

А.Ю. МИРЮТА, Т.П. ПЕРЕРВА

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
03143, Киев, ул. Акад. Заболотного, 150
E-mail: kunakh@imbg.org.ua

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА *UNGERNIA VICTORIS* В СИСТЕМЕ CaCl_2 -ТРАНСФОРМАЦИИ *ESCHERICHIA COLI* В ПРИСУТСТВИИ МОДУЛЯТОРОВ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ



Фуросемид и верапамил влияют на выход плазмидных трансформантов у E. coli в соответствии со своими свойствами регуляторов кальциевых каналов у эукариотов, т.е. фуросемид стимулирует, а верапамил ингибирует входение трансформирующей ДНК в компетентную клетку. Комплекс РНВ/ Ca^{2+} polyP не только служит каналом для проникновения трансформирующей ДНК, но и выступает как одна из мишеней для блокирующего трансформацию экстракта U. victoris.

© А.Ю. МИРЮТА, Т.П. ПЕРЕРВА, 2008

Введение. Характеристика биологической активности соединений растительного происхождения, которые все шире используются в медицине и других областях народного хозяйства, требует расширения круга адекватных тест-систем, способных максимально продемонстрировать возможности разных препаратов. В предыдущих работах мы показали эффективность использования различных тест-систем бактериального происхождения, каждая из которых, не будучи универсальной, оказалась способной продемонстрировать ту или иную специфику растительного соединения [1–3]. Одна из этих систем, а именно система CaCl_2 -трансформации *E. coli*, показала себя особенно удобной для тестирования протекторной и регенерирующей активности растительных экстрактов [3]. Детали отклика этой системы на обработку препаратами растительного происхождения были изучены с использованием экстракта *Ungernia victoris* [4]. Это позволило разработать подходы к пониманию последовательности событий, развивающихся как следствие разных вариантов взаимодействия поврежденной клетки (в нашем случае компетентной) с соединениями естественного и синтетического происхождения.

Приобретение клеткой *E. coli* состояния компетентности в результате обработки ее хлористым кальцием и температурным шоком достигается при участии двух механизмов. Один из них состоит в образовании пор между гелем и жидкокристаллическими доменами в липидном слое клеточной оболочки, что обеспечивает последующее проникновение в клетку плазмидной ДНК [5, 6]. Второй механизм связан с наличием в плазматической мембране *E. coli* поли- β -гидроксипутират/кальций полифосфатных комплексов (РНВ/ Ca^{2+} polyP), число которых существенно увеличивается при внесении культуры в холодный CaCl_2 -буфер [7]. Считается, что эти комплексы не только играют роль прокариотических кальциевых каналов, аналогичных описанному у эукариотов, но и могут служить каналами для вхождения в клетку чужеродной двухцепочечной ДНК [8]. Таким образом, у прокариотов одна и та же структура причастна как к регуляции кальциевого обмена, так и к проникновению чужеродной ДНК, что оправдывает применение блокаторов (верапамил) и активаторов (фуросемид) кальциевых каналов, описанных

для высших организмов [9, 10], с целью выяснения их возможного влияния на выход плазмидных трансформантов у *E. coli*. При наличии аналогии с влиянием этих веществ на кальциевые каналы у эукариотов ожидается угнетение выхода трансформантов верапамилом и стимуляция их выхода фуросемидом. На этом фоне может быть четко отслежено влияние растительных экстрактов относительно их стимулирующего или ингибирующего действия на проводимость комплексов РНВ/ Ca^{2+} polyP по отношению к плазмидной ДНК.

В настоящей работе изучали воздействие верапамила и фуросемида (антагониста и агониста кальциевых каналов у эукариотов) на систему CaCl_2 -трансформации у *E. coli* с целью выяснить, насколько влияние этих веществ на прокариотическую клетку отвечает их влиянию на кальциевые каналы у эукариотов. Изучали также влияние экстракта *U. victoris* на биологические эффекты, индуцированные упомянутыми соединениями, с тем, чтобы оценить, в какой мере действие экстракта *U. victoris* направлено на РНВ/ Ca^{2+} polyP-комплексы плазматической мембраны *E. coli*.

Новизна предложенного подхода состоит в использовании специфики прокариотических кальциевых каналов, позволяющей судить об их реакции на биологически активные вещества довольно простым способом — по выходу трансформантов в присутствии этих веществ. Такой прием оправдан также, если исходить из задач фармакологической промышленности, связанных с необходимостью тестирования широкого круга препаратов, чье действие влияет на кальциевый обмен клетки или же от него зависит. Возможность экстраполировать на эукариоты данные, полученные с использованием прокариотических объектов, может значительно облегчить изучение этих препаратов, по крайней мере на стадии их первичного скрининга.

Материалы и методы. Бактерии. В работе использованы штамм *Escherichia coli* HB101 и плазида pBR322, полученные из Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (Пушино, РФ).

Условия выращивания бактериальной культуры. Бактерии выращивали на агаризованной LB-среде при температуре 37 °С. Ночные куль-

туры использовали для инокуляции в жидкую LB-среду с последующим культивированием на качалке до достижения культурой середины логарифмической стадии роста при оптической плотности $\text{ОП}_{550} = 0,3$.

Получение компетентных клеток хлор-кальциевым методом и выделение плазмидной ДНК производили соответственно стандартным методикам [11].

Растительный экстракт. Исследовали активность 40%-ного этанольного экстракта, полученного из биомассы культивируемых клеток унгернии Виктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko из семейства *Amaryllidaceae*, штамм UV-2, коллекционный № 10, ККК ИМБиГ НАН Украины, Киев). Экстракт упаривали при помощи вакуумно-ротационного испарителя при температуре 40 °С почти до сухого остатка и растворяли в стерильной дистиллированной воде до исходного объема. Активность экстракта определяли по изменению конечного выхода трансформантов в варианте с экстрактом по сравнению с контролем.

В работе использовали такие модуляторы кальциевых каналов — верапамил гидрохлорид (0,25%-ный раствор) и фуросемид (1%-ный раствор) (производство фармацевтической фирмы «Дарница», Киев). Экстракт *U. victoris*, верапамил и фуросемид вносили в трансформационную смесь в концентрации 5 % от объема одновременно с плазмидной ДНК. Такая концентрация была подобрана ранее как оптимальная для экстракта *U. victoris* [4], поскольку она оказалась биологически активной и в то же время не влияла на выживание компетентных клеток *E. coli*. Эта же концентрация была использована для верапамила и фуросемида с целью стандартизации постановки опытов со всеми тремя субстанциями. В предварительных опытах (не показаны) установлено, что 5%-ные растворы аптечных препаратов верапамила и фуросемида не подавляют жизнеспособность компетентных клеток *E. coli*.

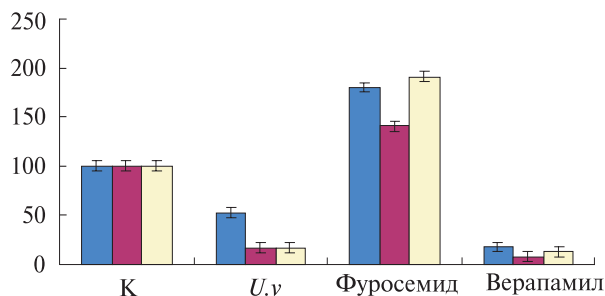
Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента [12].

Результаты исследований и их обсуждение. На рисунке представлен выход трансформантов в присутствии экстракта *U. victoris*, фуросе-

семида и верапамила по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение в систему трансформации фуросемида повышает выход трансформантов в среднем до $170,67 \pm 15,2 \%$, тогда как верапамил и экстракт *U. victoris* снижают его до $13 \pm 2,9 \%$ и $28,7 \pm 6,9 \%$ соответственно. Если отталкиваться от данных, полученных для высших организмов относительно влияния фуросемида и верапамила на кальциевые каналы, то влияние этих соединений на выход CaCl_2 -трансформантов у *E. coli* имеет аналогичный характер: наблюдается эффект увеличения проводимости ДНК в клетку в присутствии фуросемида и противоположный эффект в присутствии верапамила.

Что касается влияния экстракта *U. victoris* на систему CaCl_2 -трансформации *E. coli*, то его биологическое действие, проанализированное нами в предыдущих работах [3, 4], еще раз подтверждается результатами, приведенными на рисунке.

Полученные данные дают основание сделать выводы о наличии влияния модуляторов кальциевых каналов эукариотов на проводимость РНВ/ Ca^{2+} роlyР-комплексов *E. coli* для ДНК, но не дают информации относительно возможного влияния экстракта *U. victoris* на эти комплексы. Для выяснения, направлено ли действие экстракта *U. victoris* на РНВ/ Ca^{2+} роlyР-комплекс цитоплазматической мембраны *E. coli*, мы сравнивали влияние экстракта на выход трансформантов путем использования компетентной культуры без каких-либо дополнительных веществ и этой же компетент-



Влияние экстракта *Ungernia victoris*, фуросемида и верапамила на эффективность трансформации *E. coli* плазмидной ДНК: по вертикали — количество трансформантов, %. Столбцы разных цветов обозначают результаты разных экспериментов

ной культуры в присутствии регуляторов кальциевых каналов. Имелось в виду, что в случае, если действие экстракта *U. victoris* не направлено на РНВ/ Ca^{2+} роlyР-комплексы, протекторный эффект экстракта не будет зависеть от присутствия фуросемида или верапамила.

Если же эффект обработки экстрактом связан с этими комплексами, то их активация или ингибирование могут влиять на общий результат обработки трансформационной смеси растительным экстрактом вследствие существенных структурно-функциональных изменений состояния компонентов клеточной оболочки.

Результаты этих экспериментов представлены в таблице, где для наглядности введено понятие компетентных клеток, защищенных от трансформации экстрактом *U. victoris*. Количество таких защищенных клеток высчитывали как разницу между выходом трансформантов

Влияние экстракта *Ungernia victoris* на эффективность трансформации *E. coli* плазмидной ДНК в присутствии модуляторов кальциевых каналов эукариотов

Вариант трансформации		Выход трансформантов, % (среднее из трех экспериментов)		Защищенных клеток, %
Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	
Без использования дополнительных веществ	В присутствии экстракта <i>U. victoris</i>	100 ± 10	$45,68 \pm 1,53$	$54,32 \pm 1,53$
В присутствии фуросемида	В присутствии фуросемида и <i>U. victoris</i>	100 ± 10	$27,22 \pm 2,05$	$72,78 \pm 2,05^{**}$
В присутствии верапамила	В присутствии верапамила и <i>U. victoris</i>	100 ± 10	$60,57 \pm 3,08$	$39,43 \pm 3,08^*$

Примечание. Уровни достоверного отличия между опытным и контрольным вариантами: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

без обработки экстрактом трансформационной смеси и выходом трансформантов в присутствии экстракта *U. victoris*.

Этот подход был применен для каждого из трех вариантов — без регуляторов кальциевых каналов, в присутствии фуросемида и в присутствии верапамила. За 100%-ный принимали выход трансформантов при отсутствии экстракта *U. victoris* в каждом отдельном варианте, а не общий контроль, как это было в первой серии опытов. В таблице приведены данные трех экспериментов, из которых видно, что количество компетентных клеток, защищенных экстрактом от проникновения трансформирующей ДНК, наивысшее для варианта с фуросемидом ($72,78 \pm 2,05 \%$), самое низкое для варианта с верапамилем ($39,43 \pm 3,08 \%$) и имеет промежуточное значение для варианта без регуляторов кальциевых каналов ($54,32 \pm 1,53 \%$).

Тот факт, что в наших опытах присутствие фуросемида повышало выход трансформантов, дает основание считать, что это было обусловлено повышением проводимости РНВ/ Ca^{2+} ро1уР-комплекса для трансформирующей ДНК. Этот комплекс сформирован как канал, состоящий из двух концентрических цилиндров, где молекула РНВ образует наружный футляр, повернутый гидрофобной поверхностью к окружающему липидному бислою, а ро1уР размещен в центре и связан с внутренней гидрофильной поверхностью РНВ ионами Ca^{2+} [13]. Считается, что ДНК входит в клетку через этот комплекс по механизму, согласно которому молекула ДНК замещает ро1уР в середине РНВ цилиндра [14].

Возможно, что фуросемид, повышающий выход трансформантов, способствует проводимости этого комплекса не только для ДНК, но и для других веществ, в нашем случае для компонентов экстракта *U. victoris*. Будучи явно мобильнее трансформирующей ДНК, эти соединения быстрее заполняют активированный фуросемидом канал и блокируют его для дальнейшего прохождения трансформирующей ДНК. В присутствии верапамила РНВ/ Ca^{2+} ро1уР-канал активно блокируется самим верапамилем, и блокада трансформации экстрактом *U. victoris* в этом случае происходит на значительно более низком уровне, чем в при-

сутствии фуросемида. Не исключено, что наблюдаемый эффект связан также с изменением текучести клеточных мембран и соответственно — активности мембранных белков [15].

Блокирование трансформации одним лишь экстрактом *U. victoris* (в отсутствие как верапамила, так и фуросемида) имеет промежуточный характер. Это обстоятельство логично объяснить тем, что канал РНВ/ Ca^{2+} ро1уР не находится в заблокированном или стимулированном состоянии, а представляет собой структуру, находящуюся в состоянии средней доступности для проникновения соединений, введенных в трансформационную смесь.

Таким образом, результаты наших экспериментов показывают, что фуросемид и верапамил влияют на выход плазмидных трансформантов у *E. coli* в соответствии со своими свойствами регуляторов кальциевых каналов у высших организмов, т.е. фуросемид стимулирует, а верапамил ингибирует вхождение трансформирующей ДНК в компетентную клетку. Это обстоятельство подтверждает теорию, согласно которой каналом для проникновения трансформирующей плазмидной ДНК может служить комплекс РНВ/ Ca^{2+} ро1уР. Этот же комплекс выступает как одна из мишеней для экстракта *U. victoris*, поскольку находясь в активированном фуросемидом состоянии он оказывается более доступным для блокирования трансформации экстрактом по сравнению с клетками, обработанными верапамилем или не обработанными ни одним из регуляторов кальциевого обмена.

Следует отметить, что анализируя результаты экспериментов мы не учитываем часть трансформантов, полученных за счет возможного проникновения ДНК в разрывы между гель- и жидкокристаллическими доменами липидного слоя внешней мембраны оболочки *E. coli*, поскольку допускаем, что во всех трех вариантах опытов эта часть должна быть приблизительно одинаковой. Расхождения между угнетением выхода трансформантов экстрактом *U. victoris* в первой (рисунок) и второй (таблица) серии опытов мы объясняем использованием компетентных клеток, полученных как отдельные культуры в ходе исследований, в связи с чем их физиологические особенности могут отличаться.

A.Yu. Myryuta, T.P. Pererva

BIOLOGICAL ACTIVITY OF *UNGERNIA VICTORIS* EXTRACT IN THE *ESCHERICHIA COLI* CaCl_2 -TRANSFORMATION SYSTEM IN THE PRESENCE OF CALCIUM CHANNEL MODULATORS

Furosemid and verapamil appear to have an effect on the yield of *E. coli* plasmid transformants according to their properties as calcium channel regulators in eukaryotes. It means that furosemid stimulates and verapamil inhibits transforming DNA penetration into competent cell. PHB/Ca^{2+} polyP complex does not function only as a channel for transforming DNA penetration but appears to be one of the targets for transformation blocking *U. victoris* extract.

Г.Ю. Мирюта, Т.П. Перерва

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТУ *UNGERNIA VICTORIS* У СИСТЕМІ CaCl_2 -ТРАНСФОРМАЦІЇ *ESCHERICHIA COLI* У ПРИСУТНОСТІ МОДУЛЯТОРІВ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ

Фуросемід та верапаміл впливають на вихід плазмідних трансформантів у *E. coli* відповідно своїм властивостям регуляторів кальцієвих каналів у еукаріотів, тобто фуросемід стимулює, а верапаміл інгібує вхід трансформуючої ДНК у компетентну клітину. Комплекс PHB/Ca^{2+} polyP не тільки виконує функцію каналу для проникнення трансформуючої ДНК, а й виступає як одна із мішеней для екстракту *U. victoris*, що блокує трансформацію.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дворник А.С., Перерва Т.П., Кунах В.А. Скринінг препаратів, отриманих із культури тканин лікарських рослин, на антимуутагенну активність у системі *Escherichia coli* – бактеріофаг λ // Цитология и генетика. – 2002. – **36**, № 2. – С. 3–10.
2. Дворник А.С., Перерва Т.П., Можилевська Л.П., Кунах В.А. Вивчення активності рослинних екстрактів у системі нестабільних мутантів *Escherichia coli* // Цитология и генетика. – 2004. – **38**, № 4. – С. 9–13.
3. Мирюта Г.Ю., Дворник А.С., Можилевська Л.П., Перерва Т.П. Вивчення біологічної активності рослинних екстрактів у системі трансформації *Escherichia coli* плазмідною ДНК // Біополімери і клітина. – 2003. – **19**, № 6. – С. 525–529.
4. Мирюта А.Ю., Перерва Т.П., Можилевская Л.П., Кунах В.А. Влияние экстракта культивируемых

клеток *Ungernia victoris* и катионов некоторых металлов на эффективность трансформации клеток *Escherichia coli* плазмидной ДНК // Цитология и генетика. – 2005. – **39**, № 6. – С. 34–40.

5. Van Die I.M., Bergmans H.E.N., Hoekstra W.P.M. Transformation of *Escherichia coli*: studies of the heat shock in induction of competence // J. General Microbiol. – 1983. – **129**. – P. 663–670.
6. Van Die I., Oosterhout A., Bergmans H., Hoekstra W. The influence of phase transition of membrane lipids on uptake of plasmid DNA in *Escherichia coli* transformation // FEMS Microbiol. Lett. – 1983. – **18**. – P. 127–130.
7. Huang R., Reusch R.N. Genetic competence in *Escherichia coli* requires poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate membrane complexes and certain divalent cations // J. Bacteriol. – 1995. – **177**, № 2. – P. 486–490.
8. Pavlov E., Grimbly C., Diao C.T.M., French R.J. A high-conductance mode of a poly-3-hydroxybutyrate/calcium/polyphosphate channel isolated from competent *Escherichia coli* cells // FEBS Lett. – 2005. – **579**. – P. 5187–5192.
9. Матвеев В.В., Нестеров В.П. Частотная зависимость блокирующего действия верапамила на кальциевые каналы. Новая модель механизма // Биол. мембраны. – 1992. – **9**, № 10/11. – С. 1138–1140.
10. Маринов Б.С., Филиппов А.К. Окислительно-восстановительные свойства веществ – модуляторов кальциевых каналов // Биол. мембраны. – 1992. – **9**, № 2. – С. 174–183.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
12. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. – М.: Изд-во АН СССР, 1963. – 323 с.
13. Reasch R.N., Huang R., Bramble L.L. Poly-3-hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated Ca^{2+} channels in the plasma membranes of *Escherichia coli* // Biophys. J. – 1995. – **69**. – P. 754–766.
14. Szabo I., Bathori G., Tombula F., Brini M., Coppola A., Zoratti M. DNA translocation across planar bilayers containing *Bacillus subtilis* ion channels // J. Biol. Chem. – 1997. – **272**. – P. 25275–25282.
15. Holland I.B., Jones H.E., Campbell A.K., Jacq A. An assessment of the role of intracellular free Ca^{2+} in *E. coli* // Biochimie. – 1999. – **81**, № 8/9. – P. 901–907.

Поступила 20.01.07