

УДК: 577.57.021+ 577.1

## ПОШУК КЛІТИННИХ МІШЕНЕЙ, ЧУТЛИВИХ ДО ДІЇ ЛЕКТИНІВ, ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ СИСТЕМИ ТРАНСКРИПЦІЇ *IN VITRO*

І.С. КАРПОВА, Н.В. КОРЕЦЬКА, Л.Г. ПАЛЬЧИКОВСЬКА,  
 В.В. НЕГРУЦЬКА

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;  
 e-mail: I.s.karpova@imb.org.ua

За допомогою методу ізоелектрофокусування без амфолітів-носіїв (автофокусування) виділено ізолектини *B. subtilis* із культуральної рідини та екстракту суцвіть *S. nigra*. Фракції, що мають гемаглютинувальну активність і відрізняються за вуглеводною специфічністю були досліджені за допомогою СДС-ПААГ. У досліджуваних зразках виявлено, як мінімум, дві різні ізоформи, одна з яких мала позитивний, а інша – негативний заряд. Показано, що ізоформи як бактеріального, так і рослинного походження з негативним зарядом, мають здатність до інгібування реакції транскрипції *in vitro*. Висловлюється гіпотеза, що однією з мішеней, чутливих до впливу лектинів, може бути ДНК-залежний синтез РНК.

**Ключові слова:** лектини, транскрипція *in vitro*, автофокусування, *Bacillus subtilis*, *Sambucus nigra*.

**ВСТУП.** Лектини належать до найбільш поліфункціональних білків, особливістю яких є здатність вибірково та зворотньо зв'язувати вуглеводи та вуглеводовмісні біополімери без порушення їхньої хімічної структури [1, 2]. Лектини беруть участь у захисті рослин від інфекцій, фітофагів та стресових чинників, завдяки здатності до формування білок-вуглеводних, білок-білкових та РНК-білкових комплексів [3]. При лектин-вуглеводних взаємодіях відбуваються два типи реакцій: прямі взаємодії (аглотинація, адгезія, преципітація), яким присвячено багато досліджень, та опосередкований мембраною сигнальний вплив, який призводить до індукції каскаду біохімічних реакцій у клітині. Дослідження сигнального впливу лектинів на бактеріальні та рослинні об'єкти тільки розпочинається. На прикладі класичного фітогемаглютиніну квасолі звичайної (РНА) було показано, що завдяки субодичинній організації лектину в одній молекулі поєднується здатність до обох типів реакцій. Зокрема, за міжклітинні взаємодії відповідає еритроцитарна субодичина-

ця (РНА-Е), а за сигнальний вплив на транскрипцію і реплікацію лімфоцитів у реакції бласттрансформації — лейкоцитарна форма (РНА-Л). Це вказує на те, що для розуміння біологічної ролі лектинів та їхніх функцій доцільно досліджувати не тільки цілу молекулу, а й окремі ізоформи.

У наших попередніх роботах, присвячених вивченню механізмів дії екзогенних лектинів на мутаційний процес у тест-системі *Bacillus subtilis* виявлено ключова роль власного сіалоспецифічного лектину *B. subtilis* [4]. Даний лектин є ефективним інгібітором процесу транскрипції *in vitro*. Це дозволило висловити припущення, що мішенню його дії є ДНК-залежний синтез РНК.

Метою даної роботи було дослідити дію окремих ізоформ бактеріального лектину *B. subtilis*, а також ізоформ лектину рослинного походження із суцвіть бузини чорної (*Sambucus nigra*) у системі транскрипції *in vitro* для подальшого вивчення механізмів сигнального впливу лектинів.

### Матеріали і методи

Ізоформи лектину *B. subtilis* із культуральної рідини штаму-продуцента В-7014 (із колекції ІМВ НАНУ, автор — д.б.н. Е.О. Коваленко) та ізоформи лектину суцвіть *S. nigra* з екстракту їхньої сухої сировини одержували за допомогою модифікованого нами методу електрофокусування без додавання амфолітів-носіїв (автофокусування) [5–7].

Вплив ізоформ лектинів на процес транскрипції *in vitro* досліджували із залученням ДНК-залежної РНК-полімерази бактеріофага Т7. Матрицею була лінеаризована ДНК плазмиди рTZ19R. До неї додавали буфер, що містить такі складові: трис-НСІ, рН 7,5,

MgCl<sub>2</sub>, MDTT, інгібітор РНКаз, нуклеозидтрифосфати (АТФ, GTP, CTP, TTP) та РНК-полімераза фага Т7 *E. coli* (FERMENTAS, Литва). Водний розчин лектину (10 мг/мл) вводили перед додаванням Т7 РНК-полімерази. Реакційну суміш (20 мкл) інкубували протягом 1 год при температурі 37 °С. Реакцію транскрипції зупиняли заморожуванням при –20 °С. Отримані продукти транскрипції візуалізували за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі з додаванням 0,5 мкг/мл бромистого етидію [8–10]. Кількісну оцінку синтезованих РНК-продуктів проводили із використанням програмних пакетів "Sigma Plot 5.0" і "Origin 5.0" для Windows.

### Результати та обговорення

Для порівняльного дослідження дії окремих ізоформ власного лектину *B. subtilis* на процес транскрипції *in vitro* лектин виділяли із культуральної рідини природного штаму-продуцента В-7014 *B. subtilis* [11] за методом автофокусування. Відібрано дві молекулярні форми, які різняться сумарним зарядом та фізико-хімічними характеристиками: лужна форма, яка локалізується у діапазоні рН 7,5–8,0 (BSL-1) та кисла форма, що концентрується при рН 4,0–4,8 (BSL-2). BSL-1 аглютинуює винятково еритроцити кроля і має специфічність до N-ацетилнейрамінової кислоти, що відповідає раніше встановленій специфічності сумарного препарату лектину *B. subtilis*. BSL-2 аглютинуює еритроцити кроля та у значному титрі (1:32) еритроцити барана. У даній формі нами встановлено специфічність до лактози. Електрофоретичний аналіз білків лектиновмісних фракцій, який здійснювали у системі ПААГ-ДСН за Леммлі з використанням 10% гелю,

підтвердив (рис. 1) наявність відмін BSL-1 та BSL-2. На денситограмі як лужної, так і кислої форми лектину чітко окреслено білкові зони, які відповідали зовсім різним молекулярним масам, а саме: 20–23 кДа та 10–15 кДа, відповідно.

За розробленою методикою здійснено фракціонування лектинів із екстрактів суцвіть *S. nigra* і пилку даної рослини [7]. Дві полярні молекулярні форми, що різняться напрямом міграції в електричному полі, вуглеводною специфічністю та молекулярною масою субодиниць, одержали назву SNAflu-1 та SNApol-1. Мажорний лектин, що концентрувався при значеннях pH близько 5,0, аглютинував еритроцити людини і барана та виявив специфічність до *N*-ацетил-*D*-галактозамінату. Мажорний білок із лужної зони pH (8,0–9,0) аглютинував еритроцити людини ( $A > 0$ ) і мав специфічність до глюкози/манози. Спеціальне дослідження показало, що

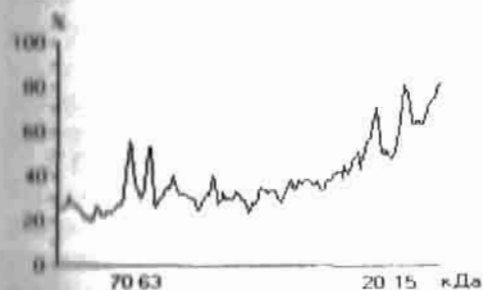
ця форма лектину характерна для пилку даної рослини.

Електрофоретичний аналіз препаратів SNAflu-1 та SNApol-1 показав (рис. 2), що кисла форма лектину має молекулярну масу біля 30 кДа, а лужна — 26 кДа.

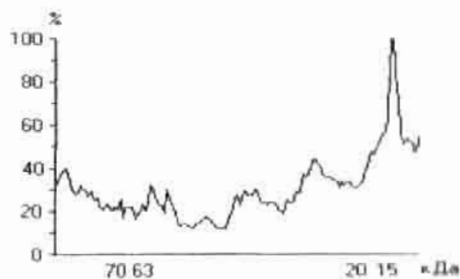
Отже, одержані полярні ізоформи лектину суцвіть бузини чорної, аналогічно до ізоформ бактеріального лектину *B. subtilis* мають характерні відмінності у фізико-хімічних та біологічних властивостях.

Враховуючи вказані відмінності у характеристиках полярних молекулярних форм досліджених лектинів, передбачали, що вони можуть виявити різну здатність до інгібування реакції транскрипції *in vitro*.

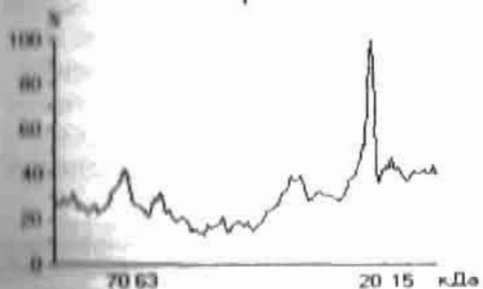
Дійсно, як видно з даних, наведених на рис. 3, у системі транскрипції *in vitro* лактозоспецифічна форма BSL-2 виявила тенденцію до незначної активації (на 12%) утворення транскриптів,



1

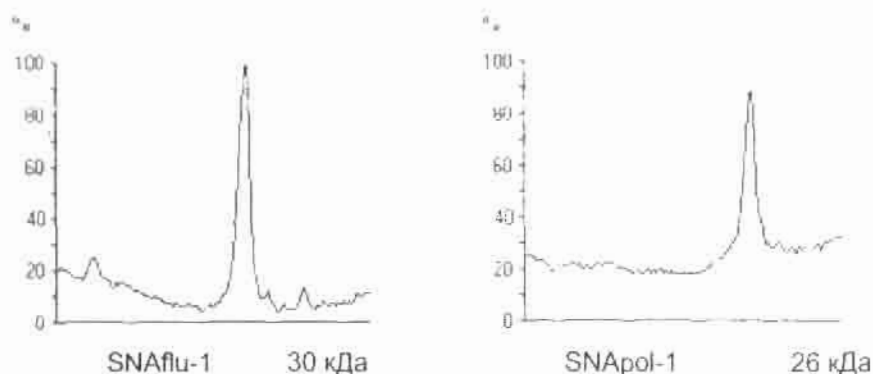


2



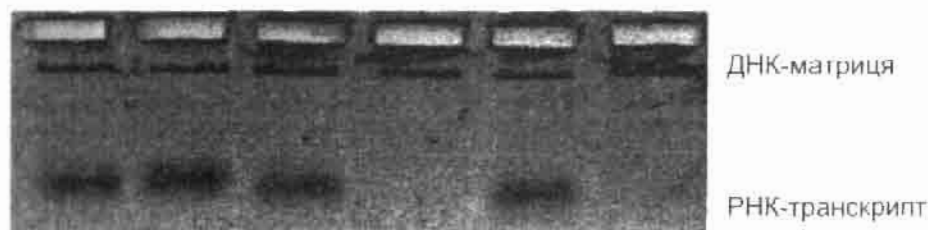
3

**Рисунок 1.** Денситограми ізоформ власного лектину *B. subtilis*. 1 — сумарний препарат до електрофокусування; 2 — BSL-2; 3 — BSL-1, одержані за методом електрофокусування. Вісь абсцис — довжина пробігу; вісь ординат — абсорбція

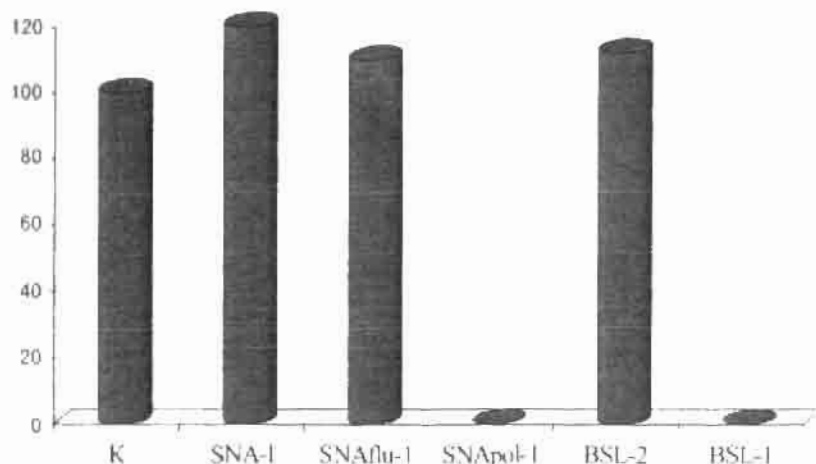


**Рисунок 2.** Денситограми ізоформ лектину судівць *S. nigra*. Вісь абсцис – довжина пробігу; вісь ординат – абсорбція

А



Б



**Рисунок 3.** Електрофореграма (А) та денситограма (Б) продуктів транскрипції *in vitro*, що сформувались під впливом ізоформ лектину судівць *S. nigra* та лектину *B. subtilis* (10 мкг/мл), які відрадянались, поєднують в електричному полі у процесі автофокусування. К – (контроль) – повний транскрипт, отриманий за відсутності лектину

в той час як сіалоспецифічна форма BSL-1 повністю блокувала процес транскрипції з плазмідного промотора. Щодо ізолектинів бузини чорної, комерційний препарат кори (SNA-I) та форма SNAflu-I суцвіть не показали достовірного впливу на процес транскрипції. В той же час, мажорний лектин пилку SNAroI-I виявив інгібіторну активність і при концентрації 100 мкг/мл повністю блокував цей матричний процес.

Одержані дані із дослідження полярних за напрямом міграції в електричному полі ізоформ бактеріального та рослинного лектину дають підстави стверджувати, що структурна множинність молекулярних форм лектинів *B. subtilis* може бути основою різнонаправленої регуляторної дії на важливі внутрішньоклітинні процеси, зокрема, на процес транскрипції.

### Висновки

1. Охарактеризовано різні молекулярні форми лектину *B. subtilis* BSL-1, BSL-2 та встановлено, що одна із форм, а саме лужна (BSL-1), повністю інгібує процес транскрипції *in vitro* за участю ДНК-залежної РНК-полімерази фага T7.

2. Показано, що із двох ізолектинів суцвіть бузини чорної SNAflu-I та SNAroI-I, які мають різні фізико-хімічні та вуглеводозв'язувальні властивості, останній є ефективним інгібітором процесу транскрипції *in vitro*.

3. Висловлюється припущення, що субординатна організація лектинів та множинність молекулярних форм є структурною основою їхнього регуляторного впливу на матричні процеси.

### Перелік літератури

1. Van Damme J. M., Peumans W. J., Puschi A., Bardocz S. Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications,

Chichester etc.: John Wiley and Sons. — 1998. — 451 p.

2. Lis H., Sharon N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition // Chem. Revs. — 1998. — Vol. 98, № 2. — P. 637-674.
3. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений // Журн. общей биологии. — 2007. — Т. 68, № 2. — С. 109-125.
4. Карпова І.С., Пальчиковська Л.Г., Корецька Н.В., Платонов М.О., Коваленко Е.О., Гетьман К.І. Лектини модулюють цитостатичну дію композитних біорегуляторів — кон'югатів аза-аналогів піримідину та феназин-1-карбонової кислоти в тест-системі *Bacillus subtilis* // Укр. біохім. журн. — 2006. — Т. 7, № 5. — С. 93-100.
5. Sova O. Autofocusing — a method for isoelectric focusing without carrier ampholytes // J. of Chromatography. — 1985. — Vol. 320, № 1. — P. 15-22.
6. Sova O. Industrial autofocusing — a new technology for large-scale isoelectric focusing // J. of Chromatography. — 1985. — Vol. 320, № 1. — P. 213-218.
7. Карпова І.С., Корецька Н.В., Пальчиковська Л.Г., Негруцька В.В. Лектини суцвіть бузини чорної *Sambucus nigra* // Укр. біохім. журн. — 2007. — Т. 7, № 5. — С. 67-73.
8. Пальчиковська Л.Г., Гарманчук Л.В., Алексєєва І.В., Усенко Л.С., Шестакова Т.С., Соляник Г.І., Швед А.Д., Чехун В.Ф. Глікозидні аналоги 6-азацитидину. Цитотоксична дія та вплив на транскрипцію *in vitro* // Біополімери і клітина. — 2005. — Т. 21, № 5. — С. 433-439.
9. Puvvada M.S., Forrow S.A., Hartley J.A., Stephenson P., Gibson I., Jenkins T.C., Thurston D.E. Inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase *in vitro* transcription DNA-binding Pyrrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepines // Biochemistry. — 1997. — Vol. 36, № 3. — P. 2478-2484.
10. Sun Li, Dove S. L., Panaghie G., deHaese P.L., Hochschild A. An RNA Polymerase mutant deficient in DNA melting facilitates

study of activation mechanism: Application to an artificial activator of transcription // *J. Mol. — Biol.* — 2004, № 5. — P. 1171–1182.

11. Підгорський 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 // Доповіді НАН України. — 2005. — № 1. — С. 154–158.

Представлено Л.Л. Лукаш  
Надійшла 28.10.2007

#### ПОИСК КЛЕТОЧНЫХ МИШЕНЕЙ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ЛЕКТИНОВ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ ТРАНСКРИПЦИИ *IN VITRO*

И.С. Карпова, Н.В. Корецкая,  
Л.И. Пальчиковская, В.В. Негруцкая

Институт молекулярной биологии  
и генетики НАН Украины, Киев,  
e-mail: [i.s.karpova@imbg.org.ua](mailto:i.s.karpova@imbg.org.ua)

Методом изоэлектрофокусирования без амфолитов-носителей (автофокусирования) проведено выделение изолектинов *B. subtilis* из культуральной жидкости и экстракта соцветий *S. nigra*. Фракции, имеющие гемагглютинирующую активность и различающиеся по углеводной специфичности были исследованы с помощью СДС-ПААГ. В исследуемых образцах были выявлены, как минимум, две разных изоформы, одна из которых имела положительный, а другая — отрицательный заряд. Показано, что изоформы, как бактериального, так и

растительного происхождения, имеющие отрицательный заряд, проявляют способность к ингибированию реакции транскрипции *in vitro*. Предполагается, что одной из мишеней, чувствительных к воздействию лектинов, может быть ДНК-зависимый синтез РНК.

*Ключевые слова:* лектины, транскрипция *in vitro*, автофокусирование, *Bacillus subtilis*, *Sambucus nigra*.

#### INVESTIGATION OF CELL TARGETS SENSITIVE TO LECTIN'S EFFECT BY USE OF TRANSCRIPTION *IN VITRO*

I.S. Karpova, N.V. Koretska,  
L.G. Palchikovska, V.V. Negrutska

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: [i.s.karpova@imbg.org.ua](mailto:i.s.karpova@imbg.org.ua)

Isolation of isolectins from *B. subtilis* culture medium and extract of the *S. nigra* inflorescences have been performed using isoelectric focusing without carrier ampholytes (autofocusing). Fractions active in agglutination tests with different carbohydrate specificity were subjected to SDS-PAGE. At least two different isolectins were present in the material under study, one with positive and second with negative charge. For negatively charged variants of both bacterial and plant isolectins it was shown the ability to inhibit the transcription *in vitro*. It is supposed that one of the common targets sensitive to lectins may be the DNA-dependent synthesis of RNA.  
*Key words:* lectins, transcription *in vitro*, autofocusing, *Sambucus nigra*, *Bacillus subtilis*.