

На правах рукописи



Мухаммадиев Ринат Салаватович

**ЛЕКТИН МИКРОМИЦЕТА *RHIZOCTONIA SOLANI*: ХАРАКТЕРИСТИКА,
СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2016

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
Багаева Татьяна Вадимовна

Официальные оппоненты: Алимов Азат Миргасимович, доктор ветеринарных наук, профессор, проректор по научной работе, зав. кафедрой биологической и неорганической химии Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана (г. Казань);

Петрова Ольга Евгеньевна, кандидат биологических наук, с.н.с. лаборатории молекулярной биологии Института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН (г.Казань)

Ведущая организация: ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН (г.Уфа)

Защита диссертации состоится «16» декабря 2016 г. в 13.00 на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, аудитория № 205А.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан « » 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук

Абрамова З.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

По данным "Всемирного фонда исследований рака" (World Cancer Research Fund), МАИР (Международного Агентства по Изучению Рака) и ВОЗ (Всемирной Организации Здравоохранения) в мире каждый год отмечается около 15 миллионов новых случаев рака [Мерабишвили, 2015]. Растет также и число различных инфекционных заболеваний, связанных с резистентностью микроорганизмов. Несмотря на то, что сделаны существенные достижения в области разработки новых лекарственных препаратов, поиск новых биологически активных соединений, способных оказывать существенное влияние на данные процессы, является актуальной проблемой, как биологии, так и медицины.

В настоящее время среди большого числа биологически активных веществ, синтезируемых организмами, особое внимание обращено на лектины. Это особая группа белков или гликопротеинов, которые способны высокоспецифично распознавать и обратимо связывать определенные углеводные структуры, не вызывая у них химических модификаций [Kocourek *et al.*, 1983; Singh *et al.*, 1999]. Данное уникальное биологическое свойство отличает лектины от ферментов и других белков, делая их бесценными инструментами в решении различных медико-биологических задач. Лектины используются в диагностике различных заболеваний, в определении групп крови, в выделении незрелых форм лимфоцитов при пересадке костного мозга, они являются необходимыми реагентами в исследованиях химии белков [Лоенко с соавт, 1992; Sharon, Lis, 2004]. Кроме того, некоторые лектины обладают антимикробным, противоопухолевым, иммуностимулирующим свойствами, а также применяются в качестве противовирусных препаратов [Лоенко с соавт, 1992].

Лектины играют важную роль во многих биологических процессах живых систем. Они участвуют в межклеточных взаимодействиях, способствуют адгезии к клеточной поверхности, регулируют процессы транспорта моно-, ди- и полисахаридов, осуществляют контроль над дифференцировкой клеток в тканях [Лоенко с соавт, 1992; Шакирова, Безрукова, 2007], играют ключевую роль как сигнальные молекулы в ответных реакциях у различных организмов [Шакирова, 2001; Larroque *et al.*, 2011].

Лектины широко распространены в природе. Однако, среди большого числа изучаемых биологических объектов, в последнее время, особое внимание уделяют микромицетам, поскольку они являются источниками различных биологически активных веществ, имеют значительный видовой потенциал, способны к активному росту и размножению [Феофилова, 2004]. Тем не менее, свойство синтезировать вещества, относящихся к лектинам, известно для немногих

микروмицетов. Остаются не исследованными и вопросы, связанные с функциями большинства лектинов.

Цель работы - получение и характеристика биологически активных соединений на основе лектинов микروмицетов.

Для решения этой проблемы были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести скрининг микромицетов для выявления новых продуцентов лектинов с высокой гемагглютинирующей активностью.
2. Определить оптимальный состав питательной среды для увеличения биосинтеза лектина продуцентом.
3. Разработать методы очистки лектина и охарактеризовать его физико-химические свойства.
4. Определить действие лектина на рост и развитие условно-патогенных и патогенных бактерий.
5. Выяснить действие лектина на пролиферацию клеточных линий в условиях *in vitro*.

Научная новизна

Впервые получен новый лектин с молекулярной массой 36 кДа из мицелия микромицета *Rhizoctonia solani*, не обладающий мутагенной активностью и отличающийся по физико-химическим свойствам от ранее известных лектинов других групп микромицетов. Разработана и стандартизована схема выделения и очистки препарата лектина, позволяющая получить гомогенный препарат.

Впервые обнаружено, что лектин микромицета *Rhizoctonia solani* обладает выраженной антибактериальной специфичностью в отношении грамм-положительной микрофлоры условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, а также высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток рака молочной железы человека.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы

Полученные в рамках диссертационной работы результаты о скрининге, динамике образования, физико-химических свойствах, углеводной специфичности лектина штамма гриба *R. solani* расширяют знания в области лектинологии.

Препарат лектина микромицета *Rhizoctonia solani*, обладая высокой гемагглютинирующей активностью, может быть использован для изучения механизмов углевод-белкового и углевод-углеводного взаимодействия биологических структур, а также в различных биомедицинских исследованиях.

Установленная антибактериальная и цитотоксическая активность лектина *Rhizoctonia solani* позволяет рекомендовать его, для дальнейшего исследования в качестве потенциального лекарственного препарата для профилактики и лечения

инфекционных заболеваний, особенно связанных со стафилококковой инфекцией, а также в качестве противоопухолевого препарата рака молочной железы.

Разработанный метод выделения и очистки лектина *Rhizoctonia solani* может быть использован для получения других лектинов микроскопических грибов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Получен новый мицелиальный лектин *Rhizoctonia solani* с высокой геагглютинирующей активностью, отличающийся по физико-химическим характеристикам от ранее известных лектинов других групп микромицетов.

2. Лектин микромицета *Rhizoctonia solani* обладает антибактериальной активностью в отношении грамм-положительной микрофлоры условно-патогенных микроорганизмов и цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток рака молочной железы человека.

Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается значительным объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и проанализированных с использованием современных высокоточных приборов, а также опубликованием полученных результатов в международных и отечественных журналах с рецензированием ведущими учеными в данной области.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на Итоговых научных конференциях (Казань, КФУ, 2016, 2015, 2014, 2013), IV Международной научной Интернет - конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, КФУ, март 24-25, 2015), Молодежном форуме Приволжского федерального округа «Иволга-2015» (Самара, июнь 17-27, 2015), V Республиканском молодежном форуме «Наш Татарстан» (Казань, апрель 14-16, 2015), III Международной научной – Интернет конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, КФУ, апрель 17-19, 2012), на конференции молодых ученых «Молодежь и инновации Татарстана» (Казань, КФТИ КазНЦ РАН, октябрь 10-12, 2012), на 1-ой Международной Интернет-конференции "Растения и микроорганизмы" (Казань, КФУ, 2011), конференции с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов "Актуальные аспекты современной микробиологии" (Казань, КФУ, 2011).

Связь работы с научными программами. Работа выполнена в соответствии с тематическим планом НИР Казанского (Приволжского) федерального университета «Эффективность и безопасность соединений-лидеров - кандидатов в противоопухолевые, ноотропные, антихолинэстеразные, противомикробные и сердечно-сосудистые лекарственные средства на период 2014-2016 годы (№ 17.1017.2014/К от 17 июля 2014 г.), «Разработка

инновационных антибактериальных препаратов для профилактики и терапии внутри- и внебольничных инфекций, вызываемых полирезистентными штаммами грамположительных бактерий» на период 2014-2016 годы (№ 14.575.21.0037 от 27 июня 2014 г. в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы»).

Исследования выполнены при финансовой поддержке 8-го и 10-го конкурса «50 лучших инновационных идей для Республики Татарстан» (октябрь 2012, 2014) и гранта по инновационным исследованиям «У.М.Н.И.К.» (дата присуждения 22.12.2012, контракт № 11717р/17263 от «05» апреля 2013г и № 3110ГУ2/2014 от 05.08.2014).

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 8 научных работ, в том числе 4 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, входящих в Перечень Scopus и ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы и список литературы. Содержание работы изложено на 132 страницах машинописного текста, содержит 19 таблиц и 42 рисунков. Список литературы включает работы 25 российских и 159 зарубежных авторов.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность своему научному руководителю д.б.н., профессору ИФМиБ КФУ Т.В. Багаевой за неоценимую помощь и всестороннюю поддержку при подготовке диссертационной работы. Автор искренне благодарен к.б.н., доценту Т.И. Абдуллину, к.б.н., доценту Т.А. Невзоровой, к.б.н., доценту А.Н. Фаттаховой к.б.н., доценту Н.С. Карамовой, к.б.н., доценту А.М. Мардановой, д.б.н., профессору Ф.К. Алимовой, д.б.н., профессору З.И. Абрамовой за советы, поддержку и помощь в работе. Автор выражает глубокую признательность аспирантам Р.С. Мухаммадиеву, А.Н. Ибрагимову, а также всем сотрудникам кафедры биохимии и биотехнологии КФУ за всестороннюю помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования. В работе были использованы микромицеты различных родов, выделенные из образцов почв районов Республики Татарстан, с зерновых и овощных культур, а также микромицеты рода *Trichoderma*, *Aspergillus* и *Penicillium*, музея культур микроорганизмов кафедры биохимии и

биотехнологии, Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Бактерии *E.coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bac.cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bac.subtilis*, *Streptococcus epidermidis* и клеточные линии MCF-7, PC-3, Hela, HEK-293, HSF были получены из коллекции культур клеток и микроорганизмов Научно-образовательного центра фармацевтики «ФАРМА 2020» КФУ.

Молекулярно-генетические анализы. Идентификацию микроорганизмов проводили определением структуры нуклеотидной последовательности ITS-1 и ITS-2 регионов с использованием универсальных праймеров [White *et al.*, 1990]: ITS1-5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' и ITS4-5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. Полученную последовательность сравнивали с последовательностями из международного банка данных NCBI с помощью пакета программ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Физиолого-биохимические методы. Для определения активности лектинов использовали реакцию агглютинации с нативными и модифицированными эритроцитами человека 0 группы крови [Singh *et al.*, 2008].

Нативные эритроциты для реакции гемагглютинации получали по методу Луцика с соавторами [Луцик с соавт., 1981]. Модифицированные эритроциты человека получали путем смешивания одного объема осадка эритроцитов с двумя объемами раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл в 0,15 М NaCl и 0,01 М Na₂CO₃ [Луцик с соавт., 1981].

Определение содержания белка в образцах проводили спектрофотометрическим методом [Семак с соавт., 2007].

Определение pH-оптимума активности лектина проводили по реакции гемагглютинации после инкубации лектина при температуре 20°C в течение 1 ч с использованием различных буферных растворов: 20 mM глицин-HCl буфер, pH 1,0-4,0, 20 mM ацетатный буфер, pH 4,0-6,0, 20 mM фосфатный буфер pH 6,0-7,0, 20 mM Трис-HCl буфер, pH 7,0-9,0 и 20 mM глицин-NaOH буфер, pH 9,0-11,0 [Singh *et al.*, 2013]. При определении pH-стабильности, очищенный раствор лектина подвергали предварительно диализу в различных буферных растворах в течение 24 часов при температуре 20°C, после чего измеряли их остаточную гемагглютинирующую активность, используя 20 mM Tris-HCl буфер (pH 7,8).

Температурный оптимум лектина изучали по гемагглютинирующей активности в 20 mM Tris-HCl буфере (pH 7,8), инкубируя аликвоты очищенного лектина в диапазоне температур от 10 до 90°C в течение 20 мин. Для определения термостабильности препарата лектина реакционную смесь выдерживали в

интервале температур от 10 до 90°C в течение 1 часа и анализировали остаточную активность.

Влияние ионов металлов на активность лектина определяли по их взаимодействию с различными металлами в концентрациях от 1 до 20 мМ на основе 20 мМ Tris-HCl буферного раствора (pH 7,5) в соответствии с методами Datta и Al-Saman с соавторами [Datta *et al.*, 1991; Al-Saman *et al.*, 2015].

Хелатирование ионов металлов комплексообразователем ЭДТА и реактивацию инактивированного белка металлами проводили инкубированием лектина в 20 мМ трис-HCl буферном растворе (pH 7,5) с динатриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты или ионами металлов Ca²⁺ и Mn²⁺ в концентрации 40 мМ при комнатной температуре в течение 60 минут.

Углеводную специфичность лектинов определяли по их взаимодействию с различными сахарами в иммунологических 96 - луночных U-образных планшетах методом ингибирования реакции гемагглютинации, используя 2%-ную суспензию нативных эритроцитов и растворы различных углеводов [Singh *et al.*, 2008].

Хроматографическая очистка препарата лектина. Для очистки лектина *Rhizoctonia solani* использовали хроматографическую систему низкого давления BioLogic LP производства компании Bio-Rad с колонкой Bio-Scale™ Mini Macro-Prep High Q, DEAE-Sepharose, Sephadex G-50, предварительно уравновешенную 20 мМ Tris-HCl буфером (pH 7,8). Связанный лектин элюировали с колонки High Q («Bio-Rad», США) и DEAE-Sepharose («Pharmacia», Швеция) линейным градиентом концентрации NaCl 0→1М при скорости потока 3 мл/мин. Элюцию белка на колонке с Sephadex G-50 («Sigma», Швеция) осуществляли Tris-HCl буфером (pH 7,8) при скорости потока 0,5 мл/мин.

Чистоту получаемых фракций лектина контролировали методом SDS-электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в соответствии с методом Лэммли [Laemmli, 1970].

Определение молекулярной массы лектина. Определение молекулярной массы лектина проводили методом гель-фильтрации на колонке Econo - Column (1,5 × 50 см, «Bio-Rad», США), заполненной Sephadex G-100 (средний, диаметр частиц 40-120 мкм) и уравновешенной Tris-HCl буферным раствором (pH 7,8). Калибровочная кривая по определению молекулярной массы лектина была построена с помощью линейной зависимости логарифма молекулярной массы белка (lg M) и объема элюирования его с колонки (V_e).

Масс-спектрометрический анализ (MALDI-TOF). Для определения первичной структуры лектина проводилась предварительная подготовка образцов на 600/384 TM AnchorChip MALDI пластинах (Bruker Daltonik, Германия) путем смешивания 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (Sigma-Aldrich,

20 мг/мл) с 2 мкл раствора лектина. Аминокислотные последовательности пептидов исследуемого лектина были исследованы на масс-спектрометре ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF фирмы Bruker Daltonik (Германия) и обработаны при помощи программного обеспечения FlexAnalysis 2,4 (Bruker Daltonik GmbH). Поиск идентичных белков среди белков всех организмов осуществляли с помощью пакета программ Mascot (<http://www.matrixscience.com>) в базе данных SwisProt и NCBI. Статистически достоверными считали белки, имеющие параметр score >80 ($p < 0.05$).

Получение пептидных фрагментов также осуществлялось трипсином по методике, изложенной на сайте (<http://www.bioc.uzh.ch>).

Микробиологические методы анализа. Определение мутагенной активности лектина проводили с помощью теста Эймса с использованием тестерных штамм бактерий *Salmonella typhimurium* TA 100 и TA 98 [Ильинская, Маргулис, 2005].

Определение противобактериальной активности лектина проводили на МПБ методом двукратных серийных разведений [Душкин с соавт., 2011; Clinical..., 2012]. Максимальная исходная концентрация лектина составляла 320 мкг/мл препарата для грамм - отрицательной и 80 мкг/мл для грамм - положительной микрофлоры. MIC и IC₅₀ были определены как наименьшая концентрация лектина, способная к полному ингибированию роста исследуемого микроорганизма (отсутствие видимого роста) и концентрация, при которой происходило 50%-ное ингибирование роста, соответственно.

Методы молекулярной биологии. Цитотоксичность лектина оценивали по выживаемости различных культур клеток с помощью общепринятого метода: метода МТТ - теста [Patel *et al.*, 2009]. Значения параметров IC₅₀ и IC₉₀ определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программы Microsoft Office Excel 2013.

Уровень трансмембранного потенциала митохондрий в условиях *in vitro* после действия препарат лектина в различных концентрациях оценивали методом проточной цитометрии по интенсивности флуоресценции митохондрий в клетках, окрашенных этиловым эфиром тетраметилродамина [Gan *et al.*, 2011].

Математическая обработка результатов. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили путем определения средних арифметических значений и их стандартных ошибок, используя стандартный пакет программ Microsoft Office Excel 2013. Достоверность разницы между сравнимыми величинами оценивали по критерию Стьюдента. Статистически достоверными считали различия при 95% доверительной вероятности ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Скрининг микромицетов по способности к синтезу лектинов

Первой задачей наших исследований было провести поиск наиболее активных продуцентов-микромицетов лектинов. Исследуя экстракты мицелия и культуральную жидкость 69 штаммов родов *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Bipolaris*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* и *Penicillium*, было обнаружено, что микромицеты были способны к синтезу лектинов различной степени активности, причем активность мицелиальных лектинов микромицетов была на порядок выше, чем у внеклеточных лектинов (мицелиальные лектины титр 16384, внеклеточные - 512). 54 штамма микромицетов внеклеточные лектины не синтезировали. Способностью к синтезу активных, внеклеточных лектинов обладал лишь штамм рода *Rhizoctonia*.

Интересным является факт, что различные штаммы одного вида могут синтезировать, как активные лектины, так и не синтезировать их. Можно предположить, что способность микромицетов к синтезу лектинов зависит не только от вида, но и от места и условий обитания штамма.

Одним из методов, позволяющим повысить чувствительность реакции гемагглютинации лектинов с эритроцитами и одновременно увеличить активность лектинов, является модификация эритроцитов ферментами [Ветченкина, Никитина, 2008; Thakur *et al.*, 2007]. В наших экспериментах было установлено, что увеличение активности мицелиальных и внеклеточных лектинов в 2-4 раза наблюдается у микромицетов при обработке эритроцитов трипсином. По-видимому, ферментативная обработка эритроцитов указанным протеолитическим ферментом приводит к удалению гликопротеинов, в том числе сиалогликопротеинов, с поверхности мембран эритроцитов. В результате данного процесса на поверхности эритроцитов наблюдается снижение поверхностного заряда и освобождение рецепторов для взаимодействия с лектинами.

Таким образом, проведенный скрининг микромицетов позволил выявить штамм микромицета рода *Rhizoctonia*, который был способен к образованию активных лектинов.

2. Молекулярно-генетическая характеристика микромицета рода *Rhizoctonia*

Определение структуры нуклеотидной последовательности ITS-1 и ITS-2 регионов ДНК микромицета рода *Rhizoctonia* показало, что она имеет 98–100% сходство с ДНК других микромицетов. Анализ видовой принадлежности штамма по нуклеотидной последовательности участка ITS1-5.8SrDNA-ITS2 позволил установить, что он соответствовал нуклеотидной последовательности *Rhizoctonia solani* из анастомозной группы 2-2 (AG-2-2, DQ452128) [Godoy-Lutz *et al.*, 2008].

Таким образом, с учетом морфологической характеристики, микромицет рода *Rhizoctonia* принадлежит к отделу *Basidiomycota*, семейству *Ceratobasidiaceae*, виду *Rhizoctonia solani*.

По первичной структуре нуклеиновых кислот штамм *Rhizoctonia solani* был депонирован в базе данных GenBank под номером KP216526.

3. Динамика образования лектинов в зависимости от роста микромицета *Rhizoctonia solani*

Изучение динамики образования лектинов микромицетом рода *Rhizoctonia solani* проводили на среде КГ, при температуре 28°C. Результаты исследования показали, что наиболее интенсивное образование лектинов микромицетом *R. solani* наблюдается на 8-11 сутки (в период стационарной фазы роста). Увеличение синтеза лектинов происходит параллельно приросту биомассы микромицета, но прямая корреляция этих показателей отсутствует, поскольку на 12 сутки культивирования штамма активность лектинов резко падает, несмотря на сохранение показаний по биомассе (рис. 1).

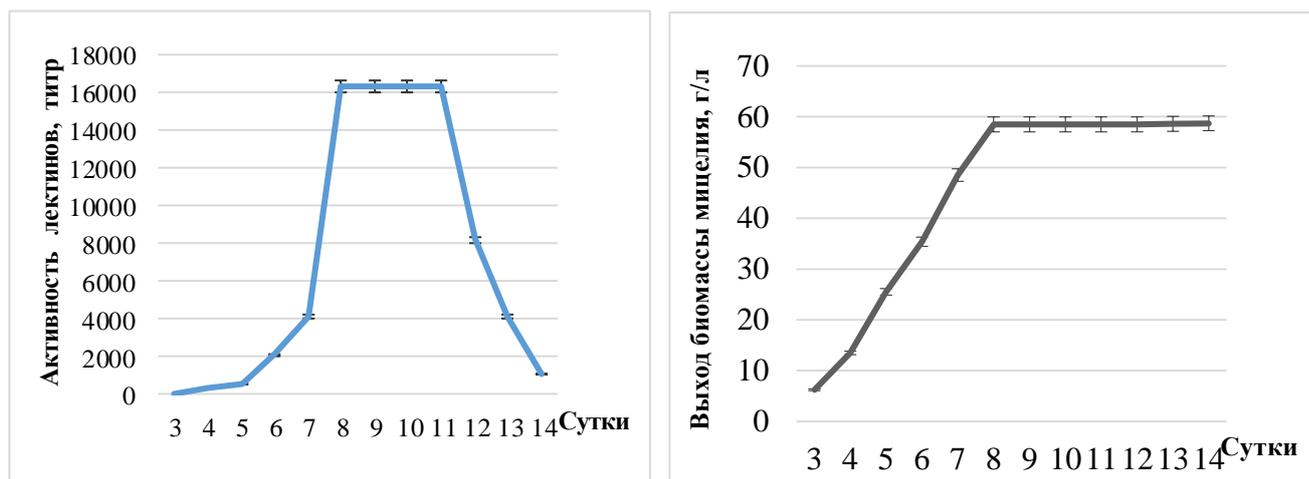


Рисунок 1. Динамика образования лектинов и роста микромицета *R. solani*

Можно предположить, что лектины синтезируются одновременно с ростом мицелия грибов и могут быть вовлечены в процесс его формирования.

Поскольку процесс образования лектинов не в малой степени связан с ростом культуры, можно было предположить, что подбор условий, повышающих прирост биомассы мицелия, будет одновременно усиливать синтез лектинов.

4. Подбор оптимальной среды культивирования микромицета для повышения процесса образования лектинов

Для определения наиболее благоприятной среды для роста и накопления лектинов микромицетом было проведено глубинное культивирование *R. solani* в различных питательных средах, таких как Сабуро, Чапека и КГ. Основное отличие этих сред связано с присутствием в питательной среде различных

источников углерода (среда Сабуро - пептон и глюкоза, среда Чапека – сахароза, КГ- глюкоза и крахмал).

Результаты исследований показали, что на 8-ые сутки роста микромицета наиболее интенсивное образование лектинов (титр 16384) наблюдалось только на среде КГ с концентрацией глюкозы 20,0 г/л. Дополнительное внесение сахарозы или крахмала в среду КГ приводило к снижению роста исследуемого микромицета и активности лектинов.

Внесение дополнительных неорганических источников азота в питательную среду культивирования микромицета, таких как нитрат аммония, нитрат натрия и сульфат аммония, в основном, не влияло на рост и накопление биомассы микромицетом, однако приводило к значительному (в 2-32 раз) снижению гемагглютинирующей активности лектинов данного микромицета, что, по-видимому, является результатом проявления азотной катаболитной репрессии.

Изучение влияния отдельных аминокислот на активность лектинов штамма *R. solani* показало, что добавление в среду КГ аспарагина и треонина в концентрации 100 мкг/мл приводит к значительному усилению (в 2 раза) их активности по сравнению с другими вариантами опытов (триптофан, аргинин). Прирост биомассы в данном варианте повышался лишь в 1,2 раза.

5. Выделение и очистка лектина микромицета *Rhizoctonia solani*

С целью дальнейшего изучения физико-химических свойств и биологических функций лектина микромицета *R. solani* была разработана и стандартизована 6 ступенчатая схема его выделения и очистки (рис. 2).

Первичное выделение лектина *R. solani* проводилось путем осаждения белков 65% насыщенным раствором сульфата аммония с последующим диализом.

Дальнейшая очистка лектина включала подбор различных хроматографических сорбентов, обеспечивающих наиболее полное удаление сопутствующих компонентов. Максимальный выход и очистку лектина *R. solani* удалось получить с помощью двух последовательных ионообменных хроматографий при использовании анионообменного картриджа Mini Macro-Prep High Q и колонки с сорбентом DEAE-Sephарose (рис. 3).

Заключительным этапом очистки лектина *R. solani* была хроматография на гель - фильтрационной колонке с Sephadex G - 50, где был получен очищенный препарат лектина с удельной активностью $1,0 \times 10^5 \pm 144,2$ U/мг (выход 17,2 %, степень очистки 107,54) (табл. 1).

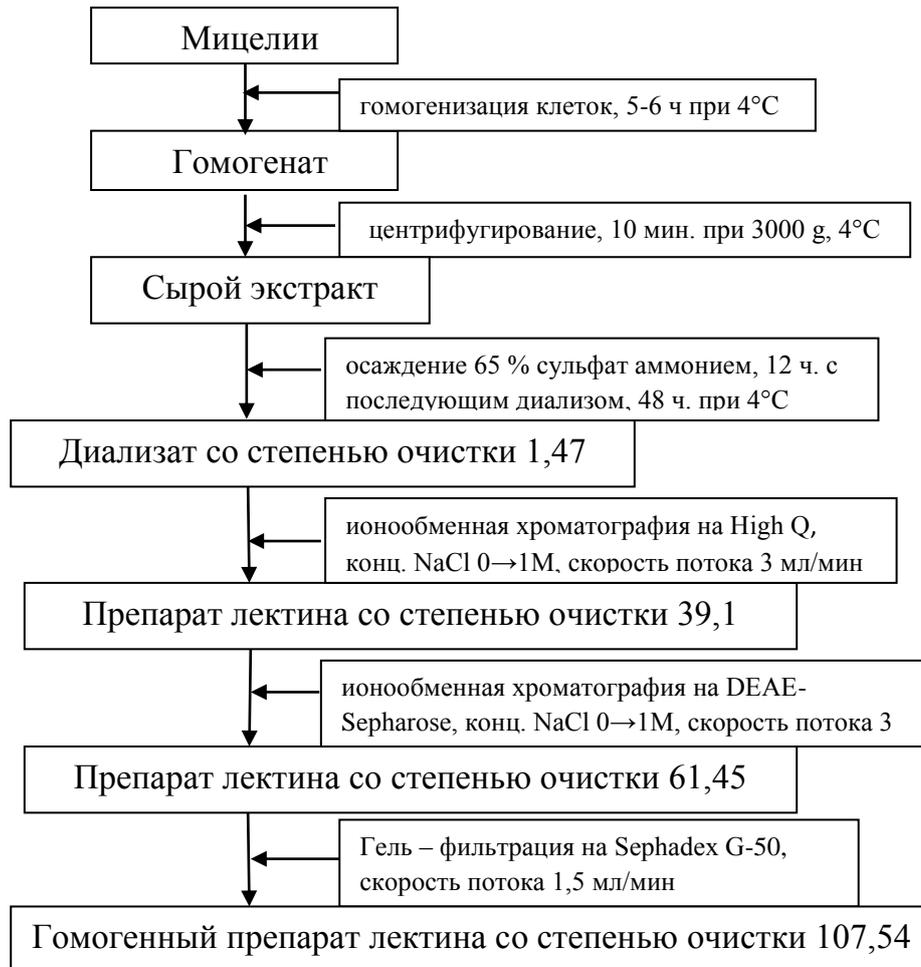


Рисунок 2. Принципиальная схема получения лектина *Rhizoctonia solani*

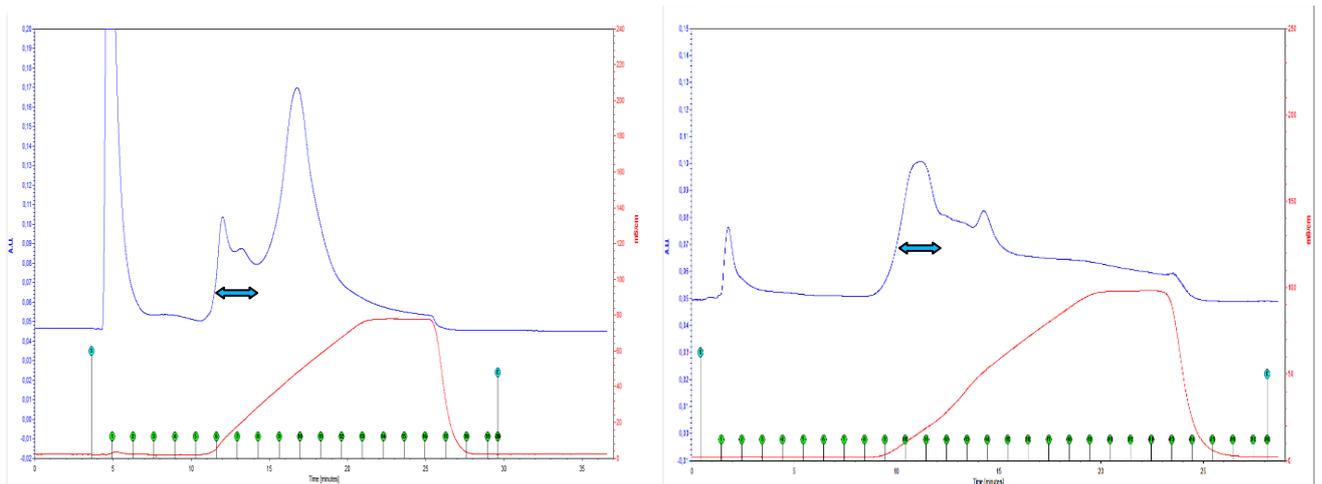


Рисунок 3. Хроматограмма препарата лектина микромицета *R. solani* после ионообменной хроматографии на колонке Bio-Scale™ Mini Macro-Prep High Q (справа) и DEAE-Sepharose (слева), уравновешенной Tris-HCl буфером. Стрелками показаны фракции, обладающие гемагглютинирующей активностью.

Таблица 1. Выделение и очистка лектина из сырого экстракта *Rhizoctonia solani*

Очистка	Объем, мл	Белок, мг/мл	Общий белок, мг	Титр ГА	Общая ГА ¹ , U	Удельная ГА ² , U/мг	Степень очистки	Выход, %
Сырой экстракт	5,8	17,2	99,8	16384	95027	$0,95 \times 10^3$	1	100
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄ и диализ	3	23,4	70,2	32768	98304	$1,4 \times 10^3$	1,47	103,5
Bio-Scale™ Mini Macro-Prep High Q	3	0,22	0,66	8192	24576	$3,7 \times 10^4$	39,1	25,9
DEAE-Sephrose	3	0,14	0,42	8192	24576	$5,9 \times 10^4$	61,45	25,9
Sephadex G-50	1	0,16	0,16	16384	16384	$1,0 \times 10^5$	107,54	17,2

¹ Общая гемагглютинирующая активность = ГА × объем (мл).

² Удельная гемагглютинирующая активность = U / белок (мг).

6. Определение степени чистоты и структуры лектина

Высокая степень чистоты лектина *R. solani* была подтверждена наличием одной полосы на электрофореграммах, полученных методом электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (рис. 4).

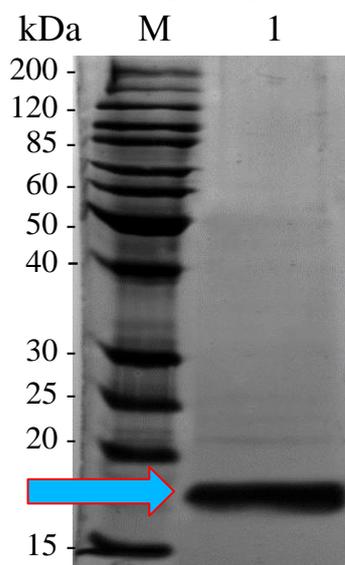


Рисунок 4. Электрофореграмма очищенного лектина *R. solani*, проявленная с использованием нитрата серебра: М - маркерные белки PageRuler™ Unstained Protein Ladder (10 - 200 kDa); 1- препарат лектина после ионообменной хроматографии и гель - фильтрации. Стрелкой показан лектин микромицета *R. solani*.

Молекулярная масса гомогенного лектина в денатурирующих условиях соответствовала $18 \pm 1,5$ кДа. Однако дальнейшее определение молекулярной массы нативного лектина *R. solani* методом гель-фильтрации на Sephadex G-100 показало, что она находится в пределах 36 ± 2 кДа (рис. 5).

Сравнение полученных результатов проведенных опытов позволило сделать вывод, что лектин *R. solani* имеет димерное строение и состоит из двух идентичных субъединиц.

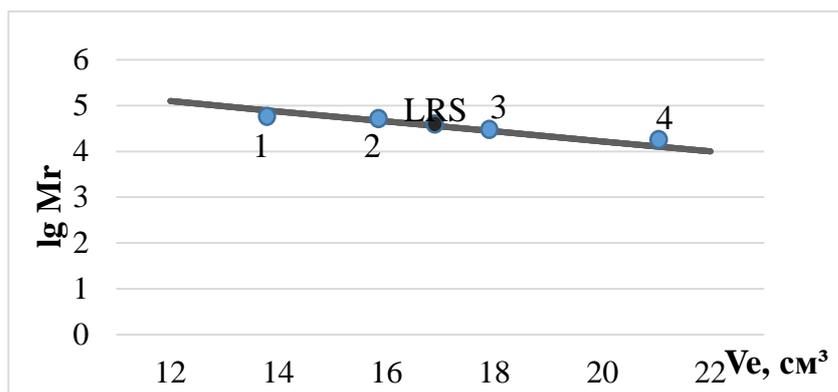


Рисунок 5. Определение молекулярной массы лектина *R.solani*: 1- бычий сывороточный альбумин (70 кДа), 2 - овальбумин (45 кДа), 3 - α -химотрипсин (26 кДа), 4 - лизоцим (14 кДа)

Определение первичной структуры лектина *Rhizoctonia solani* и поиск гомологичных белков среди различных организмов показал, что отдельные аминокислотные последовательности пептидов лектина *Rhizoctonia solani* имели сходство с некоторыми последовательностями белков других организмов. Тем не менее, параметр score для данных пептидов составлял меньше 80 ед., что свидетельствует об отсутствии достоверного сходства между ними.

Сравнительный анализ первичной структуры исследуемого лектина *R. solani* со структурой агглютинаина *Rhizoctonia solani* AG3, доступной на сервере NCBI показал, что его аминокислотная последовательность имела лишь 32 % сходства с лектином *Rhizoctonia solani* из анастомозной группы 3 (AG3) (рис. 6).



Рисунок 6. MALDI-TOF масс-спектрометрия коротких пептидов лектина *Rhizoctonia solani*. Наложение аминокислотных последовательностей пептидов исследуемого лектина на основную аминокислотную последовательность лектина *Rhizoctonia solani* AG3. Жирным шрифтом обозначены аминокислотные последовательности лектина *Rhizoctonia solani*, сходные агглютинуину *Rhizoctonia solani* из анастомозной группы 3 (AG3)

Следовательно, полученный нами лектин *Rhizoctonia solani* является новым, ранее не установленным белком.

7. Исследование некоторых физико-химических и мутагенных свойств лектина *Rhizoctonia solani*

7.1. Углеводная специфичность лектина

Одной из основных характеристик лектинов различных организмов является их специфичность по взаимодействию с различными сахарами. Данное свойство придает лектинам уникальность и служит основой для их классификации.

Проведенные нами исследования по влиянию различных углеводов на процесс агглютинации лектина *R. solani* с эритроцитами показал, что лектин имел сродство к простым сахарам D-галактозе, L-фукозе и N-ацетилгалактозамину (с МИК 0,147 мМ, 0,293 мМ и 0,586 мМ, соответственно), к дисахаридам D-лактозе и D-мелибиозе (МИК 0,293 мМ), трисахариду D-раффинозе (МИК 1,172 мМ), а также к полисахариду хондроитин-6-сульфат (МИК 1,25 мг/мл). Ингибирующее действие других сахаров на процесс агглютинации лектина с эритроцитами установлено не было.

Таким образом, проведенные нами исследования по влиянию различных углеводов на процесс агглютинации лектинов с эритроцитами показал, что полученный лектин *R. solani* является галактозо-специфичным белком, поскольку внесение в реакционную смесь минимальной концентрации галактозы (0,147 мМ) приводило к потере лектином гемагглютинирующей активности.

7.2. Температурный, рН оптимумы и диапазон стабильности лектина

Для создания лекарственного препарата, в том числе на основе лектина, необходимо знать ряд его физико-химических и мутагенных свойств.

В наших экспериментах было показано, что лектин микромицета *R. solani* является термостабильным и щелочеустойчивым белком. Температурный оптимум и диапазон стабильности лектина находится в диапазоне от 10 до 50 °С (табл.2).

Таблица 2. Влияние температуры на активность лектинов *Rhizoctonia solani*

	Т-оптимум (Т _{50%})	Время полуинактивации, мин						
		5°С	10-50°С	55°С	60°С	65°С	70°С	80°С
Лектин	10-50 (5-60)	20	ст	40	20	15	10	нс

Т_{50%} - диапазон температурных значений, при которых гемагглютинирующая активность выше 50% от наибольшего значения; ст – белок стабилен при инкубации в течение 60 мин; нс – белок не стабилен и инактивируется за 5 мин.

рН-оптимум соответствует значениям 6,5-8,5, однако при крайних значениях рН стабильность лектина снижалась (табл.3).

Таблица 3. Влияние pH на активность лектинов *Rhizoctonia solani*

	pH – оптимум (pH _{50%})	Время полуинактивации, ч										
		4	5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	10	11
Лектин	6,5-8,5 (6,0-9,0)	нс	нс	1	6	ст	ст	ст	12	1	нс	нс

pH_{50%} - диапазон pH-значений, при которых гемагглютинирующая активность выше 50% от наибольшего значения; ст – белок стабилен при инкубации в течение 24 часов; нс – белок не стабилен и инактивируется за 60 мин.

Полученные данные согласуются с результатами исследований других авторов, где установлено, что лектины микромицетов способны сохранять свою активность в пределах температур от 5 до 100°C и pH от 1,5 до 12,5.

7.3. Влияние ионов металлов на активность лектина

Биологическая активность многих лектинов клеток растений и животных требует присутствия в их составе ионов металлов. Однако для большинства лектинов микроскопических грибов их присутствие не обязательно. В наших экспериментах влияние ионов металлов на активность лектина *R. solani* изучалось при внесении в реакционную смесь солей различных металлов (CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, AlCl₃, FeCl₃, FeSO₄, CuSO₄, MnCl₂, KCl, CoCl₂) в концентрациях от 1,25 до 20 мМ. Результаты экспериментов показали, что лектин *R. solani* является металл-зависимым белком. Присутствие двухвалентных ионов Ca²⁺ в концентрации 2,5-20 мМ и ионов Mn²⁺ в концентрации 10-20 мМ повышали активность лектина в 2 раза, а удаление их с помощью ЭДТА снижало активность лектина *R. solani* на 25%. Последующее инкубирование лектина с ионами металлов Ca²⁺ и Mn²⁺ в концентрации 40 мМ приводило к полному восстановлению их активности (рис. 7).

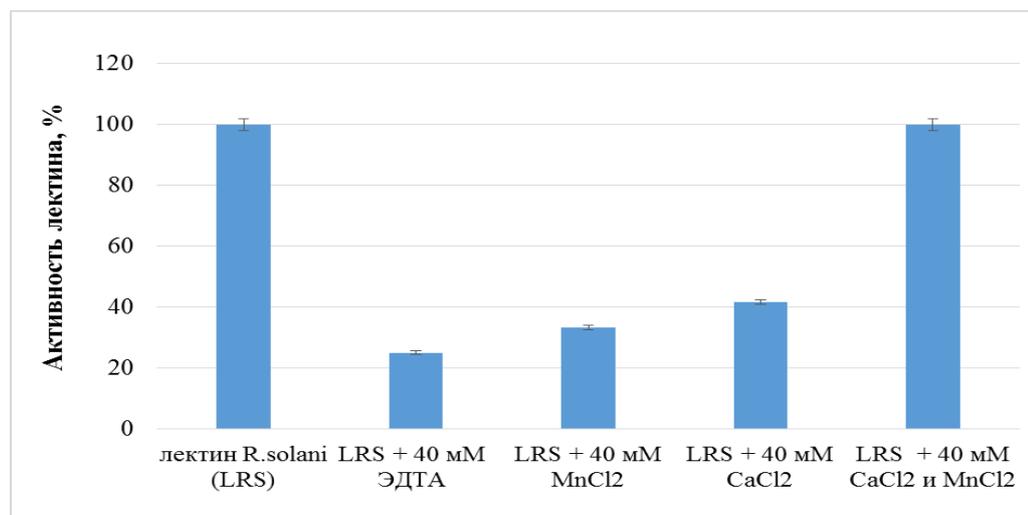


Рисунок 7. Влияние ЭДТА и двухвалентных катионов Ca²⁺ и Mn²⁺ на активность лектина *Rhizoctonia solani*

Необходимость присутствия двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mn^{2+} в составе лектина *R. solani*, по-видимому, обусловлена тем, что данные ионы металлов могут принимать участие в формировании сайта связывания углеводов лектина или обеспечивать общую стабильность структуры белка.

7.4. Мутагенная активность препарата лектина

Важным критерием любого биологически активного соединения является, прежде всего, его безопасность для человека и окружающей среды. Одним из общепринятой линейки методов исследований соединений на мутагенную активность является тест Эймса.

В наших экспериментах с помощью теста Эймса было установлено, что лектин *R. solani* не вызывает мутации типа замены пар оснований или сдвига рамки считывания, поскольку в тест-штаммах (*S.typhimurium* TA98 и *S.typhimurium* TA100) лектин не вызывал увеличение частоты реверсий (табл.4).

Таблица 4. Величина мутагенного индекса препарата лектина *Rhizoctonia solani*

	ТА 98	ТА 100
	Мутагенный индекс	
Негативный контроль (Tris-HCl буфер)	1	1
Позитивный контроль (2-нитрофлуорен или азид натрия)	4,1	9,8
Лектин <i>R. solani</i>	1,1	1,05

Таким образом, мутагенный индекс лектина *Rhizoctonia solani* находится на уровне негативного контроля.

8. Влияние препарата лектина *Rhizoctonia solani* на рост и развитие условно-патогенных и патогенных бактерий

Анализ литературы показал, что ряд лектинов, выделенных из микробных, растительных и животных клеток, способны оказывать ингибирующее действие на рост и развитие патогенных микроорганизмов.

Проверка действия лектина микромицета *R. solani* на рост и развитие микроорганизмов показала, что он обладает ингибирующим действием на рост и развитие грамм-положительных и грамм-отрицательных патогенных и условно-патогенных бактерий (рис. 8, 9). Однако, избирательность действия лектина *R. solani* была выше по отношению к штаммам грамм - положительных бактерий, чем к штаммам грамм – отрицательных бактерий.

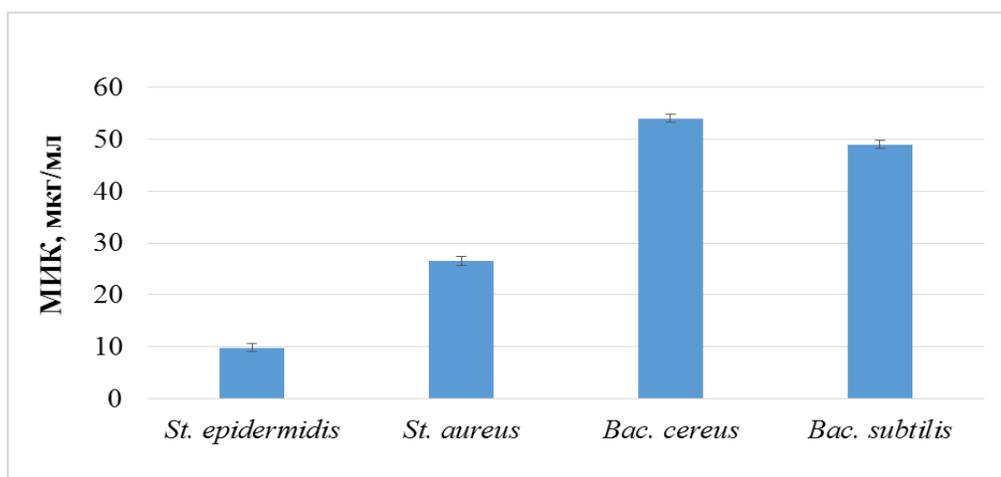


Рисунок 8. Минимальная ингибирующая концентрация лектина *Rhizoctonia solani* в отношении грамм – положительных микроорганизмов.

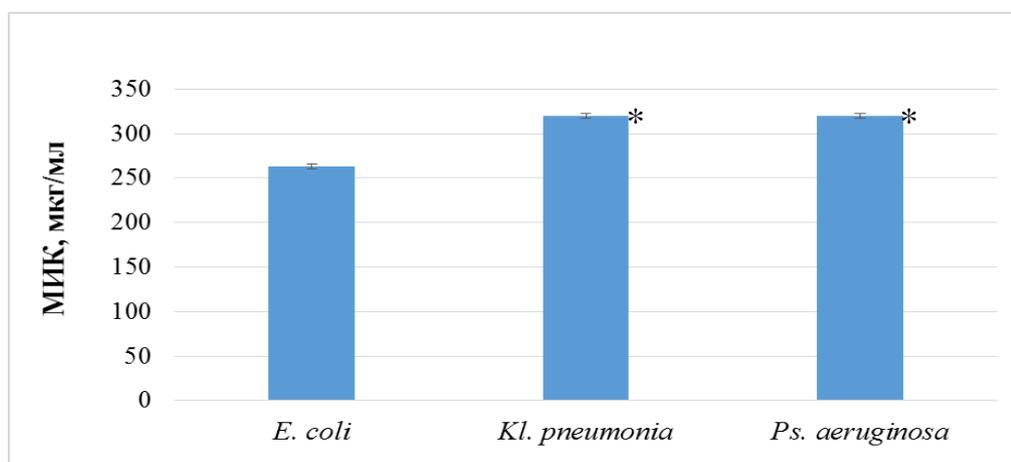


Рисунок 9. Минимальная ингибирующая концентрация лектина *Rhizoctonia solani* в отношении грамм - отрицательных микроорганизмов. «*» - лектин в концентрации 320 мкг/мл полностью не подавлял рост и развитие бактерий.

Согласно данным CLSI/NCCLS, лекарственное соединение считается активным, если МИК ≤ 16 мкг/мл. В наших экспериментах, значение МИК лектина *R. solani* по отношению к штаммам грамм – положительных составляла 9-54 мкг/мл, для грамм – отрицательных бактерии - 240 мкг/мл и выше. Наибольшую чувствительность к действию лектинов проявляли штаммы *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus*, значения МИК которых составляло $9,8 \pm 0,3$ мкг/мл и $26,5 \pm 0,8$ мкг/мл, соответственно.

Антимикробная активность лектина *R. solani*, по-видимому, связана с взаимодействием протонированных функциональных групп (аминогрупп) в белке лектина с отрицательно заряженными группами молекул на поверхности клеток, что приводит к нарушению процесса роста и деления бактерий. Кроме того, более выраженное антибактериальное действие галактозоспецифичного лектина *R. solani* по отношению к грамм-положительным микроорганизмам можно

объяснить тем, что в состав их клеточной стенки входят тейхоевые кислоты, гидроксильные группы полиолов, которых могут быть гликозилированы различными углеводными остатками, в том числе и галактозой.

Действие лектина *R. solani* было наиболее эффективно в отношении *St. epidermidis*. Несмотря на то, что данный микроорганизм относится к условно-патогенным бактериям, он способен вызывать, как нозокомиальные, так и внебольничные инфекции, поэтому препарат лектина *R. solani* может быть рекомендован для дальнейшего исследования в качестве потенциального лекарственного препарата для профилактики и лечения данных инфекционных заболеваний.

9. Влияние препарата лектина *R. solani* на различные линии опухолевых и нормальных клеток в условиях *in vitro*

В настоящее время в литературе имеется немало зарубежных работ, посвященных лектинам клеток растений и животных, обладающих противоопухолевой активностью. Однако лектины микромицетов остаются в этом отношении мало изученными соединениями.

В наших исследованиях цитотоксичность лектина *R. solani* определяли на таких линиях клеток, как раковые клетки молочной железы (MCF-7), простаты (PC-3), шейки матки (Hela), а также нормальные клетки почек эмбриона (HEK-293) и фибробластов кожи человека (HSF).

Методом МТТ - теста, было установлено, что концентрация препарата лектина, при которой происходило 50%-ное ингибирование роста различных линии опухолевых и нормальных клеток, колебалась в пределах от 3 до 10 мкг/мл (рис. 10). При этом более выраженную цитотоксичность препарат лектина проявлял по отношению к опухолевым клеткам MCF-7 и Hela по сравнению с его действием на нормальные клетки человека HEK-293, HSF и клетки опухоли PC-3.

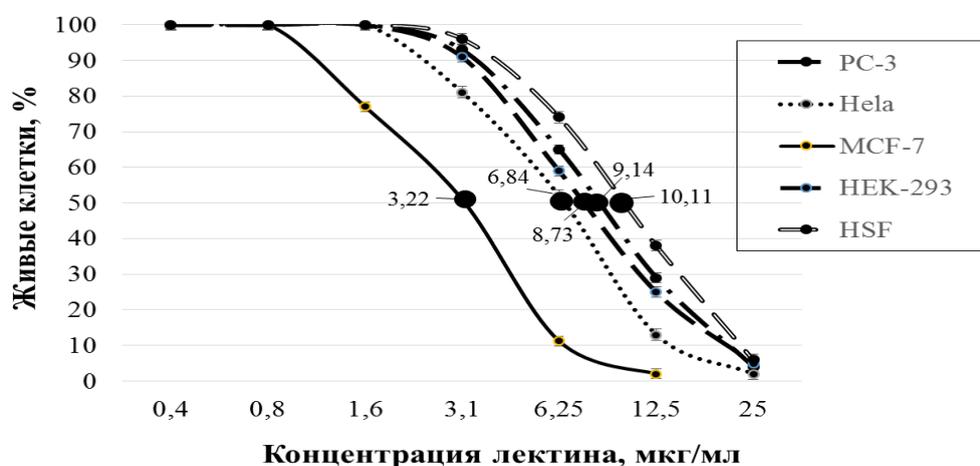


Рисунок 10. Цитотоксическая активность препарата лектина *R. solani* в отношении различных линий опухолевых и нормальных клеток. Точками показаны значения IC₅₀.

Более выраженное влияние препарата лектина *R. solani* на клетки MCF-7 и Hela, по-видимому, связано со структурой и составом плазматической мембраны опухолевых клеток. Можно предположить, что на поверхности данных клеток, как и в случае грамм-положительных бактерий, имеется значительное количество углеводных остатков галактозы и N-ацетилгалактозамина, которые активно связываются с лектином *R. solani*, обладающим углеводной специфичностью к данным сахарам. Взаимодействие лектина с данными клетками приводит к последующей их гибели. Подтверждением данного предположения является результаты действия лектина фитопатогенного гриба *Sclerotium rolfii* (SRL), обладающего специфичностью к N-ацетилгалактозамину, который связывался с клеточной поверхностью раковых клеток молочной железы (MCF-7 и ZR-75) и индуцировал их апоптоз [Savanur *et al.*, 2014].

В наших исследованиях наиболее выраженное цитотоксическое действие лектина *R. solani* наблюдались в отношении опухолевых клеток молочной железы (MCF-7). Значение IC₅₀ лектина по отношению к культуре MCF-7 составило 3,22 ± 0,1 мкг/мл. Согласно данным Национального Института Злокачественных Новообразований (National Cancer Institute, NCI) лекарственное соединение считается активным, если значение IC₅₀ составляет ≤ 4 мкг/мл после совместного контакта препарата с исследуемой линией клеток в течение 48-72 часов, т.е лектин *R. solani* может быть рассмотрен в качестве перспективного лекарственного соединения.

9.1. Влияние лектина *R. solani* на индукцию апоптоза в клеточных линиях *in vitro*

Анализ литературы показал, что апоптоз является одним из основных механизмов клеточной смерти, вызываемый лектинами. Поскольку одним из основных показателей апоптоза является снижение трансмембранного потенциала митохондрий клеток, нами проводилось изучение действия лектина *R. solani* в концентрациях 3,21-6,25 мкг/мл на данный потенциал в опухолевых и нормальных клетках (рис. 12, 13). В качестве опухолевых клеток использовали линии клеток рака молочной железы (MCF-7) и шейки матки (Hela), а также условно-нормальные клетки почек эмбриона (HEK-293). Уровень трансмембранного потенциала митохондрий клеток после совместного инкубирования с лектином оценивали методом проточной цитометрии по интенсивности флуоресценции митохондрий, окрашенных этиловым эфиром тетраметилродамина (TMRE).

Результаты исследований показали, что лектин *R. solani* в данных концентрациях обладал избирательной цитотоксичностью и приводил к снижению трансмембранного потенциала в клетках изучаемых линий. Наиболее

интенсивное снижение флуоресценции TMRE наблюдалось после совместной инкубации лектина с опухолевыми клетками MCF-7 (рис. 11, 12).

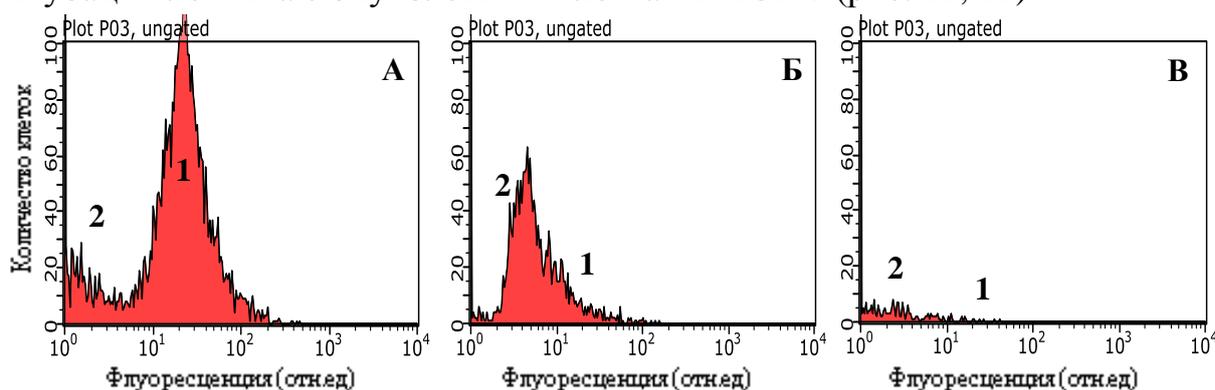


Рисунок 11. Распределение флуоресценции 100 нМ TMRE в клетках MCF-7 после культивирования с лектином *R. solani*: А – контроль (клетки без обработки); Б, В – опыт (обработанные клетки препаратом лектина в концентрации 3,21 и 6,25 мкг/мл, соответственно). 1-активные митохондрии здоровых клеток; 2-апоптотические клетки с деполяризованными митохондриями.

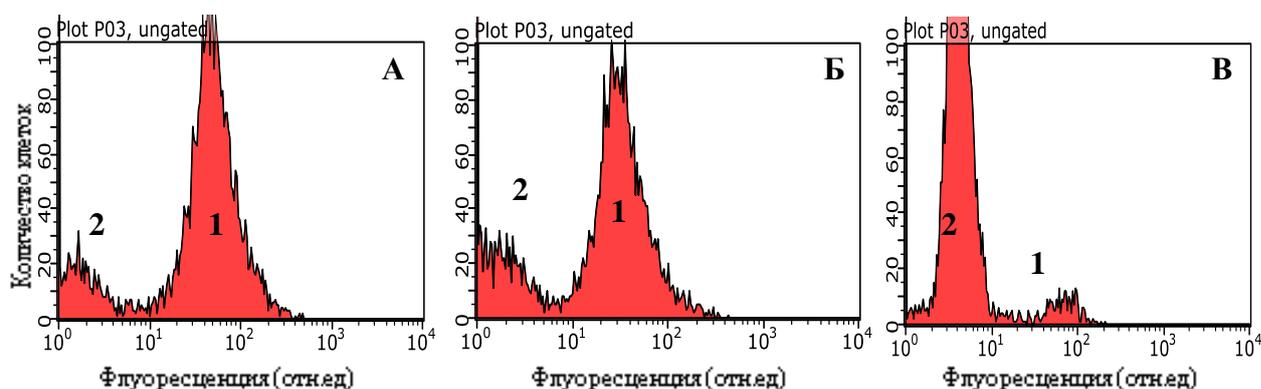


Рисунок 12. Распределение флуоресценции 100 нМ TMRE в клетках HEK-293 после культивирования с лектином *R. solani*: А – контроль (клетки без обработки); Б, В – опыт (обработанные клетки препаратом лектина в концентрации 3,21 и 6,25 мкг/мл, соответственно). 1-активные митохондрии здоровых клеток; 2-апоптотические клетки с деполяризованными митохондриями.

Можно предположить, что лектин проникая в данные клетки, по-видимому, дестабилизирует мембрану их митохондрий, индуцируя апоптоз. В отличие от клеток MCF-7, в клетках Hela и HEK-293 после инкубации с лектином в концентрации 3,21 мкг/мл трансмембранный потенциал митохондрий снижался незначительно.

Исходя из полученных результатов, можно сказать, что лектин *R. solani* обладает высоким биологически активным потенциалом и может быть рекомендован для дальнейших исследований в качестве лекарственного препарата для профилактики и лечения стафилококковых инфекций и рака молочной железы.

ВЫВОДЫ

1. Скрининг 69 штаммов микромицетов показал, что штамм рода *Rhizoctonia* (отдел *Basidiomycota*, семейство *Ceratobasidiaceae*, вид *Rhizoctonia solani*), продуцирует как мицелиальные, так и внеклеточные лектины с более высокой гемагглютинирующей активностью по сравнению с другими штаммами.

2. Выявлено, что биосинтез лектинов микромицетом *Rhizoctonia solani* увеличивается в 2 раза при культивировании продуцента на картофельно-глюкозной среде с добавлением аминокислот аспарагина и треонина в концентрации 100 мкг/мл, в период стационарной фазы роста популяции.

3. Разработан метод выделения и очистки лектина *Rhizoctonia solani* на основе анионообменной и гель-фильтрационной хроматографии. Лектин является галактозо-специфичным, металлозависимым (ионы Ca^{2+} и Mn^{2+}), димерным белком с молекулярной массой 36 ± 2 кДа. Лектин термостабилен в диапазоне 10-50°C, щелочеустойчив в пределах pH 6,5-8,5.

4. Лектин микромицета *Rhizoctonia solani* обладает выраженным антибактериальным действием относительно роста и развития грамположительной микрофлоры (МИК 9-54 мкг/мл) по сравнению с грамм-отрицательной микрофлорой (МИК 263-320 мкг/мл).

5. Лектин микромицета *Rhizoctonia solani* в большей степени подавляет пролиферацию опухолевых клеточных линий (MCF-7, Hela) по сравнению с клеточными линиями (HSF, НЕК-293) в условиях *in vitro*. Наиболее выраженное цитотоксическое действие проявляется в отношении опухолевых клеток рака молочной железы человека (IC_{50} , мкг/мл - $3,22 \pm 0,1$; IC_{90} , мкг/мл - $6,8 \pm 0,2$).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных изданиях, включенных в список Scopus и ВАК:

1. Мухаммадиев Р.С. Физико-химические свойства лектина микромицета *Rhizoctonia solani* / Р.С. Мухаммадиев, А.Н. Ибрагимов, Т.В. Багаева // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им.Ю.А.Овчинникова. - 2016. - Т.12, №4. - С. 15-21.

2. **Muhammadiev R.S.** Isolation and structural characterization of lectin micromycetes *Rhizoctonia solani* / R.S. Muhammadiev, T.V. Bagaeva // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.- 2015.- V.6(6).-P.1756-1763.

3. **Muhammadiev R.S.** Mycelial and extracellular lectins lower fungi / R.S. Muhammadiev, T.V. Bagaeva // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. - 2015. -Vol.6, № 6. - P.1737-1743.

4. Багаева Т.В. Скрининг микромицетов по способности к синтезу лектинов // Т.В. Багаева, Рин.С. Мухаммадиев, Риш.С. Мухаммадиев, Ф.К. Алимова / Микология и фитопатология. - 2014. - Т. 48, № 2. - С. 107-111. Электронный адрес в интернете: <http://elibrary.ru/item.asp?id=21315000>

Другие статьи и тезисы в сборниках материалов конференций:

1. Мухаммадиев Риш.С. Внеклеточные лектины микромицетов // Риш.С. Мухаммадиев, **Рин.С. Мухаммадиев**, Г.В. Надеева, Т.В. Багаева / Сборник трудов IV Международной научной Интернет - конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее». Казань, КФУ, март 24-25. - 2015. - С. 79- 82.
2. **Мухаммадиев Р.С.** Новый лекарственный препарат на основе лектинов микромицетов // Р.С. Мухаммадиев / Сборник материалов конференции молодых ученых «Молодежь и инновации Татарстана». Казань, КФТИ КазНЦ РАН, октябрь 10-12. - 2012. - С.22-25.
3. **Мухаммадиев Рин.С.** Лектины грибов рода *Trichoderma* // Рин.С. Мухаммадиев, Риш.С. Мухаммадиев, Т.В. Багаева, Ф.К. Алимова, А.В. Панкова, А.Н. Ибрагимов / Сборник трудов III Международной научной - Интернет конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее». Казань, КФУ, апрель 17-19. - 2012. - С. 157-159
4. Габитов Р.А. Фитопатогенные микромицеты как источник физиологически активных лектинов // Р.А. Габитов, **Рин.С. Мухаммадиев**, Риш.С. Мухаммадиев, Т.В. Багаева / Тезисы школа конференция с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Актуальные аспекты современной микробиологии». Казань, КФУ, октябрь 24-26. - 2011. - С. 96-97.

Е-mail адрес автора: tanirtashirtanir@gmail.com

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01, e-mail: ziabramova@mail.ru