

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.352.335:579.842.14

А. М. Седракян, А. З. Пепоян, Ж. А. Кцоян,
академик НАН Армении К. Г. Карагезян

**Влияние белков и фосфолипидов мембран *Salmonella derby*
на характер межклеточных взаимодействий**

(Представлено 4/УІІ 1994)

Ранее нами было показано, что плазмидосодержащие и бесплазмидные клетки *Salmonella derby* отличаются как по форме, так и по характеру межмембранных, межклеточных взаимодействий, по уровню перекисного окисления (ПОЛ) липидов и содержанию в клетках витамина Е (1).

Установлено, что бесплазмидные клетки *Salmonella derby* достигают стационарной фазы роста значительно быстрее, чем плазмидные клетки *Salmonella derby* (2). По литературным данным, процессы, ведущие к ингибированию размножения в суспензионных культурах микроорганизмов при переходе клеток из лог фазы в стационарную, обусловлены критической частотой. Известно также, что межклеточные взаимодействия в культуре микроорганизмов обладают довольно высокой таксономической специфичностью, которая обусловлена, скорее всего, природой или топографией белков, расположенных на поверхности клеточной оболочки (3).

Белковые профили бактериальных мембран выявляют различия, часто наблюдаемые в штаммах того же вида, и даже в клетках одного штамма, выращенных при различных температурах или при ограничении питания, что свидетельствует о функциональном многообразии и кооперативности организации белкового компонента мембран.

Изменения в профилях внешнемембранных белков могут быть обусловлены и введением экзогенной ДНК (4). Известно, что R-факторы могут вызывать замещение существующих белков *E.coli* В рядом альтернативных поринов (4).

Все это побудило интерес к изучению белков клеточных мембран плазмидосодержащих и бесплазмидных штаммов *Salmonella derby*.

Использовали бактериальные штаммы: *Salmonella derby* K89 — дикий тип, изолированный из клинического материала (5), несущий конъюгативный R-фактор длиной около 100 т.п.н., обозначенный

pCK101, и *Salmonella derby* K82 — бесплазмидное производное от дикого типа клеток *Salmonella derby*.

Бактерии выращивали на 2%-ном мясопептонном агаре при температуре 37°C в течение 20 ч. Собранные 3-4 г влажных клеток дважды центрифугировали в 10 мм трис-буфере pH 7,4 при 5000 об/мин 30 мин.

Выделение клеточных мембран проводили по методу Айное (6). SDS-электрофорез белков в 10%-ном полиакриламидном геле проводили по методу Леммли (7), загружая гель белковыми препаратами в количестве 0,1 мг белка на трек. Электрофореграммы сканировали на приборе Ultrascan XI (LKB) при длине волны 633 нм. Концентрации отдельных белков определяли по площади соответствующих пиков на кривых сканирования электрофореграмм.

Образцы для дифракции рентгеновских лучей готовили согласно нижеприведенной методике: мембранную суспензию соответствующей концентрации вводили в капилляр или ячейку типа "сэндвич" и оставляли в герметически закрытом виде при комнатной температуре. Образцы имели цилиндрический или плоский вид с диаметром или толщиной 0,4-1 мм. Съёмки образцов проводили на рентгеновских аппаратах УРС-60, УРС-2 с камерами типа КРОН, РКСО, предназначенных для съёмки на плоскую плёнку: для исследования малоуглового рассеивания были модифицированы при расстояниях образец — плёнка 100 и 150 нм. Были использованы также трубки БСВ-23 и БСВ-24В, дающие излучение в области 1,54 Å длины волны с напряжением на аноде 40 мВ при анодном токе 20 мА. Время экспозиции в пределах 10-14 ч. Для приготовления образца использовались кварцевые тонкослойные капилляры 0,4-1 мм, а также ячейка "сэндвич" с плоскими окнами из бериллия (8).

При препаративном выделении мембранных белков клеток *Salmonella derby* K89 и *Salmonella derby* K82 особое внимание уделяли идентичности условий роста бактерий обоих штаммов и процессов препарации.

Сравнительное изучение спектров мембранных белков клеток *Salmonella derby* выявило различия как в качественном, так и количественном содержании белков, ассоциированных с R-плазмидой (9).

Разделение мембранных белков клеток *Salmonella derby* при SDS-электрофорезе в 10%-ном полиакриламидном геле привело к образованию белковых спектров, позволяющих различить 39 и 26 полос соответственно. Вместе с тем анализ полученных результатов свидетельствует об отсутствии статистически достоверных расхождений в суммарном количестве белков плазмидного и бесплазмидного штаммов.

Представляет интерес область от 33000 до 36000, в которой располагаются пориновые белки клеток *Salmonella*. Наблюдаемые четкие полосы, соответствующие белкам Omp C, Omp F и Omp D (33000, 34000 и 35000 соответственно), отличаются по концентрациям в двух сравниваемых штаммах. Суммарное содержание поринов в бесплазмидном штамме снижено в 1,7 раза. В 1,8 раза снижено содержание белка Omp C — основного поринового канала энтеробактерий в нормальных физио-

логических условиях. Концентрация белка Omp A (36000) в исследованных штаммах неизменна.

На основании проведенных наблюдений становится очевидным наличие интересных различий в качественном наборе и количественном содержании белков в мембранах указанных штаммов, что позволяет предположить, что они воздействуют на характер межклеточных взаимодействий.

Другие важные компоненты клеточных стенок бактерий, которые могут влиять на формирование межклеточных контактов, — фосфолипиды (ФЛ). Нами показано, что R-плазмида *Salmonella derby* способствует образованию упорядоченных участков мембран, обусловленных полярными головками фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ), поэтому при дальнейшем изучении зависимости межклеточных взаимодействий от ФЛ использованы мембранные суспензии плазмидосодержащих клеток *Salmonella derby*. Так как известно, что параметры фосфолипидной мембраны (толщина, плотность и т.д., в том числе и d — суммарная толщина мембраны и межмембранного расстояния) в значительной степени определяются распределением зарядов на полярной части молекулы, нами с помощью рентгенографического метода исследовались 15%-ные мембранные суспензии плазмидных клеток *Salmonella derby* в широком интервале pH среды (2,5-10,9).

При этом предполагалось, что при переходе как в кислую, так и щелочную среду должно иметь место возникновение одноименных (положительных или отрицательных) зарядов в полярной группе молекул ФХ и ФЭ, что за счет возникновения сил электрического отталкивания должно приводить к разрушению предполагаемого порядка полярных групп молекул ФЛ на поверхности мембраны.

Результаты экспериментов свидетельствуют, что как при pH 2,5, так и при pH 10,9 рефлексы $8\text{ \AA}$ и $11\text{ \AA}$, обусловленные упорядоченностью мембран, исчезают.

Ранее нами показано, что оптимальный рост клеток *Salmonella derby* наблюдается при pH=7-7,5 (1), т.е. при более упорядоченном внутримембранном состоянии мембран указанных клеток.

Зависимость суммарной толщины мембраны и межмембранного расстояния (d) от pH среды 15%-ной мембранной суспензии плазмидосодержащих клеток *Salmonella derby*

pH среды	2,5	7,0	10,9
d -суммарное ($\text{\AA}$)	40,69	39,28	49,142

Как видно из таблицы, как в кислой (pH 2,5), так и щелочной (pH=10,9) среде имеет место увеличение межплоскостных расстояний малоугловых рефлексов, что, согласно литературным данным (10), непос-

редственно указывает на увеличение толщины межмембранной водной прослойки, т.е., по всей вероятности, при рН окружающей среды, сильно отличающихся от физиологического, изменяется характер межклеточных взаимодействий, что и приводит к нарушению роста и размножения.

Таким образом, нами показано, что в формировании межклеточных контактов важную роль играют гидрофильно-гидрофобные взаимодействия молекул ФЛ в мембранах клеток *Salmonella derby*.

Отсутствие R-плазмиды влияет на ФЛ и белковый спектр указанных клеток, приводит к усилению межмембранных взаимодействий, что свидетельствует о корреляции между R-плазмидой и структурой клеточных стенок *Salmonella derby*.

Институт молекулярной биологии НАН Армении

Ա. Մ. ՍԵՂՐԱՎՅԱՆ, Ա. Չ. ՓԵՓՈՅԱՆ, Ժ. Ա. ԿՇՈՅԱՆ,

Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս Կ. Գ. ՂԱՐԱԳՅՈՉՅԱՆ

***Salmonella derby* բջիջների թաղանթային սպիտակուցների և ֆոսֆոլիպիդների ազդեցությունը միջբջջային փոխազդեցությունների բնույթի վրա**

Ուսումնասիրվել է *S. derby* պլազմիդազուրկ և պլազմիդակիր բջիջների թաղանթակիր սպիտակուցների կազմը: Բացահայտվել է, որ R-պլազմիդի բացակայությունը *S. derby* բջիջներում բերում է սպիտակուցների (ներառյալ պորինների, որոնց քանակը պակասում է մոտավորապես 1,7 անգամ) որակական և քանակական կազմի խիստ փոփոխության:

Ուսումնասիրությունների հիման վրա արվել է ենթադրություն, որի համաձայն միջբջջային փոխազդեցությունների բնույթը *S. derby* բջիջներում կարող է պայմանավորված լինել ինչպես թաղանթային սպիտակուցների կազմով, այնպես էլ բջիջների թաղանթներում ֆոսֆոլիպիդների մոլեկուլների հիդրոֆիլ-հիդրոֆոբ փոխազդեցություններով:

ЛИТЕРАТУРА - ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ А.З.Песпоян, Г.Г.Бадалян, Ж.А.Кцоян и др, ДАН Арм ССР, т.91, №5, 219-226 (1990). ² А.З.Песпоян и др., Биохимия, т.58, №12, с.1881-1885 (1993). ³ С.В.Конев, В.М.Мажуль, Межклеточные контакты, М. Наука и техника, 1977. ⁴ M.Stephen Hammond (ed.) in: The Bacterial cell Surface, Croom Helm Ltd, London, Sydney, p.57-119, 1984. ⁵ М.К.Вартанян, Б.П.Карабсгов, Материалы II Науч. конф. ИЭБ АН Арм ССР, Ереван, с.97, 1970. ⁶ O.N.Inoue, J. Biol. Chem., v.243, p.5813 (1973). ⁷ U.K.Laemmli, Nature, v.227, p.680-685 (1970). ⁸ А.З.Песпоян, Автореф. дис., Ереван, 1990. ⁹ А.М.Седракан, Г.А.Мнацаканян, А.С.Калачян и др., ДАН Армении, т.94, №1, с.49-51 (1993). ¹⁰ В.А.Закарян, В.Г.Карапетян, Г.Г.Бадалян и др., Биофизика, т.31, с.37-42 (1986).