

УДК 579.234+615.322+578.81

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПОНЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ С БЕЛКОМ-ПОРИНОМ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Т.П. ПЕРЕРВА¹, А.Ю. МИРЮТА¹, Л.Н. МОЙСА², Л.П. МОЖИЛЕВСКАЯ¹,
 В.А. КУНАХ¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Украина 03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150

e-mail: kunakh@imbg.org.ua

² НПК "Диапроф-Мед"

Украина, 04123, г. Киев, ул. Светлицкого, 35

*Компоненты трех исследованных растительных экстрактов *Ungernia victoris*, *Rhodiola rosea* и *Polyscias filicifolia* взаимодействуют с OmpC белком-порином наружной мембраны клеточной оболочки *Escherichia coli* и не взаимодействуют с ее другими поверхностными структурами – ЛПС-комплексом, LamB и OmpA белком. Не исключена возможность взаимодействия компонентов растительных экстрактов и с другими белками-поринами, описанными как для прокариотических, так и для эукариотических систем.*

*Ключевые слова: белки-порины *E. coli*, бактериофаги, растительные экстракты.*

Введение. Предпринятое нами ранее изучение биологических свойств растительных экстрактов показало пригодность бактериальных тест-систем для демонстрации протекторных, антимуtagenных и противоопухолевых активностей исследуемых препаратов [1–3]. Кроме того, оказалось, что использование прокариотических моделей позволяет установить на уровне каких клеточных структур происходит взаимодействие растительного экстракта с тест-объектом. Так, благодаря использованию системы CaCl₂-трансформации *E. coli*, мы показали, что одной из мишеней экстракта *Ungernia victoris* может быть находящийся в плазматической мембране *E. coli* поли-β-гидроксibuтират/кальций полифосфатный комплекс (РНВ/Ca²⁺ polyP) [4]. Это обстоятельство вызывает вполне закономерный вопрос – с какими структурами на поверхности клетки связываются компоненты растительного экстракта, прежде чем проникнуть в более глубокие клеточные слои. Ответ можно получить, используя в качестве еще одной тест-системы адсорбцию бактериофагов на специфических для них рецепторах, расположенных на наружной мембране клеточной оболочки. Использование бактериофагов для изучения структурного и физиологического состояния клеточной стенки можно считать логическим продолжением метода фаготипирования, разработанного первоначально для эпидемиологического определения штаммов возбудителей инфекционных заболеваний [5] и дифференцирования гладких и шероховатых форм *S. typhimurium* [6, 7] и шигелл Флекснера [8]. Следует отметить при этом, что фаговый тест

позволяет выявить отклонения в структуре липополисахаридного комплекса (ЛПС), которые не улавливаются с помощью серологических или химических методов. Точно так же бактериофаги, рецепторы для которых служат белки наружной мембраны клеточной оболочки, с высокой степенью специфичности распознают не только “свой” белок на поверхности бактерии, но и определенные его участки [9]. Это объясняется тем, что белки хвостового отростка бактериофагов обладают высокой консервативностью, позволяющей рассматривать адсорбцию бактериофагов как очень устойчивую систему [10]. В то же время обработка бактерий различными веществами – поверхностно-активными, лизоцимом, антибиотиками, антителами приводит, как правило, к снижению или потере адсорбционной активности клеточной стенки [5]. Компоненты растительных экстрактов в случае их связывания с клеточной стенкой также могут препятствовать адсорбции бактериофагов и тем самым указывать на структуру, в контакт с которой растительный экстракт вступает прежде всего. В настоящей работе мы использовали этот подход, поскольку он позволяет определить, с белковыми или углеводными структурами взаимодействуют составляющие растительного экстракта при их первичном столкновении с клеточной поверхностью.

Материалы и методы

Бактерии. В работе использован штамм *E. coli* С600, полученный из Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (Пущино-на-Оке, Россия).

Бактериофаги. Бактериофаги Р1, Р2, Р22, Т7, λ получены из коллекции Института молекулярной биологии и генетики НАНУ (Киев, Украина), бактериофаги Ох2, Ох2h10, Ох2h12, Ту1b любезно предоставлены доктором У. Хеннингом (Институт

биологии Макса Планка, Тюбинген, Германия).

Питательные среды. Бактерии выращивали на питательной среде LB (Luria Bertani) [11]. В двуслойных посевах по Грациа [5] использовали LB-агаризованную среду (1,8% для нижнего слоя и 0,6–0,8% – для верхнего слоя).

Растительные экстракты. Использовали экстракты из биомассы культивированных клеток, полученные в виде 40%-х этанольных вытяжек методом перколяции сухой биомассы. Соотношение спирт: биомасса составляло 10:1. Конечным этапом получения экстракта было выпаривание спирта при помощи вакуумно-ротационного испарителя и перевод сухого остатка в стерильную дистиллированную воду в объеме, равном первоначальному объему спиртового экстракта. Источником биомасс были: биомасса полисциаса папоротниколистного *Polyscias filicifolia* Bailey из семейства *Araliaceae* (штамм *Polyscias* F-2, коллекционный №6, ККК ИМБиг НАН Украины, Киев) – далее экстракт *P. filicifolia*; родиолы розовой *Rhodiola rosea* L из семейства *Crassulaceae* (штамм ЗК-1, коллекционный №29, ВСКК-ВР, Москва, Россия) – далее экстракт *Rh. rosea*; унгернии Виктора *Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko из семейства *Amaryllidaceae* (штамм UV-2, коллекционный №10, ККК ИМБиг НАН Украины, Киев) – далее экстракт *U. victoris* [12].

Определение эффективности посева бактериофагов. Эффективность посева бактериофагов в присутствии экстрактов (опыт) по сравнению с контролем (посевы без экстрактов) определяли подсчетом негативных колоний на чашках Петри. В опытном варианте экстракты в объеме 0,1 мл вносили в 5,0 мл расплавленного верхнего слоя, добавляли 0,1 мл фага и 0,1 мл жидкой культуры *E. coli* С600, пе-

ремешивали и выливали на чашку с нижним слоем 1,8% агаризованной LB-среды. В контрольном варианте посева делали таким же образом, но вместо экстракта вносили 0,1мл физиологического раствора NaCl. Результаты посевов учитывали на следующий день.

Статистическая обработка данных.

Результаты опытов обрабатывали статистически на основании общепринятых методов с использованием некоторых принципов дисперсного анализа [13]. Статистическую значимость различий между группами данных оценивали при помощи критерия Стьюдента (t-критерий) и F-теста, используя для критерия Фишера следующее выражение:

$$F_d = \frac{(M_1 - M_2)^2 (n_1 + n_2 - 2)}{C_1 + C_2} \times \frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2},$$

где F_d – критерий достоверности разницы по Фишеру;

M_1 и M_2 – средние значения для двух выборок;

n_1 и n_2 – объемы первой и второй выборок; C_1 и C_2 – случайная (внутригрупповая) дисперсия в однофакторном дисперсном комплексе;

сумма квадратов центральных отклонений **gam** (V) от своей **частной** средней

$$M_1 : C_2 = \sum (V - M_1)^2.$$

Обчисленное значение критерия Фишера F_d сравнивали со стандартным значением F_{st} , которое находили с помощью специальных таблиц для двух степеней свободы, первая из которых всегда равна единице ($V_1 = 1$), а вторая – сумме объемов двух выборок минус два ($V_2 = n_1 + n_2 - 2$).

Результаты и обсуждение

Результаты исследований, представленные в таблице, свидетельствуют, что эффективность посевов бактериофагов P1, P2, P22, T7 (адсорбируются на ЛПС) [14], бактериофага λ (адсорбируется на

Таблица. Сравнительная оценка влияния растительных экстрактов на эффективность посева бактериофагов

Происхождение экстракта	1 группа бактериофагов					2 группа бактериофагов		
	P1	P2	P22	T7	lambda	Ox2	Ox2h10	Tulb
<i>U. victoris</i>	117,27±8,15 (n=3)	122,76±22,00 (n=6)	107,78±6,47 (n=3)	118,00±6,09 (n=4)	110,98±11,26 (n=5)	100±5,50 (n=10)	92,13±3,00 (n=3)	91,64±6,54 (n=3)
<i>R. rosea</i>	108,46±3,72 (n=3)	109,90±8,14 (n=5)	111,53±7,85 (n=3)	106,02±10,56 (n=4)	109,00±7,96 (n=5)	105,80±5,44 (n=10)	93,03±3,64 (n=3)	96,96±9,97 (n=4)
<i>P. filicifolia</i>	113,51±9,91 (n=3)	112,76±8,31 (n=3)	117,90±7,72 (n=3)	106,80±6,67 (n=5)	109,83±8,68 (n=5)	103,42±5,44 (n=10)	95,33±1,85 (n=3)	88,29±10,64 (n=3)

Примечание: в таблице приведены средние значения и их стандартные ошибки ($M \pm m$) в % относительно контроля, n – объем выборки.

LamB–белке) [15] и бактериофага Oх2 (адсорбируется на OmpA–белке) [16] в большей или меньшей степени повышена в присутствии растительных экстрактов, тогда как эффективность посевов бактериофагов Oх2h10, Oх2h12 и Tulb [17] в присутствии этих же экстрактов несколько понижена по сравнению с контролем.

Сравнение этих данных как двух массивов (рис.), первый из которых включает 6 бактериофагов (1 группа) и 3 экстракта (объем выборки 90 вариантов, среднее значение эффективности посева 109,17±2, 18), а второй – 3 бактериофага (2 группа) и 3 экстракта (объем выборки 28 вариантов, среднее значение эффективности посева 92,04±1,97) свидетельствует о наличии между ними статистически достоверной разницы, оцененной как при помощи t-критерия ($p < 0,01$), так и критерия Фишера ($\beta > 0,99$).

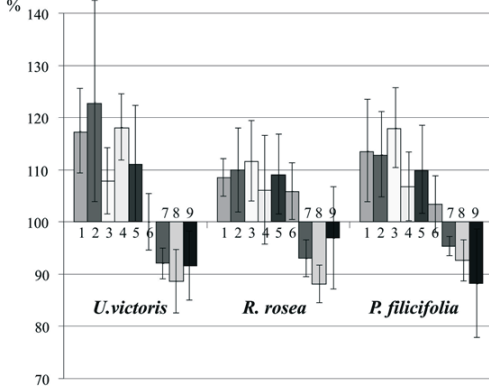


Рисунок. Распределение бактериофагов по эффективности посева в присутствии растительных экстрактов: 1 – P1; 2 – P2; 3 – P22; 4 – T7; 5 – lambda; 6 – Oх2; 7– Oх2h10; 8 – h12; 9 – Tulb

Относительно влияния отдельных экстрактов на эффективность посевов обеих групп бактериофагов показано, что в присутствии экстрактов *U. victoris* и *P. filicifolia* данный показатель статистически значимо возрастает для первой группы бактериофагов по сравнению со второй группой ($\beta > 0,95$ для *U. victoris* и $\beta > 0,99$ для

P. filicifolia). В то же время отличия в эффективности посевов бактериофагов в присутствии экстракта *R. rosea* не имеют достоверного характера ($\beta < 0,95$) и могут расцениваться лишь как определенная тенденция к ингибированию адсорбции фагов 2-й группы.

Таким образом, в присутствии исследованных нами растительных экстрактов бактериофаги Oх2h10, Oх2h12 и Tulb достоверно снижают свою эффективность посева по сравнению с контролем. От бактериофагов первой группы их отличает способность к адсорбции на OmpC-рецепторе, который входит в группу поринов наружной мембраны оболочки *E. coli* [9]. При этом бактериофаги Oх2h10 и Oх2h12, которые последовательно мутировали от OmpA-специфичного бактериофага Oх2 в направлении расширения круга хозяев [17], могут использовать в качестве рецепторов адсорбции как OmpA, так и OmpC; Tulb относится к OmpC-специфичным бактериофагам.

Ингибирование адсорбции этих трех бактериофагов со стороны растительных экстрактов свидетельствует о взаимодействии последних или с рецепторами на поверхности бактериальной клетки или с фаговыми хвостовыми отростками. Последнее представляется маловероятным, поскольку в этом случае происходило бы снижение эффективности посевов всех бактериофагов, что в эксперименте не наблюдается.

Кроме того, не наблюдается более сильного влияния растительных экстрактов на Tulb по сравнению с Oх2h10 и Oх2h12, которого можно было бы ожидать исходя из способности двух последних фагов использовать не один, а два клеточных рецептора. Мы объясняем это тем, что по активности связывания с OmpA и OmpC фаги Oх2h10 и Oх2h12 гораздо ближе к Tulb, чем к Oх2. Так, согласно дан-

ным Morona и др. [18] мутант *E. coli* P400-M1 (*ompA*) не адсорбирует Oх2, но адсорбирует 97 % Tulb, 99 % Oх2h10 и 99% Oх2h12. Еще один мутант по белку *OmpA* *E. coli* P460 адсорбирует только 5 % фага Oх2, адсорбируя при этом 99,8 % Tulb, 99 % Oх2h10 и 97,2 % Oх2h12. Если бы адсорбция Oх2h10 и Oх2h12 укладывалась в схему случайных столкновений фаг-рецептор, то падение эффективности посевов Oх2h10 и Oх2h12 на *ompA* мутантах находилось бы в пределах 50 %, тогда как описанная в литературе эффективность адсорбции двух этих фагов гораздо выше по отношению к *OmpC*, чем к *OmpA* белку. Соответственно, и в наших опытах разница между Tulb, Oх2h10 и Oх2h12 не прослеживается.

Таким образом, судя по падению эффективности посевов *OmpC*-зависимых бактериофагов компоненты трех исследованных растительных экстрактов взаимодействуют с *OmpC* рецептором наружной мембраны клеточной оболочки *E. coli* и не взаимодействуют с ее другими поверхностными структурами – ЛПС комплексом, LamB и *OmpA* белками. Влияние растительных экстрактов на *OmpC* обусловлено, очевидно, тем, что последний относится к группе белков-поринов и образует поры – неспецифическое сито, через которое диффундируют гидрофильные вещества с размером молекул до 600 Da [19]. К ним относятся моно-, ди-, три-сахариды, аминокислоты, тетрапептиды, широкий набор минеральных соединений [12, 20-22]. Используемый нами способ получения растительных экстрактов предполагает присутствие в них такого рода соединений независимо от специфических профилей метаболизма каждого из растений. Изменение состава питательной среды, в нашем случае за счет внесения 2% растительного экстракта, приводит к изменению структуры бактериального ЛПС [23, 24] и, соответственно, его

рецепторной активности по отношению к ЛПС-зависимым фагам. Структура ЛПС существенна также для стабилизации *OmpA* белка как рецептора, а присутствие в среде мальтозы увеличивает число молекул LamB, что способствует повышению эффективности посевов фагов Oх2 и λ соответственно [9]. По сути, растительные экстракты оптимизируют состав питательной среды для бактериофагов, чья адсорбционная способность зависит от состояния ЛПС, его взаимодействия с белковыми рецепторами (*OmpA*) и наличия достаточного количества мальтозо-специфического порина LamB. Все это объясняет единообразие стимулирующего влияния всех трех экстрактов на бактериофаги, объединенные в нашей работе как группа 1.

С другой стороны, специфическое сродство большого числа гидрофильных соединений к *OmpC* порину обуславливает, очевидно, некоторую степень их конкурентности по отношению к *OmpC*-зависимым бактериофагам (группа 2), что приводит к снижению эффективности их посева и объясняет однородность ингибирующего влияния всех экстрактов на эту группу бактериофагов.

Взаимодействие растительных экстрактов с белком-порином *OmpC* позволяет предположить возможность первичного контакта компонентов растительных экстрактов с другими белками-поридами, описанными как для прокариотических, так и для эукариотических систем.

Выводы

Первичный контакт растительных экстрактов с поверхностью бактериальной клетки может осуществляться как выборочное взаимодействие определенных компонентов экстракта с белками-поридами, способными пропускать внутрь клетки широкий набор гидрофильных соединений с размером молекул до 600 Da.

Список литературы

1. Дворник А.С., Перерва Т.П., Кунах В.А. Скрининг препаратов, отриманих із культури тканин лікарських рослин, на антимутагенну активність у системі *Escherichia coli* – бактериофаг λ . // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, №2. – С.3–10.
2. Перерва Т.П., Мирюта А.Ю., Можилевская Л.П. Бактериальная тест-система для первичного скрининга препаратов на антиканцерогенную и антимутагенную активность // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т. 5, №1. – 2. – С. 55–61.
3. Перерва Т.П., Дворник А.С., Мирюта А.Ю., Можилевская Л.П., Кунах В.А. Бактериальная тест-система для первичного скрининга веществ с потенциальной противоопухолевой активностью // Цитология и генетика. – 2007. – Т. 41, №4. – С. 59–65.
4. Мирюта А.Ю., Перерва Т.П. Биологическая активность экстракта *Ungernia victoris* в системе CaCl_2 -трансформации *Escherichia coli* в присутствии модуляторов кальцевых каналов // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42, №4. – С. 45–48.
5. Адамс М. Бактериофаги. – М.: Издательство иностранной литературы. – 1961. – 527 с.
6. Lindberg A.A., Hellerquist C.C. Bacteriophage attachment sites, serological specificity and chemical composition of the lipopolysaccharide of semirough and rough mutants of *Salmonella typhimurium* // J. Bacteriol. – 1971. – Vol. 105, №1. – P. 57 – 64.
7. Wilkinson S.G., Gemski P., Stocker B.A.D. Non-smooth mutants of *Salmonella typhimurium*: differentiation by phage sensitivity and genetic mapping // J. Gen. Microbiol. – 1972. – Vol. 70. – P. 527–554.
8. Лычева Т.А. Бактериофаги, выявляющие различные нарушения в синтезе полисахарида, О- антигена шигелл Флекснера. – В кн. : Материалы Юбилейного симпозиума, посвященного 50-летию Тбилисского НИИВС, Тбилиси. – 1974. – С. 129–130.
9. Лихачева Н.А., Синеокий С.П. Фаговые рецепторы *Escherichia coli*. Основные компоненты наружной мембраны *E. coli* как фаговые рецепторы // Мол. ген. микробиол. и вирусол. – 1989. – № 10. – С. 3–15.
10. Плетнева Е.А., Шабурова О.В., Крылов В.Н. Формальная схема фаговых адсорбционных рецепторов *Pseudomonas aeruginosa* и возможности ее практического использования // Генетика. – 2009. – Т. 45, №1. – С. 43 – 49.
11. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике // М.: Мир – 1976. – 460 с.
12. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіологічні – біохімічні основи. – Київ: Логос, 2005. – 724 с.
13. Плохинский Н.А. Биометрия // М.: Изд. Московского университета. – 1970. – 367 с.
14. Lindberg A.A. Bacteriophage receptors // Annual Review of Microbiology. – 1973. – Vol. 28. – P. 207 – 241.
15. Randall – Hazelbauer L., Schwartz M. Isolation of bacteriophage lambda receptor from *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1973. – Vol. 116. – P. 1436 – 1446.
16. Datta D.B., Arden B., Henning U. Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors // J. Bacteriol. – 1977. – Vol. 131. – P. 821 – 829.
17. Morona R., Henning U. Host range mutants of bacteriophage O_{x2} can use two different outer membrane proteins of *Escherichia coli* K12 as receptors. // J. Bacteriol. – 1984. – Vol. 159, №2. – P.579 – 582.
18. Morona R., Tommassen J., Henning U. Demonstration of a bacteriophage receptor site on the *Escherichia coli* K12 outer membrane OmpC by the use of a protease // Eur. J. Biochem. – 1985. – Vol. 150. – P. 161–169.
19. Nicaido H., Vaara M. Molecular basic of bacterial outer membrane permeability // Microbial. Rev. – 1985. – P. 1–32.
20. Benz R., Bauer K. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins // Eur. J. Biochemistry. – 1988. – Vol. 176. – P. 1–19.
21. Быков В.А., Запесочная Г.Г., Куркин В.А. Родиола розовая (*Rhodiola rosea* L.): традиционные и биотехнологические аспек-

- ты получения лекарственных средств (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 1988. – № 1. – С. 28–39.
22. Ахов Л.С., Шишова Ю.С., Олешек В. Протипухлинна активність фураностанолових сапонінів *Quillaja saponaria* та *Yucca schidigera* // Доповіді НАН України. – 2002. – № 5. – С. 182–184.
23. Шиліна Ю.В., Моложава О.С. Модифікації ліпополісахаридів як один із способів адаптації клітин патогенних бактерій та їх популяцій до дії біотичних та абіотичних факторів середовища // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, №2. – С. 65–80.
24. Norrod E.P. Induced changes in the surface of *Neisseria gonorrhoeae* // Can. J. Microbiol. – 1983. – Vol. 29. – P. 584–592.

Представлена Ф.И. Товкачем
Поступила 30.06.2009

ВЗАЄМОДІЯ КОМПОНЕНТІВ РОСЛИННИХ
ЕКСТРАКТІВ З БІЛКОМ-ПОРІНОМ
ЗОВНІШНЬОЇ МЕМБРАНИ БАКТЕРІАЛЬНОЇ
КЛІТИНИ

Т.П. Перерва¹, А.Ю. Мирюта¹, Л.Н. Мойса²,
Л.П. Можилевська¹, В.А. Кунах¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН
України
Україна 03680, г. Київ, вул. Акад. Заболотного,
150

e-mail: kunakh@imbg.org.ua

² НВО "Діапроф-Мед"

Україна, 04123, м. Київ, вул. Світлицького, 35

Компоненти трьох досліджених рослинних екстрактів *Ungernia victoris*, *Rhodiola rosea* та *Polyscias filicifolia* взаємодіють з OmpC білком-

поріном зовнішньої мембрани клітинної оболонки *Escherichia coli* і не взаємодіють з іншими її поверхневими структурами – ЛПВ – комплексом, LamB і OmpA білками. Не виключена можливість взаємодії компонентів рослинних екстрактів і з іншими білками-порінами, описаними як для прокаріотичних, так і для еукаріотичних систем.

Ключові слова: білки-поріни *E. coli*, бактеріофаги, рослинні екстракти.

INTERACTION OF PLANT EXTRACTS COMPONENTS WITH PROTEIN-PORIN OF EXTERNAL MEMBRANE OF BACTERIAL CELL

T.P. Pererva¹, A. Yu. Miryuta¹, L.N. Moisa², L.P. Mozhylevskaya¹, V.A. Kunakh¹

¹ Institute of molecular biology and genetics of
Natl. Acad. of Sci. of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str.,
150

e-mail: kunakh@imbg.org.ua

² "Diaprof-Med"

Ukraine, 04123, Kyiv, Svitlytsky str., 35

Components of three investigated plant extracts from *Ungernia victoris*, *Rhodiola rosea* and *Polyscias filicifolia* interact with OmpC protein-porin of external membrane of *Escherichia coli* cell envelope and do not interact with its other surface structures – LPS-complex, LamB and OmpA proteins. The possibility of interaction of plant extracts components with other protein-porins described for both procaryotic and eucaryotic systems is not excluded.

Key words: protein-porins of *E. coli*, bacteriophages, plant extracts.