

КАРПОВА І.С., **ЛИЛО В.В.**, **БІЛОЛІПЕЦЬКА О.С.***Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150
✉ karpova_is@mail.ru, (050) 441-89-78*

МУТАНТИ *BACILLUS SUBTILIS* З ІНСЕРЦІЄЮ ALU-ПОВТОРУ ЛЮДИНИ ХАРАКТЕРИЗУЮТЬСЯ ПІДВИЩЕНОЮ ЧУТЛИВІСТЮ ДО ЦИТОСТАТИЧНОЇ ДІЇ ЛЕКТИНІВ

У нашій попередній роботі [1–3] за допомогою рекомбінантних плазмід, що містили Alu-повтор геному людини (300 п. н.), було одержано серію унікальних генетично нестабільних мутантів модельного об'єкта – *Bacillus subtilis*. Була сформульована робоча гіпотеза, згідно з якою висока мінливість, зокрема порушення цитокінезу і контактного інгібування, що призводить до значної варіації розмірів колоній, є наслідком інсерції мобільного генетичного елемента (МГЕ) людини та його адаптації до нового генетичного оточення. Для Alu-повторів, частка яких складає 10 % геному людини, на сьогодні встановлено широкий спектр функцій: регуляція активності генів на рівні транскрипції та трансляції, а також участь у репарації ДНК, процесах РНК-редагування та ремоделювання хроматину, причетність до процесів старіння, певних спадкових захворювань та злоякісної трансформації [4–6]. Враховуючи особливості мутантів з порушеннями цитокінезу і контактного інгібування, було висловлено припущення про перспективність їх застосування для вивчення цитостатичної дії певних біологічно активних речовин, зокрема лектинів, інтерес до яких постійно зростає, зумовлений їх протипухлинною дією [7].

Лектини, які тотально поширені в живій природі, – від вірусів до вищих тварин і людини – вважаються універсальними регуляторами біологічних процесів [8]. Це природні білкові біологічно активні речовини, що здатні зв'язувати вуглеводи і специфічно впливати на розпізнавання між молекулами, клітинами та їх оточенням. Багаторічні дослідження свідчать про широкий спектр дії лектинів: вони можуть регулювати процеси проліферації, транскрипції, запускати апоптоз, інгібувати синтез білка, впливати на функціонування мембран як у еукаріот, так і прокаріот, а також виявляти цитотоксичний ефект [7]. Нами вперше було показано модулюючий вплив лектинів на

мутагенез [9, 10] і експресію репаративного ензиму MGMT [11, 12] в культурах клітин людини.

Метою цієї роботи була детекція можливих перебудов геному Alu-інтегрантів *B. subtilis* шляхом геномного фінгерпринтингу, визначення чутливості цих мутантів до бактеріостатичної дії лектинів та пошук потенційних мішеней такої дії.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження слугували стандартний ауксотрофний мутант *B. subtilis* Lys-42 (*lys⁻*) та одержані на його основі Alu-інтегранти з фенотиповими ознаками посиленого росту, а також додатковою залежністю від вітамінів групи В (колекція ІМБГ НАНУ). Бактерії культивували на агаризованому середовищі (1,5 %) з додаванням амінопептиду до 30 % за об'ємом. Для детекції можливих перебудов геному Alu-інтегрантів проводили ПЛР із застосуванням праймерів до основних типів некодуючих повторюваних послідовностей бактерій (REP, ERIC та BOX). Застосовували комерційні препарати лектинів із різною структурою: ізолектини лектину квасолі звичайної (PHA-E, PHA-L), лектин кори бузини чорної (SNA), лектин зародків пшениці (WGA) (Лектинотест, Україна).

Пошук мішеней дії лектинів проводили за допомогою інгібіторного аналізу за дифузним методом шляхом зіставлення результатів сумісного та окремого впливу двох чинників. Застосовували антибіотики – інгібітори синтезу клітинної стінки цефотаксим і тейкопланін, інгібітори синтезу білка доксициклін та еритроміцин (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Індія), а також інгібітор синтезу ДНК – мітоміцин С (Sigma, США). Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програмного пакету Statistica 8.0 для Windows.

Результати та обговорення

На застосуванні позагенних паліндромів REP (repetitive extragenic palindromic), розміром 35–40 п. н., внутрішньогенних консенсусних послідовностей ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), розміром 124–127 п. н., та елементів BOX, розміром 154 п. н., базується сучасний метод систематики бактерій – геномний фінгерпринтинг [14]. Припускають, що згадані повтори є «гарячими точками» для інтеграції МГЕ [15].

Отже, для виявлення можливих геномних перебудов, спричинених присутністю і активністю чужорідної ДНК, проводили ПЛР із застосуванням праймерів до послідовностей REP, ERIC та елементів BOX.

За результатами ПЛР було виявлено ампліфіковані ПЛР-продукти, які поділяли на мажорні (їх вміст складав близько 50 % для праймерів REP та ERIC або більше 10 % – для праймерів BOX від всієї ДНК профілю), проміжні (2–10 %), мінорні (1–2 %) та субмінорні (до 1 %). Ці дані підтвердили наявність у геномі *B.subtilis* власних повторюваних елементів цього типу. На фоні характерного для *B.subtilis* профілю ПЛР-продуктів у мутантів виявлено незначний міжштамовий поліморфізм щодо розподілу субмінорних продуктів ампліфікації, як це видно на прикладі застосування праймерів BOX (рис. 1).

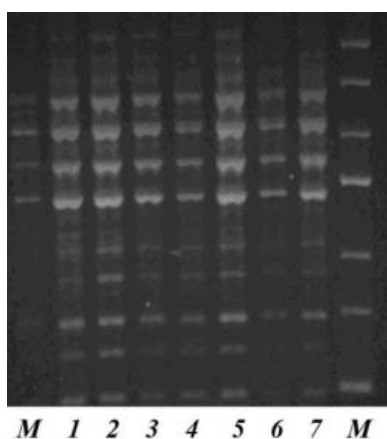


Рис. 1. Продукти BOX-ПЛР-аналізу ДНК штамів *B.subtilis*: М – маркер; 1. – Lys-42 (контроль); 2. – ІМБГ 53; 3. – ІМБГ 53 П-1; 4. – ІМБГ 271; 5. – ІМБГ 331; 6. – ІМБГ А-11, 7. – ІМБГ А-187.

Варіації в електрофоретичному профілі продуктів ампліфікації можна пояснити менш специфічними взаємодіями обраних праймерів

із різними ділянками геномної ДНК. Однак, у наших дослідженнях серед ПЛР-продуктів не виявлено фрагментів, розмір яких свідчив би на користь інтеграції чужорідної послідовності довжиною 300 п. н. Вірогідно, інсерція *Alu*-повтору відбулася без участі згаданих некодуючих послідовностей і внесла зміни в певні кодуючі ділянки геному, для визначення яких необхідні спеціальні дослідження.

Виявилося, що незалежно одержані *Alu*-інтегранти відрізняються підвищеною чутливістю до цитостатичної дії лектинів порівняно з вихідним штамом і мають певні міжштамові відмінності (рис. 2). Зокрема, штам А33 був чутливим до дії всіх застосованих препаратів лектинів у ряду РНА-Л > WGA > РНА-Е > SNA. Штами А11 і А26 були особливо чутливими до впливу РНА-Е. При цьому вихідний штам Lys-42 виявив чутливість лише до дії одного WGA.

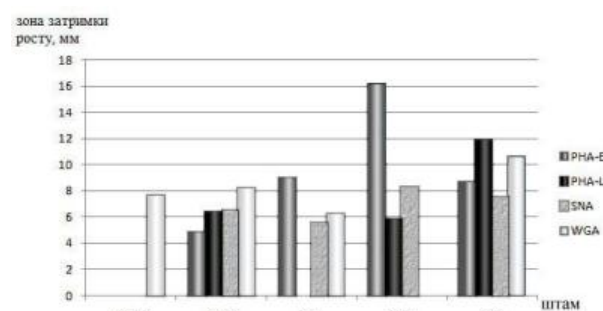


Рис. 2. Цитостатичний вплив лектинів на ріст *Alu*-інтегрантів *B. subtilis*.

За одночасного застосування лектинів і антибіотиків (як інгібіторів росту з відомим механізмом дії) було виявлено, що саме у *Alu*-інтегрантів проявляється синергізм дії двох чинників (рис. 3).

При цьому спостерігалася специфічність синергічної дії препаратів лектинів і антибіотиків, яка залежала від структурних особливостей молекули білка. Ізоформи РНА як типового представника лектинів бобових, що діють через рецептори мембран, підсилювали ефект антибіотиків-інгібіторів синтезу клітинної стінки, особливо тейкопланіну. Лектин SNA – представник сімейства RИPИ (ribosome inhibiting protein) значно підсилював вплив інгібіторів синтезу білка, в більшій мірі еритроміцину, який діє на рівні елонгації. Синергічної дії досліджених лектинів і мітоміцину С як інгібітора реплікації не виявлено (результати не представлено).

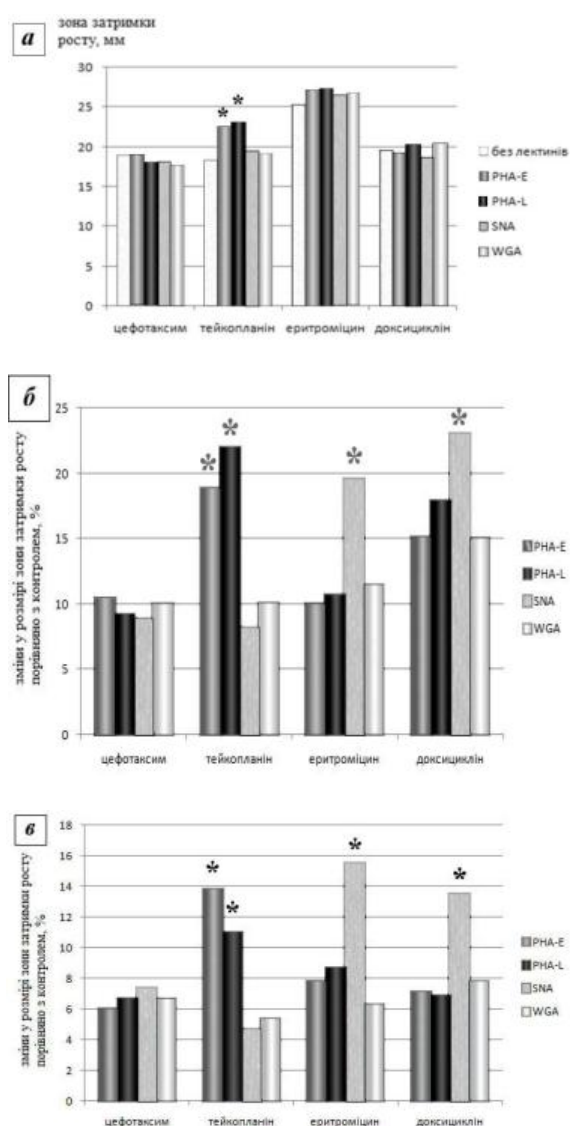


Рис. 3. Сумісна дія лектинів і антибіотиків: *а* – на контрольний штам *B. subtilis* Lys-42; *б* – мутант A187; *в* – мутант A26. У центр чашки Петрі додавали 10 мкл розчину лектину у концентрації 5 мкг/мкл. Лектинам давали увібратися протягом години при 37°C, після чого наносили стандартний диск з антибіотиком у ту саму точку, що і лектин. Контрольні чашки містили культури мутантів, які обробляли антибіотиком без лектину. Чашки інкубували протягом ночі при 37°C. Про ступінь чутливості бактеріальних клітин до дії двох агентів свідчили різниця діаметрів зон затримки росту у досліді та контролі. * – P<0.05.

Література

1. Карпова И.С., Пидпала О.В., Шульженко В.Н., Костецкий И.Е., Корецкая Н.В., Лукаш Л.Л. Мутагенная активность ДНК рекомбинантных плазмид в компетентной культуре *Bacillus subtilis* // Цитология и генетика. –1994. – Т. 28. – С. 66–73.
2. Карпова И.С., Горovenko Н.Г., Подольская С.В., Россоха З.И., Корецкая Н.В., Дмитренко В.В., Рымарь С.Е. Инсерционный механизм ДНК-мутагенеза // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т. 4. – С. 124–129.

Таким чином, на цьому етапі досліджень окреслено деякі можливі мішені дії застосованих лектинів і показано, що для лектинів – представників різних структурних класів – ці мішені можуть бути різними.

Виникає питання, чому саме Alu-інтегранти виявляють чутливість до впливу лектинів? Відомо, що регуляторна дія лектинів поширюється на важливі клітинні функції, на реалізацію яких могла вплинути інтеграція чужорідного мобільного елемента.

На прикладі слизовика *Dictyostelium discoideum*, який у несприятливих умовах від одноклітинного стану переходить до утворення багатоклітинного ансамблю, показано взаємодію лектинів і МГЕ. До регуляції згаданого фазового переходу причетна система мобільних елементів, а також ендогенні лектини (дискоїдини) [16]. Якщо взаємодія цих двох систем регуляції має загальне значення, тоді інсерція Alu-повтору може створити нові можливості для впливу лектинів, зокрема, на ростові процеси.

Висновки

Інсерція Alu-повтору людини в геном *B. subtilis* не вплинула суттєво на профіль ампліфікації власних некодуючих послідовностей – REP, ERIC та BOX. Генетично нестабільні Alu-інтегранти *B. subtilis* з порушеннями росту і контактного інгібування відрізнялися підвищеною чутливістю до цитостатичного впливу лектинів. Інгібіторний аналіз показав, що можливі мішені дії досліджених лектинів можуть бути асоційовані з клітинною поверхнею або процесом синтезу білка, залежно від структури лектину. Розроблена унікальна бактеріальна модель є адекватною як для вивчення теоретичних питань стосовно механізмів дії лектинів, так і практичного експрес-тестування цитостатичної дії цих поширених у природі біологічно активних речовин.

3. Карпова І.С., Малюта С.С. Мутагенна дія нуклеїнових кислот і еволюційний процес // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т. 9. – С. 134–146.
4. Deininger P. Alu elements: know the SINEs // *Genome Biology*. – 2011. – V. 12. – P. 36–48.
5. Hasler J. and Strub K. Alu elements as regulators of gene expression // *Nucleic Acids Research* – 2006. – V. 34. – P. 5491–5497.
6. Каримов Д.Д., Эрдман В.В., Насибуллин Т.Р., Туктарова И.А., Сомова р.Ш., Тимашева Я.Р., Мустафина О.Е. Alu-инсерционно-делеционный полиморфизм генов *COL13A1* и *LAMA2*: анализ ассоциаций с долгожительством // *Генетика*. – 2016. – Т. 52. – С. 1185–1193.
7. Liu B., Bian H., Bao J. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic // *Cancer Letters*. – 2010. – V. 287. – P. 1–12.
8. Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Несвижский Ю.В., Лахтин М.В., Шубин В.В., Черепанова Ю.В., Поспелова В.В. Классификация лектинов как универсальных регуляторных молекул биологических систем // *Вестник Российской АМН*. – 2009. – № 3. – С. 36–43.
9. Lukash L.L., Karpova I.S., Miroshnichenko O.S., Tikhonova T.N., Lylo V.V., Man'ko V.G., Sukhorada E.M., Golynskaia E.L. The effect of the lectin from *Sambucus nigra* inflorescences on spontaneous and alkylating agent-induced mutagenesis in mammalian somatic cells // *Cytol. Genet.* – 1997. – V. 31. – P. 52–60.
10. Karpova I.S., Lylo V.V., Macewicz L.L., Kotsarenko K.V., Palchykovska L.G., Ruban T.O., Lukash L.L. Lectins of *Sambucus Nigra* as Biologically Active and DNA-protective Substances // *Acta Hort. (ISHS)*. – 2015. – N 1061. – P. 93–102.
11. Macewicz L.L., Lylo V.V., Karpova I.S., Kotsarenko K.V., Ruban T.A., Lukash L.L. Plant and animal lectines as modulators of MGMT and MARP gene expression in vitro // *Factors in experimental evolution of organisms*. – 2014. – 15. – P. 260–264.
12. Lylo V.V., Karpova I.S., Kotsarenko K.V., Macewicz L.L., Ruban T.O., Lukash L.L. Lectins of *Sambucus nigra* in Regulation of Cellular DNA-protective Mechanisms // *Acta Hort. (ISHS)*. – 2015. – N 1061. – P. 103–108.
13. Delihans N. Impact of Small Repeat Sequences on Bacterial Genome Evolution // *Genome Biology and Evolution*. – 2011. – № 3. – P. 959–973.
14. Rademaker J.L.W., Bruijn F.J. Characterization and classification of microbes by Rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis // *Appl. Envir. Microbiol.* – 1998. – V. 64. – P. 2096–2104.
15. Lupski J.R., Wienstock G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in procariotic genomes // *Journ. of Bacter.* – 1992. – V. 174. – P. 4525–4529.
16. Alexander S., Leone S., Ostermeyer E. Translational control of discoidin lectin expression in *drsA* suppressor mutants of *Dictyostelium discoideum* // *Mol. Cell. Biol.* – 1991. – V. 11. – P. 3171–3179.

KARPOVA I.S., LYLO V.V., BILOLIPETSKA O.S.

Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: karpova_is@mail.ru

BACILLUS SUBTILIS MUTANTS WITH THE HUMAN ALU-REPEAT POSSESS INCREASED SENSITIVITY TO THE CYTOSTATIC ACTION OF LEKTINS

Aim. Unique *B. subtilis* mutants with altered cytokinesis that were supposed to be a result of human Alu-repeat insertions have been investigated to determine possible alterations of the genome, the sensitivity to bacteriostatic action of lectins and search for potential targets of such action. **Methods.** Rep-PCR genomic fingerprinting with use of PCR markers REP, ERIC and BOX was applied. Commercial lectins with different structures: PHA-E, PHA-L SNA, and WGA (LECTINOTEST, Ukraine) were used. Search for lectin's targets was performed by inhibitory analysis using diffuse agar test. **Results.** Alu-repeat insertions did not affect significantly the amplification profile of *B. subtilis* own noncoding sequences – REP, ERIC and BOX. Alu-integrant mutants demonstrated the increased sensitivity to the cytostatic effect of lectins. Inhibitory analysis showed that the possible targets of the lectins under study may be associated with cell surface or process of protein synthesis, depending on the lectin structure. **Conclusions.** The unique bacterial model is adequate for both the theoretical study of the mechanisms of lectin action and practical rapid tests of these biologically active substances cytostatic effects.

Keywords: *Bacillus subtilis* mutants, Alu-repeat insertion, PCR markers, lectins, inhibitory analysis.