

Е. Ф. ХАРАТЬЯН, Л. Н. КАЦ, академик А. И. ОПАРИН

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ СУКЦИНАТ-, ЛАКТАТ- И НАД-Н₂-ДЕГИДРОГЕНАЗ В МЕМБРАНАХ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Имеется значительное количество данных по определению активности дегидрогеназ в бактериальных мембранах. Эти данные, суммированные в последних монографиях и обзорах ((¹, ²) и др.), получены главным образом путем прямого энзиматического анализа фракций мембран без учета локализации ферментов на субмикроскопическом уровне. В имеющихся электроно-микроскопических работах ((³⁻⁶) и др.), как правило, отсутствуют необходимые контроли на истощение клетки по эндогенным субстратам, а сроки инкубации с тетразолиями столь длительны, что фактически позволяют судить о локализации суммарной активности эндогенных дегидрогеназ.

В настоящем исследовании мы поставили своей целью определить локализацию сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и НАД-Н₂-дегидрогеназы, т. е. трех наиболее изученных ферментов, дающих электроны первым звеньям дыхательной цепи.

Поскольку живые бактериальные клетки трудно отмыть от эндогенных субстратов, объектом наших исследований была фракция мембран трех типичных представителей аэробных бактерий *Bac. megaterium* штамма 393, *Bac. brevis* штамма б/н и *Micrococcus lysodeikticus* штамма Флеминга. Фракция включала цитоплазматическую мембрану, внутрицитоплазматические мембраны и везикулы. Во всех опытах фракцию мембран тщательно отмывали от эндогенных субстратов и использовали исключительно кратковременные сроки инкубации.

Для получения фракций мембран бактериальные культуры выращивали на МПБ при 37° на качалке в течение 4–5 час., осаждали и однократно промывали дистиллированной водой. Клетки *M. lysodeikticus* лизировали лизоцимом в течение 30 мин. при 37°, а *B. megaterium* и *B. brevis* в течение 60 мин. Лизоцим использовали в концентрации 1 мг на 1 г сырого веса клеток для микрококка и 8 мг на 1 г для бацилл. В работе применяли 0,01 *M* фосфатный буфер с 0,001 *M* Mg²⁺ рН 7,2. У *M. lysodeikticus* и *Bac. megaterium* мембраны выделяли непосредственно из клеток, а у *Bac. brevis* сначала получали протопласты в том же буфере с добавлением сахарозы (конечная концентрация 1*M*), а затем многократным промыванием вызывали освобождение мембран из протопластов. Полученные мембраны промывали буфером для удаления эндогенных субстратов 4 раза, а в случае с *Bac. brevis* 5–6 раз. Об истощении фракции мембран по эндогенным субстратам судили по отсутствию восстановления тетразолия фракцией мембран без внесения соответствующих субстратов извне.

Тетранитросиний тетразолий (ТНСТ) растворяли в диметилформамиде. В каждую пробу брали по 1 мг тетразолия в 0,1 мл диметилформамида. При инкубации с ТНСТ в пробирку вносили сначала суспензию мембран в буфере, затем раствор ТНСТ и, наконец, соответствующий субстрат. В качестве субстратов использовали сукцинат Na, НАД-Н₂ и лактат Na в конечной концентрации 0,01 *M*. Контролями служили: 1) фракция мембран без

ТНСТ и внесенных извне субстратов и 2) фракция мембран, инкубированных с ТНСТ без субстрата. Реакционную смесь перемешивали, а затем инкубировали при 37°. Время инкубации использовали минимальное, т. е. реакцию прекращали при хорошо заметном потемнении инкубационной среды в результате появления продукта восстановления ТНСТ. Время инкубации составляло 1—3 мин. при определении СДГ, 5 мин. для НАД-Н₂-дегидрогеназы и 10 мин. для ЛДГ. По окончании инкубации мембраны тщательно (4—5 раз) отмывали буфером.

Для электронно-микроскопического исследования мембраны фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом на фосфатном буфере в течение 3 мин., затем промывали 2—3 раза буфером и дофиксировали 0,2% OsO₄ (на том же буфере) в течение 18 час. Обезжизнение проводили сначала спиртом (до 70° спирта), а затем ацетоном. Препараты заключали в смесь эпон — аралдит по методу (7). Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-Producter. Для того чтобы не смешивать отложения диформаза ТНСТ с тяжелыми металлами и иметь достоверные контроли, ультратонкие срезы, как правило, не контрастировали ни уранилацетатом, ни уксуснокислым свинцом. Препараты просматривали и фотографировали на японском электронном микроскопе JEM-7 при инструментальном увеличении 30 000 и 50 000 \times .

При рассмотрении фракций мембран, не инкубированных ни с ТНСТ, ни с каким-либо субстратом (контроль), на неконтрастированных срезах трехслойное строение мембран выявляется очень слабо (рис. 1а). При этом мы обнаружили хорошую сохранность как цитоплазматической мембраны в виде замкнутого кольца, так и внутрицитоплазматических мембран, обычно имеющих вид замкнутых колец меньшего размера, окруженных цитоплазматической мембраной. О хорошей сохранности мембранного аппарата клеток свидетельствует также наличие полисом на некоторых мембранах. Тем не менее, имея дело с фракцией мембран, мы не можем с полным основанием судить о том, какому типу мезосом исходной клетки соответствуют внутренние кольцевидные мембраны в наших препаратах.

При инкубации фракций мембран с ТНСТ и сукцинатом Na в качестве субстрата мы наблюдали электронноплотные отложения конечного продукта реакции (рис. 1б, в, е, ж). При большом увеличении видно, что эти отложения образованы гранулами размером 2—4 нм (рис. 1г, д, е, ж.). Они располагаются, во-первых, в равной степени на цитоплазматической мембране и на внутренних мембранах и, во-вторых, одинаково интенсивно на обоих осмиофильных слоях мембраны. Наконец, их локализация более или менее равномерна в различных участках мембраны. Только в тех участках, которые представлены на косом срезе, эти отложения видны менее отчетливо (рис. 1б, вверху).

При рассмотрении тех опытов, где субстратом служил лактат Na, видно, что характер отложений конечного продукта реакции был тот же, что и при реакции на СДГ. Гранулы диформаза ТНСТ на всех трех объектах хорошо видны на обоих осмиофильных слоях цитоплазматической мембраны, на внутренних мембранах, а также на везикулах (рис. 1к, л). Так как ЛДГ является НАД-зависимым ферментом, некоторые авторы (8, 9) считают, что при измерении активности этого фермента фактически учитывается активность длафоразы НАД-Н₂. Однако при инкубации фракций мембран с НАД-Н₂ и ТНСТ в наших опытах можно видеть, что отложения гранул диформаза расположились иначе, чем при реакциях с двумя предыдущими ферментами. А именно, продукт реакции почти не встречается на внутрицитоплазматических мембранах и везикулах, а лишь на цитоплазматической мембране преимущественно на внешней ее стороне (рис. 1з, и).

При обсуждении полученных результатов следует учитывать, что, применяя многократное промывание фракций мембран от эндогенных субстратов, мы стремились тем самым ограничить ареал действия тетразолия тем

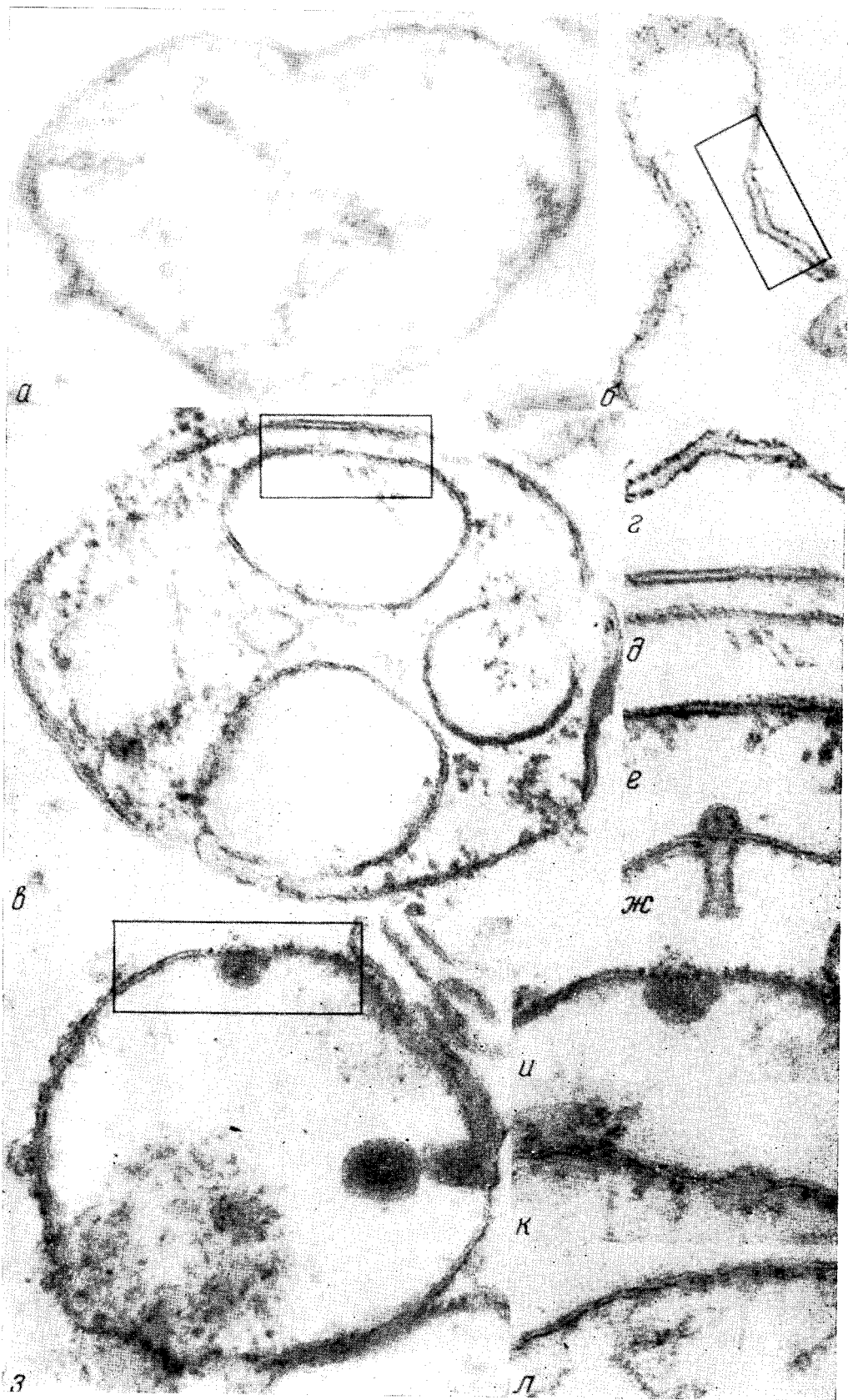
субстратом, который был внесен в инкубационную среду. Тем не менее соли тетразолия являются недостаточно специфичными маркерами дегидрогеназ. Так, в настоящее время известно, что хлорид неотетразолия, трифенилтетразолий-хлорид, пирросиний тетразолий и те соединения, которые содержат в своей молекуле иод или бром, могут брать электроны не только с уровня дегидрогеназ, но также и с цитохрома *b*, цитохрома *c* и даже с цитохрома *a/a₃* (¹⁰, ¹¹). В отношении использованного в нашей работе ТНСТ подобные данные в известной нам литературе отсутствуют. Далее следует учесть, что в опытах с сукцинатом Na и другими субстратами мы параллельно использовали два различных тетразолия: ТНСТ и тиокарбамилнитросиний тетразолий (ТК-НСТ), получив при этом аналогичные результаты. И, наконец, оба использованных тетразолия обладают наименьшей растворимостью в липидах по сравнению с другими солями тетразолия, дают наиболее мелкие гранулы диформазапов и являются пока что лучшими маркерами на дегидрогеназы в электронной микроскопии.

К сожалению, в литературе за последние годы отсутствуют работы по определению локализации дегидрогеназ в бактериях методом ультраструктурной цитохимии. В имеющихся статьях почти десятилетней давности использованы не фракции мембран, а целые бактериальные клетки и получена локализация диформаза ТНСТ на цитоплазматической мембране и в мезосомах (¹², ¹³). В грибах гриба *Paracoccidioides brasiliensis* активность СДГ, определенная с помощью ТНСТ, локализуется в основном в мезосомах и меньше в цитоплазматической мембране и в митохондриях (¹⁴). Сходные результаты получены (¹⁵) для *Neurospora crassa*. Авторы определяли локализацию СДГ, используя ТНСТ, и наблюдали отложения восстановленных продуктов реакции в мезосомах и на цитоплазматической мембране, в то время как интенсивность окраски митохондрий была различна. Оба этих объекта представляют особый интерес, так как обладают одновременно и митохондриями, характерными для высокоорганизованных клеток, и мезосомами бактериального типа. Таковы данные, которые мы можем привести в отношении локализации СДГ у микроорганизмов. Что касается ЛДГ и НАД-Н₂-дегидрогеназы, то работы, проведенные на бактериях, в этом плане отсутствуют.

Следует отметить, что наши данные не совсем согласуются с получившей сейчас широкое распространение хемосмотической теорией Митчелла. Согласно Митчеллу (¹⁶), СДГ и НАД-Н₂-дегидрогеназа расположены на внутренней стороне сопрягающей мембраны. В отношении СДГ это подтверждено (¹⁷) при определении этого фермента гистохимически с ТК-НСТ в митохондриях сердца крысы. Определены НАД-Н₂-дегидрогеназы на том же объекте с тремя различными тетразолиями показало отложения диформазапов в двух поверхностях мембран крист митохондрий с вторжением во внутрикристовое пространство (¹⁸). Однако при сопоставлении собственных данных, полученных для бактерий, мы, разумеется, с осторожностью должны сравнивать их с данными для организмов, имеющих митохондрии.

Резюмируя наши данные по возможной локализации исследованных дегидрогеназ на мембранах бактерий, можно представить следующее. Поскольку гранулы диформаза (при реакции на СДГ и ЛДГ) расположены на двух осмиофильных сторонах мембраны, представляется возможным,

Рис. 1. *a* — *Bacillus megaterium* (контрольный препарат без ТНСТ и субстрата), 180 000×; *b* — *Bacillus megaterium* (инкубация с ТНСТ+сукцинат Na), 150 000×; *c* — *Bacillus brevis* (инкубация с ТНСТ и сукцинатом Na), 150 000×; *d* — фрагмент *c*, 230 000×; *e* — *Bacillus brevis* (инкубация с ТНСТ+сукцинат Na), фрагмент, 230 000×; *ж* — *Micrococcus lysodeikticus* (инкубация с ТНСТ+сукцинат Na), фрагмент, 230 000×; *з* — *Micrococcus lysodeikticus* (инкубация с ТНСТ+НАД-Н₂), 180 000×; *и* — фрагмент *з*, 230 000×; *к*, *л* — *Bacillus megaterium* (инкубация с ТНСТ+лактат Na+НАД), 210 000×



что либо эти ферменты находятся на обеих сторонах мембраны, либо они вообще не имеют постоянного места, а перемещаются с одной стороны мембраны на другую. В отношении НАД-Н₂-дегидрогеназы можно сказать следующее. Известно, что пиридиннуклеотиды растворены в цитоплазме, т. е. находятся с внутренней стороны цитоплазматической мембраны. Отложения диформаза при реакции на НАД-Н₂-дегидрогеназу преимущественно на внешней стороне цитоплазматической мембраны могут говорить о том, что субстрат в силу своих свойств не проходит через замкнутые мембраны. Если в отдельных препаратах мы наблюдали отложения восстановленного тетразолия и на внутренней стороне цитоплазматической мембраны, то во внутрицитоплазматических мембранах они не встречались никогда.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
26 VIII 1974

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. С. Гельман и др., Мембраны бактерий и дыхательная цепь, «Наука», 1972
² Bacterial Membranes and Walls, N. Y., 1973. ³ И. Х. Горджян, Л. Н. Кац, ДАН, т. 186, 1192 (1969). ⁴ М. Н. Малаян, В. И. Бирюзова, ДАН, т. 160, 1182 (1965).
⁵ Л. А. Левченко и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 1, 165 (1969). ⁶ J. Brown et al.,
Canad. J. Microbiol., v. 14, 823 (1968). ⁷ H. Mollenhauer, Stain Technol., v. 39, 111
(1964). ⁸ H. Fahimi, C. Amarasingham, J. Cell Biol., v. 22, 29 (1964). ⁹ A. Pearse,
Histochemistry, v. 2, London, 1972. ¹⁰ T. Slater, Biochim. et biophys. acta, v. 77, 365
(1963). ¹¹ T. Slater et al., Biochim. et biophys. acta, v. 77, 383 (1963). ¹² A. Sedar,
R. Burde, J. Cell Biol., v. 24, 285 (1965). ¹³ W. Leene, W. van Iterson, J. Cell Biol.,
v. 27, 237 (1965). ¹⁴ S. Leiva, L. Carbonell, J. Gen. Microbiol., v. 62, 43 (1970).
¹⁵ J. Koke et al., Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 42, 576 (1971). ¹⁶ P. Mit-
chell, Prokaryotic and Eukaryotic Cells, XX Symposia of the Society for General Micro-
biology, 1970, p. 121. ¹⁷ A. Seligman et al., J. Cell Biol., v. 38, 1 (1968). ¹⁸ A. Selig-
man et al., J. Histochem. and Cytochem., v. 15, 1 (1967).