

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.352.335:579.842.14

М. А. Балаян, А. З. Пепоян, Г. Г. Бадалян,
академик НАН Армении К. Г. Карагезян

**Структурная организация мембран радиорезистентных
и радиочувствительных клеток *Salmonella derby***

(Представлено 27/V 1997)

Важность генетических структур в радиационном поражении живых организмов экспериментально и теоретически обоснована в рамках принципа "попадания" и теории "мишени". Радиационная мембранология не имеет аналогичной теории, которая являлась бы логическим обобщением представленной классической радиобиологии.

Целью настоящей работы является рентгенографическое изучение мембранных структур радиорезистентных и радиочувствительных клеток *Salmonella derby*.

В работе использованы условно-патогенный штамм *S derby* K89, его бесплазмидный вариант *S derby* K82, радиочувствительный плазмидный мутант K134 и его бесплазмидный вариант *S derby* K95.

В качестве основного экспериментального метода для изучения структуры мембранных суспензий служил метод дифракции рентгеновских лучей. Выделение мембран из клеток проводилось известным способом ⁽¹⁾ с соответствующей обработкой ⁽²⁾. Мембранную суспензию соответствующей концентрации вводили в капилляр или ячейку типа "сэндвич" и оставляли в герметически закрытом виде при комнатной температуре ($t=25^{\circ}\text{C}$).

Съемки проводили на рентгеновских аппаратах УРС-60, УРС-2 с модифицированными камерами типа КРОН, РКСО, предназначенными для исследования малоуглового рассеяния и дающими возможность проводить съемки на плоской пленке с расстоянием образец-пленка 100 и 150 мм. В исследовании были использованы рентгеновские трубки БСВ-23, БСВ-24В, дающие излучение в области длины волны 1.54Å с напряжением на аноде 40 кВ при его токе 20 мА и временем экспозиции 10-14 ч. Образец готовили с использованием кварцевых тонкостенных капилляров (производства ФРГ) с толщиной стенок 0.01 мм и диаметром 0.4-1.0 мм.

Межплоскостное расстояние малоугловых рефлексов, соответствующее расстоянию между регулярно чередующимися в пространстве мембранами, можно представить в виде

$$d = d_m + d_w, \quad (1)$$

где d_m и d_w — толщина мембран и межмембранного водного слоя.

Для суждения о зависимости межплоскостного расстояния от концентрации фосфолипида (C_m) и воды (C_w) для системы фосфолипид-вода использовали формулу Лузати (3)

$$d = d_0 (1 + \rho_m C_w / \rho_w C_m), \quad (2)$$

где ρ_m и ρ_w — плотность мембраны и воды.

Из уравнения (2) видно, что d в случае системы фосфолипид-вода прямо пропорционально C_w/C_m и что по наклону зависимости d от C_w/C_m можно определить отношение ρ_m/ρ_w .

Экспериментальное d определяется из условия

$$\lg 2\theta = l/D, \quad (3)$$

где l — диаметр рефлекса на рентгенограмме, D — расстояние образец-пленка, θ — угол дифракции.

Вычисляя из уравнения (3) угол дифракции и используя условие Брегга $2d \sin \theta = \lambda$, где λ — длина волны рентгеновского излучения (в данном случае $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), определяем d .

С целью выяснения закономерностей изменения межплоскостных расстояний (d) малоугловых рефлексов и определения характеристик мембран и межмембранных расстояний для наиболее выраженных рефлексов были получены зависимости d от отношения концентрации воды и мембран C_w/C_m (в гр./гр.) (таблица). Как видно из таблицы, с увеличением концентрации воды в этой системе (3) имеется нелинейный рост с достижением насыщения.

Согласно выражению (1), полученную зависимость можно объяснить следующим образом: по мере увеличения количества воды она накапливается в межмембранном пространстве, приводя к увеличению расстояния между мембранами, и полученная при этом кривая является линейной.

Согласно (4), нелинейный характер полученной зависимости может быть обусловлен высокой гидрофобностью мембран, вызывающей возникновение водной фазы вне регулярной системы мембрана-вода. При этом вода при концентрациях, превышающих определенный уровень, уже не проникает в межмембранное пространство, и поэтому уравнение (2) оказывается характерным только для гидрофильных мембран. В этом случае при увеличении концентрации воды она полностью накапливается в межмембранном пространстве, приводя к линейному росту межмембранного расстояния.

Зависимость межплоскостного расстояния d малоугловых рефлексов жидкокристаллической суспензии мембран *Salmonella derby* от C_0/C_*

Штаммы	C_0/C_*				
	0.818	1.222	1.857	3	5.667
<i>S. derby</i> K89, дикий	20,1686±0,01	20,9708±0,09	21,976±0,1	22,0627±0,05	23,9627±0,11
<i>S. derby</i> K134, радиочувствительный мутант	23,81±0,02	23,236±0,02	23,02±0,02	22,551±0,05	22,2186±0,04
<i>S. derby</i> K82, бесплазмидный радиоустойчивый	19,5194±0,01	20,4552±0,1	21,3162±0,01	21,4375±0,01	21,5014±0,02
<i>S. derby</i> K95, бесплазмидный радиоустойчивый	19,845±0,03	20,545±0,11	21,18±0,01	21,402±0,022	21,482±0,01

Исходя из этого, можно полагать, что предел насыщения $d-C_0/C_*$ в определенной мере характеризует наличие межмембранного гидрофобного взаимодействия. Результаты экспериментов свидетельствуют о сходстве гидрофобности мембран диких клеток *S. derby* K89 и их радиочувствительных мутантов *S. derby* K134, в то время как мембраны радиорезистентных бесплазмидных штаммов более гидрофобны.

Для выяснения структуры мембран была исследована дифракция рентгеновских лучей под большими углами.

Известно, что изменение вязкости мембранных липидов влияет на радиационное поражение организмов и рефлекс с межплоскостным расстоянием 4,3 Å характеризует состояние углеводородных цепочек молекул фосфолипидов в мембране (4). Отсутствие дифракции при 4,3 Å указывает на аморфное состояние, отсутствие окружности — на взаимное параллельное эквидистантное расположение молекул фосфолипида в мембране.

На рентгенограммах диких клеток *S. derby* и их радиорезистентных вариантов отмечается отсутствие рефлексов при 4,3 Å, в то время как на рентгенограммах радиочувствительных мутантных клеток *S. derby* K134 они хорошо проявляются.

Ранее нами был исследован качественный и количественный состав фосфолипидов (ФЛ) и их жирных кислот (ЖК) радиочувствительных и радиорезистентных клеток *S. derby*. Несмотря на более упорядоченное состояние внутримембранной организации радиочувствительных мутантов *S. derby* K134, нами было установлено отсутствие заметных отклонений в процентных соотношениях между насыщенными и ненасыщенными ЖК (включая и изоформы ЖК) в составе ФЛ клеток *S. derby* в зависимости от радиочувствительности.

По всей вероятности, на внутримембранную организацию радиочувствительных клеток влияют мембранные белки. В связи с этим у клеток *S. derby* K134 интерес представляют механизмы интенсификации синтеза Опр белков. Не исключено нарушение осмочувствительности регуляции синтеза пориновых белков, что может произойти как вследствие дефективности клеток по *EnvZ* белку, так и в результате мутаций в промоторном участке генов *ompF* и *ompC*.

Допустимо также участие мембранных белков *S. derby* K134 в поддержании внутримембранной организации этих клеток и в определении их радиочувствительности.

В случаях мембран плазмидных клеток *S. derby*, в отличие от бесплазмидных клеток, при больших углах дифракции возникают два четко выраженных рефлекса при 8 и 11 Å, имеющих форму окружности.

Межплоскостные расстояния обнаруженных рефлексов по своей величине совпадают с длиной полярных групп фосфатидилэтаноламинов – 8 Å и фосфатидилхолинов – 11 Å. По всей вероятности, наличие более интенсивного рефлекса 11 Å на рентгенограммах *S. derby* K89 и *S. derby* K134 связано с высоким содержанием ФХ в мембранах плазмидных клеток (6).

Таким образом, результаты экспериментов свидетельствуют об одинаковой степени гидрофобности мембран плазмидосодержащих радиорезистентных и радиочувствительных клеток *S. derby*. Обнаружено отличие этих клеток по внутримембранной организации клеточных стенок. Описанные сдвиги могут влиять на радиочувствительность клеток и являются результатом имеющих место физико-химических и генетических изменений в клетках *S. derby*.

Институт молекулярной биологии НАН Армении

Մ. Ա. ԲԱԼԱՅԱՆ, Ա. Չ. ՓԵՓՈՅԱՆ, Հ. Գ. ԲԱԿԱԼՅԱՆ,
Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս Կ. Գ. ՂԱՐԱԳՅՈՉՅԱՆ

***Salmonella derby* ռադիոկայուն և ռադիոզգայուն բջիջների թաղանթային կառուցվածքակազմակերպվածությունը**

Կատարվել է *S. derby* ռադիոկայուն և ռադիոզգայուն բակտերիայի շտամների թաղանթային սուպերհիանների ռենտգենոգրաֆիկ ուսումնասիրություն ռենտգենյան ճառագայթների մեծ և փոքր անկյունների տակ դիֆրակցիայի դեպքում: Պարզվել է, որ պլազմիդային *S. derby* շտամներից ստացված ռենտգենոգրամներում առկա են 8Å և 11Å ռեֆլեքսներ, որոնք համապատասխանում են ֆոսֆատիլիլթիանոլամինների և ֆոսֆատիլիլթոլինների լիցքավորված գլխիկների մեծությունը: Ռադիոզգայուն պլազմիդային *S. derby* շտամների թաղանթային կառուցվածքներից ստացված 4.5Å ռեֆլեքսը վկայում է այդ բակտերիաներում ճարպաթթուների առավել կարգավորված վիճակի մասին: Նզուկացվում է, որ *S. derby* բակտերիայի բջիջների թաղանթային առանձնահատկությունները կարող են բջիջների ռադիոկայունության փոփոխման հիմք հանդիսանալ:

ЛИТЕРАТУРА – ՓՐԱՇԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ O.M. Inoue, Biol. Chem., v.245, p.5813 (1973). ² В.А. Закарян, В.Г. Карапетян, Г.Г. Бадалян и др., Биофизика, т.31, с.37-42 (1986). ³ V.Luzzati, F.Husson, Cell. Biol., v.12, p.207 (1962). ⁴ В.Г. Ивков, В.Н. Берестовский, Динамическая структура липидного бислоя, М., Наука, 1981. ⁵ А.З. Пепоян и др., Радиобиология (1995). ⁶ А.З. Пепоян и др., Биохимия, т.58, с.1881-1885 (1993).