

Б. М. Куриненко, Т. Зинкевич, А. Г. Крушельницкий,
В. Я. Пономарев, Г. Ю. Яковлева

ОСОБЕННОСТИ ХИМИЧЕСКОГО СДВИГА ЯДЕР ^{31}P ФОСФОЛИПИДОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*, ИНДУЦИРОВАННОГО 2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛОМ

Ключевые слова: ЯМР-спектроскопия, фосфолипиды, *Escherichia coli*, 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ).

С помощью ЯМР-спектроскопии ядер ^{31}P фосфолипидов оценили влияние 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ) на клетки *Escherichia coli*. Установлено, что в процессе микробной трансформации ТНТ дисперсия химических сдвигов ядер ^{31}P фосфолипидов плазматической мембраны клеток исчезает, что свидетельствует о структурных перестройках мембраны. Анализ установленных изменений позволил обосновать предположение о переходе плазматической мембраны клеток *Escherichia coli* в процессе трансформации ТНТ из жидкокристаллического состояния в гель.

Keywords: NMR-spectroscopy, phospholipids, *Escherichia coli*, 2,4,6-trinitrotoluene (TNT).

Using NMR-spectroscopy of nucleus of ^{31}P from phospholipids we assessed the effects of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to cells of *Escherichia coli*. Found that in the microbial transformation of TNT the dispersion of chemical shiftings of the nucleus of ^{31}P from phospholipids of cells' plasma membrane disappears, indicating of structural changes of the membrane. Analysis of the changes set can justify the assumption of the transition of plasma membrane of *Escherichia coli* by transformation of TNT from liquid crystalline state to a gel.

Введение

2,4,6-Тринитротолуол (ТНТ), высокотоксичное и трудноразлагаемое неприродное соединение, вызывает у бактерий целый ряд структурных изменений и изменений метаболизма. Однако, до сих пор не показано наличие изменений в плазматической мембране клеток бактерий. Вместе с тем известно, что на первых этапах трансформации ТНТ в среде культивирования происходит аккумуляция активных форм кислорода (АФК) [1, 2]. Одним из следствий окислительного стресса является перекисное окисление липидов, которое может привести к изменению физических свойств мембраны. Вследствие этого целью данной работы являлась оценка структурных изменений мембран клеток *Escherichia coli*, культивированных в присутствии ТНТ, методом ЯМР-спектроскопии ядер ^{31}P фосфолипидов мембран.

Материалы и методы исследования

В работе использовали штамм *Escherichia coli* K12. Культивирование вели на синтетической среде М9 [3, 4] с добавлением глюкозы 0.4%, гидролизата казеина 0.2%. В опытный вариант добавляли ТНТ в концентрации 200 мг/л. После 4 ч культивирования клетки дважды отмывали 0.5% NaCl. Осажденную центрифугированием биомассу использовали как объект исследования.

Для оценки состояния мембраны использовали ЯМР-спектроскопию ядер ^{31}P . Эксперименты были выполнены на спектрометре Брукер AVANCE 400 при комнатной температуре. Спектры ядер ^{31}P получали при вращении образца (клеточной биомассы) под магическим углом со скоростью 6 кГц.

Математическую обработку данных проводили в стандартной компьютерной программе "Origin 6.1". В работе все эксперименты были проведе-

ны не менее чем в трех повторностях. Группу данных считали однородной, если среднеквадратическое отклонение σ в ней не превышало 13 %. Различия между группами считали достоверным при критерии вероятности $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В спектре ^{31}P клеток инокулята *E. coli* K12 наблюдается несколько сигналов: два интенсивных с химическим сдвигом 0,93 и 0,02 р.р.м., положение которых соответствует сигналам фосфолипидов [5], два слабых (-11,3 и -12,79 р.р.м.) соответствующих сигналам АТФ [6] и другим нуклеотидам, а также два пика боковых линий от вращения под магическим углом, появляющиеся в результате неполного усреднения тензора анизотропии химического сдвига ядер ^{31}P в фосфолипидах (рис. 1). После 4 часов культивирования клеток в отсутствие ТНТ расстояние между интенсивными сигналами ядер ^{31}P фосфолипидов увеличивается за счет изменения химических сдвигов (1,38 и -0,13 р.р.м.), менее интенсивные сигналы АТФ и других нуклеотидов не изменяются и не сдвигаются (рис. 2, А). Наличие двух сигналов ^{31}P в мембранах клеток контроля, культивируемых в отсутствие ТНТ, свидетельствует о том, что либо химический состав липидов, либо структура мембраны гетерогенны и могут быть разделены как минимум на две фракции.

При добавлении в среду культивирования ТНТ форма сигналов ^{31}P фосфолипидов меняется, два пика большой интенсивности сливаются в один с химическим сдвигом 0,63 р.р.м. (рис. 2, Б). Форма сигнала, принадлежащего нуклеотидам и АТФ не меняется, но его интенсивность снижается по сравнению с сигналом клеток, культивируемых без ТНТ. Уменьшение интенсивности этого сигнала в присутствии ТНТ, вероятно, связано со снижением пула восстановленных кофакторов (NAD(F)H), о чем сообщалось ранее для данного штамма [7].

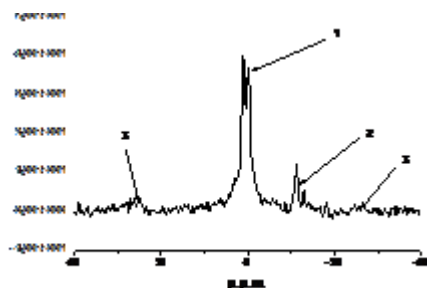


Рис. 1 - Спектры ЯМР ядер ^{31}P клеток инокулята *E. coli* K12 в нулевой момент времени: 1 – фосфолипиды; 2 – АТФ и другие нуклеотиды; 3 – боковые линии от вращения под магическим углом

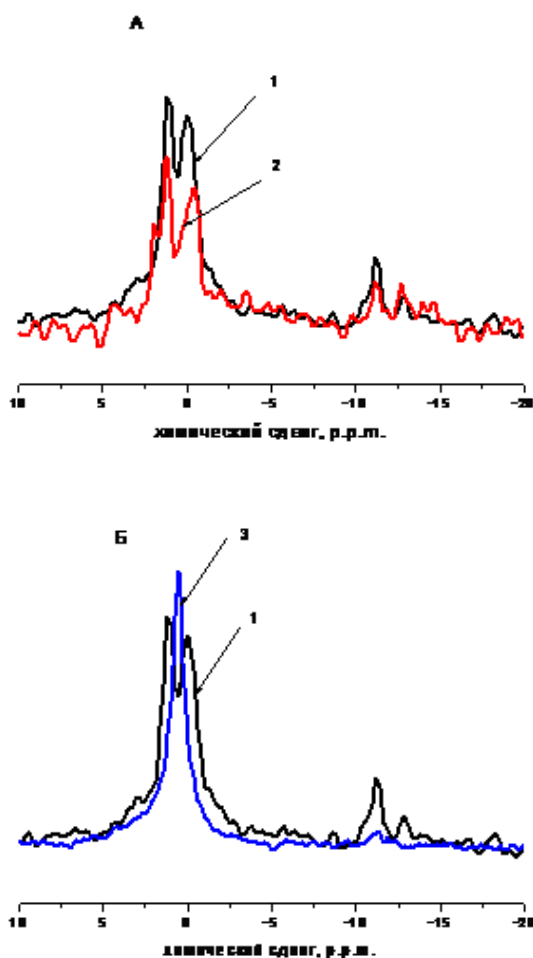


Рис. 2 - Спектры ЯМР ядер ^{31}P клеток *E. coli* K12, культивируемых 4 часа на синтетической среде: 1 – клетки инокулята, 2 – клетки культивируемые без ТНТ; 3 – клетки культивируемые в присутствии ТНТ (200 мг/л)

Отсутствие дисперсии химического сдвига ядер ^{31}P липидов в структуре фосфолипидов клеток, культивируемых с ТНТ, свидетельствует о том, что

структура фосфолипидов в мембране становится более гомогенной то есть, различия в химическом строении тех групп, которые окружают ядра ^{31}P фосфолипидов, минимальны. Однозначно объяснить причину такого усреднения на данном этапе затруднительно, так как не представляется возможным точно определить структурные элементы мембраны, обуславливающие химический сдвиг ядер ^{31}P фосфолипидов. Достаточно вероятна возможность изменения структуры или пространственной ориентации основного компонента мембран бактерий – фосфолипидов. Для такого предположения есть все основания – взаимодействие формирующего ближний порядок окружения ^{31}P фосфолипидов с ТНТ, с продуктами его трансформации, а также изменения структуры этого окружения под действием свободных радикалов, образующимися при трансформации ТНТ клетками бактерий [1, 2]. Наиболее вероятным содержанием такого изменения мембраны является её переход из жидкокристаллического состояния в гель.

Литература

1. Науменко, Е.А. Участие кислорода в бактериальной трансформации 2,4,6-тринитротолуола / Е. А. Науменко, А. В. Наумов, Е. С. Суворова, Р. Герлах, М. А. Зиганшин, А. П. Ложкин, Н. И. Силкин, Р. П. Наумова // Биохимия. – 2008. – Т.73. - №4. – С.463-469.
2. Kumagai, Y. Nitric oxide synthase (nNOS) catalyzes one-electron reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, resulting in decreased nitric oxide production and increased nNOS gene expression: implication for oxidative stress / Y. Kumagai, M. Kikushima, Y. Nakai, N. Shimojo, M. Kunimoto // Free Radicals Biology & Medicine. – 2004. – V.37. - № 3. – P.350-357.
3. Миллер, Д. Эксперименты в молекулярной генетике / Д. Миллер // М.: Мир, 1976. - 395 с.
4. Евтюгин, В.Г. Электронно-микроскопическое исследование морфологических изменений клеток кишечной палочки в условиях голодового стресса / В.Г.Евтюгин, А.Б.Маргулис, О.Н.Ильинская, М.К.Кадиров // Вестник Казанского технологического университета.- 2011.- №12.- С.167-171.
5. Jürgen, Schiller 31P NMR Spectroscopy of Phospholipids: From Micelles to membranes [Text] / Jürgen Schiller, Matthias Müller, Beate Fuchs, Klaus Arnold and Daniel Huster // Current Analytical Chemistry.- 2007.- N3.- P. 283-301.
6. Elke M., Lomeier-Vogel In vivo ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance Investigation of Tellurite Toxicity in *Escherichia coli* / Elke M.Lomeier-Vogel, Shiela Ung, and R. J. Turner // App. And Environ. Microbiol.- 2004.- P.7342-7347.
7. Куриненко, Б.М. Чувствительность различных штаммов *Escherichia coli* к токсическому действию 2,4,6 – тринитротолуола / Б.М. Куриненко, Н.А. Дениварова, Г.Ю. Яковлева // Прикл. биохимия и микробиология.- 2005. -Т.41, № 1.-С.53-57.