

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.21:576.31548.73

А. З. Пепоян

Структурная организация мембран клеток *Salmonella derby*

(Представлено академиком К. Г. Карагезяном 2/IV 2000)

Электронно-микроскопические исследования клеток плазмидосодержащего и бесплазмидного штамма *S. derby* выявили существенное различие в морфологии и ультраструктуре клеток в зависимости от наличия в них *R*-плазмиды. Бесплазмидные клетки резко отличаются как по форме и размерам, так и по строению клеточной стенки — она несколько толще и более извилиста с фимбриями. Эти исследования позволили выявить роль *R*-плазмиды в формировании клеток *S. derby* [1, 2]. С другой стороны, из литературы известно также, что *R*-плазмиды могут регулировать синтез компонентов мембран бактериальных клеток [3, 4]. Электронно-микроскопический метод позволяет выявить геометрические параметры клеточной оболочки, однако при этом структура и физико-химические характеристики остаются невыясненными. Именно это и побудило провести рентгенографический анализ водных суспензий мембран клеток *S. derby* в жидкокристаллической фазе. В работе использованы условно-патогенный штамм *S. derby* K89, несущий *R*-плазмиду, и его бесплазмидный вариант *S. derby* K82.

Выделение мембран из клеток *S. derby* проводилось по методу Айноэ [5]. В качестве основного экспериментального метода для изучения структуры мембранных суспензий был взят метод дифракции рентгеновских лучей. Образцы были изготовлены и исследованы по методу, описанному в работе [6].

Дифракционные картины водных суспензий клеточных мембран по своему характеру совпадают с дифрактограммами жидкокристаллической ламеллярной фазы систем фосфолипид-вода [6-8]. При этом межплоскостное расстояние, рассчитанное по малоугловым рефлексам и соответствующее расстоянию между регулярно-чередующимися в пространстве мембранами, можно представить как

$$d = d_M + d_B, \quad (1)$$

где d_M и d_B — толщины мембраны и межмембранного водного слоя.

Для зависимости межплоскостного расстояния от концентрации фосфолипида (C_M) и воды (C_B) для системы фосфолипид (мембрана) - вода использовали формулу Лузати [7]

$$d = d_M (1 + \rho_M C_B / \rho_B C_M), \quad (2)$$

где ρ_M и ρ_B плотности мембраны и воды.

Из уравнения (2) видно, что d в случае системы фосфолипид – вода прямо пропорциональна C_B/C_M и что по наклону зависимости d от C_B/C_M можно определить отношение ρ_M/ρ_B .

Для экспериментального определения d воспользуемся условием

$$\operatorname{tg} 2\theta = 1/D. \quad (3)$$

В формулу (3) входят радиус рентгенограммы 1, угол дифракции θ и расстояние от пленки до образца D . d измерялась в E . При измерении с помощью измерителя ИЗА-2 мы были вынуждены использовать не радиус, а диаметр рентгенограммы, и делить не на D , а на $2D$, что и послужило причиной неточности при интерпретации хода измерения.

Определяя из (3) угол дифракции и пользуясь условием Брэгга для дифракции $2\sin\theta = \lambda$, определяем d (λ – длина волны рентгеновского излучения, в данном случае $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$).

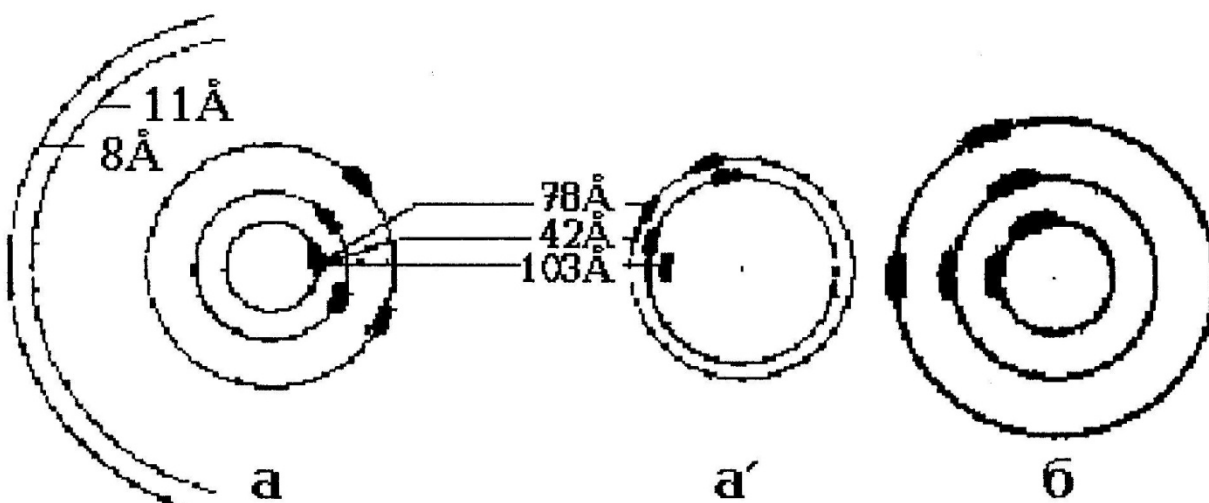


Рис. 1. Лауэграммы: а – плазмидосодержащих штаммов S. derby (а' – масштаб 2.5:1); б – бесплазмидных штаммов S. derby.

На рис. 1 схематически представлены лауэграммы, рефлексy под большими и малыми углами 15%-ной водной суспензии клеточных стенок, полученные для водных суспензий мембран плазмидосодержащих и бесплазмидных клеток S. derby.

Появление рефлексов под малыми углами указывает на возникновение системы с регулярно чередующимися мембранами с водными прослойками, как это представлено на рис. 1. Сравнивая малоугловые рефлексy для мембран плазмидных и бесплазмидных клеток S. derby, можно сделать следующие выводы. Три круговых рефлексy, возникающих под малыми углами, не являются кратным отражением основного рефлексy, что указывает на наличие трех типов структур с разными межплоскостными расстояниями. При этом указанные рефлексy в случае

бесплазмидного штамма *S. derby* менее четкие и размытые по сравнению с плазмидосодержащим штаммом. На округлых рефлексах выделяются сгустки, что свидетельствует о наличии ориентированных в пространстве участков с несколько большими межплоскостными расстояниями. Расчеты показали, что в 15%-ной водной суспензии мембран плазмидосодержащих и бесплазмидных клеток имеются структуры с межплоскостными расстояниями d соответственно 42, 78, 103 и 44, 92, 136 Å.

Учитывая, что толщина природных мембран при предельной гидратации составляет порядка 49-51 Å [9], а в состав клеточных стенок грамотрицательных бактерий входят клеточная оболочка, состоящая из наружной мембраны и пептидогликанового слоя, и плазматическая мембрана, а также учитывая соотношение (1), можно полагать, что причиной возникновения трех различных рефлексов вероятнее всего является образование структур из мембран и клеточных плазмидных клеток, имеющих разную толщину и гидратацию. Причиной размытости малоугловых рефлексов могут стать белки в периплазматическом пространстве мембран, данных о которых в литературе не имеется.

Из полученных результатов следует, что межплоскостные расстояния малоугловых рефлексов для мембран плазмидосодержащих клеток несколько меньше по сравнению с мембранами бесплазмидных клеток. Вероятно, это связано с обнаруженным при помощи электронной микроскопии фактом, что отсутствие *R*-плазмиды приводит к утолщению стенки бактериальных клеток *S. derby* [1].

Для 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 концентраций воды и мембран C_B/C_M (рис. 2). Как видно из рисунка, с увеличением концентрации воды, подобно системе фосфолипид - вода [7], имеется нелинейный рост d с достижением насыщения. По мере увеличения количества воды имеет место ее накопление в межмембранном пространстве, что приводит к увеличению расстояния между мембранами. При этом полученная кривая не является линейной и, следовательно, не подчиняется уравнению (2).

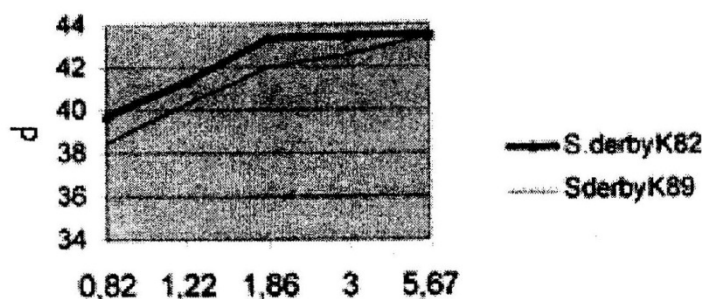


Рис. 2. Зависимость межплоскостного расстояния (d) малоугловых рефлексов жидкокристаллической суспензии мембран от C_B/C_M .

Согласно [8], нелинейный характер полученной зависимости может быть обусловлен высокой гидрофобностью мембран, вызывающей возникновение отдельной водной фазы вне

регулярной системы мембрана - вода. При этом выше определенной концентрации вода уже не проникает в межмембранное пространство. Уравнение (2) выполняется для гидрофильных мембран. В этом случае при увеличении концентрации воды она полностью накапливается в межмембранном пространстве, приводя к линейному росту межмембранного расстояния.

Исходя из этого можно полагать, что предел насыщения кривой $d - C_B/C_M$ в определенной мере характеризует наличие межмембранного гидрофобного взаимодействия. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что мембраны плазмидосодержащих и бесплазмидных клеток *S. derby* отличаются друг от друга как по толщине мембран и клеточных оболочек, так и по гидрофобности. При этом в случае плазмидных клеток межмембранные расстояния значительно меньше, чем в случае клеток, не содержащих плазмид.

Известно, что внутримембранная упорядоченность в значительной степени определяется их липидным составом. Нами было установлено, что качественный и количественный состав фосфолипидов и жирных кислот фосфолипидов [9, 10], перекисеобразование липидов и состояние антиокислительной системы [9] в клетках *S. derby* должны влиять на формирование “жидкого” состояния мембран клеток *S. derby* (особенно у бесплазмидного штамма), что должно влиять на дифракцию рентгеновских лучей под большими углами. Для выяснения структуры отдельных мембран была исследована дифракция рентгеновских лучей под большими углами тех же систем.

Из литературы известно, что рефлекс с межплоскостным расстоянием $4.3 \text{ \AA}$ характеризует состояние углеводных цепочек молекул фосфолипида в мембране [7]. Отсутствие дифракции при $4.3 \text{ \AA}$ указывает на жидкое состояние мембраны, наличие гало — на аморфное состояние, а окружности — на взаимное параллельное эквидистантное расположение молекул фосфолипида в мембране.

Как нами предполагалось, на рентгенограммах рефлексы при $4.3 \text{ \AA}$ отсутствуют (рис. 2), что указывает на то, что в мембранах обоих типов клеток *S. derby* фосфолипиды находятся в жидком состоянии. Однако при этом в случае мембран плазмидосодержащих клеток при 8 и $11 \text{ \AA}$ возникают два четко выраженных рефлекса, имеющих форму окружности. Для мембран бесплазмидных клеток указанные рефлексы отсутствуют. По величине межплоскостные расстояния обнаруженных рефлексов совпадают с длиной полярных групп молекул фосфатидилэтаноламина (ФЭ) — $8 \text{ \AA}$ и фосфатидилхолина (ФХ) — $11 \text{ \AA}$.

Ранее нами было показано [10], что, действительно, основными фосфолипидными компонентами мембран клеток *S. derby* являются ФХ и ФЭ и что отсутствие *R*-плазмиды в *S. derby* приводит к резкому уменьшению количественного содержания фосфолипидов, в частности ФХ и ФЭ. По всей вероятности, наличие более интенсивного рефлекса $11 \text{ \AA}$ на рентгенограмме связано с большим содержанием ФХ в мембранах плазмидного штамма *S. derby*. Таким образом, можно полагать, что в случае плазмидосодержащих клеток *S. derby* имеем дело с эквидистантным расположением полярных групп молекул ФЭ и ФХ на поверхности мембран, что может стать причиной возникновения рефлексов 8 и $11 \text{ \AA}$ в суспензии мембран плазмидосодержащих клеток *S. derby*.

Интересно сравнить результаты рентгенографических исследований с данными по изучению влияния *pH* окружающей среды на рост и размножение плазмидных и бесплазмидных

клеток. Установлено, что фаза роста для клеток *S. derby* соответствует $pH_{\text{опт.}} = 7,0 - 7,5$. После перехода клеток в стационарную фазу роста наблюдается изменение интенсивности роста в зависимости от pH среды со сдвигом в кислую сторону (максимум роста для ночной бесплазмидной культуры наблюдается при $pH = 6,5$, а для плазмидных клеток — при $pH = 5,02$). При росте клеток наблюдается четкий сдвиг pH среды из кислой в нейтральную, однако у бесплазмидных клеток этот переход незначительный и медленный, что указывает на замедленный метаболизм бесплазмидных клеток.

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

pH среды	2.5	7.0	10.9
d суммарное, Å	43.95	42.40	53.07

Таким образом, при нейтральных pH наблюдается ускоренный рост плазмидных клеток, имеющих более упорядоченную внутреннюю структуру мембран. Как явствует из экспериментов, направленность влияния pH окружающей среды в обоих типах клеток *S. derby* одинакова. При этом нарушение метаболизма, наблюдаемое для бесплазмидных клеток, коррелируется с неупорядоченной структурой мембран.

С другой стороны, как, было указано выше (см. также [6]), увеличение гидрофильности молекул фосфолипида или мембран должно приводить к увеличению взаимодействия мембран с водой, что в конечном счете приведет к увеличению количества молекул воды в межмембранном пространстве, вызывая увеличение межплоскостного расстояния малоугловых рефлексов. Действительно, 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 зависимости (1) и рис. 1 непосредственно указывает на увеличение межмембранной водной плоскости. Таким образом, обнаружена корреляция между наличием *R*-плазмиды и структурой мембран клеток *S. derby*.

На основании приведенных данных можно предположить, что причиной полученных закономерностей вероятнее всего являются гидрофильно-гидрофобные взаимодействия молекул фосфолипидов в мембранах.

Salmonella derby բջիջների թաղանթների կազմակերպվածությունը

Պլազմիդակիր և ոչ պլազմիդակիր *Salmonella derby* բջիջների թաղանթներն ուսումնասիրվել են ռենտգենյան ճառագայթների դիֆրակցիայի միջոցով՝ մեծ և փոքր անկյունների տակ: Պլազմիդակիր *Salmonella derby* բջիջների մոտ ռենդգենյան ճառագայթների դիֆրակցիայի մեծ անկյունների տակ՝ $8 \text{ \AA}$ և $11 \text{ \AA}$, նկատվել են ռեֆլեքսներ, որոնք վկայում են, որ այս բջիջների թաղանթները գտնվում են ավելի կարգավորված վիճակում, քան ոչ պլազմիդակիր *Salmonella derby* բջիջների թաղանթները: Ենթադրվում է, որ ռեֆլեքսները պայմանավորվում են թաղանթների մակերևույթների վրայի ֆոսֆոլիպիդների կլաստերային դասավորվածությամբ:

Литература

1. Кцоян Ж. А., Константинова Н. Д., Саркисян Н. Н., Чернов В. И. - ДАН АрмССР. Т. 89. № 5. С. 216-219.
2. Кцоян Ж. А., Саркисян Н. Н., Чернов В. И., Минасян А. С. - ДАН АрмССР. 1989. Т. 88. № 1. С. 26-29.
3. Богословская О. А., Бурлакова Е. Б., Глушенко Н. Н., Конюхов В. Ф., Лихарад Л. Я. - В сб.: Метаболические плазмиды бактерий. М. 1982. С. 33-38.
4. Лихачева Н. А., Малчанова Е. С., Ким А. А., Ильяшенко Б. Н. - Мол. ген. микроб, вирус. 1983. Т. 1. С. 15-18.
5. In: Membrane and Transport / Inoye O. M. N. York Plenum Press. 1982. V. 1. P. 289-298.
6. Шагинян А. А., Бадалян Г. Г., Минасянц М. Х. - Изв. АН АрмССР. Физика. 1989. Т. 23. С. 72-77.
7. Luzzati V., Huzzon F. - Cell Biol. 1962. V. 12. P. 207.
8. Luzzati V. - Biological Membranes (Ed. D. Chapman) London Acad. Press. 1965. P. 71.
9. Шагинян А. А., Шагинян Ар. Ар. - Кристаллография. 1990. Т. 35. С. 1511.
10. Пепоян А. З., Овсепян Л. М. и др. - Биохимия. 1993. Т. 58. С. 1880-1885.
11. Пепоян А. З., Арутюнян А. А., Кцоян Ж. А., Карагезян К. Г. - ДАН Армении. 1992. Т. 93. С. 227-230.