

УДК 577.1+679.8; 577.57.021+ 576

**В.С. Підгорський¹, Е.О. Коваленко¹, І.С. Карпова²,
О.В. Сашук¹, К.І. Гетьман¹, Т.О. Рубан², О.М. Сухорада², Л.Л. Лукаш²**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

ВПЛИВ ІЗОФОРМ ЛЕКТИНУ *BACILLUS SUBTILIS* ІМВ В-7014 НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ НОРМАЛЬНИХ ТА ЗЛОЯКІСНИХ КЛІТИН *IN VITRO*

Для лектинів сапрофітних бактерій, як і для лектинів рослинного та тваринного походження, встановлено структурно-функціональний поліморфізм, обумовлений субодиночною будовою їх молекул. Виявлено три ізоформи позаклітинного сіалоспецифічного лектину сапрофітного штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7014, які відрізняються між собою за фізико-хімічними та біологічними властивостями. Вплив ізоформ лектину на життєздатність та морфологію клітин ссавців у культурі *in vitro* залежить як від субодиночної організації білка, так і від типу досліджуваних клітин.

Ключові слова: *Bacillus subtilis*, лектин, ізоформи, властивості, клітини ссавців.

Останнім часом особливу увагу науковців привертають вуглеводзв'язуючі білки – лектини, які присутні в будь-якій живій системі, відіграють важливу роль у процесах біологічного впізнання та мають широкий спектр біологічних властивостей [3, 11, 13]. Основою ключових механізмів дії лектинів є специфічне зв'язування ними глікокон'югатів на поверхні клітин, що обумовлює міжклітинні взаємодії при утворенні різних біологічних спільнот [11]. Присутність лектинів у всіх організмах, починаючи від вірусів та бактерій до людини, вказує на їх фундаментальну роль у процесах життєдіяльності мікро- та макроорганізмів [13].

Лектини відомі вже більше ста років, і за цей час уявлення про ці вуглеводзв'язуючі білки постійно змінюються, а напрямки і об'єкти досліджень розширюються. Найбільш вивченими є лектини рослин. В останній час інтенсивно досліджуються лектини вищих тварин і людини. Серед лектинів мікробного походження достатньо вивчені лектини патогенних мікроорганізмів [10]. Найменш досліджені на сьогодні лектини сапрофітних бактерій, а їх біологічна роль і донині малозрозуміла.

Лектини сапрофітних бактерій довгий час були поза увагою вчених. Найбільш дослідженим лектином сапрофітних бактерій є позаклітинний сіалоспецифічний лектин сапрофітного штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7014. Для нього охарактеризовані фізіологічні особливості біосинтезу, фізико-хімічні та медико-біологічні властивості, а саме: інтерферогенні, імуномодулюючі, протипухлинні та антивірусні активності за відсутності будь-яких побічних ефектів [2, 5]. Це відкриває широкі перспективи для застосування даного лектину в різних галузях біології та медицини. Встановлено основний механізм антивірусної дії лектину бацил, який полягає у повному блокуванні поверхневих сіаловмісних рецепторів деяких вірусів, що запобігає їх подальшій адсорбції, репродукції та ініціації інфекційного процесу. Проте, не визначеним залишається питання взаємозв'язку між структурною організацією і функціональними властивостями позаклітинного лектину *B. subtilis* ІМВ В-7014.

Для всіх відомих лектинів характерне явище множинності молекулярних форм, тобто наявність набору ізоформ (ізолектинів) в одному організмі, який функціонує як єдиний регуляторний комплекс [11, 13]. Класичним прикладом може слугувати лектин квасолі звичайної (ФГА), молекула якого є тетрамером, побудованим із двох типів субодиноць: А і В. Ці субодиноць утворюють п'ять ізоформ, які відрізняються між собою за біологічними властивостями (рис. 1). Ізоформа А₄ (так звана, еритроцитарна) аглютинує еритроцити людини, а ізоформа

B_4 (лейкоцитарна) аглютинуює лімфоцити та спричиняє їх мітогенну бласттрансформацію. Цей приклад структурно-функціонального поліморфізму лектинів показує важливість дослідження окремих ізоформ лектинів для розуміння їх біологічної ролі.

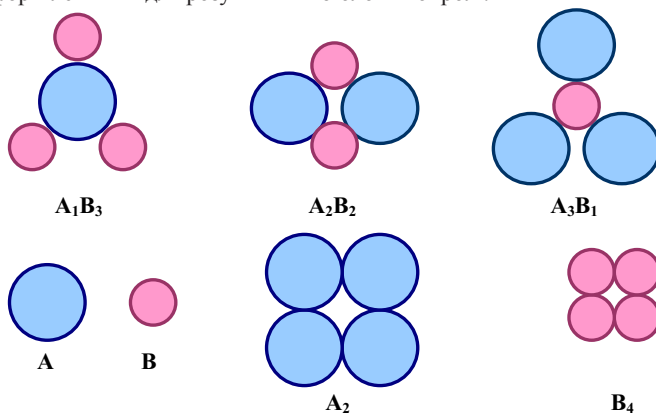


Рис. 1. Молекулярна організація лектину квасолі звичайної (ФГА):

A, B – субдиниці, A_1B_3 , A_2B_2 , A_3B_1 , A_2 , B_4 – ізоформи.

Метою роботи було визначення особливостей впливу ізоформ позаклітинного лектину сапрофітного штаму *B. subtilis* IMB B-7014 на життєздатність нормальних та злякисних клітин.

Вирішення цієї проблеми вельми актуально при створенні на базі лектинів сапрофітних мікроорганізмів ефективних лікарських засобів спрямованої дії та біорегуляторів з широким спектром активностей.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був позаклітинний сіалоспецифічний лектин сапрофітного штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7014 (далі штаму B-7014) з Української колекції мікроорганізмів IMB НАНУ, виділений із шлунково-кишкового тракту здорового новонародженого теляти.

Культивування бактерій і одержання субстанцій лектину здійснювали, як описано раніше [2, 5]. Подальшу очистку та характеристику субстанцій лектину проводили модифікованим нами методом ізоелектрофокусування без додавання амфолітів, що одержав назву автофокусування [14]. По закінченні процесу автофокусування в кожній одержаній фракції досліджували гемаглютинуючу активність та вуглеводну специфічність.

Гемаглютинуючу активність (ГАА) в культуральній рідині (КР) визначали із залученням еритроцитів кроля і барана. Наявність ГАА визначали за допомогою реакції гемаглютинації (РГА) і виражали як титр⁻¹ РГА [4]. Вуглеводну специфічність досліджували в реакції пригнічення гемаглютинації з використанням 44 вуглеводів, які згідно з класифікацією Mäkelä належать до різних класифікаційних груп [12]. Ступінь гальмування ГАА вуглеводами виражали у вигляді мінімальної дози вуглеводу, необхідної для повного інгібування РГА з еритроцитами кроля та барана.

Електрофоретичне розділення очищеної і фільтрованої субстанцій лектину проводили в SDS-ПААГ. Гелі фарбували реактивом Кумасі R-250 та азотнокислим сріблом за методом Fomsgaard [9].

Загальну кількість білка у фракціях визначали спектрофотометричним методом.

Дослідження впливу ізоформ лектину на життєздатність клітин ссавців *in vitro* здійснювали за допомогою МТТ-тесту (тест-набір CellTiter96, Promega) [8]. МТТ – 314,5-диметилтіазол-2-іл-1-2,5-дифенілтетразолію бромід, триазоліл голубий. Кількість життєздатних клітин оцінюється за зміною показника абсорбції МТТ – водорозчинної солі тетразолію, яку дегідрогенази живих клітин можуть перетворювати у забарвлену речовину формазаз з максимумом абсорбції при 570 нм.

Мікроскопічні дослідження проводили на мікроскопі Leica, збільшення 10x20; фотоапарат Canon.

Статистичну обробку результатів проводили, враховуючи параметричні та непараметричні критерії значущості [1].

Результати та їх обговорення. Раніше нами було проведено визначення деяких характеристик позаклітинного сіалоспецифічного лектину сапрофітного штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7014 [6, 7]. Встановлено, що даний лектин представляє собою комплекс щонайменше трьох ізоформ, які відрізняються між собою за фізико-хімічними, гемаглютинуючими та вуглеводз'язувальними властивостями. Нами проведені більш детальні дослідження виявлених ізоформ лектину штаму В-7014, результати підсумовано в табл. 1.

Таблиця 1.

Характеристика ізоформ позаклітинного сіалоспецифічного лектину сапрофітного штаму *B. subtilis* ІМВ В-7014

Властивості		І з о ф о р м а		
		ІФ-К	ІФ-П	ІФ-Л
Молекулярна маса		50 кДа	40 кДа	55 кДа
Заряд		(-)	(±)	(+)
рН		2,5 – 3,0	6,0 – 6,5	8,5 – 9,0
Максимальна ГАА	крізь	РЕАКЦІЯ ВІДСУТНЯ	16 ГАО	1024 ГАО
	баран	512 ГАО	РЕАКЦІЯ ВІДСУТНЯ	РЕАКЦІЯ ВІДСУТНЯ
Вуглеводна специфічність		муцин	Н-ацетилнейрамінова кислота	сіалолактоза

Примітка: ізоформи (ІФ) з кислої (К), проміжної (П) та лужної (Л) зон рН.

Використання методу ізоелектрофокусування дозволило виявити три ізоформи (ІФ) лектину: в кислій (К), проміжній (П) і лужній (Л) зонах рН, яким присвоєно наступні позначення: ІФ-К, ІФ-П та ІФ-Л, відповідно. В кислій зоні концентрується мажорний білок із молекулярною масою (ММ) 50 кДа. Ізоформа ІФ-К має негативний заряд молекули, концентрується в зоні рН 2,5-3,0, аглютинуює еритроцити барана з максимальною активністю 512 гемаглютинуючих одиниць (ГАО) та має специфічність до муцину підщелепної залози бика.

У проміжній слабо кислій зоні рН (6,0-6,5) фракції лектину виявлено ізоформу ІФ-П з ММ 40 кДа. Даний білок взаємодіє також з еритроцитами кроля і характеризується незначною гемаглютинуючою активністю (16 ГАО) та спорідненістю до N-ацетилнейрамінової кислоти.

Дослідження фракцій лектину з лужної зони рН дозволило виявити наявність білка ІФ-Л з масою 55 кДа, позитивним зарядом молекули, який переміщується в зону рН 8,5-9,0, аглютинуює еритроцити кроля, має максимальну активність 1024 ГАО і проявляє афінність до сіалолактози.

Біологічні характеристики цих ізоформ потребували поглибленого вивчення для цілеспрямованого відбору ізоформ із певними медико-біологічними ефектами. Для подальшого з'ясування біологічної активності ізоформ бактерійного лектину, зокрема, цитостатичної дії, було проведено визначення особливостей впливу найбільш активних ізоформ ІФ-К і ІФ-Л на життєздатність нормальних та злякано трансформованих клітин ссавців у культурі *in vitro*.

У культурі первинних фібробластів ембріонів миші (нормальні клітини) цитостатична дія ізоформи ІФ-Л спостерігається у всьому діапазоні концентрацій (рис. 2). Для іншої ізоформи ІФ-К цитостатичний ефект менш виражений і відмічається для двох концентрацій: 0,2 та 2,0 мкг/мл.

Дослідження впливу ізоформ лектину на умовно-нормальні клітини показало, що обидві ізоформи не знижують їхню життєздатність (рис. 3). Для концентрації 2,0 мкг/мл для обох ізоформ відмічається стимуляція проліферації клітин китайського хом'ячка, більш виражена для ізоформи ІФ-Л.

Найбільш чутливими до дії ізоформи ІФ-К виявились злякано трансформовані клітини лінії HeLa (рис. 4). Показано, що попередня обробка клітин даною ізоформою достовірно знижує їх проліферативну активність, навіть у найменшій із застосованих концентрацій. Друга ізоформа за цих умов достовірного впливу на життєздатність ракових клітин не виявляє.

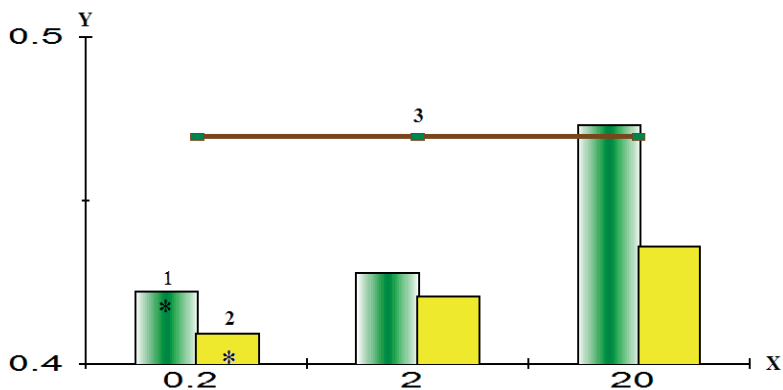


Рис. 2. Вплив ізоформ лектину штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7014 на життєздатність первинних фібробластів миші:

1 – ізоформа ІФ-К, 2 – ізоформа ІФ-Л, 3 – контроль;
 X – концентрація препарату, мкг/мл; Y – абсорбція, 570 nm;
 * – достовірні відхилення від контролю ($p < 0,05$).

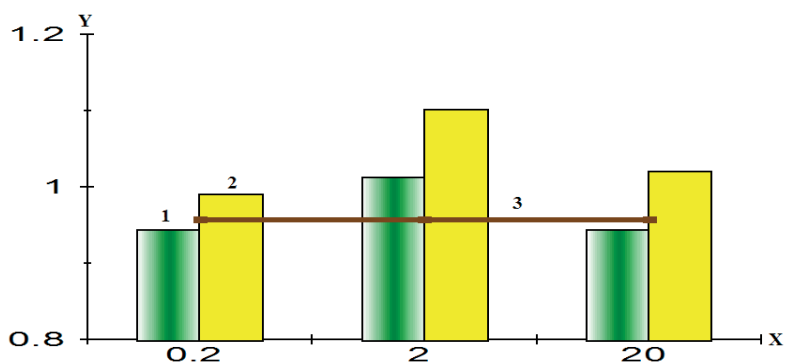


Рис. 3. Вплив ізоформ лектину штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7014 на життєздатність клітин лінії китайського хом'ячка:

1 – ізоформа ІФ-К, 2 – ізоформа ІФ-Л, 3 – контроль;
 X – концентрація препарату, мкг/мл; Y – абсорбція, 570 nm.

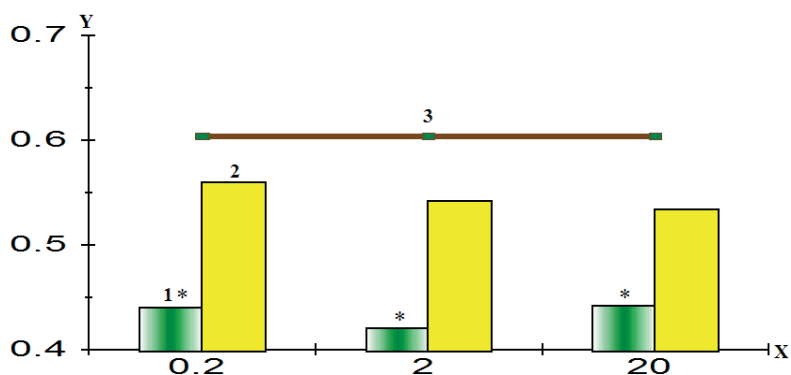


Рис. 4. Вплив ізоформ лектину штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7014 на життєздатність клітин лінії HeLa:

1 – ізоформа ІФ-К, 2 – ізоформа ІФ-Л, 3 – контроль;
 X – концентрація препарату, мкг/мл; Y – абсорбція, 570 nm
 * – достовірні відхилення від контролю ($p < 0,05$).

Таким чином, ізоформи бактерійного лектину по-різному впливають на життєздатність клітин ссавців *in vitro*. Ізоформа ІФ-К справляє суттєвий цитостатичний ефект на ракові клітини. Ізоформа ІФ-Л проявляє цитостатичну дію щодо нормальних клітин і спричиняє стимуляцію проліферації умовно-нормальних клітин ссавців.

В медичній практиці треба враховувати різну біологічну дію ізоформ лектину, де для однієї мети може бути придатна одна ізоформа лектину, а для другої – оптимальною може бути зовсім інша ізоформа.

На користь такого припущення свідчать проведені мікроскопічні дослідження дії нативного лектину і його ізоформ на морфологію і утворення моношару клітин китайського хом'ячка.

Для концентрації препаратів 2,5 мкг/мл порівняно з необробленим контролем у разі нативного лектину спостерігається суттєве порушення утворення моношару, можливо, за рахунок ослаблення міжклітинних контактів та адгезії до субстрату. В разі дії обох ізоформ утворюється щільний моношар, але для ізоформи ІФ-Л відмічається виражена вакуолізація клітин.

При підвищенні концентрації препаратів до 5,0 мкг/мл відмінності їх дії менш виражені, тільки для ізоформи ІФ-Л на фоні вакуолізації спостерігається поява окремих мертвих клітин.

Для концентрації препаратів 10,0 мкг/мл зафіксовано появу вакуолізації при дії нативного лектину.

Результати світлової мікроскопії щодо впливу бактерійного лектину і його ізоформ на морфологію і утворення моношару клітин ссавців свідчать про можливість існування різних шляхів їх дії на мембранному і внутрішньоклітинному рівні.

Отримані результати свідчать про те, що позаклітинний сіалоспецифічний лектин сапрофітного штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7014 існує у вигляді комплексу ізоформ (з кислої, лужної та проміжної зон рН), які відрізняються між собою за напрямком руху в електричному полі, локалізацією згідно з різними значеннями рІ, електрофоретичною рухливістю, спорідненістю до еритроцитів тварин різної видової належності, рівнем активності та ступенем афінності до різних сіаловмісних вуглеводів.

В попередніх дослідженнях нами було показано, що лектин штаму *B. subtilis* IMB B-7014 має дві субодиниці: А – з молекулярною масою в межах 25 кДа та В – з мМ 10 кДа [2].

В нашій роботі ми керувались такою робочою гіпотезою. По аналогії з класичним лектином ФГА (див. «Вступ») субодиниці А і В досліджуваного лектину можуть утворювати п'ять ізоформ: першу – A_4 з мМ 100 кДа, другу – B_4 з мМ 40 кДа, третю – A_1B_3 з мМ 55 кДа, четверту – A_2B_2 з мМ 70 кДа та п'яту – A_3B_1 з мМ 85 кДа.

Нами виявлено тільки три ізоформи лектину штаму B-7014: ІФ-К, ІФ-П та ІФ-Л (табл. 1, рис. 5).

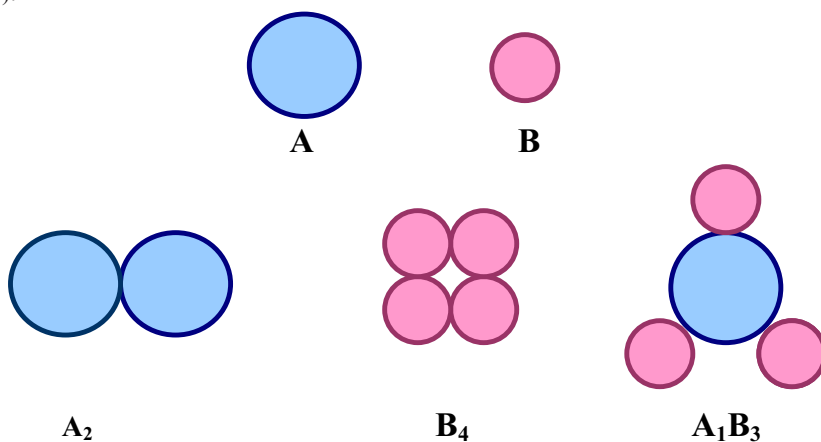


Рис. 5. Ізоформи лектину штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7014.

Молекулярна маса (мМ) ІФ-К дорівнює 50 кДа; вірогідно, це димер типу A_2 , що складається з двох субодиниць з мМ 25 кДа.

ІФ-П уявляє собою білок з мМ 40 кДа; скоріш за все, це тетрамер B_4 , який побудований з чотирьох В субодиниць з мМ 10 кДа.

ІФ-Л з мМ 55 кДа відповідає структурі тетрамера A_1B_3 , який має у своєму складі різні субодиниці у сполученні однієї А і трьох В субодиниць.

Тобто, позаклітинний сіалоспецифічний лектин сапрофітного штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7014 має три ізоформи, які представлені одним гомодимером A_2 з мМ 50 кДа і двома тетрамерами: гомотетрамером B_4 з мМ 40 кДа і гетеротетрамером A_1B_3 з масою 55 кДа, що відрізняються між собою за фізико-хімічними та біологічними властивостями (рис. 5).

Слід зазначити, що три ізоформи даного лектину синтезуються за умов культивування, які були оптимізовані нами раніше для одержання сіалоспецифічного лектину як антивірусного засобу. Це не виключає можливості існування інших ізоформ лектину штаму В-7014 при інших умовах культивування продуцента.

При встановленні біологічної активності ізоформ бактерійного лектину показано, що вплив ізоформ лектину штаму В-7014 на життєздатність нормальних і злоякісно трансформованих клітин ссавців в культурі *in vitro* залежить від субодиничної організації білка і від типу клітин. Найчутливішими до цитостатичної дії ізоформи A_2 є ракові клітини. Ізоформа A_1B_3 проявляє цитостатичну дію відносно нормальних клітин і стимулює проліферацію умовно-нормальних клітин китайського хом'ячка.

Принципово різний вплив нативного лектину і його ізоформ на життєздатність та морфологію клітин ссавців свідчать про взаємодію цих білків із різними поверхневими рецепторами та їхню здатність до активації різних сигнальних систем.

Таким чином, для лектинів сапрофітних бактерій, як і для лектинів рослинного та тваринного походження, встановлено структурно-функціональний поліморфізм, обумовлений субодиничною будовою їх молекул. Якісна різниця, що проявляється у відмінностях ізоформ за їх властивостями, може бути поясненням широкого спектру біологічних активностей даних лектинів.

Ізолектини сапрофітного штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7014 можуть знайти практичне застосування для виявлення особливостей клітинної поверхні трансформованих клітин та як потенційні регулятори проліферації клітин ссавців у культурі. Здатність ізоформи A_2 вибірково пригнічувати проліферацію злоякісно трансформованих клітин *in vitro* свідчить про перспективність його можливого використання для потреб біомедицини.

**В.С. Подгорский¹, Э.А. Коваленко¹, И.С. Карпова²,
Е.В. Сацук¹, Е.И. Гетьман¹, Т.А. Рубан², Е.М. Сухорада², Л.Л. Лукаш²**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

ВЛИЯНИЕ ИЗОФОРМ ЛЕКТИНА *BACILLUS SUBTILIS* ИМВ В-7014 НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НОРМАЛЬНЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Резюме

Для лектинов сапрофитных бактерий, как и для лектинов растительного и животного происхождения, установлен структурно-функциональный полиморфизм, обусловленный субъединичным строением их молекул. Выявлены три изоформы внеклеточного сialоспецифичного лектина сапрофитного штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7014, отличающиеся между собой по физико-химическим и биологическим свойствам. Влияние изоформ лектина на пролиферацию и морфологию клеток млекопитающих в культуре *in vitro* зависит от субъединичной организации белка и от типа исследуемых клеток.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, лектин, изоформы, свойства, клетки млекопитающих.

**THE INFLUENCE OF LECTIN ISOFORMS OF *BACILLUS SUBTILIS*
SAPROPHYTIC STRAIN IMV B-7014 ON VIABILITY OF NORMAL AND
CANCER CELLS *IN VITRO***

S u m m a r y

Structural and functional polymorphism of saprophytic bacterium lectin was demonstrated to be due to subunit organization of the molecule as it was shown for many lectins of plant and animal origin. Three isoforms of extracellular sialic acid-specific lectin produced by *Bacillus subtilis* saprophytic strain IMV B-7014 were discovered that differed for physicochemical and biological properties. The influence of the lectin isoforms on mammalian cells proliferation and morphology *in vitro* depends both on the subunit organization of the protein molecule and the type of cells under study.

The paper is presented in Ukrainian.

К е y w o r d s: *Bacillus subtilis*, lectin, isoforms, properties, mammalian cells.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Pidgorsky V.S., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Вознесенский В.Л. Первичная обработка экспериментальных данных / В.Л. Вознесенский. – Ленинград: Наука, 1969. – 84 с.
2. Коваленко Е.О. Позаклітинні лектини бактерій роду *Bacillus*: Автореф. дис. д-ра біол. наук. – К., 1999. – 36 с.
3. Луцук М. Д., Панасюк Е. Н., Луцук А. Д. Лектины. – Львов: Вища школа, 1981. – 152 с.
4. Луцук М.Д., Панасюк Е.Н., Антонюк В.А. Методы поиска лектинов (фитогемагглютининов) и определение их иммунохимической специфичности: Методические рекомендации для биохимиков и иммунологов. – Львов, 1980. – 20с.
5. Підгорський В.С., Коваленко Э.А., Симоненко И.А. Лектины бактерий – Киев: Наук. думка, 1992. – 204 с.
6. Підгорський В.С., Коваленко Е.О., Карпова І.С., Сацук О.В., Пальчиковська Л.Л., Корецька Н.В., Гетьман К.І. Ізоформи лектину *Bacillus subtilis* IMB B-7014 // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 5. – С. 9–13.
7. Підгорський В.С., Коваленко Е.О., Карпова І.С., Сацук О.В., Гетьман К.І. Структурна характеристика позаклітинного лектину сапрофітної культури *Bacillus subtilis* IMB B-7014 // Доповіди НАН України. – 2010. – № 9. – С. 143–149.
8. Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F. et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing // Cancer Res. – 1987. – 47, N 1. – P. 936–942.
9. Fomsgaard A., Freudenberg M.A., Galanos C. Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels // J. Clin. Microbiol. – 1990. – 28, N 12. – P. 2627–2631.
10. Gilboa-Garber N., Avichezer D., Garber N.C. Bacterial lectins: properties, structure, effects, function and applications // Glycosciences: Status and Perspectives / [Gabius H.-J., Gabius S., eds.]. – Weinheim: Chapman and Hall, 1997. – P. 369–398.
11. Lis H., N. Sharon. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition // Chem. Rev. – 1998. – 98. – P. 637–674.
12. Mäkelä O. Studies in hemagglutinins of leguminose seeds // Ann. Med. Exp. Biol. Fenniae. – 1957. – 35 Suppl. – P. 11–53.
13. Sharon N., Lis H. Lectins. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. – 440 p.
14. Sova O. Autofocusing – a method for isoelectric focusing without carrier ampholytes // J. Chromatography. – 1985. – 320. – P.15–22.

Отримано 16.05.2011