

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 579.842.14:579.252.5:577.352.33] 08.04

А. М. Седракян, Ж. А. Кцоян, Н. Н. Саркисян, К. А. Аракелова,
И. В. Вартересян, академик НАН Армении К. Г. Карагезян

**Спектры мембранных белков плазмидных и бесплазмидных
штаммов *Salmonella derby***

(Представлено 8/VIII 1996)

Плазмидоносительство — существенный фактор изменчивости и эволюции бактерий. Способность генетической информации плазмид расширять адаптивные возможности бактерий приобрела особо важное значение для их выживаемости в условиях повышенной агрессивности окружающей среды вследствие загрязнения ее химическими реагентами, а также целенаправленного создания и массового применения антибактериальных агентов.

Исследование R-фактора рGK101 клеток *Salmonella derby* представляет интерес в связи с множественностью эффектов плазмиды, которая, наряду с формированием лекарственной устойчивости бактерий (1), оказывает влияние на их формообразование и ультраструктуру мембран (2), метаболизм мембранных фосфолипидов (3), УФ-чувствительность и фагочувствительность (4).

Ранее проведенные исследования показали, что многие структурно-функциональные свойства клеток *S. derby*, ассоциированные с R-фактором, обусловлены организацией их клеточных оболочек, что предопределяло интерес к исследованию их структурных компонент. Данная работа посвящена исследованию влияния плазмиды на спектр мембранных белков *S. derby* и их функциональную организацию.

Природный условно-патогенный штамм *S. derby* K89 содержит конъюгативный R-фактор рGK101 длиной около 100 т.п.н. и более короткие плазмидные молекулы, длиной около 22 т.п.н. и менее. В работе использованы производные от клеток дикого типа штаммы: радиочувствительный мутантный штамм *S. derby* K134, содержащий

R-фактор рGK101, и бесплазмидные штаммы *S. derby* K6 и *S. derby* K82.

В качестве питательных сред использовали: мясопептонный бульон, 2 %-ный мясопептонный агар, минимальную среду М-9.

Бактерии выращивали при температуре 37°C до стационарной фазы (20 – 24 ч). Собранные 3-4 г влажных клеток дважды центрифугировали в 10 mM трис-буфере рН 7,4 при 5000 об/мин в течение 30 мин.

Мембраны клеток выделяли по методу Инойе (5). SDS-электрофорез белков проводили по методу Лэммли (6) в двухступенчатом 3- и 10 %-ном полиакриламидном геле. Электрофореграммы сканировали на приборе Ultrascan XI (LKB) при 633 нм.

Концентрацию полипептида в образце характеризовали по площади соответствующего ему пика на кривой сканирования электрофореграммы. Молекулярные веса полипептидов определяли, используя кривую калибровки геля, построенную по данным об относительной миграции в геле SDS-маркеров (Sigma).

Аминокислотный состав мембранных белков бактериальных клеток определяли на аминокислотном анализаторе ААА 339 фирмы "Microtehn" (ЧСФР) после гидролиза препаратов 6 н HCl в течение 24 ч при 105°C.

SDS-электрофорезом в 10%-ном ПААГ получены спектры мембранных белков клеток *S. derby* (рис. 1), белковые профили которых изображены на рис.2.

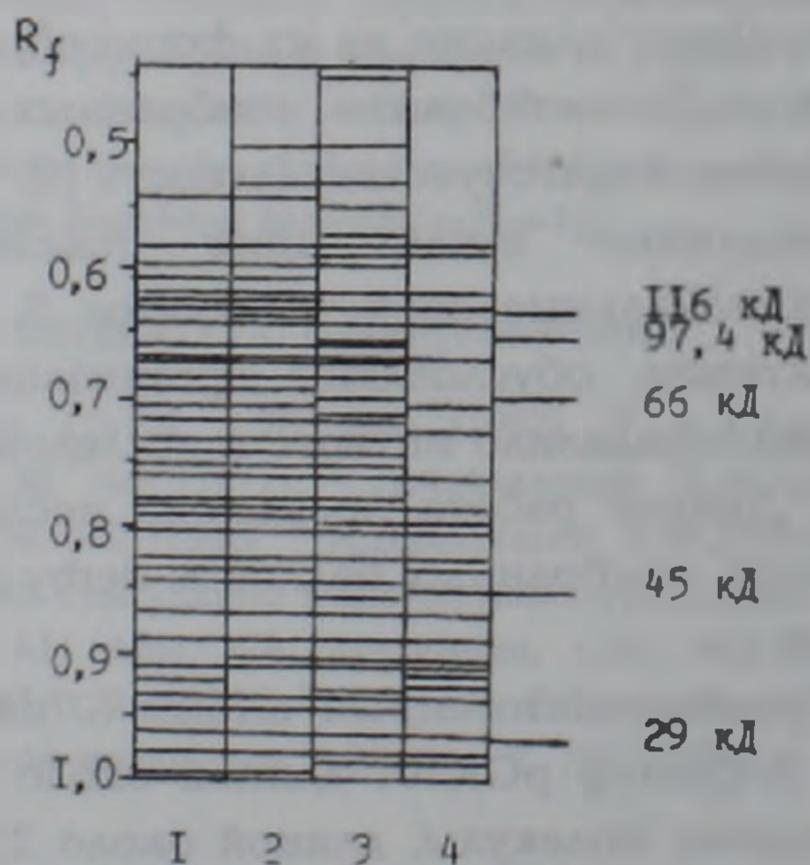


Рис.1. Относительная миграция (R_f) мембранных белков *S. derby* (SDS-электрофорез в 10% ПААГ с последующим окрашиванием в кумасси): 1 – *S. derby* K134; 2 – *S. derby* K89; 3 – *S. derby* K6; 4 – *S. derby* K82

633 нм

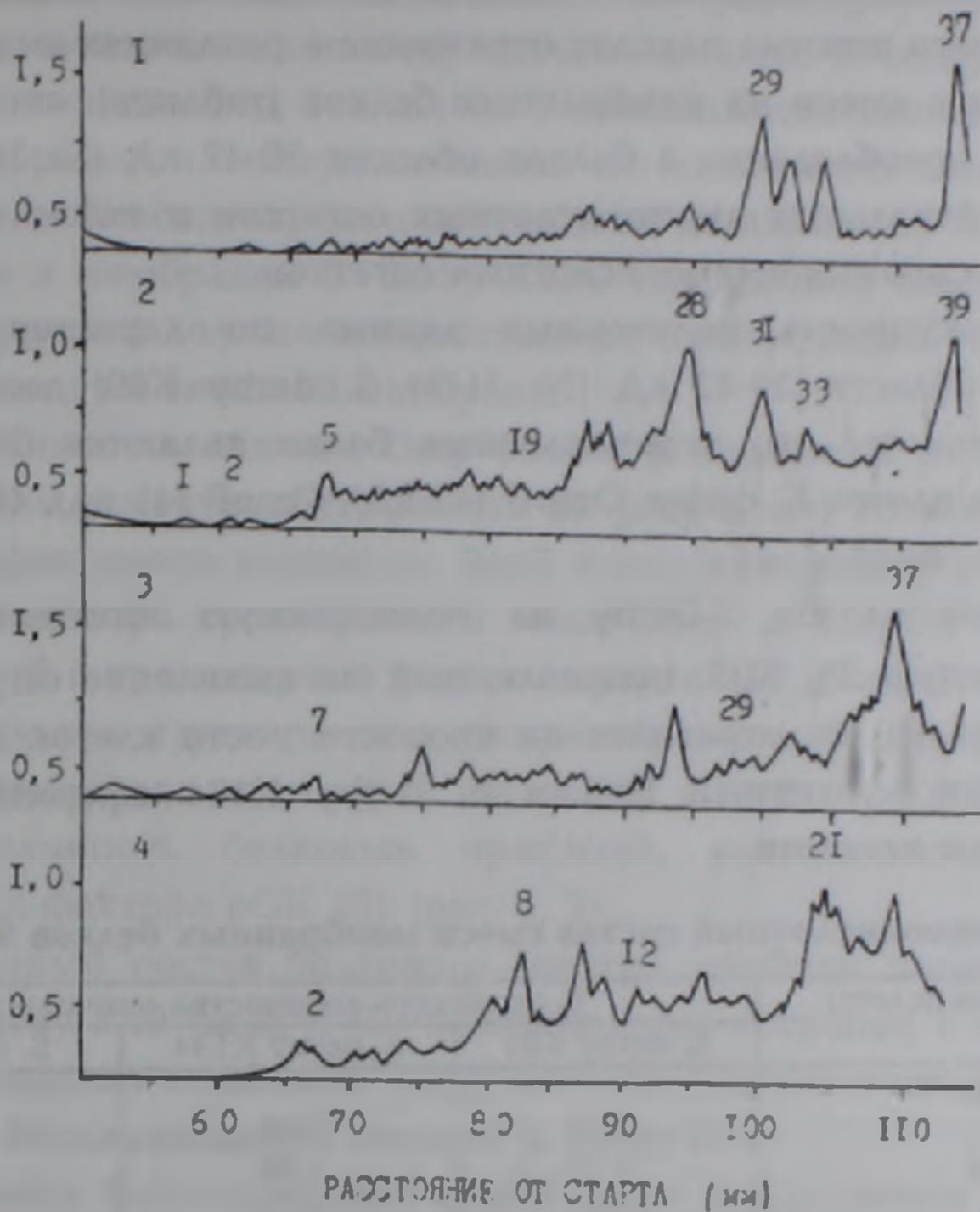


Рис.2. Кривые сканирования электрофореграмм мембранных белков *S. derby*: 1 — *S. derby* K134; 2 — *S. derby* K89; 3 — *S. derby* K6; 4 — *S. derby* K82

Сравнительное исследование белковых спектров плазмидных штаммов *S. derby* выявило их идентичность по качественному составу, за исключением одной полосы, местоположение которой соответствует полипептиду с молекулярной массой около 40 кД. В мембранах бактерий дикого типа *S. derby* K89 белок №33 с молекулярной массой около 40 кД содержится в количестве, составляющем 3,2% от общего количества мембранных белков, тогда как в мембранах штамма *S. derby* K134 белок 40 кД не наблюдается.

Следует отметить различия плазмидных штаммов *S. derby* по концентрациям мембранных белков. Белки мембран *S. derby* K134 с молекулярными массами 39-42 кД (№ 29-31) проявляются конститутивно, при этом их суммарное содержание (30%) почти в два раза превышает их содержание в мембранах штамма дикого типа (17%). Наряду с этим, помимо перечисленных белков, содержание мембранных белков *S. derby* K134 снижено по сравнению с белками клеток дикого типа примерно в 1,9 раза.

Различия в белковых спектрах мембран клеток дикого типа и мутантного штамма находят отражение в различиях аминокислотного состава смеси их мембранных белков (таблица), анализ которых выявил преобладание в белках области 39-42 кД (№ 31-34 *S. derby* K89) нейтральных аминокислотных остатков и пониженное содержание основных аминокислотных остатков.

Совокупность полученных данных по характеру профилей белков области 39-42 кД (№ 31-34 *S. derby* K89) дает основание предположить, что перечисленные белки являются Omp белками мембран клеток *S. derby*: OmpC (42 кД), OmpF (41 кД), OmpD (40 кД) и OmpA (39 кД).

Посев клеток *S. Derby* на полноценную питательную среду, содержащую 3% SDS, направленный на выявление *ompF*⁻ *ompC*⁻ фенотипа (7), не отразился на скорости роста клеток дикого типа, тогда как мутантный штамм *S. derby* K134 сформировал лишь отдельные колонии.

Аминокислотный состав смеси мембранных белков *S. derby*

Аминокислоты	% от общего количества аминокислот		
	<i>S. derby</i> K89	<i>S. derby</i> K134	<i>S. derby</i> K82
Основные:			
лизин	4,75	0,44	2,52
гистидин	5,71	1,66	0,72
аргинин	10,84	3,11	27,1
всего	21,3	5,21	30,35
Кислотные:			
аспарагин	13,6	9,9	4,37
глутамин	7,36	4,6	3,87
всего	20,96	14,5	8,24
Нейтральные:			
треонин	3,94	7,07	2,36
серин	6,88	5,86	2,1
пролин	5,56	26,24	18,46
глицин	9,4	7,77	17,6
аланин	10,3	8,83	12,59
всего	36,06	65,87	53,11
Гидрофобные:			
метионин	1,14	1,64	0,59
валин	1,82	2,73	2,38
изолейцин	1,77	2,0	1,41
лейцин	7,06	2,77	1,02
тирозин	5,83	3,7	1,61
фенилаланин	3,97	1,56	1,27
всего	21,63	14,4	8,28

Чувствительность мутантного штамма к SDS нельзя объяснить отсутствием OmpF и OmpC белков, что противоречило бы как данным электрофоретического анализа белковых спектров (рис. 1,2).

так и отсутствию недостаточности клеток по транспорту метаболитов. Природа чувствительности мутантного штамма к содержанию SDS в среде, по-видимому, заключена в стабильности связей между внешней мембраной и пептидогликаном, что может быть следствием дефектности по биосинтезу липопротеидных компонентов мембран. Наблюдаемое в мембранах *S. derby* K134 повышенное содержание белков Omp группы должно способствовать стабилизации структурной организации их внешней мембраны.

Конститутивность синтеза Omp белков в штамме *S. derby* K134 (т.е. нарушение осмочувствительности их регуляции) возможна как следствие дефектности клеток по EnvZ белку (фосфатаза и киназа OmpR — активатора транскрипции генов *ompF* и *ompC*), так и в случае мутаций в промоторном участке генов *ompF* и *ompC*.

Сравнительное изучение спектров мембранных белков *S. derby* K89 и бесплазмидных штаммов *S. derby* K82 и *S. derby* K6 выявило модифицированность белковых профилей, ассоциированную с отсутствием R-фактора рСК 101 (рис. 1, 2).

Качественный состав белкового спектра мембран плазмидного штамма *S. derby* K89 на 80% (30 полипептидов) сохранен в мембранах бесплазмидного штамма *S. derby* K6 и на 50% (19 полипептидов) в мембранах бесплазмидного штамма *S. derby* K82.

В мембранах бесплазмидных штаммов не наблюдаются некоторые полипептиды мембран плазмидного штамма *S. derby* K89, при этом № 3, 6, 10, 26, 39 (рис.1, 2) плазмидного штамма отсутствуют в мембранах обоих бесплазмидных штаммов.

Вместе с тем в бесплазмидных штаммах наблюдаются полипептиды, не выявляемые в клетках дикого типа, при этом обнаружены различия по составу полипептидов и между белковыми профилями мембран двух бесплазмидных штаммов.

Среди белков, появившихся в мембранах клеток *S. derby* после потери R-фактора, следует отметить белки с молекулярными массами 180, 52,5, 27,5 кД, которые наблюдаются в обоих бесплазмидных штаммах (соответственно № 7, 25, 39 штамма *S. derby* K6 и № 2, 12, 26 штамма *S. derby* K82). Выявлены различия и в концентрациях мембранных полипептидов сравниваемых штаммов.

Таким образом, в исследованных бесплазмидных штаммах наблюдается разная степень модифицированности белковых спектров мембран по сравнению с плазмидным штаммом, что коррелирует с функциональными особенностями сравниваемых штаммов.

Общими признаками бесплазмидных штаммов, отличающими их от плазмидного штамма, являются: округлая форма клеток (возможно вследствие дефектности РВР2), ауксотрофность, пониженная скорость роста, чувствительность к стрептомицину, пенициллину, хлорамфениколу и устойчивость к фагу dr8 (4). Бесплазмидный штамм *S. derby* K82 устойчив к тетрациклину и отличается повышенной толщиной клеточной оболочки (1,2).

Таким образом, R-фактору рGK101 *S. derby* принадлежит важная роль в жизнедеятельности этих клеток. Плазида наделяет клетки *S. derby* рядом селективных преимуществ, способствует формированию гетерогенной структуры микробной популяции, расширяя возможность микроэволюции, реализации различных типов стратегий развития популяции.

Институт молекулярной биологии НАН Армении

Ս. Մ. ՍԵՂԻՐԱՎՅԱՆ, Ժ. Ա. ԿՇՈՅԱՆ, Ն. Ն. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Կ. Ա. ԱՌԱՔԵԼՈՎԱ,
Ի. Վ. ՎԱՐԴԵՐԵՍՅԱՆ. Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս Կ. Գ. ՂԱՐԱԳՅՈՉՅԱՆ

Պլազմիդ պարունակող և պլազմիդազուրկ *Salmonella derby* շտամների թաղանթների սպիտակուցների սպեկտրները

Թաղանթների կազմավորմամբ պայմանավորված *S. derby* բջիջների մի շարք հատկությունների՝ բջիջների ձևի, թաղանթային ֆոսֆոլիպիդների կազմի, ֆազազգայնության կախվածությունը рGK101 R-գործոնից հետաքրքրություն առաջացրեց ուսումնասիրելու այդ բջիջների թաղանթային սպեկտրը և R-գործոնի ազդեցությունը նրա վրա:

Մուտանտ պլազմիդակիր *S. derby* K134 շտամի թաղանթները տարբերվում են վայրի տիպի բջիջների թաղանթներից 40 կդ սպիտակուցի բացակայությամբ և 39-ից մինչև 42 կդ մուլեկուլային զանգվածներով սպիտակուցների անփոփոխ և գրեթե կրկնակի պարունակությամբ, ինչը նպաստում է բջջաթաղանթի կայունացմանը:

Վայրի տիպի *S. derby* շտամի, նրա պլազմիդակիր և պլազմիդազուրկ ածանցյալների համեմատական ուսումնասիրությունը բացահայտեց рG101 -գործոնի զգալի ազդեցությունը թաղանթային սպիտակուցների սպեկտրի վրա:

ЛИТЕРАТУРА - ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- 1 Ж.А.Кцоян, А.С.Тансова, Н.Н.Саркисян и др., Антибиотики и химиотерапия, т.33, №10, с.760-767 (1988).
- 2 Ж.А.Кцоян, Н.Н.Саркисян, В.И.Чернов. ЖМЭИ, №2, с.14, 1991.
- 3 А.З.Перолян, С.А.Ктсоян, FEBS, p.503 (1990).
- 4 Р.Г.Антонян, Н.Н.Саркисян, К.Г.Данагулян и др., ДАН Арм ССР, т.77, №3, с.132-135 (1983).
- 5 S.Inouye, K.Takeishi, N.Lee e.a., J.Bacteriol., v.127, p.555-563 (1976).
- 6 U.K.Laemmli, Nature, v.227, p.680-685 (1970).
- 7 I.Gilbert, J.Cassadesus, FEMS Microbiol. Lett., p.205-210 (1989).