

В. И. БИНЮКОВ, Т. В. КОРОНЕЛЛИ, член-корреспондент АН СССР
Н. А. КРАСИЛЬНИКОВ, В. П. ИВАНОВ, Д. Н. ОСТРОВСКИЙ

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ПАРАМАГНИТНОГО ЗОНДА
МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С СУБСТРАТОМ КЛЕТОК
УГЛЕРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКОБАКТЕРИЙ**

Усвоение различными микроорганизмами углеводов алифатического ряда представляет большой практический интерес, и вместе с тем изучение этого явления может дать многое для понимания молекулярной организации биологической мембраны и всей оболочки клетки.

Высказывалось несколько предположений относительно механизма поглощения углеводов микробами: 1) углеводород растворяется в воде и переносится в клетку пермеазами как любое другое вещество среды; 2) углеводород проникает внутрь клетки в виде микрокапель;

Таблица 1

Значения параметров τ_c и $(a_N - a_{N_T})/(a_{N_B} - a_{N_T})$ сигнала э.п.р. зонда в целых клетках *M. paraffinicum* и модельных системах

Система	τ_c , 10^{-10} сек.	$(a_N - a_{N_T})/(a_{N_B} - a_{N_T})$
Вода	—	1
Полярные липиды	22,0	0,6
Пептидолипиды	10,0	0,48
Триглицериды	9,5	0,48
Гексадекан	0,75	0
Клетки <i>M. paraffinicum</i> (углеводород, HCl) + + углеводород	4,2	0,34
(углеводород, кипение) + углеводород	3,5	0,24
(углеводород, HCl)	8,2 (3,4)	0,28 (0,25)
(углеводород, кипение)	5,7 (2,8)	0,19 (0,20)
(глюкоза, HCl)	—	0,75 (0,35)
(глюкоза, кипение)	— (4,0)	0,68 (0,20)

Примечания. 1. Величина $(a_N - a_{N_T})/(a_{N_B} - a_{N_T})$ практически линейно зависит от полярности среды по Косоверу (11). 2. В скобках приведены значения параметров после введения в исследуемую систему эмульсии гексадекана. 3. Ошибка в измерении τ_c составляет ~20%, для $(a_N - a_{N_T})/(a_{N_B} - a_{N_T})$ — +0,05. 4. Углеводород, HCl — клетки выращены на углеводороде, инактивированы HCl, зонд введен непосредственно в оболочку; глюкоза — среда с глюкозой; кипение — обработка в кипящей водной бане, + углеводород — зонд введен в оболочку с эмульсией углеводорода.

3) углеводород растворяется в липофильной оболочке и диффундирует к внутренней ее поверхности, где трансформируется при участии специфических ферментов (14). Последняя гипотеза привлекает в настоящее время наибольшее внимание.

Недавно для изучения состояния липофильных участков биомембран был предложен метод, основанный на проникновении в эти участки

молекул свободных радикалов — зондов, сигнал электронного парамагнитного резонанса (э.п.р.) которых зависит от свойств окружающей среды (⁵, ⁶). В настоящей работе мы попытались при помощи парамагнитного зонда, молекула которого похожа на молекулу субстрата — гексадекана, получить информацию о характере взаимодействия алифатических углеводов с клеточной стенкой бактерий. Основанием для такой постановки вопроса послужили следующие рассуждения: если субстрат поглощается клеткой в виде микрокапель, то сигнал э.п.р. от зонда, находящегося в таких каплях, будет неизменным как до, так и после поглощения субстрата; если же субстрат растворяется в оболочке клетки и затем диффундирует внутрь ее, то параметры сигнала будут меняться по мере продвижения углевода (и зонда) через стенку и мембрану клетки.

В работе использовали культуру *Mycobacterium paraffinicum*, выращенную на среде с гексадеканом или глюкозой в течение 45 час. (логарифмическая фаза роста) (⁷, ⁸). Выделение и фракционирование липидов производили по ранее описанному способу (⁸, ⁹). Для подавления активности ферментов оболочки

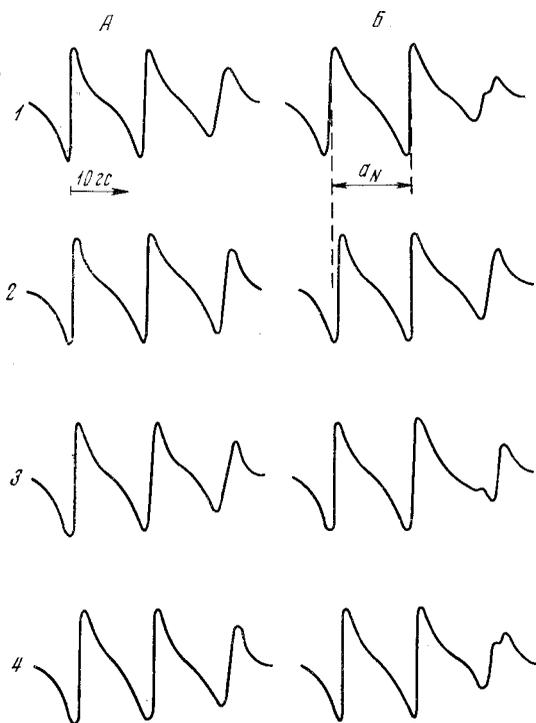


Рис. 1. Спектры э.п.р. зонда, включенного в клетки *M. paraffinicum*, выращенные на гексадекане (А) и на глюкозе (Б), инактивированные в водной бане кипячением (1, 2) и соляной кислотой (3, 4). В случаях 2, 4 после введения зонда добавлена эмульсия гексадекана

и констант изотропного сверхтонкого взаимодействия (a_N) описана в работах (⁶, ¹¹). Величиной a_N можно удовлетворительно пользоваться при определении полярности по Косову окружающей зонд среды (¹²). Температура образца при изменении была 25°.

При смешивании звуковой эмульсии гексадекана, содержащей зонд, с живыми клетками *M. paraffinicum* наблюдалась быстрая гибель зонда, причем в начальные моменты времени характер сигнала (a_N) соответствовал неполярной среде зонда, а в конечные моменты — более полярной. При введении в суспензию клеток феррицианида калия ($\sim 10^{-1}$ M) сиг-

неты ферментов оболочки клетки обрабатывали: 15% раствором H_2O_2 в течение 60 мин.; 2,5 N раствором HCl в течение 30 мин.; 11% раствором формалина 15 мин. при 4° или прогревали в кипящей водяной бане 15 мин. с последующей промывкой 0,01 M фосфатным буфером pH 7,4 с 0,001 M $MgSO_4$.

В качестве спинового зонда применяли иминоксильный радикал 2,2,6,6-тетраметил-4-(β -пальмитиноилоксиэтил)-пиперидин-1-оксил, синтезированный по методике, описанной в работе (¹⁰). Спиновой зонд вводили в оболочку клеток смешиванием водной звуковой эмульсии зонда с суспензией бактерий в течение 30 мин. при комнатной температуре с последующей отмывкой и центрифугированием. Конечная концентрация зонда в бактериальной пасте составляла $\sim 10^{-4}$ мол/л. Техника измерения сигналов э.п.р. зонда и методика расчета времени корреляции вращательной диффузии молекулы зонда (τ_c)

нал появляется вновь. Очевидно, a_N в начале опыта отражает преимущественную локализацию зонда в гексадекане, а в конце опыта — локализацию в более полярной области, что, по-видимому, связано с проникновением и диспергированием гексадекана, а вместе с ним и зонда, в оболочку клетки. Объемная локализация зонда в оболочке (¹³) подтверждается и тем фактом, что феррицианид калия, окисляя зонд до парамагнитного состояния, не приводит к изменению сигнала э.п.р.

Можно предположить, что уменьшение интенсивности сигнала зонда связано с ферментативным восстановлением его в оболочке бактерий. Чтобы исключить гибель зонда в оболочке бактерий, ферменты инактивировали различными воздействиями. Наиболее полная инактивация происходила под действием HCl и высокой температуры. В этом случае отсутствие гибели радикала позволило измерить как a_N , так и τ_c (табл. 1)*, характер полярности окружающей зонд среды при этом соответствовал опытам с живыми клетками.

Чтобы проследить за изменением состояния оболочки при взаимодействии ее с гексадеканом, зонд был включен в оболочки бактерий, выращенных как на углеводороде, так и на глюкозе, а затем они были приведены в контакт с эмульсией гексадекана. Спектры э.п.р. зонда для этих случаев и значения a_N и τ_c приведены на рис. 1 и в табл. 1. Из этих данных видно, что в бактериях, выращенных на глюкозе, степень полярности окружения зонда выше, чем во фракциях липидов, но ниже, чем в воде. Из этого следует, что в оболочке бактерий основная часть липидов существует в виде комплексов с более полярными компонентами оболочки.

В случае добавления эмульсии гексадекана к обоим типам клеток с включенным в них зондом подвижность зонда заметно возрастает. Полярность среды, окружающей зонд, находящийся в оболочках бактерий, выращенных на гексадекане, при этом практически не изменяется, а для бактерий, выращенных на глюкозе, резко уменьшается, приближаясь к таковой для первого типа клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что при росте бактерий на среде с углеводородом последний пропитывает оболочку, сольбилизируясь в липофильных ее участках.

Следует отметить, что форма спектров э.п.р. зонда в бактериях, выращенных на глюкозе, не позволяет определить τ_c зонда из-за сложности спектра (рис. 1Б 1, 3, 4), что, возможно, связано с локализацией зонда, по крайней мере, в двух типах участков оболочки, отличающихся величиной a_N , τ_c и изотропного g -фактора. Измеряемая величина a_N в этих случаях усредненная.

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

Поступило
2 VI 1971

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ N. D. Jerusalemky, G. K. Skryabin, Zs. allgem. Mikrobiol., 6, 23 (1966).
² М. Н. Мейсель, Г. А. Медведева и др., Тез. IX Международн. микробиол. конгресса, М., 1966, стр. 84. ³ Е. Г. Давидова, Л. И. Ланотышкниа, Докл. Моск. с.-х. акад., 144, 177 (1968). ⁴ M. J. Johnson, Chem. and Ind., 36, 1532 (1964).
⁵ W. Hubbell, McConnel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 61, 12 (1968). ⁶ В. И. Билюков, М. Г. Гольдфельд и др., Биохимия, 36, 1149 (1971). ⁷ Н. А. Красильников, Т. В. Коронелли, В. И. Дуда, Микробиология, 41, 2 (1972).
⁸ Н. А. Красильников, Т. В. Коронелли, Микробиол. синтез, № 9—10, 18 (1969). ⁹ Н. А. Красильников, Т. В. Коронелли, Микробиология, 40, 227 (1971). ¹⁰ Э. Г. Розанцев, Г. Л. Григорян, В. П. Иванов, Изв. АН СССР, сер. хим., 1970, 2840. ¹¹ А. Н. Вассерман, Кандидатская диссертация, ИХФ АН СССР, М., 1968. ¹² G. N. Dodd, M. D. Barrat, L. Rayner, Febs Letters, 8, 286 (1970). ¹³ Г. И. Лихтенштейн, Ю. Б. Гребенщиков и др., Молек. биол., 4, 682 (1970).

* В табл. 1 указана величина $(a_N - a_{N_T}) / (a_{N_B} - a_{N_T})$, где a_N и a_{N_T} — величины констант изотропного сверхтонкого взаимодействия для зонда в исследуемой системе и гектане, a_{N_B} — величина a_N для 2,2,6,6-тетраметил-4-оксилпиперидин-1-оксида в воде.