

ВПЛИВ ІОННОГО ТА КОЛОЇДНОГО ЗОЛОТА НА АТР-ГІДРОЛАЗНІ ФЕРМЕНТНІ СИСТЕМИ В МЕМБРАНІ МІКРООРГАНІЗМІВ *Bacillus sp. B4253* ТА *Bacillus sp. B4851*

Г. В. ДАНИЛОВИЧ¹, Т. Г. ГРУЗІНА², 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 НАН України, Київ;
e-mail: tgruzina@mail.ru

Акумуляція золота у клітинах *Bacillus sp. B4253* безпосередньо або опосередковано може бути пов'язана з активністю базальної Mg^{2+} -АТР-ази плазматичної мембрани бактерій. Тому нами проведено порівняльний аналіз кінетичних властивостей базальної азидрезистентної Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазної активності у плазматичних мембранах *Bacillus sp. B4253* (акумулюють золото) та *Bacillus sp. B4851* (не здатних його накопичувати). Показано, що за низкою кінетичних параметрів – ферментативною активністю, початковою швидкістю реакції гідролізу АТР (V_0), константою Міхаеліса (K_m), максимальною початковою швидкістю за Mg^{2+} (V_{Mg}) та АТР (V_{ATP}), оптимальною концентрацією АТР ($[ATP]_{opt}$), pH_{max} , чутливістю до дії тапсигаргіну і еозину Y – базальна Mg^{2+} -АТР-азна активність мембран у обох штамів бактерій загалом ідентична. Але за деякими показниками штами відрізняються: Mg^{2+} -АТР-азна активність мембран бактерій, які не акумулюють золото, характеризується втричі більшою спорідненістю до іонів Mg та меншим значенням $[Mg]_{opt}$.

Показано інгібувальний ефект іонного золота (10^{-4} – $3 \cdot 10^{-4}$ M) на азидчутливу (H^+ -АТР-азу) і азидрезистентну (Mg^{2+} -АТР-азу) складові Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазної активності у плазматичних мембранах досліджуваних штамів *Bacillus*. Колоїдне золото у концентрації 0,0002–4 мкг/мл стимулює (в 1,5–2,0 рази) активність H^+ -АТР-ази та Mg^{2+} -АТР-ази в мембранах бактерій, що акумулюють золото, і не впливає на цей фермент у бактерій, які не здатні до його накопичення.

Ключові слова: іонне та колоїдне золото, H^+ -АТР-аза, Mg^{2+} -АТР-аза, *Bacillus sp. B4253*, *B. sp. B4851*.

Проведені раніше дослідження показують, що клітини багатьох видів бактерій здатні з різною вибірковістю локалізувати та утримувати на своїй поверхні частки різної мінеральної природи, в т.ч. золота в колоїдній формі [1,2]. Виявлено також часткове проникнення металу всередину клітини, що, можливо, є наслідком розчинення його на клітинній поверхні. Останнє підтверджується даними електронної мікроскопії [3]. Однак, незважаючи на актуальність, механізм транспортування та процеси перекристалізації золота всередині клітини на сьогодні не вивчено.

У зв'язку з цим важливим є дослідження впливу золота (в іонній та колоїдній формах) на АТР-азну активність плазматичних мембран (ПМ) бактерій, які здатні до його акумуляції. Відомо, що аеробним бактеріям притаманне перенесення електронів від NAD-залежних субстратів на кисень і спряжене з цим процесом фосфорилування цитозольного ADP

з утворенням АТР. Дегідрогенази містяться в цитозолі бактеріальної клітини, а переносники електронів дихального ланцюга – в ПМ (подібно до мітохондрій еукаріотичної клітини), де локалізована H^+ -АТР-аза, яка регулює синтез/гідроліз АТР унаслідок зміни електрохімічного потенціалу на мембрані (під час перенесення електронів бактеріальні клітини, як і мітохондрії, відкачують протони із клітини) [4–7]. АТР-аза є одним із ключових ферментів енергетичного метаболізму клітини, завдяки якому формується різниця електрохімічного потенціалу на мембрані (ланцюг передачі електронів у бактерій відіграє другорядну роль) [8]. H^+ -АТР-аза бактеріальної мембрани подібна до мітохондріальної і належить до АТР-аз F_0F_1 -типу [9]. Відомо, що до специфічних інгібіторів цих ферментів належить олігоміцин та дициклогексилкарбодіімід (ДЦКД), який інгібує фосфорилування [10]. У дослідженнях останніх років показано, що азид натрію не тільки ефективно інгібує

електрон-транспортний ланцюг у мітохондріях [11–12], але й безпосередньо пригнічує активність H^+ -АТР-ази. Під час гідролізу АТР неорганічний фосфат P_i першим вивільнюється з активного центру ферменту, а АDP у процесі Mg^{2+} -залежної реакції дисоціює від каталітичного центру АТР-ази. Комплекс фермент–АDP у присутності іонів Mg повільно ізомеризується у неактивну форму АТР-ази, яка стабілізується азидом натрію. Останній в концентрації до 1 мМ інгібує гідроліз АТР, але не синтез [12–14]. Азид натрію використовують також як специфічний інгібітор H^+ -АТР-ази в дослідженнях активності ферменту в мембрані бактерій [4,15].

У попередніх дослідженнях нами було показано, що в загальній Mg^{2+} -АТР-азній активності ПМ штаму *Bacillus sp. B4253*, які здатні до накопичення золота, розрізняють дві компоненти: таку, що гальмується 1 мМ азидом натрію (азидчутливу) та резистентну до нього (азидрезистентну) [16]. З огляду на вищезазначене, нами було припущено, що азидчутлива компонента АТР-гідролазної активності пов'язана із функціонуванням електрон-транспортного ланцюга в бактеріальній мембрані і є АТР-азою F_0F_1 -типу, подібною до мітохондріальної H^+ -АТР-ази [4–10, 12–15]. Азидрезистентній компоненті АТР-гідролазної активності притаманна базальна Mg^{2+} -АТР-азна активність, функцію, якої у клітинах прокариотів не досліджено.

Процес накопичення золота мікроорганізмами супроводжується закисленням зовнішньоклітинного середовища (тобто трансмембранним перенесенням протонів) і генерацією різниці потенціалів на мембрані [17–19]. Якщо основною функцією H^+ -АТР-ази бактерій є синтез/гідроліз АТР та формування різниці електрохімічних потенціалів на мембрані, то, ймовірно, що енергозалежна акумуляція золота у клітинах штаму *Bacillus sp. B4253*, може бути пов'язана із функціонуванням базальної Mg^{2+} -залежної АТР-гідролази.

Метою роботи було дослідити вплив іонного ($HAuCl_4$) та колоїдного золота на азидчутливу і азидрезистентну компоненти АТР-азної активності (H^+ -АТР-ази і Mg^{2+} -АТР-ази відповідно) мембран *Bacillus sp.* штамів *B4253* (здатного до накопичення золота у клітинах) і штаму *B4851* (не здатного до його акумуляції).

Матеріали і методи

У роботі використано клітини 18-годинної культури (стаціонарна фаза росту) *Bacillus sp.*

B4253 та *Bacillus sp. B4851* із колекції Інституту біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України. Клітини вирощували в колбах на качалках в аеробних умовах при 30 °С на збагаченому середовищі такого складу (г/л): триптон – 10, дріжджовий екстракт – 5, NaCl – 5, глюкоза – 1, $CaCl_2 \cdot H_2O$ – 0,345, цистеїн – 0,03 (рН 7,0).

Фракцію ПМ клітин бактерій одержували стандартними методами препаративної біохімії як описано раніше [18]. Вміст білка тестували методом М. М. Bradford [20]. Рівень його у мембранній фракції бактерій становив 3,5–4,0 мг/мл.

Визначення загальної Mg^{2+} -залежної АТР-азної активності проводили у стандартному середовищі інкубації (об'єм – 0,4 мл) такого складу (у мМ): 5 АТР, 5 $MgCl_2$, 50 NaCl, 100 KCl, 1 ЕГТА, 20 Hepes-Tris (рН 7,4) та 0,01% дигітоніну. Кількість білка мембранної фракції у пробі (в середньому) становила 25 мкг, тривалість інкубації – 5 хв, температура – 37 °С. Контролем (на неферментативний гідроліз АТР та вміст ендogenous фосфору) слугували проби, що за своїм складом відповідали стандартному середовищу інкубації, але містили мембранний препарат, АТР-гідролазну активність якого попередньо інактивували “стоп-розчином” [21]. АТР-гідролазну реакцію ініціювали внесенням до середовища інкубації аліквоти (30 мкл) суспензії мембранного препарату, ферментативний процес гальмували додаванням до розчину 1 мл охолодженого до 8 °С “стоп-розчину”. Mg^{2+} -залежну АТР-азну активність обчислювали як різницю між загальною АТР-азною активністю та контрольним показником. Вміст неорганічного фосфору P_i визначали методом W. Rathbun та V. Betluch [21].

Азидрезистентну складову Mg^{2+} -залежної АТР-азної активності тестували за умов проведення ферментативного гідролізу АТР у стандартному середовищі інкубації та у присутності 1 мМ NaN_3 . Азидчутливу складову Mg^{2+} -залежної АТР-азної активності обчислювали як різницю між загальною та азидрезистентною Mg^{2+} -АТР-азною активністю. У досліджах використовували іонне золото у формі розчину золотохлористоводневої кислоти $HAuCl_4$ та колоїдне золото, яке одержували методом Зигмонді [22]. $HAuCl_4$ (кінцеві концентрації 10^{-9} – $3 \cdot 10^{-4}$ М) та колоїдне золото (кінцеві концентрації 0,0002–4 мкг/мл) вносили безпосередньо до середовища інкубації.

Всі експерименти, в яких вивчали властивості базальної Mg^{2+} -АТР-азної ферментатив-

ної реакції у ПМ бактерій штаму *Bacillus sp. B4851*, індиферентних до накопичення золота, здійснювали в режимі визначення початкової швидкості V_0 . Величини константи Міхаеліса за АТР (K_m) та константи активації за іонами Mg (K_{Mg}), а також значення максимальної швидкості за АТР (V_{ATP}) та Mg^{2+} (V_{Mg}) обчислювали методом Хейнса [23]. Дані лінеаризованих графіків обчислювали за допомогою метода найменших квадратів (значення коефіцієнта кореляції r становило 0,90–0,98). Одержані дані обробляли загальновідомими стандартними методами статистичного аналізу. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали в режимі програмного забезпечення на персональному комп'ютері IBM PC.

У роботі застосовували такі реактиви: АТР, Нерес, убаїн, тапсигаргін, еозин Y («Sigma», США), трис-гідроксиметиламінометан («Reanal», Угорщина), дигітонін («Merk», Німеччина), ЕГТА («Fluka», Швейцарія). Інші реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Результати та обговорення

Згідно з даними літератури, концентрування золота в бактеріальних клітинах штаму *Bacillus sp. B4253* може бути безпосередньо або опосередковано пов'язаним із активністю базальної Mg^{2+} -АТР-ази [18–19]. У попередніх експериментах нами було досліджено основні кінетичні та каталітичні властивості вищезазначеного ферменту ПМ *Bacillus sp. B4253* [16]. У зв'язку з цим виникає питання: чи притаманна така активність ПМ бактерій, які не акумулюють золото, і якщо так, то за якими ознаками вони подібні? Отже, для подальшого розвитку раніше одержаних результатів нами було досліджено Mg^{2+} -залежну АТР-гідролазну активність у мембрані бактерій *Bacillus sp. B4851*, які не здатні до накопичення золота, та проведено порівняльний аналіз з властивостями Mg^{2+} -АТР-ази ПМ *Bacillus sp. B4253*, здатних до акумуляції золота.

В експериментах було показано, що загальна Mg^{2+} -АТР-азна активність у мембрані *Bacillus sp. B4851* інгібується 1 мМ азидом натрію в середньому на 50%. Використання специфічного інгібітору H^+ -АТР-ази ДЦКД у концентрації 1 мМ дає майже такий самий інгібувальний ефект – близько 50 % (графічні дані не наведено). Таким чином, загальна Mg^{2+} -АТР-азна активність ПМ *Bacillus sp. B4851*, не здатних до акумуляції золота, двокомпонентна: азидчутлива, яка гальмується 1 мМ азидом натрію і є H^+ -АТР-азою F_0F_1 -типу, та азидре-

зистентна до дії 1 мМ азиду натрію, тобто є базальною Mg^{2+} -АТР-азою.

Дані стосовно впливу NaN_3 в різних концентраціях (0,05–10 мМ) на Mg^{2+} -АТР-азну активність свідчать, що максимальний ефект інгібування спостерігається при концентрації 0,7–1,0 мМ. Подальше збільшення концентрації інгібітору до 10 мМ не спричинює подальшого гальмування активності ферменту. Значення активності базальної Mg^{2+} -АТР-ази у ПМ штаму *Bacillus sp. B4851* становить $4,6 \pm 0,4$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка ($n = 5$).

На другому етапі експерименту досліджували основні кінетичні характеристики базальної Mg^{2+} -АТР-ази та проводили порівняльний аналіз її гідролазної активності у ПМ *Bacillus sp.* штамів *B4851* та *B4253*. Результати, одержані нами раніше, наведено в таблиці [16]).

Отже, базальна Mg^{2+} -АТР-азна активність тестується як у мембрані *Bacillus sp. B4253* так і *Bacillus sp. B4851*, які відповідно здатні і нездатні до накопичення золота. Проведені дослідження показують, що за кінетичними параметрами (значенням ферментативної активності, V_0 , K_m , V_{Mg} , V_{ATP} , $[ATP]_{opt}$, pH_{max} , чутливістю до тапсигаргіну та еозину Y) базальна Mg^{2+} -АТР-азна активність мембран обох штамів бактерій подібна. Втім, за деякими параметрами вони відрізняються: Mg^{2+} -АТР-азній активності мембран бактерій, що не накопичують золото, притаманна втричі більша спорідненість до іонів Mg, менша $[Mg]_{opt}$ і чутливість до дії іонів La.

Порівняння дії $HAuCl_4$ та колоїдного золота на АТР-азну активність мембран *Bacillus sp.* штамів *B4253* та *B4851*

1. Вплив на бактерії іонного золота. Показано, що $HAuCl_4$ (концентрація 10^{-9} – 10^{-6} М) практично не діє на активність H^+ -АТР-ази штаму *B4253*, а в більших концентраціях (10^{-5} – $3 \cdot 10^{-4}$ М) вірогідно дозозалежно інгібує активність ферменту: до 75% при концентрації $3 \cdot 10^{-4}$ М (рис. 1).

Вплив $HAuCl_4$ на H^+ -АТР-азну мембранну активність *Bacillus sp. B4851* в концентраціях 10^{-9} – 10^{-5} М практично не спостерігається. Вірогідний інгібувальний ефект виявлено при 10^{-4} та $3 \cdot 10^{-4}$ М іонного золота: ферментативна активність в середньому знижується на 45 та на 82% відповідно.

За низьких концентрацій $HAuCl_4$ (10^{-9} – 10^{-5} М) практично не впливає на базальну Mg^{2+} -АТР-азну активність мембран *Bacillus sp. B4253*, а в концентраціях 10^{-4} – $3 \cdot 10^{-4}$ М вірогідно інгібує базальну активність ферменту: максимально на 65% (концентрація $3 \cdot 10^{-4}$ М).

Порівняння характеристик азидрезистентної компоненти Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР (базальної Mg^{2+} -АТР-ази) в мембрані клітин бактерій *Bacillus sp.*, здатних та не здатних до накопичення золота ($M \pm m$, $n = 5-6$)

Параметри	<i>Bacillus sp. B4253</i> (здатні до накопичення золота)	<i>Bacillus sp. B4851</i> (не здатні до накопичення золота)
Активність ферменту за стандартних умов, мкмоль P_i /год на 1 мг білка	$4,7 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,4$
Початкова швидкість (V_0), нмоль P_i /хв на 1 мг білка	60 ± 3	70 ± 5
Константа активації за Mg^{2+} (K_{Mg}), мМ	$2,3 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,3$
Максимальна початкова швидкість за Mg^{2+} (V_{Mg}), мкмоль P_i /год на 1 мг білка	$10,0 \pm 0,6$	$7,6 \pm 1,2$
Константа Міхаеліса (K_m), мМ	$0,62 \pm 0,09$	$0,68 \pm 0,06$
Максимальна початкова швидкість за АТР ($V_{АТР}$), мкмоль P_i /год на 1 мг білка	$7,1 \pm 0,7$	$8,4 \pm 1,6$
Значення оптимальної концентрації Mg^{2+} у присутності 5 мМ АТР ($[Mg]_{opt}$), мМ	4–5	2–4
Значення оптимальної концентрації АТР у присутності 5 мМ Mg^{2+} ($[АТР]_{opt}$), мМ	4–5	4–5
Залежність активності ферменту від рН у діапазоні 6,0–8,0, рН _{max}	Сигмоїдальна 7,5–8,0	Сигмоїдальна 7,5–8,0
Інгібітори, % інгібування:		
0,1 мМ La^{3+}	17	34
1 мМ убаїн	13	не впливає
0,1 мкМ тапсигаргін	13	10
1 мМ еозин Y	73	76

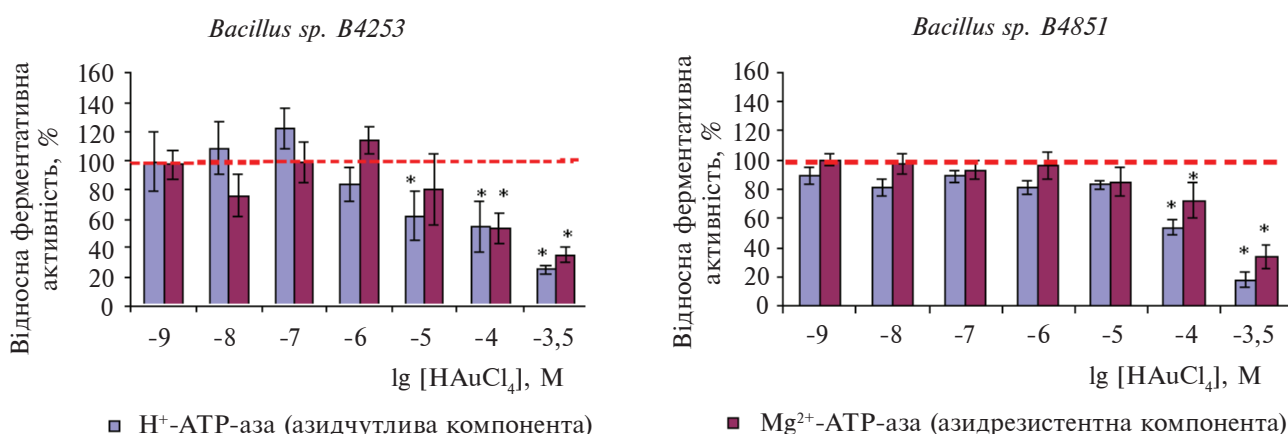


Рис. 1. Вплив $HAuCl_4$ на дві складові АТР-гідролазної активності у плазматичній мембрані обох штампів бактерій. За 100% прийнято значення ферментативної активності за відсутності в середовищі $HAuCl_4$ (контроль). * Дані порівняно з контролем вірогідні, $P < 0,05$ ($M \pm m$, $n = 6$).

На базальну мембранну Mg^{2+} -АТР-азну активність *Bacillus sp. B4851* $HAuCl_4$ у концентраціях 10^{-9} – 10^{-5} М не впливає. Вірогідний

інгібувальний ефект спостерігається при 10^{-4} – $3 \cdot 10^{-4}$ М $HAuCl_4$ з максимумом інгібування (на 66%) при концентрації $3 \cdot 10^{-4}$ М.

Раніше нами було показано, що HAuCl_4 (10^{-5} – $5 \cdot 10^{-4}$ М) істотно пригнічує ростові процеси у клітинах штаму *B. cereus* B4368, які сорбують золото на клітинній поверхні [24]. У свою чергу, у клітинах штаму *Alcaligenes eutrophus* CH34, не здатних до накопичення золота, ростові процеси у присутності $5 \cdot 10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-5}$ М HAuCl_4 практично не відбуваються. Було також встановлено, що АТР-азна активність у присутності 10^{-6} – 10^{-4} М HAuCl_4 пригнічується на 30% у клітин штаму *B. cereus* B4368 і повністю інгібується у *A. eutrophus* CH34.

Отже, одержані нами результати щодо впливу HAuCl_4 на ферментативні системи у бактеріальній ПМ практично збігаються з такими, які одержано на клітинному рівні.

2. Вплив на бактерії колоїдного золота. Одержані нами дані свідчать, що колоїдне золото діє на активність як H^+ -АТР-ази, так і Mg^{2+} -АТР-ази мембран *Bacillus sp.* штаму B4253. Установлено вірогідну стимуляцію (до двох разів) H^+ -АТР-азної активності в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій колоїдного золота (0,0002–4 мкг/мл), у той час як активність Mg^{2+} -АТР-ази за низьких концентрацій (0,0002–0,02 мкг/мл) не змінюється. Базальна АТР-гідролазна активність при концентраціях золота 0,2–2,0 мкг/мл підвищується в 1,5 раза, а при 4,0 мкг/мл – удвічі (рис. 2). При цьому встановлено, що колоїдне золото не впливає на обидві складові АТР-гідролазної активності в мембранах *Bacillus sp.* B4851 (рис. 2).

У роботі [25] показано, що колоїдне золото в концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ мкг/мл стимулює ріст бактерій *Esherichia coli* 1257, але за вищих концентрацій (до 10^{-3} мкг/мл) ріст клітин значно

пригнічується. Також для цього штаму бактерій виявлено, що колоїдне золото (10^{-7} – 10^{-5} мкг/мл) стимулює АТР-азну активність та вихід протонів із бактеріальних клітин. Збільшення концентрації його ($5 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-1}$ мкг/мл) інгібує вищезазначені процеси. Автори припускають, що характер взаємодії колоїдної частки та іона золота з бактеріальною клітиною неоднаковий. Можливо, іонне золото після зв'язування з мембраною безпосередньо включається до ферментативних процесів, що відбуваються на її поверхні, в той час як колоїдні частки, ймовірно, залишаються інертними і частково депонують іонну форму металу, яка поступово вивільнюється внаслідок хімічних перетворень на поверхні частки.

Виявлена стимуляція колоїдним золотом активності азидчутливої H^+ -АТР-ази може бути цікавою з погляду тлумачення механізму акумуляції золота в бактеріях: йдеться про можливу індукцію ним збільшення величини негативного електричного потенціалу внаслідок виходу протонів H^+ і активації ферменту. Однак феномен активації колоїдним золотом базальної Mg^{2+} -АТР-ази залишається нез'ясованим.

Отже, проведені дослідження свідчать про наступне. Загальна Mg^{2+} -АТР-азна активність ПМ *Bacillus sp.* B4851, що не здатні акумулювати золото, як і активність ПМ *Bacillus sp.* B4253, здатних до цього процесу [16], містить два компоненти: азидчутливий, який гальмується азидом натрію і є H^+ -АТР-азою F_0F_1 -типу, та азидрезистентний до азиду натрію – базальну Mg^{2+} -АТР-азу. Проведений

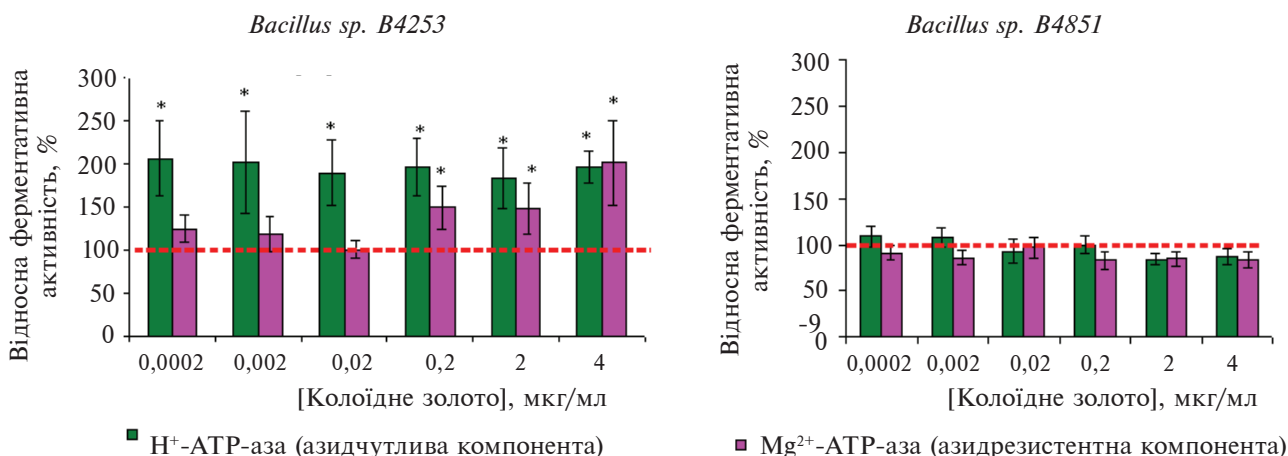


Рис. 2. Вплив колоїдного золота на дві складові АТР-гідролазної активності у плазматичній мембрані бактерій, здатних та не здатних до накопичення золота. За 100 % прийнято значення ферментативної активності за відсутності золота (контроль). * Дані порівняно з контролем вірогідні, $P < 0,05$ ($M \pm m$, $n = 6$).

порівняльний аналіз кінетичних властивостей базальної Mg^{2+} -АТР-ази мембрани *Bacillus sp. B4851*, які не накопичують золото, з Mg^{2+} -АТР-азною активністю в мембрані *Bacillus sp. B4253*, які акумулюють його, свідчить, що за більшістю кінетичних параметрів вони подібні (за значенням ферментативної активності V_0 , K_m , V_{Mg} , V_{ATP} , $[ATP]_{opt}$, pH_{max} , чутливістю до дії тапсигаргіну та еозину Y). Але Mg^{2+} -АТР-азна активність мембран бактерій, які не акумулюють золото, має більшу спорідненість до іонів Mg та менше значення $[Mg]_{opt}$.

Установлено, що іонне золото (концентрації 10^{-4} – $3 \cdot 10^{-4}$ М) ефективно інгібує мембранну H^+ -АТР-азу та Mg^{2+} -АТР-азу *Bacillus sp.* штамів *B4253* і *B4851*. Колоїдне золото, навпаки, стимулює активність H^+ -АТР-ази та Mg^{2+} -АТР-ази в 1,5–2,0 рази в мембрані *Bacillus sp. B4253*, які здатні до накопичення золота, та практично не впливає на зазначену АТР-гідролазну активність у мембрані *Bacillus sp. B4851*, що не акумулюють його. Одержані в роботі результати практично збігаються з даними літератури щодо впливу іонного та колоїдного золота на бактеріальні клітини.

Вищенаведені результати, зокрема стосовно стимуляції колоїдним золотом мембранної азидчутливої H^+ -АТР-ази в *Bacillus sp.* штаму *B4253*, які акумулюють золото, можуть мати важливе значення для подальшого розвитку уявлень щодо механізмів його транспортування у клітини мікроорганізмів та ролі АТР-гідролазних систем плазматичної мембрани в цих процесах.

Роботу виконано в рамках та за фінансової підтримки комплексної програми фундаментальних досліджень “Наносистеми, наноматеріали та нанотехнології” за темою “Колоїдно-хімічні властивості біологічних наносистем” (договір № 1/7).

ВЛИЯНИЕ ИОННОГО И КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА НА АТР-ГИДРОЛАЗНЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ МЕМБРАН МИКРООРГАНИЗМОВ *Bacillus sp. B4253* И *Bacillus sp. B4851*

А. В. Данилович¹, Т. Г. Грузина²,
З. Р. Ульберг², С. А. Костерин¹

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;
²Институт биокolloидной химии
им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев;
e-mail: tguzina@mail.ru

Предполагается, что аккумуляция золота в клетках *Bacillus sp. B4253* прямо или косвенно может быть связана с активностью базальной Mg^{2+} -АТР-ази плазматической мембраны бактерий. В данной работе проведен сравнительный анализ кинетических свойств базальной азидрезистентной Mg^{2+} -зависимой АТР-гідролазної активності во фракції плазматических мембран *Bacillus sp.* штаммов *B4253* и *B4851*, аккумулярующих золото и не способных к этому процессу соответственно. Показано, что по ряду кинетических параметров — удельной ферментативной активности, начальной скорости реакции гидролиза АТР (V_0), константы Михаэлиса (K_m), максимальной начальной скорости по Mg^{2+} (V_{Mg}) и АТР (V_{ATP}), оптимальной концентрации АТР ($[ATP]_{opt}$), pH_{max} , чувствительностью к действию тапсигаргина и еозина Y — базальная Mg^{2+} -АТР-азная активность мембран бактерий, аккумулярующих золото, и бактерий, не способных к этому процессу, сходны. Однако по некоторым параметрам они отличаются: Mg^{2+} -АТР-азная активность мембран бактерий, не аккумулярующих золото, имеет втрое большее сродство к ионам Mg и меньшее значение $[Mg]_{opt}$.

Показан інгибуруючий ефект іонного золота (10^{-4} – $3 \cdot 10^{-4}$ М) на азидчутливу (H^+ -АТФ-аза) і азидрезистентну (Mg^{2+} -АТФ-аза) компоненти Mg^{2+} -зависимой АТФ-гідролазної активності в плазматических мембранах *Bacillus*, акумулюючих і неакумулюючих золото. Коллоїдне золото в концентрації 0,0002–4 мкг/мл стимулює активність H^+ -АТФ-ази і Mg^{2+} -АТФ-ази в мембрані бактерій, акумулюючих золото, в 1,5–2,0 рази і не впливає на активність АТФ-аз мембрани бактерій, не здатних к його акумуляції.

Ключевые слова: іонне і коллоїдне золото, H^+ -АТФ-аза, Mg^{2+} -АТФ-аза, *Bacillus sp. B4253*, *Bacillus sp. B4851*.

EFFECT OF IONIC AND COLLOID GOLD ON ATP-HYDROLASE FERMENTATIVE SYSTEMS IN MEMBRANE OF *Bacillus sp. B4253* AND *Bacillus sp. B4851*

G. V. Danylovysh¹, T. G. Gruzina²,
Z. R. Ulberg², S. O. Kosterin¹

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

²Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: tgruzina@mail.ru

S u m m a r y

Accumulation of gold in cells of *Bacillus sp. B4253* can be directly or indirectly connected with activity of bacteria plasma membrane basal Mg^{2+} -ATPase. Therefore this work deals with a comparative analysis of kinetic properties of plasma membrane basal azide-resistant Mg^{2+} -dependent ATP-hydrolase activity of *B. sp. B4253* and *B. sp. B4851* capable to gold accumulation and not capable to this process, accordingly. It is shown, that by a number of kinetic parameters – specific fermentative activity, initial speed of reaction of hydrolysis ATP (V_0), Michaelis constant (K_m), the maximal initial speed by Mg^{2+} (V_{Mg}) and by ATP (V_{ATP}), optimum concentration of ATP ($[ATP]_{opt}$), pH_{max} , sensitivity to action of the thapsigargin and eosine Y – bacteria membranes basal Mg^{2+} -ATPase activity accumulating gold, and the bacteria not capable to this process, are identical. But by some parameters they differ: Mg^{2+} -ATPase activity of membranes of the bacteria which do not accumulate gold, has three times greater affinity for Mg ions and smaller value $[Mg]_{opt}$.

The inhibition effect of ionic gold (10^{-4} – $3 \cdot 10^{-4}$ M) is shown on azide-sensitive (H^+ -ATPase) and azide-resistant (Mg^{2+} -ATPase) components Mg^{2+} -dependent ATP-hydrolase activity in fraction of plasma membranes of microorganisms *Bacillus* accumulating gold, and not capable to this process. Colloid gold (0.0002–4 μ g/ml) stimulates activity of H^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase in a membrane of the bacteria accumulating gold 1.5–2 times, and does not influence activity of ATPases of a membrane of the bacteria which do not accumulate gold.

Key words: ionic and colloid gold, H^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase, *Bacillus sp. B4253*, *B. sp. B4851*.

1. Овчаренко Ф. Д., Ульберг З. Р., Грузина Т. Г. // Усп. соврем. биол. – 1991. – 111. – С. 276–284.
2. Эстрела-Льопис В., Овчаренко Ф. Д., Юркова И. Н. // Физ.-хим. механика и модельн. дисп. систем. – 1991. – 22. – С. 1–14.
3. Ульберг З. Р., Гарбара С. В., Марочко Л. Г. // Коллоид. журн. – 1988. – 50. – С. 1026–1031.
4. Hirata H., Ohno K., Kagawa Y., Hamamoto T. // J. Biol. Chem. – 1986. – 261, N 21. – P. 9839–9843.
5. Eschemann A., Galkin A., Oettmeier W. et al. // Ibid. – 2005. – 280, N 5. – P. 3138–3142.
6. Zhang J., Hellwig P., Osborn J. P., Gennis R. B. // Ibid. – 2004. – 279, N 52. – P. 53980–53987.
7. Schau M., Chen Y., Hulett M. // J. Bacteriology. – 2004. – 186, N 14. – P. 4585–4595.
8. Serrano R. // Biochim. Biophys. Acta. – 1988. – 947, N 1. – P. 1–28.
9. Kotyk A. // Cell Mol. Biol. Lett. – 1997. – 2, N 1. – P. 131–144.
10. Кравцов А. В., Алексеенко И. П. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран. – К.: Наук. думка, 1990. – 175 с.
11. Hansen F. B., Nicholls P. // Biochim. Biophys. Acta. – 1978. – 502, N 1. – P. 400–408.
12. Bald D., Amano T., Maneyuki E. et al. // J. Biol. Chem. – 1998. – 273, N 2. – P. 865–870.
13. Сыроешкин А. В., Галкин М. А., Седлов А. В., Виноградов А. Д. // Биохимия. – 1999. – 64, № 10. – С. 1337–1347.
14. Bulygin V. V., Syroeshkin A. V., Vinogradov A. D. // FEBS Lett. – 1993. – 328, N 1,2. – P. 193–196.
15. Beil W., Birkholz C., Wagner S., Sewing K. F. // Pharmacology. – 1995. – 50, N 5. – P. 333–337.

16. Данилович Г. В., Грузина Т. Г., Ульберг З. Р., Костерін С. О. // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 5. – С. 45–51.
17. Грузина Т. Г., Чеховская Т. П., Велебер В. В., Ульберг З. Р. // Там же. – 2003. – **75**, № 3. – С. 67–70.
18. Карамушка В. И., Ульберг З. Р., Грузина Т. Г. // Там же. – 1990. – **62**, № 1. – С. 76–82.
19. Карамушка В. И., Ульберг З. Р., Грузина Т. Г. // Прикл. биохим. и микробиология. – 1991. – **27**, № 1. – С. 119–126.
20. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – Р. 248–282.
21. Rathbun W., Vetluch V. // Anal. Biochem. – 1969. – **28**. – Р. 436–445.
22. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / Под ред. А. В. Перцова. – М.: МГУ, 1976. – 110 с.
23. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир, 1990. – 348 с.
24. Грузина Т. Г., Балакина М. Н., Карамушка В. И. и др. // Микробиология. – 1997. – **66**, № 1. – С. 14–18.
25. Грузина Т. Г., Чеховская Т. П., Вембер В. В. и др. // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, № 3. – С. 95–98.

Отримано 19.10.2006