

УДК: 577. 57.021

ЗДАТНІСТЬ ЛЕКТИНІВ МОДУЛЮВАТИ ДІЮ АНТИБІОТИКІВ НА РІСТ МУТАНТІВ *Bacillus subtilis*

І. С. КАРПОВА, Н. В. КОРЕЦЬКА, Т. О. КОЧУБЕЙ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: lukash@imbg.org.ua

На бактеріальній моделі *Bacillus subtilis* з використанням антибіотиків в якості метаболічних інгібіторів, блокуюючих процеси реплікації (митоміцин), транскрипції (рифампіцин) або трансляції (стрептоміцин), була встановлена здатність угледосвязуючих білків – лектинів рослинного походження – по-різному впливати на внутріклеточні процеси. Ефект залежить від структури лектина, а також стану системи репарації/реплікації бактерії. Найбільш виражене діє на присутні лектинам з хітинсвязуючим доменом (STA, WGA) в відношенні інгібітора матричного синтезу ДНК (митоміцин C) при наявності неповрежденної системи репарації. Відсутність ефекту у мутантів *recP* і *rolC* може свідчити про посередницьку роль відповідних бактеріальних білків в реалізації сигнального впливу лектинів. Один із рибосомаактивуючих лектинів – SNA-I – виявляє здатність посилювати дію стрептоміцину. Припускається, що в основі внутріклеточного впливу лектинів на метаболічні процеси лежать комплексні механізми, що вимагають участі репаративних функцій.

Ключові слова: лектини, антибіотики, мутанти *Bacillus subtilis*, біосинтез ДНК, репарація.

Докладно належать поширені у природі білки, що здатні специфічно розпізнавати та нековалентно зв'язувати вуглеводи або їхні залишки в різних макромолекулах [1,2]. Біологічні реакції за участю лектинів поділяються на два типи. Перший – це безпосередній контакт із вуглеводними групами, що зумовлює міжклітинні взаємодії. Інший тип реакцій – сигнальний вплив, опосередкований рецепторами мембрани, який індукуює складний ланцюг внутрішньоклітинних перетворень. Серед них найвідомішим є шлях, що призводить до мітогенної бласттрансформації лімфоцитів [3].

Останнім часом, згідно з даними рентгеноструктурного аналізу, формується класифікація лектинів на основі структурних особливостей молекули, яка має замінити попередні “формальні” класифікації [4]. Рослинні лектини пропонують розділити на чотири структурні класи: лектини бобових; лектини з хітинсвязуючим доменом (за попередньою класифікацією лектини злаків); подібні до лектину рицини білки типу 2, які інактивують рибосоми, скорочено RIP-2 (від *ribosome inactivating proteins*), та манозоспецифічні лектини однодольних [2]. Лектини тваринного походження належать до п'яти – шести великих сімейств [3,5]. Комп'ютерні технології дозволили порівняти просторові моделі найбільш детально досліджених лектинів. Цей підхід висвітлює принципово важливий факт то-

пологічної подібності лектинів мікробного, рослинного та тваринного походження, незважаючи на порівняно невисокий (20–30%) відсоток гомології амінокислотних послідовностей [6]. Деякі автори пропонують серед тваринних лектинів виділити групу L-лектинів (схожих на лектини бобових), R-лектинів, подібних до лектину рицини білків типу RIP-2 тощо [7]. Схожість топологічної організації свідчить про універсальний принцип, закладений в основу функціональної активності лектинів. Припускають, що ці білки мають фундаментальну властивість сприймати інформацію, закодовану у вуглеводних залишках (глікокоді), та передавати її до чутливих мішеней, які й досі досліджені недостатньо.

Останнім часом антибіотики, завдяки їхній здатності специфічно блокувати певні реакції, використовуються у фундаментальних дослідженнях як метаболічні інгібітори для розкриття молекулярних механізмів біологічних процесів. Це окреслило мету роботи: на модельному об'єкті – сапрофітній бактерії *Bacillus subtilis*, у якій було виявлено власні лектини [8], – дослідити чутливі до їхньої дії мішені, використовуючи антибіотики, що блокують такі ключові процеси, як реплікація ДНК, транскрипція та біосинтез білка.

Матеріали і методи

У роботі використовувався, розроблений для *B. subtilis* аналог тесту Еймса (*rec-test*), що ба-

зується на порівнянні чутливості мутантів із пошкодженою системою репарації/рекомбінації/реплікації до бактеріостатичного впливу досліджуваних речовин [9]. Тест-об'єктами були мутанти *B. subtilis* міжнародного банку [10], які ми одержали з лабораторії професора А. А. Прозорова (Інститут загальної генетики РАН, Москва). Штам SB25 має дві біохімічні мутації – в гені *hisH* (гістидинфосфат-амінотрансферази) і *trpC2* (індолгліцерол-фосфатсинтетази) та непошкоджену систему репарації/рекомбінації (*rec*⁺). Ізогений до нього штам *recP* має додатково мутацію *rec149*, яка впливає на процес рекомбінації та репарації (*rec*). Третій з досліджених штамів – BD293, крім ауксотрофних маркерів (*thr-5 trpC2*), має дефектний фермент ДНК-полімерази III (*polC*).

Вивчали дію комерційних рослинних лектинів (“ЛЕКТИНОТЕСТ”, Львів, Україна), що належали до трьох поширених класів. Досліджували два лектина бобових – канавалії мечовидної (*ConA*) та квасолі звичайної – РНА-Р (сумарний препарат). В експериментах використовували також лектини картоплі (*STA*) та зародків пшениці (*WGA*), які містять хітинзв'язувальний домен, та лектини (типу *RIP-2*), що інактивують рибосоми, виділені з кори бузини чорної (*SNA-I*) і омели білої (*VAA*).

В інгібіторному аналізі застосовували антибіотики з різним механізмом дії: мітоміцин С – як інгібітор матричного синтезу ДНК; рифампіцин, здатний гальмувати процес транскрипції (обидва препарати фірми «Sigma», США) та стрептоміцин, що блокує біосинтез білка («Київ-медпрепарат», Україна). Для вияву чутливих до дії лектинів мішеней за допомогою антибіотиків застосовували два підходи: дифузний метод [9] з урахуванням останніх вимог щодо стандартизації цієї процедури [11], а також метод визначення мінімальної інгібувальної концентрації (МІС) [12].

За дифузного методу паспортизовані культури *B. subtilis* вирощували протягом ночі на поверхні 3%-го скошеного триптозного агару («Difco», США) при 37 °С. Клітини змивали буфером Спіцайзена [13], використовуючи солі вітчизняного виробництва (в г/л): K_2HPO_4 – 14; KH_2PO_4 – 6; $(NH_4)_2SO_4$ – 2; цитрат Na – 1. Для одержання гомогенної суспензії культуру фільтрували через ватно-марльовий фільтр. Кількість клітин стандартизували за показниками нефелометра КФК-2 (λ 440 нм), розводячи культуру до $1 \cdot 10^8$. У день дослідження готували розчини лектинів у концентрації 200 мкг/мл у стерильному 0,15 М NaCl. Після додавання до 100 мкл розчину лектину рівного об'єму стандартизованої бактерійної культури в епендорфі суміш змішували 30 с на струшувачі типу Vortex. У кон-

троль замість лектину додавали відповідний об'єм 0,15 М NaCl. Реакційну суміш інкубували 30 хв при 37 °С і висівали по 100 мкл на чашки Петрі з повноцінним середовищем такого складу: 200 мл розплавленого 3%-го агару (“ПРИМОРРИБПРОМ”, Росія), 100 мл амінопептиду (С.-Петербург, Росія) та 100 мл концентрованого буфера Спіцайзена ($\times 4$). Свіжі водні розчини антибіотиків в ефективній концентрації, яку підбирали емпірично, наносили крапельно самплером по 10 мкл на поверхню агару зі щойно засіяною бактеріальною культурою. Після 24-годинної інкубації при 37 °С визначали діаметри зон інгібування росту за допомогою мікрометра. Мірою впливу лектинів на бактеріостатичний ефект антибіотиків слугувала різниця між діаметром зон пригнічення росту культури не обробленої (контроль) та обробленої лектином (в мкм та відсотках).

У разі іншого підходу визначали мінімальну інгібувальну концентрацію антибіотика в культурі, обробленій лектином, та у відповідному контролі. Початкові етапи стандартизації культури були такими, як і за використання дифузного методу. З концентрованого розчину антибіотика готували серію послідовних дворазових розведень у 96-лунковому плоскодонному імунологічному планшеті, дотримуючись вимог стерильності. При цьому в кожному лунку спочатку додавали 50 мкл дистильованої води, після чого проводили послідовне титрування 50 мкл вихідного розчину антибіотика, щоб одержати до 14 концентрацій на варіант. Оброблену (дослід) та необроблену лектином (контроль) культуру, згідно з дифузним методом, розводили до густини 1×10^4 клітин/мл рідким середовищем для росту такого складу: амінопептид – 1 частина, буфер Спіцайзена – 2 частини. В кожному лунку планшета з антибіотиком, а також в декілька контрольних лунок з водою (без антибіотика) додавали 200 мкл підготовленої суспензії. Планшети обережно струшували й інкубували при 37 °С 18 год. Особливості цитостатичної дії антибіотика в різних варіантах дослідження визначали за показниками адсорбції на рідері системи ANTHOS 2001 (Anthos lubtec instruments). Мінімальну інгібувальну концентрацію визначали з урахуванням рекомендацій, наведених у статті [12], як найменшу, що викликає вірогідне пригнічення росту клітин. Результати обробляли статистично за допомогою пакета програм “Quattro Pro for Windows”.

Результати та обговорення

Вивченню впливу лектинів на бактерії передувала перевірка дифузним методом чутливості досліджуваних штамів до бактеріостатичної дії антибіотиків. Чутливість штамів до рифампіци-

ну (1–25 мкг/мл) не мала вірогідних відмінностей. Мітоміцин С (5–10 мкг/мл) був в 1,5–2,0 рази ефективнішим стосовно штамів із дефектною системою репарації та реплікації, що узгоджується з даними літератури [9]. Стрептоміцин (1–50 мкг/мл) у разі використання дифузного методу не виявив бактеріостатичної дії на культуру *rec*⁺-штаму. Тому його сумісний вплив із лектинами досліджували при вирощуванні бактерій на рідкому середовищі, використовуючи метод мінімальної інгібувальної концентрації, де можна збільшити дозове навантаження антибіотика на клітину у разі зменшення інокулюму [14].

Насамперед ми провели дослідження впливу лектинів на пошкоджувальний ефект мітоміцину [15]. Мітоміцин є протипухлинним антибіотиком, що взаємодіє з ДНК *in vivo* та *in vitro*. Він належить до матричних інгібіторів, який внаслідок утворення ковалентних зшивок між комплементарними ланцюгами ДНК блокує процес реплікації. На синтез РНК і білка він не діє.

Як впливає з рис. 1, лектини могли неоднаково впливати на бактеріостатичний ефект мітоміцину. Із двох препаратів лектинів бобових манозоспецифічний лектин канавалії мечовидної (ConA) не виявив вірогідного впливу на дію цього антибіотика. Препарат РНА-Р, який, як відомо, є сумішшю двох гомотетрамерних (Е4, L4) та трьох гетеротетрамерних ізоформ (Е3L, Е2L2, ЕL3), специфічних до олігосахаридів, посилював дію мітоміцину на 30% у *rec*⁺-штаму. Максимальний ефект щодо мітоміцину (160%) мав один із хітинзв'язувальних лектинів – STA – у *rec*⁺-штаму. В разі мутанта *recP* він був вірогідно меншим (130%) за повної відсутності такого впливу на штам *polC*. Інший відомий хітинзв'язу-

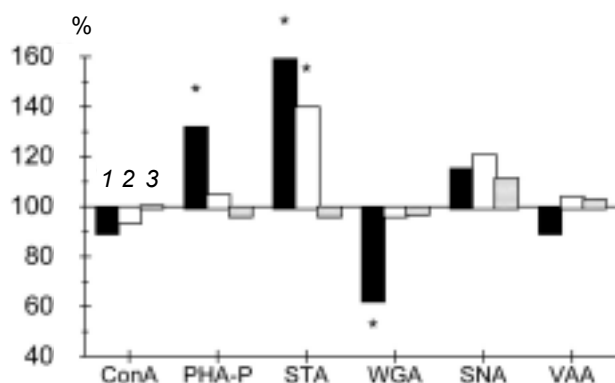


Рис. 1. Вплив лектинів на бактеріостатичну дію мітоміцину (10 мкг/мл) залежно від генотипу мутанта: х – лектини; у – зона пригнічення росту (% від контролю); 1 – штам *rec*⁺; 2 – штам *recP*; 3 – штам *polC*; * відхилення від контролю вірогідні, *p* < 0,05.

вальний лектин зародків пшениці (WGA) виявив протилежно спрямований гальмувальний ефект щодо мітоміцину, але лише у *rec*⁺-штаму. За вуглеводною специфічністю до олігомерів N-ацетил-D-глюкозаміну хітинзв'язувальні лектини належать до однієї групи, але WGA взаємодіє також із залишками сілової кислоти [16]. Особливістю STA є значний вміст у молекулі вуглеводного компонента, що досягає 52,3% [2]. При дослідженні дії лектинів, подібні до білків, що інактивують рибосоми, було помічено, що сіалоспецифічний лектин кори бузини чорної (SNA-I) має тенденцію до незначного посилення ефекту антибіотика на 10–20%, незалежно від генотипу штаму. В разі додавання специфічного до галактози лектину омели білої (VAA) вірогідного впливу на бактеріостатичний ефект мітоміцину за дослідженої концентрації не спостерігається.

Отже, застосування мітоміцину, як матричного інгібітора синтезу ДНК, дозволяє розділити досліджувані лектини на такі, що вірогідно посилюють дію антибіотика (STA, РНА-Р), мають тенденцію до інтенсифікації (SNA-I), блокують дію антибіотика (WGA) і не впливають на синтез ДНК (ConA, VAA). Важливим наслідком експериментів було виявлення залежності сумісної дії лектин–антибіотик від стану репаративно-реплікативної функції клітини. Вірогідні ефекти спостерігаються у *rec*⁺-штаму. Порушення в системі репарації/рекомбінації (мутант *recP*) та дефект ферменту ДНК-полімерази III (мутант *polC*) призводить до відсутності ефекту лектинів на дію мітоміцину, за винятком STA, вплив якого був меншим порівняно з *rec*⁺-контролем. Також нечутливим до модифікувальної дії досліджених лектинів на бактеріостатичний ефект мітоміцину виявився мутант *polC* із дефектною ДНК-полімеразою III. Це дозволяє дійти висновку про важливу роль ферменту в реалізації регуляторного впливу лектинів. Отже, процес реплікації ДНК може бути мішенню, чутливою до дії певних лектинів, але їхній ефект опосередковується внутрішньоклітинними білками.

Зважаючи на широкий спектр біологічної активності лектинів, можна припустити, що вони впливають на активність бактеріальних генів на рівні транскрипції [17]. Для перевірки цього припущення в наших подальших дослідженнях було застосовано напівсинтетичний антибіотик – рифампіцин. Механізм його дії полягає у здатності утворювати комплекс з ферментом – ДНК-залежною РНК-полімеразою, який у мікроорганізмів заважає ініціації синтезу РНК.

Серед досліджених препаратів лектини бобових та лектини, що інгібують рибосоми, не

мали вірогідного впливу на ефект антибіотика (рис. 2). Тенденцію до різнонаправленого впливу виявляють обидва хітинзв'язувальні лектини, з яких STA дещо підвищує (на 10–13%), а WGA вірогідно гальмує дію рифампіцину у випадку *rec*⁺-штаму. Ефект WGA може бути спричиненим його здатністю впливати на матричні процеси. Це узгоджується з відомим фактом, що після ініціації транскрипції потрійний комплекс ДНК–РНК–фермент стає нечутливим до рифампіцину [18]. Однак дію WGA на цьому рівні також опосередковано продуктами генів *recP* і *polC*. Про це свідчить нечутливість відповідних мутантів до модифікувального впливу зазначеного лектину. Оскільки рифампіцин заважає ініціації транскрипції, специфічно зв'язуючись з β-субодиницею РНК-полімерази, відсутність сумісного ефекту більшості досліджених лектинів і рифампіцину показує, що вони не мають спільної мішені.

Щоб з'ясувати, чи можуть лектини втручатися у процес біосинтезу білка, було використано стрептоміцин, який пригнічує синтез білка в мікробній клітині через стійке зв'язування з білком S12, що є складовою частиною 30S-субодиниці рибосоми [19]. При застосуванні дифузного методу виявилось, що чітка зона інгібування росту утворюється тільки в разі попереднього оброблення культури сіалоспецифічним лектином кори бузини чорної (SNA-I), що належить до лектинів, які інгібують рибосоми. Для дослідження сумісної дії цього лектину та стрептоміцину ми використали метод мінімальної інгібувальної концентрації антибіотика в рідкому середовищі, який спричинює вірогідний цитостатичний ефект.

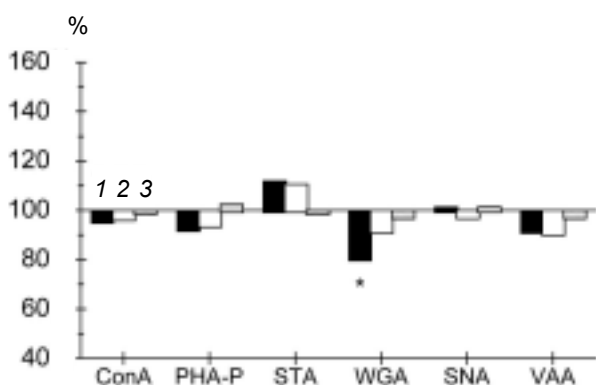


Рис. 2. Вплив лектинів на бактеріостатичну дію рифампіцину (25 мкг/мл) залежно від генотипу мутанта: х — лектини; у — зона пригнічення росту (% від контролю); 1 — штаму *rec*⁺; 2 — штаму *recP*; 3 — штаму *polC*; * відхилення від контролю вірогідні, $p < 0,05$.

Із кривих, наведених на рис. 3, випливає, що сумісна дія SNA-I та стрептоміцину має міжштамові відмінності. У штаму з непошкодженою системою репарації/реплікації (*rec*⁺) без оброблення лектином на кривій доза–ефект спостерігається плато в діапазоні концентрацій антибіотика від 0 до 0,125 мкг/мл. Подальше подвоєння концентрації зумовлює повне інгібування видимого росту (MIC = 0,250 мкг/мл). У культурі, обробленій лектином, плато охоплює менший діапазон концентрацій (0–0,063 мкг/мл), а доза антибіотика 0,125 мкг/мл вірогідно пригнічує ріст, що свідчить про посилення ефекту лектином. Штаму *recP*, як і більшість мутантів із пошкодженою системою репарації, характеризується зниженням показників росту в рідкому середовищі і збільшенням чутливості до стрептоміцину порівняно зі штамом *rec*⁺. Оброблення лектином впливає на чутливість бактерій до антибіотика, при цьому помітне пригнічення росту культури відбувається за концентрації 0,032 мкг/мл, та за MIC 0,125 мкг/мл. Мутант *polC* відрізняється від контролю (штаму *rec*⁺) відсутністю повного інгібування росту в дослідженому діапазоні концентрацій стрептоміцину. Як показала додаткова перевірка паралельних посівів матеріалу вихідної та нічної культур на агаризованому середовищі із стрептоміцином, цей факт пояснюється збільшенням частки клітин, резистентних до антибіотика. Останнє узгоджується з даними літератури про високу мутабельність штамів, дефектних за ДНК-полімеразою III. Іншою особливістю штаму *polC* була його чутливість до цитостатичного впливу лектину (SNA-I). Про це свідчить пригнічення росту обробленої лектином культури на 25–30% за нульової концентрації стрептоміцину і зниження рівня плато на 25–30% в діапазоні концентрацій від 0 до 0,125 мкг/мл, чого не спостерігається у двох інших штамів.

Відомо, що SNA-I характеризується специфічністю до сілової кислоти, а його молекула містить дві структурно та функціонально різні субодиниці А та В, ковалентно з'єднані дисульфідним містком. Білок А здатний проникати крізь мембрану і виявляти N-глікозидазну активність (rRNA N-glycohydrolase, EC 3.2.2.22) щодо рРНК. Це призводить до інактивації білкового синтезу в еу- та прокаріотичних клітинах (RIP-активність). У поліпептиду В каталітичної активності не виявлено, але він містить характерний для лектинів вуглеводзв'язувальний домен [2]. Останнім часом встановлено, що RIP-білки можуть видаляти аденін також із ДНК та інших аденозинвмісних макромолекул [20].

Одержані нами результати щодо посилення дії стрептоміцину в разі попереднього оброблен-

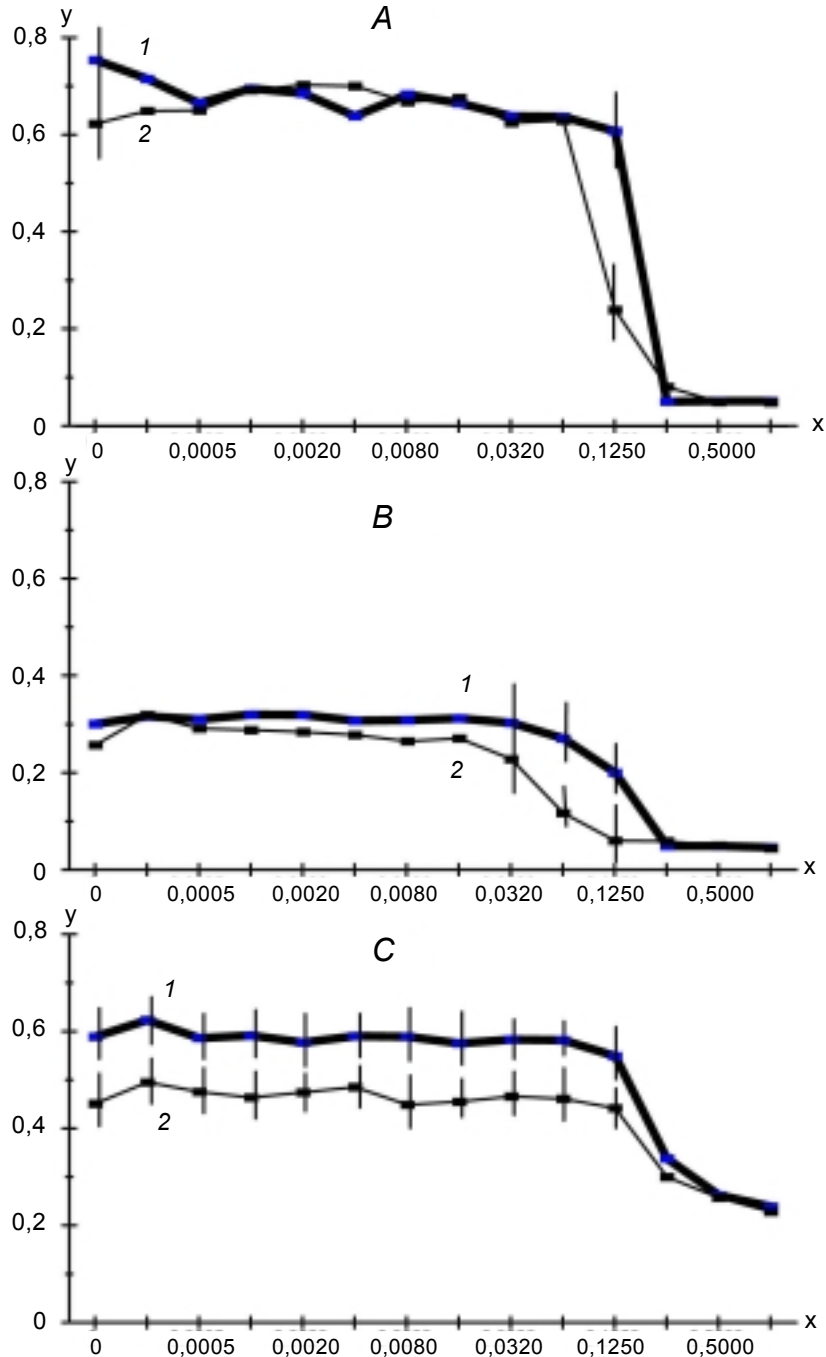


Рис. 3. Вплив SNA на бактеріостатичну дію стрептоміцину залежно від генотипу мутанта (метод мінімальної токсичної дози): x – концентрація стрептоміцину (мкг/мл) в серії двократних розведень; y – оптична густина; А – штам *rec⁺*; В – штам *recP*; С – штам *rolC*; 1 – контроль (без оброблення лектином); 2 – SNA; відхилення від контролю вірогідні, $p < 0,05$.

ня бактеріальних клітин препаратом SNA-I свідчать про їхню спільну мішень, пов'язану із процесом біосинтезу білка. Водночас потребують пояснення виявлені нами міжштамові відмінності. Якщо SNA-I притаманна слабка депурінізувальна активність щодо ДНК, то мутанти, дефектні за системою репарації/реплікації, будуть чутливі-

шими до його генотоксичної дії. За таких умов цитостатичний ефект матиме дві складові: блокування біосинтезу білка та нерепаровані розриви ДНК.

Таким чином, застосування антибіотиків дозволило виявити здатність лектинів неоднаково впливати на внутрішньоклітинні процеси, залежно

від структури лектину та генотипу мутанта за станом системи репарації/реплікації. Найвираженішу, але різноспрямовану дію стосовно мітоміцину С – інгібітора матричного синтезу ДНК – мали лектини з хітинзв'язувальним доменом (STA, WGA). Очевидно, зазначені лектини діють за сигнальним типом через посередництво бактеріальних білків системи репарації та реплікації. Про це свідчить вірогідне зниження ефекту у мутантів.

Білок, який інактивує рибосоми – SNA-I, – посилює дію інгібітора білкового синтезу стрептоміцину. Проте для SNA-I не виключена можливість, діяти за іншим механізмом, що призводить до ферментативної депуринізації ДНК.

Можна припустити, що механізми, за якими лектини впливають на внутрішньоклітинні процеси, є комплексними і залежать від репаративних функцій.

ABILITY OF LECTINS TO MODEL THE ACTION OF ANTIBIOTICS ON GROWTH OF MUTANTS OF *Bacillus subtilis*

I. S. Karpova, N. V. Koretska, T. O. Kochubey

Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: lukash@imbg.org.ua

S u m m a r y

Using the bacterium *B. subtilis* as a model and antibiotics as metabolic inhibitors which can suppress replication (mitomycin), transcription (rifampycin) or translation (streptomycin), it is shown that carbohydrate-binding proteins (lectins of plant origin) have different action on intracellular processes under study. The effect depends on lectin's structure and on the condition of bacterial reparation/recombination system. Lectins with chitin-binding domain (STA, WGA) is characterized by the most expressed effect on the repair-proficient strain when the inhibitor of template function of DNA (mitomycin C) was used. The absence of such effect on mutants *recP* and *polC* may prove that the corresponding bacterial proteins play the role of mediators in transmission of the signal influence of lectins. The representative of ribosome-inactivating lectins – SNA-I – could increase the streptomycin effect.

It is proposed that intracellular effects of lectins have complex mechanisms which need participation of repair functions.

К е у w o r d s: lectins, antibiotics, mutants of *Bacillus subtilis*, template function of DNA, reparation.

1. Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Луцик А. Д. Лектины. Львов: Вища школа. 1981. 150 с.
2. Van Damme J. M., Peumans W. J., Pustai A., Bardocz. S. Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. Chichester etc.: John Wiley and Sons. 1998. 451 p.
3. Тимошенко А. В. // Вест. Белор. госуд. ун-та. Сер. 2. Хим., биол., географ. 1997. № 2. С. 38–47.
4. Лахтин В. М. // Мол. биол. 1994. 28, № 2. С. 245–272.
5. Gabius H.-J. // Eur. J. Biochem. 1997. 243, N 1. P. 543–576.
6. Lis H., Sharon N. // Chem. Revs. 1998. 98, N 2. P. 637–674.
7. Drickamer K. // Nature Struct. Biol. 1995. 2, N 1. P. 437–439.
8. Подгорский В. С., Коваленко Э. А., Симоненко И. А. Лектины бактерий. К.: Наук. думка. 1992. 202 с.
9. Kada T., Sadaie Y., Sakamoto Y. Handbook of mutagenicity test procedures / Eds. B. J. Kilbey et al. Amsterdam–New York–Oxford: Elsevier. 1984. P. 13–31.
10. *Bacillus* genetic stock center. Strains and data / Ed. X. H. Dean. Fourth edition. Columbus–Ohio–USA. 1989. 160 p.
11. Felmingham D., Brown D. F. J. // J. of Antimicrob. Chemotherapy. 2001. 48. Suppl. S1. P. 81–85.
12. Andrews J. M. // Ibid. P. 5–16.
13. Прозоров А. А. Трансформация у бактерий. М.: Наука. 1988. 256 с.
14. Tarantino P. M., Zhi Ch., Gambino J. J. // J. Med. Chem. 1999. 42. P. 2035–2040.
15. Goldberg I. H., Fridman P. A. // Ann. Rev. of Biochim. 1971. 40. P. 811–823.
16. Wright C. S. // J. Biol. Chem. 1992. 267, N 20. P. 14345–14352.
17. Nutman J., Berger M., Chase P. A. et al. // J. of Immunol. 1987. 138, N 10. P. 3481–3487.
18. Sousa R., Chung J. J., Rose J. P., Wang B.-C. // Nature. 1993. 364, N 6438. P. 593–595.
19. Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке. 3. М.: Мир. 1980. 488 с.
20. Barbieri L., Ciani M., Girbes T. et al. // FEBS Letters. 2004. 563, N 1–3. P. 219–222.

Отримано 28.01.2005