Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»

На правах рукописи

Давыдова Людмила Александровна

Адаптационные изменения липидов и их эффект на конформацию OmpF порина Yersinia pseudotuberculosis

03.01.04 - биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: д.б.н., профессор Санина Нина Михайловна

Содержание

ВВЕДЕНИЕ7
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР12
1.1. Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий 12
1.1.1. Особенности структуры цитоплазматической и наружной мембран 12
1.2. Влияние факторов окружающей среды на липидный состав бактерий15
1.3. Порины
1.4. Липид-белковые взаимодействия и конформация белков
1.5. Взаимосвязь между белками внешней мембраны, липидами и а антибиотикорезистетностью грамотрицательных бактерий
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
2.1. Бактериальные штаммы и условия культивирования 44
2.2. Получение фракций наружной и внутренней мембран Yersinia pseudotuberculosis
2.3. Идентификация фракций наружной и внутренней мембран
2.3.1. Фото- и рефрактометрия мембранных фракций, полученных в результате
равновесного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы46
2.3.2. Электрофоретическое разделение белков мембранных фракций,
полученных после равновесного ультрацентрифугирования в градиенте
плотности сахарозы47
2.3.3. Вестерн-блоттинг мембранных фракций, полученных в результате
ультрацентрифугирования
2.4. Экстракция липилов
2.5. Тонкослойная хроматография
2.5.1. Приготовление пластинок
2.5.2. Системы растворителей для тонкослойной хроматографии липидов 49
2.5.3. Обнаружение липидов
2.6. Количественное определение фофолипидов 49
2.7. Препаративное выделение фосфолипидов50
2.8. Анализ состава жирных кислот общих липидов Y. pseudotuberculosis50

2.9. Исследование фазовых переходов общих липидов Y. pseudotuberculosis 51
2.10. Подготовка липид-белковых комплексов для калориметрических, спектроскопических исследований, ДСН-ПААГ-электрофореза и вестерн- блоттинга
2.11. Калориметрическое исследование термоденатурации порина
2.12. Исследование собственной флуоресценции порина
2.13. ДСН-ПААГ-электрофорез и вестерн-блоттинг порина
2.14. Исследование влияния экстракта полифенолов из шелухи гречихи на резистентность <i>Y. pseudotuberculosis</i> к ампициллину
2.14.1. Определение минимальной ингибирующей концентрации ампициллина
для Y. pseudotuberculosis56
2.15. Анализ уровня экспрессии <i>pldA, ompF</i> и <i>ompC</i> в зависимости от состава культуральной среды
3.1. Влияние стресс-индуцированных изменений в липидах <i>Y. pseudotuberculosis</i> на конформацию порина OmpF
3.1.1. Влияние фенола на фосфолипидный и жирнокислотный состав общих
липидов Y. pseudotuberculosis59
3.1.2. Влияние фенольной обработки на термотропное поведение общих липидов <i>Y. pseudotuberculosis</i>
3.1.3. Влияние аккумуляции лизофосфатидилэтаноламина в липидах <i>Y</i> .
pseudotuberculosis на конформацию порина OmpF63
3.1.3.1. Дифференциальная сканирующая калориметрия порина
3.1.3.2. Собственная флуоресценция порина
3.2. Жирнокислотный состав лизофосфатидилэтаноламина и фосфатидилэтаноламина из клеток Y. pseudotuberculosis, обработанных фенолом
3.3. Влияние ФЭ, насыщенной и ненасыщенной форм ЛФЭ на конформацию порина YOmpF
3.3.1. Дифференциальная сканирующая калориметрия порина
3.3.2. Собственная флуоресценция порина76
3.3.3. Вестерн-блоттинг

3.4. Эффект повышения температуры роста и теплового шока на липидный состав внутренней и наружной мембран <i>Y. pseudotuberculosis</i>
3.4.1. Идентификация фракций, обогащенных наружной и цитоплазматической
мембранами
3.4.2. Фосфолипидный состав цитоплазматической и наружной мембран и
целых клеток Y. pseudotuberculosis, выращенных при разных температурах или
подвергнутых тепловому шоку85
3.4.3. Влияние температуры культивирования и теплового шока на
жирнокислотный состав липидов цитоплазматической и наружной мембран Ү.
pseudotuberculosis
3.5. Влияние уровня ЛФЭ на чувствительность <i>Y. pseudotuberculosis</i> к ампициллину
3.5.1. Характеристика экстракта полифенолов из шелухи гречихи
3.5.2. Влияние глюкозы и экстракта полифенолов из гречихи на
фосфолипидный состав Y. pseudotuberculosis94
3.5.3. Влияние глюкозы и экстракта полифенолов из шелухи гречихи на
уровень экспрессии генов фосфолипазы А наружной мембраны и
неспецифических поринов (OmpF и OmpC) в клетках Y. pseudotuberculosis95
3.5.4. Исследование чувствительности к ампициллину клеток Ү.
pseudotuberculosis в зависимости от присутствия глюкозы и экстракта
полифенолов из шелухи гречихи в культуральной среде
ВЫВОДЫ 100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хромато-масс-спектрометрия

- ДГДГ дигалактозилдиацилглицерин
- ДМФХ 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин

ДПФЭ-1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3- фосфоэтаноламин

- ДСК дифференциальная сканирующая калориметрия
- ДСН додецилсульфат натрия
- ДФГ дифосфатидилглицерин
- ЖК жирная кислота
- ИН индекс ненасыщенности
- ЛОФЭ-1-олеоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3- фосфоэтаноламин
- ЛПС липополисахарид
- ЛПФЭ 1-пальмитоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3- фосфоэтаноламин
- ЛФЭ лизофосфатидилэтаноламин
- МГДГ моногалактозилдиацилглицерин
- МИК минимальная ингибирующая концентрация
- МЭЖК метиловый эфир жирной кислоты ЖК
- НЖК насыщенная жирная кислота
- НМ наружная мембрана
- ПААГ полиакриламидный гель
- ПЦР-РВ полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
- СХДГ сульфохиновозилдиацилглицерин
- ТСХ тонкослойная хроматография
- ФГ фосфатидилглицерин
- ФИ фосфатидилинозитол
- ФК фосфатидная кислота
- ФЛ фосфолипид
- $\Phi X \phi oc \phi a т u д u л x o л u н$
- $\Phi \Im \phi oc \phi$ атидилэтаноламин

- ЦМ цитоплазматическая мембрана
- Aas ацилтрансфераза/ацилсинтаза
- Н гексагональная фаза
- Н_{II} инвертированная гексагональная фаза
- L ламеллярная фаза
- LamB специфический порин для транспорта мальтозы
- Lnt липопротеин N-ацитрансфераза
- L_а ламеллярная жидкокристаллическая фаза
- L_β гелевая ламеллярная фаза
- MscL механочувствительный канал высокой проводимости
- рАb поликлональные антитела
- PldA фосфолипаза А наружной мембраны
- Q кубическая фаза
- ScrY специфический порин для транспорта сахарозы
- YOmpF OmpF порин Y. pseudotuberculosis

введение

Бактерии осуществляют первичный контакт с окружающей средой посредством клеточных мембран, липидный матрикс которых представляет собой гетерогенный бислойный ансамбль амфифильных молекул. Компенсаторные изменения в жирнокислотном составе и головных группах мембранных липидов в процессе адаптации обеспечивают уникальные свойства мембраны, динамические И структурные 3a счет чего поддерживается жизнедеятельность организма В новых условиях существования. Вероятно, эти же процессы могут влиять на устойчивость бактерий к антибиотикам и иммунной системе организма-хозяина. Поэтому понимание молекулярных механизмов адаптации бактерий к меняющимся условиям окружающей среды и их резистентности к стрессам имеет большое значение для выбора адекватной стратегии медикаментозного лечения заболеваний, вызванных патогенными бактериями.

Грамотрицательные энтеробактерии Yersinia pseudotuberculosis относятся К психротрофам И отличаются высокой экологической пластичностью, поэтому являются хорошими модельными объектами для исследования процессов адаптации. Показано, что Y. pseudotuberculosis может изменять свой липидный профиль в зависимости от температуры, способа культивирования, фазы роста и источника углерода (Соловьева и др., 1988; Красикова *и др.*, 2001; Bakholdina *et al.*, 2001). Присутствие глюкозы в среде, повышение температуры культивирования до уровня, характерного для паразитической фазы жизни (37 °C), или недостаточная аэрация приводят не только к изменению соотношения между основными фосфолипидами (Φ Л): фосфатидилэтаноламином (Φ Э), фосфатидилглицерином (ФГ) и дифосфатидилглицерином (ДФГ), но И накоплению значительного лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ), количества практически отсутствующего в мембранах бактериальных клеток при оптимальных условиях существования (Kern et al., 2001). Наибольшее увеличение уровня ЛФЭ происходит в бактериальных клетках, находящихся в стрессовых условиях (Bukholm *et al.*, 1997; Kern *et al.*, 2001; Giles *et al.*, 2011; Cesari *et al.*, 2016). Так, было показано, что в клетках *Y. pseudotuberculosis*, обработанных фенолом в бактерицидной концентрации, содержание ЛФЭ возрастает в 4 раза по сравнению с его уровнем в нативных клетках (Бахолдина *u dp.*, 2011). Долгое время накопление ЛФЭ в мембранах бактерий рассматривалось как артефакт, однако аномально высокий уровень этого лизофосфолипида, проявляющего свойства детергента, по-видимому, является частью бактериального ответа на стресс.

Благодаря своему полиморфизму, липиды являются адекватным строительным материалом для клеточных мембран (Frolov *et al.*, 2011). Многочисленные исследования показывают, что они взаимодействуют с белками, изменяя конформацию и свойства последних (Lee, 2004; Yeagle, 2014; Hong, 2015).

Предполагается, что структура липидов определяет их укладку вокруг мембранных белков, а большое разнообразие типов липидных молекул обеспечивает различные конформационные состояния белка, оптимальные для данных условий (Benga, Holmes, 1984; Frolov *et al.*, 2011). Поэтому изменения в физико-химических свойствах липидов должны коррелировать с их влиянием на конформацию и, тем самым, на функции белковых компонентов мембраны. Таким образом, понимание процессов динамики мембранных белков в их нативной гидрофобной среде позволяет по-новому взглянуть на их функционирование.

ОтрF порин является доминирующим белком наружной мембраны (HM) *Y. pseudotuberculosis*, выполняющим важную роль в процессах обмена между клеткой и окружающей средой (Rokitskaya *et al.*, 2016). Известно также, что порины служат каналами для поступления некоторых антибиотиков в клетку и, следовательно, ответственны за развитие устойчивости к данным препаратам (Nikaido, 1992, 2003). Поэтому

исследование адаптационных липид-индуцированных изменений конформации и функциональной активности поринов имеет не только теоретическое значение для понимания физиологии микроба, но и важно с практической точки зрения, в частности, для решения возрастающей проблемы антибиотикорезистентности бактерий.

Целью настоящей работы было исследование влияния адаптационных изменений в липидах *Y. pseudotuberculosis* на конформацию порина OmpF, а также установление их роли в антибиотикорезистентности бактерии к β-лактамному антибиотику ампициллину.

Для реализации поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

1. Выделить общие липиды из нативных и обработанных фенолом клеток *Y. pseudotuberculosis* и охарактеризовать их фосфолипидный и жирнокислотный состав.

2. Изучить влияние липидов, выделенных из интактных и обработанных фенолом клеток *Y. pseudotuberculosis*, на конформацию OmpF порина.

3. Провести сравнительный анализ влияния насыщенной и ненасыщенной лизоформ ФЭ на конформацию ОтрF порина.

4. Исследовать влияние температуры культивирования и теплового шока на состав фосфолипидов наружной и цитоплазматической мембран *Y*. *pseudotuberculosis*.

5. Изучить влияние уровня ЛФЭ на чувствительность *Y*. *pseudotuberculosis* к ампициллину.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. ЛФЭ преимущественно аккумулируется в наружной мембране клеток *Y. pseudotuberculosis*.

2. В ответ на стресс в клетках *Y. pseudotuberculosis* преимущественно накапливается ненасыщенная форма ЛФЭ.

3. Повышенное содержание ЛФЭ в общих липидах *Y*. *pseudotuberculosis* является причиной интегральных конформационных изменений, приводящих к увеличению термостабильности OmpF порина.

4. В отличие от насыщенного ЛФЭ, его ненасыщенная форма повышает термостабильность OmpF порина *Y. pseudotuberculosis*, уплотняя упаковку мономеров белка и предохраняя его нативную тримерную форму от термоденатурации.

5. Повышение уровня ЛФЭ приводит к снижению чувствительности *Y. pseudotuberculosis* к ампициллину. Адаптационные изменения, связанные с уменьшением содержания ЛФЭ, наоборот, повышают чувствительность бактериальных клеток к антибиотику.

Научная новизна. Впервые показан различный эффект общих липидов Y. pseudotuberculosis с высоким и низким содержанием ЛФЭ на конформацию OmpF порина и установлено, что в ответ на стресс аккумулируется преимущественно ненасыщенная форма ЛФЭ. Впервые противоположный эффект ненасыщенной И показан насыщенной молекулярных форм ЛФЭ конформацию OmpF *Y*. на порина pseudotuberculosis (YOmpF). Впервые исследован фосфолипидный И жирнокислотный состав HM и цитоплазматической мембран (ЦМ) Y. pseudotuberculosis при адаптации к повышению температуры и в условиях теплового шока. Показано, что ЛФЭ преимущественно накапливается в НМ Y. pseudotuberculosis, в которой локализуется YOmpF. Установлено, что повышение уровня ЛФЭ приводит к снижению чувствительности У. *pseudotuberculosis* к β-лактамному антибиотику ампициллину. Показана возможность регулирования чувствительности Y. pseudotuberculosis К ампициллину путем изменения уровня ЛФЭ в бактериальных клетках.

Практическая значимость. Полученные результаты могут быть использованы для выработки новой стратегии борьбы с патогенными организмами, основанной на применении обычных антибиотиков в

комбинации с факторами регуляции адаптационных изменений в гидрофобном окружении пориновых каналов. Результаты данной работы могут быть использованы при проведении теоретических и практических занятий для студентов-биологов и медиков в соответствующих ВУЗах.

Апробация работы И публикации. Результаты исследований представлены следующих научных форумах: XI Региональная на конференция студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии (Владивосток, 2012), IV Съезд биофизиков России (Нижний Новгород, 2012), VI Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз – Россия 2013» (Иркутск, 2013), 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, 2013), 12t^h Euro fed lipid congress (Монпелье, 2014), V Съезд биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), 6th Asian symposium on plant lipids and 6th International Singapore lipid symposium (Сингапур, 2015), VIII Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых биологов «Симбиоз – Россия 2015» (Новосибирск, 2015), V Съезд биохимиков России (Дагомыс, 2016).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них 3 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах и 10 тезисов докладов конференций.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 130 страницах, иллюстрирована 10 рисунками и содержит 12 таблиц. Список литературы насчитывает 261 источник.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий обладает сложной молекулярной организацией. Она состоит из двух мембран (наружной (HM) и цитоплазматической (ЦМ)), разделённых периплазматическим пространством, в котором располагается тонкий пептидогликановый (муреиновый) слой, связанный с липопротеином Брауна и порином OmpA HM (Kulp, Kuehn, 2010; Nakayama *et al.*, 2012).

Мембраны существенно отличаются между собой по липидному и белковому составу, что, вероятно, объясняется их различными функциями и локализацией. НМ бактерии обращена во внеклеточное пространство и осуществляет взаимосвязь бактерии с окружающей средой, тогда как ЦМ ограничивает содержимое клетки и обеспечивает транспорт веществ в цитоплазму и передачу сигнала непосредственно в клетку (Ruiz *et al.*, 2006).

Наличие HM у грамотрицательных бактерий обеспечивает дополнительный барьер на пути проникновения в клетку различных веществ. Поэтому грамотрицательные бактерии более устойчивы к воздействию ферментов, различных химических агентов, в том числе и дезинфицирующих веществ, а также антибиотиков. В связи с этим биофизическое и структурное исследование компонентов HM представляет большой практический интерес при подборе антимикробной терапии и разработке новых лекарственных препаратов (Tenover, 2006; Clifton *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014).

1.1.1. Особенности структуры цитоплазматической и наружной мембран

HM грамотрицательных бактерий отличается OT ЦM своим асимметричным строением: внутренний внешний HM И монослои образованы фосфолипидами и липополисахаридом (ЛПС) соответственно (Bos et al., 2007; Barák, Muchová, 2013; Gu et al., 2015). ЛПС выполняет

важную биологическую роль, поддерживая целостность НМ и принимая активное участие во взаимоотношениях хозяин-патоген (Whitfield, Trent, HM 2014). Внутренний монослой состоит, образом, главным ИЗ фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилглицерина $(\Phi\Gamma)$ И дифосфатидилглицерина (ДФГ) или кардиолипина. Эти же липиды формируют фосфолипидный бислой ЦМ. Содержание фосфолипидов в наружном и внутреннем монослоях ЦМ примерно одинаково (Koebnik et al., 2000).

В 1968 году японские ученые впервые опубликовали методику разделения НМ и ЦМ грамотрицательных бактерий на примере *Escherichia coli* (Miura, Mizushima, 1968). Впоследствии Осборн М. с соавторами предложили модифицированную методику для работы с *Salmonella typhimurium* (Osborn *et al.*, 1972). С тех пор данная методика претерпела ряд минорных изменений, была адаптирована под конкретные лабораторные задачи. Однако и сейчас в основе исследований по разделению мембран грамотрицательных бактерий и их идентификации лежит работа Осборна М. с соавторами, признанная классической (Klüsener *et al.*, 2009; Vences-Guzmán *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012).

В целом было показано, что качественный состав фосфолипидов в НМ и ЦМ отличается незначительно (Ruiz *et al.*, 2006), но существенные различия наблюдаются в количественном соотношении липидов. Так, в 1979 году была разработана модель мембраны для *Erwinia carotovora*, согласно которой ФЭ, основной мембранообразующий липид, распределяется крайне неравномерно между НМ и ЦМ. По данным этих исследований около 35% от суммарного содержания ФЭ приходится на НМ; из них только 4% – на внешний монослой, который, главным образом, сформирован ЛПС. Однако ФЭ в монослоях ЦМ представлен практически в равных количествах, и его доля составляет приблизительно 65% от суммарного содержания ФЭ в клетках *E. carotovora* (Shukla *et al.*, 1980).

Белковый состав НМ и ЦМ имеет существенные не только количественные, но и, что наиболее важно, качественные различия. Около 50% от общей массы НМ составляют белки, которые представлены либо в виде интегральных белков, либо в виде липопротеинов (Koebnik *et al.*, 2000). Соотношение белок/липид в НМ значительно выше, чем в ЦМ (Osborn *et al.*, 1972). Около 90% липопротеинов находится во внутреннем монослое НМ в отличие от липопротеинов ЦМ, которые локализованы во внешнем монослое мембраны (Ruiz *et al.*, 2006).

Бактериальные липопротеины характеризуются наличием консервативного цистеинового N-концевого остатка, модифицированного липидом, что позволяет гидрофильному белку заякориваться в гидрофобный мембранный слой липидов (Nakayama et al., 2012). Липопротеины выполняют различные функции, включая транспорт питательных веществ, передачу сигнала в бактериальную клетку; они участвуют в процессах адгезии, конъюгации и споруляции, а также обеспечивают фолдинг некоторых белков. У патогенных бактерий липопротеины играют важную взаимоотношениях хозяин-патоген. Наличие определенных роль BO липопротеинов является необходимым условием вирулентности бактерий (Kovacs-Simon et al., 2011).

Интегральные белки HM и ЦМ существенно отличаются по своей структуре. Интегральные белки с α-спиральными трансмембранными доменами найдены в ЦМ, тогда как в HM интегральные белки представлены амфипатическими β-баррельными белками, имеющими β-складчатую структуру (Kim *et al.*, 2012; Selkrig *et al.*, 2014; Rollauer *et al.*, 2015).

Несмотря на общность структуры, многочисленные β-баррельные белки НМ выполняют различные функции, связанные с транспортом веществ и сигнализацией, а также имеют жизненно важное значение для мембранного биогенеза. Они могут действовать как каналы, транспортеры, ферменты, рецепторы, структурные белки (например, OmpA) и белки механизмов

транслокации и сборки (translocation and assembly machineries) β-баррельных белков и ЛПС (Fairman *et al.*, 2011; Ulrich, Rapaport, 2015; Kleinschmidt, 2015; Okuda *et al.*, 2016).

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий хорошо защищает клетки от вредных агентов, препятствуя или замедляя их проникновение в клетку. В то же время питательные вещества и продукты жизнедеятельности проходить через мембраны с высокой скоростью, должны что осуществляется благодаря хорошо развитой сети мембранных транспортных выделяют неспецифические белков. Среди них три класса: каналообразующие специфические белки (порины), каналы И энергозависимые транспортные системы с высоким сродством к лиганду (Nikaido, 1992).

1.2. Влияние факторов окружающей среды на липидный состав бактерий

Первичный контакт любой клетки с внешней средой или другими клетками осуществляется посредством биологических мембран. Бактерии существуют в широком диапазоне изменчивости условий окружающей среды приспосабливаться к воздействию вынуждены самых И различных абиотических факторов, таких как температура, давление, соленость, pH, токсичные вещества. Для выполнения своих функций мембрана клеток должна обладать определенными физическими свойствами. Выживаемость эктотермных организмов многом определяется адаптационными BO изменениями в липидном составе мембран, направленными на поддержание ее жидкокристаллического состояния. Этот феномен впервые был изучен на мембранах E. coli и получил название «гомеовязкостной адаптации» (Sinensky, 1974).

Вязкость мембран регулируется составом полярных головных групп и ацильных остатков липидов (Yoon *et al.*, 2015). В первую очередь

компенсаторные изменения в мембране происходят за счет корректировки жирнокислотного состава (Russell, 1984; Yoon *et al.*, 2015). Тем не менее, существенным преобразованиям может подвергаться и фосфолипидный состав бактериальных мембран (Oliver, Colwell, 1973; Bakholdina *et al.*, 2004).

Все биологические мембраны являются функциональной платформой для трансмембраных белков, уникальной особенностью которых является то, что они функционируют в сильно анизотропной липидной cpege (Pogozheva et al., 2013). Именно эти белки воспринимают первичные сигналы и передают их в клетку, обеспечивают транспорт веществ, вывод продуктов обмена и ряд других функций. Поэтому правильное функционирование мембранных белков лежит в основе нормального физиологического состояние клетки, в том числе и в условиях стресса. В свою очередь, физические и химические свойства липидного матрикса обеспечивают оптимальную конформацию белка, его пространственную локализацию, а также взаимодействия с белками и небольшими молекулами, другими ЧТО необходимо ДЛЯ функциональной активности мембранных белков (Phillips et al., 2009; Bondar et al., 2010; Jardon-Valadez et al., 2010). Поэтому для понимания механизмов реагирования бактерий на различные стрессы необходимо комплексное исследование всех компонентов мембран, а также их взаимосвязи друг с другом.

Адаптационные бактериальных мембран изменения вязкости обеспечиваются, прежде всего, за счет регулирования соотношения между ненасыщенными и насыщенными жирными кислотами (ЖК), а также путем циклопропановых ЖК изменения уровня И иис-транс-изомеризации мононенасыщенных ЖК в составе липидов мембран. Сравнительно редко физическое состояние липидного матрикса мембран бактерий регулируется за счет длины ацильных цепей и образования их разветвленных производных (Yoon *et al.*, 2015).

Изменение степени ненасыщенности ЖК – один из наиболее эффективных механизмов регулирования текучести мембран. Показано, что полностью насыщенные полярные глицеролипиды не способны формировать бислой и, соответственно, структуру биологической мембраны при физиологической температуре (Stubbs, Smith, 1984; Лось, 2001).

В пределах жидкокристаллического состояния амфифильных липидов мембран различают три основные фазы: ламеллярную (L); кубическую (Q) и гексагональную (Н). Ламеллярная фаза характерна для основной массы липидов в биологических мембранах. В зависимости от температуры окружающей среды ацильные цепи липидов в ламеллярной фазе могут принимать различные конформации, соответствующие жидкокристаллическому (L_{α}) и гелевому (L_{β}) состояниям. Температура, при которой липид из гелевого (кристаллоподобного) состояния переходит в жидкокристаллическое, называется температурой фазового перехода и обозначается наблюдается T_{max} , так как при ней максимальное теплопоглоглощение (Брагина, Миронов, 2002).

Температура фазового перехода зависит от состава мембранных липидов и в организмах с дефицитом холестерина в основном определяется жирнокислотным составом. В наибольшей степени температура фазового перехода липида зависит от наличия *цис*-двойных связей в ацильных цепях, которые препятствуют плотной упаковке молекул (Mansilla *et al.*, 2004; Черенкевич, 2008).

Пойкилотермные организмы, включая бактерии, способны регулировать температуру фазового перехода мембранных липидов и таким образом поддерживать оптимальное для функционирования жидкокристаллическое состояние бислоя в ответ на изменения условий окружающей среды (Mansilla *et al.*, 2004).

На сегодняшний день наиболее изучено влияние температурного фактора среды на адаптационные изменения липидов мембран

бактериальных клеток. Однако с полной уверенностью можно сказать, что физическое состояние бислоя, регулируемое соотношением ненасыщенных и насыщенных ЖК, определяет жизнедеятельность бактерий и в условиях осмотического стресса, воздействия токсических агентов, повышенного давления и ряда других факторов (Yoon *et al.*, 2015).

Например, показано, что увеличение степени насыщенности ЖК приводит к замедлению потери воды клетками в условиях низкого водного потенциала среды (Cesari et al., 2016). В ответ на присутствие токсических агентов в среде текучесть мембран также снижается, что препятствует их прохождению внутрь клетки (Murínová, Dercová, 2014). Вероятно, в основе ответа бактерий на воздействие какого-либо токсичного химического агента лежит тот же механизм, что и при повышении температуры. В результате такой адаптации бислой дополнительно уплотняется (Denich et al., 2003). правило соблюдается Хотя ЭТО не всегда. Так, при воздействии ксеноэстрогена трибутилтинхлорида на клетки *Pseudomonas* sp., наоборот, количество ЖК с двойными связями увеличивалось (Bernat et al., 2014).

Содержание циклопропановых ЖК также влияет на вязкость бактериальной мембраны. Циклопропановые ЖК были найдены во многих грамотрицательных бактериях, таких как Yersinia, Pseudomonas, Salmonella, Citrobacter и других (Bakholdina et al., 2004; Kaclikova et al., 2005; Kim et al., 2005; Munoz-Rojas et al., 2006). Они придают жесткость мембране (Härtig et al., 2005), повышая температуру фазового перехода липидов (McGarrity, Armstrong, 1981). Циклопропановые ЖК образуются в ответ на ряд стрессов, таких как повышение температуры, низкая соленость среды, присутствие токсинов, осмотический стресс (Zhao et al., 2003; Bakholdina et al., 2004; Asakura *et al.*, 2012; Chen, Gänzle, 2016). Однако этот механизм не является бактерий. Например, универсальным для некоторые психрофильные бактерии поддерживают довольно высокий уровень циклопропановых ЖК при низких температурах роста (Könneke, Widdel, 2003). Е. coli в ответ на кислотный стресс увеличивает содержание циклопропановой ЖК (Chen, Gänzle, 2016), в то время как у *P. putida* уровень циклопропановых ЖК остается неизменным при снижении pH (Pini *et al.*, 2009).

Поскольку все адаптационные механизмы должны синхронизироваться с необходимыми физиологическими функциями (Murínová, Dercová, 2014), то важно учитывать, что S-адезинметионин, необходимый для синтеза циклопропановых ЖК, активно вовлечен в синтезы других молекул. Поэтому снижение или повышение уровня S-адезинметионина может быть ответом на общую метаболическую регуляцию. Вероятно, это является причиной различий между видами бактерий в содержании циклопропановых ЖК в ответ на один и тот же стресс (Pini *et al.*, 2009).

Еще одним видом жирнокислотных модификаций липидов бактерий является цис-транс-изомеризация двойной связи в ацильной цепи. Она не требует АТФ, никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАД(Φ)H₂) или глутатиона и действует в отсутствие синтеза липидов *de novo*. Поэтому такая модификация не зависит от фазы роста микроорганизма и довольно быстро включается в адаптационный ответ. Однако, несмотря на кажущиеся преимущества, цис-транс-изомеризация представлена далеко не у всех видов грамотрицательных бактерий, а только у тех, которые способны жить в широком спектре экосистем. Вероятно, данный механизм дает ИМ дополнительные возможности приспособиться к различным экологическим нишам (Yoon *et al.*, 2015).

Превращение *цис*-ненасыщенных ЖК в *транс*-форму имеет большое значение для приспособления бактерий к меняющимся химическим или физическим параметрам среды. Повышение температуры является одним из факторов окружающей среды, индуцирующих значительное повышение уровня *транс*-ненасыщенных ЖК в составе фосфолипидов бактерий, но *цис*-*транс* изомеризация в наибольшей степени изучена при ответе *P. putida* на

присутствие в среде фенола и других органических растворителей, дестабилизирующих мембрану (Zhang, Rock, 2008).

Замена цис- на транс-конформацию двойной связи приводит к уплотнению ацильных цепей, а следовательно, к повышению температуры фазового перехода липидов и уменьшению проницаемости мембраны. В эффект ЖК общем смысле аналогичен замене ненасыщенных на насыщенные, так пространственная конфигурация как трансненасыщеннной ЖК аналогична насыщенной ЖК (Zhang, Rock, 2008). К тому же ЖК с цис-двойной связью ингибируют взаимопроникновение ацильных цепей, тем самым увеличивая текучесть мембран (Smith et al., 2014).

ЖК бактерий структурно довольно разнообразны. Модуляция жирнокислотного состава является высокоэффективным механизмом адаптации и позволяет бактериям существовать в широком диапазоне условий среды.

Наряду с изменением в составе ацильных цепей под воздействием стресса в микроорганизмах также отмечено переключение в биосинтезе классов липидов. Как уже было отмечено, мембрана бактерий в основном представлена такими фосфолипидами как ФЭ, ФГ и ДФГ. Обычно содержание цвиттерионного ФЭ значительно выше доли анионных фосфолипипидов (ФГ и ДФГ).

Благодаря небольшой головной группе, Φ Э с ненасыщенными ЖК присуща форма усеченного конуса, основание которого тем шире, чем больше степень ненасыщенности его ЖК. В этом случае ФЭ является неламеллярным липидом, имеющим тенденцию к образованию инвертированной гексагональной фазы (H_{II}). Однако ФЭ, ацильные цепи которого не содержат двойных связей, близок по своей пространственной организации к ламеллярным липидам с цилиндрической формой молекул (Israelachvili, 2011; De Kruijff, 1997).

В некоторых бактериях В значительных количествах также присутствует фосфатидилхолин (ΦX). Как известно, ΦX образуется из $\Phi \Theta$ путем трех его последовательных метилирований (Vance, Vance, 1996). Полярная голова ФХ больше, чем у ФЭ, и поэтому его молекулы имеют цилиндрической, независимо от ненасыщенности форму, близкую к Поэтому ФХ является ацильных остатков. ламеллярным липидом. формирующим плоский или замкнутый в везикулу бислой (Israelachvili, 2011).

Конверсия между ФЭ и ФХ с увеличением последнего в условиях стресса была найдена у многих бактерий (Paulucci *et al.*, 2011; Paulucci *et al.*, 2015; Cesari *et al.*, 2016), содержащих ФХ в своих мембранах.

Поддержание баланса между ламелярными и неламеллярными липидами имеет решающее значение для структуры и функциональной активности мембран (Denich *et al.*, 2003) при адаптации различных организмов. Например, в условиях стресса изменяется количественное соотношение между ФГ, который так же как и ФХ является ламеллярным липидом, и неламеллярным ФЭ. Показано, что с увеличением соотношения ФГ/ФЭ мембрана становится менее проницаемой для липофильных и полярных молекул (Murzyn et al., 2005). Однако в зависимости от химической природы агента уровень ФГ относительно ФЭ может как увеличиваться, так и уменьшатся (Weber, Bont, 1996). Так, например, в ответ на воздействие трибутилин хлорида в бактерии Pseudomonas sp. B-219 уровень ФГ снижался практически в два раза. Тем не менее, в этих условиях увеличивался уровень ФК, которая, аналогично ФХ и ФГ, склонна к формированию бислоя (Bernat et al., 2014).

Неламеллярный ЛФЭ обычно отсутствует или является минорным фосфолипидом в бактериальных клетках. Однако его уровень может значительно увеличиваться в стрессовых условиях (Kern *et al.*, 2001). Лизофосфолипиды в клетках могут синтезироваться несколькими способами:

de novo, из диацильных глицерофосфолипидов под действием фосфолипазы А наружной мембраны (PldA), а также при участии липопротеин Nацитрансферазы (Lnt), локализованной в ЦМ (Соловьева *и др.*, 1988; Harvat *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2016).

Перенос лизофосфолипидов через бислой ЦМ с последующим преобразованием в ФЭ осуществляется посредством LplT/Aas системы, которая, вероятно, играет существенную роль в поддержании стабильности биологических мембран. LplT представляет собой трансмембранный белок, состоящий из 12 спиралей, и катализирует трансбислойный перенос лизофосфолипидов, то является фосфолипидной флиппазой. есть У некоторых бактерий LplT транспортер находится в виде единого комплекса с Aas ацилтрансферазой/ацилсинтазой, которая осуществляет синтез ФЭ из ЛФЭ. В других бактериях эти белки представляют собой два физически разделенных комплекса, однако их гены организованы в бицистронный оперон.

Долгое время предполагалось, что LplT/Aas-опосредованный транспорт и ацилирование ограничивается только лизо-ФЭ (Harvat *et al.*, 2005). В своем недавнем исследовании Лин Ю. с соавторами в эксперименте *in vitro* на сферопластах *E. coli* показали, что LplT не транспортирует лизофосфатидную кислоту и лизо-ФХ. Однако авторы обнаружили, что кинетика переноса лизоформ основных мембранных липидов, ФГ, ДФГ, ФЭ, с помощью LplT практически одинакова. Также было показано, что в рециклирование диацильных форм ФЭ, ФГ или тетра-ацильной формы ДФГ вовлечен весь комплекс LplT/Aas. Вероятно, глицериновая или этаноламиновая головные группы являются основными химическими факторами, определяющими распознавание субстрата данным переносчиком (Lin *et al.*, 2016).

Керн Р. с соавторами (Kern *et al.*, 2001) установили, что уровень ЛФЭ в 4 раза увеличивается в мембране *E. coli* при тепловом шоке. Подобные изменения в составе липидов были найдены у *Azospirillum brasilense* в условиях дефицита воды (Cesari *et al.*, 2016), у *Helicobacter pylori* при снижении pH (Bukholm *et al.*, 1997), при воздействии желчи на *Vibrio cholerae* (Giles *et al.*, 2011).

Форма молекулы в виде обратного конуса не позволяет лизолипидам формировать бислойные структуры в воде, но они самостоятельно способны формировать мицеллы (Mouritsen, 2011). Считается, что лизофосфолипиды в мембране выступают в качестве детергентов, дестабилизируя её. Тем не менее, при определенном количестве они, напротив, способны поддерживать структуру бислоя (Jain *et al.*, 1980; Jain, Haas, 1981).

Однако долгое время не уделялось должного внимания подробному исследованию влияния этих липидов на мембрану и мембранные белки. В большинстве исследований использованы лишь насыщенные лизоформы ФХ. Очевидно, что физико-химические свойства липида и, соответственно, его влияние на бислой определяют как полярные головные группы, так и жирнокислотные остатки фосфолипидов. Поэтому необходимо детальное исследование различных лизоформ липидов, так как, вероятно, их эффекты на бислой могут различаться.

Еще одним липидом, широко представленным в мембранах бактерий, является кардиолипин. Он обратимо синтезируется из ФГ и по химической представляет собой две молекулы фосфатидной кислоты, структуре связанные одной молекулой глицерина. Потенциально ДФГ может нести два отрицательных заряда, по одному на каждой из своих фосфатных групп (Lemmin et al., 2013). Однако, несмотря на очевидную симметрию головной группы ДФГ, ионизация фосфатных групп происходит при разных значениях кислотности (рК₁ ~ 2.8 и рК₂ ~ 7.5-9.5) (Kates et al., 1993). Поэтому при ДΦГ физиологических условиях чаще всего несет только ОДИН отрицательный заряд. При этом гидроксильные группы фосфатов образуют внутримолекулярные водородные связи с центральной гидроксильной группой глицерина, формируя бициклическую резонансную структуру (Haines, 2009):



ДФГ присутствует в обеих мембранах грамотрицательных бактерий, но преимущественно локализуется в ЦМ (Raetz *et al.*, 1979) Латерально в монослоях ДФГ распределен неравномерно (Matsumoto *et al.*, 2006), концентрируясь преимущественно в участках с наибольшей кривизной, образуя домены, функциональная роль которых активно исследуется в последние годы (Mileykovskaya, Dowhan, 2000).

Молекула ДФГ из-за наличия большой гидрофобной области и небольшой полярной головы обладает формой конуса, поэтому кардиолипин имеет склонность к образованию участков с отрицательной кривизной (Lemmin et al., 2013; Renner, Weibel, 2011). По одной из гипотез большая клеточная кривизна реорганизует мембрану и создает упорядоченные липидные домены, которые определяют положение конкретных белков. Термодинамические модели организации внутренней мембраны в бактерии подтверждают данную гипотезу (Renner, Weibel, 2011). В частности, было транспортера пролина ProP показано, что локализация И механочувствительного ионного канала MscS в E.coli является ДФГзависимой (Romantsov *et al.*, 2010).

ДФГ также играет значимую роль в адаптации бактерий к экологическим стрессам, таким как низкая pH, высокая соленость, повышенная температура (Romantsov *et al.*, 2007; Zhang, Rock 2008; Tsai *et al.*, 2011; MacGilvray *et al.*, 2012).

Кардиолипин имеет существенное значение для взаимодействия бактериальной мембраны с антимикробными пептидами и является

фактором, определяющим антибиотикочувствительность (Hung, Lee, 2006). При культивировании грамотрицательных бактерий в присутствии катионных антимикробных пептидов в ЦМ усиливается синтез ДФГ, который впоследствии активно транспортируется в НМ. Значение этого механизма заключается в том, что он позволяет избежать проникновения катионных веществ в периплазматические и цитоплазматические отсеки за счет увеличения поверхностного заряда НМ (Dalebroux et al., 2015). ДФГ может электростатически взаимодействовать с катионными антибиотиками. Предполагается, что существует механизм так называемой «анионной липидной кластеризации» (Epand et al., 2008). Более подробно об этом написано в разделе 1.5, посвященном проблеме антибиотикорезистентности бактерий.

Показано, что $\Phi\Gamma$ может частично заменить $Д\Phi\Gamma$ в клетках *E. coli* (Oliver *et al.*, 2014; Romantsov *et al.*, 2009). Дефицитные по $Д\Phi\Gamma$ клетки менее жизнеспособны в стационарной фазе, тогда как в диких штаммах, напротив, активно экспрессируется кардиолипинсинтетаза, что сопровождается увеличением содержания $Д\Phi\Gamma$, а экспрессия фосфатидилглицеролфосфатсинтетазы подавляется (Koprivnjak *et al.*, 2011; Hiraoka *et al.*, 1993).

Исследования физиологического значения модификаций в головных группах и составе жирных кислот липидов в последние годы только набирают обороты. Сейчас не вызывает сомнения тот факт, что изменения в физико-химических свойствах мембранных липидов должны коррелировать с их временным влиянием на конформацию а, следовательно, и функцию мембранных белков. Последние, в свою очередь, являются основным интерфейсом, обеспечивающим взаимодействие между окружающей средой и клетками эктотермных организмов. Поэтому нормальная жизнедеятельность бактериальной клетки возможна только при условии поддержания их функциональной активности.

1.3. Порины

Порины были найдены во всех грамотрицательных бактериях и даже отдельных группах грамположительных (Novikova et al., 2009). Принято выделять специфические и неспецифические (общие) порины. К первой группе относят, например, такие порины как, LamB и ScrY, через которые специфических субстратов осуществляется транспорт c помощью облегченной диффузии. LamB осуществляет транспорт мальтозы; ScrY канал для проведения сахарозы. Однако они также могут пропускать более крупные олигосахариды группы мальтозы и сахарозы соответственно. Поэтому субстратное узнавание поринов этих не является высокоспецифичным (Yamashita, Buchana, 2010).

Среди белков НМ грамотрицательных бактерий доминируют общие порины, не обладающие субстратной специфичностью (Портнягина *u др.*, 2004). К этой группе относят, например, такие порины, как OmpF, OmpC и PhoE. Все они имеют довольно высокую степень гомологии, однако через них диффундируют молекулы разного размера и заряда. Показано, что через OmpF и OmpC предпочтительно транспортируются катионы, в то время как через PhoE, который экспрессируется в клетке в отсутствие фосфата, в основном проходят анионы (Scholten, Tommassen, 1994).

Неспецифические порины бактерий имеют общий план строения. Они состоят из антипараллельных β-тяжей, которые укладываются в β-баррели (бочонки) так, что первый тяж взаимодействует с последним. В результате в мембране β-тяж, формируется канал (или пора). образованный гидрофобными и гидрофильными аминокислотными остатками, является амфифильной структурой, чья гидрофильная часть обращена внутрь, в пору, а гидрофобная экспонирована снаружи. В-тяжи по обе стороны НМ соединены петлями. Более длинные петли обращены во внеклеточное пространство, короткие – в периплазматическое (Nikaido, 1992). Пора, сформированная баррелем, наполнена водой и обеспечивает пассивную диффузию основных питательных веществ с молекулярной массой не более 600 кДа (Novikova *et al.*, 2009; Yamashita, Buchana, 2010; Dhakshnamoorthy *et al.*, 2013).

Большинство поринов (OmpF, OmpC, OprP, и PhoE) являются тримерами. Но такие порины, как OccD1, OmpG и NanC, существуют в мономерной форме (Niramitranon *et al.*, 2016).

Исследования показывают, олигомеризация что важна для функциональной активности поринов, так как способствует она формированию активных сайтов, повышает сродство белкового комплекса к лиганду и увеличивает его стабильность (Ali, Imperiali, 2005; Pereira-Leal et al., 2007). Сравнительный анализ неспецифического порина OmpF E. coli и субстрат-специфического OprP *P. aeruginosa* показал, что функционирование общих поринов в большей степени зависит от олигомеризации. В мономерной форме OmpF превращается в анион-селективную пору, в то время как OprP сохраняет свою прежнюю активность (Niramitranon et al., 2016).

Пориновые каналы открыты большую часть времени, но они могут закрываться при высоком напряжении или в присутствии осморегулирующих периплазматических глюканов, что было показано в экспериментах *in vitro* (Delcour *et al.*, 1992).

По данным кристаллографических исследований общие порины состоят из 16 β-тяжей, формирующих баррель, и 8 петель, обращенных во внеклеточное пространство. Наиболее протяженной является петля L3, которая имеет важное физиологическое значение. Она проникает внутрь барреля, образуя сужение и обеспечивая субстратную селективность канала (Yamashita, Buchana, 2010).

В месте сужения присутствует сильное электрическое поле, сформированное за счет наличия кислых аминокислотных остатков в петле L3 и основных аминокислотных остатков на противоположной стенке

барреля. Это электрическое поле имеет большое значение для проводимости канала (Pongprayoon, 2014). Проникающие ионы взаимодействуют со стенкой канала, и в этом смысле движение ионов по порину нельзя рассматривать как простую диффузию, что подтверждено многочисленными исследованиями по измерению проводимости и селективности поринов в растворах с различной ионной силой и pH, а также при мутациях, приводящих к заменам аминокислотных остатков участка сужения поры (Bredin *et al.*, 2002; Alcaraz et al., 2004; Lauman et al., 2008; Delcour, 2009). Большое значение для стабилизации тримерной структуры порина в нативной мембране имеет петля L2 (Achouak et al., 2001). Петля L2 направлена в сторону от того мономера, частью которого она является, частично закрывая вход в пору соседнего мономера. Между центральной частью петли L2 и основанием петли L3 формируется солевой мостик, благодаря которому тримерная структура порина является очень стабильной, особенно к повышению температуры (Ulmschneider, Sansom, 2001). Петли L1 и L4 также важны для взаимодействия между мономерами в тримерных формах многих общих поринов (Galdiero et al., 2012).

В эксперименте с OmpF *E. coli* было показано, что петли L1, L7 и L8 участвуют в конформационных изменений, формируя «крышку» над порой, которая может закрывать канал в условиях понижения pH (Baslé *et al.*, 2004).

Типичный геном грамотрицательной бактерии кодирует также небольшие белки HM, состоящие из 8 или 10 тяжей. К числу таких белков относится OmpA, являющийся основным компонентом HM *E. coli*. Однако главной для этого белка является структурная функция: к нему прикреплен пептидогликан. Другим интересным небольшим белком, функционирующим как канал в *E. coli*, является OmpW. Этот белок также состоит из 8 тяжей и, как показывают исследования, вовлечен в бактериальный механизм защиты от стресса (Nandi *et al.*, 2005). В составе мембраны *E. coli* найдены и другие небольшие порины: OmpX, PagP, OmpT и OmpLA (Yamashita, Buchana, 2010).

Исследования показывают, что гидрофильные антибиотики проникают в клетку через пориновые каналы (Nikaido, 2003). Была доказана роль поринов в развитии антибиотикорезистентности бактерий (Davin-Regli *et al.*, 2008; Pagès *et al.*, 2008). Экспрессия этого белка может существенно снижаться при неблагоприятных условиях. Негативная регуляция экспрессии гена *ompF* является одним из механизмов повышения антибиотикорезистентности бактерий (Quinn *et al.*, 1986; Tzouvelekis *et al.*, 1994).

1.4. Липид-белковые взаимодействия и конформация белков

Как уже было отмечено, липидный состав биологических мембран может изменяться в зависимости от условий культивирования бактерий или различаться у различных видов микроорганизмов. Этот факт довольно интересен, поскольку важные биологические структуры в клетке чрезвычайно консервативны. Например, белок, выполняющий конкретную функцию в одном типе клеток, очень похож на белок с той же самой функцией в другом типе клеток, в то время как химическая структура молекул липидов в биологических мембранах очень вариабельна (Lee, 2011).

Сотни молекулярных видов индивидуальных фосфолипидов представлены в бактериальных, и тысячи в мембранах эукариотичексих клеток, хотя одного или двух фосфолипидов вполне достаточно для формирования стабильной бислойной структуры. Биологическая роль такого разнообразия связана с необходимостью поддерживать структурную и функциональную активность мембранных белков, которая напрямую зависит от физико-химических свойств липидов, и, тем самым, обеспечивать физиологические процессы в клетке (Vance, Vance, 1996).

Структура и состав липидов установлены для многих организмов. Однако глубокого понимания функций отдельных липидов нет даже для таких простых и хорошо изученных организмов, как *E.coli*. Исследование липид-белковых взаимодействий в мембране осложняет тот факт, что белки находятся в контакте с липидами в разной степени (Barrera *et al.*, 2013). В связи с этим липиды принято делить на аннулярные и неаннулярные.

Аннулярные липиды сольватируют белки, связываясь с гидрофобными и/или гидрофильными участками. Исследования показали, что взаимодействия аннулярных липидов с мембранными белками слабые и неспецифические (Lee, 2003).

Неаннулярные липиды расположены между трансмембранными участками α-спиралей или внутри субъединиц белкового комплекса. Они связываются с различными гидрофобными участками белков или белковых комплексов мембраны и обладают более высоким сродством к мембранным белкам, чем аннулярные липиды (Lee, 2011; Hsia *et al.*, 2015).

Оба типа липидов оказывают определенное влияние на структуру и функцию белков. Эффект аннулярных липидов определяется, во-первых, между гидрофобным степенью соответствия белковым кором И окружающими его ацильными цепями, а, во-вторых, распределением заряда групп полярных головных липида И аминокислотных остатков, расположенных на границе с водно-липидной фазой, что подтверждено многочисленными экспериментами (Hsia et al., 2015). Так, было показано, гидрофобного что изменение степени соответствия определяет конформационное состояние механочувствительного канала высокой проводимости (MscL) E. coli. Увеличение толщины бислоя за счет удлинения ацильных цепей способствует закрытию данного канала (Perozo *et al.*, 2002).

Гидрофобное несоответствие между белком и бислоем может быть разрешено различными способами. Липидный бислой может сжиматься или расширяться, чтобы соответствовать гидрофобной толщине белка. Однако показано, что толщина бислоя приблизительно одинакова у разных мембран (25-30 Å). К тому же подобного рода искажения бислоя являются энергетически затратными. Поэтому липиды, которые могут связаться с белком без изменения толщины бислоя, будут значительно активнее с ним взаимодействовать. липиды, образующие бислой. чем неравный гидрофобной области белка. Известно, что гидрофобная толщина OmpF порина E. coli в бислое определяется положением ароматических колец его аминокислотных остатков и составляет около 24 Å; схожую гидрофобную толщину имеет бислой ди-(C14:1)-ФХ (около 21 Å). Установлено, что данный молекулярный вид ФХ имеет высокую константу связывания с OmpF. По мере увеличения длины ацильной цепи до C20 константа связывания с порином значительно снижается, в то время как дальнейшее увеличение длины жирнокислотного хвоста до С24 приводит лишь к небольшим ее изменениям. Эти данные свидетельствуют о том, что при начальном увеличении длины жирных кислот с С14 до С20 липидный бислой вокруг β-баррелей становится тоньше, но при дальнейшем увеличении длины углеводородной цепи деформируется сам В-баррель для оптимизации взаимодействия с бислоем (Lee, 2003).

Эффект длины жирных кислот на связывание фосфолипидов с βбарельными белками сильно отличается от такового с α-спиральными белками. Последние, вероятно, в большей степени способны к изменению своей конформации (Lee, 2003).

Конформационные изменения белка, которые необходимы для достижения гидрофобного соответствия с липидным бислоем мембраны, могут привести к изменению его функции.

Головная группа аннулярного липида также имеет большое значение для структуры и активности белка. Взаимодействие между головными группами липида и заряженными группами аминокислотных остатков белка во многом определяет конформацию белка и его функциональный статус. В работе с белком TmrAB из *Thermus thermophiles*, членом суперсемейства ABC-транспортеров, было показано, что белок имеет значительно большее сродство к анионному липиду $\Phi\Gamma$, чем цвиттерионному $\Phi\Theta$ (Bechara *et al.*, 2015). Напротив, важная роль $\Phi\Theta$ была показана в формировании активной конформации метародопсина II. По мнению авторов, в основе данного процесса лежит образование водородных связей между $\Phi\Theta$ и остатком Glu-134 в родопсине (Soubias *et al.*, 2010).

Необходимо отметить, что в настоящее время проблема селективности мембранных белков к липидам активно исследуется. Так, по мнению Лагановского А. с соавторами, решение вопроса селективности необходимо для понимания роли липидов в функционировании белков и связывании ими лекарственных препаратов (Laganowsky et al., 2014). Работая над данным вопросом, авторы показали избирательную модуляцию структуры и функций трех мембранных белков. Так, ими было установлено, что различные фосфолипиды связываются неизбирательно и с высокой авидностью с механочувсвительным каналом высокой проводимости Mycobacterium tuberculosis, придавая стабильность этой белковой структуре. Тем не менее, фосфатидилинозитол (ФИ) в наибольшей степени стабилизирует структуру MscL. Вероятно, это связано с тем, что ФИ играет важную роль в функционировании данного канала (Zhong, Blount, 2013). Для аквапорина Z *E. coli* (AqpZ) также была показана стабилизация структуры разными липидами. Выявлено, что ДФГ в наибольшей степени препятствовал разворачиванию АqpZ. С помощью функциональных анализов авторам удалось также доказать модулирующую активность кардиолипина в отношении функции данного аквапорина.

Исследования с использованием штаммов *E. coli* с регулируемым мембранным липидным составом (Bogdanov *et al.*, 2008, 2010a; Bogdanov, Dowhan, 2012) в сочетании с методами определения топологии белка показали, что липидные молекулы являются важнейшим фактором,

определяющим ориентацию трансмембранного домена белка по отношению к плоскости бислоя (Bogdanov et al., 2014). В экспериментах in vivo и in vitro было доказано, что топология трансмембранного домена пермеазы лактозы (LacY) чувствительна к плотности заряда на поверхности мембраны. Белок формирует свою нативную топологию в протеолипосомах, состоящих из фосфолипидов (ФЭ, ΦX) полярных липидов: или гликолипидов (моноглюкозилдиацилглицерина, диглюкозилдиацилглицерина). Протеолипосомы, сформированные только анионными липидами (ФГ, кардиолипин), не обеспечивают нативную топологию LacY (Vitrac et al., 2013).

На сегодняшний день в литературе имеется много сведений о том, что ромбовидная протеаза *E. coli* GlpG активна в присутствии Φ Э, но не Φ Х (Urban, Wolfe, 2005).

Неаннулярные липиды напрямую взаимодействуют с белком, определяя его активность, и могут выступать в качестве кофактора для мембранных белков. Так, например, считается, что взаимодействие ФГ, не входящего в состав аннулярного слоя вокруг кальциевого канала KcsA, помогает упаковке белка и поддерживает его проводимость (Marius *et al.*, 2012).

К другой функции неаннулярных липидов относится их аллостерический эффект на регулирование активности белков, например, рецепторов, связанных с G-белком (Pucadyil, Chattopadhyay, 2004).

Наконец, взаимодействие между неаннулярными липидами и мембранными белками имеет важное значение для включения белков в липидные домены (рафты), существование которых до недавнего времени признавалось только в эукариотах и рассматривалось как фундаментальный признак эволюционного развития многоклеточных организмов. Однако последние данные показывают, что липидные рафты широко распространены в бактериях, которые организуют многие процессы передачи информации,

секреции белков и транспорт веществ с помощью мембранных микродоменов, подобных липидным рафтам эукариотических клеток (Bramkamp, Lopez, 2015).

Фолдинг и функционирование мембранных белков контролируется не только специфическими, но также и неспецифическими взаимодействиями с формирующими мембрану липидами.

Ha протяжении длительного времени исследуется значение мембранной кривизны для модулирования активности белков И биологических процессов в целом (Epand et al., 2015). Спонтанная кривизна влияет на сворачивание и вставку пептидов и белков в бислой. По мнению некоторых авторов, в основе взаимодействия амфифильных α-спиральных пептидов с липидным матриксом может лежать тот же принцип, что и у βбаррельных белков грамотрицательных бактерий. В связи с этим они удобной исследования липид-белковых являются моделью для взаимодействий в биологической мембране (Strandberg, Ulrich, 2015).

Было показано, что в бислое с отрицательной спонтанной кривизной, сформированном 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолином, амфифильные всегда катионные пептиды связываются только С поверхностью бислоя, то есть ориентируются параллельно плоскости мембраны. С другой стороны, бислой с положительной кривизной, образованный 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолином (ДМФХ), способствует полному включению пептидов, то есть их трансмембранному положению. Примечательно, что фолдинг и вставка β-баррельных белков протекает легче в бислоях с положительной кривизной, в то время как отрицательная кривизна препятствует этим процессам (Strandberg, Ulrich, 2015).

Правильный фолдинг OmpA, идеальная β-баррельная структура которого жизненно важна для стабильности внешней мембраны *E. coli* (Wang, 2002), наблюдалась после реконструкции белка, растворенного в

детергенте, в малые моноламеллярные везикулы, образованные ДМФХ. В последующих исследованиях авторами была показана возможность рефолдинга OmpA из раствора мочевины при ее разбавлении и добавлении моноламеллярных везикул ДМФХ (Surrey, Jahnig, 1995).

Значение кривизны мембраны для прямого контроля функциональной активновности белка было также показано для ЦТФ: фосфохолинцитидилтрансферазы (Attard *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2001) и родопсина (Soubias *et al.*, 2010).

Большую роль в определении функционального статуса белков также играет наличие «дефектов» в структуре мембраны. В данном случае под термином «дефект» подразумевается наличие небислойной структуры (кубической или гексагональной фазы). Показано, что фермент таффазин, представляющий собой неспецифическую фосфолипид-трансацетилазу, более активен в мицеллах или агрегатах гексагональной фазы, чем в плоском бислое (Schlame *et al.*, 2012).

Фолдинг β-баррельных белков НМ осуществляется главным образом с помощью субъединицы ВатА белкового комплекса ВАМ (β-barrel assembly machinery) НМ, который ускоряет их сборку и вставку в бислой. На примере OmpA порина *E. coli* было показано, что бактериальные липиды ФЭ и ФГ создают кинетический барьер для фолдинга белка в мембране, в то время как ФХ, отсутствующий в мембранах *E. coli*, способствует быстрому и эффективному сворачиванию порина. НМ и ЦМ грамотрицательных бактерий имеют в своем составе одни и те же липиды, создающие приблизительно равные кинетические барьеры, тогда как ВатА способен снижать кинетический барьер, налагаемый липидами НМ. Поэтому вновь синтезируемый порин в развернутой форме транспортируется из ЦМ в НМ, где при участии ВатА происходит фолдинг белка. Встраивание поринов в ЦМ могло бы привести к нарушению протонных градиентов и гибели клеток (Gessmann *et al.*, 2014), которая также может быть вызвана путем нарушения работы BamA. В связи с этим BamA, позволяющая антибиотикоустойчивым клеткам грамотрицательных бактерий поддерживать свой защитный барьер, предлагается использовать в качестве мишени для новых антиинфекционных препаратов (Gu *et al.*, 2016).

Таким образом, последние исследования указывают на непосредственное участие липидов в различных фундаментальных клеточных процессах. Липиды определяют структурные свойства белков, их топологию в мембране и функциональную активность (Cournia *et al.*, 2015; Dowhan *et al.*, 2004).

1.5. Взаимосвязь между белками внешней мембраны, липидами и антибиотикорезистетностью грамотрицательных бактерий

Ha сегодняшний устойчивость антибиотикам день к является глобальной медицинской проблемой. Различные способы адаптации бактерий, позволяющие им приспосабливаться к изменяющимся условиям среды, вероятно. лежат И В основе антибиотикорезистентности И устойчивости к иммунной системе хозяина. В связи с этим, понимание процесса адаптации важно для расшифровки механизмов вирулентности бактерий и выбора новых стратегий для медикаментозного лечения заболеваний.

Некоторые бактерии устойчивы к определенным антибиотикам по своей природе. Как уже было отмечено, НМ грамотрицательных бактерий обеспечивает дополнительный уровень защиты, что делает их значительно более устойчивыми в сравнении с грамположительными бактериями в отношении некоторых антибиотиков. Так, например, даптамицин и ванкамицин, используемые против грамположительных бактерий, абсолютно не эффективны для грамотрицательных бактерий (Tsuchido, Takano, 1988; Randall *et al.*, 2013; Blair *et al.*, 2015).
Однако бактерии также могут приобретать устойчивость к различным антибиотикам. Это может осуществляться посредством различных механизмов. Во-первых, некоторые бактерии способны инактивировать антибиотик путем его ферментативного гидролиза или модификации. Вомутаций результате генетических посттрансляционных вторых, В И модификаций в бактериях могут изменяться отдельные структуры, являющиеся мишенями для антибиотиков. Большинство антибиотиков с высоким сродством связываются со своими специфическими мишенями в бактериальной клетке и, тем самым, препятствуют ее нормальному функционированию и жизнедеятельности бактерии в целом. Изменения в целевой структуре, которые не позволяют антибиотику эффективно связываться с ней, но при этом не приводят к потере её функций, могут придавать устойчивость бактериям к антибиотикам (Blair et al., 2015). Втретьих, в основе механизмов резистентности бактерий лежат процессы, направленные на снижение концентрации антибиотика внутри клетки из-за его затрудненного прохождения через мембрану. Последний механизм реализуется за счет изменений в липидном и/или белковом составе, а также активации эффлюксных насосов (efflux pumps) (Hooper, 2001; Nikaido, 2003; Nikaido, 2009; Wright, 2011; Steinbuch, Fridman, 2016; Fernández, Hancock, 2012; Purushothaman et al., 2016). Необходимо отметить, что обычно эти механизмы не изолированы друг от друга, а работают синергетически.

В силу того, большинство антибиотиков ЧТО нацелено на дестабилизацию внутриклеточных процессов, их эффективность во многом зависит от способности проникать в бактериальную клетку. Особенно мощным барьером на пути антибиотиков является НМ грамотрицательных бактерий (Delcour, 2009). В зависимости от природы антибиотика. существует два основных способа преодоления этого барьера: липидопосредованный и порин-опосредованный. Гидрофобные молекулы, к которым относятся макролиды, аминогликозиды (гентамицин, канамицин),

катионные пептиды и ряд других лекарственных препаратов, диффундируют в клетку через гидрофобный липидный бислой. Гидрофильные молекулы, неспецифические например, в-лактамы. используют порины ДЛЯ проникновения в клетку. Некоторые из антибиотиков могут использовать оба пути. В качестве примера можно привести тетрациклин и хинолоны. Следовательно, как липидные, так и белковые компоненты НМ в основном определяют чувствительность бактерий к антибиотикам, а различные белков способствуют модификации И липидов развитию антибиотикорезистентности (Delcour, 2009; Nikaido, 2003).

Стимулирование пассивной диффузии через липидный бислой является перспективной идеей для разработки эффективных препаратов. Однако наше ограниченное понимание взаимодействия антибиотиков с компонентами мембраны значительно тормозит поиски решения проблемы Исследование антибиотикорезистентности. тонких механизмов взаимодействия липидов с лекарственными препаратами важно также для разработки эффективных систем липосомальной доставки лекарственных средств, которые в силу своей низкой токсичности и биосовместимости имеет важное терапевтическое значение (Sousa, Gameiro, 2013; Allen, Cullis, 2013).

К настоящему времени накопилось много сведений об изменениях в ЛПС, направленных на противодействие антибиотику. Главным образом, модификации ЛПС связаны с изменением общего заряда, уменьшением степени порядка в ацильных цепях, а также с гликозилированием кора ЛПС (Steinbuch, Fridman, 2016; Delcour, 2009; Carola, Knech 2012; Kerrinnes *et al.*, 2015).

Устойчивость к антимикробным препаратам также вырабатывается путем трансформации фосфолипидного состава мембраны бактерии. Показано, что в ответ на применение антибиотиков липидный состав мембран способен к значительным перестройкам. Так, например, обработка *P. aeruginosa* тетрациклином и ципрофлоксацином приводила к увеличению содержания фосфолипидов с одновременным понижением уровня При нейтральных липидов. этом жирнокислотный состав липидов качественно оставался стабильным: из 13 основных ЖК 11 присутствовало во всех исследуемых образцах. Но изменялось соотношение различных ЖК. Индекс ненасыщенности ЖК уменьшался в обработанных клетках, что указывает на повышение ригидности липидов и, следовательно, понижение проницаемости клеточной мембраны (Yehia et al., 2015).

Многочисленными исследованиями подтверждено то, что важное значение во взаимодействии патогена с антибиотиком играет соотношение между анионными и цвиттерионными липидами. При этом необходимо отметить, что при различных pH один и тот же антибиотик может находиться в протонированной или депротонированной форме и поэтому будет поразному взаимодействовать с липидным бислоем в определенных условиях.

Отрицательно заряженные анионные липиды, в отличие от цвиттерионных, могут электростатически взаимодействовать с мембранными белками и катионными антибиотиками. Предполагается, что существует механизм так называемой «анионной липидной кластеризации», лежащий в основе устойчивости бактерий к катионным антимикробным пептидам (Epand *et al.*, 2008).

В присутствии избытка ФЭ анионные фосфолипиды равномерно распределяются в бислое мембраны. Взаимодействие поликатионного приводить антибиотика будет с ними к группировке анионных фосфолипидов, заставляя их отделяться от цвиттерионного ФЭ. В результате будут формироваться отдельные дефекты на границе разделов липидных фаз, нарушающие барьерную функцию мембраны. Поэтому для повышенного количества анионных фосфолипидов в мембране потребуется увеличение концентрации катионного антибиотика, чтобы разделить мембрану на липидные фазы и сформировать дефекты на их границе (Bishop, 2014).

Несмотря на то, что обычно анионную кластеризацию связывают с ФК и ДФГ, нельзя исключить участие ФГ в этом процессе.

Было обнаружено, что снижение уровня Φ Э способствует резистентности бактерий к некоторым антибиотикам, таким как полимиксин В (Kerrinnes *et al.*, 2015), а также к некоторым антибактериальным пептидам (Carola, Knech, 2012). Было показано, что фосфолипаза A₁, специфичная к Φ Э, поддерживает его низкий уровень в мембране *Brucella melitensis*, за счет чего повышается устойчивость бактерии к полимиксину В. Предполагается, что этот механизм дает дополнительные преимущества при инфицировании хозяина (Kerrinnes *et al.*, 2015).

Так как фосфолипиды определяют топологию мембранных белков (Zhang, Rock, 2008), то изменение баланса фосфолипидов влияет также и на функционирование белков, в том числе тех, которые участвуют во взаимоотношении с клетками организма-хозяина и проведении антибиотиков в клетку. Возможность регулирования работы многих белков посредством изменений в липидном составе бактериальной мембраны, в том числе за счет изменения кривизны бислоя, широко описан в соответствующей литературе и обсуждается в предыдущей главе настоящего обзора.

В НМ наблюдается большое разнообразие белков, однако лишь некоторые из них представлены большим количеством копий. К таким белкам относится липопротеин Lpp, OmpA и неспецифические порины (Nikaido, 1994).

В то время как Lpp и OmpA в основном несут структурную функцию, неспецифические порины обеспечивают транспорт небольших молекул, в том числе и малых гидрофильных молекул, обладающих антибактериальным эффектом, и, следовательно, оказывают значительный эффект на восприимчивость бактерий к некоторым антибиотикам.

Известно, что снижение транспорта антибиотика в бактериальную клетку может быть достигнуто за счет падения уровня экспрессии поринов,

замены одного канала в мембране на другой, более селективный, а также путем функциональных изменений, обусловленных специфическими мутациями. Например, *P. aeruginosa* в составе своей мембраны имеет различные пориновые каналы, каждый из которых специализируется на специфических молекул питательных поглощении веществ и имеет приблизительно в 100 раз более низкую проницаемость для малых гидрофильных молекул, чем большинство диффузионных каналов других организмов. В связи с этим некоторые штаммы *P. aeruginosa* оказались устойчивыми к антибиотику имипенему, так как они утратили пориновые каналы, обычно осуществляющие транспорт этого антибиотика. Клетки Е. *coli* способны временно снижать производство определенных поринов в ответ на воздействие салициловой кислоты, а также в ответ на повышение концентрации тетрациклина (Pagès *et al.*, 2008).

Для другой энтеробактерии, *Y. pseudotuberculosis*, было показано снижение экспрессии гена OmpF поринового канала в ответ на применение двух антибиотиков, налидиксовой кислоты и канамицина. Интересно отметить, что канамицин, для которого пориновый канал не является основным маршрутом доставки, лишь в незначительной степени снижал уровень экспрессии *ompF* (Bystritskaya *et al.*, 2014).

Изменение функции порина, приводящее к снижению скорости проникновения препаратов в клетку – еще один механизм, лежащий в основе антибиотикорезистентности бактерий. Этот механизм главным образом осуществляется путем мутации в петле L3, приводящей к снижению диффузии через пориновый канал. Единичные мутации в аминокислотной последовательности петли приводят к искажению ее структуры, изменению ее заряда, в результате чего просвет поры может сужаться, а эффективное взаимодействие с антибиотиком ослабляться (De *et al.*, 2001; Delcour, 2009).

Функциональная активность поринового канала может быстро изменяться путем связывания лиганда или под влиянием различных физико-

41

химических факторов (Delcour, 2009). Существуют электростатические взаимодействия между проникающими ионами и зарядами ионизированных остатков аминокислот по всей длине канала. Поэтому движение ионов в поре нельзя рассматривать как простую диффузию. Природа и положение конкретных зарядов в порине и антибиотике играют важную роль для диффузии последних внутрь клетки. Чем лучше антибиотик связывается с каналом, тем выше его диффузия. Показано, что для OmpF проницаемость цвиттерионных антибиотиков примерно в 50-60 раз больше, чем у их моноанионных аналогов (Delcour, 2009).

Такие факторы, как сдвиг рН или мутации, связанные с заменой аминокислот, существенно отдельных остатков влияют на ионную селективность канала (Bredin et al., 2002; Lauman et al., 2008). Поэтому проводимость канала определяется не только размером поры, но и степенью взаимодействия проникающих ионов со стенками барреля. Увеличение размера поры не всегда сопровождается изменением ее проводимости. По этой строгой, однозначной причине нет корреляции между антибиотикочувствительностью бактерии и диаметром канала (Nikaido, 1994; Bredin et al., 2002; Lauman et al., 2008).

Следовательно, проницаемость мембраны для антибиотиков зависит от многих факторов, в том числе она определяется природой самих антибиотиков, которые, в зависимости от степени протонирования, могут использовать различные пути проникновения в клетку.

Кратко суммируя приведенные данные, важно подчеркнуть, что механизмы антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий реализуются за счет модификаций основных компонентов клеточной мембраны: белков, липидов, а также ЛПС. Поэтому изменения в липидбелковой составляющей мембран, особенно НМ, связанные с адаптацией грамотрицательных бактерий к различным условиям окружающей среды могут быть использованы в качестве естественного инструмента для

42

преодоления антибиотикорезистентности и повышения эффективности антиинфекционной терапии с помощью обычных, а не вновь создаваемых антибиотиков.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Бактериальные штаммы и условия культивирования

В работе использовали дикий штамм 488 и лабораторный штамм KS 3058 *Y. pseudotuberculosis* O:Ib серовара.

Культивирование бактерий *Y. pseudotuberculosis*, экстракция и анализ общих липидов были выполнены в лаборатории Молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН. Порин YOmpF был выделен из *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598, серовар O:IB) по методу, описанному Новиковой О.Д. с соавторами (Новикова *и др.*, 1989), и любезно предоставлен в виде раствора в 0.03М трис–HCl буфере, pH 7.8 с 0.125% ноктил-β-D-глюкопиранозида (Sigma, США) сотрудниками данной лаборатории.

Штамм KS 3058 выращивали в аэробных условиях при температуре 8 °C в питательном бульоне (Махачкала, Россия) со встряхиванием при 180 об/мин в течение 6 суток до достижения ранней стационарной фазы (Bakholdina *et al.*, 2001). Бактерии обрабатывали 1%-ным раствором фенола в течение 20 мин или оставляли интактными, затем использовали для получения общих липидных экстрактов для последующего эксперимента по исследованию влияния адаптационных изменений липидов на конформацию YOmpF.

Штамм 488 *Y. pseudotuberculosis* культивировали в LB-среде (Becton, Dickinson, Нидерланды). Бактериальные клетки выращивали до логарифмической фазы ($OD_{600} = 1$) при 8 °C или 37 °C в аэробных условиях со встряхиванием при 180 об/мин. Часть бактерий, выращенных при 8 °C, подвергали тепловому шоку, который индуцировали в клетках путем резкого повышения температуры культивирования до 45 °C и последующей инкубации в течение 30 мин на водяной бане (RSB - 12, Remi Elektrotechnik Limited, Индия) при этой же температуре.

Для определения влияния экстракта полифенолов из шелухи гречихи на фосфолипидный состав *Y. pseudotuberculosis* клетки штамма 488 культивировали в разных условиях: в LB-среде, LB-среде с 0.5% глюкозы и LB-среде с 0.5% глюкозы с добавлением 0.1 мг/мл экстракта полифенолов из гречихи. Бактериальные клетки выращивали до логарифмической фазы в аэробных условиях со встряхиванием при 180 об/мин при температуре 8 °C.

Бактерии отделяли от культуральной среды путем центрифугирования при 1200 g в течение 20 мин, а затем дважды промывали физиологическим раствором (0.85% NaCl).

2.2. Получение фракций наружной и внутренней мембран Yersinia pseudotuberculosis

Процедура разделения НМ и ЦМ базировалась на методике равновесного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы Осборна М. и соавторов (Osborn *et al.*, 1972), модифицированной Парком Дж. и соавторами (Park *et al.*, 2012).

Сферопласты клеток *Y. pseudotuberculosis*, штамм 488 были получены в результате обработки клеток смесью лизоцим-ЭДТА. Клетки были суспендированны в холодном растворе 10 мМ трис–HCl, pH 7.8, содержащем 0.75 М сахарозы, из расчета 30 мл раствора на 1 г клеток. Лизоцим добавляли до конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали на льду 2 мин при интенсивном перемешивании.

Клеточную суспензию медленно разбавляли двумя объемами 1.5 мМ ЭДТА (Na⁺), pH 7.5 на льду. Полученные сферопласты лизировали ультразвуком 4 раза по 30 с с интервалом в 1 мин (для суспензии объемом 25 мл). Целые клетки и мембранные агрегаты удаляли центрифугированием в режиме 1200 g, 20 мин. Затем отбирали 2/3 супернатанта, чтобы исключить загрязнение клеточным дебрисом.

Супернатант центрифугировали при 200,000 g, 10 °C в течение 60 мин

(ротор TLA 110, ультрацентрифуга Optima MAX-XP, Beckman coulter, США). Полученный из 1 г клеток мембранный осадок промывали холодным раствором 0.25 мМ сахарозы, 3.3 мМ трис–HCl и 1 мМ ЭДТА (Na⁺), pH 7.8 и центрифугировали 90 мин при 200,000 g.

Отмытый мембранный осадок растворяли в 2 мл холодной 25%-ной сахарозы (по весу) в 5 мМ ЭДТА(Na⁺), рН 7.5 и встряхивали на вортексе. 0.8 мл общей мембранной фракции наслаивали на 3.2 мл 35-50%-ного (вес/вес) линейного сахарозного градиента (35%, 40%, 45%, 50%), содержащего 5 мМ ЭДТА, рН 7.5. После центрифугирования при 310,000 g в течение 6.5 ч при 4 °C (ротор SW 60 Ti, центрифуга Optima L-90 K, Beckman coulter, США) мембранные фракции объемом 0.1-0.15 мл собирали со дна пробирки.

2.3. Идентификация фракций наружной и внутренней мембран

Идентификация фракций HM проводили с использованием специфических маркеров HM – порина OmpF и PldA, в то время как, ЦМ была идентифицирована согласно данным плавучей плотности и полному или практически полному отсутствию маркеров HM.

2.3.1. Фото- и рефрактометрия мембранных фракций, полученных в результате равновесного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы

Наличие белка в мембранных фракциях устанавливали спектрофотометрически (UV-2550, Shimadzu, Япония) при 280 нм. При проведении спектрофотометрии в ячейку для сравнения помещали 50%-ный раствор сахарозы. По коэффициентам преломления, полученным методом рефрактометрии, была рассчитана плавучая плотность частиц по следующей формуле:

 $\rho_0 = 2.7329 \ n_{20} - 2.6425,$

где ρ_o – плавучая плотность частиц (плотность раствора сахарозы) при температуре 0 °C, n_{20} – коэффицент преломления при 20 °C (Остерман, 1981).

2.3.2. Электрофоретическое разделение белков мембранных фракций, полученных после равновесного ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы

Собранные после ультрацентрифугирования фракции тестировались с помощью электрофореза на наличие в них специфичных белков, характерных для НМ грамотрицательных бактерий. Электрофорез проводили согласно методике Лэммли (Laemmli, 1970) в ПААГс ДСН. Использовали 5%-ный концентрирующий и 12%-ный разделяющий гели. Разделение проводили при 15 мА, 170 В, 2.3 Вт в течение 1.5-2 ч.

Белки в геле окрашивали Кумасси R-250 в 10%-ной уксусной кислоте и 30%-ном метаноле. Для идентификации мембранных фракций использовали, наряду с маркерами молекулярных масс 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130 и 170 кДа (Termo Scientific, Литва), OmpF в 50%-ной сахарозе, выделенный из бактерий псевдотуберкулеза (Лихацкая *и др.*, 1985).

2.3.3. Вестерн-блоттинг мембранных фракций, полученных в результате ультрацентрифугирования

Наличие PldA в мембранных фракциях, соответствущих спектрофотометрическим пикам, оценивали с помощью вестерн-блоттинга, используя мышиную поликлональную антисыворотку к рекомбинантной *Y*. PldA pseudotuberculosis, была любезно которая предоставлена Лаборатории антибактерального сотрудниками молекулярных основ иммунитета ТИБОХ ДВО РАН)

После ДСН-ПААГ-электрофореза (2.14.2) белки переносили из неокрашенного геля на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм, Millipore, США) с помощью оборудования для полусухого переноса в токе 0.8 мА/см² в

течение ночи при 4 °C в соответствии со стандартной процедурой (Towbin *et al.*, 1979).

Иммунодетекцию проводили согласно протоколу для «SNAP i.d.» (Millipore, США) с первичными мышиными антителами к рекомбинантной PldA *Y. pseudotuberculosis*.

Образовавшиеся комплексы антиген-антитело выявляли иммунопероксидазным конъюгатом козьих антител к IgG мыши (Anti Mouse (HRP), Invitrogen, США) с 3,3⁻ диаминобензидином тетрагидрохлоридом в присутствии перекиси водорода в течение 20 мин при комнатной температуре.

2.4. Экстракция липидов

Общие липидные экстракты были получены ИЗ отмытой физиологическим раствором (0.85% NaCl) бактериальной массы или объединенных мембранных фракций бактериальных клеток по методу Фольча (Folch *et al.*, 1957). Экстракт упаривали на роторном испарителе под вакуумом при 30 °C. Экстракты бактериальных клеток, растворенные в хлороформе, стабилизировали 0.05% 2.6-ди-трет-бутил-п-крезолом И хранили в морозильной камере в плотно закрытой посуде из темного стекла.

2.5. Тонкослойная хроматография

2.5.1. Приготовление пластинок

Для приготовления пластинок использовали высокочистый силикагель с размерами пор 60 Å, частиц 5-25 мкм, объемом пор 0.75 см³/г, без связующего вещества (Sigma –Aldrich, США). На стеклянные пластинки 6х6 см (микро-TCX) и 9×12 см (препаративная TCX) наносили по 2 и 5 мл водной суспензии силикагеля в концентрации 0.23 мг/мл с 10% CaSO₄ x 2H₂O, соответственно. Пластинки высушивали на воздухе и перед применением

активировали 1 ч при 120 °C в сушильном шкафу. Образцы наносили с помощью калиброванного капилляра объемом 5 мкл (Sigma – Aldrich, CША).

2.5.2. Системы растворителей для тонкослойной хроматографии липидов

Для анализа фосфолипидного состава бактерий с помощью двумерной TCX в первом направлении использовали систему хлороформ-метанолбензол-28%-ный аммиак (65:30:10:6, об/об), а во втором направлении – систему хлороформ-метанол-бензол-уксусная кислота-ацетон-вода (70:30:10:5:4:1, об/об) (Vaskovsky, Terekhova, 1979). Для анализа ФЛ методом одномерной TCX использовали систему хлороформ-метанол-вода (65:25:4, об/об).

2.5.3. Обнаружение липидов

Для обнаружения липидов использовали неспецифический реагент – 10%-ный раствор H₂SO₄ в метаноле с последующим нагреванием пластинки при температуре 150 °C.

Из специфических реагентов применяли молибдатный реактив, приготовленный по методу Васьковского В. Е. и соавторов (Vaskovsky *et al.*, 1975) для обнаружения фосфолипидов. Аминосодержащие липиды выявляли с помощью 0.2%-ного раствора нингидрина в ацетоне.

2.6. Количественное определение фофолипидов

Для количественного определения отдельных классов ФЛ в общих липидных экстрактах использовали универсальный молибдатный реагент и описанную для его применения методику (Vaskovsky *et al.*, 1975).

Контрольную пробу для каждого измерения брали отдельно. Поглощение контрольной пробы не превышало 0.04-0.05 единиц оптической плотности. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали раствор однозамещенного фосфата калия и ФХ, выделенный из яичного желтка.

2.7. Препаративное выделение фосфолипидов

Хроматографически чистые $\Phi \ni$ и Л $\Phi \ni$ получали из общего липидного экстракта, выделенного из *Y. pseudotuberculosis*, с помощью препаративной TCX, как описано в разделе 2.3. После хроматографии пластинку высушивали и опрыскивали водой. Обнаруженные таким способом жирные пятна идентифицировали по *Rf*. После высушивания зону сорбента, содержащую $\Phi \ni$ или Л $\Phi \ni$, соскребали с пластинки. $\Phi Л$ элюировали с силикагеля системой хлороформ-метанол (1:1, об/об). Полученный элюат упаривали под вакуумом при 40 °C с помощью роторного испарителя и перерастворяли в хлороформе из расчета 5 мг/мл.

Чистоту полученных препаратов ФЛ контролировали с помощью микро-ТСХ в условиях, описанных в разделе 2.3. Хроматографическая чистота полученных препаратов была не ниже 99%. Препараты фосфолипидов стабилизировали 0.05% 2.6-ди-трет-бутил-п-крезолом и хранили в морозильной камере в плотно закрытой темной посуде.

2.8. Анализ состава жирных кислот общих липидов Y. pseudotuberculosis

Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали по методу (Carreau, Dubacq, 1985). Для их получения использовался свежеприготовленный 5% раствор соляной кислоты в метаноле. Для приготовления раствора к 10 частям метанола добавляли по каплям 1 часть (по объёму) ацетилхлорида (Sigma, Германия). К липидам, растворенным в хлороформе (50 мкл) добавляли 1 мл метилирующей смеси. Смесь нагревали при 90 °C в течение 1 ч в стеклянном флаконе объемом 10 мл. После окончания реакции и охлаждения смеси к ней добавляли 200 мкл дистиллированной воды. Метиловые эфиры экстрагировали трижды 1 мл гексана. Объединенный экстракт упаривали и перерастворяли в гексане. МЭЖК выделяли с помощью микро-TCX в бензоле на пластинках с силикагелем, предварительно активированных при 110 °C в течение 30 мин. Зону сорбента, соответствующую *Rf* 0.6-0.9, переносили на фильтр, МЭЖК элюировали хлороформом. Полученный элюат упаривали, перерастворяли в 100 мкл гексана и исследовали на газо-жидкостном хроматографе Agilent 6890 с пламенно-ионизационным детектором (Agilent, CША). Использовали капиллярную колонку Innowax (25 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), газ-носитель – гелий, линейная скорость – 35 см/сек, температура термостата – 200 ^оC, температура испарителя и детектора – 210 °C. Идентификацию МЭЖК проводили при помощи расчета эквивалентной длины цепи (Christie, 1988).

2.9. Исследование фазовых переходов общих липидов Y. pseudotuberculosis

Для исследования использовали общие липиды, выделенные из Ү. pseudotuberculosis, штамм KS 3058. Необходимое количество липидов, растворенных в хлороформе, переносили в стандартные алюминиевые контейнеры и высушивали под вакуумом до постоянного веса 4-5 мг. Затем к образцам добавляли равное по весу количество смеси вода-этиленгликоль (1:1,об/об). Полученные гидратированные образцы герметично запаковывали специальные микроконтейнеры помещали В И В измерительную ячейку дифференциального сканирующего калориметра (СКБ БΠ PAH, Пущино). ДСМ-2М Температурную зависимость теплопоглощения липидов исследовали в интервале от -100 °C до 60 °C при чувствительности 40 мВт со скоростью 16 °С/мин. По полученным термограммам фазовых переходов липидов определяли температурный интервал перехода и температуру фазового перехода, T_{max} по температуре максимума теплопоглощения. Температурную область измерений калибровали по реперным образцам нафталина, ртути и индия.

2.10. Подготовка липид-белковых комплексов для калориметрических, спектроскопических исследований, ДСН-ПААГэлектрофореза и вестерн-блоттинга

Общие липиды из Y. pseudotuberculosis в хлороформе вносили в алюминиевый микроконтейнер, удаляли растворитель под вакуумом и доводили вес липида до 1 мг. Липиды перерастворяли в 100 мкл 0.03 М трис-HCl буфера, pH 7.8, предварительно подогретого до температуры 40-50 °C. Смесь диспергировали с помощью вортекса (ІКА, Германия). К полученной дисперсии добавляли 0.5 мг порина YOmpF, растворенного в 0.03 М трис-HCl буфера, pH 7.8 с 0.125% октил-β-D-глюкопиранозида, перемешивали на вортексе. Полученную дисперсию выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем порин-липидный комплекс использовали для калориметрических исследований. Для проведения спектроскопических исследований препараты комплексов разбавляли 0.03 М трис–HCl буфером, рН 7.8 до концентрации белка 50 мкг/мл. Аналогично готовили комплексы порина YOmpF с синтетическими липидами (Avanti Polar Lipids, Inc, CША): 1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ЛПФЭ), 1-олеоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ЛОФЭ) и 1,2-дипальмитоил-snглицеро-3-фосфоэтаноламин (ДПФЭ).

Для ДСН-ПААГ-электрофореза и вестерн-блоттинга. 0.5 мг фосфолипидов (ДПФЭ, ЛПФЭ или ЛОФЭ) смешивали с 0.5 мл трис-HCl буфера, pH 6.5, содержащего 10 мМ NaCl. Полученную липидную суспензию обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе Sonifier 250 (Branson, CША) (амплитуда 15%) на льду в течение 3 мин (в режиме 1 мин – работа /1 мин – перерыв). К диспергированным липидам добавляли раствор порина YOmpF (концентрация белка 1 мг/мл в 0.1 М трис-HCl, pH 7.8, содержащего 0.25% ДСН) в соотношении 1:1, по объёму. Смесь порина с липидами инкубировали в течение 15 мин при 75 °С.

2.11. Калориметрическое исследование термоденатурации порина

Термоденатурацию порина индивидуального и в комплексе с липидами исследовали с помощью высокочувствительного дифференциального адиабатического сканирующего микрокалориметра Scal-1 (СКБ БП РАН, Пущино) с объемом ячейки 0.33 мл. Перед анализом все пробы были предварительно дегазированы при помощи дегазатора изотермического титрационного калориметра VP-ITC MicroCal (GE Heathcare, CША).

Полученные комплексы или индивидуальный порин в 0.03 М трис-НС1 буфере, pH 7.8 помещали в ячейку калориметра. Нагрев образцов проводили в диапазоне от 10 °C до 100 °C при чувствительности 50 мкВт со скоростью 1 °С мин⁻¹, при постоянном давлении 2 атм. Для проверки обратимости денатурации использовали процедуру повторного прогрева: образец охлаждали, после чего заново снимали зависимость теплоемкости от температуры. Отсутствие воспроизводимости теплопоглощения пика необратимости процесса денатурации белка. свидетельствовало 0 Температурные зависимости молярной теплоемкости белка при тепловой денатурации используя анализировали, программу, разработанную Кургановым Б.И. с соавторами (Kurganov *et al.*, 1997), и программный пакет ORIGIN (MicroCal., CIIIA).

2.12. Исследование собственной флуоресценции порина

Спектрофлуориметрическое исследование порина в индивидуальном состоянии и в комплексе с липидами проводили методом собственной флуоресценции белка на спектрофлуориметре PC1 (ISS, CША), снабженного программным обеспечением Vinci (ISS, США). Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 296 нм. Ширина щели монохроматора – 3 нм по

53

каналу возбуждения и поглощения. Флуоресценцию измеряли в интервале от 300 до 400 нм с шагом 2 нм. Измерения проводили в растворе белка с оптической плотностью менее 0.2 для предотвращения эффекта внутреннего фильтра. Спектры эмиссии были скорректированы по базовой линии и инструментальной спектральной чувствительности. Деконволюцию (разложение) полученных спектров осуществляли с помощью программы ORIGIN (MicroCal., США).

2.13. ДСН-ПААГ-электрофорез и вестерн-блоттинг порина

В приготовленные комплексы порина с ДПФЭ, ЛПФЭ или ЛОФЭ добавляли равный объем 2х буфера, содержащего 2% ДСН (Bogdanov *et al.*, 2010b).

Перед внесением в гель образцы перемешивали на вортексе (IKA, Германия) в течение 30 мин при комнатной температуре и затем раскапывали по 20 мкл в лунки геля. Электрофорез проводили в 12%-ном разделяющем ПААГ (Bio-Rad Laboratories, США). ДСН отсутствовал в разделяющем и концентрирующем гелях. Электродный буфер содержал 0.1% ДСН.

После гель-электрофореза белки переносили из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану (Whatman-Schleicher and Schuell, Germany) с помощью оборудования для полусухого переноса (Bogdanov *et al.*, 2010b).

Последовательное обнаружение различных форм YOmpF проводили с использованием поликлональных антител (pAb), направленных против термоденатурированной мономерной или нативной тримерной форм YOmpF, соответственно. pAb были получены против соответствующих форм порина, выделенных из клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенной при 8 °C (Cocalico Biologicals, PA, CШA), и очищены с помощью белковой хроматографии (Profinia TM, Bio-Rad).

Нитроцеллюлозную мембрану помещали в 5%-ный БСА в TBS-NP40 и инкубировали в течение 12 ч при 4 °C, отмывали от БСА с использованием

ТВЅ-NР40 в течение 15 мин и инкубировали 1 ч с кроличьими антителами pAb против термоденатурированной мономерной формы YOmpF (1:10000 в TBS-NP40). Мембрану промывали 3 раза с помощью TBS-NP40 в течение 15 мин, инкубировали 1.5 ч с анти-кроличьими антителами, меченными пероксидазой (Thermo Scientific, США), в соотношении 1:10000 в TBS-NP40. Затем повторяли трехкратную процедуру отмывки в TBS-NP40, а также дополнительно проводили отмывку один раз с помощью <u>TBS (</u>10 мМ трис-HCl, 0.9% NaCl, pH 7.4) без детергента Nonidet P-40 в течение 15 мин. Связавшиеся антитела выявляли с помощью хемилюминесцентной системы SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific, США), которую готовили непосредственно перед использованием; компоненты системы смешивали в соотношении 1:1 по объему. Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с готовым хемилюминесцентным субстратом в течение 3 мин.

Для обнаружения антител против нативной тримерной формы YOmpF эту же нитроцеллюлозную мембрану помещали в 5%-ный БСА в TBS-NP40 и инкубировали в течение 12 ч при 4 °C. Процедуру обнаружения антител проводили так же, как описано для термоденатурированной мономерной формы порина, используя pAb против нативной тримерной формы YOmpF.

Визуализацию окрашенных полос на мембране осуществляли с помощью Fluor-S Max^{TM} MultiImager (Bio-Rad Laboratories, США). Для сбора и хранения изображений использовали программное обеспечение Bio-Rad software Quantity OneTM version 4.4.1

2.14. Исследование влияния экстракта полифенолов из шелухи гречихи на резистентность *Y. pseudotuberculosis* к ампициллину

Экстракт полифенолов из шелухи гречихи был получен по оригинальной методике и любезно предоставлен ст. преподавателем кафедры химических и ресурсосберегающих технологий ШЕН ДВФУ Заболотной А.М.

2.14.1. Определение минимальной ингибирующей концентрации ампициллина для *Y. pseudotuberculosis*

Y. pseudotuberculosis, штамм 488 культивировали в LB-среде и LBсреде, содержащей 0.5% глюкозы. Бактериальные клетки выращивали до логарифмической фазы в аэробных условиях со встряхиванием при 180 об/мин, при температуре 8 °C.

Клетки из LB-среды переносили стерильным ватным тампоном (Medline, США) на LB-агар и LB-агар, содержащий 0.1 или 1 мг/мл экстракта полифенолов из шелухи гречихи, а клетки из LB-среды с 0.5% глюкозы переносили на LB-агар с 0.5% глюкозы и LB-агар, содержащий 0.5% глюкозы и 0.1 или 1 мг/мл экстракта полифенолов из шелухи гречихи.

Чашки высушивали в стерильных условиях в течение 15 мин. Затем полоску Е-теста для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) ампициллина (BioMérieux, Франция) помещали на поверхность агаровой среды.

Бактерии культивировали в течение суток при температуре 30 °C. После инкубации результат определяли по шкале разведений ампициллина, нанесенных на стрип Е-теста: место пересечения зоны задержки роста бактерий с тест-полоской соответствует значению МИК. Исследования проводили как минимум в трех повторах для каждой опытной группы.

2.15. Анализ уровня экспрессии *pldA*, *ompF* и *ompC* в зависимости от состава культуральной среды

Экспрессия пориновых генов *Y. pseudotuberculosis* 488 была изучена с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-PB). Суммарная РНК была получена из клеток в поздней экспоненциальной фазе роста (OD₆₀₀ от 1.1 до 1.5), используя Aurum Total RNA mini KIT (Bio-Rad, США) в соответствии с протоколом производителя. Для удаления геномной ДНК проводили ДНКазную обработку с использованием набора RNAse-Free DNAse (Thermo Scientific, США) для удаления геномной ДНК. Концентрацию и чистоту РНК определяли с помощью электрофореза и спектрофотометрии при 260 нм. кДНК (из 2 мкг мРНК) синтезировали с использованием набора MMLV RT kit («Евроген», Россия) и случайных гексамерных праймеров (Табл. 1) согласно инструкции производителя («Евроген», Россия).

кДНК была использована для количественного определения относительного уровня *отр* и *отр* методом ПЦР-РВ в амплификаторе 96 LightCycler (Roche, Швейцария). Результаты стандартизовали относительно уровня транскрипции гена «домашнего хозяйства» 16S rDNA. Специфические праймеры использовались, как указано в таблице 1. Специфичность праймеров и эффективность амплификации были проверены по методу, описанному ранее (Livak, Schmittgen, 2001).

Таблица 1. Праймеры, использованные в ПЦР-РВ

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер		
ompF	5' ATGAATCACCACCGAACACT 3'	5' CAAGACGGCAACGCAAC 3'		
ompC	5' TGACAGGAAGTTATCAGCACC 3'	5 'GACGGGAACCACGACAGT 3'		
pldA	5' CTTTCCCTATCTGGCGTGGT 3'	5 'GCTGTGGCTCGTAGTTGGTTT 3'		
16S	5' CTTGATTTCCCACCATTACG 3'	5' ATTTAGCCGAGATGCTTTAG 3'		
rDNA				

Реакции проводили с использованием HS GoTaq ДНК-полимеразы (Promega, США) и флюоресцентного интеркалирующего красителя Eva Green (Biotium, США) согласно рекомендациям производителей. Реакцию осуществляли в следующих условиях: начальная денатурация при 95 °C – 8 мин; 40 циклов, включающих 15 с при 95 °C, 10 с при 55 °C и 20 с при 72 °C с последующим определением флуоресценции.

Для увеличения специфичности ПЦР кривую плавления определяли после 40 циклов аплификации. Чистоту выделенной РНК определяли в ходе реакции ПЦР без обратной транскриптазы. Также оставляли негативный контроль – реакционную смесь, содержащую воду, очищенную от нуклеаз, вместо матрицы.

Для каждого образца реакцию выполняли в двух повторах от двух различных РНК препаратов.

Количественый профиль экспресии анализировали используя метод сравнительного порогового цикла 2^{-ΔΔCT} (Livak, Schmittgen, 2001). Уровень генной экспресии оценивали относительно гена «домашнего хозяйства» 16S rDNA.

Дисперсионный анализ (ANOVA) использовали для оценки статистически значимого эффекта глюкозы или экстракта полифенолов из шелухи гречихи на уровень экспресии поринов *Y. pseudotuberculosis*. Значения *P*<0.05 считалось статистически значимым. ANOVA проведен с использованием статистических программ Statistics 10 (Tulsa, CША, 2008).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние стресс-индуцированных изменений в липидах *Y*. *pseudotuberculosis* на конформацию порина OmpF

Различные стрессовые факторы, такие как тепловой шок (Kern *et al.*, 2001), низкий pH среды (Bukholm *et al.*, 1997), обработка фенолом (Бахолдина *u др.*, 2011), вододефицит (Cesari *et al.*, 2016), воздействие желчи (Giles *et al.*, 2011) индуцируют резкое увеличение содержания ЛФЭ у различных видов бактерий, в то время как его уровень в мембранах при оптимальных условиях роста не превышает 2-5%.

Увеличение содержание ЛФЭ свидетельствует об активации PldA, которая обычно находится в клетке в неактивной форме, но начинает функционировать при стрессе (Istivan, Coloe, 2006). Так как этот адаптационный ответ связан с превращением одного фосфолипида HM (ФЭ) в другой (ЛФЭ), которое катализируется PldA, располагающейся как и порин YOmpF в HM, то на первом этапе работы был изучен эффект аккумуляции ЛФЭ в общих липидах клеток *Y. pseudotuberculosis,* обработанных фенольным биоцидом, на конформацию порина YOmpF.

3.1.1. Влияние фенола на фосфолипидный и жирнокислотный состав общих липидов *Y. pseudotuberculosis*

Для получения образцов общих липидов *Y. pseudotuberculosis* с разным содержанием ЛФЭ были использованы интактные клетки бактерий и клетки, обработанные 1%-ным фенолом, так как ранее было показано, что обработка клеток *Y. pseudotuberculosis* фенолом приводит к существенному увеличению содержания ЛФЭ (Бахолдина *и др.*, 2011).

Как показано в таблице 2, обработка фенолом приводила к значительным изменениям в фосфолипидном составе *Y. pseudotuberculosis*. Содержание ЛФЭ увеличивалось в 2.5 раза за счет снижения содержания ФЭ. Под действием стресса наблюдались также реципрокные изменения уровней анионных фосфолипидов $\Phi\Gamma$ и Д $\Phi\Gamma$. Необходимо отметить, что содержание Л Φ Э в обработанных фенолом клетках было приблизительно в 2.4 раза больше, чем содержание $\Phi\Gamma$. Последний, в свою очередь, является основным мембранным липидом, наряду с Φ Э и Д $\Phi\Gamma$, у большинства бактерий, в том числе у *Y. pseudotuberculosis*, и при нормальных условиях содержится в клетках в больших количествах, в то время как Л Φ Э в них практически отсутствует. Такая конверсия, вероятно, косвенно подтверждает значение Л Φ Э в мембранах бактерий в условиях стресса.

Кроме того, в обработанных фенолом клетках было зафиксировано появление значительного количества монометил-ФЭ (МеФЭ), который является конечным продуктом метилирования ФЭ (Sohlenkamp, Geiger, 2016). Подобного рода изменения в липидах являются характерными для бактерий при различных стрессовых состояниях (Hoch, 1992; Istivan, Coloe, 2006).

Таблица 2. Фосфолипидный состав общих липидов интактных и обработанных фенолом клеток *Y. pseudotuberculosis* (% от общих липидов)

Фосфолипиды	Интактные клетки	Клетки, обработанные фенолом		
ФЭ	73.1	48.8		
ЛФЭ	5.7	14.6		
ΦΓ	11.0	6.1		
ДФГ	10.2	22.0		
МеФЭ		6.1		
Х		2.4		
ΦЭ+ЛΦЭ/ΦΓ+ДΦΓ	3.7	2.3		

МеФЭ – монометил-ФЭ. Стандартное отклонение составляло менее 1% для трех повторов

По данным ГЖХ-анализа обработка клеток *Y. pseudotuberculosis* фенолом приводила к значительному изменению жирнокислотного состава общих липидов бактерии (табл. 3). Так, общий уровень ненасыщенности липидов, судя по соотношению ненасыщыщенные/насыщенные ЖК, снизился в 2 раза.

Таблица 3. Жирнокислотный состав общих липидов интактных и обработанных фенолом клеток *Y. pseudotuberculosis* (% от суммы жирных кислот)

Жирные кислоты	Интактные клетки	Клетки, обработанные фенолом
15:0	0.3	9.6
15:1n-7	0.1	1.3
16:0	18.5	13.1
16:1n-11	0.1	1.1
16:1n-7	48.6	27.7
17:0	0.3	6.4
17:1	0.2	2.9
17:0 _{cp}	1.1	9.6
18:0	0.7	0.8
18:1n-7	30.1	27.5
ненасыщенные ЖК	79.1	60.5
насыщенные ЖК	19.8	29.9
ненасыщ./ насыщ. ЖК	4.0	2.0

ЖК - жирная кислота, ненасыщ./насыщ. – отношение суммы ненасыщенных ЖК к сумме насыщенных ЖК. Жирные кислоты, содержание которых было меньше 1%, не приведены. Стандартное отклонение составляло менее 0.5% для трех повторов

Такие изменения были обусловлены главным образом снижением уровня основной мононенасыщенной ЖК 16:1n-7 почти в 2 раза и резким подъемом уровней насыщенных ЖК 15:0 и 17:0, которые практически отсутствовали в липидах нативных клеток *Y. pseudotuberculosis*.

Понижение ненасыщенности липидов также достигалось за счет примерно 9-кратного увеличения содержания 17:0_{ср}, которая, как и другие ЖК с циклопропановым кольцом, образуется путем метилирования мононенасыщенных ЖК, но, в отличие от своих предшественников, циклопропановые ЖК способствуют увеличению вязкости и стабильности бактериальных мембран (McGarrity, Armstrong, 1981). Так, показано, что циклопропановые ЖК предохраняют бактериальные клетки от негативного воздействия различных экологических факторов, включая присутствие этанола в среде (Grandvalet *et al.*, 2008), высокое осмотическое давление (Asakura *et al.*, 2012), низкие значения pH (Brown *et al.*, 1997; Chang, Cronan, 1999) и высокие температуры (Ruan *et al.*, 2011; Chen, Gänzle, 2016). В связи с этим уместно предположить, что возросший уровень $17:0_{cp}$ является защитной реакцией *Y. pseudotuberculosis* на фенольный стресс, направленной на уплотнение мембраны и снижение её проницаемости.

3.1.2. Влияние фенольной обработки на термотропное поведение общих липидов *Y. pseudotuberculosis*

Как показано на рисунке 1, результатом адаптационных изменений жирнокислотного состава общих липидов *Y. pseudotuberculosis*, индуцированных обработкой фенолом, явилось увеличение температуры их фазового перехода на 23 °C. Такие изменения являются закономерными и обусловлены увеличением содержания насыщенных и циклопропановых ЖК в липидах этих бактерий.

Результаты, приведеные в таблицах 2, 3 (раздел 3.1.1) и на рисунке 1, в целом подтверждают сделанные ранее заключения о влиянии фенола на фосфолипидный и жирнокислотный состав и термотропное поведение липидов *Y. pseudotuberculosis* (Бахолдина *и др.*, 2011).



Рис. 1. Температурная зависимость избыточного теплопоглощения общих липидов *Y. pseudotuberculosis*, обработанной (сплошна линия) и необработанной (пунктирная линия) фенолом. Соотношение между липидом и смесью вода-этиленгликоль (1:1, по объему) было 1:2, по объему. Вертикальная линия соответствует 25 мВт. Скорость сканирования: 16 °С/мин. Вес липида: 5 мг. Каждый липидный образец сканировали как минимум в трех повторах

3.1.3. Влияние аккумуляции лизофосфатидилэтаноламина в липидах *Y. pseudotuberculosis* на конформацию порина OmpF

Конформационные изменения в порине, индуцируемые липидами из интактных и обработанных фенолом клеток *Y. pseudotuberculosis*, были изучены с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и собственной флуоресценции белка.

3.1.3.1. Дифференциальная сканирующая калориметрия порина

Термодинамические параметры тепловой денатурации белка. полученные В результате калориметрического анализа, позволяют конформационные интегральные характеризовать изменения в макромолекуле.

Анализ ДСК-переходов порина YOmpF осуществляли на основе модели одностадийной необратимой денатурации (или модели двух состояний) $N_3 \xrightarrow{k} D_3$, где N_3 и D_3 – нативный и денатурированный тример порин, соответственно, k – константа скорости денатурации первого порядка, которая меняется в зависимости от температуры в соответствии с уравнением

Аррениуса. Поэтому избыточную теплоемкость C_p^{ex} анализировали с помощью нелинейного метода наименьших квадратов, приближая данные к уравнению (Kurganov *et al.*, 1997):

$$C_p^{ex} = \frac{1}{\nu} \Delta H \exp\left\{\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T}\right)\right\} \times \exp\left\{-\frac{1}{\nu} \int_{T_o}^T \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T}\right)\right] dT\right\} (1),$$

где v = dT/dt (К мин⁻¹) – скорость сканирования; ΔH – разница энтальпий между денатурированным и нативным состояниями; E_A – энергия активации процесса денатурации; R – универсальная газовая постоянная (8.314 Дж /(К моль)); T^* - температура, при которой константа скорости денатурации (k) равна 1 мин⁻¹.

Результаты приближения показаны на рисунке 2 сплошной линией и приведены в таблице 4. Правильность приближения оценивали по коэффициенту корреляции (*r*):

$$r = \sqrt{1 - \sum_{i=1}^{n} (y_i - y_i^{calc})^2 / \sum_{i=1}^{n} (y_i - y_i^m)^2}$$
(2),

где y_i and y_i^{calc} – экспериментальное и рассчитанное значения C_p^{ex} соответственно; y_i^m – среднее значение C_p^{ex} и n – число точек.

Попытки использовать различные необратимые модели для денатурации порина (например, модель Ламри–Эйринга с быстро устанавливающимся равновесием на первой стадии и модель, включающую две последовательно протекающие необратимые стадии) не улучшали точность приближения, указывая на то, что простейшая модель была достаточной для количественного описания денатурации порина.

В таблице 4 представлены значения параметров уравнения Аррениуса для тепловой денатурации порина и его комплексов с липидами. Образцы липидов, необогащенные и обогащенные ЛФЭ, индуцировали увеличение ΔH и T^* на 2.4-2.7 ккал/моль и 0.9-1.5 К, соответственно, по сравнению с индивидуальным порином. Особенно выраженная разница наблюдалась

между экспериментальной энергией активации (E_A) исследованных образцов, которая повысилась на 56.3 ккал/моль и 69.8 ккал/моль, соответственно, по сравнению с индивидуальным порином. Таким образом, оба липида увеличивали термостабильность порина, но липиды, обогащенные ЛФЭ, оказывали более выраженный эффект.



Рис. 2. Температурная зависимость избыточной молярной теплоемкости индивидуального порина YOmpF (светлые круги) и его комплексов с общими липидами интактных (черные круги) и обработанных фенолом (светлые ромбы) клеток *Y. pseudotuberculosis* в 0.03 М трис-HCl буфере, pH 7.8, с 0.125% н-октил-β-D-глюкопиранозида. Скорость сканирования - 60 К·ч⁻¹. Сплошная линия представляет собой наилучшее соответствие каждой экспериментальной кривой уравнению (1). Концентрация белка - 0.83 мг/мл

Следовательно, повышение температуры фазового перехода общих липидов *Y. pseudotuberculosis*, обогащенных ЛФЭ, приводит к увеличению термостабильности OmpF вследствие интегральных конформационных перестроек в белке, которые, вероятно, обусловлены скорее изменением кривизны, а значит и энергетики бислоя, чем жидкостности мембраны *per se* (Andersen, Koeppe, 2007).

Таблица 4. Значения параметров уравнения Аррениуса для тепловой денатурации порина и его комплексов с общими липидами интактных и обработанных фенолом клеток *Y. pseudotuberculosis*

Параметры	Порин	Порин + общие	Порин + общие липиды	
		липиды интактных	клеток, обработанных	
		клеток	фенолом	
ΔH (ккал·моль ⁻¹)	97.7	100.1	100.4	
$T^{*}(\mathbf{K})$	359.6	361.1	360.5	
$E_{\rm A}$ (ккал моль ⁻¹)	65.8	122.1	135.6	
r	0.9993	0.9989	0.9996	

 ΔH – разница энтальпий между денатурированным и нативным состояниями белка (энтальпия денатурации); T^* – температура, при которой константа скорости денатурации (k) равна 1 мин⁻¹; E_A – экспериментальная энергия активации процесса денатурации; r – коэффициент корреляции

Кривизна бактериальных мембран в первую очередь определяется содержанием основного неламеллярного липида ФЭ, который способствует формированию отрицательной кривизны и неустойчивости бислоя.

В клетках, не обработанных фенолом, уровень ФЭ составлял 73.1% от суммы фосфолипидов *Y. pseudotuberculosis*. Фенол индуцировал снижение уровня ФЭ до 48.8%, однако и в этих клетках он по-прежнему являлся доминирующим. Присутствие более чем 20% анионных ФГ и ДФГ, склонных к формированию бислойных структур, оказывало стабилизирующий эффект на мембрану *Y. pseudotuberculosis*, независимо от обработки фенолом (Lee, 2004). Тем не менее, содержание этих ламеллярных липидов в сумме возрастало в 1.3 раза при обработке фенольным биоцидом.

Известно, что геометрия мембран напрямую зависит от энергии напряжения, определяемой кривизной бислоя. Конверсия ФЭ в другой неламеллярный липид ЛФЭ, который в отличие от своего предшественника, напротив, способствует формированию участков с положительной кривизной, вероятно, приводит к релаксации общего напряжения в бислое и подъему температуры фазового перехода липидов (рис.1), благодаря их более плотной упаковке (Alonso *et al.*, 2000). Таким образом, наличие мицеллообразующих амфифильных липидов, таких как ЛФЭ (Epand, 1998), может существенно влиять на конформацию белка и его функцию (Lundbaek, Andersen, 1994; Brown, 2012).

Реципрокные изменения в содержании ламеллярных $\Phi\Gamma$ и $Д\Phi\Gamma$ также способствуют изменению физического состояния бислоя. Увеличение уровня $Д\Phi\Gamma$ с одновременным снижением содержания $\Phi\Gamma$ при обработке фенолом может способствовать росту температуры фазового перехода липидов *Y*. *pseudotuberculosis* и повышать целостность структуры клеточной мембраны. Данный адаптационный механизм используется бактериями для повышения устойчивости своих клеток в стрессовых условиях (Zhang, Rock, 2008; Lewis, McElhaney, 2009; Tsai *et al.*, 2011; MacGilvray *et al.*, 2012). В отличие от $\Phi\Gamma$, $Д\Phi\Gamma$ имеет тенденцию к образованию обратной гексагональной фазы, что может приводить к увеличению плотности упаковки липидов бислоя (Lindblom *et al.*, 1991; Linde *et al.*, 2004). Этот эффект снижает способность белков к проникновению в гидрофобную среду (Bezrukov *et al.*, 2000).

Учитывая тот факт, что латерально в мембранах ДФГ распределен неравномерно и преимущественно локализуется в участках с наибольшей кривизной, образуя домены (Matsumoto *et al.*, 2006; Mileykovskaya, Dowhan, 2000), а анионный ФГ имеет значительно меньшее сродство к OmpF *E. coli*, по сравнению с ФЭ (O'Keeffe *et al.*, 2000), можно предполагать, что ФЭ имеет первостепенное значение в определении и поддержании конформации порина.

3.1.3.2. Собственная флуоресценция порина

Более детальная информация о липид-индуцированных конформационных изменениях в структуре YOmpF была получена из экспериментальных спектров собственной флуоресценции белка. Деконволюция спектров на элементарные компоненты, соответствующие эмиссии белкового флуорофора (триптофана) в зависимости от специфического микроокружения (Пермяков, 2003), показала, что образцы липидов оказывают различный эффект на третичную структуру порина.



Рис. 3. Спектры собственной флуоресценции (темные круги) индивидуального порина YOmpF (A) и его комплексов с общими липидами, выделенными из интактных (B) и обработанных фенолом (C) клеток *Y. pseudotuberculosis*, в 0.03 М трис-HCl буфере, pH 7.8, с 0.125% н-октил-β-D-глюкопиранозида и их приближение к теоретической модели дискретных состояний остатков триптофана в белках (сплошная линия, которая является суммой спектральных компонентов S, I и II (пунктирные линии)) (Пермяков, 2003). Концентрация белка – 0.05 мг/мл. Длина волны возбуждения – 296 нм

Как известно, каждый мономер порина YOmpF содержит три остатка триптофана, Trp56, Trp106 и Trp211. Trp56 расположен в месте контакта мономеров; Trp211 лежит на внешней поверхности тримера белка; Trp106 локализован в петле L3, которая образует сужение внутри поры. Как было показано ранее, по степени увеличения гидрофобности микроокружения эти остатки могут быть расположены в следующем порядке: Trp106 - Trp211 - Trp56 (Новикова *и др.,* 2007; Guzev *et al.,* 2005).

В 1973 году Бурштейн Е.А. с соавторами сформулировал модель дискретных состояний остатков триптофана в белках, согласно которой, существует пять наиболее вероятных спектральных форм остатков триптофана (Burstein *et al.*, 1973). Спектральная форма А встречается крайне редко и найдена пока только в двух белках. Она соответствует излучению невозмущенных индольных хромофоров в нейтральном гидрофобном окружении белковой глобулы. Главный максимум излучения таких хромофоров расположен при 306.5 нм.

Спектральные формы S (λ_{max} = 316-317 нм) и I (λ_{max} = 330-332 нм) соответствуют излучению индольных хромофоров внутри белковой глобулы, образующих эксиплексы 1:1 и 1:2, соответственно, с ближайшими полярными группами белка.

Спектральная форма II (λ_{max} = 340-342 нм) соответствует излучению индольных хромофоров на поверхности белка в контакте с молекулами связанной воды, подвижность которых довольно низка.

Спектральная форма III ($\lambda_{max} = 350-353$ нм) реже, чем другие формы, встречается в нативных белках. Она соответствует излучению индольного хромофора на поверхности белковой молекулы в контакте со свободно релаксирующей водой.

Хромофоры форм II и III легко доступны растворителю, ионам и молекулам тушителя, в отличие от форм S и I.

Деконволюция экспериментальных спектров флуоресценции порина (рис. 3, табл. 5) показала, что неодинаковый термостабилизирующий эффект липидов с различным содержанием ЛФЭ связан с особенностями их влияния на третичную структуру порина.

Таблица 5. Влияние общих липидов, выделенных из интактных и обработанных фенолом клеток *Y. pseudotuberculosis*, на распределение спектральных форм триптофана в общем спектре флуоресценции порина YOmpF, %

Проба	Спектральная форма триптофана			
	S	Ι	II	III
Порин	21.2	23.9	14.8	40.1
Порин + общие липиды интактных клеток	20.7	26.5	0	52.8
Порин + общие липиды клеток, обработанных фенолом	29.0	0	0	71.0

Липидное окружение индуцировало смещение максимума эмиссии общей флуоресценции (λ_{max}) порина в более длинноволновую область: от 332 нм до 334 нм и 340 нм в комплексе порина с липидами, необогащенными и обогащенными ЛФЭ соответственно. В присутствии обоих образцов липидов наблюдалось исчезновение спектральной формы II, что сопровождалось увеличением вклада формы III. С другой стороны, вклад форм S или I также повышался. Эти противоположные эффекты проявлялись сильнее под влиянием липидов, обогащенных ЛФЭ, которые вызывали исчезновение не только формы II, но и формы I. Судя по полученным результатам, под действием образца липидов с повышенным содержанием ЛФЭ увеличивалась плотность упаковки мономеров в гомотримере YOmpF, формируя более гидрофобную среду для части остатков триптофана (возможно, Trp56), что выражалось в увеличении доли спектральной формы S. Это объясняется тем, что молекулы ЛФЭ, склонные к формированию положительной кривизны, бислой компрессионный эффект на мембраны, уплотняя оказывают гидрофобное ядро белка (Mouritsen, 2011.

Однако этот же образец липидов, вероятно, способствует экспозиции части остатков триптофана на поверхность белка (возможно, Trp211) в гидрофильное окружение, что приводит к повышению вклада спектральной

формы III с одновременным снижением вклада форм II и I. Подобное изменение конформации порина может быть вызвано не только релаксацией общего напряжения бислое, кривизны В но И повышением гидрофильно/липофильного баланса липидного бислоя в непосредственной близости от белка за счет конверсии ФЭ в ЛФЭ, а также увеличением давления ацильных цепей, что может препятствовать проникновению белка в бислой (Bezrukov et al., 2000). Эффект липидного образца со сравнительно низким уровнем ЛФЭ на конформацию порина, вероятно, ограничивался экспозицией части остатков триптофана на поверхности белка в водное окружение.

Таким образом, наибольшее увеличение термостабильности белка под влиянием липидов с повышенным содержанием ЛФЭ сопровождалось уплотнением мономеров в тримере порина и экспозицией части остатков триптофана в водную среду. Эти перестройки в конформации YOmpF могут препятствовать проницаемости поринового канала бактерии в стрессовых условиях.

В целом первый этап работы показал, что повышенное содержание ЛФЭ в липидах клеток *Y. pseudotuberculosis*, подвергнутых стрессу, влечет за собой изменение физических свойств бислоя, в частности, значительно увеличивается температура фазового перехода общих липидов бактериальной мембраны. В свою очередь, повышение уровня ЛФЭ в липидном окружении порина YOmpF приводит к конформационным перестройкам белка, способствующим уплотнению мономеров в тримере.

Этот факт представляется довольно необычным, в связи с тем, что лизолипиды традиционно принято считать жесткими детергентами, дестабилизирующими липидный бислой и конформацию мембранных белков (Coey *et al.*, 2011). Однако подобные выводы основаны на исследованиях с использованием насыщенных форм лизолипидов, в то время как в живых

системах могут аккумулироваться лизолипиды с различными ацильными остатками.

В связи с этим второй этап работы был направлен на идентификацию молекулярных форм ЛФЭ, аккумулируемого в клетках *Y. pseudotuberculosis*, обработанных фенолом, и сравнительное исследование эффекта ФЭ и его насыщенного и ненасыщенного лизопроизводных на конформацию и стабильность OmpF порина *Y. pseudotuberculosis*.

3.2. Жирнокислотный состав лизофосфатидилэтаноламина и фосфатидилэтаноламина из клеток *Y. pseudotuberculosis*, обработанных фенолом

Для выяснения того, какая молекулярная форма ЛФЭ (насыщенная или ненасыщенная) преимущественно накапливается в *Y.pseudotuberculosis* в состоянии стресса, был изучен состав жирных кислот ЛФЭ в сравнении с ФЭ в бактериальных клетках, обработанных фенолом. Как показано в таблице 6, ненасыщенная форма ЛФЭ доминирует в общей фракции ЛФЭ и составляет более 50%, в то время как доля насыщенного ЛФЭ не превышает 15%.

Соотношение между содержанием ненасыщенных и насыщенных жирных кислот в ЛФЭ выше в 3.5 раза, чем в ФЭ бактериальных клеток, обработанных фенольным биоцидом. Это различие обусловлено высоким содержанием мононенасыщенных жирных кислот 18:1n-11, 19:1 и 16:1n-11 и, одновременно, более низким содержанием жирных кислот с насыщенными ацильными цепями 16:0 и 18:0 (в 3 и 8 раз соответственно) в ЛФЭ по сравнению с ФЭ. Тем не менее, уровень *цис*-вакценовой кислоты 18:1n-7 в 4.6 раза ниже в ЛФЭ, чем в ФЭ.

Как уже было отмечено, обработка фенольным биоцидом приводит к значительному увеличению содержания циклопропановых ЖК в общих липидах *Y. pseudotuberculosis*. Во фракции ЛФЭ также аккумулируется большое количество циклопропановой ЖК 17:0_{ср} (29.2%) (табл.6).
Жирные кислоты	ЛФЭ	ФЭ
16:0	6.1	19.0
16:1 n-11	3.6	1.4
16:1 n-7	10.8	9.1
17:0cp	29.2	12.1
18:0	2.1	17.2
18:1 n-7	3.1	14.3
18:1 n-11	8.0	3.1
19:0 ai	0.5	5.1
19:1	9.1	3.2
ненасыщенные ЖК	51.9	39.5
насыщенные ЖК	14.8	41.0
ненасыщ./ насыщ. ЖК	3.5	1.0

Таблица 6. Жирнокислотный состав ЛФЭ и ФЭ клеток *Y. pseudotuberculosis*, обработанных фенолом (% от суммы жирных кислот)

і и аі — *изо*- и *антеизо*-метил-разветвленные жирных кислот; ср — циклопропановые жирные кислоты. Жирные кислоты, содержание которых было ниже 3%, не представлены. Стандартное отклонение составляло менее 0.5% для трех повторов

Таким образом, можно заключить, что в клетках *Y. pseudotuberculosis* преимущественно накапливается ненасыщенная форма ЛФЭ в ответ на фенольный стресс.

3.3. Влияние ФЭ, насыщенной и ненасыщенной форм ЛФЭ на конформацию порина YOmpF

3.3.1. Дифференциальная сканирующая калориметрия порина

Для сравнения эффекта ФЭ и его насыщенных и ненасыщенных лизоформ на интегральные изменения конформации порина YOmpF были использованы следующие синтетические фосфолипиды: 1,2-дипальмитоил-

sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДПФЭ), 1-пальмитоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ЛПФЭ) и 1-олеоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ЛОФЭ) соответственно.

ДСК анализ показал, что термоденатурация индивидуального порина, а также порина в комплексе с синтетическими липидами при pH 7.8 характеризуется хорошо выраженными калориметрически необратимыми термоиндуцированными переходами (рис. 4). Поэтому полученные данные анализировали в соответствии с моделью одностадийной необратимой денатурации (Sanchez-Ruiz, 1992; Любарев, Курганов, 2000) как описано в разделе 3.1.3.1.



Рис. 4. Температурная зависимость избыточной молярной теплоёмкости порина YOmpF индивидуального (1) и в комплексе с ЛПФЭ (2), ДПФЭ (3) и ЛОФЭ (4) в 0.03 М трис-HCl буфере, pH 7.8, с 0.125 % н-октил- β -D-глюкопиранозид. Скорость сканирования – 60 К·ч⁻¹. Сплошная линия – наилучшая подгонка к модели двухстадийной кинетически детерминированной необратимой денатурации (Kurganov *et al.*, 1997). Концентрация белка – 0.83 мг/ мл

Как следует из таблицы 7, значения параметров уравнения Аррениуса для тепловой денатурации порина менялись различно в зависимости от липидного окружения. ДПФЭ и ЛОФЭ индуцировали увеличение энергии активации термоденатурации (E_A) порина в 1.3 и 2.6 раза соответственно, в отличие от ЛПФЭ, в комплексе с которым E_A снижалась в 1.5 раза по сравнению с E_A индивидуального порина.

Таблица 7. Значения параметров уравнения Аррениуса для термоденатурации YOmpF порина индивидуального и в комплексе с ДПФЭ, ЛОФЭ или ЛПФЭ

Параметры	Образцы			
	Порин	Порин+ЛПФЭ	Порин+ДПФЭ	Порин+ЛОФЭ
ΔH , kcal/mol	130.1	421.8	331.9	183
$E_{\rm A}$, kcal/mol	72.3	49.6	96.2	189.9
<i>T</i> *, °C	87.4	83.2	84.5	84.9
r	0.9989	0.9994	0.9998	0.9997

 ΔH – разница энтальпий между денатурированным и нативным состояниями белка (энтальпия денатурации); T^* – температура, при которой константа скорости денатурации (k) равна 1 мин⁻¹; E_A – экспериментальная энергия активации процесса денатурации; г – коэффициент корреляции

Изменения $E_{\rm A}$ под действием использованных фосфолипидов сопровождались понижением T^* и повышением энтальпии денатурации порина $(\Delta H).$ Наибольший эффект обоих параметров индуцировал насыщенный ЛФЭ (ЛПФЭ) (на 4.2 К и 291.7 kcal/mol соответственно), тогда как влияние ненасыщенного ЛФЭ (ЛОФЭ) было минимальным (на 2.5 K and 52.9 kcal/mol соответственно).

Таким образом, калориметрический анализ показал, что ненасыщенный ЛФЭ (ЛОФЭ) более эффективно стабилизирует порин, чем даже ламеллярный ДПФЭ (Leekumjorn, Sum, 2007). В то время как насыщенный ЛФЭ (ЛПФЭ) ведет себя как сильный детергент, способствующий термоденатурации порина, ЧТО согласуется С классическими представлениями о роли лизолипидов в мембране (Krueger-Koplin et al., 2004).

3.3.2. Собственная флуоресценция порина

Влияние синтетических липидов на третичную структуру порина оценивали по изменению спектров собственной флуоресценции белка (рис. 5). Деконволюция экспериментальных спектров триптофановой флуоресценции порина на компоненты, соответствующие излучению отельных флуорофоров (Пермяков, 2003), показала сильное влияние всех изученных липидов на третичную структуру порина (табл. 8).

Особенно заметные изменения произошли в содержании спектральной формы I. Вклад этой формы резко снизился с 68% до нуля и 5% под влиянием ЛОФЭ/ЛПФЭ и ДПФЭ, соответственно, и сопровождался увеличением вклада спектральной формы II с 16% до 76-88%. С другой стороны, под действием ДПФЭ и ЛОФЭ увеличивался вклад спектральной формы S с 16% до 19% и 22% соответственно. ЛПФЭ оказывал противоположный эффект, снижая вклад формы S до 12%.

Таким образом, все три липида, но особенно ЛПФЭ, оказывают релаксирующий эффект на конформацию порина, разрыхляя структуру его периферических областей. Одновременно с этим, ДПФЭ и, особенно, ЛОФЭ уплотняют, а ЛПФЭ, наоборот, ослабляет контакт между мономерами в тримере порине YOmpF, о чем свидетельствует увеличение содержания формы S в комплексах с этими липидами. Необходимо отметить, что в этом случае эффект ЛОФЭ был даже более значительным, чем эффект ДПФЭ.

Эти данные коррелируют с результатами калориметрических и спектрофлуориметрических исследований комплексов порина с общими липидами из интактных и обработанных фенолом клеток *Y*. *pseudotuberculosis* (рис. 2 и 3), которые также свидетельствуют о повышении термостабильности порина, сопровождающееся уплотнением гидрофобного кора белка и одновременной релаксацией его периферических областей (3.1.3.1 и 3.1.3.2).



Рис. 5. Спектры собственной флуоресценции (светлые круги) порина YOmpF индивидуального (A) и в комплексе с ДПФЭ (B), ЛОФЭ (C) и ЛПФЭ (D) в 0.03 М трис-HCl буфере, pH 7.4, с 0.125% н-октил-β-D-глюкопиранозида и их приближение к теоретической модели дискретных состояний остатков триптофана в белках (сплошная линия, которая является суммой спектральных компонентов S, I и II (пунктирные линии)). Концентрация белка – 0.05 мг/ мл. Длина волны возбуждения – 296 нм

Следовательно, стресс-индуцированные изменения конформации YompF прежде всего обусловлены накоплением в липидном окружении белка ненасыщенной формы ЛФЭ.

Таблица 8. Влияние ДПФЭ, насыщенного и ненасыщенного лизопроизводных ФЭ (ЛПФЭ и ЛОФЭ соответственно) на распределение спектральных форм триптофана в общем спектре флуоресценции порина YompF, %

Οδραρειι	Спектральные формы триптофана				
oopased	S	Ι	II		
Порин	16	68	16		
Порин+ДПФЭ	19	5	76		
Порин+ЛОФЭ	22	-	78		
Порин+ЛПФЭ	12	-	88		

3.3.3. Вестерн-блоттинг

ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) может быть использован для исследования прочности контактов между мономерами порина во время резкого увеличения температуры (Reid *et al.*, 1988). Поэтому устойчивость порина к тепловой денатурации была установлена с помощью ДСН-ПААГ и последующего вестерн-блоттинга с антителами к термоденатурированному мономеру (рис. 6А) и нативному тримеру (рис. 6В) YOmpF.



Рис. 6. Способность ЛОФЭ, ЛПФЭ и ДПФЭ (дорожки 2-4, соответственно), сохранять тримерную форму (3x) YOmpF при 75 °C. 1 – YOmpF. 1X – мономерная форма порина. Нитроцеллюлозную мембрану последовательно обрабатывали поликлональными антителами к денатурированной мономерной (А) и нативной тримерной (В) формам порина

Как видно из рисунка 6, под действием высокой температуры количество денатурированного мономера увеличивалось в образцах порина, сольватированных ЛПФЭ и, наоборот, уменьшалось в комплексах белка с ДПФЭ и особенно с ЛОФЭ. Следовательно, ненасыщенная форма ЛФЭ (ЛОФЭ) в наибольшей степени способствует поддержанию нативной конформации тримера YOmpF при повышенных температурах, что согласуется с данными ДСК-анализа и спектрофлуориметрии (3.3.1. и 3.3.2.).

Различный эффект исследованных липидов на конформацию YOmpF можно объяснить различиями как в геометрии, так и в гидрофильнолипофильном балансе трех молекул. Детергенты, включая лизолипиды, образуют мицеллы, форма которых зависит от их концентрации и химической структуры. Так как химические структуры ЛПФЭ и ЛОФЭ различны, то, вероятно, они образуют мицеллы различной формы. Как ДПФЭ и ЛПФЭ имеют форму цилиндров известно, молекулы И инвертированных конусов соответственно (Israelachvili, 2011). Молекула ЛОФЭ, сохраняя форму инвертированного конуса, вероятно, приближается к цилиндрической форме ДПФЭ благодаря наличию двойной связи в ацильной цепи (рис. 7).



Рис. 7. Молекулярные формы липидов: А – ДПФЭ, В – ЛПФЭ, С – ЛОФЭ

С другой стороны, молекулярная форма липидов определяет их способность образовывать структуры с различной спонтанной кривизной, индуцирующей напряжение в мембранной упаковке (packing stress). Цилиндрической (ДПФЭ) и обратноконической (ЛПФЭ) молекулярным формам липидов присуща нулевая и положительная спонтанная кривизна

соответственно (Arouri, Mouritsen, 2013) и, следовательно, такие молекулы склонны к формированию планарного бислоя и сферических мицелл соответственно. ЛОФЭ, вероятно, образует переходную структуру, сочетающую в себе свойства бислоя и мицеллы (сплюснутые, дискоидные мицеллы (oblate micelles)) (le Maire *et al.*, 2000) с менее выраженной положительной кривизной, чем у сферических мицелл (рис. 8).

Различные формы агрегатов амфифильных липидных молекул оказывают различный эффект на конформацию белков (Arora, Tamm, 2001). Показано, что детергентные лизо-ФЛ, в отличие от бислойных ФЛ, образующих везикулы, не обеспечивают полностью нативной конформации мембранных белков и приводят к искажениям и изменениям в стабильности как общей конформации белковой молекулы, так и ее отдельных участков (Coey *et al.*, 2011).



Рис. 8. Модели сплюснутой (oblate) (А) и сферической (Б) мицелл и их связывания с мембранными белками (В и Г соответственно) (le Maire *et al.*, 2000)

С другой стороны, положительная кривизна бислойных участков мицелл, образованных ЛОФЭ, в соответствии с моделью гибкой поверхности (flexible surface model) для липид-белковых взаимодействий (Brown, 2012) должна приводить к уплотнению гидрофобной области порина и (рис.8 A, B) и, следовательно, в большей степени стабилизировать конформацию белка, чем бислой с нулевой спонтанной кривизной, образованный ДПФЭ. В свою

очередь, сферические мицеллы ЛПФЭ дестабилизируют конформацию белка подобно сильным детергентам (рис. 8 Б, Г).

преимущественное накопление ненасыщенной Итак. формы BO фракции ЛФЭ Y. pseudotuberculosis, обработанных фенолом, и способность молекулярных форм ЛФЭ и ФЭ образовывать структурно отличающиеся объяснить надмолекулярные комплексы могут различные липидконформацию OmpF индуцированные эффекты на порина *Y*. pseudotuberculosis. Эти уникальные свойства разных моекулярных форм фосфолипидов также обясняют повышение термостабильности порина, вызванное аккумуляцией ЛФЭ per se в липидах Y. pseudotuberculosis, подвегнутой стрессу.

3.4. Эффект повышения температуры роста и теплового шока на липидный состав внутренней и наружной мембран *Y. pseudotuberculosis*

Клеточная оболочка грамотрицательных бактерий представляет собой сложный биологический барьер, состоящий из двух мембран, разделенных периплазматическим пространством.

Несмотря на то, что в литературе имеются данные о распределении индивидуальных фосфолипидов в клеточной оболочке мезофильных грамотрицательных бактерий (Ishinaga *et al.*, 1979; Osborn *et al.*, 1972; Shukla *et al.*, 1980; Lugtenberg, Peters, 1976; Klüsener *et al.*, 2009; Vences-Guzm *et al.*, 2011), для психротрофных бактерий подобная информация до сих пор отсутствует, в том числе для энтеропатогенной *Y. pseudotuberculosis*, характеризующейся высокой экологической пластичностью (Bakholdina *et al.*, 2004).

Имеющаяся информация о распределении липидов между НМ и ЦМ в основном ограничивается модельным объектом *E. coli*. Однако последние исследования демонстрируют, что липидные профили *E. coli* и других бактерий существенно отличаются, то есть не существует такого понятия,

81

как типичный липидный состав бактериальной мембраны. Следовательно, необходимо создание видоспецифических липидомных баз данных (Layre, Moody, 2013; Sohlenkamp, Geiger, 2016). Более того, обнаружены различия в белковом и липидном составах ЦМ и HM, выделенных из разных грамотрицательных бактерий (Sohlenkamp, Geiger, 2016; Chatterjee, Chaudhuri 2012). Поэтому данные о распределении фосфолипидов между HM и ЦМ различных видов бактерий необходимы для правильной интерпретации конформационных и функциональных изменений мембранных белков бактерий в стрессовых условиях.

Эктотермные организмы, к которым относятся бактерии, особенно уязвимы к изменению температуры окружающей среды, так как их рост, развитие функционирование основном определяются И В данным абиотическим фактором. В связи с этим в бактериях выработались различные адаптационные механизмы, позволяющие им адекватно реагировать на Многие температурные колебания. ИЗ ЭТИХ механизмов являются универсальными и активно используются бактериями в различных, в том числе стрессовых, условиях. Однако сведения о влиянии высоких температур роста или теплового шока на фосфолипидный состав НМ и ЦМ бактерий рода Yersinia отсутствуют в литературе.

Тепловой стресс может рассмариваться как тепловая адаптация, если при этом клетка подвергается воздействию температуры выше оптимальной для роста организма в течение длительного времени, или как тепловой шок, если клетка подвергается воздействию температуры выше максимальной для ее роста в течение очень короткого периода времени.

Для того, чтобы понять механизм ответа *Y. pseudotuberculosis* к обоим типам теплового стресса, были исследованы изменения в фосфолипидном составе и составе жирных кислот липидов HM и ЦМ клеток *Y. pseudotuberculosis*, растущих при температурах, соответствующих сапрофитной (8 °C) и паразитической (37 °C) фазам жизни, а также

82

подвергнутых тепловому шоку, который индуцировался резким повышением температуры с 8 °C до 45 °C.

3.4.1. Идентификация фракций, обогащенных наружной и цитоплазматической мембранами

В результате равновесного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы общей мембранной фракции *Y. pseudotuberculosis* были получены три хорошо визуализирующихся дискретных полосы в пробирке.

Спектрофотометрический анализ фракций, полученных после центрифугирования, выявил три пика абсорбции при 280 нм (рис. 9А).

Пики I-III были обозначены в порядке убывания их плавучей плотности (1.25; 1.19 и 1.16 г/см³ соответственно). Профиль градиента и значения плавучей плотности по существу были аналогичны тем, что представлены в работе (Osborn *et al.*, 1972), а именно пики плавучей плотности соответствовали HM, промежуточной фазе и ЦМ.

Фракции, обогащенные HM, были идентифицированы по наличию специфических маркеров, таких как OmpF и PldA (рис. 9 В, С). Фракции, обогащенные ЦМ, были идентифицированы по соответствующей плавучей плотности и полному отсутствию PldA (рис. 9 В): согласно результатам Вестерн-блоттинга с сывороткой анти-PldA, мембранные фракции, соответствующие пикам II и I (полосы 3 и 4 соответственно), содержали PldA, в то время как этот маркерный белок HM полностью отсутствовал в пике III.

ОтрF порин, который также локализован в HM, главным образом был обнаружен во фракциях пика I (рис. 9 С). Пик II представлял собой смешанную мембранную фракцию, состоящую из HM и ЦМ.

Аналогичный подход применялся при идентификации мембранных фракций клеток *Y. pseudotuberculosis*, подвергнутых тепловому шоку, а также выращенных при 37 °C.



Рис. 9. Разделение И идентификация мембранных фракции *Y*. pseudotuberculosis, культивированной при 8 °C. (А) Поглощение белков в мембранных фракциях, полученных после равновесного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы грубой мембранной фракции из клеток У. pseudotuberculosis. Поглощение белков измеряли при 280 нм (A280) в каждой фракции против 50%-ной сахарозы. Фракции собирали от дна пробирок. (В) Вестерн-блот анализ полученных мембранных фракций с использованием сыворотки анти-PldA. Дорожка 1 – маркеры молекулярных масс; дорожа 2 фракция 17, пик III; дорожка 3 - фракция 10, пик II; дорожка 4 – фракция 5, пик I. (С) ДСН-ПААГ электрофореграмма белков клеточного лизата и мембранных фракций. Гель окрашивали Кумасси R-250. Дорожка 1 – клеточный лизат; дорожка 2 – YOmpF порин в 50%-ной сахарозе; дорожка 3 фракция 5, пик I; дорожка 4 – фракция 10, пик II; дорожка 5 – фракция 17, пик III; дорожка 6 – маркеры молекулярных масс

Как и ожидалось, OmpF и PldA после фракционирования были также локализованы главным образом в пике I. Существенных различий в распределении OmpF и PldA в мембранных фракциях между клетками, выращенными при 8 °C, 37 °C или подвергнутых тепловому шоку, обнаружено не было. Это позволило нам сделать вывод, что данная процедура фракционирования позволяет разделить клеточную оболочку на две фракции, обогащенные HM и ЦМ.

3.4.2. Фосфолипидный состав цитоплазматической и наружной мембран и целых клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при разных температурах или подвергнутых тепловому шоку

Для анализа фосфолипидного состава НМ и ЦМ липиды были экстрагированы из объединенных мембранных фракций 3-8 и 13-18 соответственно (рис. 9 А).

Как показано в таблице 9, ФЭ, ЛФЭ, ФГ и ДФГ были найдены в мембранах клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при 37 °C и подвергнутых тепловому шоку. Однако ЛФЭ не был обнаружен в ЦМ бактерий при 8 °C.

Таблица 9. Фосфолипидный состав наружной и цитоплазматической мембран и целых клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при разных температурах или подвергнутых тепловому шоку (% от общих фосфолипидов)

Фосфоли-	Температура роста				Тепловой шок				
пиды		8 °C			37 °C			45 °C	
	HM	ЦM	Целые	HM	ЦM	Целые	HM	ЦM	Целые
			клетки			клетки			клетки
ФЭ	76.7	82.7	85.4	62.2	78.8	71.8	54.4	68.6	71.5
ΦΓ	5.9	7.9	9.0	14.1	9.3	10.5	17.6	11.8	15.1
ДФГ	16.4	9.4	4.2	12.6	6.7	12.1	18.6	11.8	10.8
ЛФЭ	1.0	-	1.4	11.1	5.2	5.6	9.4	7.8	2.6
ФЭ+ЛФЭ/	2.5	4.8	6.5	2.7	5.2	3.4	1.7	3.2	2.7
ΦΓ+ДΦΓ									

Стандартное отклонение составляло менее 1% для трех повторов

ФЭ был преобладающим липидом в обеих мембранах и целых клетках *Y. pseudotuberculosis*, независимо от температуры культивирования или воздействия теплового шока. Однако, в противоположность мезофильной *E. coli*, где HM клеток, подвергнутых тепловому шоку, характеризовались повышенным содержанием ФЭ (Lugtenberg, Peters, 1976), уровень этого фосфолипида в *Y. pseudotuberculosis* был всегда выше в ЦМ, чем в HM. Тем не менее, снижение уровня ФЭ в обеих мембранах *Y. pseudotuberculosis* отмечалось как при повышеннии температуры культивирования, так и при тепловом шоке.

Содержание ФЭ в целых клетках *Y. pseudotuberculosis* было близко уровню этого ФЛ в НМ клеток, выращенных как при обеих температурах культивирования, так и после их обработки тепловым шоком. Повышение температуры культивирования и тепловой шок приводили к одинаковому снижению уровня ФЭ в целых клетках бактерии, однако эффект теплового шока был более выраженным.

Значительная потеря в содержании ФЭ сопровождалась заметным увеличением содержания ЛФЭ, особенно в НМ (приблизительно на 10%) клеток, выращенных при 37 °С или подвергнутых тепловому шоку. В ЦМ содержание ЛФЭ составило примерно 6% как при тепловой адаптации, так и тепловом шоке клеток, в то время как этот липид не был обнаружен в ЦМ при 8 °С, а его содержание в НМ не превышало 1%. Однако тепловой шок в *E. coli* не индуцирует повышение уровня ЛФЭ ни в одной из ее мембран (Lugtenberg, Peters, 1976).

Преимущественная аккумуляция ЛФЭ в НМ главным образом связана с тем, что в ней также локализована PldA (Соловьева $u \partial p$., 1988), которая обычно «молчит» в клетке, но активируется при стрессе (Istivan, Coloe, 2006).

Таким образом, реципрокные изменения в содержании цвиттерионных ФЭ и ЛФЭ наблюдались в обеих мембранах и целых клетках, адаптированных к теплу или подвергнутых тепловому шоку. Однако, независимо от температуры культивирования, ЦМ содержала заметно большее количество ФЭ, чем НМ.

Примечательно, что в НМ клеток, выращенных при 37 °С или подвергнутых тепловому шоку, возрастал уровень анионного фосфолипида ФГ (в 2 и 3 раза соответственно), в то время как его содержание было практически равным в НМ и ЦМ бактерий, выращенных при 8 °С. В *Е. coli* ЦМ была обогащена обоими анионными фосфолипидами, ФГ и ДФГ, независимо от температуры роста (Lugtenberg, Peters, 1976).

Уровень ДФГ был неизменно выше в НМ, однако он снижался с повышением температуры культивирования в обеих мембранах. При тепловом шоке для ДФГ наблюдались противоположные изменения, его содержание увеличивалось приблизительно на 2% в ЦМ и НМ. Предполагается, что ДФГ является стрессовым липидом, роль которого может быть связана со стабилизацией белков и поддержанием целостности мембраны (Prossnigg *et al.*, 2010; Laganowsky *et al.*, 2014).

Высокий уровень содержания $\Phi\Gamma$ и Д $\Phi\Gamma$ с одновременным снижением уровня Φ Э был показан и в клеточной оболочке других бактерий. Так, например, изменения подобного характера были найдены в мембране *Vibrio sp* при солевом стрессе (Danevcic *et al.*, 2005).

Эти изменения способствуют повышению заряда НМ бактериальных клеток, адаптированных к теплу или подвергнутых тепловому шоку. В этом смысле соотношение ФЭ+ЛФЭ/ФГ+ДФГ является более информативным параметром, который обратно пропорционален суммарному отрицательному заряду мембраны. Согласно изменениям значений этого параметра, тепловой шок приводит к резкому увеличению суммарного отрицательного заряда НМ и ЦМ.

При этом вкладом ЛПС в изменение отрицательного заряда НМ можно пренебречь, так как температура роста критично не влияет на его содержание

и структуру кора в клетках *Y. pseudotuberculosis* (Krasikova *et al.*, 2000; Бахолдина, Соловьева, 2009).

Повышение отрицательного заряда НМ *Y. pseudotuberculosis* может снижать чувствительность бактерий к катионным антибиотикам и увеличивать их выживаемость в стрессовых условиях (Epand *et al.*, 2008; Dalebroux *et al.*, 2014).

Увеличение отрицательного заряда за счет накопления фосфатидной кислоты (Sutterlin *et al.*, 2014; Bishop, 2014), ДФГ (Dalebroux *et al.*, 2014; Dalebroux *et al.*, 2015), а также ФГ, как было показано в нашей работе для *Y*. *pseudotuberculosis*, с одновременной редукцией уровня цвиттерионного ФЭ, может быть общей стратегией, повышающей барьерную функцию HM грамотрицательных бактерий, независимо от соотношения ламеллярных и неламеллярных фосфолипидов.

3.4.3. Влияние температуры культивирования и теплового шока на жирнокислотный состав липидов цитоплазматической и наружной мембран Y. pseudotuberculosis

Бактерии, как и все пойкилотермные организмы, способны регулировать текучесть мембран в ответ на изменение температуры роста за счет регуляции жирнокислотного состава липидов мембранного матрикса (Beney, Gervais, 2001).

Данные, приведенные в таблице 10, позволяют сравнить изменения в составе жирных кислот липидов НМ и ЦМ клеток *Y. pseudotuberculosis,* выращенных при различных температурах или подвергнутых тепловому шоку.

При температуре 8 °C состав ЖК характеризовался тремя основными кислотами: пальмитиновой (16:0), пальмитолеиновой (16:1n-7) и *цис*вакценовой (18:1n-7). Процентное содержание этих ЖК существенно не различалось в НМ и ЦМ и составляло приблизительно 20, 30 и 25% соответственно. Повышение температуры роста приводило к резкому снижению содержания основных ненасыщенных жирных кислот 16:1n-7 и 18:1n-7 в обеих мембранах (примерно до 1-3%). Напротив, количество минорных ненасыщенных жирных кислот 18:1n-9, 20:1 и, особенно, 17:1 увеличивалось в результате тепловой адаптации. Уровень 20:1 и 17:1 в большей степени возрастал в ЦМ.

Таблица 10. Жирнокислотный состав общих липидов наружной и цитоплазматической мембран клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при различных температурах или подвергнутых тепловому шоку

Жирные кислоты	Температура			Тепловой		
	культив		ирования		шок	
	8	°C	37 °C		45 °C	
	HM	ЦM	HM	ЦM	HM	ЦM
12:0	0.3	0.6	2.0	0.8	1.0	4.8
14:0	1.4	1.3	9.9	3.0	1.5	3.3
15:0	1.3	1.3	2.8	2.6	0.7	1.5
16:0	21.2	19.0	29.7	36.0	21.6	20.8
17:0 cp	0.3	0.4	3.7	5.0	0.3	0.7
16:1 n-9	0.6	0.9	2.5	2.0	0.1	2.3
16:1 n-7	30.1	33.2	0.8	2.2	34.0	24.3
17:1	1.9	1.8	7.5	12.6	1.1	1.8
18:0	3.9	2.7	11.4	6.1	3.5	4.3
18:1 n-9	2.9	2.0	7.1	6.3	2.3	3.9
18:1 n-7	25.5	24.3	1.6	2.9	27.4	18.3
20:1	0.5	0.5	1.6	4.4	0.5	0.6
ненасыщенные ЖК	64.3	65.9	25.6	36.7	67.6	55.6
насыщенные ЖК	31.4	28.2	63.9	52.3	29.8	37.9
ненасыщ./насыщ.	2.0	2.3	0.4	1.4	2.3	1.5
i+ai	2.2	3.5	3.3	3.0	1.2	2.8
ср	0.7	0.9	5.4	6.8	1.0	2.9
Другие	1.4	1.5	1.8	1.2	0.4	0.8

i+ai – сумма *изо-* и *антеизо-*метил-разветвленных ЖК; ср – циклопропановые ЖК. ЖК, содержание которых было ниже 2%, не представлены. Стандартное отклонение составляло менее 1% для трех повторов

В целом общий уровень ненасыщенных ЖК снижался в 2.5 и 1.8 раза в НМ и ЦМ соответственно, то есть липиды ЦМ в результате оказывались более ненасыщенными, чем липиды НМ. В то время как в бактериях, выращенных при 8 °C, уровень ненасыщенности ЖК был близким. Как и ожидалось, противоположные изменения наблюдались в содержании насыщенных ЖК, уровень которых увеличивался приблизительно в 2 раза в обеих мембранах. В результате, соотношение ненасыщенные/насыщенные ЖК снижалось, но оставалось выше в липидах ЦМ.

Повышение температуры роста также индуцировало значительное увеличение (в 7.5 раз) количества циклопропановых ЖК в общих липидах НМ и ЦМ. Эти результаты согласуются с данными, полученными в работе (McGarrity, Armstrong, 1981), согласно которой, замена *цис*-двойной связи на циклопропановое кольцо в ацильных цепях ЖК повышает температуру фазового перехода фосфолипида и, тем самым, способствует стабилизации мембран бактерий в условиях повышения температуры роста.

Процентное содержание *изо-* и *антеизо-*метил-разветвленных ЖК было низким и оставалось практически неизменным при повышении температуры роста, что исключает их роль в регуляции вязкости липидов мембран при термоадаптации *Y. pseudotuberculosis*.

Тепловой шок не оказывал влияния на жирнокислотный состав липидов НМ. Однако в ЦМ прослеживались некоторые термоадаптационные изменения: соотношение ненасыщенные/насыщенные ЖК снижалось с 2.3 до 1.5 и приблизительно в три раза увеличивалось содержание циклопропановых ЖК. При этом вклад 17:0_{ср} был минимальным.

Описанные различия в составе ЖК липидов HM И ЦM *Y*. pseudotuberculosis в основном были схожи с теми, что были описаны для Е. coli и Erwinia carotovora (Shukla et al., 1980; Lugtenberg, Peters, 1976). HM Жирнокислотный состав липидов характеризовался большей ЖК сравнению липидов ЦМ. Соотношение насыщенностью ПО С ненасыщенные/насыщенные ЖК снижалось при тепловой адаптации, но оставалось на более высоком уровне в ЦМ.

Однако мы также обнаружили, что с повышением температуры роста в мембранах *Y*. pseudotuberculosis значительно возрастает уровень циклопропановых ЖК. Этот механизм стабилизации мембран (McGarrity, 1981) не был обнаружен у Е. coli. В отличие от Ү. Armstrong, pseudotuberculosis у также E. coli не наблюдалось изменений в содержании 16:1n-7. (Lugtenberg, Peters, 1976). Тепловой шок в Е. coli при резком смещении температуры с 30 °C до 44 °C приводил к значительным изменениям в содержании основных ЖК (Shigapova et al., 2005), тогда как значительного эффекта теплового шока на жирнокислотный состав Ү. pseudotuberculosis не наблюдалось.

Отмеченные принципиальные различия В термоиндуцированных изменениях фосфолипидного и жирнокислотного составов липидов ЦМ и НМ психротрофной Y. pseudotuberculosis в сравнении с мезофильной E. coli, вероятно, объясняются различиями в содержании ферментов, участвующих в биосинтезе фосфолипидов и жирных кислот в этих видах бактерий (http://www.genome.jp база данных KEGG). Присутствие ЖК 18:1n-9 (табл. 10) наряду с существованием гомологичного гена для аэробной Д9десатуразы жирных кислот в геноме Y. pseudotuberculosis (база данных UniProt http://www.uniprot.org/uniprot/A0A0E8XME0) предполагает наличие как аэробного, так и анаэробного путей десатурации ЖК. Напротив, в E. coli имеется только анаэробный путь десатурации (Aguilar, Mendoza, 2006). Этот факт может быть рассмотрен как биохимический ключ к пониманию различий механизмах, В лежащих В основе термоадаптации энтеропатогенных бактерий, и объясняет расхождения в составе, биосинтезе и обмене липидов, выявленные в модельном организме *E.coli* по сравнению с другими бактериями.

91

3.5. Влияние уровня ЛФЭ на чувствительность Y. pseudotuberculosis к ампициллину

современной Впечатляющие достижения В раличных областях медицины, таких как хирургия, трансплантология, неонатология, онкология были бы невозможны без эффективной антиинфекционной терапии с антибиотиков. Однако применением чрезмерное, a зачастую И необоснованное использование антибиотиков привело к неконтролируемому росту числа антибиотикорезистентных штаммов бактерий. В настоящее время ситуация становится критической и рассматривается наряду с такой глобальной проблемой, как изменение климата (Laxminarayan et al., 2013). В связи с этим понимание механизмов резистентности бактерий К антибиотикам становится все более значимой биохимической проблемой, и необходимость выработки новой стратегии применения антибиотиков не вызывает сомнения (Kapil, 2005; Martins et al., 2014). Использование антибиотиков в комбинации с биоактивными веществами представляется одним из наиболее перспективных направлений в антимикробной терапии (Lewis, Ausubel 2006; Jayaraman et al., 2010; Lim et al., 2016). Этот подход был опробован в настоящем исследовании.

Известно, что антибиотикорезистентность обеспечивается несколькими основными механизмами. Среди них: модификация антибиотиков дезактивирующими ферментами, активация системы эффлюксных насосов бактериальной клетки и снижение проницаемости наружной мембраны. Последний путь приобретения резистентности наименее изучен (Ziervogel, Roux, 2013; Delcour, 2009).

В настоящее время основу антимикробной химиотерапии составляют β-лактамные антибиотики в силу их высокой эффективности при лечении большинства инфекций, а также низкой токсичности (Страчунский, Козлов 2002). Ампициллин принадлежит к пенициллиновой группе β-лактамных антибиотиков. Он подавляет активность транспептидазы, катализирующей образование пептидных мостиков между тетрапептидами соседних цепочек пептидогликана и, тем самым, ингибирует заключительный этап синтеза клеточной стенки (Sharma *et al.*, 2013).

Ампициллин в бактерию поступает через пориновые каналы (Ziervogel, Roux, 2013), поэтому его концентрация в клетке напрямую зависит от проводящей активности поринов. Генетические нарушения в биосинтезе и экспрессии поринов (Bystritskaya *et al.*, 2014; Moya-Torres *et al.*, 2014) рассматривают в качестве возможных причин снижения их проницаемости, явно недооценивая роль липидного окружения в модуляции проводящей активности данных каналов.

Так, наши исследования показали, что повышение уровня стрессового липида ЛФЭ в клетках *Y. pseudotuberculosis* приводит к увеличению температуры фазового перехода общих липидов (3.1.2), что индуцирует изменения в пространственной организации порина YOmpF (3.1.3), способные затруднить транспорт различных низкомолекулярных соединений, в том числе и β -лактамных антибиотиков, в клетки бактерий. Важно отметить, что ЛФЭ преимущественно накапливается в HM, там же, где локализуется OmpF порин (3.4.2.).

Для того, чтобы установить роль адаптационных изменений в липидах, в частности, повышения уровня ЛФЭ, в формировании у *Y. pseudotuberculosis* антибиотикорезистентности к ампициллину, нами была изучена чувствительность клеток с высоким и низким содержанием ЛФЭ к данному антибиотику.

Клетки с высоким уровнем ЛФЭ получали при культивировании *Y*. *pseudotuberculosis* на питательной среде с глюкозой, которая, как было показано ранее, способствует накоплению данного фосфолипида (Красикова $u \, dp$. 2001; Bakholdina *et al.*, 2004).

Для понижения уровня $Л\Phi Э$ в мембранах клеток Y. pseudotuberculosis в питательную среду добавляли экстракт полифенолов из шелухи гречихи, антиоксидантные свойства которого (Heś et al., 2012) могут быть связаны с ингибированием PldA (Snijder, Dijkstra 2000). Это предположение основывалось на известной способности полифенольных соединений из ингибиторовать активность различных источников эукариотической фосфолипазы A₂ (Alam *et al.*, 2016; Arnold *et al.*, 2015; da Silva *et al.*, 2009).

3.5.1. Характеристика экстракта полифенолов из шелухи гречихи

Содержание фенольных соединений в экстракте полифенолов из шелухи гречихи составило 73 мг/г концентрата в пересчете на фенол.

Экстракт и данные о содержании в нем фенольных соединений были любезно предоставлены сотрудниками базовой кафедры химических и ресурсосберегающих технологий Школы естественных наук Дальневосточного федерального университета.

3.5.2. Влияние глюкозы и экстракта полифенолов из гречихи на фосфолипидный состав *Y. pseudotuberculosis*

Результаты наших исследований показали (таблица 11), что добавление глюкозы в концентрации 0.5% в питательную среду LB увеличивало продукцию ЛФЭ в клетках *Y. pseudotuberculosis* 488, выращенных при 8 °C, приблизительно в 6 раз. Тогда как результатом дополнительного внесения в питательную среду с глюкозой экстракта полифенолов из шелухи гречихи в концентрации 0.1 мг/мл, наоборот, было двукратное снижение уровня ЛФЭ. Содержание других фосфолипидов изменялось несущественно.

Вероятно, снижение уровня ЛФЭ в клетках обусловлено ингибирующим действием полифенолов шелухи гречихи на фосфолипазу А наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают литературные данные о том, что ингибиторы эукариотической фосфолипазы A_2 могут взаимодействовать с фосфолипазой А наружной мембраны грамотрицательных бактерий (Belosludtsev *et al.*, 2014).

Таблица 11. Фосфолипидный состав *Y. pseudotuberculosis*, выращенной при при 8 °С, в зависимости от присутствия глюкозы и экстракта полифенолов из шелухи гречихи в LB среде (% от общих фосфолипидов)

Фосфолипиды		Питательная среда				
	LB	LB LB+глюкоза LB + глюкоза				
			полифенолы			
ФЭ	85.4	62.5	64.5			
ΦΓ	9.0	11.5	10.2			
ДФГ	4.2	17.2	21.2			
ЛФЭ	1.4	8.8	4.1			

Стандартное отклонение составляло менее 1% для трех повторов

Как правило, активность бактериальных фосфолипаз в современной литературе связывают со стрессом. Данный фермент рассматривают в качестве «реставратора» мембраны бактерий в неблагоприятных условиях, способного регулировать ее проницаемость (Dekker, 2000), то есть работа фосфолипазы А наружной мембраны рассматривается, как один из возможных механизмов адаптации грамотрицательных бактерий.

3.5.3. Влияние глюкозы и экстракта полифенолов из шелухи гречихи на уровень экспрессии генов фосфолипазы А наружной мембраны и неспецифических поринов (OmpF и OmpC) в клетках Y. pseudotuberculosis

Изменение уровня ЛФЭ может быть связано как с изменением активности, так и с изменением экспрессии PldA. Целью исследования относительного уровня экспрессии PldA было выяснение вклада этого процесса в изменение продукции ЛФЭ в клетках *Y. pseudotuberculosis*, выращенной в присутствии 0.5% глюкозы и экстракта полифенолов из шелухи гречихи в концентрации 0.1 мг/мл (табл. 11). Для анализа были

использованы клетки, культивированные в LB-среде, LB-среде с добавлением 0.5% глюкозы и LB-среде с добавлением 0.5% глюкозы и 0.1 мг/мл экстракта полифенолов из шелухи гречихи.

Как видно из рисунка 10 А, добавление глюкозы в питательную среду снижало уровень экспрессии PldA, тогда как дополнительное введение экстракта полифенолов из шелухи гречихи не приводило к последующему достоверному изменению этого уровня.

Также были изучены относительные уровни экспрессии поринов OmpF и OmpC в клетках *Y. pseudotuberculosis*, поскольку известно, что проницаемость поринового канала, в том числе для ампициллина, может зависеть не только от изменений конформации порина OmpF, но и от уровня его экспрессии, которая реципрокно связана с экспрессией другого порина OmpC, имеющего меньшую проводимость (Mahendran *et al.*, 2010; Новикова $u \, dp.$, 2011; Moya-Torres *et al.*, 2014). Общее содержание поринов OmpF и OmpC поддерживается в клетке на постоянном уровне, однако их соотношение зависит от различных абиотических факторов таких, как осмолярность (Hall, Silhavy 1981; Наsegawa *et al.*, 1976), температура (Lugtenberg, Peters, 1976), антибиотиковый стресс (Cohen *et al.*, 2008; Быстрицкая $u \, dp.$, 2014), pH (Thomas, Booth 1992), концентрация различных питательных веществ (Liu, Ferenci, 2001).

Как видно из рисунка 10 (В, С), добавление глюкозы в культуральную среду влияло на экспрессию пориновых генов ompF и ompC*Y*. pseudotuberculosis. Количество транскриптов гена *отр* убывало, а отрС, напротив, усиливалась, экспрессия гена что согласуется С результатами предыдущих исследований (Thomas, Booth, 1992, Liu, Ferenci, 2001), демонстрирующих влияние глюкозы на транскрипцию поринов.

Между эффектом глюкозы и ее совместным действием с экстрактом полифенолов из шелухи гречихи достоверных различий в экспрессии генов *отрС* и *отрF* не наблюдалось (рис. 10 В, С). Таким образом, полученные

данные позволяют заключить, что полифенолы из шелухи гречихи не влияют на транскрипцию *ompF* и *ompC*.



Рис. 10. Относительный уровень экспрессии генов *pldA* (A), *ompF* (B) и *ompC* (C) в клетках *Y. pseudotuberculosis*, культивированных в LB-среде с глюкозой и LB-среде с глюкозой и экстрактом полифенолов из шелухи гречихи. Транскрипцию генов-мишеней в культуре, выращенной в LB-среде без глюкозы и экстракта полифенолов из шелухи гречихи, использовали в качестве контроля. Уровни экспрессии показаны как кратное изменение по сравнению со средним уровнем экспрессии в контрольной группе. Столбцы представляют собой средние значения повторных измерений из двух различных экспериментов \pm стандартное отклонение

3.5.4. Исследование чувствительности к ампициллину клеток *Y*. *pseudotuberculosis* в зависимости от присутствия глюкозы и экстракта полифенолов из шелухи гречихи в культуральной среде

Данные, полученные при исследовании фосфолипидного состава и уровня экспрессии OmpF и OmpC поринов Y. pseudotuberculosis, нашли свое результатах Е-тестов чувствительности отражение В клеток *Y*. pseudotuberculosis к ампициллину, которая оценивалась по уровню ингибирующей минимальной концентрации (МИК) ампициллина В зависимости от присутствия глюкозы и экстракта полифенолов из шелухи гречихи в LB среде.

Как показано в таблице 12, бактерии, выращенные на LB среде, были в 2 раза более чувствительными к ампициллину, чем бактерии, культивированные на питательной среде с добавлением глюкозы.

Таблица 12. Значение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) ампициллина для *Y. pseudotuberculosis*, в зависимости от присутствия глюкозы и/или экстракта полифенолов из шелухи гречихи в LB среде

Питательная среда	МИК, мкг/мл
LB	0.125
LB+полифенолы, 0.1 мг/мл	0.125
LB+полифенолы, 1 мг/мл	0.125
LB+глюкоза	0.25
LB+глюкоза +полифенолы 0.1 мг/мл	0.125
LB+глюкоза +полифенолы 1 мг/мл	0.19

Анализ проводили в трех повторах. Результаты Е-тестов полностью воспроизводились

Согласно данным ПЦР-РВ (3.5.3), добавление глюкозы в питательную среду снижало уровень экспрессии генов *pldA* и *ompF*, но активировало экспресиию *ompC* (рис. 10). Следовательно, резкое повышение уровня ЛФЭ (табл. 11) и сопутствующее снижение проницаемости бактериальной мембраны для исследованного антибиотика под действием глюкозы не связано с изменением уровня экспрессии генов *pldA*, так как в клетках *Y*.

pseudotuberculosis, выращенной при этих условиях, отмечается резкое повышение уровня ЛФЭ (табл.11). Таким образом, аккумуляция ЛФЭ может быть обусловлена в данном случае только повышением активности PldA.

С другой стороны, изменения в уровне экспрессии *ompF* и *ompC* согласуются с увеличением резистенности бактерии к ампициллину под действием глюкозы: снижение экспрессии более проницаемого канала OmpF наряду с увеличением экспрессии менее проницаемого канала OmpC (рис. 10 В, С) (Nikaido, 2003; Moya-Torres *et al.*, 2014).

Однако отсутствие достоверного эффекта экстракта полифенолов из шелухи гречихи на экспрессию обоих поринов не объясняет, почему снижается резистентность *Y. pseudotuberculosis* к ампициллину под действием данного экстракта (табл.12). Следовательно, в основе механизма изменения проницаемости бактериальной мембраны для ампициллина лежит не только регуляция экспрессии главных поринов HM, но и их конформационные перестройки под влиянием ЛФЭ, уровень которого повышался под действием глюкозы, а под влиянием экстракта полифенолов из шелухи гречихи, наоборот, снижался (табл. 11).

Интересно отметить, что эффект экстракта полифенолов из шелухи гречихи, добавленного к LB-среде с глюкозой, на величину МИК носил дозозависимый характер: наибольшая активность достигалась при меньшей концентрации (0.1 мг/мл), тогда как при концентрации 1 мг/мл тенденция сохранялась, но эффект был менее выраженным. Важно, что сам по себе экстракт полифенолов из шелухи гречихи, добавленный к LB-среде без глюкозы, не влиял на значение МИК, независимо от концентрации экстракта, что подтверждает ингибирующее действие экстракта полифенолов из шелухи гречихи на активность PldA, а, следовательно, доказывает, что изменение уровня ЛФЭ является мощным механизмом, регулирующим проницаемость бактериальной мембраны за счет липид-индуцированных изменений в конформации OmpF порина.

выводы

1. Впервые установлено распределение фосфолипидов между наружной (HM) и цитоплазматической (ЦМ) мембранами Yersinia pseudotuberculosis и показано, что тепловой стресс вызывает возрастание уровня лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) от 0 и 1% до 6% и 10% в ЦМ и НМ соответственно.

2. При повышении температуры культивирования существенно увеличивается насыщенность жирных кислот (ЖК) и количество циклопропановых ЖК (в 7.5 раз) в составе липидов обеих мембран, что характерно для бактерий в условиях тепловой адаптации. Напротив, тепловой шок практически не влияет на жирнокислотный состав мембран *Y*. *pseudotuberculosis*.

3. Общие липиды, выделенные из обработанных фенолом клеток *Y*. *pseudotuberculosis*, содержат существенно больше ЛФЭ (в 2.5 раза), насыщенных и циклопропановых ЖК (в 2 и 9 раз соответственно) и характеризуются более высокой температурой фазового перехода (на 23 °C) по сравнению с общими липидами интактных клеток.

4. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии установлено, что общие липиды из *Y. pseudotuberculosis*, обогащенные ЛФЭ, в большей степени индуцируют интегральные конформационные изменения, повышая термостабильность OmpF порина *Y. pseudotuberculosis* (YOmpF), чем общие липиды с низким уровнем ЛФЭ.

5. С помощью собственной белковой флуоресценции показано, что наиболее выраженное влияние общих липидов мембраны, обогащенных ЛФЭ, на интегральные конформационных изменениях порина связано с уплотнением гидрофобной области белка (увеличение вклада спектральной формы S) и экспозицией ароматических флуорофоров на поверхности белка в водное окружение (увеличение вклада спектральной формы Ш).

6. Впервые показано, что ненасыщенная форма ЛФЭ является превалирующей молекулярной формой этого стрессового липида в клетках *Y*. *pseudotuberculosis*, обработанных фенольным биоцидом.

7. Впервые установлено, что ненасыщенная форма ЛФЭ (1-олеоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин) повышает термостабильность YOmpF, уплотняя упаковку мономеров белка и предохраняя его нативную тримерную форму, в отличие от насыщенного ЛФЭ (1-пальмитоил-2гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина), который ослабляет контакт между мономерами и способствует диссоциации белка.

8. Впервые установлено, что резистентность *Y. pseudotuberculosis* к ампициллину связана с повышенным содержанием ЛФЭ в бактериальных клетках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Бахолдина С.И., Соловьева Т.Ф. Экологические аспекты вирулентности бактерий псевдотуберкулеза // Вестник ДВО РАН. 2009. № 3. С. 85-90.

2. Бахолдина С.И., Шубин Ф.Н., Санина Н.М., Соловьева Т.Ф. Действие фенола на бактерии псевдотуберкулеза, культивированные в различных средах // Журн. микробиол. 2011. № 6. С. 64-69.

Брагина Н.А., Миронов А.Ф. Мембранология. ИПЦ МИТХТ,
 2002. 98 с.

4. Быстрицкая Е.П., Стенкова А.М., Портнягина О.Ю., Ракин А.В., Рассказов В.А., Исаева М.П. Регуляция экспрессии главного порина *Yersinia pseudotuberculosis* в условиях антибиотикового стресса // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2014. №2. С. 17-21.

5. Красикова И.Н., Бахолдина С.И., Соловьева Т.Ф. Глюкоза как фактор среды роста, регулирующий липидный состав *Yersinia pseudotuberculosis* // Биохимия. 2001. Т. 66. Вып. 8. С. 1122-1127.

6. Лихацкая Г.Н., Портнягина О.Д., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. Выделение порообразующего белка из внешней мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* и изучение его действия на проводимость бислойных липидных мембран // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 12. С. 1219-1224.

7. Лось Д.А. Структура, регуляция экспресии и функционирования десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 163-198.

8. Любарев А.Е., Курганов Б.И. Изучение необратимой тепловой денатурации белков методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Успехи биологической химии. 2000. Т. 40. С. 43—84.

9. Новикова О.Д., Фролова Г.М., Вакорина Т.И., Таранкова З.А., Глазунов В.П., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. Конформационная стабильность и иммунохимические свойства иерсинина — основного белка

внешней мембраны псевдотуберкулезного микроба // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 763—772.

10. Новикова О.Д., Ким Н.Ю., Лукьянов П.А., Емельяненко В.И., Кузнецова С.М., Лихацкая Г.Н., Соловьева Т.Ф. Влияние рН на структуру и функциональную активность порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*. 2. Характеристика рН-индуцированных конформационных интермедиатов иерсинина // Биол. мембраны. 2007. Т. 24. № 2. С. 159–168.

11. Новикова О.Д., Хоменко В.А., Емельяненко В.И., Лихацкая Г.Н., Зелепуга Е.А., Ким Н.Ю., Исаева М.П., Портнягина О.Ю., Вострикова О.П., Сидорова О.В., Соловьева Т.Ф. ОтрС-подобный порин из *Yersinia pseudotuberculosis*: молекулярная характеристика, физико-химические и функциональные свойства. Биологические мембраны. 2011. Т. 28. № 2. С. 95– 110.

Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие).
 М.: Наука, 1981. 288 с.

13. Пермяков Е.А. Метод собственной люминисценции белка. М.: Наука, 2003. 189 с.

14. Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Вострикова О.П., Хоменко В.А., Соловьева Т.Ф. Бактериальные порины как перспективные антигены для диагностики и вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний // Вестник ДВО РАН. 2004. № 3. С. 35-44.

15. Соловьева Т.Ф., Ермак И.М., Мороз С.И., Красикова И.Н., Новикова О.Д., Хоменко В.А., Фролова Г.М., Иванова Е.П., Тимченко Н.Ф., Оводов Ю.С. Влияние температуры культивирования на состав основных компонентов внешней мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. № 5. С. 492-500. 16. Страчунский Л.С., Козлов С.Л. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей. М.: Боргсс, 2002. 436 с

17. Черенкевич С.Н. Биологические мембраны: учеб. пособие для студентов физ., биол., биохим., биотехн. специальностей. Минск: БГУ, 2008.184 с.

18. Achouak W., Heulin T., Pages J.-M. Multiple facets of bacterial porins // FEMS Microbiol. Lett. 2001. Vol. 199. Issue 1. P.1–7.

19. Aguilar P.S., Mendoza D. Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans // Mol. Microbiol. 2006. Vol. 62. Issue 6. P. 1507-1514.

20. Alam M.I., Alam M.A., Alam O., Nargotra A., Taneja S.C., Koul S. Molecular modeling and snake venom phospholipase A₂ inhibition by phenolic compounds: Structure–activity relationship // Eur. J. Med. Chem. 2016. Vol. 114. P. 209-219.

21. Alcaraz A., Nestorovich E.M., Aguilella-Arzo M., Aguilella V.M., Bezrukov S.M. Salting out the ionic selectivity of a wide channel: the asymmetry of OmpF // Biophys. J. 2004. Vol. 87. No. 2. P. 943-957.

22. Ali M.H., Imperiali B. Protein oligomerization: how and why // Bioorg. Med.Chem. 2005. Vol. 13. Issue 17. P. 5013–5020.

23. Allen T.M., Cullis P.R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications // Adv. Drug Delivery Rev. 2013.Vol. 65. Issue 1. P. 36–48.

24. Alonso A., Goci F., Buckley J. Lipids favoring inverted phase enhance the ability of aerolysin to permeabilize liposome bilayers // Biochemistry. 2000. Vol. 39. Issue 46. P. 14019-14024.

25. Andersen O.S., Koeppe R.E. Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2007. Vol. 36. P. 107–130.

26. Arnold E., Benz T., Zapp C., Wink M. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 α (cPLA2 α) by medicinal plants in relation to their phenolic content // Molecules. 2015. Vol. 20. Issue 8. P.15033-15048.

27. Arora A., Tamm L.K. Biophysical approaches to membrane protein structure determination // Curr. Opin. Struct. Biol. 2001. Vol. 11. Issue 5. P. 540-547.

28. Arouri A., Mouritsen O.G. Membrane-perturbing effect of fatty acids and lysolipids // Prog. Lipid Res. 2013. Vol. 52. Issue 1. P. 130-140.

29. Asakura H., Ekawa T., Sugimoto N., Momose Y., Kawamoto K., Makino S., Igimi S., Yamamoto S. Membrane topology of *Salmonella* invasion protein SipB confers osmotolerance // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. Vol. 426. Issue 4. P. 654-658.

30. Attard G.S., Templer R.H., Smith W.S., Hunt A.N., Jackowski S. Modulation of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase by membrane curvature elastic stress // Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000. P. 9032–9036.

31. Bakholdina S.I., Krasikova I.N., Buzoleva L.S., Shubin F.N., Solov'eva T.F. Effects of culture method and growth phase on free lipid composition of *Yersinia pseudotuberculosis* // Biochemistry (Mosc.). 2001. Vol. 66. P. 415–421.

32. Bakholdina S.I., Sanina N.M., Krasikova I.N., Popova O.B., Solov'eva T.F. The impact of abiotic factors (temperature and glucose) on physicochemical properties of lipids from *Yersinia pseudotuberculosis* // Biochimie. 2004. Vol. 86. Issue 12. P. 875-81.

33. Barák I., Muchová K. The role of lipid domains in bacterial cell processes // Int. J. Mol. Sci. 2013. Vol. 14. No. 2. P. 4050-4065.

34. Barrera N.P., Zhou M., Robinson C.V. The role of lipids in defining membrane protein interactions: insights from mass spectrometry // Trends Cell Biol. 2013. Vol. 23. Issue 1. P.1-8.

35. Baslé A., Qutub R., Mehrazin M., Wibbenmeyer J., Delcour A. H. Deletions of single extracellular loops affect pH-sensitivity, but not voltagedependence, of the *E. coli* porin OmpF // Protein Eng. Des. Sel. 2004. Vol. 17. Issue 9. P. 665–672.

36. Bechara C., Noll A., Morgner N., Degiacomi M. T., Tampé R., Robinson C. V. A subset of annular lipids is linked to the flippase activity of an ABC transporter // Nat. Chem. 2015. Vol. 7. No. 3. P.255–262.

37. Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Kondratyev M.S., Agafonov A.V., Purtov Y.A. Interaction of phospholipase A of the *E. coli* outer membrane with the inhibitors of eucaryotic phospholipases A_2 and their effect on the Ca2+-induced permeabilization of the bacterial membrane // J. Membrane Biol. 2014. Vol. 247. P. 281–288.

38. Beney L., Gervais P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. Vol. 57. Issue 1. P. 34-42.

39. Benga G., Holmes R.P. Interactions between components in biological membranes and their implications for membrane function // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1984. Vol. 43. Issue. 3. P.195-257.

40. Bernat P., Siewiera P., Soboń A., Długoński J. Phospholipids and protein adaptation of *Pseudomonas* sp. to the xenoestrogen tributyltin chloride (TBT) // World J. Microbiol. Biotechnol. 2014. Vol. 30. Issue. 9. P. 2343-2350.

41. Bezrukov S.M. Functional consequences of lipid packing stress // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2000. Vol. 5. Issues 3-4. P. 237–243.

42. Bishop R.E. Emerging roles for anionic non-bilayer phospholipids in fortifying the outer membrane permeability barrier // J. Bacteriol. 2014. Vol. 196. Isssue 18. P. 3209-3213.

43. Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J.
Molecular mechanisms of antibiotic resistance // Nat. Rev. Microbiol. 2015. Vol.
13. Issue 1. P. 42-51.

44. Bogdanov M., Dowhan W. Lipid-dependent generation of a dual topology for a membrane protein // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287. Issue 45. P. 37939-37948.

45. Bogdanov M., Mileykovskaya E., Dowhan W. Lipids in the assembly of membrane proteins and organization of protein supercomplexes: implications for lipid-linked disorders // Subcell. Biochem. 2008. Vol. 49. P. 197–239.

46. Bogdanov M., Heacock P., Guan Z., Dowhan W. Plasticity of lipidprotein interactions in the function and topogenesis of the membrane protein lactose permease from *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010a. Vol. 107. No. 34. P. 15057-15062.

47. Bogdanov M., Heacock P., Dowhan W. Study of Polytopic Membrane Protein Topological Organization as a Function of Membrane Lipid Composition // In: Protein Secretion, Methods in Molecular Biology, ed. A. Economou. New York: Springer Science+Business Media, 2010b. P. 79-101.

48. Bogdanov M., Dowhan W., Vitrac H. Lipids and topological rules governing membrane protein assembly // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1843. Issue 8. P.1475-1488.

49. Bondar A.N., del Val C., Freites J.A., Tobias D.J., White S.H. Dynamics of SecY translocons with translocation-defective mutations // Structure. 2010. Vol. 18. Issue 7. P. 847-857.

50. Bos M.P., Robert V., Tommassen J. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane // Annu. Rev. Microbiol. 2007. Vol. 61. P.191-214.

51. Bramkamp M., Lopez D. Exploring the existence of lipid rafts in bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2015. Vol. 79. Issue 1. P. 81-100.

52. Bredin J., Saint N., Malléa M., Dé E., Molle G., Pagès J.M., Simonet V. Alteration of pore properties of *Escherichia coli* OmpF induced by mutation of key residues in anti-loop 3 region // Biochem. J. 2002. Vol. 363. Pt. 3. P.521–528.

53. Brown M.F. Curvature forces in membrane lipid–protein interactions // Biochemistry. 2012. Vol. 51. Issue 49. P. 9782-9795.

54. Brown J.L., Ross T., McMeekin T.A., Nichols P.D. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance // Int. J. Food Microbiol. 1997. Vol. 37. Issues 2–3. P. 163–173.

55. Bukholm G., Tannæs T., Nedenskov P., Esbensen Y., Grav H.J., Hovig T., Guldvog I. Colony variation of *Helicobacter pylori*: pathogenic potential is correlated to cell wall lipid composition // Scand. J. Gastroenterol. 1997. Vol. 32. P. 445-454.

56. Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. Fluorescence and the localization of tryptophan residues in protein molecules // Photochem. Photobiol. 1973. Vol. 18. Issue 4. P. 263-279.

57. Busby S., Ebright R.H. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP) // J. Mol. Biol. 1999. Vol. 293. Issue 2. P. 199-213.

58. Bystritskaya E.P., Stenkova A.M., Portnyagina O.Yu., Rakinc A.V., Rasskazova V.A., Isaeva M.P. Regulation of *Yersinia pseudotuberculosis* major porin expression in response to antibiotic stress molecular genetics // Mol. Genet. Microbiol. Virol. 2014. Vol. 29. No. 2. P. 63–68.

59. Carola I.E., Knech V. Antimicrobial selectivity based on zwitterionic lipids and underlying balance of interactions // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1818. Issue 9. P. 2192-201.

60. Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of macro-scale method to the microscale for faty acid methyl transesterification of biologicall lipid extracts // J. Chromatogr. Sci. 1985. Vol. 23. No. 2. P. 54-56.

61. Cesari A.B., Paulucci N.S., Biasutti M.A., Reguera Y.B., Gallarato L.A., Kilmurray C., Dardanelli M.S. Reorganization of *Azospirillum brasilense* cell membrane is mediated by lipid composition adjustment to maintain optimal fluidity during water deficit // J. Appl. Microbiol. 2016. Vol. 120. Issue 1. P. 185-194.
62. Chang Y.Y., Cronan J.E. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 1999. Vol. 33. Issue 2. P. 249–259.

63. Chatterjee S.N., Chaudhuri K. Gram-negative bacteria: the cell membranes // In: Outer Membrane Vesicles of Bacteria. Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer, 2012. P. 15-34.

64. Chen Y.Y., Gänzle M.G. Influence of cyclopropane fatty acids on heat, high pressure, acid and oxidative resistance in *Escherichia coli* // Int. J. Food Microbiol. 2016. Vol. 222. P. 16-22.

65. Christie W.W. Equivalent chain length of methyl ester derivatives of fatty acid on gas chromatography// J. Cromatogr. 1988. Vol. 447. No. 2. P. 305-314.

66. Clifton L.A., Skoda M.W., Daulton E.L., Hughes A.V., Le Brun A.P., Lakey J.H., Holt S.A. Asymmetric phospholipid: lipopolysaccharide bilayers; a Gram-negative bacterial outer membrane mimic // J. R. Soc. Interface. 2013. Vol. 10. Issue 89. P.1-11.

67. Coey A.T., Sahu I.D., Gunasekera T.S., Troxel K.R., Hawn J.M., Swartz M.S., Wickenheiser M. R., Reid R.-J., Welch R.C., Vanoye C.G., Kang C., Sanders C.R., Lorigan G.A. Reconstitution of KCNE1 into lipid bilayers: comparing the structural, dynamic, and activity differences in micelle and vesicle environments // Biochemistry. 2011. Vol. 50. Issue 50. P. 10851-10859.

68. Cohen S.P., McMurry L.M., Levy S.B. marA locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1988. Vol. 170. P. 5416–5422.

69. Cournia Z., Allen T.W., Andricioaei I., Antonny B., Baum D., Brannigan G., Buchete N.V., Deckman J.T., Delemotte L., Del Val C., Friedman R., Gkeka P., Hege H.C., Hénin J., Kasimova M.A., Kolocouris A., Klein M.L., Khalid S., Lemieux M.J., Lindow N., Roy M., Selent J., Tarek M., Tofoleanu F., Vanni S., Urban S., Wales D.J., Smith J.C., Bondar A.N. Membrane protein structure, function, and dynamics: a perspective from experiments and theory // J. Membr. Biol. 2015. Vol. 248. Issue 4. P. 611-640.

70. da Silva S.L., Calgarotto A.K., Maso V., Damico D.C., Baldasso P., Veber C.L., Villar J.A., Oliveira A.R., Comar M.Jr., Oliveira K.M., Marangoni S. Molecular modeling and inhibition of phospholipase A_2 by polyhydroxy phenolic compounds // Eur. J. Med. Chem. 2009. Vol. 44. Issue 1. P. 312-321.

71. Dalebroux Z.D., Matamouros S., Whittington D., Bishop R.E., Miller S.I. RhoP regulates acidic glycerophospholipid content of the *Salmonella typhimurium* outer membrane // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. Vol. 111. P. 1963-1968.

72. Dalebroux Z.D., Edrozo M.B., Pfuetzner R.A., Ressl S., Kulasekara B.R., Blanc M.P., Miller S.I. Delivery of cardiolipins to the *Salmonella* outer membrane is necessary for survival within host tissues and virulence // Cell Host Microbe. 2015. Vol. 17. No. 4. P. 441-451.

73. Danevcic T., Rilforsb L., Strancarc J., Lindblomb G., Stopara D. Effects of lipid composition on the membrane activity and lipid phase behaviour of *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown at various NaCl concentrations // Biochim. Biophys. Acta. 2005. Vol. 1712. Issue 1. P. 1-8.

74. Davies S.M., Epand R.M., Kraayenhof R., Cornell R.B. Regulation of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase activity by the physical properties of lipid membranes: an important role for stored curvature strain energy // Biochemistry. 2001.Vol. 40. No. 35. P. 10522–10531.

75. Davin-Regli A., Bolla J.M., James C.E., Lavigne J.P., Chevalier J., Garnotel E., Molitor A., Pagès J.M. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens // Curr. Drug Targets. 2008. Vol. 9. Issue 9. P. 750-759.

76. De E., Basle A., Jaquinod M., Saint N., Mallea M., Molle G., Pages J.M. A new mechanism of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae induced by a

structural modification of the major porin // Mol. Microbiol. 2001. Vol. 41. Issue 1. P. 189–198.

77. De Kruijff B. Lipids beyond the bilayer // Nature. 1997. Vol. 386. P. 129-131.

78. Dekker N. Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function // Mol. Microbiol. 2000. Vol. 35. P. 711–717.

79. Delcour A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1794. Issue 5. P. 808-816.

80. Delcour A.H., Adler J., Kung C., Martinac B. Membrane-derived oligosaccharides (MDO's) promote closing of an *E. coli* porin channel // FEBS Lett. 1992. Vol. 304. Issue 2-3. P. 216–220.

81. Denich T.J., Beaudette L.A., Lee H., Trevors J.T. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes // J. Microbiol. Methods. 2003. Vol. 52. Issue 2. P. 149-82.

82. Dhakshnamoorthy B., Ziervogel B.K., Blachowicz L., Roux B.A structural study of Ion permeation in OmpF porin from anomalous X - ray diffraction and molecular dynamics simulations // J. Am. Chem. Soc. 2013. Vol. 135. Issue 44. P. 16561-16568.

83. Dowhan W., Mileykowskaya E., Bogdanov M. Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1666. P. 19-39.

84. Epand R.M. Lipid polymorphism and protein–lipid interactions // Biochim. Biophys. Acta. 1998. Vol. 1376. Issue 3. P. 353–368.

85. Epand R.M., Rotem S., Mor A., Berno B., Epand R.F. Bacterial membranes as predictors of antimicrobial potency // J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol. 130. Issue. 43. P.14346-14352.

86. Epand R.M., D'Souza K., Berno B., Schlame M. Membrane curvature modulation of protein activity determined by NMR // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1848. Issue 1. Part B. P. 220–228.

87. Fairman J.W., Noinaj N., Buchanan S.K. The structural biology of β-barrel membrane proteins: a summary of recent reports // Curr. Opin. Struct. Biol. 2011. Vol. 21. No. 4. P. 523-531.

Fernández L., Hancock R.E. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance // Clin. Microbiol. Rev. 2012. Vol. 25. Issue 4. P. 661-681.

89. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 14. P. 497-509.

90. Foo Y.H., Spahn C., Zhang H., Heilemann M., Kenney L.J.Single cell super-resolution imaging of *E. coli* OmpR during environmental stress // Integr. Biol. (Camb). 2015. Vol. 7. Isssue 10. P. 1297-1308.

91. Frolov V.A., Shnyrova A.V., Zimmerberg J. Lipid polymorphisms and membrane shape // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011. Vol. 3. Issue 11. P. 1-14.

92. Galdiero S., Falanga A., Cantisani M., Tarallo R., Della Pepa M.E., D'Oriano V., Galdiero M. Microbe-host interactions: structure and role of Gramnegative bacterial porins // Curr. Protein Pept. Sci. 2012. Vol. 13. Issue 8. P. 843– 854.

93. Gao H., Zhang Y., Yang L., Liu X., Guo Z., Tan Y., Han Y., Huang X., Zhou D., Yang R. Regulatory effects of cAMP receptor protein (CRP) on porin genes and its own gene in *Yersinia pestis* // BMC Microbiol. 2011. Vol. 23. P. 11-40.

94. Gessmann D., Chung Y.H., Danoff E.J. Plummer A.M., Sandlin C.W., Zaccai N.R., Fleming K.G. Outer membrane beta-barrel protein folding is physically controlled by periplasmic lipid head groups and BamA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. Vol. 111. Issue 16. P. 5878-5883. 95. Giles D.K., Hankins J.V., Guan Z., Trent M.S. Remodelling of the *Vibrio cholerae* membrane by incorporation of exogenous fatty acids from host and aquatic environments // Mol. Microbiol. 2011. Vol. 79. Issue 3. P. 716–728.

96. Görke B., Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients // Nat. Rev. Microbiol. 2008. Vol. 6. Issue 8. P. 613-624.

97. Grandvalet C., Assad-García J.S., Chu-Ky S., Tollot M., Guzzo J., Gresti J., Tourdot-Maréchal R. Changes in membrane lipid composition in ethanoland acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation // Microbiology. 2008. Vol. 154. Pt 9. P. 2611– 2619.

98. Gu Y., Stansfeld P.J., Zeng Y., Dong H., Wang W., Dong C. Lipopolysaccharide is inserted into the outer membrane through an intramembrane hole, a lumen gate, and the lateral opening of LptD // Structure. 2015. Vol. 23. Issue 3. P. 496–504.

99. Gu Y., Li H., Dong H., Zeng Y., Zhang Z., Paterson N.G., Stansfeld P.J., Wang Z., Zhang Y., Wang W., Dong C. Structural basis of outer membrane protein insertion by the BAM complex // Nature. 2016. Vol. 531. Issue 7592. P. 64-69.

100. Guzev K.V., Isaeva M.P., Novikova O.D., Solov'eva T.F., Rasskazov V.A. Molecular characteristics of OmpF-like porins from pathogenic *Yersinia* // Biochemistry (Mosc.). 2005. Vol. 70. Issue 10. P. 1104–1110.

101. Haines T.H. A new look at cardiolipin // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1788. Issue 10. P. 1997-2002.

102. Hall M.N., Silhavy. T.J. The *ompB* locus and the regulation of the major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K12 // J. Mol. Biol.1981. Vol. 146. P. 23–43.

103. Harman J.G. Allosteric regulation of the cAMP receptor protein // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1547. Issue 1. P. 1-17.

104. Härtig C., Loffhagen N., Harms H. Formation of trans Fatty Acids Is Not Involved in Growth-Linked Membrane Adaptation of *Pseudomonas putida* // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71. No. 4. P. 1915-1922.

105. Harvat E.M., Zhang Y.M., Tran C.V., Zhang Z., Frank M.W., Rock C.O., Saier M.H. Lysophospholipid flipping across the *Escherichia coli* inner membrane catalyzed by a transporter (LpIT) belonging to the major facilitator superfamily // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 208. Issue 12. P. 12028-12034.

106. Hasegawa Y., Yamada H., Mizushima S. Interactions of outer membrane proteins O-8 and O-9 with peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K-12 // J. Biochem. 1976. Vol. 80. P.1401–1409.

107. Hęś M., Gorecka D., Dziedzic K. Antioxidant properties of extracts from buckwheat by-products // Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 2012. Vol. 11. Issue 2. P.167-174.

108. Hiraoka S., Matsuzaki H., Shibuya I. Active increase in cardiolipin synthesis in the stationary growth phase and its physiological significance in *Escherichia coli* // FEBS Lett. 1993. Issue 336. Vol. 2. P. 221-224.

109. Hoch F.L. Cardiolipins and biomembrane function // Biochim. Biophys. Acta.1992. Vol. 1113. Issue 1. P. 71–133.

110. Hong H. Role of Lipids in Folding, Misfolding and Function of Integral Membrane Proteins // Adv. Exp. Med. Biol. 2015. Vol. 855. P. 1-31.

111. Hooper D.C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance // Emerging Infect. Dis. 2001.Vol. 7. Issues 2. P. 337-341.

112. Hsia C-Y., Richards M.J., Daniel S. A review of traditional and emerging methods to characterize lipid–protein interactions in biological membranes // Anal. Methods. 2015. Vol. 7. Issue 17. P. 7076-7094.

113. Huang L., Tsui P., Freundlich M. Positive and negative control of ompB transcription in *Escherichia coli* by cyclic AMP and the cyclic AMP receptor protein // J. Bacteriol. 1992. Vol. 174. Issue 3. P. 664-670.

114. Hung W.C., Lee M.T. The interaction of melittin with *E. coli* membrane: The role of cardiolipin // Chinese Journal of Physics. 2006. Vol. 44. Issue 2. P. 137-149.

115. Ishinaga M., Kanamoto R., Kito M. Distribution of phospholipid molecular species in outer and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* // J. Biochem. 1979. Vol. 86. Issue 1. P. 161-165.

116. Israelachvili N. Intermolecular and Surface Forces. San Diego: Academic Press, 2011. 674 p.

117. Istivan T.S., Coloe P.J. Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis // Microbiology (UK). 2006. Vol. 152. Pt.5. P. 1263–1274.

118. Jain M.K., van Echteld C.J., Ramirez F., de Gier J., de Haas G.H., van Deenen L.L. Association of lysophosphatidylcholine with fatty acids in aqueous phase to form bilayers // Nature. 1980. Vol. 284. Issue 5755. P. 486–487.

119. Jain M.K., De Haas G.H. Structure of 1-acyl lysophosphatidylcholine and fatty acid complex in bilayers // Biochim. Biophys. Acta. 1981. Vol. 642. Issue 1. P. 203–211.

120. Jardon-Valadez E., Bondar A.N., Tobias D.J. Coupling of retinal, protein, and water dynamics in squid rhodopsin // Biophys. J. 2010. Vol. 99. Issue 7. P. 2200-2207.

121. Jayaraman P., Sakharkar M.K., Lim C.S., Tang T.H., Sakharkar K.R. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa in vitro* //Int. J. Biol. Sci. 2010. Vol. 6. P. 556–568.

122. Kaclikova E., Krascsenicsova K., Pangallo D., Kuchta T. Detection and quantification of *Citrobacter freundii* and *C. braakii* by 5'-nuclease polymerase chain reaction // Curr. Microbiol. 2005. Vol. 51. No. 4. P. 229–232.

123. Kapil A. Antibiotics are critical in the treatment of bacterial infections // Indian J. Med. Res. 2005. Vol. 121. 2005. P. 83-91.

124. Kates M., Syz J.-Y., Gosser D., Haines T.H. pH-dissociation characteristics of cardiolipin and its 2'-deoxy analogue // Lipids. 1993. Vol. 28. Issue 10. P. 877-882.

125. Kern R., Joseleau-Petit D., Chattopadhyay M.K., Richarme G. Chaperone-like properties of lysophospholipids // Biochem. Biophys. Res.Commun. 2001. Vol. 289. Issue 5. P. 1268-1274.

126. Kerrinnes T., Young B.M., Leon C., Roux C.M., Tran L., Atluri V.L., Winter M.G., Tsolis R.M. Phospholipase A₁ modulates cell envelope phospholipid content of *Brucella melitensis*, contributing to polymyxin resistance and pathogenicity // Antimicrob. Agents Chemother. 2015. Vol. 59. No. 11. P. 6717-6724.

127. Kim B.H., Kim S., Kim H.G., Lee J., Lee I.S., Park Y.K. The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) // Microbiology. 2005. Vol. 151. Pt 1. P. 209-218.

128. Kim K.H., Aulakh S., Paetzel M. The bacterial outer membrane β -barrel assembly machinery // Protein Sci. 2012. Vol. 21. Issue 6. P. 751–768.

129. Kleinschmidt J.H. Folding of β -barrel membrane proteins in lipid bilayers - Unassisted and assisted folding and insertion // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1848. P. 1927–1943.

130. Klüsener S., Aktas M., Thormann K.M., Wessel M., Narberhaus F. Expression and physiological relevance of *Agrobacterium tumefaciens* phosphatidylcholine biosynthesis genes // J. Bacteriol. 2009. Vol. 191. No. 1. P. 365-374.

131. Koebnik R., Locher K.P., Van G.P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell // Mol. Microbiol. 2000. Vol. 37. No. 2. P. 239-253.

132. Könneke M., Widdel F. Effect of growth temperature on cellular fatty acids in sulphate-reducing bacteria // Environ. Microbiol. 2003. Vol. 5. No. 11. P. 1064-1070.

133. Koprivnjak T., Zhang D., Ernst C.M., Peschel A., Nauseef W.M., Weiss J.P. Characterization of *Staphylococcus aureus* cardiolipin synthases 1 and 2 and their contribution to accumulation of cardiolipin in stationary phase and within phagocytes // J. Bacteriol. 2011. Vol. 193. Issue 16. P. 4134-4142.

134. Kovacs-Simon A., Titball R.W., Michell S.L. Lipoproteins of bacterial pathogens // Infect. Immun. 2011. Vol. 79. No. 2. P. 548-561.

135. Krasikova I.N., Bakholdina S.I., Solov'eva T.F. Synthesis of lipopolysaccharides in the bacterium *Yersinia pseudotuberculosis*: effect of the pVM82 plasmid and growth temperature // Biochemistry (Mosc.). 2000. Vol. 65. Issue 11. P.1272-1278.

136. Krin E., Sismeiro O., Danchin A., Bertin P.N. The regulation of Enzyme IIAGlc expression controls adenylate cyclase activity in *Escherichia coli* // Microbiology. 2002. Vol. 148. Pt 5. P. 1553–1559.

137. Krueger-Koplin R.D., Sorgen P.L., Krueger-Koplin S.T., Rivera-Torres I.O., Cahill S.M., Hicks D.B., Grinius L., Krulwich T.A., Girvin M.E. An evaluation of detergents for NMR structural studies of membrane proteins // J. Biomol. NMR. 2004. Vol. 28. Issue 1. P. 43-57.

138. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles // Annu. Rev. Microbiol. 2010. Vol. 64. P. 163-184.

139. Kurganov B.I., Lyubarev A.E., Sanchez-Ruiz J.M., Shnyrov V.L. Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins. Criteria of validity of onestep mechanism of irreversible protein denaturation // Biophys. Chem. 1997. Vol. 69. Issue 2-3. P. 125-135.

140. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.

141. Laganowsky A., Reading E., Allison T., Ulmschneider M.B., Degiacomi M.T., Baldwin A.J., Robinson C.V. Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function // Nature. 2014. Vol. 510. Issue 7503. P. 172–175.

142. Lauman B., Pagel M., Delcour A. H. Altered pore properties and kinetic changes in mutants of the *Vibrio cholerae* porin OmpU // Mol. Membr. Biol. 2008. Vol. 25. Issue 6-7. P. 498-505.

143. Laxminarayan R., Duse A., Wattal C., Zaidi A.K., Wertheim H.F., Sumpradit N., Vlieghe E., Hara G.L., Gould I. M., Goossens H., Greko C., So A. D., Bigdeli M., Tomson G., Woodhouse W., Ombaka E., Peralta A.Q., Qamar F.N., Mir F., Kariuki S., Bhutta Z.A., Coates A., Bergstrom R., Wright G.D., Brown E.D., Cars O. Antibiotic resistance—the need for global solutions // Lancet. Infect. Dis. 2013. Vol. 13. No. 12. P. 1057–1098.

144. Layre E., Moody D.B. Lipidomic profiling of model organisms and the world's major pathogens // Biochimie. 2013. Vol. 95. Issue 1. P. 109-115.

145. le Maire M., Champeil P., Moller J.V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents // Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1508. Issue 1-2. P. 86-111.

146. Lee A.G. Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective // Biochim. Biophys. Acta. 2003. Vol. 1612. Issue 1. P. 1–40.

147. Lee A.G. How lipids affect the activities of integral membrane proteins // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1666. Issue 1-2. P. 62-87.

148. Lee A.G. Lipid–protein interactions // Biochem. Soc. Trans. 2011.Vol. 39. Issue 1. P. 761–766.

149. Leekumjorn S., Sum A.K. Molecular studies of the gel to liquidcrystalline phase transition for fully hydrated DPPC and DPPE bilayers // Biochim Biophys Acta. 2007. Vol. 1768. Issue 2. P. 354-365.

150. Lemmin T., Bovigny C., Lançon D., Dal Peraro M. Cardiolipin models for molecular simulations of bacterial and mitochondrial membranes // J. Chem. Theory Comput. 2013. Vol. 9. No. 1. P. 670-678.

151. Lewis K., Ausubel F.M. Prospects for plant-derived antibacterial // Nat. Biotechnol. 2006. Vol.24. P. 1504–1507.

152. Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N. The physicochemical properties of cardiolipin bilayers and cardiolipin-containing lipid membranes // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1788. Issue 10. P. 2069–2079.

153. Lim A., Subhan N., Jazayeri J.A., John G., Vanniasinkam T., Obied H.K. Plant phenols as antibiotic boosters: *in vitro* interaction of olive leaf phenols with ampicillin phytother // Phytother. Res. 2016. Vol. 30. Issue 3. P. 503-509.

154. Lin Y., Bogdanov M., Tong S., Guan Z., Zheng L. Substrate selectivity of lysophospholipid transporter LpIT involved in membrane phospholipid remodeling in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. 2016. Vol. 291. Issue 5. P. 2136-2149.

155. Lindblom G., Rilfors L., Hauksson J.B., Brentel I., Sjölund M. Bergenstahl B. Effect of head-group structure and counterion condensation on phase equilibria in anionic phospholipid–water systems studied by ²H, ²³Na, and ³¹P NMR and X-ray diffraction // Biochemistry. 1991. Vol. 30. Issue 45. P. 10938-10948.

156. Linde K., Gröbner G., Rilfors L. Lipid dependence and activity control of phosphatidylserine synthase from *Escherichia coli* // FEBS Lett. 2004. Vol. 575. Issue 1-3. P. 77–80.

157. Liu X., Ferenci T. An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of *ompF* and *ompC* porin expression under nutrient limitation // Microbiology. 2001. Vol. 147. P. 2981–2989.

158. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}_{T}$ Method // Methods. 2001. Vol. 25. Issue 4. P.402-408.

159. Lugtenberg E.J.J., Peters R. Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* K12 // Biochim. Biophys. Acta. 1976. Vol. 441. Issue 1. P. 38-47.

160. Lundbaek J.A., Andersen O.S. Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers // J. Gen. Physiol. 1994. Vol. 104. Issue 4. P. 645-673.

161. MacGilvray M.E., Lapek J.D., Friedman A.E., Quivey R.G., Cardiolipin biosynthesis in *Streptococcus* mutans is regulated in response to external pH // Microbiology. 2012. Vol. 158. Pt. 8. P. 2133–2143.

162. Mahendran K.R., Kreir M., Weingart H., Fertig N., Winterhalter M. Permeation of antibiotics through OmpF and OmpC porins: screening for influx on a single-molecule level // J. Biomol. Screen. 2010. Vol. 15. Issue 3. P. 302-307.

163. Mansilla M.C., Cybulski L.E., Albanesi D., de Mendoza D. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors // J. Bacteriol. 2004. Vol. 186. No. 20. P. 6681-6688.

164. Marius P., De Planque M.R.R., Williamson P.T.F. Probing the interaction of lipids with the non-annular binding sites of the potassium channel KcsA by magicangle spinning NMR // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1818. Issue 1. P. 90–96.

165. Martins A., Spengler G., Molnár J., Amaral L. Bacterial Antibiotic Resistance // eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 2014. http://www.els.net. doi: 10.1002/9780470015902.a0001993.pub2.

166. Matsumoto K., Kusaka J., Nishibori A., Hara H. Lipid domains in bacterial membranes // Mol. Microbiol. 2006. Vol 61. Issue 5. P. 1110–1117.

167. McGarrity J.T., Armstrong J.B. Phase transition behavior of artificial liposomes composed of phosphatidylcholines acylated with cyclopropane fatty acids // Biochim. Biophys. Acta. 1981. Vol. 640. Issue 2. P. 544-548.

168. Mileykovskaya E., Dowhan W. Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange // J. Bacteriol. 2000. Vol. Issue 4. 182. P. 1172–1175.

169. Miura T., Mizushima S. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membrane of *Escherichia coli* K12 // Biochim. Biophys. Acta. 1968. Vol. 150. No. 1. P. 159-161.

170. Mouritsen O.G. Lipids, curvature, and nano-medicine // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2011. Vol. 113. P. 1174–1187.

171. Moya-Torres A., Mulvey M.R., Kumar A., Oresnik I.J., Brassinga A.K. The lack of OmpF, but not OmpC, contributes to increased antibiotic resistance in *Serratia marcescens* // Microbiology. 2014. Vol. 160. Pt 9. P.1882-1892.

172. Munoz-Rojas J., Bernal P., Duque E., Godoy P., Segura A., Ramos J.
L. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida*KT2440 to freeze-drying // Appl. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72. Issue 1. P.
472-477.

173. Murínová S., Dercová K. Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane // Int. J. Microbiol. 2014. Article ID 873081. http://dx.doi.org/10.1155/2014/873081.

174. Murzyn K., Rog T., Pasenkiewicz-Gierula M. Phosphatidylethanolamine–phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane // Biophys. J. 2005. Vol. 88. Issue 2. P. 1091–1103.

175. Nakayama H., Kurokawa K., Lee B.L. Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways // FEBS Journal. 2012. Vol. 279. Issue 23. P. 4247–4268.

176. Nandi B., Nandy R.K., Sarkar A., Ghose A.C. Structural features, properties and regulation of the outer-membrane protein W (OmpW) of *Vibrio cholera* // Microbiology. 2005. Vol. 151. Pt 9. P. 2975–2986.

177. Nikaido H. Porins and specific channels of bacterial outer membranes // Mol Microbiol. 1992. Vol. 6. Issue 4. P. 435-442.

178. Nikaido H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. Issue 6. P. 3905–3908.

179. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. Vol. 67. Issue 4. P. 593–656.

180. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria // Annu. Rev. Biochem.2009. Vol. 78. P. 119–146.

181. Niramitranon J., Sansom M.S., Pongprayoon P. Why do the outer membrane proteins OmpF from *E. coli* and OprP from *P. aeruginosa* prefer trimer? Simulation studies // J. Mol. Graph. Model. 2016. Vol. 65. P. 1–7.

182. Notley-McRobb L., Deatht A., Ferenci T. The relationship between external glucose concentration and cAMP levels inside *Escherichia coli*: implications for models of phosphotransf erase-mediated regulation of adenylate cyclase // Microbiology. 1997. Vol. 143. Pt 6. P. 1909-1918.

183. Novikova O.D., Solovyeva T.F. Nonspecific porins of the outer membrane of Gram-negative bacteria: Structure and functions // Biochemistry (Mosc.). 2009. Vol. 3. No. 1. P. 3–15.

184. O'Keeffe A.H., East J.M., Lee A.G. Selectivity in lipid binding to the bacterial outer membrane protein OmpF // Biophys. J. 2000. Vol. 79. Issue 4. P. 2066–2074.

185. Okuda S., Sherman D.J., Silhavy T.J., Ruiz N., Kahne D. Lipopolysaccharide transport and assembly at the outer membrane: the PEZ model // Nat. Rev. Microbiol. 2016. Vol. 14. P. 337–345.

186. Oliver J.D., Colwell R.R. Extractable lipids of gram-negative marine bacteria: phospholipid composition // J. Bacteriol. 1973. Vol. 114. No. 3. P. 897-908.

187. Oliver P.M., Crooks J.A., Leidl M., Yoon E.J., Saghatelian A., Weibel
D.B. Localization of anionic phospholipids in *Escherichia coli* cells // J. Bacteriol.
2014. Vol. 196. Issue 19. P. 3386–3398.

188. Osborn M.J., Gander J.E., Parisi E., Carson J. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane // J. Biol. Chem. 1972. Vol. 247. Issue 12. P. 3962-3972.

189. Pagès J.M., James C.E., Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria // Nat. Rev. Microbiol. 2008. Vol. 6. Issue 12. P. 893–903.

190. Park J., Kawamoto J., Esaki N., Kurihara T. Identification of coldinducible inner membrane proteins of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, by proteomic analysis // Extremophiles. 2012. Vol. 16. No. 2. P. 227-236.

191. Paulucci N.S., Gallarato L.A., Reguera Y.B., Vicario J.C., Cesari A. B., Garc 1a de Lema M.B., Dardanelli M.S. *Arachis hypogaea* PGPR isolated from Argentine soil modifies its lipids components in response to temperature and salinity // Microbiol. Res. 2015. Vol. 173. P. 1–9.

192. Paulucci N.S., Medeot D.B., Dardanelli M.S. de Lema M.G. Growth temperature and salinity impact fatty acid composition and degree of unsaturation in peanut-nodulating rhizobia // Lipids. 2011. Vol. 46. Issue 5. P. 435–444.

193. Pereira-Leal J.B., Levy E.D., Kamp C., Teichmann S.A. Evolution of proteincomplexes by duplication of homomeric interactions // Genome Biol. 2007. Vol 8. R51.

194. Perozo E., Kloda A., Cortes D.M., Martinac B. Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating // Nat. Struct. Biol. 2002. Vol. 9. No. 9. P. 696–703.

195. Phillips R., Ursell T., Wiggins P., Sens P. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function // Nature. 2009. Vol. 459. Issue 7245. P. 379-385.

196. Pini C.V., Bernal P., Godoy P., Ramos J.L., Segura A. Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance

in Pseudomonas putida DOT-T1E // Microb. Biotechnol. 2009. Vol. 2. Issue 2. P. 253-261.

197. Pogozheva I.D., Tristram-Nagle S., Mosberg H.I., Lomize A.L. Show more structural adaptations of proteins to different biological membranes // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1828. Issue 11. P. 2592–2608.

198. Pongprayoon P. How do the protonation states of E296 and D312 in OmpF and D299 and D315 in homologous OmpC affect protein structure and dynamics? Simulation studies // Comput. Biol. Chem. 2014. Vol. 53. Part B. P. 226–234.

199. Prossnigg F., Hickel A., Pabst G., Lohner K. Packing behaviour of two predominan anionic phospholipids of bacterial cytoplasmic membranes // Biophys. Chem. 2010. Vol. 150. Issue 1-3. P. 129-135.

200. Pucadyil T.J., Chattopadhyay A. Cholesterol modulates ligand binding and G-protein coupling to serotonin 1A receptors from bovine hippocampus // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1663. Issue 1–2. P.188–200.

201. Purushothaman S., Cama J., Keyser U.F. Dependence of norfloxacin diffusion across bilayers on lipid composition // Soft Matter. 2016. Vol. 12. No. 7. P. 2135-2144.

202. Quinn J.P., Dubek E.S., Divinceuzo C.A., Lucks D.A., Lerner, S.A. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections // J. Infect. Dis. 1986. Vol. 154. No. 2. P. 298–294.

203. Raetz C.R., Kantor G.D., Nishijima M., Newman K.F. Cardiolipin accumulation in the inner and outer membranes of *Escherichia coli* mutants defective in phosphatidylserine synthetase // J. Bacteriol. 1979. Vol. 139. Issue 2. P. 544-551.

204. Randall C.P., Mariner K.R., Chopra I., O'Neill A.J. The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other Gram-negative pathogens // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. Vol. 57. No. 1. P. 637-639.

205. Reid J., Fung H., Gehring K., Klebba P.E., Nikaido H. Targeting of porin to the outer membrane of *Escherichia coli*. Rate of trimer assembly and identification of a dimer intermediate // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263. Issue 16. P. 7753-7759.

206. Renner L.D., Weibel D.B. Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. Vol. 108. Issue 15. P. 6264–629.

207. Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Naberezhnykh G.A., Khomenko V.A., Gorbach V.I., Firsov A.M., Zelepuga E.A., Antonenko Y.N., Novikova O.D.. Single channel activity of OmpF-like porin from *Yersinia pseudotuberculosis* // Biochim. Biophys. Acta. 2016. Vol. 1858. P. 883–891.

208. Rollauer E.S., Sooreshjani M.A., Noinaj N., Buchanan S.K. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria // Phil. Trans. R. Soc. 2015. Vol. 370. Issue 1679. pii: 20150023. doi: 10.1098/rstb.2015.0023.

209. Romantsov T., Battle A.R., Hendel J.L., Martinac B., Wood J.M. Protein localization in *Escherichia coli* cells: Comparison of the cytoplasmic membrane proteins ProP, LacY, ProW, AqpZ, MscS, and MscL // J. Bacteriol. 2010. Vol. 192. Issue 4. P. 912–924.

210. Romantsov T., Guan Z., Wood J.M. Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1788. Issue 10. P. 2092–2100.

211. Romantsov T., Helbig S., Culham D.E., Gill C., Stalker L., Wood J.M. Cardiolipin promotes polar localization of osmosensory transporter ProP in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 2007. Vol. 64. Issue 6. P. 1455–1465.

212. Ruan L., Pleitner A., Gänzle M.G., McMullen L.M. Solute transport proteins and the outer membrane protein NmpC contribute to heat resistance of *Escherichia coli* AW1.7 // Appl. Environ. Microbiol. 2011. Vol. 77. No. 9. P. 2961–2967.

213. Ruiz N., Kahne D., Silhavy T.J. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis // Nat. Rev. Microbiol. 2006. Vol. 4. No. 4. P. 57-66.

214. Russell N.J. Mechanisms of thermal adaptation in bacteria // Trends Biochem. Sci. 1984. Vol. 9. No. 3. P. 108–112.

215. Salesse R., Garnier J., Daveloose D. Modulation of adenylate cyclase activity by the physical state of pigeon erythrocyte membrane. 2. Fluidity-controlled coupling between the subunits of the adenylate cyclase system? // Biochemistry. 1982. Vol. 21. Issue 7. P. 1587-1590.

216. Sanchez-Ruiz J.M. Theoretical analysis of Lamry-Eyring models in differential scanning calorimetry // Biophys. J. 1992. Vol. 61. P. 921-935.

217. Schlame M., Acehan D., Berno B., Xu Y., Valvo S., Ren M., Stokes D.L., Epand R.M. The physical state of lipid substrates provides transacylation specificity for tafazzin // Nat. Chem. Biol. 2012. Vol. 8. Issue 10. P. 862-869.

218. Scholten M., Tommassen J. Effect of mutations in the -10 region of the phoE promoter in *Escherichia coli* on regulation of gene expression // Mol. Gen. Genet. 1994. Vol. 245. No. 2. P. 218-223.

219. Selkrig J., Leyton D.L., Chaille T. Webb C.T., Lithgow T. Assembly of β -barrel proteins into bacterial outer membranes // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1843. Issue 8. P. 1542–1550.

220. Sharma S.K., Singh L., Singh S. Comparative study between penicillin and ampicillin // Sch. J. App. Med. Sci. 2013. Vol. 1. Issue 4. P.291-294.

221. Shigapova N., Torok Z., Balogh G., Goloubinoff P., Vígh L., Horvath I. Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. Vol. 328. Issue 4. P.1216-122.

222. Shukla S.D., Green C., Turner J.M. Phosphatidylethanolamine distribution and fluidity in outer and inner membranes of the Gram-negative bacterium *Erwinia carotovora* // Biochem. J. 1980. Vol. 188. Issue 1. P. 131-135.

223. Sinensky M. Homeoviscous Adaptation—A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1974. Vol. 71. No. 2. P. 522–525.

224. Smith E.A., Smith C., Tanksley B., Dea P.K. Effects of *cis*- and *trans*unsaturated lipids on an interdigitated membrane // Biophys. Chem. 2014. Vol. 190–191. P. 1–7.

225. Snijder H.J., Dijkstra B.W. Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase // Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1488. P. 91-101.

226. Sohlenkamp C., Geiger O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways // FEMS Microbiol. Rev. 2016. Vol. 40. Issue. 1. P.133-159.

227. Soubias O., Teague W.E., Hines K.G., Mitchell D.C., Gawrisch K., Contribution of membrane elastic energy to rhodopsin function // Biophys. J. 2010. Vol. 99. Issue 3. P. 817–824.

228. Sousa I., Gameiro P. Encapsulation of fluoroquinolones in phosphatidylcholine: cholesterol liposomes // J. Pharm. Drug. Deliv. Res. 2013. Vol. 2. Issue 2. doi:10.4172/2325-9604.1000114.

229. Steinbuch K.B., Fridman M. Mechanisms of resistance to membranedisrupting antibiotics in Gram-positive and Gram-negative bacteria // Med. Chem. Commun. 2016. Vol. 7. Issue 1. P. 86-102.

230. Strandberg E., Ulrich A.S. AMPs and OMPs: Is the folding and bilayer insertion of β -stranded outer membrane proteins governed by the same biophysical principles as for α -helical antimicrobial peptides? // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1848. Issue 9. P.1944-54.

231. Stubbs C.D., Smith A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function // Biochim. Biophys. Acta. 1984. Vol. 779. Issue 1. P. 89-137.

232. Surrey T., Jahnig F. Kinetics of folding and membrane insertion of a beta-barrel membrane protein // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. Issue 47. P. 28199-28203.

233. Sutterlin H.A., Zhang S., Silhavy T.J. Accumulation of phosphatidic acid increases vancomycin resistance in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 2014. Vol. 196. P. 3214-3220.

234. Tagami H., Inada T., Kunimura T., Aiba H. Glucose lowers CRP levels resulting in repression of the lac operon in cells lacking cAMP // Mol. Microbiol. 1995. Vol. 17. Issue 2. P. 251-258.

235. Tenover F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria // Am. J. Infect. Control. 2006. Vol. 34. Issue 5. P. 3–10.

236. Thomas A.D., Booth I.R. The regulation of expression of the porin gene ompC by acid pH // J. Gen. Microbiol. 1992. Vol. 138. P. 1829-1835.

237. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. Vol 76. Issue 9. P. 4350–435.

238. Tsai M., Ohniwa R.L., Kato Y., Takeshita S.L., Ohta T., Saito S., Hayashi H., Morikawa K. *Staphylococcus aureus* requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity // BMC Microbiol. 2011. Vol. 11. Issue 13. P. 1-12.

239. Tsuchido T., Takano M. Sensitization by heat treatment of *Escherichia coli* K-12 cells to hydrophobic antibacterial compounds // Antimicrob. Agents Chemother. 1988. Vol. 32. Issue 11. P. 1680–1683.

240. Tzouvelekis L.S., Tzelepi E., Kaufmann H.E., Mentis A.F. Nucleotide sequence of a plasmid-mediated cephalosporinase gene (blaLAT-1) found in *Klebsiella pneumonia* // J. Med. Microbiol. 1994. Vol. 40. Issue 9. P. 403–407.

241. Ulmschneider M.B., Sansom M.S. Amino acid distributions in integral membrane protein structure // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1512. No. 1. P. 1–14.

242. Ulrich T., Rapaport D. Biogenesis of beta-barrel proteins in evolutionary context // Int. J. Med. Microbiol. 2015. Vol. 305. No. 2. P. 259-264.

243. Urban S., Wolfe M.S. Reconstitution of intramembrane proteolysis *in vitro* reveals that pure rhomboid is sufficient for catalysis and specificity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102. No. 6. P. 1883-1888.

244. Vance D.E., Vance J. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Amsterdam: Elsevier BV, 1996. 631p.

245. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. An universal reagent for phospholipid analysis // Chromatog. 1975. Vol. 114. P. 129-141.

246. Vaskovsky V.E., Terekhova T.A. HPTLC of phospholipid mixtures containing phosphatidylglycerol // J. High. Resol. Chrom. 1979. Vol. 2. P. 671-672.

247. Vences-Guzm M.A., Guan Z., Ormeno-Orrillo E., Gonzalez-Silva N., Lopez-Lara I.M., Martínez-Romero E., Geiger O., Sohlenkamp C. Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899 // Mol. Microbiol. 2011. Vol. 79. Issue 6. P. 1496-1514.

248. Vitrac H., Bogdanov M., Dowhan W. Proper fatty acid composition rather than an ionizable lipid amine is required for full transport function of lactose permease from *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288. Issue 8. P. 5873-5885.

249. Wang Y. The Function of OmpA in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. Vol. 292. Issue 2. P. 396-401.

250. Weber F.J., de Bont J.A. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes // Biochim. Biophys. Acta. 1996. Vol. 1286. Issue 3. P. 225–245.

251. Whitfield C., Trent M.S. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides // Annu. Rev. Biochem. 2014. Vol. 83. P. 99-128.

252. Wright G.D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance // Chem. Commun. 2011. Vol. 47. Issue 14. P. 4055–4061.

253. Wu E.L., Fleming P.J., Yeom M.S., Widmalm G., Klauda J.B., Fleming K.G., Im W. *E. coli* outer membrane and interactions with OmpLA // Biophys. J. 2014. Vol. 106. Issue 11. P. 2493-2502.

254. Yamashita S., Buchanan S.K. Solute and Ion Transport: Outer Membrane Pores and Receptors // EcoSal. Plus. 2010. Vol. 4. No. 1. P 1-14.

255. Yeagle P.L. Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1838. Issue 6. P.1548-1559.

256. Yehia H.M., Hassanein W.A., Ibraheim S.M. Studies on molecular characterizations of the outer membrane proteins, lipids profile, and exopolysaccharides of antibiotic resistant strain *Pseudomonas aeruginosa* // BioMed Research International. 2015. Vol. 2015. Article ID 651464 doi: 10.1155/2015/651464.

257. Yoon Y., Lee H., Lee S., Kim S., Choi K. Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses // Food Res. Int. 2015. Vol. 72. P. 25–36.

258. Zhang Y.M., Rock C.O. Membrane lipid homeostasis in bacteria // Nat. Rev. Microbiol. 2008. Vol. 6. Issue 3. P. 222-233.

259. Zhao Y., Hindorff L.A., Chuang A., Monroe-Augustus M., Lyristis M., Harrison M.L., Rudolph F.B., Bennett G.N. Expression of a cloned cyclopropane fatty acid synthase gene reduces solvent formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69.No. 5. P.2831-2841.

260. Zhong D., Blount P. Phosphatidylinositol is crucial for the mechanosensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* MscL // Biochemistry. 2013. Vol. 52. Issue 32. P. 5415-5420.

261. Ziervogel B.K., Roux B. The binding of antibiotics in OmpF porin // Structure. 2013. Vol. 21. Issue 1. P. 76-87.