

Л. Ф. ПАНЧЕНКО, В. Л. МИГУШИНА, Н. С. ФЕДОТОВ, М. А. ТАРШИС

ТРАНСПОРТ УГЛЕВОДОВ В КЛЕТКИ *Mycoplasma laidlawii*

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 30 VII 1972)

Исследование реакций, осуществляющих перенос различных соединений через полупроницаемую клеточную мембрану, является одним из ключевых вопросов современной физиологии бактерий. Наибольшее количество экспериментальных исследований в этой области приходится на изучение транспорта углеводов, который является интегральным и регулирующим этапом во внутриклеточном катаболизме углеводов (¹⁻³). В настоящее время наиболее широко признаны два молекулярных механизма активного транспорта углеводов в бактериальную клетку. Первый из них предполагает, что углеводы связываются на поверхности мембраны со специфическими акцепторными белками — пермеазами, а затем с помощью переносчиков транспортируются в клетку, где аккумулируются против концентрационного градиента. В данном случае перенос углевода через мембрану и его аккумуляция являются независимыми процессами (⁴⁻⁷). Вторым механизмом связан с транслокацией углеводов в клетку с помощью фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферазной системы (ФТС), существование которой подтверждено многочисленными биохимическими и генетическими методами (¹⁻⁷). ФТС осуществляет сопряжение транспорта углеводов с их фосфорилированием, в результате чего углеводы проникают в клетку в виде фосфорных эфиров.

Микоплазма является удобной моделью для изучения транспортных реакций, поскольку она лишена клеточной стенки (¹⁰). Кроме того, из-за малого размера генома в микоплазме отсутствуют многие биосинтетические реакции, вследствие чего ее рост зависит от присутствия ряда субстратов в питательной среде (⁸⁻¹³). Именно поэтому в цитоплазматических мембранах должны находиться соответствующие транспортные системы. Тем не менее, транспортные процессы в клетках микоплазмы изучены крайне мало. Так, исследовалось потребление калия, аминокислот и ацетата (⁹⁻¹⁰). Роттем и Рейзен изучали общие закономерности проникновения некоторых сахаров в клетки *Mycoplasma gallisepticum* и предположили существование нескольких транспортных систем (¹²). Наконец, следует отметить интересную гипотезу Смита (^{13, 14}) об участии холестерина и каротиноидов в переносе глюкозы и ацетата в клетки микоплазмы.

Несомненный интерес представляло детальное изучение транспорта углеводов в клетки сапрофитного штамма *M. laidlawii*, а также выяснение взаимодействий между углеводами в процессе их потребления.

Штамм *M. laidlawii* (получен от проф. Келлера, Иена, ГДР) выращивали 16–18 час. при 37° на среде Эдварда с 5% сыворотки и пенициллином (1000 ед на 1 мл среды). Клеточный осадок дважды промывали средой выделения (0,25 *M* NaCl; 0,01 *M* MgCl₂) и суспендировали в этой же среде до конечной концентрации белка 4–8 мг/мл (белок определяли по Лоури). Включение углеводов, меченных по первому углеродному атому, исследовали в смеси объемом 1 мл: 0,01 *M* фосфатный буфер pH 7,6; 0,15 *M* NaCl; 0,01 *M* MgCl₂ и 0,2 мг белка. Смесь прогревали 10 мин. при 37°, после чего вносили меченые углеводы. В опытах использовались C¹⁴-мальтоза, C¹⁴-манноза, C¹⁴-галактоза и C¹⁴-фруктоза (Амершам, Англия). После инкуба-

ции клетки собирали на мембранных фильтрах HUFS (Синпор, Чехословакия) с диаметром пор 0,3–0,5 μ , дважды промывали холодной средой выделения, высушивали и определяли их радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном спектрометре SL-30 («Интертехник», Франция). При

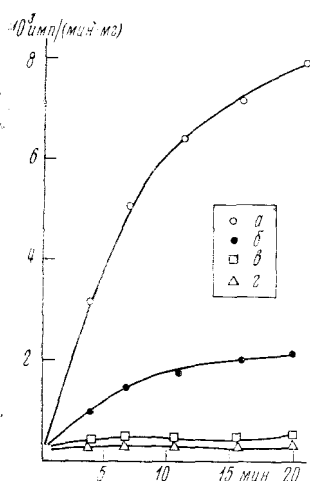


Рис. 1. Транспорт углеводов клетками *M. laidlawii*. а — C^{14} -мальтоза ($1,4 \cdot 10^{-5}$ мол/л), б — C^{14} -фруктоза ($3,4 \cdot 10^{-5}$ мол/л), в — C^{14} -манноза ($3,6 \cdot 10^{-5}$ мол/л), г — C^{14} -галактоза ($1,8 \cdot 10^{-6}$ мол/л)

исследовании действия ингибиторов клетки предынкубировали с ними 10 мин., после чего в среду вносили радиоактивные углеводы и выдерживали 15 мин.

Из рис. 1 следует, что клетки микоплазмы способны накапливать только мальтозу и фруктозу, причем включение мальтозы происходит значительно более интенсивно. На рис. 2 представлена зависимость поглощения мальтозы от ее концентрации в наружной среде. Кривая является классической гиперболой и отражает активный характер поступления углевода в клетку и его аккумуляции. На основании этой зависимости по методу двойных обратных величин была высчитана K_m , низкая величина которой ($2,86 \cdot 10^{-5}$ мол/л) указывает на ферментативную природу транспорта мальтозы. Концентрационная зависимость и ее обратные величины, полученные для фруктозы, приведены на рис. 3. K_m для фруктозы составляет $2,6 \cdot 10^{-5}$ мол/л. И в данном случае можно думать об активном характере транспорта в клетки микоплазмы.

Была исследована зависимость транспорта углеводов от их содержания в среде роста. Оказалось, что интенсивность включения мальтозы и фруктозы не изменялась при добавлении к среде роста 1% немеченных мальтозы и фруктозы соответственно. Это говорит о конститутивном характере транспортных систем.

Если транспорт углеводов происходит с помощью активного механизма, а не путем облегченной диффузии, то внутриклеточная концентрация

Таблица 1

Действие ингибиторов на транспорт мальтозы и фруктозы в клетки *M. laidlawii*

Ингибиторы	Концентрация, мол/л	Ингибирование в %		Ингибиторы	Концентрация, мол/л	Ингибирование в %	
		мальтоза	фруктоза			мальтоза	фруктоза
Моноацетат	10^{-2}	97	65	ДНФ	10^{-2}	86	50
	10^{-3}	55	35		10^{-3}	41	36
	10^{-4}	32	14		10^{-4}	28	14
Азид натрия	10^{-3}	32	14	п-ХМБ	10^{-3}	96	60
	10^{-4}	23	12		10^{-4}	93	43
NaCN	10^{-2}	46	56	N-Этилмалеимид	10^{-2}	94	72
	10^{-3}	32	47		10^{-3}	92	64
	10^{-4}	12	23		10^{-4}	77	62

($K_{вн}$) должна превышать наружную ($K_{нар}$). Действительно, при концентрации мальтозы в наружной среде $7,1 \cdot 10^{-6}$ мол/л $K_{вн} / K_{нар} = 18$, а для фруктозы (наружная концентрация $1,7 \cdot 10^{-5}$ мол/л) 19. (Все концентрации пересчитывались на 1 μ л клеточной воды.) Следовательно, можно полагать, что оба углевода транспортируются в клетку против концентрационного градиента.

Наконец, для окончательного подтверждения активной природы транспорта углеводов, а также его ферментативного характера исследовалось действие различных метаболических ингибиторов. Результаты опытов суммированы в табл. 1. Очевидно, что поглощение клетками микоплазмы мальтозы обнаруживает высокую чувствительность прежде всего к ингибиторам SH-групп — N-этилмалеимиду, *n*-хлормеркурибензоату и моноподацетату (соответственно 94,93 и 97% ингибирования при концентрации ингибиторов 10^{-2} мол/л). Эффект наблюдается и при более низких концентрациях этих веществ. 2,4-динитрофенол, являющийся разобщителем дыхания и фосфорилирования в дыхательной цепи, также вызывает подавление. Остальные испытанные нами ингибиторы оказались малоактивными. Эти же ингибиторы, правда несколько слабее, подавляли аккумуляцию фруктозы.

Обсуждая полученные нами данные, следует прежде всего отметить, что клетки *M. laidlawii* способны активно переносить не только глюкозу (¹⁵), но также мальтозу и фруктозу. Об активной природе транспорта этих углеводов свидетельствует их накопление против градиента концентрации. В случае облегченной диффузии соотношение $K_{вн} / K_{нар}$ не должно превышать единицу. В наших опытах это соотношение намного превышало единицу. Полученные из концентрационных кривых обратные зависимости и вычисленные из них значения констант Михаэлиса для обоих сахаров прямо указывают на ферментативный характер переносчиков. Кроме того, это положение подтверждается реакцией транспорта на действие ингибиторов SH-групп, которые специфически подавляют активность транспортных белков (^{2, 4}).

Следует отметить, что поскольку мальтоза и фруктоза являются для микоплазмы утилизируемыми субстратами, мы имеем дело не только с транспортом (как в случае с углеводами типа α -метилглюкозида или 3-О-метилглюкозы), а с транспортом и последующим метаболизмом, что несколько осложняет интерпретацию полученных данных. Тем не менее, учитывая, что исследовались начальные сроки включений, а также роль транспортных процессов как первичных этапов метаболизма, следует отнести эти результаты к характеристике транспортных систем. Таким образом, можно считать, что фруктоза и мальтоза переносятся в клетки *M. laidlawii* специфическими активными транспортными системами, которые были показаны для ряда других бактерий (^{2, 4}).

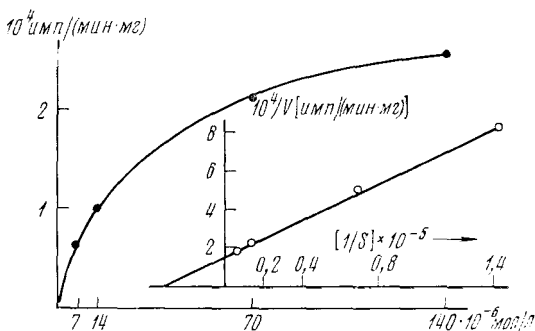


Рис. 2. Зависимость между скоростью включения S^{14} -мальтозы и ее наружной концентрацией. Внутри — обратная зависимость по Лайнуверу — Берку

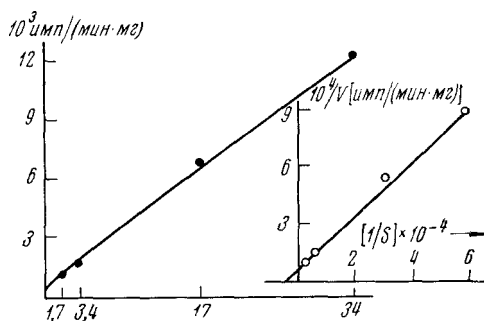


Рис. 3. Зависимость между скоростью включения S^{14} -фруктозы и ее наружной концентрацией (10^{-5} мол/л). Внутри — обратная зависимость по Лайнуверу — Берку

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Roseman, J. Gen. Physiol., **54**, 138S (1969).
- ² Н. Кабак, Ann. Rev. Biochem., **39**, 561 (1970).
- ³ В. Н. Гершанович, Усп. совр. биол., **72**, 24 (1971).
- ⁴ A. Kepes, J. Membrane Biol., **4**, 87 (1971).
- ⁵ W. Klingmüller, H. Huh, Europ. J. Biochem., **25**, 141 (1972).
- ⁶ M. M. Neville, S. R. Suskind, S. Roseman, J. Biol. Chem., **246**, 1294 (1971).
- ⁷ Г. И. Бурд и др., Мол. биол., **2**, 89 (1968).
- ⁸ S. Rodwell, Ann. N. Y. Acad. Sci., **143**, 88 (1967).
- ⁹ S. Rottem, S. Razin, J. Bacteriol., **92**, 714 (1966).
- ¹⁰ S. Razin et al., J. Bacteriol., **95**, 1685 (1968).
- ¹¹ S. Rottem, S. Razin, J. Gen. Microbiol., **48**, 53 (1967).
- ¹² S. Rottem, S. Razin, J. Bacteriol., **97**, 787 (1969).
- ¹³ P. F. Smith, Adv. Lipid. Res., **6**, 69 (1968).
- ¹⁴ P. F. Smith, Lipids, **4**, 331 (1969).
- ¹⁵ М. А. Таршис, В. Л. Мигушина и др., Биохимия, **37**, № 5 (1972).