

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

Структурна характеристика позаклітинного лектину сапрофітної культури *Bacillus subtilis* ІМВ В-7014

Досліджено деякі особливості структурної організації позаклітинного сіалоспецифічного лектину сапрофітного штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7014. Встановлено, що він являє собою комплекс ізоформ, які відрізняються між собою за фізико-хімічними та біологічними властивостями, а саме: напрямком руху в електричному полі, локалізацією згідно з різними значеннями pI , електрофоретичною рухомістю, рівнем активності, ступенем афінності до різних вуглеводів та спорідненістю до еритроцитів тварин різної видової належності. Характерною ознакою для всіх ізоформ лектину є наявність молекулярної одиниці з масою 50 кДа, саме якій притаманні лектинові властивості: гемаглютинуюча активність та спорідненість до сіалових кислот і сіаловмісних глікокон'югатів.

Лектини складають окрему групу білків неімунної природи, які здатні вибірково та зворотно зв'язувати вуглеводи та вуглеводвмісні глікокон'югати. Вони відомі вже понад 120 років і виявлені у представників усього живого світу. Найменш дослідженими є лектини мікроорганізмів, здебільшого це стосується представників сапрофітної мікрофлори [1, 2].

Серед лектинів сапрофітних мікроорганізмів на сьогодні найбільш дослідженими є позаклітинні лектини сапрофітних бактерій роду *Bacillus*, а серед останніх — позаклітинний лектин штаму *B. subtilis* ІМВ В-7014. Цей лектин одержаний у вигляді препаратів різного ступеня очищення та детально охарактеризований. Визначені його різноманітні властивості та встановлена унікальна здатність розпізнавати тонкі структури сіалових кислот. За своїми фізико-хімічними характеристиками даний лектин відповідає світовим стандартам сіалоспецифічних лектинів, але має перевагу перед останніми за високим рівнем активності та афінності до сіалових кислот, за медико-біологічними активностями і відсутністю токсичних та алергічних властивостей [2, 3]. Проте до цього часу не визначеними залишаються його структурні особливості. Вирішення цієї проблеми є необхідним для створення лікарських засобів спрямованої дії та біорегуляторів з широким спектром активностей.

Об'єктом дослідження був позаклітинний лектин сапрофітного штаму *B. subtilis* ІМВ В-7014, виділеного із шлунково-кишкового тракту здорового новонародженого теляти (Українська колекція мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України). Культивування бактерій та одержання лектину здійснювали як описано раніше [4]. Експерименти по вивченню субодиничної організації позаклітинного лектину штаму В-7014 проведені за допомогою методу автофокусування без застосування комерційних амфолітів [5, 6]. По закінченні даного процесу в кожній одержаній фракції досліджували гемаглютинуючу (лектинову) активність (ГАА) щодо еритроцитів кроля та барана [7]. ГАА визначали як \log_2 титру реакції гемаглютинації (РГА), де \log_2 титру⁻¹ РГА 1 дорівнює 2 гемаглютинуючим одиницям (ГАО), \log_2 титру⁻¹ РГА 2 = 4 ГАО, \log_2 титру⁻¹ РГА 3 = 8 ГАО тощо. Загальну кількість білка у фракціях визначали спектрофотометричним методом. Вуглеводну специфічність досліджували в реакції пригнічення гемаглютинації [7]. Для



Рис. 1. Характеристика молекулярних форм препарату позаклітинного лектину *B. subtilis* ІМВ В-7014

цього використовували набір із 44 вуглеводів та глікокон'югатів. Ступінь гальмування ГАА вуглеводами виражали у вигляді мінімальної дози вуглеводу, необхідної для повного інгібування РГА з еритроцитами кроля та барана. Електрофоретичне розділення субстанції лектину проводили в системі SDS-ПААГ за методом Laemmli [8]. Після завершення процесу розділення гелі фарбували реактивом Кумасі R-250 та азотнокислим сріблом за методом Fomsgaard [9]. Молекулярну масу досліджуваних зразків визначали за допомогою набору електрофоретичних маркерів ("Sigma", США) з молекулярними масами 220, 100, 60, 45, 30 та 20 кДа. У роботі представлені середні значення 3–5 дослідів та їх середня квадратична помилка. Усі отримані результати оброблені статистично [10, 11].

За допомогою методу автофокусування виявлено, що субстанція лектину складається з молекулярних форм двох типів: домінуючої кислої (А) і в мінорній кількості лужної (В) (рис. 1). Кисла форма лектину концентрується в діапазоні кислих значень рН 1,5–4,0 (див. рис. 1, А). Дана форма проявляє спорідненість як до еритроцитів барана, так і кроля. Максимальний рівень ГАА в реакції з еритроцитами барана становить 256 ГАО (\log_2 титру⁻¹ РГА = 8); з підвищенням значень рН лектинова активність зменшується до 8 ГАО. Найбільшу афінність до еритроцитів кроля зареєстровано при значеннях рН близько 2,0; ГАА дорівнює 512 ГАО. Лужна форма лектину, що формується при значеннях рН близько 12,0, аглютинує виключно еритроцити кроля, проте характер прояву та рівень лектинової активності в даному випадку незначний і не перевищує 4 ГАО (див. рис. 1, В).

З метою детальнішої характеристики даного лектину були проведені дослідження із залученням методу електрофорезу в системі SDS-ПААГ. Після проведення електрофорезу з наступним фарбуванням гелю реактивом Кумасі на електрофореграмі було виявлено п'ять молекулярних компонентів з масою в діапазоні від 60 до 20 кДа (рис. 2, І). До складу виявленого комплексу входять два мажорні поліпептиди з молекулярними масами близько 50 і 25 кДа (див. рис. 2, І, а, d). Мінорні структури мають молекулярну масу приблизно 40, 35 і 20 кДа (див. рис. 2, І, b, c, e).

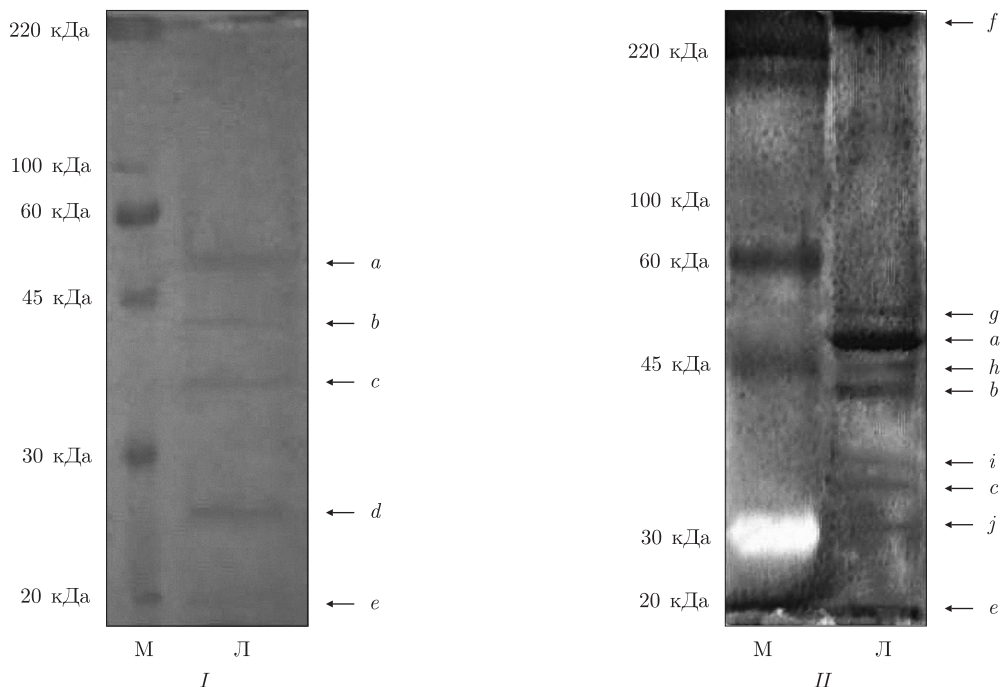


Рис. 2. Електрофореграма позаклітинного лектину штаму *B. subtilis* IMB B-7014: *I* — фарбування реактивом Кумасі; *II* — фарбування азотнокислим сріблом; М — маркерні білки, Л — лектини, *a–j* — індивідуальні пептиди

У попередніх дослідженнях показано, що позаклітинний лектин штаму B-7014 являє собою глікопротеїн з високим вмістом вуглеводної частини [3]. У зв'язку з цим додатково було використано методику фарбування вуглеводів у поліакриламідних гелях [9]. При фарбуванні гелів азотнокислим сріблом на електрофореграмі виявлено щонайменше дев'ять пептидів, серед яких виділено чотири мажорні з масою більше 220 кДа та близько 50, 40 і 20 кДа (див. рис. 2, *II, f, a, b* та *e*). Поліпептид з молекулярною масою більше 220 кДа, ймовірно, утворюється за рахунок агрегації субодиниць з меншою молекулярною масою, що відповідає одержаним раніше даним [3]. У діапазоні 60–30 кДа виявлені п'ять мінорних компонентів, маса найбільшого з яких становить 55 кДа (див. рис. 2, *II, g, h, i, c, j*).

Порівняння електрофореграм субстанції позаклітинного лектину, фарбованих за двома різними методиками, показало, що поліпептиди з масою 50, 40 та 20 кДа характерні для обох випадків. Відсутність на обробленій азотнокислим сріблом електрофореграмі структури, яка б відповідала пептиду *d* електрофореграми, фарбованої Кумасі, свідчить про її виключно білкову природу. У той же час наявність додаткових одиниць можна пояснити екрануванням білкової частини лектину вуглеводними залишками, які, як правило, є гідрофільними і добре зафарбовуються сріблом.

Додатково було проведено дослідження електрофоретичної рухомості всіх фракцій лектину, отриманих під час автофокусування. Найбільша ГАА з еритроцитами кроля спостерігається у кислої фракції 4 (512 ГАО). За даними електрофорезу, ця фракція є найбільш подібною за спектром наявних компонентів до субстанції нефракціонованого (нативного) лектину (рис. 3). Вона характеризується наявністю, як мінімум, п'яти структур з молекулярними масами більше 220 та близько 50, 40, 35 і 30 кДа, що відповідає пептидам *f, a, b, c* та *j* нативного лектину. Таким чином, високий рівень ГАА кислої фракції 4 лектину

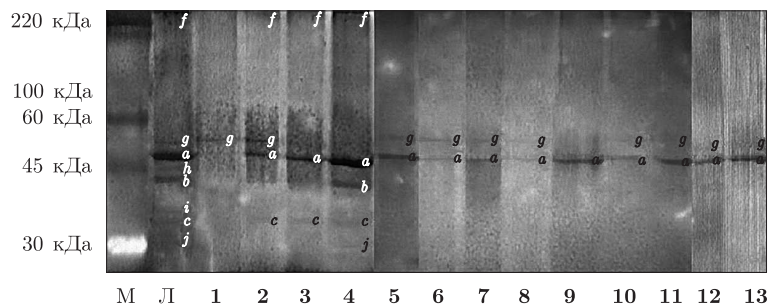


Рис. 3. Електрофореграма кислих фракцій (1–13) позаклітинного лектину штаму *B. subtilis* IMB V-7014: М — маркерні білки, Л — лектини, а–j — індивідуальні пептиди

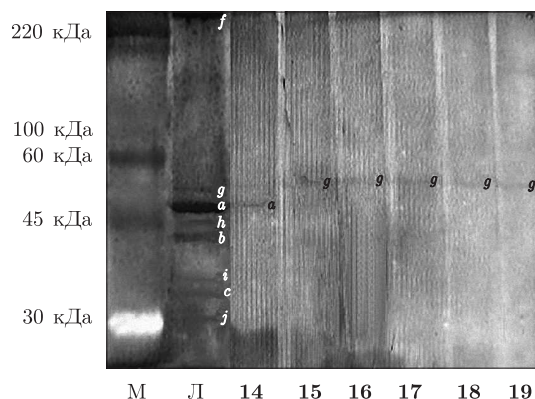


Рис. 4. Електрофореграма лужних фракцій (14–19) позаклітинного лектину штаму *B. subtilis* IMB V-7014: М — маркерні білки, Л — лектини, а–j — індивідуальні пептиди

в реакції з еритроцитами кроля, вірогідно, забезпечується наявністю в складі досліджуваних лектинів трьох мажорних одиниць з молекулярними масами більше 220 та близько 50 і 40 кДа.

У інших кислих фракцій (5–13) лектину виявлено мажорну структуру з молекулярною масою 50 кДа та мінорну з приблизною масою 55 кДа.

На електрофореграмі лужних фракцій (14–19) лектину, які проявляють спорідненість тільки до еритроцитів кроля, виявлено присутність нечітко виражених структур з молекулярною масою 55 кДа у фракціях 15–19 і 50 кДа — у фракції 14 (рис. 4).

Дослідження ГАА та молекулярних характеристик різних фракцій даного лектину, отриманих під час автофокусування, свідчить про те, що лектинові властивості притаманні лише субодиницям з молекулярною масою 50 кДа та більше 220 кДа, остання з яких, імовірно, утворилася за рахунок агрегації з декількох попередніх пептидів.

Визначальною характеристикою лектинів будь-якого походження є їх здатність зв'язувати вуглеводи та вуглеводвмісні біополімери [1, 2]. З метою виявлення таких властивостей у фракцій лектину штаму V-7014 проведено дослідження їх ГАА та спорідненості до різних вуглеводів з використанням еритроцитів кроля і барана та набору вуглеводів, які згідно з класифікацією Mäkelä належать до різних класифікаційних груп [2]. Отримані результати наведені в табл. 1, 2.

Рівень ГАА нативної субстанції лектину в реакції з еритроцитами кроля досягає максимальних значень 2048–4096 ГАО. Досліджений лектин проявляє рідкісну для лектинів

будь-якого походження спорідненість до сіалових та уронових кислот, яка представлена в порядку зменшення: муцин підщелепної залози бика (містить у своєму складі обидва типи сіалових кислот) > глюкуронова кислота > N-ацетилнейрамінова кислота = галактуоронова кислота (див. табл. 1).

При вивченні гемаглютинуючих властивостей одержаних при автофокусуванні фракцій лектину максимальні значення ГАА зареєстровані в кислій фракції 4, для якої рівень активності досягає 512 ГАО. У інших фракцій лектину (1–3, 5–10, 15 та 19) активність незначна і коливається в діапазоні значень 2–4 ГАО. У фракціях 11–14 і 16–18 виявлено слідову ГАА або вона відсутня.

Визначення вуглеводної специфічності фракцій лектину в реакції з еритроцитами кроля дозволило виявити вуглеводзв'язуючі властивості лише у фракції 4. Найбільшу афінність вона проявляє до муцину підщелепної залози бика, а також до N-ацетилнейрамінової і D-галактуороної кислот та D-глюкозаміну. У інших фракціях визначення вуглеводної специфічності було неможливим у зв'язку з низьким рівнем ГАА або її відсутністю.

Таблиця 1. Лектинова активність та вуглеводна специфічність фракцій позаклітинного лектину сапрофітного штаму *B. subtilis* ІМВ В-7014 (з еритроцитами кроля)

Зразок лектину	ГАА, ГАО	Мінімальні інгібуючі РГА концентрації вуглеводів, мМ						
		D-глюкозамін	D-галактозамін	Фруктозо-1,6-бісфосфат	D-глюкуронова кислота	D-галактуоронова кислота	N-ацетилнейрамінова кислота	Муцин підщелепної залози бика*
Нативний лектин	2048–4096	75,0	37,5	30,0	3,75	15,0	15,0	0,0625
Фракції 1–3	2–4	0	0	0	0	0	0	0
Фракція 4	512	37,5	0	0	0	37,5	37,5	0,312
Фракції 5–14	0–2	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
Фракція 15	4	0	0	0	0	0	0	0
Фракції 16–19	0–2	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в

Примітка. н/в – вуглеводна специфічність не визначена. *Мінімальні інгібуючі РГА концентрації вуглеводів, мг/мл.

Таблиця 2. Лектинова активність та вуглеводна специфічність фракцій позаклітинного лектину сапрофітного штаму *B. subtilis* ІМВ В-7014 (з еритроцитами барана)

Зразок лектину	ГАА, ГАО	Мінімальні інгібуючі РГА концентрації вуглеводів, мМ						
		D-глюкозамін	D-галактозамін	Фруктозо-1,6-бісфосфат	D-глюкуронова кислота	D-галактуоронова кислота	N-ацетилнейрамінова кислота	Муцин підщелепної залози бика*
Нативний лектин	512–1024	75,0	37,5	0	37,5	150,0	37,5	0,625
Фракція 1	256	75,0	150,0	0	0	0	75,0	1,25
Фракція 2	128	75,0	150,0	0	0	0	75,0	1,25
Фракції 3–5	32–64	0	0	0	0	0	150,0	1,25
Фракція 6	16	0	0	0	0	0	0	2,5
Фракції 7, 8	8–32	0	0	0	0	0	0	0
Фракція 9	16	0	0	0	0	0	0	1,25
Фракції 10, 12	8	0	0	0	0	0	0	0
Фракції 11, 13	16	0	0	0	0	0	0	2,5
Фракції 14–19	0	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в

Примітка. н/в – вуглеводна специфічність не визначена. *Мінімальні інгібуючі РГА концентрації вуглеводів, мг/мл.

Використання для РГА еритроцитів барана дозволило виявити інші характеристики лектину та його фракцій. Рівень активності нативного лектину знижувався у 4–8 разів порівняно з рівнем ГАА при застосуванні еритроцитів кроля і досягав значень 512–1024 ГАО (див. табл. 2). Активність виявлена у всіх фракціях за винятком лужних фракцій **14–19**. При фракціонуванні лектину відбувається поступове зниження її рівня від 256 до 8 ГАО. Максимальна ГАА показана для фракцій **1** та **2** (256 і 128 ГАО відповідно).

При визначенні вуглеводної специфічності даних фракцій лектину з використанням еритроцитів барана виявлені також інші особливості. Встановлено, що спорідненість нативного препарату лектину до муцину підщелепної залози бика та уронових кислот зменшується у 10 разів, а до N-ацетилнейрамінової кислоти у 2,5 раза порівняно з попереднім дослідженням з еритроцитами кроля. Не вдалося виявити і характерну для даного лектину афінність до фруктозо-1,6-бісфосфату. Використання еритроцитів барана дало змогу підтвердити здатність взаємодіяти з вуглеводами у фракції **1–6, 9, 11** та **13**. Спільною ознакою для них є спорідненість до муцину підщелепної залози бика. Специфічність до N-ацетилнейрамінової кислоти характерна для фракцій **1–5**. Фракції **1** і **2** проявляють спорідненість також до аміноцукрів, більшою мірою до D-глюкозаміну. Кислі фракції **3–6, 9, 11** і **13** взаємодіяли лише з муцином підщелепної залози бика і виявилися моноспецифічними, що рідко зустрічається у лектинів будь-якого походження.

Таким чином, як нативний лектин, так і його фракції проявляють унікальну спорідненість до сіалових та уронових кислот. Спорідненість до вуглеводів залежить від типу використаних в РГА еритроцитів: кроля або барана.

Отримані результати свідчать про те, що позаклітинний сіалоспецифічний лектин сапрофітного штаму *B. subtilis* IMB B-7014, як і лектини рослинного та тваринного походження, являє собою комплекс ізоформ, які відрізняються між собою за фізико-хімічними та біологічними властивостями. До них належать напрямок руху в електричному полі, локалізація згідно з різними значеннями pI , електрофоретична рухомість, рівень активності, ступінь афінності до різних вуглеводів та спорідненість до еритроцитів тварин різної видової належності. Характерною ознакою для всіх ізоформ лектину є наявність молекулярної одиниці з масою 50 кДа, саме якій притаманні лектинові властивості: гемаглютинуюча активність та спорідненість до сіалових кислот і сіаловмісних глікокон'югатів.

1. Sharon N., Lis H. Lectins. – Dordrecht: Kluwer, 2003. – 440 p.
2. Подгорський В. С., Коваленко Э. А., Симоненко И. А. Лектины бактерий. – Киев: Наук. думка, 1992. – 204 с.
3. Коваленко Э. А., Гетьман Е. И., Вьюницкая В. А. Бактерии рода *Bacillus* – продуценты внеклеточных лектинов // Уч. зап. Тартус. ун-та. – 1989. – **1**, вып. 869. – С. 118–123.
4. Методы очистки белков / Ред. Р. Скоупс. – Москва: Мир, 1985. – 358 с.
5. Карпова І. С., Коваленко Е. О., Пальчиковська Л. Г., Корецька Н. В., Платонов М. О., Зелений С. Б., Гетьман К. І., Сацук О. В., Підгорський В. С. Дослідження можливих механізмів дії лектину *Bacillus subtilis* з використанням композитних біорегуляторів – похідних феназин-1-карбонової кислоти // Вісник ОНУ. – 2007. – **12**, вип. 5. – С. 112–121.
6. Sova O. Autofocusing – a method for isoelectric focusing without carrier ampholytes // J. Chromatography. – 1985. – **320**. – P. 15–22.
7. Луцик 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.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **227**, No 5259. – P. 620–685.
9. Fomsgaard A., Freudenberg M. A., Galanos C. Modification of the silver staining technique to detect lipopolisaccharide in polyacrylamide gels // J. Clin. Microbiol. – 1990. – **28**, No 12. – P. 2627–2631.

10. Вознесенский В. Л. Первичная обработка экспериментальных данных. – Ленинград: Наука, 1969. – 84 с.
11. Урбах В. Ю. Статистический анализ в медицинских и биологических системах. – Москва: Медицина, 1975. – 295 с.

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

Надійшло до редакції 24.12.2009

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

Structural description of extracellular lectin of saprophytic strain *Bacillus subtilis* IMV B-7014

Some properties of the structural organization of extracellular sialic acid-specific lectin that was produced by Bacillus subtilis IMV B-7014 are investigated. It is shown that the lectin represents a complex of isoforms that are notable for physicochemical and biological properties such as the direction of movement in an electrical field, localization in accordance with different pI values, electrophoretic mobility, level of hemagglutination activity and specificity to different carbohydrates, and affinity level to erythrocytes from different animal species. The feature of all lectin isoforms is the presence of a subunit with a molecular weight of 50 kDa. It possesses lectin properties: hemagglutination activity and specificity to sialic acids and sialic acid-containing glycoconjugates.