

ОСМОТУВСТВИТЕЛЬНЫЙ Н—К-ОБМЕН АНАЭРОБНО
ВЫРАЩЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *PROTEUS*

А. А. ТРЧНЯН, И. А. ВАЙН

Ереванский университет, кафедра биофизики и лаборатория
биофизики субклеточных структур

Показано, что анаэробно выращенные *P. mirabilis* и *P. vulgaris* в щелочной среде глюкозой обменивают Н⁺ клетки на К⁺ среды в две, разделенные во времени фазы. Кинетические параметры для поглощения К⁺ в первую фазу близки к таковым для Trk системы *E. coli*. Сделан вывод, что *P. mirabilis* и *P. vulgaris* обладают Н⁺-АТФазным комплексом (F₀F₁) и Trk-подобной системой поглощения К⁺, при работе которых происходит осмотуравнительный обмен 2Н⁺ клеток на К⁺ среды. Предполагается, что осморегуляция поглощения К⁺ через Trk-подобную систему у этих бактерий осуществляется при участии периплазматических белков и зависит от активности Н⁺ в среде.

Սույն է արվում, որ անաէրոբ աճածներում աճեցած *P. mirabilis* և *P. vulgaris* բակտերիաները Գլյուկոզից մշտապես փոխարինում են Կ⁺-ը Կ⁺-ը միջավայրի Կ⁺-ով երկու մասնակից փուլերով:

Նշումներով է, որ *P. mirabilis* և *P. vulgaris* բակտերիաները ունեն H^+ -ԱՏՖ-ազային կոմպլեքս (F₀F₁) և K⁺-ի կլոմեման Trk-եման նմանությամբ, որոնք աջակցանքի ընթացքում ազդի է ունենում ընդ 2H⁺-ի միջավայրի K⁺-ով օսմոզոգոյուն փոխանակութունը: Անջումով է, որ այդ բակտերիաների մասին Trk-համակարգի միջոցով K⁺-ի կլոմեման օսմոզ-ըզոզոսումը ազդի է ունենում պերիպլազմատիկ սպրոսկոցիների մասնակցությամբ և կախված է միջավայրի H⁺-ի ակտիվությունից:

It has been shown that anaerobically grown *P. mirabilis* and *P. vulgaris* in alkaline medium with glucose exchange H⁺ from the cells for K⁺ of the medium in two different steps.

It has been concluded that *P. mirabilis* and *P. vulgaris* have the H⁺-ATPase complex and Trk-like system of K⁺ uptake and the osmosensitive exchange of 2H⁺ from the cells for K⁺ of the medium takes place under operation of these systems. It has been assumed that osmoregulation of K⁺ uptake via the Trk-like system in these bacteria is carried out by periplasmic proteins and dependent on H⁺ activity in the medium.

Ключевые р. *Proteus*—осмотуравнительный Н—К обмен

Предпринятое нами исследование Н—К обмена у различных видов грамотрицательных факультативно-анаэробных бактерий рода *Proteus* представляет интерес, по крайней мере, по трем причинам. Во-первых, почти не исследован транспорт К⁺ в других бактериях,

Сокращения: ДНК—дезоксирибонуклеиновая кислота, ЭДТА—этилендиаминтетрауксусная кислота, ТФФ—тетрафенил фосфоний, КХФГ—карбонилсукцинилгидратин.

как подчеркивает Эпстайн с соавт. [15], вполне вероятно, что системы транспорта K^+ в других *Enterobacteriaceae* подобны таковым у *E. coli*. Далее, поглощение K^+ через конститутивную Ttk-систему у анаэробно выращенных *E. coli* осуществляется в обмен на $2H^+$, выводимых из клеток посредством F_1F_2 [7—9], и обе транспортные системы, как мы обосновываем [4, 12], объединяются друг с другом в единый суперкомплекс, функционирующий как H^+ — K^+ -насос. Такое предположение подтверждается на *S. typhi-aureum* [14], молочнокислых бактериях [13] и, возможно, отражает общую закономерность, заключающуюся в объединении транспортных белков в суперкомплексы у анаэробно выращенных и анаэробных бактерий. Наконец, поглощение K^+ через Ttk-систему у *E. coli* регулируется тургорным давлением [6], понижение которого приводит либо к перестройке самой системы и увеличению ее активности [6, 10, 15], либо к освобождению системы от периплазматических белков, зажимающих ее при повышении тургорного давления [3]. Возможно, что второй путь регуляции поглощения K^+ с помощью периплазматических белков характерен для грамотрицательных бактерий.

Материал и методики В работе использовали *P. mirabilis* и *P. vulgaris*, представленные проф. [М. Е. Коцнином] (НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А. Александрова, г. Ереван).

P. mirabilis и *P. vulgaris* хранили на космках рыбжьего агара под слоем вазелинового масла и ежемесячно высевали на твердые питательные среды в чашки Петри. Бактерии выращивали в питательной среде с глюкозой [5] при соотношении объемов среды к объему колбы 1:1,25 в течение 18—22 ч при 37° без встряхивания. Отмывали центрифугированием и переносили в экспериментальный раствор, представляющий собой фосфатно-трисовый буфер, содержащий 0,4 мМ сульфата магния, 1 мМ хлорида натрия и хлорид калия. В качестве отмывочных растворов использовали дистиллированную воду или растворы мальтозы и маннозы различной концентрации, которые не утилизировались бактериями [2]. Осмотичность растворов определяли расчетами. Титр бактерий определяли подсчетом колоний после посева на твердые среды. Сухой вес бактерий определяли взвешиванием отмытого осадка суспензии после высушивания при 105° до постоянного веса. Площадь поверхности и внутриклеточный объем бактерий рассчитывали по средним размерам [2].

Транспорт катионов изучали по измерению их активности в среде, определяемому потенциометрическим методом с помощью стеклянных селективных электродов [5]. Кинетические параметры транспорта—константу Михаэлиса (K_m) и максимальную скорость переноса (V_{max})—определяли по методу Лайнуивера-Бэрка. Стехиометрию ДНК-чувствительных потоков катионов оценивали в параллельном эксперименте при наличии ДНК и без него или же по разнице потоков до и после перегибов на кривых транспорта [3, 7].

Величину $\Delta\psi$ рассчитывали по распределению ГФФ между клеткой и средой, определяемому потенциометрическим методом с помощью селективного электрода [1]. При определении $\Delta\psi$ бактерии предварительно обрабатывали с помощью ЭДТА в концентрации 10 мМ, учитывали также адсорбцию ГФФ- на бактериях после их кипячения в течение 5 мин.

Каждая кинетическая кривая представляет собой, по крайней мере, одну из трех подобных кривых данной серии экспериментов (не приводится). Результаты обрабатывали статистически с определением стандартной ошибки.

Результаты и обсуждение. Бактерии *P. mirabilis* при перенесении в среду с глюкозой, умеренной активностью K^+ и значениях pH выше 7,5 секретируют H^+ и поглощают K^+ в две, разделенные во времени фазы. Секретция H^+ из бактерий в первые минуты значительно выше, чем в последующий период, и на кривой наблюдается перегиб. Поглощение же K^+ в течение 5—8 мин сменяется существенным выходом этих катионов из клеток, и затем после 30 мин начинается второе поглощение K^+ со значительно меньшей скоростью, чем в первую фазу, и гораздо более длительное. При значениях pH среды ниже 7,5 выход K^+ между фазами поглощения не наблюдается, и быстрое поглощение этих катионов в первой фазе сменяется медленным во второй фазе. Поглощение K^+ в первую фазу имеет K_m и V_{max} в 3,5 мМ и 0,91, мМг.мин соответственно (табл. 1), характерные для Tpk-системы поглощения K^+ у *E. coli* [7, 9, 10] и *S. typhimurium* [14] и свидетельствующие о том, что поглощение K^+ в первую фазу у *P. mirabilis* осуществляется, возможно, через Tpk-подобную систему.

H^+ — K^+ -обмен чувствителен к осмотическому давлению среды. Перенос бактерий из среды с высокой осмотичностью (раствор мальтозы, 1200 мосМ) в среду с низкой (экспериментальный раствор, 570 мосМ) приводит к уменьшению скорости секретии H^+ и резкому подавлению поглощения K^+ . Меньшие перепады осмотичности, приводящие к подобным эффектам у *E. coli* [3, 7] и даже выходу K^+ из клеток, не приводят к таким результатам. Вторичное увеличение осмотичности (звездание мальтозы, 300 мосМ) резко усиливает секретцию H^+ из клеток и включает поглощение K^+ , при этом такие эффекты наблюдаются как в период выхода K^+ из клеток, так и при поглощении этих катионов во вторую фазу, и имеют место при щелочных значениях pH среды. Эти результаты указывают на то, что изменение осмотического давления среды, влияющее на тургорное давление, регулирует H^+ — K^+ -обмен, характерный для первой фазы, и включает т.б. обмен возможно при низкой активности H^+ в среде.

H^+ — K^+ -обмен подавляется с помощью ДЦКД, арсената и КХФГ. Ранее с использованием мутантов *E. coli* с дефектами в отдельных субъединицах F_1F_0 мы показали, что влияние ДЦКД на H^+ — K^+ -обмен у анаэробно выращенных *E. coli* связано с F_0 [8]. Полученные же результаты указывают на то, что H^+ — K^+ -обмен у *P. mirabilis*

Таблица 1. Кинетические параметры поглощения K^+ и анаэробно выращенных бактерий рода *Proteus*

Бактерия	Фаза поглощения K^+	K_m , мМ	V_{max} , мМоль/г. мин
<i>P. mirabilis</i>	первая	3.5	0.91
	вторая	13.0	0.12
<i>P. vulgaris</i>	первая	3.3	0.73

Таблица 2. Стехиометрия ДЦКД-чувствительных потоков H^+ и K^+ и первую фазу поглощения K^+ у анаэробно выращенных бактерий рода *Proteus*

Активность K^+ в среде, м.э	Время, мин	Поток и катионот, мМоль \cdot л ⁻¹ \cdot мин ⁻¹		Среднее значение	Среднее значение	Среднее значение
		H^+	K^+			
у анаэробно выращенных ДЦКД-чувствительных						
<i>P. mirabilis</i>						
1.92	8.1	3.35 ± 0.31	0.97 ± 0.11	0.4 ± 0.06	2.0 ± 0.1	9
1.92	7.0	1.49 ± 0.16	0.44 ± 0.09	0.35 ± 0.05	1.9 ± 0.1	3
1.92	6.0	1.74 ± 0.20	0.59 ± 0.07	0.30 ± 0.01	2.0 ± 0.1	5
0.96	8.1	2.56 ± 0.27	0.51 ± 0.05	0.25 ± 0.04	2.1 ± 0.2	4
4.50	н.т.	2.91 ± 0.32	1.26 ± 0.16	0.63 ± 0.10	2.0 ± 0.1	5
<i>P. vulgaris</i>						
0.96	8.0	2.38 ± 0.25	0.41 ± 0.05	0.22 ± 0.03	2.0 ± 0.1	5
1.92	8.0	2.65 ± 0.27	0.81 ± 0.09	0.40 ± 0.03	2.0 ± 0.2	3
4.50	8.0	2.98 ± 0.31	1.00 ± 0.12	0.56 ± 0.05	1.9 ± 0.2	3

осуществляется через ДЦКД-чувствительный механизм мембраны возможно, F_0F_1 и нуждается как в АТФ, так и в $\Delta\mu$]

$H^+ - K^+$ -обмен в первую фазу осуществляется с устойчивой стехиометрией ДЦКД-чувствительных потоков катиона, равной $2H^+/K^+$ (табл. 2), что обнаружено ранее у анаэробно выращенных *E. coli* [3, 7—9], *S. typhimurium* [14], анаэробных молочнокислых бактерий [13].

Бактерии *P. vulgaris* осуществляют такой же $H^+ - K^+$ -обмен, что и *P. mirabilis* (табл. 1, 2). Эти же бактерии генерируют $\Delta\mu$ величиной -116 ± 5 и -120 ± 5 мВ соответственно, падающий на 15—20 мВ при отрицательном осмотическом шоке или в присутствии ДЦКД (не показано).

Совокупность наших результатов указывает на то, что *P. mirabilis* и *P. vulgaris* осуществляют $H^+ - K^+$ -обмен в две разделенные во времени фазы, в первую фазу он чувствителен к осмотическому давлению среды, ДЦКД, характеризуется устойчивой стехиометрией и осуществляется, скорее всего, через Tgk -подобную систему, возможно, F_0F_1 .

С учетом того, что у анаэробно выращенных *E. coli* F_0F_1 вступает в прямое взаимодействие с Tgk -системой, образуя сульфидокомплекс, функционирующий как $H^+ - K^+$ -насос [4, 7, 12], наши результаты позволяют допустить, что у *P. mirabilis* и *P. vulgaris* также может иметь место непосредственное взаимодействие F_0F_1 с Tgk -подобной системой с образованием сульфидокомплекса, функционирующего как $H^+ - K^+$ -насос, обменивающий $2H^+/K^+$.

Следует выделить то обстоятельство, что у этих бактерий $H^+ - K^+$ -обмен и $\Delta\mu$ оказались чувствительными к изменению осмотического давления среды. Мы предполагаем, что $2H^+/K^+$ -обмен регулируется посредством периплазматических белков, работающих как белки-клапаны [3], и такой путь регуляции характерен, вероятно,

му, для грамотрицательных бактерий. По всей видимости, полные насосы мембраны этих бактерий должны включаться в необходимый период адаптации бактерий на короткое время, что может предотвратить потери энергии в клетках, особенно при низкоэффективных энергетических процессах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гринюс Л. Л., Дагестанчиус Р. Ю., Аликмавичюс Г. А. Биохимия. 45, 1609—1618, 1980.
2. Краткий определитель бактерий Берги. 188—189. М., 1980.
3. Трчунян А. А., Карасулян Э. Л., Ванян Н. А. Биол. журн Армении. 37, 836—843, 1984.
4. Трчунян А. А., Оганджанян Е. С., Миронова Г. Д. и др. Биофизика. 36, 102—104, 1994.
5. Dargaryan S. S., Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 554—560, 1978.
6. Epstein W. FEMS Microbiol. Lett., 29, 73—78, 1986.
7. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 8, 597—603, 1981.
8. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 11, 29—36, 1983.
9. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 15, 417—426, 1986.
10. Rhoads D. B., Winters F. B., Epstein W. J. Gen. Physiol., 67, 325—341, 1976.
11. Sueller C. H. Science, 138, 789—793, 1970.
12. Trchounian A. A., Oganjanian E. S. Stud. Biophys., 132, 231—234, 1989.
13. Trchounian A. A., Oganjanian E. S., Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 17, 503—508, 1987.
14. Trchounian A. A., Ter-Nikogossian V. A., Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 17, 183—192, 1987.
15. Walderhaug M. O., Doseit D. C., Epstein W. Ion Transport in Procarvates. 85—138, N.—Y.: Acad. Press, 1987.

Поступило 22.IV 1991 г.

Биол. журн. Армении. № 1.(45) 1992

УДК 577.24

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЦ, СОДЕРЖАЩИХ ГЕН ГОРМОНА РОСТА БЫКА, ПОД КОНТРОЛЕМ ДЛИННОГО КОНЦЕВОГО ПОВТОРА ВИРУСА САРКОМЫ РАУСА

Г. К. ШАХБАЗЯН, Н. С. АМБАРЦУМЯН, И. Д. КАЗАРЯН,
А. К. ОГАНЕСЯН, А. К. ШАХБАЗЯН, Ж. И. АКОПЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван
Бурастанская экспериментальная совхоз-лаборатория, Армения

Проведен анализ F_2 трансгенных мышц на наличие в их геноме интегрированных последовательностей гена гормона роста быка под контролем длинного концевой повтора вируса саркомы Рауса. В духе случая показана интеграция искомым последовательностей и экспрессия их на уровне транскрипции в мышечных тканях животных.

Վստարված է F_2 տրանսգենային մկների անալիզը ըստ նրանց գենոմում ինտեգրացված ցույց ածի հորմոնի գենի հաջորդականությունների առկայության: Ուսումի սարկոմայի վիրուսի վերջնային երկար կրկնությունն օժանդակությամբ:

Երկու զնաչում ցույց է տրված որոնելի հաջորդականությունների ինտեգրացիան և տրանսկրիպցիայի մակարդակով նրանց էքսպրեսիան կենդանիների մկնային հյուսվածքներում: