

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕНГМЮРОВСКИХ МОНОСЛОЕВ ФОСФОЛИПИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ *E. COLI* K-12 Зубова К.В., Кузнецова В.А., Аль-Альвани А.Ж., Глинская Е.В., Каневский М.В., Глуховской Е.Г.

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского
ул. Астраханская, 83, г. Саратов, 410012, РФ; e-mail: zubovaksushechka@mail.ru
Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. В работе представлены исследования ленгмюровских монослоев нативных фосфолипидов, выделенных из клеточных мембран тест-культуры *E.coli* K-12. В составе липида А бактерий *E. coli* K-12 обнаружены шесть метиловых эфиров жирных кислот: метил гексадеканонат, метил транс-9-октадеканонат, метил цис-9-гексадеценонат, метил цис-9,10-метиленгексадеканонат, метил октадеканонат и метил тетрадеканонат. Для формирования монослоя готовили рабочий раствор нативных фосфолипидов в хлороформе с концентрацией $C=10^{-4}$ М. Для исследования влияния объема аликвоты рабочего раствора на формирование монослоя фосфолипиды вносили на поверхность воды в количествах $V=50, 100$ и 150 мкл. Монослои исследовали методом изотерм сжатия, анализ которых показал наличие как минимум трех устойчивых плотно упакованных состояний с высокой механической прочностью.

Ключевые слова: нативные фосфолипиды, ленгмюровские монослои, устойчивые состояния.

Фосфолипиды являются важнейшими структурными компонентами клеточной стенки бактерий, участвуют в адаптации микроорганизмов к среде обитания, обладают биологической активностью и могут выступать в качестве биомаркеров на изменение окружающей среды и одним из компонентов экологического мониторинга [1].

Известно, что строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий сложнее, чем грамположительных, она состоит из наружной и внутренней (цитоплазматической) мембран, а также периплазмы, состоящей из пептидогликана. Большая часть наружной мембраны представлена двойным слоем липидов, основным компонентом которых являются фосфолипиды. Бимолекулярная природа и амфипатический характер позволяют клеточным мембранам формировать двухслойную структуру, защищающую бактерии от влияния негативных факторов, но не препятствующую поступлению необходимых для роста питательных веществ [2].

Несмотря на значительное разнообразие в клетках прокариот фосфолипидных структур, большинство из них являются глицеролипидами, содержащими две цепи жирных кислот. Типичные молекулы фосфолипидов состоят из обращенной наружу отрицательно заряженной гидрофильной фосфатной головной группы, присоединенной к глицерину, и двух гидрофобных ацильных цепочек-хвостов – неполярных жирных кислот, обращенных внутрь клетки. Подобное расположение амфипатических фосфолипидов обеспечивает образование плотной физико-химической мембранной структуры, непроницаемой для водорастворимых веществ внеклеточной среды и требуемой для концентрации необходимых для жизнедеятельности молекул в цитоплазме. Кроме того, длина цепи и степень насыщенности жирных кислот, входящих в структуру фосфолипидов, модулируют толщину и текучесть биомембран [3].

Синтезируемый бактериями спектр фосфолипидов представлен фосфатидилэтанололамином, фосфатидилглицерином, дифосфатидилглицерином, отличающимися количеством и длиной ацильных цепей, числом, положением и геометрией ненасыщенных связей, а также структурой, полярностью и зарядом головных частей. Кроме основных групп, бактерии синтезируют дополнительные, менее распространенные фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол [4].

Целью настоящей работы являлось выделение и характеристика нативных фосфолипидов клеточных мембран бактерий *E.coli* K-12 с использованием метода ленгмюровских монослоев.

Работа выполнена на базе кафедры микробиологии и физиологии растений биологического факультета, лаборатории пленочных наноструктурированных материалов ОНИ наноструктур и биосистем Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского, лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН.

В исследовании использовали стандартную тест-культуру *E. coli* K-12. Бактерии культивировали в стерильном режиме на термостатируемой качалке IS-OS 20 (Phoenix Instrument, Германия) в колбах с жидкой средой Лэнди (в расчете на 100 мл среды: глюкоза 3 г, глутамат натрия 0,5 г, сульфат магния 0,05 г, дигидрофосфат калия 0,1 г, сульфат марганца 0,5 г, хлорид калия 0,05 г, сульфат железа 0,015 г, сульфат меди 0,016 г, дрожжевой экстракт 0,1 г, pH = 7-7,2) при температуре 37 °C в течение 24 ч. Далее клетки центрифугировали при 10000 g в течении 30 минут на центрифуге Eppendorf 5804 g (Германия). К полученным 2 г образцам биомассы добавляли 3 мл смеси хлороформа и метанола в соотношении 1:2. Далее образец выдерживали на холоду в течение 1 часа, периодически помешивая. Повторно центрифугировали в течение 5 минут при 10000 g, добавляли в образец смесь хлороформа и метанола (1:2). Далее образец подвергали ультразвуковой обработке в течение 15 минут. В качестве источника ультразвука использовали УЗ излучатель

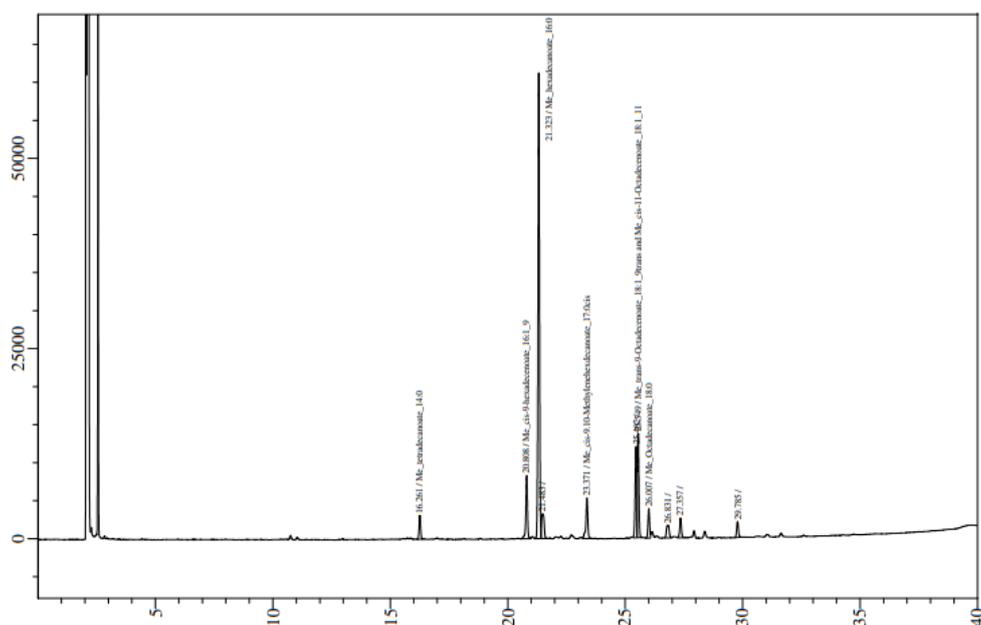


Рисунок 1. Результаты МЭЖК

Dinatron 125 (Dinatronics, США). Частота УЗ - 1 МГц, плотность мощности – 1,5 Вт/см² в непрерывном режиме. После центрифугирования (10000 g, 5 мин) к супернатанту добавляли смесь воды и хлороформа в соотношении 1:1, центрифугировали 15 минут при 6000 g. Отбирали нижний слой фосфолипидов. Экстракцию и отбор фосфолипидов проводили повторно три раза. С помощью методики определения общего фосфора по Беренблему и Чейну [5] установили, что концентрация фосфора в 100 мкл образца составляет 53,1 мкг/мл.

Определение состава и соотношения жирных кислот липида А осуществляли методом ГЖХ метиловых эфиров ЖК (МЭЖК). Метилирование жирных кислот липида А выполняли согласно методике, описанной в работе Mayer et al. [6]. Идентификацию жирных кислот липида А проводили по эталонным образцам фирмы Sigma (США) в процентах от суммы всех МЭЖК. Программирование температурного режима осуществляли в интервале от 130 до 250 °С со скоростью нагрева 4 °С/мин. Температура испарителя – 250 °С, температура детектора – 270 °С, скорость газа-носителя (He) 1,3 см³/мин; сброс 1:50.

Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) выполняли на газовом хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабженном капиллярными колонками DB-5 (Hewlett-Packard, США) и EQUITY-1 (Supelco, США) (рис. 1, табл. 1).

Результаты показали, что в составе липида А бактерий *E. coli* K-12 обнаружены шесть метиловых эфиров жирных кислот: метил гексадеканоеат, метил транс-9-октадеканоеат, метил цис-9-гексадеценоеат, метил цис-9,10-метиленгексадеканоеат, метил октадеканоеат и метил тетрадеканоеат. Более 60 % от общего объема всех эфиров жирных кислот составляет метил гексадеканоеат.

Для формирования монослоя готовили рабочий раствор нативных фосфолипидов в хлороформе с концентрацией $C=10^{-4}$ М [2]. Для исследования влияния объема аликвоты на формирование монослоя раствор вносили на поверхность воды в количествах $V=50, 100$ и 150 мкл. Монослои исследовали методом изотерм сжатия [7], рассчитанные зависимости модуля сжатия от удельной площади представлены на рисунке 2.

На зависимости давления и модуля сжатия от удельной площади можно видеть 3-4 участка, которые соответствуют состояниям молекул с плотной упаковкой.

Диапазоны удельных площадей, на которых формируются эти состояния $A = 0,58-0,64; 0,78-0,85; 0,98-1,10$ нм².

Таблица 2. Характеристика МЭЖК

| Метиловые эфиры жирных кислот | Встречаемость в образце (%) |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Метил гексадеканоеат | 62,74 |
| Метил транс-9-октадеканоеат | 14,08 |
| Метил цис-9-гексадеценоеат | 9,11 |
| Метил цис-9,10-метиленгексадеканоеат | 6,75 |
| Метил октадеканоеат | 4,11 |
| Метил тетрадеканоеат | 3,21 |

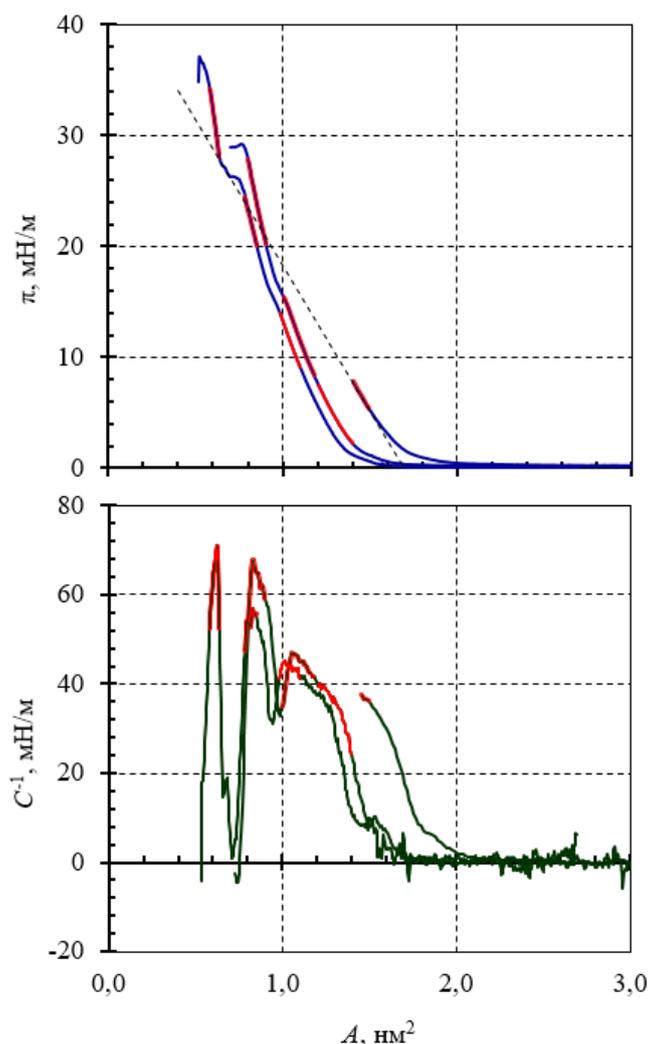


Рисунок 2. Изотермы (вверху) и модуль сжатия (внизу) монослоев

На рисунке 2 видно, что самое плотное первое (на изотерме слева направо) из плотноупакованных состояний формируется при минимальных значениях удельных площадей $A = 0,58-0,64 \text{ nm}^2$, для которых модуль сжатия максимален $C^{-1} = 97 \text{ mN/m}$, а рассчитанное A_0 в этом состоянии имеет величину около $0,90$ при очень низких давлениях порядка $2-5 \text{ mN/m}$ и при сжатии до величины удельной площади порядка $1,5-1,9 \text{ nm}^2$. Полученные значения для этого состояния имеют величины модуля сжатия меньше, чем для типичных фосфолипидов (дипальмитоил фосфатидилхолина) или классических ПАВ, например, из ряда жирных кислот (стеариновой, арахидиновой, олеиновой). Кроме того, по приведенным зависимостям видно, что существуют как минимум еще три состояния, в которых молекулы монослоя упаковываются в плотные структуры. На этих участках модуль сжатия имеет локальные максимумы, свидетельствующие о повышении механической прочности монослоя и его высокой стабильности. Площадь, приходящаяся на молекулу изучаемого фосфолипида, примерно в 4,5 раза больше сечения алифатической цепи $-(C_nH_{2n})-$ ($0,2 \text{ nm}^2$).

Таблица 2. Параметры монослоев нативных фосфолипидов

| Параметры | V050ul | V100ul | V150ul |
|-----------------|--------|--------|--------|
| A_{min} | 1,4 | 0,8 | 0,58 |
| A_{max} | 1,5 | 0,9 | 0,64 |
| a | 26,31 | 76,29 | 108,94 |
| b | 44,65 | 88,81 | 97,51 |
| A_0 | 1,697 | 1,164 | 0,895 |
| $C_0=K_0$ | 0,0224 | 0,0113 | 0,0103 |
| $C_0^{-1}=\chi$ | 44,645 | 88,805 | 97,508 |

Таким образом, проведены исследования ленгмюровских монослоев нативных фосфолипидов, выделенных из клеточных мембран тест-культуры *E.coli* K-12. Результаты МЭЖК выявили, что в составе липида А исследуемых бактерий наиболее часто встречаются метил гексадеcanoат и метил транс-9-октадеcanoат, составляя 76,82 % от общего объема всех исследуемых эфиров жирных кислот. Исследование монослоев методом изотерм сжатия показало наличие как минимум трех устойчивых плотно упакованных состояний с высокой механической прочностью.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда (проект № 21-73-20057).

Список литературы / References:

1. Ахметшина А.Э., Сироткин А.С. Анализ фосфолипидных жирных кислот микроорганизмов как биомаркеров окружающей среды. *Вестник казанского технического университета*, 2014, т. 17, № 19, с. 233-236. [Akmetshina A.E., Sirotkin A.S. Analysis of phospholipid fatty acids of microorganisms as biomarkers of the environment. *Bulletin of Kazan Technical University*, 2014, vol. 17, no. 19, pp. 233-236. (In Russ.)]
2. Sastre D.E., Basso L.G.M. et al. Membrane fluidity adjusts the insertion of the transacylase PlsX to regulate phospholipid biosynthesis in Gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.*, 2020, vol. 295, no. 7, pp. 2136-2147. doi: 10.1074/jbc.RA119.011122
3. Shrivastava R., Jiang X., Chng S.S. Outer membrane lipid homeostasis via retrograde phospholipid transport in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2017, vol. 106, no. 3, pp. 395-408. doi: 10.1111/mmi.13772
4. Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н. Значение мембранных фосфолипидов в реализации защитных стратегий бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*, 2020, т. 97, № 6, с. 594-603. [Andryukov B.G., Lyapun I.N. The importance of membrane phospholipids in the implementation of protective strategies in bacteria. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology*, 2020, vol. 97, no. 6, pp. 594-603. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-10
5. Berenblum Y., Chain E. An improved method for colorimetric determination of phosphate. *Biochem. G.*, 1938, vol. 32, no. 2, pp. 295-298. doi: 10.1042/bj0320295
6. Mayer H., Tharanathan R.N., Weckesser J. Analysis of lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Meth. Microbiol.*, 1985, vol. 18, pp. 157-207. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70475-6
7. Qassime M.M. et al. A studying of subphase temperature and dissolved ascorbic acid concentration influence on the process of Langmuir monolayer formation. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2018, vol. 1124, p. 031010. doi: 10.1088/1742-6596/1124/3/031010

CHARACTERISTICS OF LANGMUIR MONOLAYERS OF PHOSPHOLIPIDS ISOLATED FROM CELL MEMBRANES *E. COLI* K-12 TEST CULTURES

Zubova K.V., Kuznetsova V.A., Al-Alvani A.Zh., Glinskaya E.V., Kanevsky M.V., Glukhovskaya E.G.

Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky
Astrakhan str., 83, Saratov, 410012, Russia; e-mail: zubovaksushechka@mail.ru

Abstract. The paper presents studies of Langmuir monolayers of native phospholipids isolated from the cell membranes of the *E. coli* K-12 test culture. Six fatty acid methyl esters were found in the composition of *E. coli* K-12 bacteria lipid A: methyl hexadecanoate, methyl trans-9-octadecanoate, methyl cis-9-hexadecanoate, methyl cis-9,10-methylene hexadecanoate, methyl octadecanoate and methyl tetradecanoate. To form a monolayer, a working solution of native phospholipids in chloroform with a concentration of $C=10^{-4}$ M was prepared. To study the effect of the aliquot volume of the working solution on the formation of the monolayer, phospholipids were introduced to the water surface in quantities $V=50, 100$ and $150 \mu\text{l}$. Monolayers were studied by the method of compression isotherms, the analysis of which showed the presence of at least three stable densely packed states with high mechanical strength.

Key words: native phospholipids, Langmuir monolayers, stable states.