

В. М. КУШНАРЕВ

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ
И 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ
КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 26 XI 1969)

При электронномикроскопическом изучении распределения аденозинтрифосфатной активности у кишечной палочки и сальмонелл мышинного тифа было обнаружено, что продукт реакции постоянно встречается в клеточной стенке бактерий (^{3, 5}). Биохимическими методами также была показана связь нуклеотидаз и окислительных ферментов с препаратами клеточных оболочек некоторых грам-отрицательных бактерий ((^{7, 10, 14, 15}) и др.). Хорошо известно, что активность гидролитических ферментов (нуклеотидаз) и окислительных ферментов цепи переноса электронов (ЦПЭ) также свойственны мембранным структурам бактерий ((^{1, 4}) и др.). В то же время применяемые методы выделения клеточных оболочек не обеспечивают чистоты препарата от примеси мембранных структур (¹²), а при выделении препаратов мембранных структур грам-отрицательных бактерий не удается освободиться от примеси клеточных стенок (^{6, 12}).

Попытка разделения цитоплазматической мембраны и клеточной стенки кишечной палочки (¹⁰) нуждается в серьезной проверке, поскольку в обеих фракциях присутствовали ферменты ЦПЭ и АТФаза. Таким образом, остается неясным, какой структуре свойственна АТФазная активность: мембранам, клеточной стенке или же обоим структурам. Единственный метод, который может указать на распределение активности ферментов на структурах, не разделенных препаративно, — электронная микроскопия в сочетании с цитохимией.

В настоящей работе приведены данные по цитохимическому выявлению активности АТФазы и 5'-нуклеотидазы в препаратах клеточных оболочек кишечной палочки.

Препараты клеточных оболочек получали методом механического дезинтегрирования со стеклянными бусами из 18-часовой культуры *E. coli* В, выращенной на мясо-пептонном агаре (³) (приносим благодарность Е. С. Станиславскому за помощь в выполнении этого раздела работы).

Для определения локализации нуклеотидаз использовали модификацию метода Гомори, разработанную и примененную нами ранее для электронномикроскопического изучения щелочной фосфатазы и АТФазы (^{5, 8}).

Процедура окрашивания и микроскопия были следующими. Клеточные оболочки или целые клетки дважды отмытые физиологическим раствором хлористого натрия инкубировали в веронал-ацетатном буфере рН 9,5, содержащем $1,5 \cdot 10^{-3}$ М АТФ- Na_2 и 0,2 М CaCl_2 . Материал из среды инкубации наносили на сеточки-подложки, покрытые формваровой пленкой, и просматривали в электронном микроскопе. Часть материала фиксировали по (¹³), обезживали в спиртах и заливали в метакрилаты. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме ОМ- J_2 фирмы Райхерт. Электронную микроскопию проводили на приборе УЭМВ-110 при 75 кВ и инструментальном увеличении 20 000—40 000 \times .

Ферментативную активность препаратов клеточных стенок и целых клеток определяли по гидролизу АТФ (Reanal) и 5'-АМФ (Labor. Reagen-

zien). Изменения содержания неорганического фосфата измеряли по Кондрашевой и др. (2). Белок определяли по (9). Активность выражали в микрограммах $P_{\text{неорг}}$, освобождающегося за 60 мин. на 1 мг белка препарата при 37°. Инкубационная среда для биохимических определений имела такой же состав, как и для цитохимических опытов, но не содержала CaCl_2 .

В табл. 1 представлены результаты определения активности нуклеотидаз в целых клетках и препаратах клеточных стенок кишечной палочки.

Таблица 1

	АТФ- Na_2	5'-АМФ	Достоверность различий
Клетки	$7,2 \pm 0,65$	$2,95 \pm 0,17$	$P < 0,01$
Клеточные стенки	$30,2 \pm 4,5$	$14,5 \pm 0,75$	$P < 0,05$
Достоверность различий	$P < 0,01$	$P < 0,001$	

Специальные исследования показали, что гидролиз АТФ в обоих препаратах активируется ионами Mg^{2+} и угнетается ионами Ca^{2+} и, по всей вероятности, может быть отнесен к АТФ-фосфогидролазе (3.6.1.3). Гидролиз 5'-АМФ может быть результатом активности строго специфичной 5-нуклеотидазы (3.1.3.5). Кроме того, препарат клеточных оболочек гидролизовал 3'-АМФ (активность $8,4 \pm 0,93$, $P < 0,02$).

Из табл. 1 видно, что удельная активность препаратов клеточных оболочек значительно выше, чем целых клеток. Однако такая концентрация активности могла быть отнесена равно как к собственно стенкам, так и к мембранным структурам, присутствующим в препаратах оболочек. Для разрешения этого вопроса и были проведены электронномикроскопические исследования.

На рис. 1А представлена клетка *E. coli* после инкубирования АТФ и CaCl_2 и окрашенная негативно фосфорновольфрамовой кислотой, рН 8,5. Темные отложения фосфата кальция рельефно выделяются на структурах клеточной стенки. На срезах клеток (рис. 1Б) отчетливо видна связь отложений продукта гидролиза с липопротеиновым слоем клеточной стенки. При инкубировании с 5'-АМФ фосфат кальция отлагался в клеточной стенке, но не в цитоплазме.

При инкубировании препарата клеточных стенок в буфере с АТФ или АМФ в присутствии CaCl_2 продукт реакции отлагался на поверхности стенки, и, создавая эффект негативного контраста в местах отложений, фосфат кальция оттянул на поверхности круглые субъединицы диаметром $36 \pm 0,8 \text{ \AA}$ (рис. 1В—Д). После инкубирования с АТФ отложения фосфата были мелкими и покрывали всю поверхность клеточной стенки (рис. 1В), тогда как после инкубирования с 5'-АМФ они были крупными и располагались на большом расстоянии друг от друга (рис. 1Г).

Рис. 1. А — клетка кишечной палочки, окрашенная на АТФазу; негативное контрастирование ФВК, рН 8,7; на гранулярной поверхности клеточной стенки — темные скопления фосфата кальция (ϕ) ($60\,000 \times$). Б — срез клеток кишечной палочки из предыдущего препарата (окрашенных на АТФазу): отложения фосфата кальция в липопротеиновом слое ($мл$) клеточной сетки ($70\,000 \times$). В — препарат клеточной стенки кишечной палочки, окрашенный на АТФазу: отложения ϕ в виде мелких скоплений по всей поверхности стенки; без дополнительного контрастирования ($40\,000 \times$). Г — окрашивание на 5'-нуклеотидазу: отложения ϕ в виде крупных, редко расположенных островов ($40\,000 \times$). Д — структура поверхности клеточной стенки и характер отложений ϕ на ней (темные скопления ϕ создают эффект негативного контраста, выявляя круглые субъединицы (c) поверхности стенки, вокруг которых расположен ϕ) ($100\,000 \times$). Е, Ж — срезы препарата клеточных стенок, окрашенного на АТФазу: отложения ϕ на собственно клеточной стенке ($к.с$) и на цитоплазматической мембране ($ц.м$); мембрана и стенка четко разделены ($80\,000 \times$)

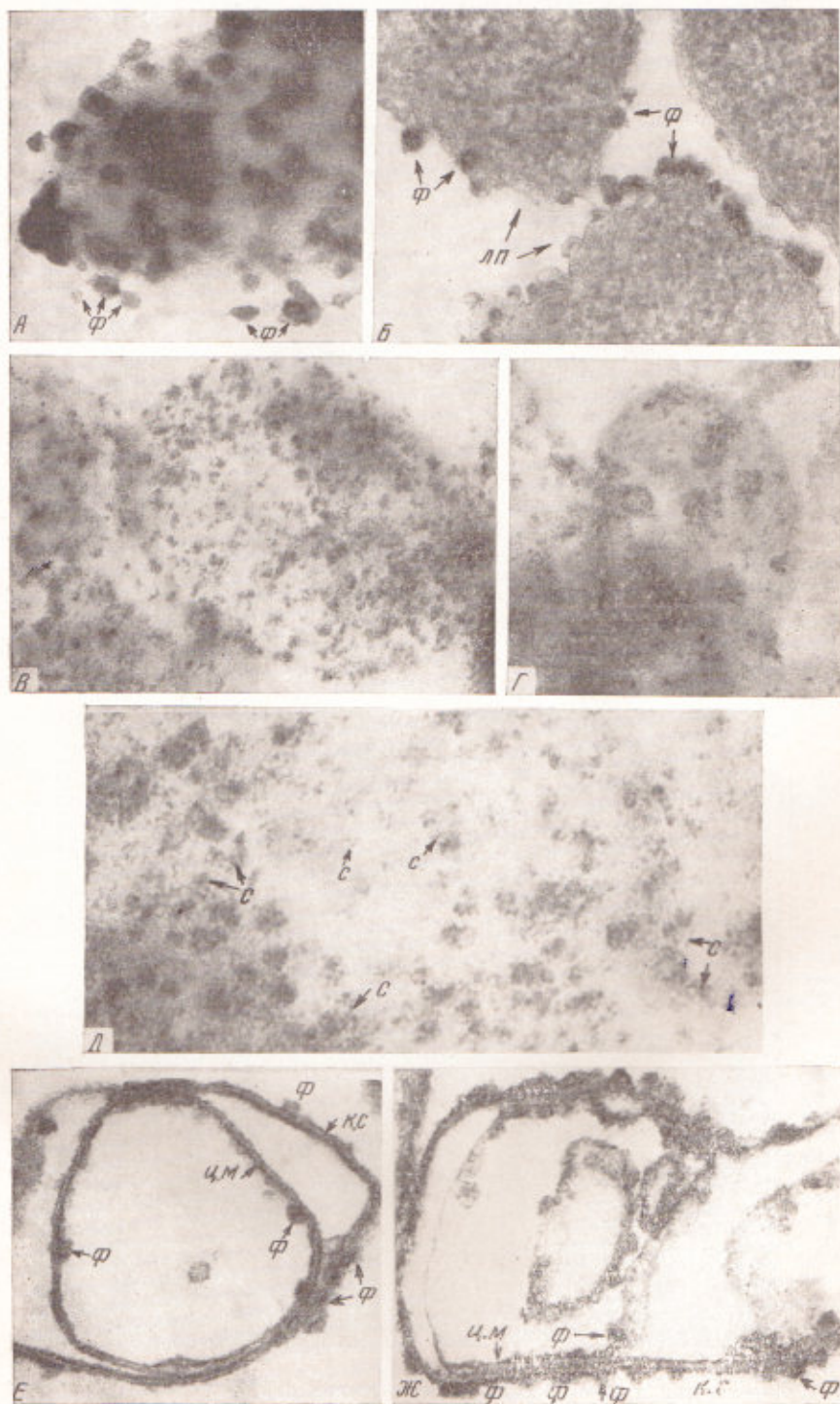


Рис. 1

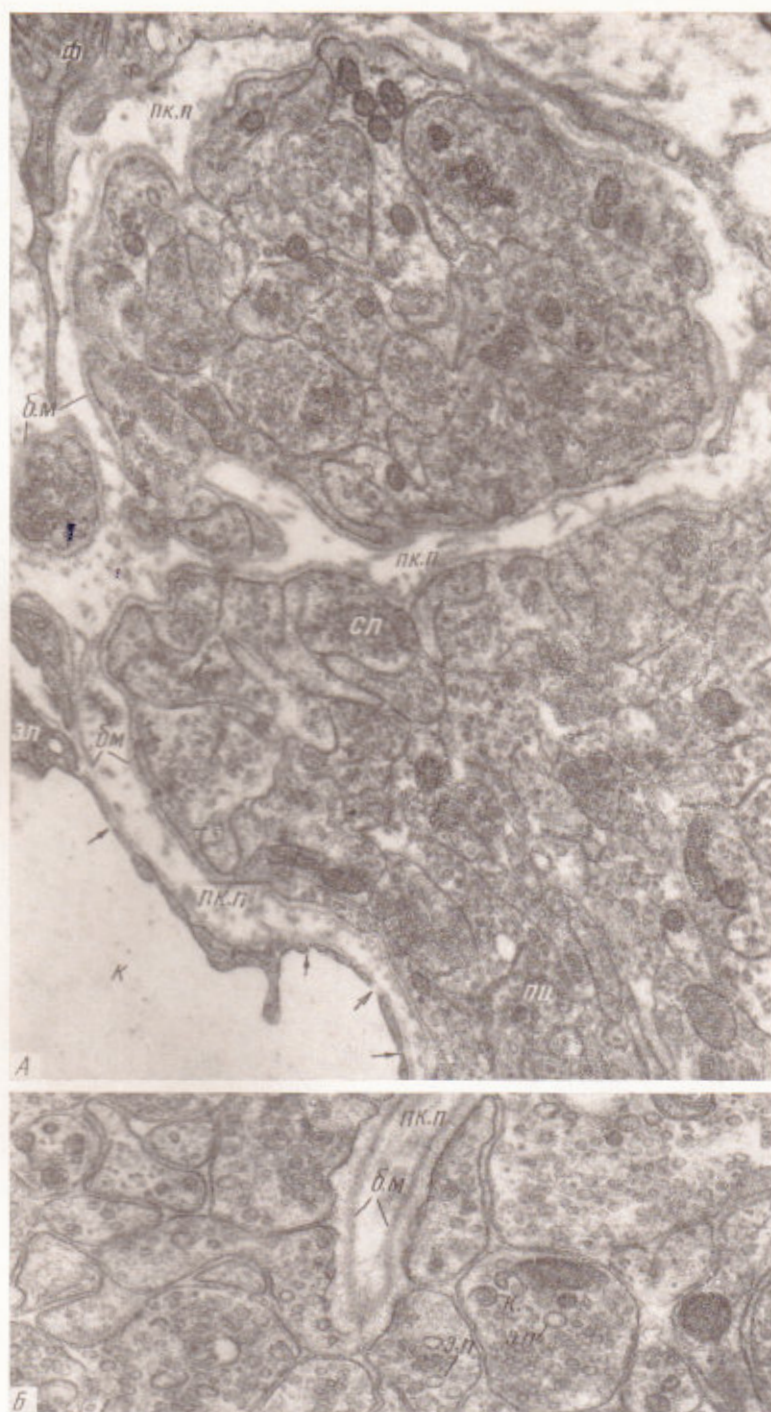


Рис. 3. А — наружная зона срединного возвышения нейрогипофиза 14-дневного крыска; крупный комплекс нервных терминалей, окруженный базальной мембраной (б.м), включен в перикапиллярное пространство (п.к.п.; к — капилляр); от поверхности фибробласта (ф), расположенного в п.к.п., отходит волокна коллагена; в окончатых — пузырьки с плотным центром (п.ц и стрелки), синаптические пузырьки (с.п.) и электронопустые пузырьки (э.п.); 9000 ×. Б — организация п.к.п. и нейро-васкулярных контактов в наружной зоне срединного возвышения нейрогипофиза двухнедельных крысят; 22 200 ×

На срезах препаратов клеточных стенок отчетливо различимы собственно стенка и цитоплазматическая мембрана (рис. 1 *Е, Ж*). Фосфат кальция расположен, по всей видимости, на наружной поверхности стенок, в их липопротеиновом слое. На цитоплазматической мембране он был расположен в обоих осmioфильных слоях, но преимущественно во внутреннем. На всем протяжении внутренний листок цитоплазматической мембраны плотней наружного, что было подтверждено денситометрически. В препаратах, инкубированных с 5'-АМФ, отложения фосфата присутствовали только в клеточной стенке.

Наибольшая опасность ложной локализации продукта реакции при цитохимическом изучении нуклеотидаз связана с применением метода Вакстейна и Майзеля, основанного на образовании преципитата фосфата свинца. Это было убедительно показано в серии работ Мозеса и др. (11), нашедших, что ионы свинца вызывают неэнзиматический гидролиз аденозинтрифосфата и других нуклеотидов и, кроме того, почти полностью угнетают активность АТФаз, расположенных в мембранах. Свойства АТФазы мембран бактерий значительно отличаются от тканевых, но фактор неэнзиматического гидролиза субстрата остается. Это послужило главной причиной отказа от метода Вакстейна и Майзеля и применения для нашего исследования разработанной модификации «кальциевого» метода Гомори. Кишечная палочка, использованная в опытах, не обладает активностью щелочной фосфатазы (3). Поэтому гидролиз АТФ и 5'-АМФ может быть отнесен к активности специфических ферментов.

Таким образом, применение цитохимии в сочетании с электронной микроскопией позволило определить локализацию двух гидролитических ферментов непосредственно в клеточной стенке кишечной палочки. Поскольку цитохимические и биохимические опыты были проведены в практически идентичных условиях, можно со значительной степенью вероятности полагать, что установлена локализация аденозинфосфогидролазы (3.6.1.3) и 5'-нуклеотидазы (3.1.3.5).

Московский научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова

Поступило
18 XI 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. С. Гельман, М. А. Лукьянова, Д. Н. Островский, Дыхательный аппарат бактерий, М., 1966. ² М. Н. Кондрашева, М. Лесогорова, С. Шноль, Биохимия, 30, 3, 567 (1965). ³ В. М. Кушнарев, Функционально-морфологическая характеристика ультраструктур бактерий, Докторская диссертация, М., 1969. ⁴ В. М. Кушнарев, Л. Г. Дуденкова, Журн. эволюцион. биохим. физиол., 2, 2 (1966). ⁵ В. М. Кушнарев, Т. А. Смирнова, IX Международный конгресс по микробиологии, Рефер. секц., 1966, стр. 80. ⁶ A. Brown et al., Biochim. et biophys. acta, 58, 514 (1962). ⁷ T. Fujita, R. Sato, J. Biochem., 60, 568 (1966). ⁸ V. Kushnarev, T. Smirnova, Canad. J. Microbiol., 12, 4 (1966). ⁹ O. Lowry et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). ¹⁰ T. Miura, S. Mizushima, Biochim. et biophys. acta, 150, 1, 159 (1968). ¹¹ M. Moses, A. Rosenthal, J. Histochem. Cytochem., 16, 8, 530 (1968). ¹² R. G. E. Murray, In: Proto-plasts, Spheroplasts and L-forms, N. Y., 1969. ¹³ A. Ryter, E. Kellenberger et al., Zs. Naturforsch., 13b, 597 (1958). ¹⁴ M. R. J. Salton, Bacterial Cell Wall, 1964. ¹⁵ G. Weinbaum, R. Maturban, Biochim. et biophys. acta, 124, 207 (1966).