

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 579.842.14:579.252.5:577.112.108

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

Роль мембран в повышенной устойчивости плазмидного штамма  
*Salmonella derby* к стрептомицину

(Представлено 17/VI 1996)

Природный условно-патогенный штамм *S. derby* К89 характеризуется повышенной устойчивостью к стрептомицину (8000 мкг/мл) (1). Механизмы резистентности, детерминированной R-фактором рСК101, недостаточно выяснены.

Ранее проведенные исследования не подтвердили хромосомальный механизм устойчивости к Sm, связанный с модификацией белковых субъединиц рибосом (2), так как бесплазмидные изогенные штаммы *S. derby* (как спонтанные, так и полученные элиминацией плазмиды) чувствительны к антибиотику (1).

Известно, что плазмидные механизмы устойчивости к аминогликозидным антибиотикам связаны с ферментативной инактивацией их молекул. Возможно и снижение проницаемости клеточной оболочки бактерий к Sm, опосредованное плазмидой (2).

Ранее проведенные исследования клеток *S. derby* не обнаружили энзимологических активностей, катализирующих инактивацию Sm путем фосфорилирования или аденилирования молекул антибиотиков. Было показано отсутствие как конститутивных, так и индуцибельных стрептомициниактивирующих ферментов в плазмидном штамме *S. derby* К89.

Анализ совокупности полученных данных позволил предположить, что плазмидная детерминанта опосредует устойчивость *S. derby* к Sm за счет изменения проницаемости клеточной оболочки для молекул антибиотика (1).

Проникая в бактериальную клетку, молекулы антибиотика должны преодолеть барьеры как внешней мембраны, так и цитоплазматической. Снижение проницаемости внешней мембраны к Sm

должно быть обусловлено отсутствием либо нефункциональным состоянием пор, формируемых OmpF, OmpC и OmpD пориновыми белками, которые являются преобладающими по содержанию компонентами внешней мембраны сальмонелл (2).

Накопленные данные предопределили интерес к исследованию преобладающих белковых компонентов мембран *S. derby*, влияния R-фактора pGK101 на их качественный состав и количественное содержание для выявления роли внешней мембраны в формировании устойчивости *S. derby* к Sm.

В работе использованы условно-патогенный штамм *S. derby* K89, содержащий R-фактор pGK101, и его бесплазмидный вариант *S. derby* K82.

Разделение SDS-электрофорезом в 10% ПААГ (3) белков мембран, выделенных из клеток по методу Инойе (4), выявило белковые профили мембран *S. derby*. В области полипептидов, соответствующих по электрофоретической подвижности пориновым белкам сальмонелл (5), белковый профиль плазмидного штамма *S. derby* K89 содержит полипептиды №31-33, высокие концентрации которых позволяют отнести их к преобладающим компонентам мембраны (таблица). Суммарное содержание перечисленных белков составляет примерно 14% от общего количества мембранных белков плазмидного штамма.

Концентрации мембранных белков *S. derby*

$R_f$ относительная миграция белков в 10% ПААГ	<i>S. derby</i> K89		<i>S. derby</i> K82	
	№ пика	концентрация	№ пика	концентрация
0,872	31	1,46	17	0,81
0,881	332	0,53	18	0,4
0,89	33	0,59	19	0,36
% от общего количества мембранных белков		14,0		10,0

Посев плазмидного штамма *S. derby* K89 на полноценную питательную среду, содержащую 3% SDS, направленный на выявление OmpF<sup>-</sup>OmpC<sup>-</sup> фенотипа (6), не отразился на росте клеток, что подтвердило наличие и функциональную активность порообразующих белков внешней мембраны.

Полученные данные согласуются с отсутствием недостаточности плазмидных клеток *S. derby* K89 по транспорту метаболитов, что отражается в скорости роста плазмидных клеток в полноценной и минимальной средах (7).

В мембранах бесплазмидного штамма *S. derby* K82 наблюдается некоторое понижение концентраций белков №17-19 (таблица), соответствующих по электрофоретической подвижности в геле белкам №31-33 плазмидного штамма. Суммарное их содержание составляет примерно 10% от общего количества мембранных белков *S. derby* K82. Тем не менее, клеточная оболочка бесплазмидного штамма проницаема для молекул Sm, так как его клетки не способны расти на полноценной питательной среде при концентрации антибиотика 200 мкг/мл (1).

На основании перечисленного можно предположить, что наружная мембрана плазмидных клеток *S. derby* не препятствует проникновению молекул антибиотиков в периплазматическое пространство. Барьерную функцию, снижающую проникновение Sm в клетки *S. derby*, выполняет, по-видимому, цитоплазматическая мембрана.

Преодоление стрептомицином цитоплазматической мембраны — процесс энергозависимый, который может быть нарушен в результате: блокировки биосинтеза гема, снижения содержания липофильных хинонов в цитоплазматической мембране, недостаточности штаммов по компонентам дыхательной цепи (2).

Институт молекулярной биологии НАН Армении

Ա. Մ. ՍԵՂՐԱՎՅԱՆ, Ժ. Ա. ԿՇՈՅԱՆ, Ն. Ն. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Կ. Ա. ԱՌԱԿԵԼՈՎԱ.

Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս Կ. Գ. ՂԱՐԱԳՅՈՉՅԱՆ

**Թաղանթների դերը *Salmonella derby* պլազմիդակիր շտամի ստրեպտոմիցինի նկատմամբ բարձր կայունության ձևավորման մեջ**

SDS-էլեկտրաֆորետիկ բաժանումով 10% պոլիակրիլամիդային հելի մեջ ուսումնասիրվել են պլազմիդ պարունակող *S. derby* K89 և նրանց պլազմիդազուրկ ածանցյալ ստրեպտոմիցինի նկատմամբ զգայուն *S. derby* K82 բջիջների թաղանթների սպիտակուցները: Գերակշռող սպիտակուցային բաղադրիչների որոկական սպեկտրը և քանակութունները, ինչպես նաև պլազմիդակիր բջիջների 3% SDS պարունակող միջավայրում աճելու հատկությունը վկայում են արտաքին թաղանթում Օտր սպիտակուցների առկայության և գործող վիճակի մասին: Ենթադրվում է, որ pGK101 R-գործոնով որոշվող *S. derby* բջիջների բարձր կայունությունը ստրեպտոմիցինի նկատմամբ (8000 մկգ/մլ) ներքին թաղանթի թափանցելիության իջեցման հետևանք է:

## ЛИТЕРАТУРА - ՓՐԱՇԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- <sup>1</sup> *Ж.А.Кцоян, А.С.Тайсова, Н.Н.Саркисян и др.*, Антибиотики и химиотерапия, т.33, №10, с.760-767 (1988). <sup>2</sup> *Ю.В.Сазыкин, П.С.Навашин*, Итоги науки и техники, ВИНТИ. Сер. биотехнология, т.31, с.1-187 (1991). <sup>3</sup> *U.K.Laemmli*, Nature, v.227, p.680-685 (1970). <sup>4</sup> *O.N.Inouye*, Membranes and Transport, A.N., N.Plenum Press, v.1, p.289-298 (1982). <sup>5</sup> *S.M.Hammond*, in: The Bacterial Cell Surface. Croom Helm., London Sydney, 1984. <sup>6</sup> *B.Lugtenberg*, FEBS Letter, v.96, №1, p.99-105 (1978). <sup>7</sup> *А.З.Пепоян, Г.Г.Бадалян, Ж.А.Кцоян и др.*, ДНАН РА, т.91, №5, с.219-226 (1990).