

В. В. АНДРОСОВ, В. В. ВЫСОЦКИЙ

ФЕНОМЕН ОБРАЗОВАНИЯ МНОЖЕСТВЕННЫХ МЕМБРАН В КЛЕТКАХ Hg МУТАНТОВ *ESCHERICHIA COLI* K12

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 3 III 1975)

Анализ многочисленных электронно-микроскопических исследований позволяет утверждать, что мембранный компонент бактериальных клеток представлен цитоплазматической мембраной и ее дериватами — внутрицитоплазматическими мембранными структурами (мезосомами). У большинства грамотрицательных бактерий мембранные образования развиты очень слабо в обычных условиях и выявляются с большим трудом (¹⁻³). В настоящем сообщении представлены результаты, показавшие наличие множественных мембранных образований в клетках Hg мутантов *E. coli* K12, полученных и описанных ранее (^{4, 5}).

Объектами исследования служили Hg мутанты *E. coli* K12 LAC1 (производный HfrC) и LPA3 (производный PA309.) Бактериальные штаммы, выращенные на твердой полноценной среде, фиксировались двумя модифицированными методами. При первой фиксации их помещали в 4% глутаровый альдегид на 1 час (⁶), затем обрабатывали 1% осмиевой кислотой (1 час). После заливки материала в расплавленный агар вырезанные кусочки помещали на 2 часа в 3% раствор уранилацетата в 30% этаноле. Фиксация препаратов K_2MnO_4 осуществлялась в модификации метода Luft (⁷), заключительный этап которого также предусматривал обработку уранилацетатом. Все фиксаторы готовили на буфере Михаэлиса (рН 6,4). Ультратонкие срезы, полученные на ультратоме LKB-8801A (Швеция), дополнительно прокрашивали 3% уранилацетатом (⁶) в течение 30 мин. и изучали на электронном микроскопе JEM-100B (Япония) при инструментальном увеличении 10 000—100 000.

Анализ обзорных микрофотоснимков показал, что для популяции Hg мутантов характерен выраженный полиморфизм. Наиболее часто встречались клетки круглой, овальной и вытянутой формы (что, по-видимому, зависело также от плоскости среза), диаметром от 1 до 5 мкм, а также сферические элементы диаметром до 0,1 мкм. Наряду с ними обнаруживались клетки неправильной формы, иногда с многочисленными выступами цитоплазмы, придающими им звездчатую форму. По своей морфологии Hg мутанты больше всего напоминали стабильные L-формы *E. coli* (^{8, 9}).

В отличие от интактных бактериальных клеток, профили поверхностных структур Hg мутантов были сглажены, и поэтому их составные части дифференцировались достаточно четко. В зависимости от цитоархитектоники поверхностных структур в популяции Hg мутантов можно было выделить 3 типа клеток. Клетки первого типа были окружены клеточной стенкой обычного для грамотрицательных микроорганизмов строения, толщиной 180—200 Å. Электронно-оптический слой клеточной стенки, соответствующий ригидному компоненту, был иногда сильно уплощен и отделялся от цитоплазматической мембраны периплазматическим пространством (рис. 1).

Клетки второго типа (~30%) также снаружи были окружены клеточной стенкой, но цитоплазматическая мембрана почти не прослеживалась вследствие высокой оптической плотности цитоплазмы (рис. 2).

Эти типы клеток часто имели неправильную форму за счет выступов цитоплазмы, возникающих при нарушении ригидности клеточной стенки. У некоторых клеток этого типа, кларуки от цитоплазматической мембраны, наблюдался мелкозернистый диффузный компонент, отнесенный нами к продуктам деполимеризации клеточной оболочки.

Третий тип клеток имел промежуточное строение: мембрана клеточной стенки характеризовалась прерывистостью и наблюдалась лишь на более или менее протяженных участках клеточной поверхности.

Цитоплазму большинства клеток заполняли рибосомы размером до 200 Å, находящиеся между фибриллярным материалом нуклеотида. У большинства клеток основная масса нуклеотида имела центральное расположение и четко дифференцировалась от других компонентов цитоплазмы.

Наряду с этими типичными компонентами, выявляемыми у граммотрицательных бактерий, мы наблюдали в большом количестве редупликации мембранных образований. По своему расположению и структуре их можно было условно разделить на 3 типа: внутренние одномембранные кольцевидные образования, внутренние многомембранные концентрические структуры и дополнительные цитоплазматические мембраны.

Внутренние циркулярные мембранные образования, встречающиеся у клеток различных размеров, окантовывали вакуоли, которые иногда занимали более половины профиля клеток (рис. 1). По своему строению они ничем не отличались от цитоплазматической мембраны клетки. В клетках второго типа вакуоли имели резкие неправильные очертания и были множественны (рис. 2). На некоторых снимках внутри вакуолей обнаруживались участки вещества цитоплазмы, в свою очередь окантованные мембраной и несущие фибриллярный компонент — ДНК (рис. 4). Предполагается, что их возникновение происходит, по-видимому, путем выпячивания мембраны вакуоли, перетекания в него материала цитоплазмы и последующего отграничения. Отграниченные участки вещества достигали размеров 750—1000 Å. Подобные «элементарные тельца», обладающие репродуктивными свойствами, были обнаружены ранее у стабильных L-форм (^{13, 14}).

Способность клеток в популяции Hg мутантов продуцировать внутренние множественные цитоплазматические мембраны и мембранные напластования является наиболее интересной и важной особенностью мутантов. Во всех исследованных популяциях находились, как правило, клетки, окантованные двумя дискретными мембранами. Редко встречались клетки, имеющие напластования из 3 и даже 5 поверхностных мембран (рис. 3). По своей ультраструктуре они также ничем не отличались от мембран обычного строения. Они разделялись промежутками в 80—100 Å. На их внутренней поверхности иногда можно было наблюдать мельчайшие сферические тельца (до 200—300 Å), контактирующие с ними.

Наряду с этими мембранными образованиями у некоторых клеток, а также в культуральной среде обнаруживались компактные многомембранные концентрические образования. Их мембраны имели параллельные слои, сходные с мизлиновыми структурами, причем эти многомембранные образования либо окружали целиком некоторые клетки, либо имели вид внутрицитоплазматических дисков. При лизисе клеток эти диски нередко обнаруживались в культуральной среде. Концентрические мембранные образования по своему внешнему виду напоминали мезосомы грамположительных бактерий. Их образование всегда сопряжено с цитоплазматической мембраной. На рис. 4 представлен процесс формирования концентрических мезосомоподобных мембранных структур у почкующейся клетки Hg мутанта.

В настоящее время множественные мембранные напластования удалось выявить у клеток, находящихся в условиях голодания по аминокислотам (15) или дефициту в отношении ионов Mg^{2+} (^{13, 14}), либо у стабильных L-форм *E. coli* (⁷). Описано также образование множественных напластований цитоплазматических мембран у клеток *E. coli*, выращенных при 40°

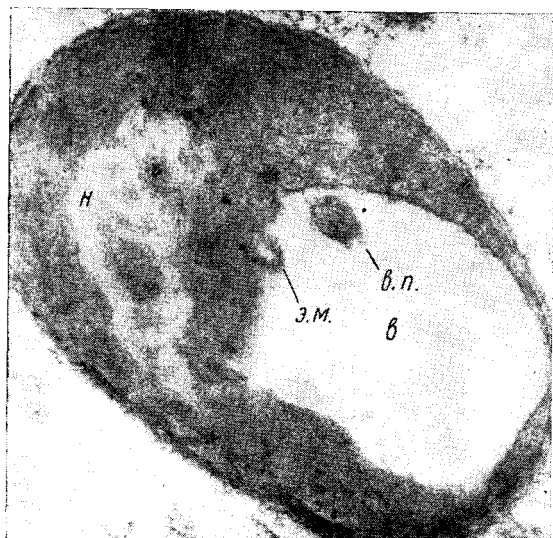


Рис. 1



Рис. 2

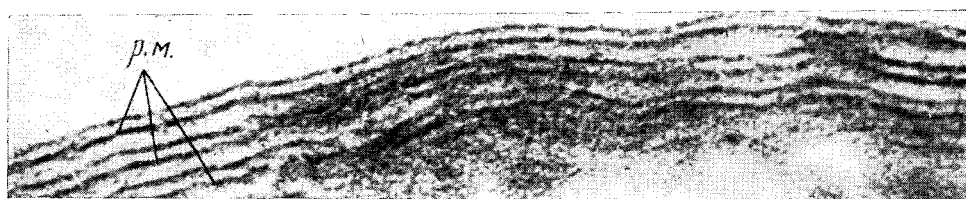


Рис. 3



Рис. 4

Рис. 1. Крупный сферический элемент в популяции II_g мутанта. *в* — вакуоль, *э.м.* — эвагинация мембраны вакуоли, *в.п.* — внутривакулярная почка, *н* — нуклеотид. Фиксация марганцовокислым калием. 55 000×

Рис. 2. Множественные вакуоли в клетке второго типа. *к.с.* — клеточная стенка, *ц.п.м.* — цитоплазматическая мембрана. Фиксация глутаровым альдегидом. 45 000×

Рис. 3. Множественная редупликация цитоплазматических мембран (*р.м.*). Фиксация глутаровым альдегидом. 90 000×

Рис. 4. Образование редупликаций мембран концентрического типа (*м.м.*) в почкующемся элементе из клетки II_g мутанта. 180 000×

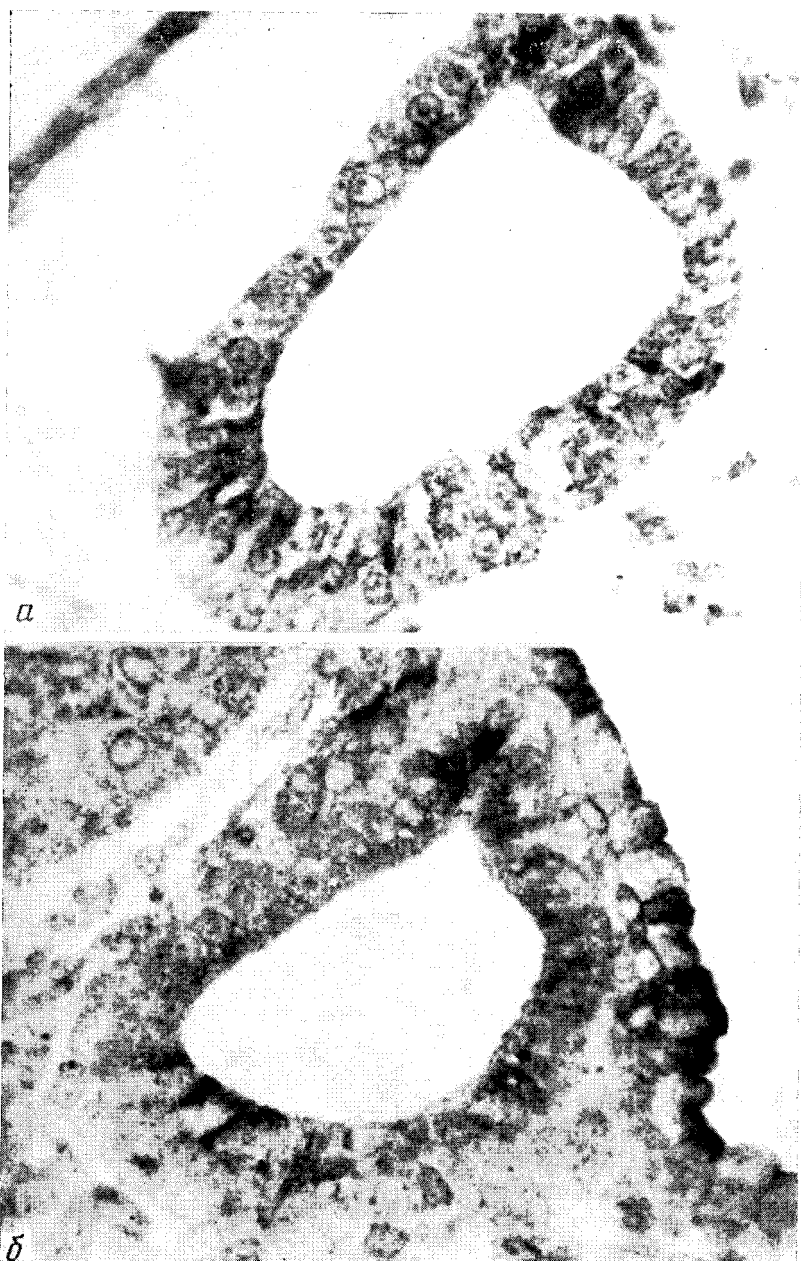


Рис. 1. Слуховые пузырьки контрольных нецентрифугированных (а) и подопытных центрифугированных (б) зародышей травяной лягушки, зафиксированных одновременно на стадии довольно поздней хвостовой почки. В контроле слуховой пузырек еще не покрыт мезенхимой, а в опыте уже идет образование слуховой капсулы

(¹⁵). Обнаружение сходных мембранных образований у Hg мутантов указывает на нарушение у них определенных процессов обмена в результате мутации. Картированная мутация, обозначенная символом HgA, располагалась на 64 минуте генетической карты *E. coli* K12 и являлась по своей природе точковой (³). Высокая чувствительность этих мутантов к пенным и неионным детергентам, а также ко многим антибиотикам, свидетельствует о повышенной проницаемости оболочек клетки к этим агентам. Это предположение подтверждается также и экспериментально: у многих клеток Hg мутантов отсутствовали клеточные оболочки, что позволило на основании электронной микроскопии отнести их к протопластическому типу клеток. Предварительные исследования показали, что мутация HgA приводит к нарушению нормального транспорта некоторых веществ в клетку, в частности ионов K^+ и Na^+ . Биохимическая природа нарушений в клетке, связанных с данной мутацией, изучается в настоящее время.

Второй Московский государственный медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Поступило
4 II 1975

Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. Kellenberger, A. Ryter, In: Modern Development in Electron Microscopy, B. N. Sigel (Ed.), N. Y., 1964, p. 335.
- ² W. van Iterson, Bacteriol. Rev., v. 29, 299 (1965).
- ³ E. H. Cota-Robles, J. Ultrastructure Res., v. 16, 620 (1966).
- ⁴ В. В. Андросов, Биологические и генетические свойства L-форм и L-мутантов *Escherichia coli* K12, Канд. дисс., М., 1972.
- ⁵ В. В. Андросов, В. С. Леваев, ДАН, т. 246, 202 (1974).
- ⁶ L. Dienes, S. Bullivant, J. Bacteriol., v. 95, 672 (1968).
- ⁷ J. H. Luft, J. Biophys. Biochem. Cytol., v. 2, 799 (1956).
- ⁸ В. С. Леваев, Вестн. АМН СССР, т. 8, 32 (1965).
- ⁹ J. Gumpert, E. Schumann, U. Taubeneck, Zs. allgem. Mikrobiol., B. 11, 19 (1971).
- ¹⁰ C. Weibull, J. Bacteriol., v. 90, 1467 (1965).
- ¹¹ D. C. Dannis, J. H. Marston, Texas Reports on Biol. and Med., v. 23, 729 (1965).
- ¹² K. R. Smith, G. R. Smith, J. Ultrastructure Res., v. 4, 213 (1960).
- ¹³ G. Lutsch, P. Venker, Naturwiss., v. 56, 568 (1969).
- ¹⁴ C. Morgan, H. S. Rosenkranz, H. M. Rose, J. Bacteriol., v. 91, 891 (1966).
- ¹⁵ R. A. Weigand, J. M. Shively, J. W. Greenawalt, J. Bacteriol., v. 102, 240 (1970).