

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.152.3

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА КАТАЛІТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ Mg²⁺-ЗАЛЕЖНОЇ АТР-ГІДРОЛАЗИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ *Bacillus sp. B4253*, ЗДАТНИХ ДО НАКОПИЧЕННЯ ЗОЛОТА

Г. В. ДАНИЛОВИЧ¹, Т. Г. ГРУЗИНА², З. Р. УЛЬБЕРГ², С. О. КОСТЕРІН¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

²Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка, Україна, Київ;
e-mail: tgruzina@mail.ru

В цитоплазматическій мембрані *Bacillus sp. B4253*, способних к аккумуляції золота в іонній і колоїдній формі, ідентифіцирована Ca²⁺-незалежна Mg²⁺-залежна АТР-гідролізна ферментативна активність, состоящая из двух компонент — азидчувствительной и азидрезистентной. Охарактеризованы свойства азидрезистентной компоненты АТР-гідролізнаї реакції: динаміка накоплення одного из ее продуктів — неорганіческого фосфата P_i; залежність швидкості гідролізу АТР від вмісту мембранного білка; рН-залежність; чутливість АТР-гідролізнаї активності к зміні концентрацій реагентів (АТР, Mg²⁺), а також к дію деяких специфічних і неспецифічних інгібіторів іон-транспортуючих Mg²⁺-залежних АТР-гідролізнаї систем (оубаїну, тапси-гаргину, еозину Y, іонам La). Предполагается, что полученные експериментальні данні можуть бути полезні при дальнішій дослідженні молекулярних і мембранних механізмів аккумуляції золота в *Bacillus sp. B4253*.

К л ю ч е в е с л о в а: аккумуляція золота, *Bacillus sp. B4253*, цитоплазматическая мембрана, Ca²⁺-незалежна Mg²⁺-залежна АТР-аза, дигітонін, азид натрія, еозин Y.

Клітини мікроорганізмів багатьох видів здатні акумулювати іонне та колоїдне золото [1–3]. Найбільше ця властивість притаманна гетеротрофним бактеріям, які виділені із золотоносних родовищ [2]. Золото належить до групи так званих “авітальних елементів”, і, принаймні, на сьогодні його вплив на перебіг біохімічних процесів в клітині не встановлено.

Практично мікробна біомаса за різних умов може утримувати значну кількість металу шляхом “пасивної” сорбції та(або) комплексоутворення. Такий тип взаємодії між металами і біомасою, який називається “біосорбцією” [4], є властивим як для живих, так і мертвих клітин. Проте в багатьох випадках спостерігається “активне” концентрування іонів металів живими клітинами з чіткою залежністю від метаболічної активності мікроорганізмів [5–6]. Цей тип взаємодії між металами та біомасою отримав узагальнену назву “біоаккумуляція”.

Як правило, у процесі концентрування металу бактеріями виявляється дві фази: порівняно швидко початкове фізико-хімічне зв’язування його на поверхні клітин та наступна повільна

енергозалежна акумуляція, причому перша фаза може тривати декілька хвилин, тоді як друга — декілька годин [6].

Відомо, що золото має бактерицидну дію [1]. Втім залишається не з’ясованим, чи має ефект акумуляції золота біологічне значення, чи він є наслідком реалізації якихось життєво важливих функцій бактеріальної клітини в екстремальних умовах.

Результати проведеного нами раніше інгібіторного аналізу свідчать, що енергозалежне концентрування золота в бактеріальних клітинах безпосередньо або опосередковано залежить від функціонування мембранної Mg²⁺-залежної АТР-гідролізу (Mg²⁺-АТР-ази) [7–8]. Тому є вагомим підставою вважати, що Mg²⁺-АТР-аза мембран бактерій може мати важливе значення в накопиченні золота мікроорганізмами.

З огляду на вищезазначене, мета роботи полягала в ідентифікації та вивченні каталітичних властивостей Mg²⁺-залежної АТР-гідролізу мембран *Bacillus sp. B4253*, здатних до накопичення золота в іонному або колоїдному стані.

Матеріали і методи

В роботі були використані клітини 18-годинної культури (стаціонарна фаза росту) *Bacillus sp. B4253* з колекції Інституту біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України. Клітини вирощували в колбах на качалках в умовах аерації при 30 °C на збагаченому середовищі такого складу (г/л): триптон – 10, дріжджовий екстракт – 5, NaCl – 5, глюкоза – 1, CaCl₂·H₂O – 0,345, цистеїн – 0,03 (рН 7,0).

Фракцію цитоплазматичних мембран клітин бактерій виділяли з використанням стандартних методів препаративної біохімії [7]. Вміст білка визначали методом М. М. Bradford [9]. Типове середнє значення вмісту його в мембранній фракції становило 3,0–3,3 мг/мл.

Реакцію ферментативного гідролізу АТР та визначення Mg²⁺-залежної АТР-азної активності здійснювали у стандартному середовищі інкубації (об'єм – 0,4 мл), що містило (в мМ): АТР – 5, MgCl₂ – 5, NaCl – 50, KCl – 100, NaN₃ – 1, етиленглікольтетраацетат (ЕГТА) – 1, Нерес-трис (рН 7,4) – 20, до якого додавали 0,01% дигітоніна. Кількість білка мембранної фракції у пробі (в середньому) становила 75 мкг/мл, час інкубації – 5 хв. Контролем (на неферментативний гідроліз АТР та вміст ендogenous фосфору) слугували проби, що за своїм складом відповідали стандартному середовищу інкубації, але містили мембранний препарат з попередньо інактивованою АТР-гідролазою шляхом оброблення його “стоп-розчином” [10]). АТР-гідролазну реакцію ініціювали внесенням до середовища інкубації аліквоти (30 мкл) суспензії мембранного препарату, а гальмували 1 мл охолодженого до 8 °C “стоп-розчину” такого складу: натрій-ацетатний буфер (рН 4,3) – 1,5 М, формальдегід – 3,7%, етанол – 14%, трихлороцтова кислота – 5%. Ca²⁺-незалежну (ЕГТА-резистентну) Mg²⁺-залежну АТР-азну активність обчислювали як різницю між загальною активністю її та показником у контролі (за присутності ЕГТА). Вміст неорганічного фосфору P_i визначали методом W. Rathbun та V. Vetluch [10]. Інші необхідні модифікації складу середовища інкубації описано в розділі “Результати та обговорення”.

Всі експерименти з вивчення властивостей “базальної” Ca²⁺-незалежної Mg²⁺-АТР-азної ферментативної реакції здійснювали в режимі визначення її початкової швидкості V_o. Величини константи Міхаеліса (K_m) за АТР та константи активації за іонами Mg (K_{Mg}), а також значення максимальної швидкості за АТР (V_{АТР}) та Mg²⁺ (V_{Mg}) розраховували з використанням метода Хейнса [11]. Лінеаризовані графіки обчислювали з використанням метода найменших квадратів

(значення коефіцієнта кореляції *r* становило 0,90–0,98). Статистичний аналіз одержаних даних здійснювали загальновідомими стандартними методами, кінетичні та статистичні розрахунки проводили в режимі програмного забезпечення на персональному комп'ютері IBM PC.

У роботі застосовували наступні реактиви: АТР, нерес – (N-2-гідроксietилпіперазин-N'-2-етансульфонат), оубаїн, тапсигаргін, еозин Y («Sigma», США), трис(гідроксиметил)амінометан – трис («Reanal», Угорщина), дигітонін («Merck», Німеччина), ЕГТА («Fluka», Швейцарія). Інші реактиви – вітчизняного виробництва кваліфікації ч. д. а. та х. ч.

Результати та обговорення

Підбір оптимальних умов для визначення Ca²⁺-незалежної Mg²⁺-залежної АТР-гідролазної ферментативної активності в цитоплазматичній мембрані *Bacillus sp. B4253*. На першому етапі досліджень нами були підібрані оптимальні умови для визначення Mg²⁺-залежної АТР-гідролазної активності у фракції цитоплазматичних мембран *Bacillus sp. B4253*. У разі використання стандартного середовища інкубації, яке не містить фактора пермеабілізації плазматичної мембрани – дигітоніну, – кальцієвий хелатор ЕГТА в концентрації 1 мМ, як відомо, надійно забезпечує зв'язування ендogenous іонів Ca [12]. Отже, за таких умов йдеться про визначення саме Ca²⁺-незалежної Mg²⁺-залежної АТР-азної ферментативної активності (“сукупної”) в цитоплазматичній мембрані *Bacillus sp. B4253*, величина якої становила 8,6 ± 1,0 мкмоль P_i/год на 1 мг білка (n = 5). Для порівняння зазначимо, що у плазматичній мембрані клітин електростимульованої тканини – гладеньких м'язів – АТР-гідролазна активність була практично ідентичною (10–12 мкмоль P_i/год на 1 мг білка) [13]. При цьому слід зауважити, що за зазначених умов експерименту не можна виключати можливість спонтанної інактивації Mg²⁺-залежної АТР-гідролази цитоплазматичної мембрани клітин бактерій під час виділення та зберігання мембранної фракції, внаслідок чого може втрачатись ферментативна активність. Крім того, є підстави вважати, що активність цієї АТР-гідролази залежить і від низки інших факторів, зокрема від умов та фази росту мікроорганізмів.

Після додавання до середовища інкубації NaN₃ (1 мМ) Mg²⁺-залежна АТР-азна активність пригнічується майже на 63%, а величина азид-резистентної компоненти становить 3,2 ± 0,5 мкмоль P_i/год на 1 мг білка (n = 5). Таким чином, вдалося встановити, що за відсутності в середовищі дигітоніну “сукупна” Ca²⁺-незалежна Mg²⁺-АТР-

азна активність включає дві компоненти:

1) такої, що гальмується 1 мМ NaN_3 : її величина становить $5,5 \pm 0,6$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка ($n = 5$), тобто 63% від активності “сукупної” Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТР-ази;

2) резистентної компоненти до дії азиду натрію: її величина дорівнює $3,2 \pm 0,5$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, тобто 37% від “сукупної” активності Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТР-ази. Отже, азидчутливу компоненту обчислюють як різницю між “сукупною” Ca^{2+} -незалежною Mg^{2+} -АТР-азною активністю та Ca^{2+} -незалежною, резистентною до NaN_3 . Таким чином, у цитоплазматичній мембрані *Bacillus sp. B4253* азидчутлива складова АТР-гідролазної активності загалом в 1,7 раза перевищує азидрезистентну.

З даних літератури відомо, що фракція плазматичних мембран, яку одержують методами препаративної біохімії, є гетерогенною з топологічного погляду, оскільки здебільшого містить як “незамкнені”, так і “замкнені” (цитоплазматичним боком назовні або всередину) мембранні фрагменти [14]. Отже, зрозуміло, що “базальна” Mg^{2+} -АТР-аза частково перебуває в латентному стані і тестування її активності можливе лише після попереднього порушення інтактності везикульованих мембранних структур. Такі умови можна створити внесенням в середовище інкубації неіонного детергенту дигітоніну, який специфічно взаємодіє із плазматичними мембранами, збагаченими холестеролом [14].

Було встановлено (рис. 1), що внесення в середовище інкубації фактора перфорації плазматичної мембрани дигітоніну в концентрації 0,005–0,01% індукує потенційно можливу латентну АТР-азну активність, унаслідок чого підвищується “сукупна” Ca^{2+} -незалежна Mg^{2+} -АТР-азна активність (майже на 26%) порівняно з контролем, тобто за відсутності детергенту в середовищі інкубації (рис. 1, крива 1). Якщо вважати, що Ca^{2+} -незалежна Mg^{2+} -залежна АТР-аза тестує саме цитоплазматичний бік мембрани, то одержані нами дані можуть свідчити про те, що близько 26% мембранних фрагментів (за вмістом білка) є замкненими цитоплазматичним боком усередину (“правильно” замкненими везикулами – outside out vesicles”). Втім у широкому діапазоні концентрацій детергенту (0,001–0,1%) крива залежності ферментативної активності від концентрації дигітоніну куполоподібна: максимальне значення активності спостерігається за концентрації 0,005–0,01%. Дійсно, в разі використання в експериментах 0,05–0,1%-го дигітоніну відбувається гальмування “сукупної” Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТР-азної активності на 41% порівняно з її максимальним значенням.

Це можна пояснити тим, що детергент у порівняно великих концентраціях істотно порушує структурно-функціональні властивості цитоплазматичної мембрани, внаслідок чого може інгібуватися АТР-гідролазна ферментативна активність [14]. Що стосується концентраційної залежності впливу дигітоніну на азидчутливу та азидрезистентну компоненти “сукупної” Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТР-азної активності, то були одержані такі результати. В діапазоні концентрації дигітоніну 0,001–0,005% азидчутлива компонента ферментативної активності зростає на 29%, у той час як за підвищення його концентрації (до 0,1%) – гальмується майже на 52% стосовно максимального значення (рис. 1, крива 2). Крива залежності азидрезистентної компоненти ферментативної активності від концентрації дигітоніну має слабо виражений порівняно зі “сукупною” Ca^{2+} -незалежною Mg^{2+} -АТР-азною активністю куполоподібний вигляд: за концентрації детергенту 0,001–0,01% вона збільшується майже на 34% порівняно з контролем, а за подальшого зростання до 0,1% – зменшується практично до контрольного рівня (рис. 1, крива 3).

Таким чином, оптимальна концентрація дигітоніну для визначення “сукупної” Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТР-азної активності та її двох компонент – азидчутливої і азидрезистентної – становить близько 0,005–0,01%. Саме цей діапазон концентрацій детергенту слід вважати найоптимальнішим для практичного використання в експериментах з вивчення кінетичних та каталітичних властивостей ферментативних АТР-гідролазних реакцій, які ідентифіковані нами в цитоплазматичній мембрані *Bacillus sp. B4253*.

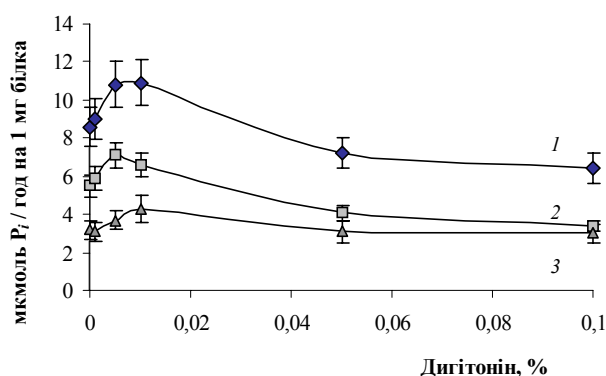


Рис. 1. Вплив дигітоніну на Ca^{2+} -незалежну Mg^{2+} -АТР-азну ферментативну активність у цитоплазматичній мембрані *Bacillus sp. B4253* ($n = 5$): 1 – “сукупна” Mg^{2+} -АТР-азна активність; 2 – NaN_3 -чутлива компонента Mg^{2+} -АТР-азної активності; 3 – NaN_3 -резистентна компонента Mg^{2+} -АТР-азної активності.

Вивчення деяких кінетичних та каталітичних властивостей резистентної до дії азиду натрію Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазної ферментативної активності в цитоплазматичній мембрані *Bacillus sp. B4253*.

На другому етапі наших досліджень ми вивчили деякі кінетичні та каталітичні властивості Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазної реакції, яку виявляли за присутності в середовищі цитоплазматичних мембран *Bacillus sp. B4253*, зокрема резистентної її компоненти до дії азиду натрію. В цих дослідах концентрація дигітоніну становила 0,01%. З огляду на специфіку дії NaN_3 , можна припустити, що азидрезистентна компонента АТР-гідролазної реакції пов'язана не зі спряженням реакції Ca^{2+} -незалежного Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТР із функціонуванням електрон-транспортного ланцюга, а з іншими механізмами.

Кінетика звільнення неорганічного фосфату P_i — продукту азидрезистентної ферментативної АТР-гідролазної реакції. Було виявлено, що кількість продукту P_i ферментативної реакції задовольняє кінетичним закономірностям хімічного процесу нульового порядку, принаймні протягом 15 хв: у цьому інтервалі часу графік залежності P_i від періоду інкубації є практично лінійним (рис. 2).

Таким чином, нами показана можливість надійного визначення початкової швидкості V_0 резистентної до дії азиду натрію Mg^{2+} -АТР-азної ферментативної реакції, середнє значення якої — 60 ± 3 нмоль P_i /хв на 1 мг білка ($n = 5$). У подальших експериментах тривалість інкубації мембран становила 5 хв, тобто було використано режим саме початкової швидкості ферментативної реакції.

Залежність початкової швидкості азидрези-

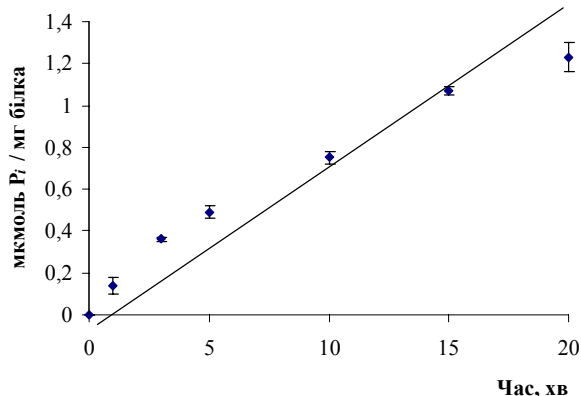


Рис. 2. Динаміка вивільнення неорганічного фосфату P_i у процесі Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТР-азної ферментативної реакції, резистентної до дії азиду натрію, у фракції цитоплазматичних мембран *Bacillus sp. B4253* ($n = 5$).

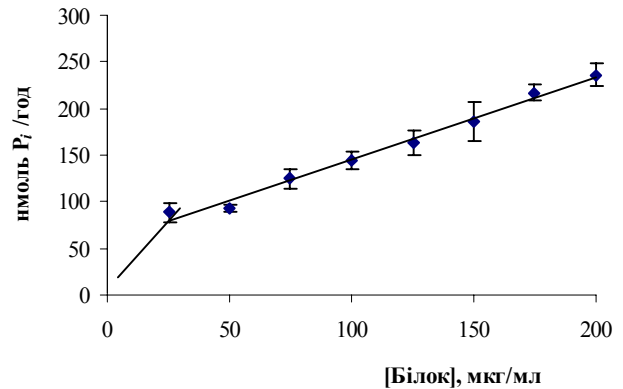


Рис. 3. Залежність початкової швидкості Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТР-азної азидрезистентної ферментативної реакції від вмісту білка у фракції цитоплазматичних мембран *Bacillus sp. B4253* ($n = 5$).

стентної ферментативної АТР-гідролазної реакції від вмісту білка у фракції плазматичних мембран. Одержані дані свідчать, що V_0 ферментативного гідролізу АТР лінійно залежить від вмісту (діапазон концентрації 25–200 мкг/мл) мембранного білка в середовищі інкубації (рис. 3). Отже, швидкість нечутливої до дії азиду натрію Mg^{2+} -АТР-азної ферментативної реакції практично прямо пропорційна концентрації білка в середовищі інкубації. В подальших дослідах вміст білка в ньому становив в середньому 75 мкг/мл.

pH-Залежність початкової азидрезистентної компоненти ферментативної АТР-гідролазної активності. Крива залежності початкової азидрезистентної компоненти ферментативної активності від рН середовища інкубації (використовували 20 мМ Нерес-трис) мала S-подібний вигляд (рис. 4). Якщо за рН 6,0–6,5 ферментативна активність була низькою (0,7–1,6 мкмоль P_i /год на 1 мг білка), то в діапазоні рН 6,5–7,5 спостерігається значне збільшення її (до $7,5 \pm \pm 0,3$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, рН 7,5). За подальшого зростання рН активність ферменту підвищується незначно з тенденцією виходу на плато при рН 7,5–8,0.

Залежність початкової азидрезистентної ферментативної АТР-гідролазної активності від еквіміліомольного співвідношення $[ATP]/[Mg^{2+}]$, $[Mg^{2+}]$ (за постійної $[ATP])$ та $[ATP]$ (за постійної $[Mg^{2+}])$. Згідно з результатами каталітичного титрування фракції цитоплазматичних мембран сукупно нуклеозидтрифосфатом АТР та іонами Mg в еквіміліомольних концентраціях ($[ATP]/[Mg^{2+}] = 0,1 / 0,1 - 5,0 / 5,0$), спостерігається складна S-подібна (двофазна) залежність величини початкової ферментативної активності азидрезистентної компоненти АТР-гідролазної актив-

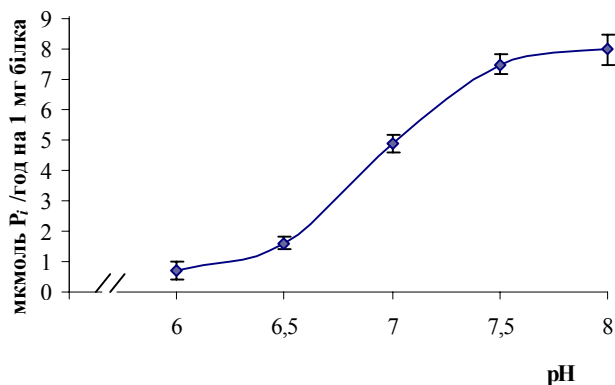


Рис. 4. рН-Залежність азидрезистентної компоненти Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТФ-азної ферментативної активності у фракції цитоплазматичних мембран *Bacillus sp. B4253* ($n = 6$).

ності від концентрації субстратів реакції гідролізу — АТФ та Mg^{2+} . При цьому було виявлено, що за підвищення $[\text{АТФ}]$ та $[\text{Mg}^{2+}]$ (в режимі сталого еквімолярного співвідношення концентрацій цих реагентів) від 0,1 до 2,0 мМ відбувається монотонне збільшення ферментативної активності з виходом на плато. За подальшого підвищення концентрації $[\text{АТФ}]$ та $[\text{Mg}^{2+}]$ до 5,0 мМ концентраційна залежність ферментативної активності виходить на друге плато (дані не наведено).

Важливі кінетичні параметри азидрезистентної компоненти Mg^{2+} -АТФ-азної ферментативної реакції — K_m , K_{Mg} , $V_{\text{АТФ}}$ та V_{Mg} —, які визначали методом каталітичного титрування і за зміни концентрації АТФ у межах 0,05–5 мМ (за 5 мМ MgCl_2) та іонів Mg від 0,1 до 5 мМ (за 5 мМ АТФ) наведено на рис. 5 та 6 відповідно.

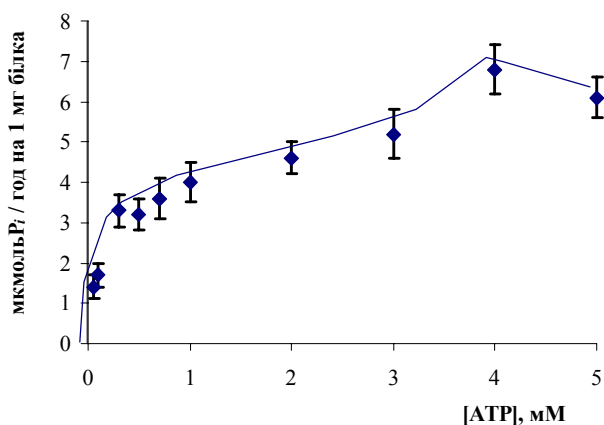


Рис. 5. Залежність азидрезистентної компоненти Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТФ-азної ферментативної активності у фракції цитоплазматичної мембрани *Bacillus sp. B4253* від концентрації АТФ (0,05–5 мМ) за постійної концентрації іонів Mg (5 мМ) ($n = 6$).

Одержані результати свідчать, що величини K_m і K_{Mg} ($0,6 \pm 0,1$ мМ та $2,3 \pm 0,4$ мМ відповідно) є фізіологічними концентраціями АТФ та іонів Mg в цитоплазмі (близько 0,5–5 мМ). Значення початкової максимальної швидкості, що були визначені за АТФ ($V_{\text{АТФ}}$) та Mg^{2+} (V_{Mg}), дорівнювали $7,1 \pm 0,7$ і $10,0 \pm 0,6$ мкмоль P_i / год на 1 мг білка відповідно. Загалом, згідно з нашою попередньою оцінкою, вищенаведені дані стосовно залежності азидрезистентної компоненти Mg^{2+} -АТФ-азної ферментативної активності від величини співвідношення $[\text{АТФ}]/[\text{Mg}^{2+}]$, а також концентрацій АТФ та Mg^{2+} свідчать про складність, з погляду кінетики, механізму резистентності до дії азиду натрію Mg^{2+} -АТФ-азної ферментативної реакції. Отже, не виключено, що в ній беруть участь не лише хелатний комплекс MgATP^{2-} , але й нуклеозидтрифосфат ATP^{4-} та іони Mg у вільному стані. Але це питання потребує подальшого з'ясування.

Вплив деяких інгібіторів на початкову азидрезистентну ферментативну АТФ-гідролазну активність. Дані щодо впливу деяких необоротних та оборотних інгібіторів Mg^{2+} -залежних АТФ-гідролазних систем мембранних структур еукаріотичних клітин на ферментативну АТФ-гідролазну активність у цитоплазматичній мембрані *Bacillus sp. B4253* наведено на рис. 7. З них впливає, що селективний інгібітор транспортної Na^+ , K^+ -АТФ-ази 1 мМ оубаїн [15] і високоселективний та високоафінний інгібітор Mg^{2+} , АТФ-залежної кальцієвої помпи ендо(сарко)плазматичного ретикулума 0,1 мкМ терпеновий лактон тапсигаргін [16] незначно гальмують ферментативну азидрезистентну компоненту АТФ-гідролазної

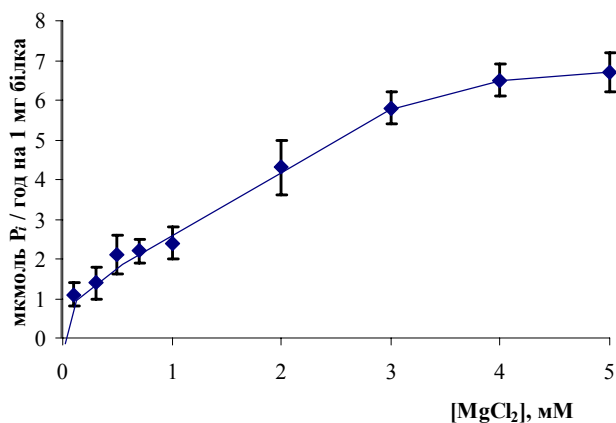


Рис. 6. Залежність азидрезистентної компоненти Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТФ-азної ферментативної активності у фракції цитоплазматичної мембрани *Bacillus sp. B4253* від концентрації іонів Mg (0,1–5 мМ) за постійної концентрації АТФ — 5 мМ ($n = 6$).

активності (на 13%). Оборотний неспецифічний інгібітор Mg^{2+} , АТР-залежних іон-транспортувальних систем (Na^+ , K^+ -АТР-ази; Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази; електрофоретичного кальцієвого уніпортера мітохондрій) еозин Y [16, 17] у концентрації 1 мМ пригнічує АТР-гідролазну реакцію на 83%, аналогічно до його впливу на Mg^{2+} -АТР-азу плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин міометрія [13]. Антагоніст Ca^{2+} лантан [18] лише на 17% інгібує ферментативний гідроліз АТР в концентрації 0,1 мМ, але за збільшення її до 1 мМ пригнічувальний ефект зростає – ферментативна реакція гальмується на 35%. Причина цього, можливо, полягає в тому, що іони La конкурують з іонами Mg в реакції гідролізу АТР за зв'язування з нуклеозидтрифосфатом АТР⁴⁻.

Таким чином, резистентна до дії азиду натрію компонента ферментативної Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТР-азної активності цитоплазматичної мембрани *Bacillus sp. B4253* майже нечутлива до дії таких специфічних інгібіторів транспортних АТР-аз, як оуабайн та тапсигаргін. Проте La^{3+} в концентрації 1 мМ інгібує АТР-гідролазну реакцію ефективніше. Неспецифічний інгібітор Mg^{2+} , АТР-залежних іон-транспортувальних систем еозин Y ще істотніше пригнічує перебіг цієї реакції.

Отже, нами були виявлені оптимальні умови для визначення Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазної ферментативної активності і її двох компонент – азидочутливої та азидрезистентної – у фракції цитоплазматичних мембран

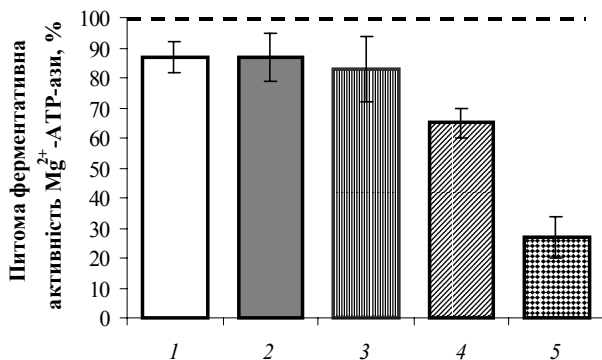


Рис. 7. Вплив оборотних і необоротних інгібіторів на азидрезистентну компоненту Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТР-азної ферментативної активності у фракції цитоплазматичних мембран *Bacillus sp. B4253*: 1 – оуабайн (1 мМ), 2 – тапсигаргін (0,1 мкМ), 3 – $LaCl_3$ (0,1 мМ), 4 – $LaCl_3$ (1 мМ), 5 – еозин Y (1 мМ). За 100% прийнято значення Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТР-азної ферментативної активності у разі відсутності інгібітора в середовищі інкубації ($n = 5$).

бактерій *Bacillus sp. B4253*, здатних акумулювати золото, охарактеризовано деякі кінетичні та каталітичні властивості азидрезистентної компоненти реакції ферментативного гідролізу АТР, не пов'язаної з функціонуванням електронного ланцюга. Ми вважаємо, що одержані нами експериментальні дані доцільно використовувати в подальших дослідженнях молекулярних і мембранних механізмів акумуляції золота у клітинах *Bacillus sp. B4253*.

Робота виконувалась в рамках та за фінансової підтримки комплексної програми фундаментальних досліджень “Наносистеми, наноматеріали та нанотехнології” за темою “колоїдно-хімічні властивості біологічних наносистем” (доповідь № 1/7).

IDENTIFICATION AND CATALYTIC PROPERTIES OF Mg^{2+} -DEPENDENT АТР-HYDROLASE OF PLASMIC MEMBRANE OF *Bacillus sp. B4253* CAPABLE TO GOLD ACCUMULATION

G. V. Danilovich, T. G. Gruzina,
Z. R. Ulberg, S. O. Kosterin

Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;
Institute of Biocolloidal Chemistry, Ukraine, Kyiv;
e-mail: tgruzina@mail.ru

S u m m a r y

Ca^{2+} -independent, Mg^{2+} -dependent АТР-hydrolase fermentative activity consisting of two components – azide-sensitive and azide-resistant ones has been identified in cytoplasmic membrane of *Bacillus sp. B4253* capable to gold accumulation in ionic and colloid forms. The authors have characterized properties of the azide-resistant component of АТР-hydrolase reaction:

- dynamics of accumulation of one of the reaction products – inorganic phosphate P_i ;
- dependence of АТР hydrolysis rate on the membrane protein content;
- pH-dependence;
- sensitivity of АТР-hydrolase activity to the change of reagents (АТР, Mg^{2+}) concentration, as well as to the effect of some specific and nonspecific inhibitors of ion-transporting Mg^{2+} -dependent АТР-hydrolase systems (ouabain, tapsigargin, eosine Y, La ions). It is supposed that the obtained experimental data can be used for the following study of molecular and membrane mechanisms of gold accumulation in *Bacillus sp. B4253*.

К e y w o r d s: gold accumulation, *Bacillus*

sp. B4253, cytoplasmic membrane, Ca²⁺-independent, Mg²⁺-ATPase, digitonin, sodium azide, eosine Y.

1. Higham D. P., Sadler P. J., Scawen M. D. // J. Inorg. Biochem. 1988. **26**, N 2. P. 253–261.
2. Маракушев С. А., Болезина Т. Н., Ковалевская А. Н. // Докл. АН СССР. 1988. **330**, № 5. С. 1211–1214.
3. Овчаренко Ф. Д., Ульберг З. Р., Гарбара С. В. // Там же. 1985. **284**, № 3. С. 711–713.
4. Volesky B. Biosorption of heavy metals / Ed. B. Volesky. CRC Press, Boca Raton. 1990. 396 p.
5. Gadd G. M., Rehm H. J. // Biotechnology. 1988. **6**. VCH. Weinheim. P. 401–415.
6. Garnham G. W., Codd G. A., Gadd G. M. // App. Microbiol. Biotechnol. 1992. **37**, N 2. P. 270–284.
7. Карамушка В. И., Ульберг З. Р., Грузина Т. Г. // Укр. биохим. журн. 1990. **62**, № 1. С. 76–82.
8. Карамушка В. И., Ульберг З. Р., Грузина Т. Г. // Прикл. биохим. и микробиология. 1991. **27**, № 1. С. 119–126.
9. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. **72**. P. 248–282
10. Rathbun W., Betluch V. // Ibid. 1969. **28**. P. 436–445.
11. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Наука. 1990. 348 с.
12. Болдырев А. А. и др. Биологические мембраны. М.: Мир. 1992. 140 с.
13. Данилович Г. В., Костерин С. О. // Укр. біохім. журн. 2001. **73**, № 6. С. 30–40.
14. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах. К.: Наук. думка. 1990. 216 с.
15. Scheiner-Bobis Georgios // Eur. J. Biochem. 2002. **269**. P. 2424–2433.
16. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Бабич Л. Г. и др. // Укр. биохим. журн. 1996. **68**, № 6. С. 50–61.
17. Skou J. C., Esmann M. // Biochim. Biophys. Acta. 1981. **647**, № 2, P. 232–240.
18. Левицкий Д. О. Кальций и биологические мембраны. М.: Высш. школа. 1990. 124 с.

Отримано 09.04.2004