

НОВИЙ МАНОЗОСПЕЦИФІЧНИЙ ЛЕКТИН ІЗ КОРЕНЕВИЩ ЛІЛІЙНИКА РУДУВАТОГО (*Hemerocallis fulva* L.): ОЧИЩЕННЯ ТА ВЛАСТИВОСТІ

В. О. АНТОНЮК^{1,2}, Л. В. ПАНЧАК^{1,2}, М. О. СТАРИКОВИЧ¹, Р. С. СТОЙКА¹

¹Інститут біології клітини НАН України, Львів;

²Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна;
e-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua

Із кореневищ лілійника рудуватого (*Hemerocallis fulva* L.) афінною хроматографією на манані із дріжджів і подальшою іонообмінною хроматографією на DEAE-Toyopearl одержано і очищено новий лектин, вихід якого становить ~ 10 мг з 1 кг свіжої рослинної сировини. Лектин виявляє високу спорідненість до дріжджового манану і низьку – до α -метил-D-манопіранозиду, D-фруктози, D-туранози і 2-ацетамідо-D-галактопіранози. Він взаємодіє з манозовмісними глікопротеїнами – яєчним альбуміном, овомукоїдом і пероксидазою коріння хропу – але зі значно нижчою афінністю. За результатами електрофорезу в 20%-му ПААГ із DSNa очищений лектин містить субодиниці з ММ 12 кДа, а за даними гель-хроматографії на колонці Toyopearl HW-55 Мм лектину становить 48 кДа. Він добре аглютинуює еритроцити кролика, децю гірше – щура та мурчака і не аглютинуює еритроцити людини. Лектин не втрачає гемаглютинуючої активності після діалізу проти 1%-го розчину ЕДТА і витримує нагрівання до 60 °С протягом 60 хв.

Ключові слова: манозоспецифічні лектини, лілійник рудуватий (*Hemerocallis fulva* L.), очищення, властивості.

Вуглеводзв'язувальні протеїни, що мають назву «лектини», або «аглютиніни», знайдено в багатьох квіткових рослинах. За своїми структурно-функціональними характеристиками усі відомі на сьогодні рослинні лектини поділяють на 7 молекулярних родин [1]. Кожна з цих родин має свій типовий центр зв'язування вуглеводів, тривимірна структура якого відрізняється від аналогічного центру інших родин лектинів. Важливою є родина манозоспецифічних лектинів однодольних, інтерес до яких за останні роки істотно зріс, оскільки вони виявляють низку унікальних властивостей, зокрема високу селективність до манозовмісних олігосахаридів, що дозволяє застосувати їх для аналізу та очищення манозовмісних глікокон'югатів [2]. Інше застосування їх в медико-біологічних дослідженнях базується на значній інгібіторній дії деяких із них на функціонування ретровірусів людини і тварин, включно з вірусом імунодефіциту людини [3, 4]. Показано також їхню здатність блокувати манозо-фібрілярні рецептори адгезії *Echerichia coli* в тонкому кишечнику щурів [5] та виявляти клітини на ранніх стадіях апоптозу [6].

Серед однодольних рослин манозоспецифічні лектини найкраще досліджено у

представників родин *Amaryllidaceae*, *Iridaceae*, *Liliaceae*, *Orchidaceae*, *Alliaceae*. Інші родини цього класу рослин досліджено мало. У той же час вони можуть містити лектини з іншою вуглеводною специфічністю і селективністю до клітин тканин ссавців.

Внаслідок пошуку лектинів серед рослин інших родин, крім згаданих вище, нами знайдено низку нових лектинів, зокрема у кореневищі лілійника рудуватого (*Hemerocallis fulva* L.), що належить до родини лілійних (*Liliaceae*), яку відносять до класу однодольних рослин (*Liliopsida*) порядку лілеєцвітих (*Liliales*).

Метою роботи було розробити метод одержання манозоспецифічного лектину із кореневищ лілійника рудуватого (*Hemerocallis fulva* L.), а також охарактеризувати деякі його фізико-хімічні і біологічні властивості.

Матеріали і методи

Лілійник рудуватий заготовляли у вересні на приватній земельній ділянці у м. Львові. Підземну частину рослини у кількості 1,0 кг відмивали від землі, подрібнювали і гомогенізували у співвідношенні 1 : 3 з 0,9%-им розчином NaCl. Одержаний гомогенат центрифугували при 6000 g 10 хв; рН

надосадової рідини доводили до 4,5 і після нейтралізації рН до 6,5–7,0 осад, що утворювались, видаляли, а протеїни надосадової рідини осаджували сульфатом амонію при 90%-му насиченні. Осад збирали центрифугуванням (6000 g, 10 хв), розчиняли у воді і після тригодинного діалізу проти води наносили на афінний сорбент – співполімер дріжджового манану і крохмалю (об'єм нанесеної проби – 90 мл, об'єм афінного сорбенту – 120 мл), спосіб одержання якого описано раніше [7]. Елюцію лектину з колонки афінного сорбенту здійснювали за допомогою 2%-го розчину D-манози, розчиненої в 0,05 М калійборатному буферному розчині з рН 8,2. Вихід протеїну з колонки контролювали за абсорбцією елюату при 280 нм. Фракції, що містили протеїн, об'єднували, висолювали сульфатом амонію і діалізували проти 0,02 М фосфатного буферного розчину (рН 7,0). Після діалізу розчин (4,2 мл) наносили на колонку DEAE-Toyorearl, об'ємом 15 мл, врівноважену тим самим буферним розчином. Збирали фракції, які спричинювали аглютинацію еритроцитів кролика та елюювалися з колонки іонообмінника в діапазоні концентрацій буферного розчину 0,02–0,1 М, рН 7,0 (рис. 1).

Інші лектини, використані в роботі (лектини м'якоти плодів банана, цибулин підсніжника і нарциса, зубців часнику, кореневих купини багатоквіткової) одержували за методикою, описаною вище, із незначними модифікаціями.

Чистоту одержаного лектину оцінювали за допомогою диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) у трис-гліциновій (рН 8,6) буферній системі, а молекулярну масу його субодиниць визначали за допомогою електрофорезу в 20%-му ПААГ у присутності 0,1%-го DSNa з використанням суміші протеїнів із відомою молекулярною масою (Fermentas, Литва).

Молекулярну масу лектину визначали гел-хроматографією на колонці Toyorearl HW-55, використовуючи як маркери яечний лізоцим (Мм = 14,3 кДа), соєвий інгібітор трипсину (Мм = 21 кДа), пероксидазу хрому (Мм = 43 кДа), лектин насіння гороху (Мм = 48 кДа), лектин підсніжника (Мм = 50 кДа), альбумін сироватки крові бика (Мм = 69 кДа) та лектин виноградного слимака (Мм = 79 кДа).

Вміст вуглеводів у препараті лектину визначали методом Dubois et al. [8], а вуглеводну специфічність одержаного лектину – в реакції пригнічення гемаглютинації еритроцитів кролика вуглеводами та глікопротеїнами. За допомогою поступового розведення вуглеводу або глікопротеїну знаходили його мінімальну концентрацію, за якої повністю пригнічувалась активність лектину з титром 1 : 4 [9].

Для характеристики вуглеводної специфічності лектину використовували: D-глюкозу, D-фруктозу, D-галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу (Союзхимреактив, Росія), рафінозу (Fluka, Швейцарія), α - і β -метил-

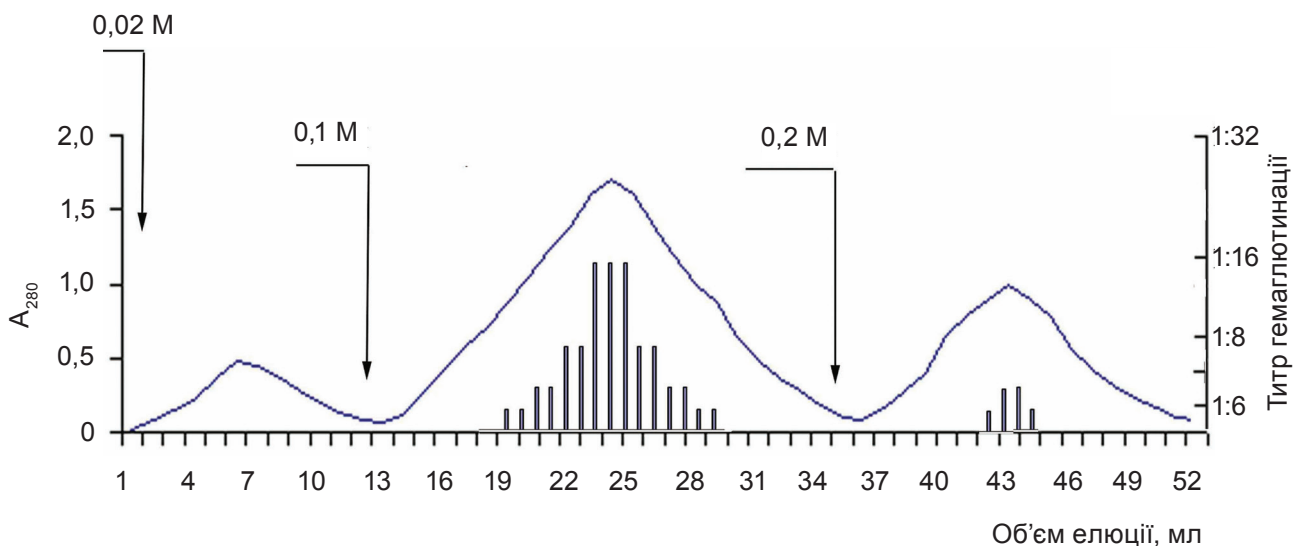


Рис. 1. Очищення лектину *Heterocallis fulva* за допомогою іонообмінної хроматографії на колонці з DEAE-Toyorearl. Стрілками вказано місце нанесення і молярність фосфатного буфера; а стовпчиками – місце елюції лектину за його гемаглютинуючою активністю щодо еритроцитів кролика (шкала праворуч)

D-галактозида, L-рамнозу, 2-ацетамідо-D-галактопіранозид та 2-ацетамідо-D-глюкопіранозид (Chemapol, Чехія), D-манозу, D-туранозу, L-рибозу (Братиславський хімічний інститут, Словаччина), мелібіозу, α -метил-D-манозид, L-фукозу (Koch Light, Велика Британія). Для вивчення взаємодії лектину із глікопротеїнами та полісахаридами використовували водорозчинний крохмаль, глікоген печінки свині, овомукоїд та тричі перекристалізований овальбумін (Biolar, Олайн, Латвія), гуміарабік та гепарин (Loba Feinchemie, Австрія), лужну фосфатазу з кишечника теляти (Serva, Німеччина), а також очищений інулін [10], дріжджовий манан [11] і тиреоглобулін бика [12].

Результати та обговорення

Лілійник рудуватий – багаторічна трав'яниста рослина висотою до 120 см із красивими великими квітами оранжевого кольору, що формою і величиною нагадують квіти лілії. Походить із Китаю, вирощується як декоративна рослина по всій території України, іноді дичавіє [13]. Застосовується в китайській народній медицині як діуретичний та проти-запальний засіб [14].

Із 1 кг свіжозібраних кореневих лілійника рудуватого одержано 9,6 мг ліофільно висушеного лектину, який має вигляд білого аморфного порошку, добре розчинного у водно-сольових розчинах при pH 3–9. Лектин витримує прогрівання при 60 °C протягом 1 год, але за 15 хв при 72 °C втрачає 75% своєї активності. Під час діалізу проти 1%-го розчину ЕДТА впродовж 8 год лектин не втрачає гемаглютинуючої активності, що може свідчити про те, що Ca^{2+} і Mg^{2+} не є необхідними для проявлення його активності. Вміст вуглеводів в одержаному препараті лектину менше 0,5%.

Під час електрофорезу в 7,5%-му ПААГ при pH 8,6 одержаний лектин рухається як одна протеїнова смуга. Електрофорез в 20%-му ПААГ у присутності 0,1%-го DSNa дозволив виявити одну протеїнову зону з Мм 12 кДа (рис. 2). Результати гель-хроматографії лектину при pH 7,2 передбачають його гомотетрамерну будову (Мм = 48 кДа).

Лектин добре аглютинуює еритроцити кролика, менше – еритроцити щура та мурчака і не аглютинуює еритроцити людини. За характером взаємодії з еритроцитами кролика, мурчака і щура лектин відрізняється від інших досліджуваних нами манозоспецифічних лектинів однодольних рослин (табл. 1). За цією

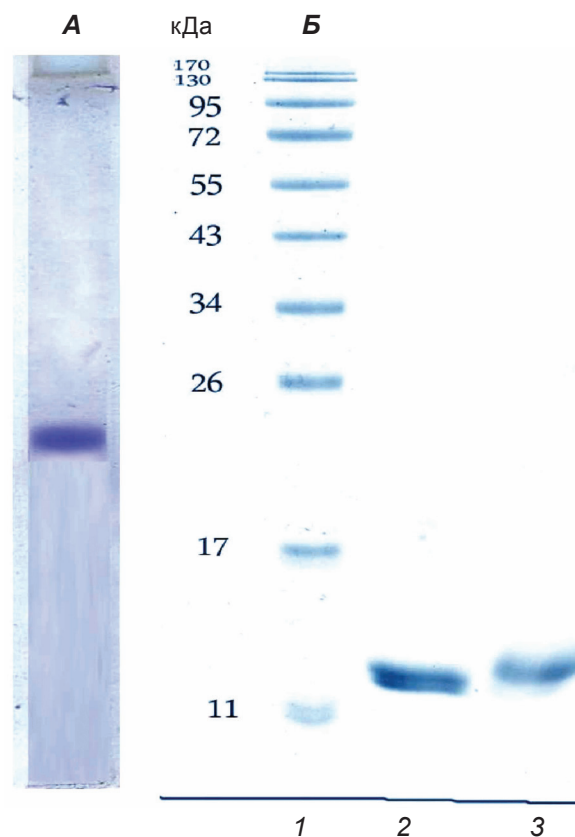


Рис. 2. Електрофореграми очищеного лектину лілійника рудуватого (Б-2) та лектину підсніжника (Б-3). Електрофорез у 7,5%-му ПААГ за pH 8,6 (А) і у 20%-му ПААГ за pH 8,6 та у присутності 0,1%-го DSNa (Б, 1 – протеїни з відомою молекулярною масою)

ознакою він є ближчим до лектину купини багатоквіткової, ніж до лектину плодів банана.

Порівнюючи вуглеводну специфічність лектину лілійника рудуватого та інших манозоспецифічних лектинів, наведених у табл. 2, можна відмітити як спільні, так і відмінні риси. Спільним є їхня слабка взаємодія з D-манозою і α -метил-D-манопіранозидом, а також сильна взаємодія із дріжджовим мананом. Саме завдяки іммобілізації останнього на нерозчинному носії нам вдалося очистити ці лектини з різних джерел. У той самий час ці лектини істотно відрізняються взаємодією з глікопротеїнами, а саме з пероксидазою коренів хрону та тиреоглобуліном бика. Лектин м'якоті банана взаємодіє з пероксидазою хрону в низькій концентрації, тоді як лектини нарциса і купини не взаємодіють із цим ферментом навіть у концентрації 1%, а для лектину лілійника рудуватого взаємодію з пероксидазою можна виявити лише при концентрації

Таблиця 1. Характеристика взаємодії манозоспецифічних лектинів із еритроцитами тварин і людини

Лектин	Мінімальна концентрація лектину (мкг/мл), що спричинює аглютинацію еритроцитів			
	Кролик	Мурчак	Щур	Людина (групи О, А, В)
HFRA	19	156	39	—
MBA	9,75	2,44	2500	—
NPA	9,75	19	312	—
GNA	9,75	312	—	—
LVA	4,88	9,75	625	—
PMRA	4,88	78	9,75	—
ASA	19	312	1250	—

«—» Означає відсутність аглютинації у концентрації 10 мг/мл. Аглютинін HFRA – *Heremocrallis fulva rhizomae* (лілійник рудуватий); MBA – *Musa banana* (банан); NPA – *Narcissus pseudonarcissus* (нарцис); GNA – *Galanthus nivalis* (підсніжник); LVA – *Leucojum vernum* (білоцвіт весняний); PMRA – *Polygonatum multiflorum rhizomae* (купина багатоквіткова); ASA – *Allium sativum* (часник)

1%. Тиреоглобулін бика добре взаємодіє з лектином купини багатоквіткової, відносно слабо зв'язується з лектинами нарциса та банана і не взаємодіє з лектином лілійника рудуватого. Нами виявлено взаємодію всіх цих лектинів із 2-ацетамідо-D-галактопіранозою, яка не має зв'язуватися манозоспецифічними лектинами. Це може свідчити, що олігоманозидна структура, в якій є 2-ацетамідо-D-галактопіранозид може бути набагато кращим лігандом для

досліджуваних лектинів, ніж олігоманозидна структура без цього вуглеводу.

Вуглеводну специфічність лектинів підсніжника, нарциса і часника достатньо добре охарактеризовано, тоді як лектини білоцвіту, купини багатоквіткової та банана вивчені менше [15]. Встановлено, що лектини підсніжника і нарциса добре взаємодіють з α 1-6-манозидами, α 1-3 та α 1-2-манозиди є слабкішими інгібіторами цих лектинів.

Таблиця 2. Характеристика взаємодії лектинів із вуглеводами та глікопротеїнами

Інгібітор	Найменша концентрація (мМ або %), що пригнічує активність 4 гемаглютинуючих одиниць лектину			
	HFRA	MBA	PMRA	NPA
α -Метил-D-манопіранозид	50	50	—	—
D-Фруктоза	50	100	—	—
Тураноза	50	25	25	100
2-Ацетамідо-D-галактопіраноза	6,25	100	12,5	12,5
Ячний альбумін	1%	0,125%	0,5%	—
Овомукоїд	1%	0,125%	—	0,5%
Пероксидаза коренів хрону	1%	0,062%	—	—
Крохмаль	0,5%	0,5%	1%	—
Дріжджовий манан	0,004%	0,004%	0,002%	0,002%
Тиреоглобулін бика	—	0,5%	0,016%	0,25%
Лужна фосфатаза кишечника теляти	—	0,5%	1%	0,25%

У таблицю не внесено: D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, L-рамноза, L-арабіноза, L-фукоза, лактоза, рафіноза, мелібіоза, 2-ацетамідо-D-глюкопіраноза, D-глюкуронова кислота, глікоген печінки свині, гуміарабік, гепарин, ламінарин, інουλін, імуноглобулін G людини, з якими лектини не взаємодіють у концентрації 100 мМ (моно- і дисахариди) або 1% (полісахариди і глікопротеїни). Скорочені назви лектинів як у табл. 1

Манотріоза – кращий інгібітор за манобіозу; α 1-6, α 1-3, α 1-4-глюкани (лінійні, розгалужені, природні і синтетичні) не взаємодіють із цими лектинами. Лектин часнику посівного, навпаки, добре зв'язує α -1-3-манозиди і слабо – α -1-6-манан. Ця властивість лектинів може бути використана для розділення структурно відмінних N-гліканів із високим вмістом манози, а також для фракціонування клітин, які мають залишки манози у складі глікокон'югатів на своїй поверхні.

Взаємодіючи із вуглеводними рецепторами на поверхні клітин, манозоспецифічні лектини здатні спричинити низку біологічних ефектів, наприклад, лектин банана діє як мітоген щодо мишачих спленоцитів, крім того, він індукує в цих клітинах продукцію γ -інтерферону, фактора некрозу пухлин та інтерлейкіну-2 [16]. Відомо, що лектини підсніжника, нарциса і деяких видів купини є сильними інгібіторами ретровірусів [17]. У той самий час вони не пригнічують синтез протеїнів на рибосомах і не виявляють полінуклеотид-аденозин глікозидазну активність [18].

Таким чином, лектини однодольних, одержані з рослин, навіть близьких видів, відрізняються за своєю вуглеводною специфічністю, що впливає на їхні біологічні властивості. У подальших дослідженнях планується використати одержані нами манозоспецифічні лектини як інструмент для виявлення специфічних типів клітин, у першу чергу патологічних та апоптичних.

НОВИЙ МАННОЗОСПЕЦИФИЧНИЙ ЛЕКТИН ИЗ КОРНЕВИЩ КРАСОДНЕВА РЫЖЕГО (*Hemerocallis fulva* L.): ОЧИСТКА И СВОЙСТВА

В. О. Антонюк^{1,2}, Л. В. Панчак^{1,2}, М. О. Старикович¹, Р. С. Стойка¹

¹Институт биологии клетки НАН Украины, Львов;

²Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Украина; e-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua

Из корневищ красоднева рыжего (*Hemerocallis fulva* L.) методом аффинной хроматографии на маннанах из дрожжей с последующей ионообменной хроматографией на DEAE-Toyopearl получен и очищен новый лектин с выходом ~ 10 мг из 1 кг свежего растительного сырья. Лектин проявляет высокое сродство к указанному маннану и слабое – к α -метил-D-маннопиранозиду, D-фруктозе, D-туранозе и 2-ацетамидо-D-галактопиранозе.

Он также связывает маннозосодержащие гликопротеины – яичный альбумин, овомукоид и пероксидазу корня хрена, но со значительно меньшей аффинностью. Электрофорезом в 20%-ом ПААГ в присутствии DSNa установлено, что лектин состоит из субъединиц с Мм 12 кДа. Молекулярная масса лектина, определенная с помощью гель-хроматографии на колонке Toyopearl HW-55, равняется 48 кДа. Он хорошо агглютинирует эритроциты кролика, меньше – крысы и морской свинки и не агглютинирует эритроциты человека. Лектин сохраняет гемагглютинирующую активность после диализа против 1%-го раствора ЭДТА и выдерживает нагревание при 60 °C на протяжении 60 минут.

Ключевые слова: маннозоспецифичные лектины, красоднев рыжий (*Hemerocallis fulva* L.), очистка, свойства.

A NEW MANNANOSE-SPECIFIC LECTIN FROM DAYLILY (*Hemerocallis fulva* L.) RHIZOME: PURIFICATION AND PROPERTIES

V. O. Antonyuk^{1,2}, L. V. Panchak^{1,2}, M. O. Starykovych¹, R. S. Stoika¹

¹Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, Ukraine;

²Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ukraine; e-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua

A new lectin was purified from the daylily (*Hemerocallis fulva* L.) with the yield of approximately 10 mg per kg of fresh plant rhizome. The purification procedure was based on application of the affinity chromatography on the column with yeast mannan and the ion-exchange chromatography on the column with DEAE-Toyopearl. The lectin possessed low affinity for α -methyl-D-mannopyranoside, D-fructose, D-turanose and 2-acetamido-D-galactopyranose and high affinity for the yeast mannan. The lectin bound with greatly less affinity for the mannose-containing glycoproteins, such as ovoalbumin, ovomucoid and horseradish peroxidase. According to the results of electrophoresis in 20% DSNa-PAGE, the lectin consists of subunits of 12 kDa molecular weight. According to the results of gel-chromatography on the Toyopearl HW-55, the lectin's molecular weight is 48 kDa. It agglutinated rabbit erythrocytes very well, while rat and guinea-pig erythrocytes were agglutinated worse, and human erythrocytes were not agglutinated at all.

Lectin's dialysis against 1% EDTA or heating to 60 °C for 60 min did not stop its hemagglutinating activity.

Key words: mannose-specific lectins, day-lily (*Heimerocallis fulva* L.), purification, properties.

1. *Van Damme E. J. M., Peumans W. J., Barre A., Rougé P.* // Crit. Rev. Plant Sci. – 1998. – **17**. – P. 575–692.
2. *Saito K., Komae A., Kakuta M. et al.* // Eur. J. Biochem. – 1993. – **217**. – P. 677–681.
3. *Balzarini J., Van Laethem K., Hatse S. et al.* // J. Virol. – 2004. – **78**. – P. 10617–10627
4. *Yang Y., Xu H. L., Zhang Z. T. et al.* // Phytomedicine. – 2011. – **18**. – P. 748–755.
5. *Pusztai A., Grant G., Spencer R. J. et al.* // J. Appl. Bacteriol. – 1993. – **75**. – P. 360–368.
6. *Bilyy R. O., Antonyuk V. O., Stoika R. S.* // J. Mol. Histology. – 2004. – **35**. – P. 829–838
7. Деклараційний патент на корисну модель № 13770. Спосіб очищення манозспецифічних лектинів / В. О. Антонюк. – Опубл. 17.04.2006, Заявка u200510008.
8. *Dubois M., Gilles K., Hamilton I. et al.* // Anal. Chem. – 1956. – **28**. – P. 350–356.
9. Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Антонюк В. А. и др. Методы исследования углеводной специфичности лектинов (методические рекомендации). Львов. – 1983. – 20 с.
10. *Лазурьевский Г. В., Терентьева И. В., Шамшурин А. А.* Практические работы по химии природных соединений. – М.: Высшая школа. – 1966. – 336 с.
11. *Методы химии углеводов* / под ред. Кочеткова Н. К. – Москва: Мир, 1967. – 512 с.
12. *Shifrin S., Consiglio E., Kohn L. D.* // J. Biol. Chem. – 1983. – **258**. – P. 3780–3786.
13. *Определитель высших растений Украины* / Доброчаева Д. Н., Котов М. И., Прокудин Ю. Н. и др. – Киев: Наукова думка, 1987. – 548 с.
14. *Konishi T., Fujiwara Y., Konoshima T. et al.* // Chem. Pharm. Bull. – 2001. – **49**. – P. 318–320.
15. *Антонюк В. О.* Лектини та їх сировинні джерела. – Львів: Кварт, 2005 – 554 с.
16. *Cheung A. H., Wong J. H., Ng T. B.* // Phytomedicine. – 2009 – **16**. – P. 594–600.
17. *Jie An, Jin-Zhi Liu, Chuan-Fang Wu et al.* // Acta Biochim. Biophys. Sin. – 2006. – **38**, N 2. – P. 70–78
18. *Van Damme Els J. M.* / in book: Induced Plant Resistance to Herbivory. – Springer Science+Business Media B.V. – 2008. – P. 285–307.

Отримано 23.11.2012