

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 615.322+547.963.61.001.6

М.В. Лахтин, В.М. Лахтин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин**РАЗНООБРАЗИЕ ЛЕКТИНОВЫХ СИСТЕМ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ****ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия**

Приведены результаты исследования лектиновых систем производственных штаммов лактобацилл и бифидобактерий кишечника человека. Лектиновые системы представлены как поверхностноклеточные и внеклеточные; солюбилизированные в мягких и жестких условиях; твердофазные флуоресцентные и хемилюминесцентные; анионные/кислые, околонеутральные и катионные/щелочные; маскированные/энкапсулированные экзополимерными веществами небелковой природы и неэнкапсулированные; род/вид/штамм/консорциум-типизируемые; связывающие синтетические полимерные гликоконъюгаты.

Ключевые слова: лектиновые системы, пробиотические бактерии, лактобациллы, бифидобактерии, синтетические гликополимеры

DIVERSITY OF PROBIOTIC BACTERIAL LECTIN SYSTEMS**M.V. Lakhtin, V.M. Lakhtin, S.S. Afanasiev, V.A. Alioshkin****G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow**

Lectin systems of industrial strains of probiotic bacteria of human origin were investigated. Lectin systems were observed as cell surface and extracellular; solubilized in mild and firm conditions; solid phased fluorescent and chemiluminescent; anionic/acidic, neutral and cationic/alkaline; masked/blocked/encapsulated with exopolymeric substances of non-protein origin (localized together) and non-encapsulated; genus/strain/consortia-specific and typing; specific to soluble artificial polymeric polyvalent glycoconjugates imitating exposed clusters of mucin-type glycans and possessing exposed multiple carbohydrate residues such as GalNAc- α - or Man- α - as side short branches of polyacrylamide linear chain). Results indicate prospects of glycoconjugates-binding lectin systems in glycobiology, molecular glycomedicine and bio(nano)glycotechnology.

Key words: lectin systems, probiotic microorganisms, lactobacilli, bifidobacteria, artificial glycolymers

Развитие технологий на основе пробиотических бактерий (ПБ) с учетом их высокомолекулярных метаболических продуктов узнавания и сигналлинга являются важной составляющей стратегических перспектив медицинской биотехнологии и медицинской микробиологии [1, 3, 7]. Одним из таких новых метаболических перспективных продуктов ПБ являются лектины – белки, способные распознавать гликоконъюгаты (ГК). Лектины широко распространены в природе на всех уровнях организации живого, участвуют в сигналлинге, являются находят разнообразное применение в гликобиологии, гликомедицине и гликобиотехнологии [8, 10, 11, 16, 17]. Среди них лектины ПБ (ЛПБ) мало изучены, характеризуются большим потенциалом использования [2, 7, 12–15]. В свою очередь, лектиновые системы (ЛС) вообще и, ЛС ПБ, в частности, остаются наименее исследованными.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовать с помощью набора ГК разнообразие ЛС индустриальных штаммов ПБ.

МЕТОДЫ

Препараты белков и ЛПБ готовили и ЛС идентифицировали, как описано ранее [4–6, 9, 12]. Концентрированные в фосфатно-солевом буфере (ФСБ рН

7.2–7.4) высокомолекулярные (более 27 кД) образцы в 1% твине-80 наносили на целлюлозные аппликаторы на пластине полиакриламидного геля (ПААГ). Разделенные изоэлектрофокусированием в пластине ПААГ (ИЭФ-ПААГ) в градиентах рН в интервале рН 4–8 (в присутствии 7–8 М мочевины и 5% (вес/объем) сахарозы, при температуре 8–10 °С, в условиях низковольтного электрофореза [600–700 В], в течение ночи [16–18 ч]) и электрооблотированные на мембрану белки проявляли флуоресцентным красителем *SYPRO Ruby protein stain* (Bio-RaD Lab.) или ГК-ПАА-биотином (www.lectinity.com) – 5 мкг/мл ГК в ФСБ в течение 16–24 ч при 4 °С в полипропиленовом корыте при мягком встряхивании блотта на качалке. Связавшийся с блотом биотин проявляли стрептавидин-пероксидазой, а связавшуюся пероксидазу – хемилюминесцентным субстратом. Флуоресценцию (Фл, возбуждение Фл при 365 или 254 нм) и хемилюминесценцию (Хл) регистрировали в режиме живого изображения (режиме реального времени) в темной камере системы (*Dark Room Bio-Chemi System* (UVP, Calif.)). Использовали светофильтры *Bromide Ethidium* и *Coomassie*. Анализ цифровых фотографий проводили с использованием пакета программ *LabWorks 4.0*. Для выявления максимального числа компонентов ЛС проводили компьютерную реконструкцию/редактирование фотографий.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Белковый состав ПБ различался у лактобацилл и бифидобактерий (рис. 1, 2), а картины Фл частично отражали штаммотипирование (рис. 1 – левая часть). Поверхностноклеточные белки пробиотика Ацилакт и составляющих его штаммов представлены в подавляющем большинстве кислыми белками (треки 1–4 на рис. 1). Некоторые из поверхностноклеточных

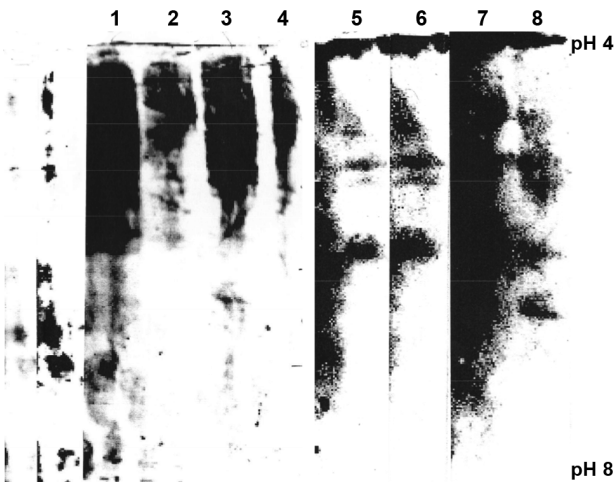


Рис. 1. Белки поверхности *Lactobacillus acidophilus* (пробиотика Ацилакт и составляющих его штаммов), проявленные флуоресцентным красителем SYPRO Ruby protein blot stain (Bio-Rad Lab.), возбуждение Фл при 365 нм, регистрация Фл с использованием светофильтра Bromide Ethidium (треки 1–4) или светофильтра Coomassie (треки 5–8). 1–3, 5–8 – белки, десорбированные посредством 1-3 М LiCl; 4 – верхний белковый слой (десорбция 0.2 М NaCl до десорбции с использованием LiCl); 1, 4, 5, 6 – Ацилакт; 2, 7 – штамм 100_{авт}; 3, 8 – штамм NK1; слева – белки культуральной жидкости штамма K₃III₂₄ (два трека с минимальным и максимальным набором).

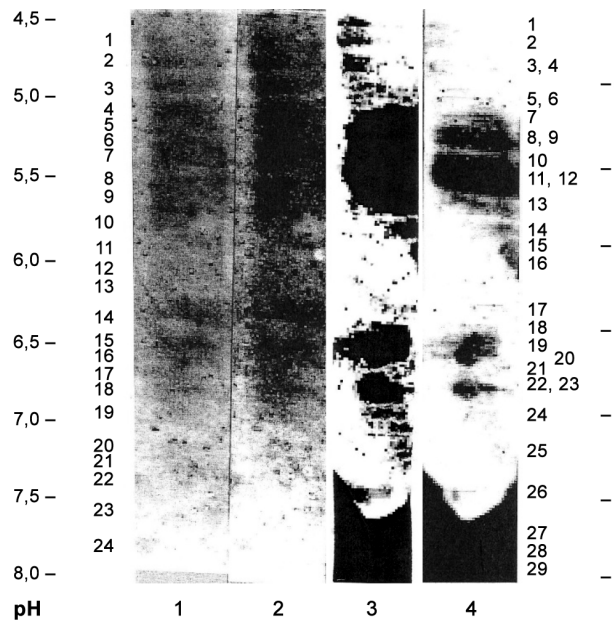


Рис. 2. Белки культуральной жидкости *B. longum* spp. *adolescentis* MC-42. Фильтр Coomassie (треки 1 и 2) или Ethidium Bromide (треки 3 и 4). В треках 2 и 3 усилены/реконструированы минорные белки треков 1 и 4. Белки 27-29 маскированы экзополимерными веществами.

белков лактобацилл организованы в высокомолекулярные распределенные в белковые блоки сильно флуоресцирующие ансамбли (треки 5–8 на рис. 1 справа). Белки бифидобактерий в щелочной области маскированы экзополимерными веществами (рис. 2).

На рис. 3–5 показаны примеры ЛС (поверхностноклеточных и внеклеточных, солюбилизированных в мягких и жестких условиях, твердофазных хемилюминесцентных, связывающих синтетические полимерные ПАА-ГК с экспонированными остатками GalNAc-альфа-или Man-альфа-) лактобацилл и бифидобактерий. Поверхностноклеточные ЛС проявляли сходство с внеклеточными (рис. 4). ЛС (сильно кислые, слабо кислые, околонеутральные и щелочные) значительно лучше типировали штаммы и консорциум штаммов (рис. 3, 5) по сравнению с установленным белковым массивом (рис. 1). По данным Хл число выявляемых компонентов ЛС возрастало, а их выраженность и дискретность улучшались при предварительной/дополнительной обработке ЛС детергентом в условиях кипячения (рис. 5).

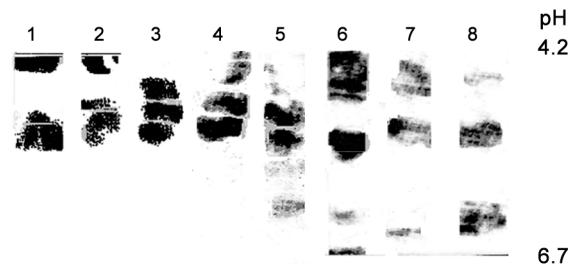


Рис. 3. Штамм-специфичные системы кислых лектинов лактобацилл и бифидобактерий в градиенте pH 4–7 (проявление лектинов на блотах ГК-биотином и стрептавидин-пероксидазой с последующим добавлением хемилюминесцентного субстрата пероксидазы). 1, 2 – бифидобактерии (*Bifidobacterium longum* spp. *adolescentis* MC-42; *B. gallinarum* ГБ); 3–8 – лактобациллы (3, 6 – *Lactobacillus helveticus* 100_{авт}; 5, 8 – *L. helveticus* NK1; 4, 7 – Ацилакт [*L. helveticus* NK1 + *L. helveticus* 100_{авт} + *L. casei* K₃III₂₄]); 1–5 – Man-альфа-ПАА-биотин; 6–8 – GalNAc-альфа-ПАА-биотин. Реконструированные паттерны, отражающие максимальное число системных лектиновых компонентов.

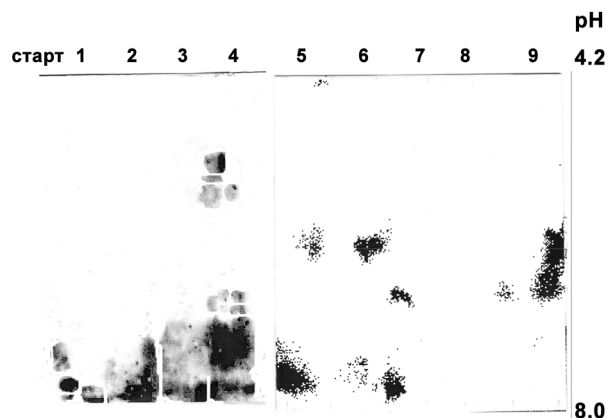


Рис. 4. Щелочные/катионные и околонеутральные системы лектинов бифидобактерий и лактобацилл в градиенте pH 5-8. 1, 2, 5, 6 – бифидобактерии; 3, 4, 7–9 – лактобациллы; 1-4 – GalNAc-альфа-ПАА-биотин; 5–9 – Man-альфа-ПАА-биотин; 3, 4, 7–9 – лектины, десорбированные посредством LiCl. Реконструированные паттерны, отражающие максимальное число системных лектиновых компонентов.

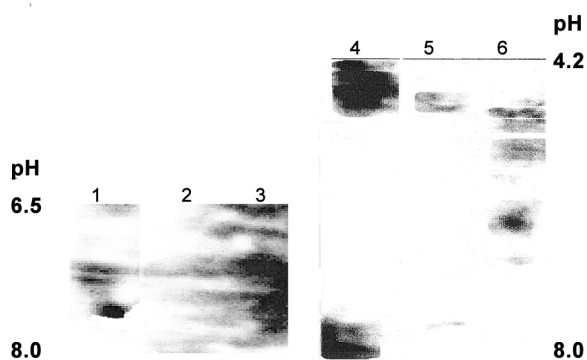


Рис. 5. Системы лектинов лактобацилл в градиенте pH 6.5–8.0 (слева) и pH 4.0–8.0 (справа). ИЭФ в ПААГ в 8 М мочевиной суммарного препарата высокомолекулярных белков (более 27 кД) лактобацилл после их кипячения в додецилсульфате натрия с 2-меркаптоэтанолом. 1, 4 – Ацилакт; 2, 5 – *Lactobacillus helveticus* 100; 3, 6 – *L. helveticus* NK1; слева – GalNAc-альфа-ПАА-биотин; справа – Man-альфа-ПАА-биотин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты указывают на разнообразие ЛС ПБ, возможность их использования для штаммотипирования, перспективы использования муцинсвязывающих и маннан-связывающих и связывающих аналоги ГК ЛС ПБ вместо ПБ или вместе с ними.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Караулов А.В. (ред.) Микробиоценозы и здоровье человека. – М.: Династия, 2015, 548 с.

Aleshkin VA, Afanasiev SS, Karaulov AV (eds) (2015). Microbiocenoses and human health [Mikrobiotsenoz i zdorovye tcheloveka], 107-172.

2. Лахтин В.М., Алешкин В.А., Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Поспелова В.В., Шендеров Б.А. Лектины, адгезины и лектиноподобные вещества лактобацилл и бифидобактерий // Вестник РАМН. – 2006. – № 1. – С. 28–34.

Lakhtin VM, Lakhtin MV, Alioshkin VA, Afanasiev SS (2006). Lectins, adhesions and lectin like substances of lactobacilli and bifidobacteria [Lektini, adgesini i lektinopodobniye veshstva laktobatsill i bifidobakteriy]. *Vestnik RAMN*, 1, 28-34.

3. Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Несвижский Ю.В., Поспелова В.В., Лахтин М.В., Воропаева Е.А., Черепанова Ю.В., Агапова Ю.В. Стратегические аспекты конструирования пробиотиков будущего // Вестник РАМН. – 2008. – № 2. – С. 33–44.

Lakhtin VM, Afanasiev SS, Alioshkin VA, Nesvizhskiy YV, Pospelova VV, Lakhtin MV, Voropayeva EA, Cherepanova YV, Agapova YV (2008). Strategical aspects of constructing probiotics in future [Strategicheskiye aspekti konstruirivaniya probiotikov budushevo]. *Vestnik RAMN*, 2, 33-44.

4. Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Лахтин В.М., Алешкин В.А. Гликоконъюгаты-распознающие системы бактериальных культур // Ключевые аспекты научной деятельности – 2014. Биологические науки: Материалы X Междунар. научно-практич. конф. «Ключевые

аспекты научной деятельности. Сер. «Биологические науки» (7-15 янв. 2014, Przemysl, Польша). Том 16. – С. 17–21.

Lakhtin MV, Afanasiev SS, Lakhtin VM, Alioshkin VA (2014). Glycoconjugates-recognizing systems of bacterial cultures (in Russian) [Glikokonjugaty-raspoznajushhie sistemi bakterial'nyh kul'tur]. *Ključevye aspekty nauchnoj dejatel'nosti – 2014. Biologicheskie nauki: Materialy X Mezhdunar. nauchno-praktich. konf. «Ključevye aspekty nauchnoj dejatel'nosti. Ser. Biologicheskie nauki»* (7-15 janv. 2014, Przemysl, Pol'sha), 16, 17-21.

5. Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Лахтин В.М., Алешкин В.А. Дот-блотовый анализ гликоконъюгаты-связывающих лектиновых препаратов, изолированных из бактериальных культур // Ключевые вопросы научной деятельности – 2014. Биологические науки: Материалы X Междунар. научно-практич. конф. (7-15 янв. 2014, Przemysl, Польша). – Т. 16. – С. 23–27.

Lakhtin MV, Afanasiev SS, Lakhtin VM, Aleshkin VA (2014). Dot blot analysis of glycoconjugates-binding lectin preparations isolated from bacterial cultures (in Russian) [Dot-blotovyy analiz glikokonjugaty-svjazyvajushhih lektinovyh preparatov, izolirovannyh iz bakterial'nyh kul'tur]. *Materialy X Mezhdunar. nauchno-praktich. konf. «Ključevye aspekty nauchnoj dejatel'nosti. Ser. «Biologicheskie nauki»* (7-15 janv. 2014, Przemysl, Pol'sha), vol. 16, 23-27.

6. Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Лахтин В.М., Алешкин В.А. Новые гликоконъюгаты-распознающие системы в культуральных жидкостях перспективных пробиотических штаммов бифидобактерий и лактобацилл // Наука и образование без границ – 2013: Материалы IX Междунар. научно-практич. конф. (7-15 дек. 2013, Przemysl, Польша). – Т. 37. – С. 64–68.

Lakhtin MV, Afanasiev SS, Lakhtin VM, Aleshkin VA (2013). New Glycoconjugates-recognizing Systems in Cultural Fluids of Perspective Probiotic Strains of Bifidobacteria and Lactobacilli [Novye glikokonjugaty-raspoznajushhie sistemy v kul'tural'nyh zhidkostyah perspektivnyh probioticheskikh shtammov bifidobakterij i laktobacill]. *Nauka i obrazovanie bez granic – 2013: Materialy IX Mezhdunar. nauchno-praktich. konf. (7-15 dek. 2013, Przemysl, Pol'sha)*, vol. 37, 64-68.

7. Лахтин М.В., Алешкин В.А., Лахтин В.М., Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Поспелова В.В. Роль лектинов пробиотических микроорганизмов в жизнеобеспечении макроорганизма // Вестник РАМН. – 2010. – № 2. – С. 3–8.

Lakhtin MV, Aleshkin VA, Lakhtin VM, Nesvizhskiy YV, Afanasiev SS, Pospelova VV (2010). The Role of lectins of probiotic microorganisms in sustaining the macroorganism [Rol lektinov probioticheskikh mikroorganizmov d zhizneobespetchenii makroorganizma]. *Vestnik RAMN*, 2, 3-8.

8. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Алешкин А.В. Лектины и ферменты в биологии и медицине. – М.: Династия, 2010. – 496 с.

Lakhtin MV, Lakhtin VM, Aleshkin VA, Afanasiev SS, Aleshkin AV (2010). Lectins and enzymes in biology and medicine [Lektiny i fermenty v biologii i meditsine], 496.

9. Способ получения лектинов, обладающих противокандидной активностью: Патент 2486241 Российская Федерация, МПК C12N1/20 / Лахтин М.В.,

Лахтин В.М., Алешкин А.В., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Кулакова Ю.В.; Заявитель и патентообладатель Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (RU). – 2012112390/10, заявл. 02.04.2012; опубл. 27.06.2013 Бюл. № 18 – 8 с.

Lakhtin MV, Lakhtin VM, Aleshkin AV, Aleshkin VA, Afanasiev SS, Kulakova YV (2013). Way of receiving the lektin possessing protivokandidny activity [Sposob polutcheniya lektinov obladayushih protivokandidnoy aktivnostyu]: Patent 2486241 Rossiyskaya Federatsiya, MPK C12N1/20; Applicant and patent holder Gabrichovsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (RU). 2012112390/10, appl. 02.04.2012; publ. 27.06.2013, Bul. N 18, 8 p.

10. Gabius HJ (2008). Glycans: bioactive signals decoded by lectins. *Biochem Soc Trans.*, 36, 1491-1496.

11. Imberty A (2013). Bacterial Lectins and Adhesins: Structures, Ligands and Functions. *Synthesis and Biological Applications of Glycoconjugates*, 3-11.

12. Lakhtin M, Lakhtin V, Aleshkin A, Bajrakova A, Afanasiev S, Aleshkin V (2012). Lectin systems imitating

probiotics: potential for biotechnology and medical microbiology. *Probiotics 2012*, 417-432.

13. Lakhtin MV, Lakhtin VM, Aleshkin AV, Afanasiev SS, Aleshkin VA (2013). Differences and similarities between new probiotic bifidobacterial and lactobacillus lectin systems interacting to glycoconjugates. *Glycoconjugate J.*, 30, 375-376.

14. Lakhtin MV, Lakhtin VM, Aleshkin AV, Afanasiev SS, Aleshkin VA (2013). Functional similarities and differences between new lectin systems in human organism: protein hormone and probiotic bacterial. *Glycoconjugate J.*, 30, 370.

15. Lakhtin M, Lakhtin V, Alyoshkin V, Afanasiev S (2011). Lectins of beneficial microbes: system organization, functioning and functional superfamily. *Beneficial Microbes*, 2 (2), 155-165.

16. Lakhtin V, Lakhtin M, Alyoshkin V (2011). Lectins of living organisms. The overview. *Anaerobe*, 17 (6), 452-455.

17. Schnaar RL (2015). Glycans and glycan-binding proteins in immune regulation: A concise introduction to glycobiology for the allergist, 135: 609-615.

Сведения об авторах Information about the authors

Лахтин Михаил Владимирович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; тел.: (495) 708-02-62; e-mail: info@gabrich.com)

Lakhtin Mikhail Vladimirovich – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of Gabrichovsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (125212, Moscow, ul. Admirala Makarova, 10; tel.: (495) 708-02-62; e-mail: info@gabrich.com)

Лахтин Владимир Михайлович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

Lakhtin Vladimir Mikhailovich – Doctor of Biological Sciences, Chief Research Officer of Gabrichovsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology

Афанасьев Станислав Степанович – Заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (e-mail: afanasievss409.4@bk.ru)

Afanasiev Stanislav Stepanovich – Honored Scientist of the Russian Federation, Professor, Doctor of Medical Science, Deputy Director of Gabrichovsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (e-mail: afanasievss409.4@bk.ru)

Алешкин Владимир Андрианович – Заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор биологических наук, директор ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

Aleshkin Vladimir Andrianovich – Honored Scientist of the Russian Federation, Professor, Doctor of Biological Sciences, Director of Gabrichovsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology