

---

spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology, 2004, 38, 428–432.

13. O. Obemeata, F. Nnenna and N. Christopher Microbiological assessment of stored *Tilapia guineensis*. African J. of Food Sci. Vol. 5(4), pp. 242 – 247, 2011.

Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

## ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФУКОЗОСПЕЦИФИЧЕСКОГО ЛЕКТИНА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ НОВООБРАЗОВАНИЙ

ГЮРДЖЯН К.Г.<sup>1</sup>, ДАВТЯН М.П.<sup>1</sup>, ГРИГОРЯН Р.М.<sup>2</sup>, САРКИСЯН Н.К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА, Севака 5/1

<sup>2</sup>Институт Молекулярной биологии НАН РА  
gristinegurjyan1993@mail.ru

Лектины, углеводсвязывающие белки, рассматриваются в качестве перспективных маркеров для выявления опухолей. Проведена очистка фукозоспецифического лектина из луковиц тюльпана. Процедура очистки включала фракционирование сульфатом аммония, ионообменную хроматографию. При электрофорезе, проведенном в неденатурирующих условиях, получен гомогенный препарат белка. Проведена иммобилизация фукозоспецифического лектина на предварительно силанизированные поверхности предметных стекол. Показано его специфическое связывание с клеточной линией хронической миелоидной лейкемии человека KCL22.

*Фукозоспецифический лектин – агглютинация – силанизация – опухоль*

Լեկտինները՝ ածխաջրեր կապող սպիտակուցները, դիտվում են որպես հեռանկարային մարկերներ նորագոյացությունների ախտորոշման ժամանակ: Իրականացվել է ֆուկոզսպեցիֆիկ լեկտինի անջատում վարդակակաչի սոխուկներից: Լեկտինի մաքրման ընթացքը ներառում է ամոնիումի սուլֆատով նստեցումը և իոնափոխանակային բրոմատոգրաֆիան: Ստացվել է էլեկտրոֆորետիկ հոմոգեն սպիտակուց: Էլեկտրոֆորեզն իրականացվել է ոչ դենատուրացված պայմաններում: Վերոնշյալ սպիտակուցը իմոբիլիզացվել է սիլանիզացված առարկայակիր ապակու մակերեսին: Ցույց է տրված տվյալ լեկտինի ինսամակցությունը մարդու արյան բրոնխի միելոիդ լեյկեմիայի KCL22 բջջային գծի հետ:

*Ֆուկոզսպեցիֆիկ լեկտին – ագլուտինացում- սիլանիզացում-ուռուցք*

Lectins - carbohydrate binding proteins, are considered as the prospective markers for tumor detection. In this respect, the purification of fucose specific lectin from tulip bulbs was conducted. Purification involved fractionation by ammonium sulphate, followed by ion –exchange chromatography. As a result electrophoretically homogeneous protein in non-denaturing conditions was obtained. The protein immobilization on silanized glass slides was conducted and its binding with human chronic myeloid leukemia cell line KCL22 was demonstrated.

*Fucose specific lectin- agglutination- silanization- tumor*

Процесс канцерогенеза сопровождается серьезными изменениями в метаболизме клетки, направленными на обеспечение ряда функций. В частности, активируется пролиферация клетки с одной стороны, с другой - предотвращается иммунный ответ. Одной из основных характеристик опухолевых клеток, отличающих их от нормальных, - это aberrантное гликозилирование. Причем гликозилирование затрагивает как внутриклеточные белки, так и белки на плазматической мембране. Первое четкое экспериментальное доказательство того, что злокачественная трансформация

---

приводит к изменениям в процессах гликозилирования на поверхности клетки, было представлено в работах [2, 4, 5, 6, 8, 9].

Гликозилирование определяет такие малигнанные свойства клеток как инвазивность и метастазирование, и, как полагают, с одной стороны увеличивает время жизни белков, блокируя их протеолиз, с другой - маскирует рецепторы на плазматической мембране, предотвращая процессы апоптоза. Результаты дальнейших исследований подтвердили, что неопластическая трансформация и злокачественная прогрессия часто сопровождаются также структурными изменениями в углеводной части гликоконъюгатов. Чаще всего наблюдается экспрессия эмбриональных углеводных антигенов, изменение групповых детерминант крови, неполный процессинг аспарагин-связанных олигосахаридов, увеличение сиалинизирования и содержания полилактозамина, а также разветвление триманнозильной основы комплексного типа N-связанных структур. Поэтому, неудивительно, что раковые маркеры очень часто оказываются фетальными белками. Таким образом анализ гликозилирования может с одной стороны позволить детектировать опухолевые клетки, с другой - служить мишенью для терапии.

Фукозилирование является одной из наиболее распространенных модификаций гликопротеинов и гликолипидов при онкотрансформации. Фукозилирование включает присоединение остатка фукозы к N-гликанам, O-гликанам и гликолипидам. L-фукоза является важным компонентом секреторных гликоконъюгатов и определяет фенотип многих клеточных популяций человека, так как L-фукоза входит в состав многих антигенных детерминант, в том числе антигенов групп крови и раковоэмбриональных антигенов, экспрессируемых при различных онкологических заболеваниях.

Хорошим инструментом для изучения процессов гликозилирования являются лектины - углеводов связывающие белки, широко распространенные во всех организмах. К настоящему времени получено и изучено более двух сотен растительных, животных и бактериальных лектинов. Они характеризуются специфичностью к различным сахарам, и следовательно, разнообразие лектинов может быть эффективно использовано для детекции процессов гликозилирования. Поскольку aberrантное гликозилирование при ряде опухолей характеризуется фукозилированием белков плазматической мембраны, в данной статье была сделана попытка получения фукозо-специфического лектина и изучения его способности связывать опухолевую клеточную линию KCL-22. Из литературы [1] известно, что лектин с такой специфичностью присутствует в луковицах тюльпана, поэтому работа была направлена на очистку и изучение этого лектина.

### **Материалы и методы**

*Спектральные измерения* проводили на спектрофотометре Hitachi 150-40, концентрацию белка определяли по оптической плотности при длине волны 224 нм и 236 нм согласно [3]. Электрофорез в неденатурирующих условиях проводили по методу [7]. Для хроматографии использовали ионообменники Toyopearl 650 M (Japan) и CM-52 фирмы Реанал.

*Определение агглютинирующей активности лектина.* Для анализа активностей применяли трипсинизированные эритроциты человека. В агглютинационных исследованиях использовали 4% суспензию трипсинизированных эритроцитов. К 50 мкл суспензии эритроцитов добавляли равный объем раствора лектина, инкубировали от 10 мин до 2 часов при 4°C, комнатной температуре и при 37°C

*Силанизация стекла.* Силанизацию проводили в 5% растворе силана (3-aminopropyltriethoxysilane) в ацетоне в течение 18 часов при комнатной температуре.

*Иммобилизация белка.* Силанизированные предметные стекла активировали 2 %

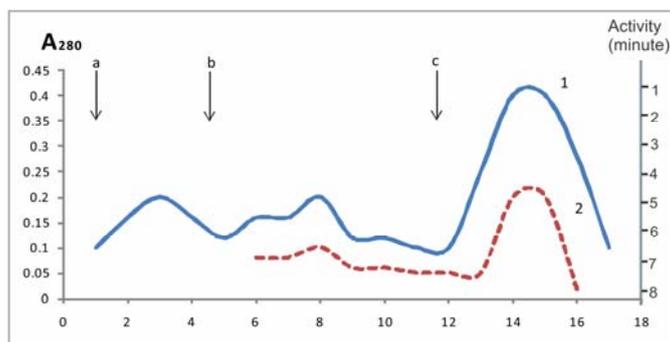
глутаровым альдегидом в 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.4 в течение 18 часов при комнатной температуре, промывали дистиллированной водой, затем фосфатно-солевым буфером, добавляли раствор фукозоспецифичного лектина в фосфатно-солевом буфере (0,7 мг/мл), инкубировали 18 часов при 4<sup>0</sup>С. Несвязавшиеся активные участки блокировали бычьим сывороточным альбумином в конечной концентрации 0,3 %.

*Клеточная культура.* В работе использовали суспензионную клеточную линию KCL-22 (хроническая миелоидная лейкемия человека). Клетки выращивали при 37<sup>0</sup>С с 5% CO<sub>2</sub> в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% раствора бычьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Для определения специфического связывания клеток с лектином опухолевые клетки инкубировали с лектин иммобилизованными стеклами в течение 1 ч, стекла промывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали раствором этанол: уксусная кислота (3:1), окрашивали красителем Гимза (5%) и анализировали связывание клеток микроскопически (HumaScore 16100/1). В контрольных экспериментах для исключения возможности неспецифического связывания проводили анализ связывания клеток с силанизированными стеклами, иммобилизованными бычьим сывороточным альбумином.

### Результаты и обсуждение.

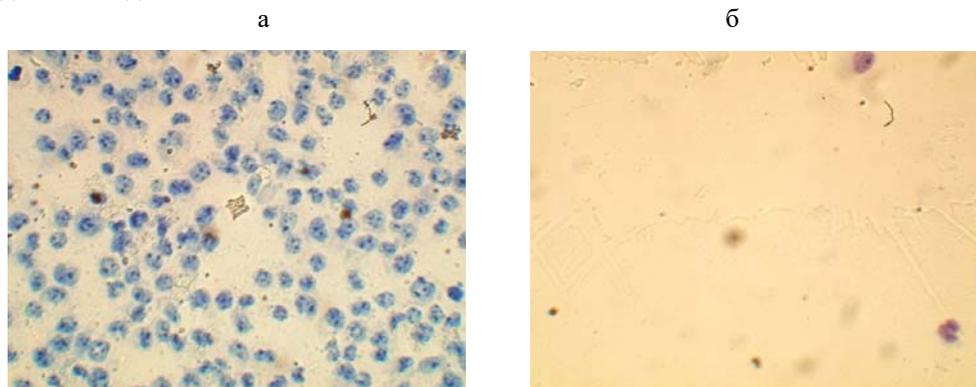
*Очистка лектина из луковиц тюльпана.* 50 гр мелко нарезанных луковиц тюльпана гомогенизировали в 250 мл фосфатно-солевого буфера (0.02 М фосфат натрия, 0.15 М хлорид натрия pH 7.4), экстрагировали 1 час. Экстракт центрифугировали 20 мин при 5000 x g надсадок фракционировали сульфатом аммония, собирая фракции между 40 и 60% насыщения. Осадок диализовали против буфера (0.02 М Трис HCl pH 8.7), осветляли центрифугированием и наносили на колонку с анионообменником Тоуорpearl-650 М, (2.5x3 см), заранее уравновешенную тем же буфером. Собирали несвязавшуюся с носителем фракцию, диализовали против 0.01 М натрий-ацетатного буфера pH 4.7 и наносили на колонку с КМ-целлюлозой (2.5x1.5 см), уравновешенную тем же буфером. Колонку промывали буфером до тех пор пока оптическое поглощение элюата не составляло менее 0.02. Далее собирали фракции ступенчатой элюцией 0.01 М ацетатным буфером, содержащим хлорид натрия в концентрации 0.05 М, 0.1 М, и 0.2 М. Хроматографическое поведение белка на колонке представлено на рис 1.



**Рис. 1.** Ионообменная хроматография фукозоспецифического лектина на КМ-целлюлозе. 1-хроматограмма, 2-активность. Фракции собирали по 2 мл. а- концентрация NaCl - 0.05 М, б - 0.1 М, с - 0.2 М.

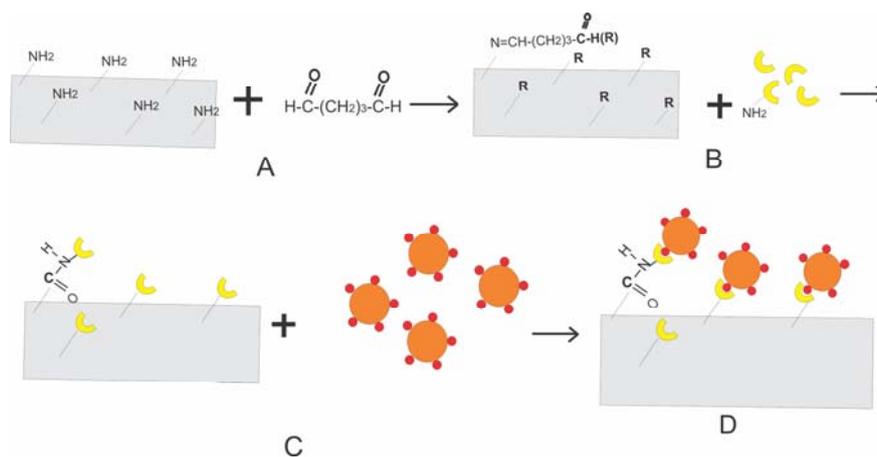
В результате проведенных процедур получен электрофоретически гомогенный препарат лектина из луковиц тюльпана, проявляющий агглютинационную активность по отношению к трипсинизированным эритроцитам человека I(O) группы крови (рис 2).

Результаты исследования связывания опухолевых клеток с фукозоспецифическим лектином представлены на рис. 2. Было выявлено специфическое связывание опухолевых клеток хронической миелоидной лейкемии человека только с лектин иммобилизованными стеклами (рис 2а). Связывание клеток с силанизированными стеклами, используемыми в качестве контроля для исключения возможности неспецифического связывания, не наблюдалось (рис 2б). Таким образом, можно заключить что фукозоспецифический лектин проявляет сродство к опухолевым клеткам данного вида.



**Рис. 2.** а - связывание клеток с силанизированными стеклами, б - контроль, окрашивание по Романовскому-Гимзе, увеличение 400 х.

Схематическое изображение процесса прикрепления клеток к поверхности силанизированных стекол представлено на рисунке 4.



**Рис.3.** А - активация силанизированных стекол глютаровым альдегидом, В - иммобилизация фукозоспецифического лектина на поверхности предметных стекол, С, D - прикрепление опухолевых клеток.

---

Таким образом, результаты проведенных экспериментов демонстрируют, что фукозоспецифический лектин может быть успешно применен для детекции и идентификации некоторых опухолевых клеток, и, в перспективе, для выделения собственно опухолевых клеток из биопсийного материала с целью последующего использования при получении противораковых препаратов.

#### Литература

1. *Cammie B. P. A., Peeters B., Peumans W. J.*. A new lectin from tulip (*Tulipa*) bulbs.// *Planta*, 1986, 169, 583
2. *Dennis JW, Granovsky M, Warren CE*. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. // *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1473 (1), 21–34
3. *Groves W, Davis F, Sells BH*. Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference. // *Anal.Biochem*, 1968, 22, (2) 195-210
4. *Guo JM, Zhang XY, Chen HL, et al*. Structural alterations of sugar chains in urine fibronectin from bladder cancer patients and its enzymatic mechanism.// *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127 (8), 512–9
5. *Hakomori S*. Introductory remarks on aberrant glycosylation in tumors. In: *Altered Glycosylation in Tumor Cells*, Cold Spring Harbor: AR Liss, Inc 1988 : 2017- 12
6. *Nabi IR, Dennis JW*. The extent of poly lactosamine glycosylation of MDCK LAMP-2 is determined by its Golgi residence time. // *Glycobiology*, 1998, 8 (9), 947–53
7. *Takano R, Muchmore E, Dennis JW*. Sialylation and malignant potential in tumour cell glycosylation mutants. // *Glycobiology*, 1994, 4 (5), 665–74
8. *Unverzagt C, Andre S, Seifert J, et al*. Structure-activity profiles of complex biantennary glycans with core fucosylation and with/without additional alpha 2,3/alpha2,6 sialylation: synthesis of neoglycoproteins and their properties in lectin assays, cell binding, and organ uptake. // *J Med Chem*, 2002, 45 (2), 478–91

Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

## АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА И ИХ ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ *PARASALMO MIKISS*

А. А. ЗАХАРЯН

*Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии  
ani.zakharyan@ysu.am*

Была исследована активность ферментов биосинтеза пролина из орнитина (орнитинтрансаминазы и пирролин-5-карбоксилатредуктазы) и внутриклеточная локализация этих ферментов в различных органах радужной форели. Исследования показали, что самая высокая активность этих ферментов обнаружено в икринках и в печени, а самая низкая - в почках. Активность ферментов биосинтеза пролина из орнитина проявляется как в надосадочной, так и в осадочной фракции гомогената, но более высокая активность проявляется в осадочной фракции, то есть эти ферменты имеют митохондриальную локализацию.

*Орнитинтрансаминаза - пирролин-5-карбоксилатредуктаза - внутриклеточная локализация ферментов*

Ուսումնասիրվել է օրնիտինից պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների (օրնիտինտրանսամինազի և պիրոլին-5-կարբօքսիլատրեդուկտազի) ակտիվությունը և այդ ֆերմենտների ներքային տեղակայումը իշխան ձկան տարբեր օրգաններում: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ այդ ֆերմենտների ամենաբարձր ակտիվություն հայտնաբերվել է ձկնկիթներում և լյարդում, իսկ ամենա-