

Свойства лектинов и поверхностных биополимеров клеток непатогенных коринебактерий

В. С. Подгорский, И. М. Фуртат¹, Т. М. Ногина, Э. А. Коваленко,
Е. В. Сашук, Е. И. Гетьман

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 154, Киев, Украина, 03680

¹Национальный университет «Киево-Могилянская Академия»
Ул. Григория Сковороды, 2, Киев, Украина, 04070

furtat.im@gmail.com; tnogina@ukr.net

Цель. Изучить лектиновые свойства клеток непатогенных коринебактерий и препаратов их поверхностных биополимеров (ПБ), экстрагированных додецилсульфатом натрия (SDS). **Методы.** ПБ экстрагировали из интактных клеток 0,15 М раствором NaCl, содержащим 1 % SDS. Концентрацию белка определяли методом Лоури, углеводов – антроновым методом. Электрофорез проводили в системе ПААГ–SDS по Лэммли. Гемагглютинирующую активность (ГАА) определяли на эритроцитах кролика; углеводную специфичность лектинов – в реакции торможения гемагглютинации. **Результаты.** В электрофоретических спектрах препаратов ПБ выявлены белковые и углеводные биополимеры с молекулярной массой 10–120 кДа, не обладающие ГАА. После экстракции ПБ клетки коринебактерий сохраняли жизнеспособность и имели более высокую в сравнении с интактными клетками ГАА, равную 64–2048 единиц. Гемагглютинины обработанных SDS клеток большинства штаммов коринебактерий наивысшее сродство проявляли к муцину подчелюстной железы быка и N-ацетилнейраминовой кислоте. **Выводы.** У исследованных штаммов непатогенных коринебактерий обнаружены ассоциированные с внутренними слоями клеточной стенки лектины с преобладающей специфичностью к сиаловым кислотам.

Ключевые слова: *Corynebacterium*, поверхностные биополимеры, лектины, гемагглютинирующая активность, углеводная специфичность.

Введение. Как известно, коринебактерии имеют большое значение для медицины и биотехнологии, что обуславливает актуальность их исследования, в частности, лектинов и белоксодержащих поверхностных биополимеров (ПБ), которые могут отвечать за антигенную специфичность, устойчивость к терапевтическим агентам и другим факторам [1–5]. Следует отметить, что различные виды *Corynebacterium* и другие близкородственные им актинобактерии значительно отличаются от остальных грамположительных бактерий структурой и составом

клеточной стенки (КС), основным компонентом которой является комплекс, включающий ковалентно связанные между собой пептидогликан, арабиногалактан и миколовые кислоты [1]. Уникальной особенностью КС этих актинобактерий является формирование (дополнительно к цитоплазматической мембране) атипичной двухслойной мембраноподобной структуры, состоящей из миколовых кислот и гликолипидов [6]. Этот липидный бислой пронизан пориноподобными белками, образующими каналы, обеспечивающие диффузию небольших гидрофильных молекул в клетку [4, 7]. Белки находятся и в слое КС, примыкающем к ли-

пидному бислою, а также в S-слоях, расположенных на внешней поверхности клетки и состоящих из нековалентно связанных с КС однотипных белков или гликопротеинов [1, 8]. Наиболее изучены белоксодержащие ПБ у патогенных видов рода *Corynebacterium* – возбудителей дифтерии *C. diphtheriae* и непатогенных – продуцентов аминокислот *C. glutamicum*. У них исследованы порины [4, 7], белок PS1, имеющий миколтрансферазную активность [1, 9], и белок PS2, формирующий S-слой клеток [3].

Известно, что белоксодержащие ПБ коринебактерий могут играть роль ответственных за адгезию антигенных детерминант, связывать бактериофаги и иммуноглобулины [2, 5, 10, 11]. Часто функции медиаторов адгезии у них выполняют ассоциированные с клеткой лектины – белки, биологическая роль которых состоит в прямом нековалентном взаимодействии с углеводами или гликоконъюгатами, следствием чего являются реакции агглютинации или преципитации [10, 12, 13]. Сведения о гемагглютинирующей активности (ГАА) и лектинах коринебактерий в литературе весьма ограничены и касаются патогенных представителей рода – *C. diphtheriae*, *C. parvum* и *C. pyogenes* в связи с их участием в инфекционных процессах [2, 10, 12, 13]. Так, у *C. diphtheriae* описаны поверхностные лектиноподобные белки с молекулярной массой (м. м.) 67 и 72 кДа, которые могут функционировать как адгезины и способны связываться с рецепторами эритроцитов человека [2].

Непатогенные виды *Corynebacterium* в этом отношении не исследованы. Среди сапрофитных бактерий наиболее изучены лектины рода *Bacillus*, являющиеся внеклеточными сиалоспецифичными гликополимерами с широким спектром биологической активности [13, 14].

Для получения ПБ предложены методы их экстракции из целых клеток с помощью детергентов [15–17]. В таких случаях часто используют додецилсульфат натрия (SDS), который, взаимодействуя преимущественно с гидрофобными участками белковых молекул, экстрагирует из интактных клеток поверхностные белки и гликопротеины, ассоциированные нековалентными связями с другими компонентами КС [15, 16]. По данным литера-

туры, белоксодержащие S-слои клеток также могут легко удаляться детергентами с их поверхности без разрушения клеток [8].

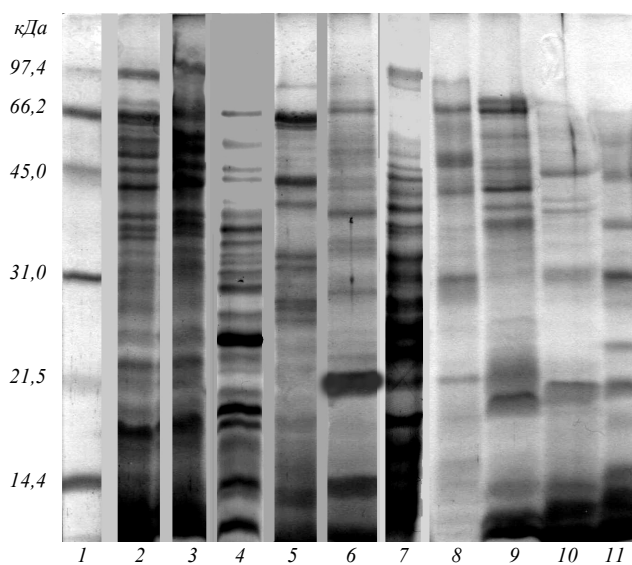
Учитывая изложенное выше, цель данной работы состояла в изучении лектиновых свойств интактных и обработанных SDS клеток, а также препаратов ПБ непатогенных коринебактерий, экстрагированных SDS из целых клеток.

Материалы и методы. Объектами исследования служили штаммы коринебактерий, поддерживаемые в Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ) Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины – *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732; *C. glutamicum* УКМ Ас-673, УКМ Ас-674, УКМ Ас-675, УКМ Ас-714, УКМ Ас-715, УКМ Ас-733; *C. flavescens* УКМ Ас-611; *C. terpenotabidum* УКМ Ас-610; *C. variabile* УКМ Ас-716, УКМ Ас-717; *C. vitaeruminis* УКМ Ас-718 и *Corynebacterium* sp. УКМ Ас-719.

Бактерии выращивали на жидкой питательной среде № 53 [18] при перемешивании ($n = 240$ об/мин) в течение 24 ч при температуре 28 °С. Поверхностные биополимеры КС экстрагировали из интактных клеток 0,15 М раствором NaCl, содержащим 1 % SDS («Sigma», США), pH 4,5, как описано ранее [19]. После центрифугирования экстракта (8000 об/мин) получены два препарата: 1) препарат поверхностных биополимеров КС, содержащихся в супернатанте и растворимых в SDS; 2) препарат клеток после экстрагирования из них ПБ. Для контроля жизнеспособности обработанные SDS клетки высевали на агаризованную среду № 53 и окрашивали по Граму. Целостность клеток контролировали с помощью электронной микроскопии при рабочем увеличении 20 тыс. на микроскопе JEM-1200 EX («JEOL», Япония).

Наличие диагностических аминокислот пептидогликана КС, миколовых кислот и моносахаридный состав клеток изучали по методам [20].

Содержание белков в препаратах ПБ определяли методом Лоури, количество углеводов – антроновым методом [21]. Электрофорез проводили в системе ПААГ–SDS («Sigma») по Лэммли с применением 14 % гелей и набора маркерных белков LMW («Bio-Rad», США) [19]. Для визуализации электрофореграмм использовали кумасси голубой R-250 («Serva», ФРГ) и AgNO₃ («Sigma») [22].



Электрофореграмма препаратов поверхностных биополимеров, экстрагированных SDS из целых клеток коринебактерий: 1 – маркерные белки LMW («Bio-Rad», США); 2 – *C. glutamicum* УKM Ac-714; 3 – *C. glutamicum* УKM Ac-715; 4 – *C. glutamicum* УKM Ac-733; 5 – *C. terpenotabidum* УKM Ac-610; 6 – *C. flavescens* УKM Ac-611; 7 – *C. variabile* УKM Ac-716; 8 – *C. variabile* УKM Ac-717; 9 – *C. vitaeum* УKM Ac-718; 10 – *C. ammoniagenes* УKM Ac-732; 11 – *Corynebacterium sp.* УKM Ac-719

ГАА исследовали с помощью трипсинизированных и фиксированных глутаровым альдегидом кроличьих эритроцитов в реакции гемагглютинации (РГА) [23]. ГАА определяли как наибольшее разведение, при котором еще наблюдалась РГА, и выражали как титр⁻¹ РГА, равный одной гемагглютинирующей единице (ГАЕ). При изучении ГАА использовали супернатанты культуральной жидкости (СКЖ), полученные ее центрифугированием (8000 об/мин) после роста штаммов на среде № 53, интактные клетки и препараты клеток ($1 \cdot 10^9$ кл/мл), трижды отмытые и ресуспендированные в фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl. Контролями в реакции служили среда № 53 и раствор SDS, используемый для экстракции ПБ.

Углеводную специфичность изучали в реакции торможения гемагглютинации [23] с помощью набора из 42 углеводов, которые, согласно классификации Макела [24], относятся к четырем группам специфичности: D-аллоза, D-альтроза, D-галактоза, D-глюкоза, D-ксилоза, L-ксилоза, D-ликсоза, меллибиоза, D-галактоза (Inst. of Chemistry, Чехия); N-ацетил-D-галактозамин, D-галактозамин солянокислый, D-манноза, L-манноза («Chemapol», Че-

хия); D-рибоза («Loba Chemie», Австрия); L-фукоза («Sigma»); D-раффиноза, D-целлобиоза («Fluka», Швейцария); D-арабиноза, L-рамноза, L-рибоза, D-фруктоза («Pharmacia», Швейцария); N-ацетил-D-глюкозамин, D-глюкозамин солянокислый («Calbiochem», США); L-арабиноза, глюкозо-6-фосфорная кислота, фосфоглюконовая кислота, фруктозо-1, 6-бисфосфат («Reanal», Венгрия); α -D-глюкозо-1-фосфат, α -D-глюкозо-6-фосфат, α -D-глюкозо-1, 6-бисфосфат, 2-дезоксид-D-глюкоза, лактоза, мальтоза, α -метил-D-глюкозид, β -метил-D-глюкозид, D-трегалоза («Serva»); N-ацетилнейраминная кислота («Serva»); муцин подчелюстной железы быка, D-галактуриновая кислота, D-глюкуроновая кислота, инозит, манит («Sigma»). Степень торможения ГАА исследуемым углеводом выражали как его минимальную концентрацию, необходимую для полного ингибирования РГА [23].

Результаты и обсуждение. Сравнительный анализ интактных клеток и препаратов клеток коринебактерий, полученных после экстракции ПБ, выявил, что они не отличаются между собой по форме, размерам, способности положительно окрашиваться по Граму и характером роста на питательных средах. Нами установлено, что обработанные SDS клетки, так же как и исходные, содержат коринемиколовые кислоты, а также диагностические компоненты пептидогликана (мезо-диаминопимелиновая кислота, глутаминовая кислота и аланин в соотношении 1:1:2) и арабиногалактана (арабиноза и галактоза). Это свидетельствует о том, что после экстракции ПБ клетки коринебактерий остаются жизнеспособными и сохраняют основной структурный компонент КС – комплекс пептидогликан–арабиногалактан–миколовые кислоты.

Определение состава препаратов ПБ позволило выявить в них присутствие биополимеров белковой и углеводной природы, соотношение между которыми у разных штаммов составляло 1:0,6–1:23,7 соответственно.

Электрофоретические спектры этих препаратов содержали более 20 индивидуальных биополимеров с м. м. 10–120 кДа (рисунок). Сравнение спектров показало наличие в них как специфических белков, присущих только определенному виду коринебактерий, так и общих для всех штаммов низкомолекулярных компонентов, расположенных в

Таблица 1
Гемагглютинирующая активность интактных и обработанных SDS клеток коринебактерий

Вид, штамм	Титр ⁻¹ реакции гемагглютинации	
	Интактные клетки	Клетки, обработанные SDS
<i>C. ammoniagenes</i> УКМ Ас-732	0	64
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-673	0	512
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-674	0	256
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-675	0	512
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-714	0	256
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-715	0	128
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-733	0	256
<i>C. flavescens</i> УКМ Ас-611	256–512	2048
<i>C. terpenotabidum</i> УКМ Ас-610	16	128
<i>C. variabile</i> УКМ Ас-716	128	1024–2048
<i>C. variabile</i> УКМ Ас-717	16	64
<i>C. vitaeruminis</i> УКМ Ас-718	0	1024
<i>Corynebacterium</i> <i>sp.</i> УКМ Ас-719	0	256–512

зоне геля, где локализованы биополимеры с м. м. 19,5–17,5 и 12,5–10,0 кДа. Полученные нами данные об электрофоретических спектрах препаратов ПБ коринебактерий близки описанным в работе [17] для поверхностных белков штамма *C. glutamicum* ATCC 1318, экстрагированных из целых клеток детергентом Triton X114. Авторы установили, что электрофоретические профили этих белков не отличаются от таковых, полученных из КС традиционным методом.

При определении ГАА в СЖК всех исследованных коринебактерий таковой не выявлено, что может свидетельствовать о неспособности изученных штаммов синтезировать внеклеточные гемагглю-

тинины. ГАА не обнаружена и во всех препаратах ПБ. В интактных клетках ГАА зарегистрирована только у штаммов *C. flavescens* УКМ Ас-611 (256–512 ГАЕ), *C. variabile* УКМ Ас-716 (128 ГАЕ), *C. terpenotabidum* УКМ Ас-610 (16 ГАЕ) и *C. variabile* УКМ Ас-717 (16 ГАЕ), а после обработки этих клеток SDS указанная активность возрастала в 4–16 раз (табл. 1).

Нами установлено, что независимо от наличия или отсутствия ГАА в интактных клетках эта активность всегда обнаруживается в препаратах клеток исследованных штаммов коринебактерий после экстрагирования ПБ, что позволяет предположить присутствие в их составе гемагглютининов, связанных с клеточными структурами. Максимальных значений (1024–2048 ГАЕ) указанная активность достигает в препаратах клеток *C. vitaeruminis* УКМ Ас-718, *C. variabile* УКМ Ас-716 и *C. flavescens* УКМ Ас-611. Наличие ГАА и ее более высокие значения во всех обработанных SDS клетках, сохранивших жизнеспособность и основной каркас КС (комплекс пептидогликан–арабиногалактан–миколовые кислоты), свидетельствуют о том, что содержащиеся в них гемагглютинины локализованы во внутренних, примыкающих к этому комплексу слоях КС. Видимо, в интактных клетках коринебактерий эти соединения экранированы наружными слоями КС (в частности S-слоями) и поэтому выявляются в клетках только после удаления с помощью SDS поверхностных биополимеров.

При определении углеводной специфичности обнаруженных у коринебактерий гемагглютининов установлено, что все штаммы, за исключением *Corynebacterium sp.* УКМ Ас-719, проявляют избирательную аффинность только к девяти из всех исследованных углеводов (табл. 2). Эти углеводы являются производными D-галактозы и D-глюкозы и относятся, соответственно, ко II и III группам специфичности согласно классификации Макела [24].

На основании полученных данных (наличие ГАА, подавляемой специфичными углеводами) можно сделать вывод о том, что выявленные у коринебактерий гемагглютинины являются лектинами. Наивысшее родство большинство из них проявляет к углеводам III группы специфичности (табл. 2). У лектинов изученных штаммов (за исключением *C. terpenotabidum* УКМ Ас-610 и *Cory-*

Таблица 2
Углеводная специфичность лектинов непатогенных коринебактерий

Вид, штамм	Углеводы, мМ (минимальная ингибирующая РГА концентрация)								
	II группа специфичности			III группа специфичности					
	N-ацетил-D-галактозамин	D-галактозамин	D-галактурононовая кислота	Фруктозо-1,6-бисфосфат	Глюкозо-6-фосфорная кислота	D-глюкуроновая кислота	N-ацетил-D-глюкозамин	N-ацетилнейраминная кислота	Муцин
<i>C. ammoniagenes</i> УКМ Ас-732	–	–	–	–	–	–	–	15,0	4,0
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-674	–	–	7,5	7,5	–	–	–	7,5	1,0
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-675	–	–	1,87	7,5	–	7,5	–	7,5	0,5
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-714	–	–	7,5	15,0	–	–	–	7,5	0,5
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-715	–	3,75	7,5	7,5	37,5	7,5	–	3,75	1,0
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-733	–	–	15,0	7,5	–	–	–	15,0	1,0
<i>C. flavescens</i> УКМ Ас-611	15,0	–	7,5	15,0	–	–	–	3,75	2,0
<i>C. terpenotabidum</i> УКМ Ас-610	–	–	–	3,75	–	–	–	–	–
<i>C. variabile</i> УКМ Ас-716	–	–	–	15,0	–	7,5	–	7,5	1,0
<i>C. variabile</i> УКМ Ас-717	–	–	–	30,0	–	7,5	–	15,0	2,0
<i>C. vitaeruminis</i> УКМ Ас-718	–	–	7,5	15,0	–	–	37,5	3,75	1,0
<i>Corynebacterium</i> <i>sp.</i> УКМ Ас-719	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Пр и м е ч а н и е. Концентрация муцина приведена в мкг/мл.

necrobacterium sp. УКМ Ас-719) наиболее высокая специфичность обнаружена к муцину подчелюстной железы быка, содержащему 27 % N-ацетилнейраминной кислоты, 4 % N-гликолилнейраминной кислоты и 18 % N-ацетил-D-галактозамина [2]. Минимальные концентрации этого гликопротеина, ингибирующие РГА, составляют 0,5–4,0 мМ. В меньшей степени лектины коринебактерий способны к связыванию N-ацетилнейраминной кислоты и фруктозо-1,6-бисфосфата, минимальные ингибирующие РГА концентрации которых для большинства штаммов находятся в пределах 7,5–15,0 мМ.

Преобладающая аффинность лектинов коринебактерий к муцину подчелюстной железы быка и N-ацетилнейраминной кислоте позволяет отнести

эти лектины к сиалоспецифичным, что обнаружено у непатогенных коринебактерий впервые. Лектины с аналогичной специфичностью выявлены только у токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, у которых они проявляют сродство к муцину, выделенному из слизистой желудка человека, N-ацетилнейраминной кислоте и N-ацетил-D-глюкозамину [2, 10, 11]. Известно, что ассоциированные с КС лектины патогенных видов *C. parvum* и *C. pyogenes* характеризуются иной углеводной специфичностью [2, 10, 12, 13]. Так, у *C. parvum* они принадлежат к группе D-маннозоспецифичных лектинов, а у *C. pyogenes* содержат олигосахаридные цепочки, имеющие терминальную α - и β -связанную D-галактозу и N-ацетил-D-глюкозамин [13].

Нами установлено также, что лектины *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 и *C. terpenotabidum* УКМ Ас-610 являются моноспецифичными и проявляют сродство к сиаловым кислотам и фруктозо-1,6-бисфосфату соответственно. Важно отметить, что среди лектинов разного происхождения моноспецифичные лектины встречаются крайне редко [2].

У лектинов штаммов *C. glutamicum*, *C. flavescens* УКМ Ас-611 и *C. vitaeruminus* УКМ Ас-718 выявлена способность к распознаванию представителей не только III, но и II группы углеводов, однако их сродство к этим углеводам оказалось значительно меньшим, чем к муцину подчелюстной железы быка. Сродство большинства лектинов к упомянутому муцину, включающему два типа сиаловых кислот, а также к другим представителям III и II групп углеводов свидетельствует о том, что для связывания гликоконъюгатов с этими лектинами необходимы олигосахаридные детерминанты сложной структуры, или предполагает наличие в клеточной стенке коринебактерий, по крайней мере, двух лектинов.

Важно отметить, что только у *Corynebacterium sp.* УКМ Ас-719 в препарате клеток не обнаружено аффинности ни к одному из использованных в работе углеводов. Это, очевидно, связано с тем, что в данном наборе отсутствуют специфичные для лектина этого штамма углеводы или же рецептор для него имеет неуглеводную природу.

В результате проведенных исследований у непатогенных штаммов коринебактерий впервые установлено наличие лектинов, связанных с внутренними слоями клеточной стенки, и их уникальная специфичность к сиаловым кислотам. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего получения и изучения свойств лектинов этих актинобактерий для возможного их использования в медико-биологической практике.

Выводы. 1. Препараты поверхностных биополимеров непатогенных коринебактерий, полученные экстракцией SDS из целых клеток, содержат белковые и углеводные компоненты с молекулярной массой от 10 до 120 кДа, не обладающие гемагглютинирующей активностью.

2. Клетки коринебактерий после удаления растворимых в SDS поверхностных биополимеров сохраняют жизнеспособность, комплекс пептидогли-

кан-арабиногалактан-миколовые кислоты и обладают гемагглютинирующей активностью, составляющей 64–2048 единиц.

3. Исследованные штаммы коринебактерий характеризуются наличием ассоциированных с внутренними слоями клеточной стенки сиалоспецифичных лектинов, проявляющих наибольшее сродство к муцину подчелюстной железы быка и N-ацетилнейраминовой кислоте.

V. S. Podgorskyi, I. M. Furtat¹, T. M. Nogina, E. A. Kovalenko, E. V. Sashchuk, E. I. Getman

The properties of lectins and cells surface biopolymers of non-pathogenic corynebacteria

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine
154, Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

National University «Kyiv-Mohyla Academy»
2, Grygoriya Skovorody Str., Kyiv, Ukraine, 04070

Summary

Aim. To study lectin properties of non-pathogenic corynebacteria cells and preparations of their surface biopolymers (SBP), extracted by SDS. **Methods.** SBP were extracted from intact cells by 0.15 M solution of NaCl contains 1 % SDS. Protein content was determined using Lowry method, carbohydrates – with anthrone method. Electrophoresis was performed in SDS-PAGE according to Lemmli. Hemagglutinating activity (HAA) was studied using rabbit erythrocytes. The lectin carbohydrate specificity was determined by reaction of inhibition of hemagglutination. **Results.** Electrophoretic set of SBP preparations contained the proteins and carbohydrates biopolymers with molecular mass of 10.0–120.0 kDa which did not possess HAA. After extraction of SBP the corynebacteria cells remained viable and have HAA higher than intact cells (64–2048 units). The hemagglutinins of the majority of corynebacteria strains after treatment of cells with SDS exhibited the highest affinity to the bovine submandibular gland mucin and N-acetylneuraminic acid. **Conclusions.** The examined non-pathogenic strains of corynebacteria were found to contain the lectins, associated with internal layers of a cell wall, which showed a predominant specificity to sialic acids.

Keywords: *Corynebacterium*, surface biopolymers, lectins, hemagglutinating activity, carbohydrate specificity.

V. S. Підгорський, І. М. Фуртат, Т. М. Ногіна, Е. О. Коваленко, О. В. Сащук, Є. І. Гетьман

Властивості лектинів та поверхневих біополімерів клітин непатогенних коринебактерій

Резюме

Мета. Вивчити лектинові властивості клітин непатогенних коринебактерій та препаратів їхніх поверхневих біополімерів (ІБ), екстрагованих додецилсульфатом натрію (SDS). **Методи.** ІБ з інтактних клітин екстрагували 0,15 М розчином NaCl,

що містить 1 % SDS. Концентрацію білків визначали методом Лоурі, вуглеводів – антроновим методом. Електрофорез проводили в системі ПААГ–SDS за Леммлі. Гемаглютинуючу активність (ГАА) встановлювали із застосуванням еритроцитів кроля, вуглеводну специфічність лектинів – у реакції гальмування гемаглютинації. **Результати.** Електрофоретичні спектри препаратів ПБ містили білкові і вуглеводні біополімери з молекулярною масою 10–120 кДа, які не виявляли ГАА. Після екстракції ПБ клітини коринебактерій зберігали життєздатність і мали вищу, ніж інтактні клітини, ГАА, яка становила 64–2048 одиниць. Гемаглютиніни оброблених SDS клітин більшої штампів коринебактерій проявляли найвищу спорідненість до муцину підщелепної залози бика і N-ацетилнейрамінової кислоти. **Висновки.** У досліджених штамів непатогенних коринебактерій виявлено асоційовані з внутрішніми шарами клітинної стінки лектини з переважною специфічністю до сіалових кислот.

Ключові слова: *Corynebacterium*, поверхневі біополімери, лектини, гемаглютинуюча активність, вуглеводна специфічність.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Puech V., Chami M., Lemassu A., Laneelle M.-A., Schiffler B., Gounon P., Bayan N., Benz R., Daffe M. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane // *Microbiology*.–2001.–**147**, Pt 5.–P. 1365–1382.
- Colombo A. V., Hirata R. Jr., de Souza C. M., Monteiro-Leal L. H., Previato J. O., Formiga L. C., Andrade A. F., Mattos-Guaraldi A. L. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes // *FEMS Microbiol. Lett.*–2001.–**197**, N 2.–P. 235–239.
- Bayan N., Houssin C., Chami M., Leblon G. Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications // *J. Biotechnol.*–2003.–**104**, N 1–3.–P. 55–67.
- Schiffler B., Barth E., Daffe M., Benz R. *Corynebacterium diphtheriae*: identification and characterization of a channel-forming protein in the cell wall // *J. Bacteriol.*–2007.–**189**, 21.–P. 7709–7719.
- Yelyseyeva I. V., Babych Ye. M., Zhdamarova L. A., Belozersky V. I., Kolpak S. A., Gorbach T. V., Bobireva I. V. Biological characteristics of diphtheriae pathogen antigens obtained by physicochemical methods // *Ann. Mechnikov Inst.*–2008.–N 3.–P. 25–31.
- Zuber B., Chami M., Houssin C., Dubochet J., Griffiths G., Daffe M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state // *J. Bacteriol.*–2008.–**190**, N 16.–P. 5672–5680.
- Costa-Riu N., Burkovski A., Kramer R., Benz R. PorA represents the major cell wall channel of the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* // *J. Bacteriol.*–2003.–**185**, N 16.–P. 4779–4786.
- Chami M., Bayan N., Peyret J. L., Gulik-Krzywicki T., Leblon G., Shechter E. The S-layer protein of *Corynebacterium glutamicum* is anchored to the cell wall by its C-terminal hydrophobic domain // *Mol. Microbiol.*–1997.–**23**, N 3.–P. 483–492.
- Brand S., Niehaus K., Puhler A., Kalinowski J. Identification and functional analysis of six mycolyltransferase genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: the genes *cop1*, *cmt1*, and *cmt2* can replace each other in the synthesis of trehalose dicorynomycolate, a component of the mycolic acid layer of the cell envelope // *Arch. Microbiol.*–2003.–**180**, N 1.–P. 33–44.
- Mattos-Guaraldi A. L., Duarte Formiga L. C., Pereira G. A. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae* // *Microbes Infect.*–2000.–**2**, N 12.–P. 1507–1512.
- Ott L., Holler M., Gerlach R. G., Hensel M., Rheinlaender J., Schaffer T. E., Burkovski A. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells // *BMC Microbiol.*–2010.–**10**, N 2.–P. 1–9.
- Karas S. R., Kasimova D. L., Kostyukova N. N. Some features of adhesins of *Corynebacterium diphtheriae* // *Zhur. Mikrobiol.*–1991.–N 5.–C. 17–18.
- Podgorskyi V. S., Kovalenko E. A., Simonenko I. A. The lectins of bacteria.–Kyiv: Naukova dumka, 1992.–203 p.
- Karpova I. S., Kovalenko E. A., Koretskaya N. V., Getman E. I. Extracellular lectins of saprophytic bacteria *Bacillus subtilis* and its mutants // *Biopolym. Cell.*–2004.–**20**, N 4.–P. 290–295.
- Messner P., Allmaier G., Schaffer C., Wugeditsch T., Lortal S., Konig H., Niemetz R., Dorner M. Biochemistry of S-layers // *FEMS Microbiol. Rev.*–1997.–**20**, N 1–2.–P. 25–46.
- Braithwaite C. E., Smith E. E., Songer J. G., Reine A. H. Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis* // *Vet. Microbiol.*–1993.–**38**, N 1–2.–P. 59–70.
- Aizava T., Iwabuchi N., Kikuchi A., Urai M., Anzai H., Sunairi M., Nakajima M. A rapid and simple method using the detergent Triton X114 for preparation of outer membrane proteins from bacteria containing mycolic acids // *Actinomycecol.*–2001.–**15**, N 1.–P. 6–10.
- Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH: Catalogue of strains / Fourth Ed.–Braunschweig: Gesellschaft für Biotechnologische Forschung GmbH, 1989.–459 p.
- Mykhalsky L. O., Furtat I. M., Demyanenko F. P., Kostyuchyk A. A. Electrophoretic patterns of cell wall protein as a criterion for the identification and classification of *Corynebacteria* // *Ukr. Biokhim. Zhur.*–2001.–**73**, N 3.–P. 61–70.
- Methods of soil microbiology and biochemistry* / Ed. D. G. Zvyagintsev.–Moscow: Mosc. State Univ. publ., 1991.–304 p.
- Zaharova I. J., Kosenko L. V. Methods of studying microbial polysaccharides.–Kyiv: Naukova dumka, 1982.–192 p.
- Harlow E., Lane D. Antibodies: a laboratory manual.–New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1988.–726 p.
- Lutsik M. D., Panasjuk E. N., Antonyuk V. A. Methods of search lectins (phytohemagglutinins) and their definition immunochemical specificity (Methodical recommendations for biochemists and immunologists).–Lviv, 1980.–20 p.
- Makela O. Studies in hemagglutinins of leguminose // *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*–1957.–**35**, Suppl.–P. 11–53.

UDC 579.871.1:234.8.097 + 577.1

Received 06.09.10