до повної їх відсутності. Виявлено вплив мутацій в генах *recP* і *recE4* штамів *B. subtilis*, що належать до системи репарації/рекомбінації, на динаміку утворення лектинів вільної та зв'язаної форм, рівень їх активності, термін присутності в культуральній рідині та на поверхні клітин: мутація в гені *recE4* сприяла значному підвищенню лектинової активності на середовищі з галактозою, а мутація в гені *recP* призводила до втрати здатності бактерій продукувати обидві форми лектинів. У зв'язку з цим висловлено припущення про ймовірну причетність бациллярних лектинів до репаративної функції.

Лектини — це білки або глікопротеїни неімунної природи, які здатні специфічно і зворотно зв'язувати вуглеводи та вуглеводвмісні біополімери без порушення їх хімічної структури [1, 2]. Лектини присутні в усіх живих організмів і мають широкий спектр біологічної активності. У літературі є достатньо даних відносно лектинів різного походження, а саме: їх властивостей, функціональної ролі, біологічної дії, можливих сфер застосування в різних галузях біології та медицини тощо [3–8]. Однак на сьогодні обмежені відомості щодо особливостей лектинів сапрофітних бактерій, які протягом багатьох років досліджуються авторами [2, 9, 10].

У даному повідомленні наведено результати порівняльного дослідження синтезу лектинів природним штамом *Bacillus subtilis* та мутантами *B. subtilis*, що мають дефекти в генах системи репарації/рекомбінації, залежно від джерела вуглецю в живильному середовищі.

Об'єктами дослідження були природний штам *B. subtilis* ІМВ В-7014 (далі штам В-7014) — продуцент позаклітинних сіалоспецифічних лектинів, виділений з шлунково-кишкового тракту здорового новонародженого теляти (Українська колекція мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім Д. К. Заболотного НАН України), а також чотири мутанти, що складають дві ізогенні пари: *B. subtilis* SB25 (*hisH2 trpC2 rec+*) та *B. subtilis* *recP149* (*hisH2 trpC2 recP*), *B. subtilis* BD170 (*thr-5 trpC2 rec+*) та *B. subtilis* BD224 (*thr-5 trpC2 recE4*) (далі SB25, *recP149*, BD170 та BD224), які походять від ґрунтового ізоляту і одержані з Міжнародної колекції (Колумбус, Огайо, США) [11].

Культивування бактерій та одержання клітин і культуральної рідини (КР) проводили як описно раніше на середовищах Гаузе, що відрізнялися за джерелом вуглецю: у контролі

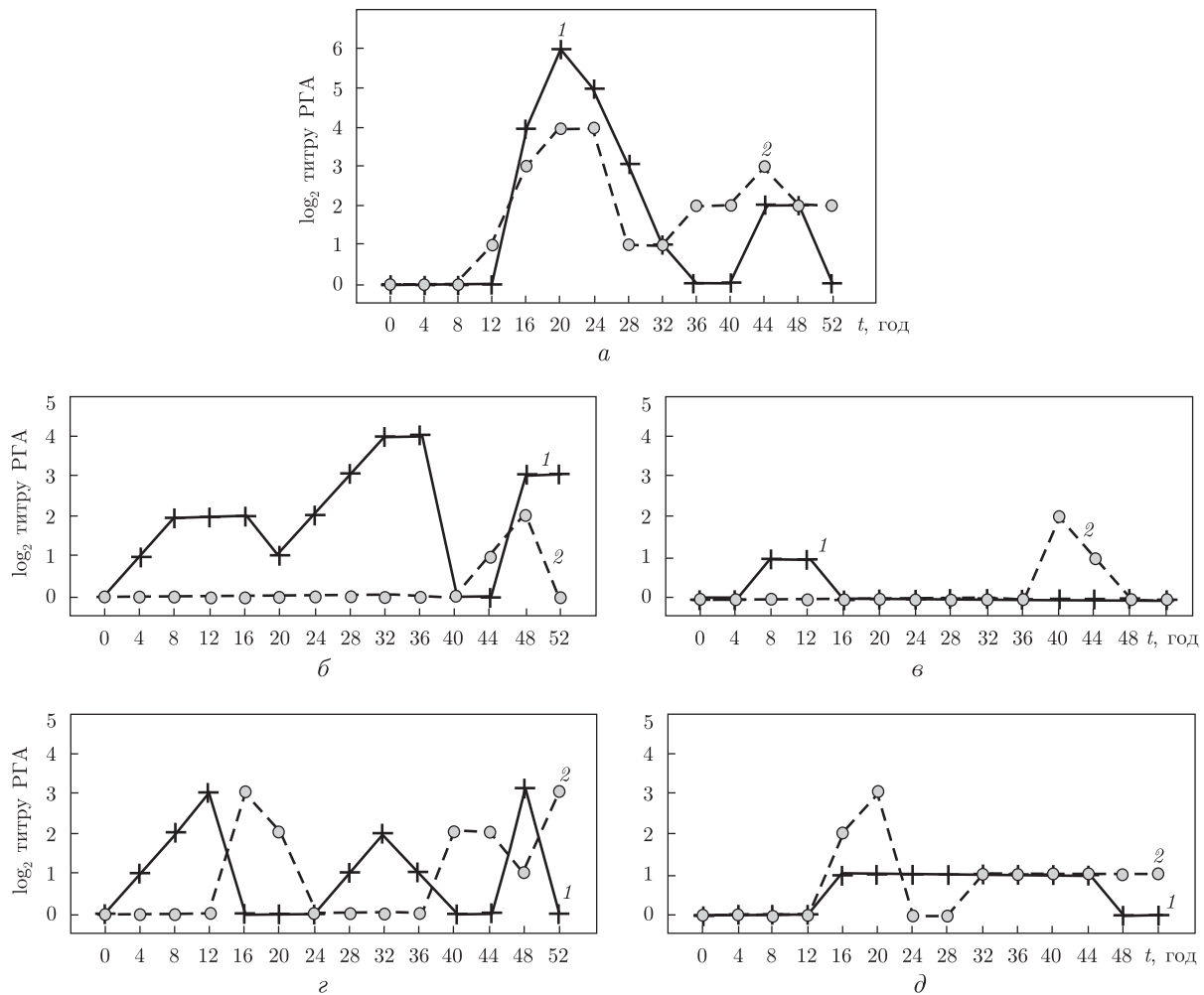


Рис. 1. Синтез позаклітинних (1) та поверхневих (2) лектинів різними штамми *B. subtilis* на середовищі Гаузе з глюкозою:  
 а — *B. subtilis* IMB B-7014; б — *B. subtilis* SB25; в — *B. subtilis* recP149; г — *B. subtilis* BD170; д — *B. subtilis* BD224

середовище містило глюкозу (1%), а в дослідних варіантах — галактозу (1%) та лактозу (1%) [9]. Присутність лектинів визначали в динаміці росту в звільненій від клітин КР (позаклітинна або вільна форма лектинів) та на поверхні нативних клітин (поверхнева або зв'язана форма лектинів) у реакції гемаглютинації (РГА) з обробленими трипсином та фіксованими глутаровим альдегідом еритроцитами кроля в серії двократних розведень [12]. Гемаглютинуючу (лектинову) активність (ГАА) визначали як  $\log_2$  титру РГА, де  $\log_2$  титру РГА 1 дорівнює 2 гемаглютинуючим одиницям (ГАО),  $\log_2$  титру РГА 2 = 4 ГАО,  $\log_2$  титру РГА 3 = 8 ГАО і т. д. Відмінності реєстрували за такими параметрами: максимальним рівнем продукування лектинів, початком їх синтезу і формою кривої накопичення лектинів та впливом мутацій на процес біосинтезу лектинів.

Згідно з одержаними даними (рис. 1), динаміка синтезу обох форм лектинів на середовищі Гаузе з глюкозою характеризувалася міжштамовими відмінностями. За максимальним рівнем лектинової активності в КР на середовищі з глюкозою штамми розподілились таким

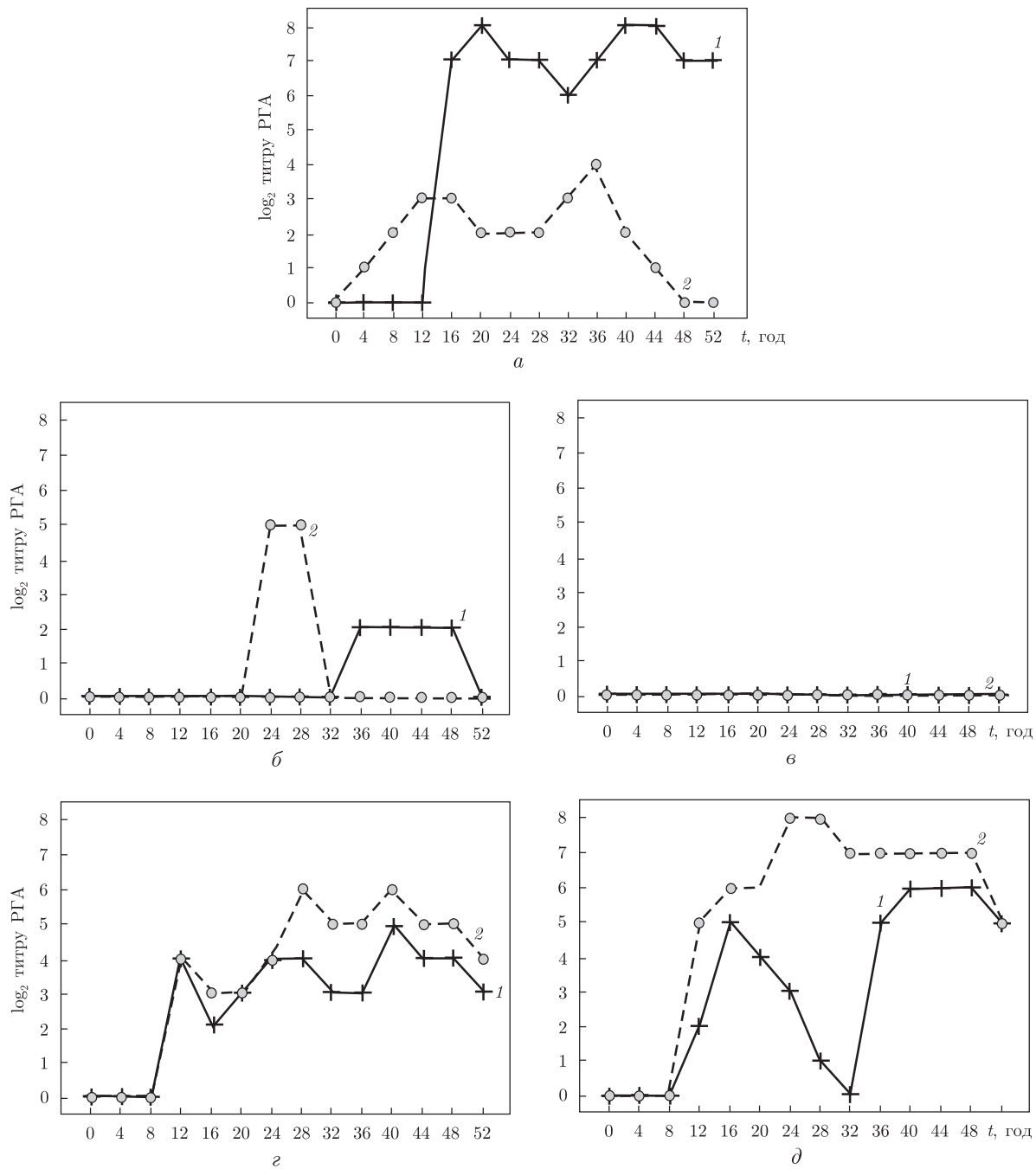


Рис. 2. Синтез позаклітинних (1) та поверхневих (2) лектинів різними штамами *B. subtilis* на середовищі Гаузе з галактозою:

*a* — *B. subtilis* IMB B-7014; *б* — *B. subtilis* SB25; *в* — *B. subtilis* recP149; *г* — *B. subtilis* BD170; *д* — *B. subtilis* BD224

чином у порядку зменшення: B-7014 > SB25 (*rec+*) > BD170 (*rec+*) > BD224 (*recE4*) = = recP149 (*recP*), що відповідало значенням ГАО 64 : 16 : 8 : 2 : 2.

Динаміка лектинової активності в КР у штамів з пошкодженою репаративною функцією описувалась кривими складної форми, які мали два (B-7014) або три піки (SB25,

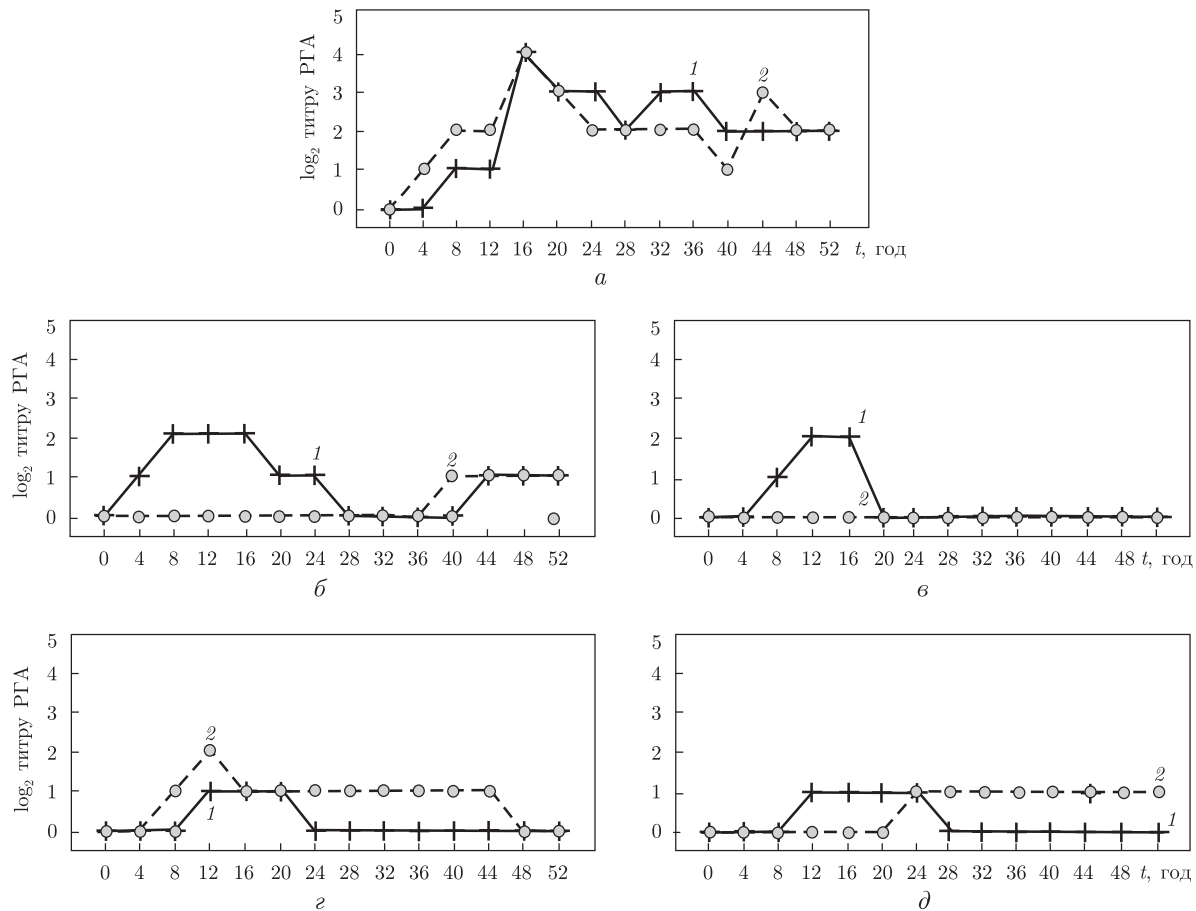


Рис. 3. Синтез позаклітинних (1) та поверхневих (2) лектинів різними штамами *B. subtilis* на середовищі Гаузе з лактозою:  
 а — *B. subtilis* IMB B-7014; б — *B. subtilis* SB25; в — *B. subtilis* recP149; г — *B. subtilis* BD170; д — *B. subtilis* BD224

BD170). Мутації в генах *recP* та *recE4* істотно пригнічували рівень продукування лектину. Слідова лектинова активність у штаму recP149 реєструвалася починаючи з 4 до 16 год, у штаму з мутацією в гені *recE4* — з 12 по 48 год росту. Лектини поверхневої форми виявлені в усіх досліджуваних штамів. За динамікою прояву мутанти відрізнялися як від природного штаму, так і між собою. За характером прояву ГАА ізогенні мутанти BD170 (*rec+*) і BD224 (*recE4*) були подібні між собою і природним штамом, але істотно відрізнялися від пари мутантів SB25 (*rec+*) та recP149 (*recP*). В останньому випадку лектинова активність з'являлась із значною затримкою (через 36–40 год росту) і не перевищувала 4 ГАО.

Заміна ключового вуглеводу на галактозу спричиняла значне підвищення (до 64 разів) рівня продукування обох типів лектинів у штамів B-7014, BD170 (*rec+*), BD224 (*recE4*) (рис. 2). У штамів SB25 (*rec+*) та recP149 (*recP*) галактоза істотно пригнічувала продукування позаклітинних лектинів. У штаму SB25 (*rec+*) максимальний рівень ГАА в КР не перевищував 4 ГАО, а у штаму recP149 (*recP*) лектинова активність не реєструвалась. Більшою мірою міжштамові відмінності виявлялися у поверхневих лектинів на середови-

щі з галактозою. Внаслідок мутації лектинова активність значно зросла і у штамів BD170 (*rec+*), BD224 (*recE4*) та SB25 (*rec+*) перевищила рівень активності природного штаму. Лише у штаму *recP149* мутація в гені *recP* призводила до повної втрати лектинової активності.

Застосування дисахариду лактози виявило загальну тенденцію до пригнічення лектинової активності, яка у природного штаму позначилася на синтезі позаклітинних лектинів, а у мутантів — на синтезі обох форм лектинів (рис. 3). На фоні незначної активності лектинів міжштамові відмінності мутантів не мали вираженого характеру.

Таким чином, за даними проведених досліджень встановлено залежність синтезу позаклітинних і поверхневих лектинів від джерела вуглецю в ростовому середовищі та генотипу штамів *B. subtilis*. Порівняно з контрольним середовищем, що містило глюкозу, найбільш виражені міжштамові особливості зафіксовані на середовищі з галактозою, де рівень продукування лектинів міг як підвищуватись до 64 разів, так і зменшуватись до повної їх відсутності; на середовищі з лактозою синтез обох форм лектинів у всіх випадках значно пригнічувався. Виявлено вплив мутацій в генах *recP* і *recE4* штамів *B. subtilis*, що належать до системи репарації/рекомбінації, на динаміку утворення лектинів вільної та зв'язаної форм, рівень їх активності, термін присутності в культуральній рідині та на поверхні клітин. Мутація в гені *recE4* сприяла значному підвищенню лектинової активності на середовищі з галактозою, а мутація в гені *recP* призводила до втрати здатності бактерій продукувати обидві форми лектинів. Встановлення впливу мутацій, які належать до системи репарації/рекомбінації, на лектинову активність штамів *B. subtilis* дозволяє висловити припущення про ймовірну причетність бациллярних лектинів до репаративної функції.

1. *Lis H., Sharon N.* Lectins. – Dordrecht: Kluwer, 2003. – 440 p.
2. *Подгорський В. С., Коваленко Э. А., Симоненко И. А.* Лектины бактерий. – Киев: Наук. думка, 1992. – 202 с.
3. *Van Damme J. M., Peumans W. J., Pustai A., Bardocz S.* Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. – Chichester: Wiley, 1998. – 451 p.
4. *Гольнская Е. Л., Погорелая Н. Ф., Макаренко В. И.* Изучение и применение лектинов. Т. 2. Лектины в биологии и медицине // Уч. зап. Тартуск. ун-та. – 1989. – Вып. 870. – С. 212–217.
5. *Карпова І. С., Корецька Н. В., Кочубей Т. О.* Здатність лектинів модулювати дію антибіотиків на ріст мутантів *Bacillus subtilis* // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 3. – С. 136–141.
6. *Луцки М. Д., Панасюк Е. Н., Луцкий А. Д.* Лектины. – Львов: Вища шк., 1981. – 152 с.
7. *Подгорський В. С., Карпова І. С., Коваленко Е. О., Корецька Н. В., Гетьман К. І., Римар С. Ю.* Участь лектинів сапрофітних бактерій *Bacillus subtilis* у репаративних процесах // Доп. НАН України. – 2005. – № 1. – С. 154–158.
8. *Тимошенко А. В.* Гликобиология и биомедицинское применение лектинов // Вестн. БГУ. Сер. 2. – 1997. – № 2. – С. 38–47.
9. *Коваленко Е. О.* Позаклітинні лектини бактерій роду *Bacillus*: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – Київ, 1999. – 36 с.
10. *Подгорський В. С., Коваленко Э. А., Гетьман Е. И., Вьюницкая В. А.* Влияние условий культивирования на продуцирование лектинов некоторыми представителями бактерий рода *Bacillus* // Микробиол. журн. – 1989. – **51**, № 6. – С. 30–34.
11. *Bacillus genetic stock center.* Strains and data. – Columbus, Ohio, 1989. – 160 p.
12. *Луцкий М. Д., Панасюк Е. Н., Антоноук В. А.* Методы поиска лектинов (фитогемагглютининов) и определение их иммунохимической специфичности: Методические рекомендации для биохимиков и иммунологов. – Львов, 1980. – 20 с.

Academician of the NAS of Ukraine **V. S. Pidgorskyy, E. O. Kovalenko,**  
**I. S. Karpova, O. V. Sashchuk, N. V. Koretska, K. I. Getman**

### **Influence of *Bacillus subtilis* mutants' genotype on lectin synthesis with use of different carbon sources**

*We research the different *Bacillus subtilis* mutants' genotype influence on the synthesis of extracellular and surface lectins by using the growth medium with different carbon sources in comparison with natural strain *B. subtilis*. The biggest interstrain features are seen on a medium with galactose, where the level of lectin production can rise by 64 times, as well as decrease to the complete absence. We discovered an impact of a mutation in *recP* and *recE4* genes *B. subtilis*, which belong to the reparation/recombination system, on the constitution dynamics of extracellular and surface lectins, level of their activity, and the duration of their presence in cultural medium and on cell surface. The mutation in *recE4* gene contributed to a considerable increase of the lectin activity on a medium with galactose; the mutation in *recP* gene resulted in a loss of the bacterial ability to produce both lectin forms. The established mutation influence on the lectin activity allowed us to presume a possible relation of bacillary lectins to the reparation function.*