

УДК 577.217/579.23

**ТОПОГРАФИЯ КАРДИОЛИПИНСИНТАЗ  
В ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ *E. coli****В.В. Иванова, Т.А. Невзорова***Аннотация**

Трансдукцией фага P1 были созданы мутантные штаммы *E. coli* с делециями в генах кардиолипсинтаз (Cls) и маннитолпермеазы A. Методом тонкослойной хроматографии с использованием радиоактивной метки P<sup>32</sup> кардиолипин был обнаружен при функционировании ClsB и/или ClsC кардиолипсинтаз. Новые липиды такие, как фосфатидилманнитол, обнаруживались при активности ClsB или ClsC. Дифосфатидилманнитол обнаруживался только при единоличной активности ClsB. Следовательно, активные центры ClsB и ClsC обращены в периплазматическое пространство, где они могут использовать синтезированный фосфатидилглицерин и преобразовывать его в кардиолипин. Соответственно, активный центр ClsA обращен в цитоплазму.

**Ключевые слова:** *E. coli*, кардиолипсинтаза, кардиолипин.

**Введение**

Кардиолипин (CL) или дифосфатидилглицерин, является важным структурным компонентом бактериальной мембраны *E. coli*. Уровень кардиолипина может увеличиваться при стрессе, например при увеличении концентрации солей в среде. Очевидно, это связано с необходимостью улучшения энергетического обмена и поддержанием структуры мембраны [1, 2].

Биосинтез кардиолипина у прокариот включает несколько последовательных стадий, где на заключительном этапе две молекулы фосфатидилглицерина конденсируются в кардиолипин.

Некоторыми авторами [1] были получены важные результаты по синтезу основных анионных фосфолипидов – кардиолипина и фосфатидилглицерина у *E. coli*. Сконструированные мутанты по генам кардиолипсинтаз и фосфатидилглицеринсинтаз позволили выяснить, является ли наличие данных фосфолипидов в мембране критичным для жизнеспособности клетки. Выяснилось, что мутанты по кардиолипсинтазам жизнеспособны, в то время как отсутствие фосфатидилглицерина приводит к летальным последствиям для клеток.

Штаммы *E. coli*, имевшие мутации в гене кардиолипсинтазы, могли синтезировать кардиолипин (CL). Считалось, что данный процесс происходит благодаря сравнительно низкой субстратной специфичности фосфатидилсеринсинтазы, однако это было только предположение [3]. Одновременно были получены интересные данные по субстратной специфичности самой кардиолипсинтазы.

Шибую с соавторами показал [4], что мутантные штаммы по гену маннитолпермеазы (*mtlA*), выращенные на среде с маннитолом, продуцируют новые фосфолипиды, выявленные методом тонкослойной хроматографии. При вещественном анализе данных фосфолипидов оказалось, что они принадлежат фосфатидилманнитулу (PM) и дифосфатидилманнитулу (DPM). Было сделано предположение, что происходит перенос фосфатидной группы с кардиолипина на маннитол, которое затем блестяще подтвердилось. Делеция гена кардиолипинсинтазы *ClsA* привела к практически полному исчезновению данных фосфолипидов. М. Шлам и М. Рен [2] предположили, что существует второй ген кардиолипинсинтазы (в настоящее время известной как *ClsB*), который начинает функционировать на стационарной фазе роста, при этом делетированная авторами кардиолипинсинтаза А (*ClsA*) является принципиальной, то есть продуцирует основное количество кардиолипина.

Впоследствии действительно был подробно исследован второй ген кардиолипинсинтазы (*ClsB*) и регуляция его экспрессии [5].

Наконец, группой ученых под руководством В. Дауэна [3] был обнаружен третий ген кардиолипинсинтазы (*ClsC*) и, как предположили сами авторы статьи, последний: мутанты *E. coli* по всем трем генам кардиолипинсинтаз не способны продуцировать кардиолипин.

Итак, в настоящее время известны три кардиолипинсинтазы *E. coli*, катализирующие конденсацию двух молекул фосфатидилглицерина с образованием CL, которого в норме у *E. coli* содержится 5–15% от всех фосфолипидов: *ClsA*, *ClsB* и *ClsC* [2]. Но направлен ли синтез кардиолипина в периплазму или в цитоплазму и какова ориентация активных центров *Cls*, не известно. Поэтому цель настоящего исследования – определение топографии кардиолипинсинтаз в мембранах *E. coli*

### Объекты и методы исследования

Методом трансдукции фага P1 были созданы мутантные штаммы *E. coli* с делециями в генах кардиолипинсинтаз (*Cls*), и каждый из семи штаммов также был мутирован трансдукцией по гену маннитолпермеазы А (*mtlA*). Мутанты отбирались на среде Лурия – Бергани, содержащей антибиотик канамицин с конечной концентрацией 25 мкг/мл, мутации верифицировались генотипированием.

В работе использовались следующие штаммы *E. coli*:

- 1) W3110 WT – дикий тип *E. coli*;
- 2) ВКТ10  $\Delta$ *clsA*::kan – делеция в гене кардиолипинсинтазы А;
- 3) ВКТ11  $\Delta$ *clsA*/ $\Delta$ *clsB*::kan – делеция в гене кардиолипинсинтаз А и В;
- 4) ВКТ12  $\Delta$ *clsA*/ $\Delta$ *clsB*/ $\Delta$ *clsC*::kan – делеция в гене кардиолипинсинтаз А, В и С;
- 5) ВКТ14  $\Delta$ *clsB*::kan – делеция в гене кардиолипинсинтазы В;
- 6) ВКТ15  $\Delta$ *clsC*::kan – делеция в гене кардиолипинсинтазы С;
- 7) ВКТ16  $\Delta$ *clsA*/ $\Delta$ *clsC*::kan – делеция в гене кардиолипинсинтаз А и С.

Поскольку экспрессия кардиолипинсинтазы, так же как и количество кардиолипина, увеличивается приблизительно в 2.5 раза с ранней логарифмической фазы роста до стационарной [1], экстракцию липидов проводили из клеток, выращенных до середины лог фазы ( $OD_{600} = 0.6$ ) на бедной жидкой среде

Лурия-Бертани с источником углерода маннитолом при 37 °С и покачивании 250 грт и добавлением радиоактивной метки P<sup>32</sup>. Отрицательным контролем послужил мутант с делециями в генах всех кардиолипинсинтаз (ВКТ12), положительным – дикий тип (WT) *E. coli* W3110.

Далее клетки осаждали 5 мин центрифугированием 5000 об/мин и отмывали 1 раз для удаления избытка радиоактивности 0.1 М трис-буфером, pH 7.5, содержащим 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% цитрат натрия, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Экстракцию фосфолипидов проводили ресуспендированием осадка клеток в 0.1 мл 0.5 Н NaCl в 0.1 Н HCl. Затем добавляли 0.3 мл смеси хлороформ : метанол (1 : 2) и встряхивали в течение 30 мин. Затем добавляли 0.1 мл 0.5 Н NaCl в 0.1 Н HCl для разделения фаз и дополнительного удаления водорастворимых радиоактивных фосфатов. Встряхивали в течение 10 мин и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 мин. Удаляли верхний слой и аккуратно собирали нижний, не захватывая клеточный дебрис, располагающийся между слоями. Радиоактивность измеряли с помощью сцинтиллятора, используя 5 мкл экстракта.

Далее была проведена двумерная тонкослойная хроматография (ТСХ) на пластинках фирмы Merck [3]: для разделения в одном направлении использовали состав хлороформ : метанол : аммоний (65 : 30 : 4), для второго кислого разделения – хлороформ : метанол : уксусная кислота : вода (85 : 12.5 : 12.5 : 3). Измерение, визуализацию и обработку результатов проводили, используя Personal Molecular Imager и программу Quantity One от Bio-Rad.

Ориентацию активного центра кардиолипинсинтаз определяли по образованию CL, PM и DPM.

### Результаты и их обсуждение

В настоящее время известно, что кардиолипинсинтазы *E. coli* располагаются на внутренней мембране кишечной палочки и представляют собой фермент с молекулярной массой 46 кДа, содержащий несколько консервативно расположенных N-концевых остатков, которые не являются необходимыми для активности фермента, однако ориентация активного центра неизвестна [6, 7].

На рис. 1 представлена схема локализации кардиолипинсинтаз с неизвестной ориентацией активных центров ферментов, где маннитолпермеаза должна быть расположена во внутренней мембране *E. coli*.

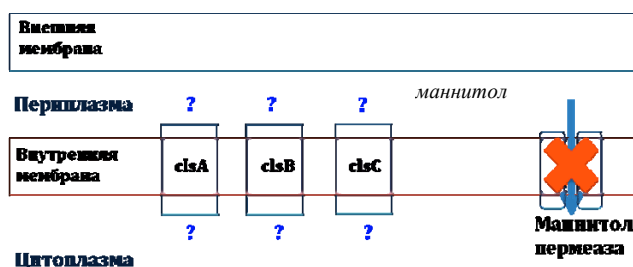


Рис. 1. Схематическое изображение расположения кардиолипинсинтаз и удаленной маннитолпермеазы в плазматических мембранах *E. coli*; ClsA, ClsB и ClsC – кардиолипинсинтазы

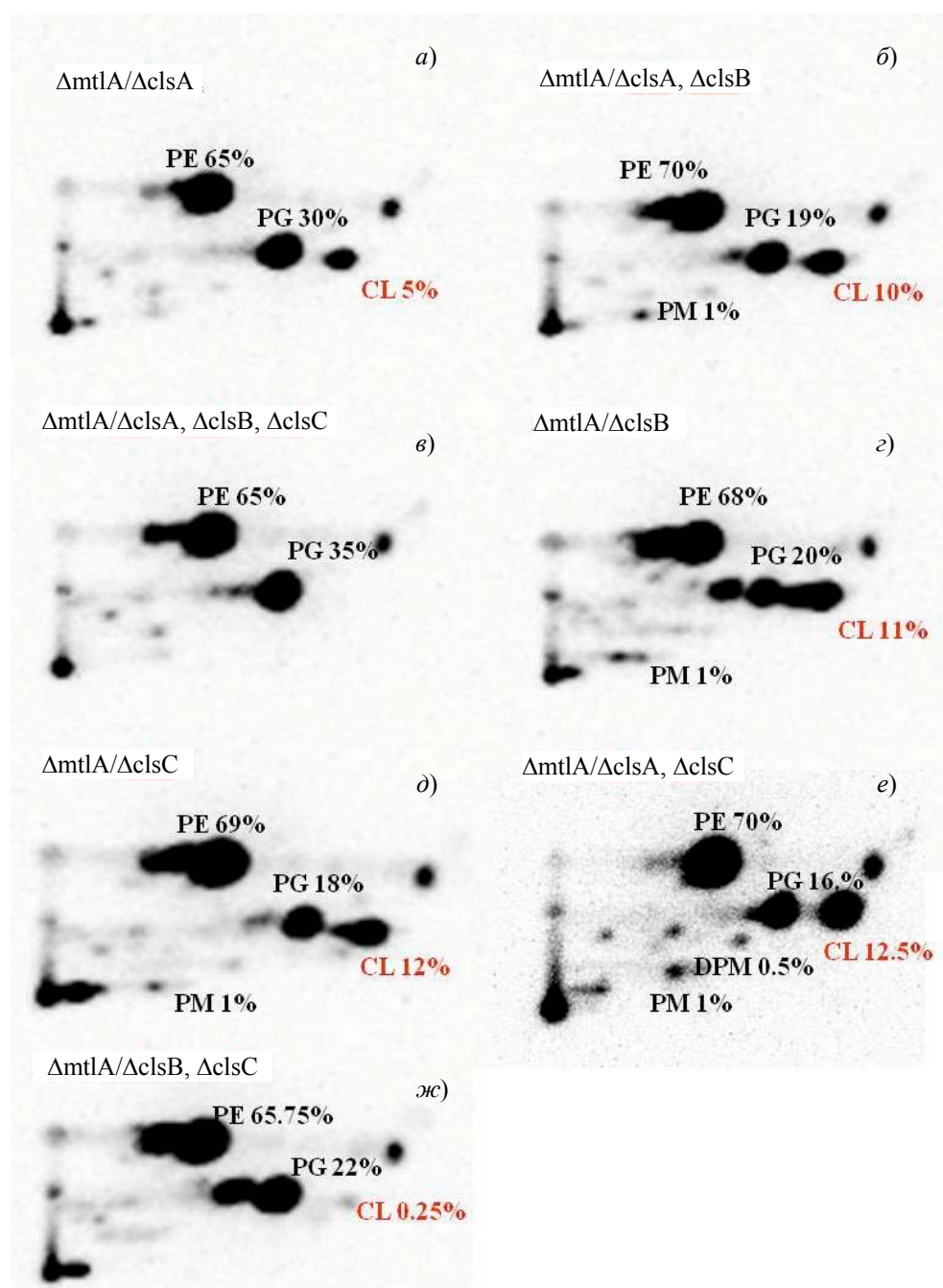


Рис. 2. Двумерная ТСХ с радиоактивной меткой  $P^{32}$  фосфолипидов мутантов *E. coli* в %.  $\Delta mtlA$  – штаммы с делецией в гене *mtlA* маннитолпермеазы;  $\Delta clsA/B/C$  – штаммы с делецией в генах *clsA/B/C* соответственно или с двойными и тройными делециями; PE – фосфатидилэтанолламин, PG – фосфатидилглицерин, CL – кардиолипин, PM – фосфатидилманнитол, DPM – дифосфатидилманнитол

После проведения двумерной ТСХ и обработки в Quantity One Software по интенсивности сигнала от радиоактивной метки  $P^{32}$  в процентах определили фосфолипидный состав бактериальных мембран (рис. 2).

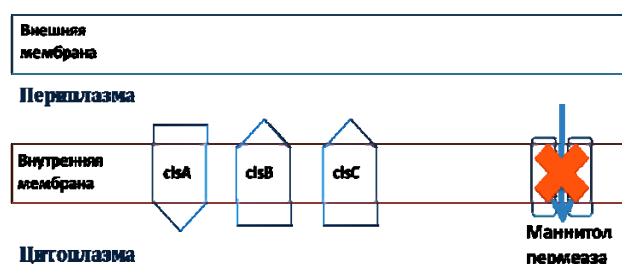


Рис. 3. Схематическое изображение расположения активных центров кардиолипсинтаз в плазматических мембранах *E. coli* при выключении гена маннитолпермеазы A; CIsA, CIsB и CIsC – кардиолипсинтазы

По данным ТСХ в мутантном штамме ВКТ12 (рис. 2, в), где отсутствуют все кардиолипсинтазы, кардиолипина и новых фосфолипидов PM и DPM не было обнаружено.

В мутанте ВКТ16 (рис. 2, е), где функционировала только CIsB, обнаружены липиды PM и DPM, а также отмечено, что по сравнению с остальными штаммами в клетках синтезируется наибольшее количество кардиолипина (12.5%), что, возможно, связано с регуляторной ролью *clsB* [5].

Фосфадитилманнитол образовывался только при функционировании CIsB (рис. 2, е) или CIsC (рис. 2, б), но не при их совместной активности, как в штамме ВКТ10 (рис. 2, а). Этот факт был обнаружен впервые и подтвержден в литературных данных не найден. Но замечено, что максимальная экспрессия гена *clsC* зависит от продукта соседнего гена *clsB*, но только во время транскрипции с одного оперона. Механизм стимулирования экспрессии гена *clsC* геном *clsB* остается не выясненным, однако уникален, так как не обнаружен у других организмов, кроме *E. coli* [5].

Важно, что следовые количества кардиолипина, меньше чем в диком типе, обнаружены в мутанте, где была активна только *clsA* и где также выявлено отсутствие PM и DPM, следовательно, можно предположить, что активный центр данной кардиолипсинтазы направлен в цитоплазму и переноса фосфатидной группы с кардиолипина на маннитол не происходит, так как это должно происходить при участии как маннитолпермеазы, которая в данном исследовании удалена, так и кардиолипсинтазы, активный центр которой должен при этом находиться в периплазматическом пространстве. По наличию кардиолипина, фосфадитилманнитола и дифосфотидилманнитола можно предположить, что активные центры ферментов CIsB и CIsC направлены в периплазматическое пространство *E. coli*.

### Заключение

Настоящая работа является одним из первых этапов по определению топографии кардиолипсинтаз *E. coli*. На данном этапе можно составить предварительную схему ориентации кардиолипсинтаз в мембранах *E. coli* (рис. 3), так как обнаружено, что:

- 1) кардиолипин обнаружен при работе ClsB и/или ClsC;
- 2) новые липиды такие, как фосфотидилманнитол, обнаружены при работе ClsC или ClsB;
- 3) дифосфотидилманнитол синтезируется только при единоличной работе ClsB.

Тем самым можем предположить, что осмолярность клеток кишечной палочки поддерживается за счет принципиальной ClsA, а регуляторная ClsB и вспомогательная ClsC участвуют в поддержании равновесного соотношения между фосфолипидами в плазматической мембране *E. coli*.

### Литература

1. Mileykovskaya E., Dowhan W. Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1788, No 10. – P. 2084–2091. – doi: 10.1016/j.bbamem.2009.04.003.
2. Schlame M., Ren M. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes // Biochim Biophys Acta. – 2009. – V.1788, No 10. – P. 2080–2083. – doi: 10.1016/j.bbamem.2009.04.019.
3. Tan B., Bogdanov M., Zhao J., Dowhan W., Raetz C., Guan Z. Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates // Proc Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – V. 109, No 41. – P. 16504–16509. – doi: 10.1073/pnas.1212797109.
4. Shibuya I., Yamagoe S., Miyazaki C., Matsuzaki H., Ohta A. Biosynthesis of novel acidic phospholipid analogs in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1985. – V. 161, No 2. – P. 473–477.
5. Kim K.-S., Manasherob R., Cohen S.N. YmdB: a stress-responsive ribonuclease-binding regulator of *E. coli* RNase III activity // Genes Dev. – 2008. – V. 22, No 24. – P. 3497–3508. – doi: 10.1101/gad.1729508.
6. Hiraoka S., Nukui K., Uetake N., Ohta A., Shibuya I. Amplification and substantial purification of cardiolipin synthase of *Escherichia coli* // J. Biochem. – 1991. – V. 110, No 3. – P. 443–449.
7. Quigley B.R., Tropp B.E. *E. coli* cardiolipin synthase: function of N-terminal conserved residues // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1788, No 10. – P. 2107–2113. – doi: 10.1016/j.bbamem.2009.03.016.

Поступила в редакцию  
22.04.13

---

**Иванова Вилена Витальевна** – аспирант кафедры биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: jassyra@mail.ru

**Невзорова Татьяна Александровна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: tnevzorova@mail.ru

\* \* \*

**TOPOGRAPHY OF CARDIOLIPIN SYNTHASES  
IN THE PLASMA MEMBRANE OF *E. coli****V.V. Ivanova, T.A. Nevzorova***Abstract**

The mutant *E. coli* strains with deletions in the genes of cardiolipin syntases (*cls*) and mannitol permease A were constructed using the P1 phage transduction. Cardiolipin was detected under the activity of ClsB and/or ClsC cardiolipin syntases using TLC methods with P<sup>32</sup> radiolabelling. New lipids such as phosphatidyl mannitol were found when ClsB or ClsC cardiolipin syntases were active. Diphosphatidyl mannitol was found when only ClsB was active. Consequently, the active centers of ClsB and ClsC face the periplasmic space, where enzymes convert the synthesized phosphatidylglycerol to cardiolipin. Accordingly, the active center ClsA faces the cytoplasm.

**Keywords:** *E. coli*, cardiolipin syntase, cardiolipin.

**References**

1. Mileykovskaya E., Dowhan W. Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, vol. 1788, no. 10, pp. 2084–2091. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.04.003.
2. Schlame M., Ren M. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, vol. 1788, no. 10, pp. 2080–2083. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.04.019.
3. Tan B., Bogdanov M., Zhao J., Dowhan W., Raetz C., Guan Z. Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 41, pp. 16504–16509. doi: 10.1073/pnas.1212797109.
4. Shibuya I., Yamagoe S., Miyazaki C., Matsuzaki H., Ohta A. Biosynthesis of novel acidic phospholipid analogs in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1985, vol. 161, no. 2, pp. 473–477.
5. Kim K.-S., Manasherob R., Cohen S.N. YmdB: a stress-responsive ribonuclease-binding regulator of *E. coli* RNase III activity. *Genes Dev.*, 2008, vol. 22, no. 24, pp. 3497–3508. doi: 10.1101/gad.1729508.
6. Hiraoka S., Nukui K., Uetake N., Ohta A., Shibuya I. Amplification and substantial purification of cardiolipin synthase of *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, 1991, vol. 110, no. 3, pp. 443–449.
7. Quigley B.R., Tropp B.E. *E. coli* cardiolipin synthase: function of N-terminal conserved residues. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, vol. 1788, no. 10, pp. 2107–2113. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.03.016.

Received  
April 22, 2013

---

**Ivanova Vilena Vitalevna** – PhD Student, Department of Biochemistry, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [jassyra@mail.ru](mailto:jassyra@mail.ru)

**Nevzorova Tatyana Aleksandrovna** – PhD in Biology, Associate Professor, Department of Biochemistry, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [tnevzorova@mail.ru](mailto:tnevzorova@mail.ru)