

11. Sharma R. K., Wang J. H., Adv. Cyclic Nucl. Res. 10, 187—193, 1979.
12. Thompson W. J., Terasaki W. L., Epstein P. M., Strata S., J. Adv. Cycl. Nucl. Res. 10, 69—92, 1979.
13. Volpi M., Shalaji R. I., Epstein P. M., Adregar D. M., Feinstein M. B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 795—799, 1981.

Биолог. журн. Армения, № 1 (47), 1994

УДК 577.352.315+27

АКТИВНОСТЬ TRK СИСТЕМЫ ПОГЛОЩЕНИЯ K^+ У АНАЭРОБНО ВЫРАЩЕННЫХ МУТАНТОВ E. COLI С UNC-ДЕЛЕЦИЕЙ

А. В. ВАСИЛЯН, Е. С. ОГАНДЖАНИЯ, А. А. ТРЧУНЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра физиологии растений, кафедра биофизики и лаборатория биофизики субклеточных структур

Показано, что поглощение K^+ у анаэробно выращенных мутантов E. coli с unc-делецией в отсутствие F_1F_0 -АТФазы осуществляется через Trk систему, однако в отличие от предшественника не подавляется с помощью N,N'-дихлорогексикарбодимида и не происходит в обмен на $2H^+$ выводимых из клетки. В то же время АТФазная активность изолированных мембран этих мутантов существенно ниже, чем у предшественника, и в отличие от него не подавляется с помощью ДЦКД и не зависит от концентрации K^+ в среде. АТФазная активность у предшественника подавляется с помощью ДЦКД, но не зависит от концентрации K^+ в среде при анаэробном росте бактерий, в присутствии ингибита. В то же время при таком росте АТФазная активность мутанта с unc-делецией также ниже и не зависит от концентрации K^+ в среде. Сделан вывод о том, что Trk система может работать отдельно и в мутантах в отсутствие F_1F_0 -АТФазы, но не обладает АТФазной активностью.

Յույժ է տրված, որ անաերոբ աճումներից աճեցված E. coli-ի unc-դե-
լեցիայով մուտանտների մոտ K^+ -ի կոնցենտրացիան կատարվում է Trk համակարգի
միջոցով, սակայն ի տարբերություն իր նախնու, այն չի արգելակվում N,N'-դի-
ցլոհեքսիկարբոդիմիդով (DCCD) և չի իրադրոծվում $2H^+$ դուրս բերվող
 $2H^+$ -ով փոխանակմամբ: Միևնույն ժամանակ այդ մուտանտներից անջատված
մեմբրանների ԱՖՖ-ազային ակտիվությունը շատ փոքր է, բան նախնիի մոտ, և
ի տարբերություն չի արգելակվում DCCD-ի միջոցով ու կախված չէ միջավայրում
 K^+ -ի կոնցենտրացիայից: Նախնու ԱՖՖ-ազային ակտիվությունը արգելակվում է
DCCD-ի միջոցով, բայց կախված չէ միջավայրում K^+ -ի կոնցենտրացիայից նու-
րապես առկայությամբ բակտերիաների աճման ժամանակ: Միևնույն ժամանակ
այդ աճման դեպքում սոս-դեկլորացված մուտանտների մոտ ԱՖՖ-ազային ակտի-
վությունը նույնպես փոքր է և կախված չէ միջավայրում K^+ -ի կոնցենտրացիա-
յից: Ներկայացված է, որ Trk համակարգը կարող է գործել սոսանձին նաև մու-
տանտներում F_1F_0 -ԱՖՖ-ազի րաջակայությամբ, բայց օժտված չէ ԱՖՖ-ազային
ակտիվությամբ:

The K^+ uptake in anaerobically grown E. coli mutants with unc-de-
letion in the absence of the F_1F_0 -ATPase has been shown to be carried
out by the Trk system, but unlike its precursor it is not inhibited by
N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) and not exchanged for $2H^+$ ex-
truded from the cell. At the same time, ATPase activity of isolated

membranes from these mutants is too small and not inhibited by DCCD and it does not depend on external K^+ concentration. ATPase activity in precursor is inhibited by DCCD, but it does not depend on external K^+ concentration upon growth of bacteria in the presence of nitrate. At the same time, upon this growth ATPase activity in the mutants with undeletion is small too and does not depend on external K^+ concentration. The Trk system is concluded to can operate separately in mutants in the absence of the F_1F_0 -ATPase, however it has no ATPase activity.

Trk система — АТФазная активность — мутанты с инс-делецией — анаэробно выращенные бактерии.

Большинство бактерий интенсивно накапливает K^+ до высокого градиента этих катионов между клеткой и средой [1, 11—12, 16]. Такое накопление K^+ , необходимого для роста бактерий [1, 16], регуляции тургора клетки [1, 6] и активности ряда ключевых ферментов [1—4, 10] осуществляется посредством совокупности транспортных систем, одной из которых является так называемая Trk система поглощения K^+ [4, 12, 16]. Эта конститутивная система является K^+ -насосом, который нуждается для проявления своей активности как в электрохимическом протонном градиенте (ΔpH), так и в АТФ [11, 13, 16]. При этом ΔpH служит, скорее всего, движущей силой для транспорта K^+ , а АТФ является аллостерическим регулятором активности этого транспортного белка. Вместе с тем в нашей лаборатории были получены факты, свидетельствующие о том, что Trk система у анаэробно выращенных бактерий может взаимодействовать внутри мембраны с F_1F_0 -АТФазой и формировать суперкомплекс, функционирующий как H^+ - K^+ -насос [1, 10, 11, 14, 15]. Такой насос обменивает $2H^+$ клетки на один K^+ среды и обладает АТФазной активностью, зависящей от концентрации K^+ в среде. Было показано, что ДЦКД-чувствительная АТФазная активность протопластов анаэробно выращенных бактерий существенно возрастает при увеличении концентрации K^+ в среде и такой феномен исчезает при мутациях в *insA* или *trkA* генах, ведущих к остановке F_1F_0 -АТФазы и Trk системы соответственно [10]. Более того, K^+ -зависимая ДЦКД-чувствительная АТФазная активность обнаруживается также в изолированных мембранах и препаратах F_1F_0 -АТФазы из анаэробно, но не аэробно выращенных бактерий [14—15].

Непосредственное взаимодействие F_1F_0 -АТФазы с Trk системой и их объединение в суперкомплекс, работающий как единый механизм — H^+ - K^+ -насос, представляется достаточно понятным, однако механизм и регуляция такого прямого взаимодействия остаются неясными. К тому же, недавно обнаружены кодирующие Trk систему новые гены, находящиеся в различных участках хромосомы *E. coli* [4], роль которых требует изучения. Нужна ли F_1F_0 -АТФаза для активности Trk системы и определяет ли она АТФазную активность, зависящую от K^+ ? А может Trk система работает самостоятельно и обладает АТФазной активностью?

В настоящей работе сделана попытка найти ответы на поставленные вопросы.

Материал и методика. Бактерии. В работе использовали мутанты *E. coli* с исподеленной (табл. 1), выведенные проф. В. Элстайном в лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии Чикагского университета, США.

Выращивание бактерий. Бактерии выращивали в колбах, залитых питательной средой с глюкозой [5], в течение 9—15 ч при 37°C. В ряде экспериментов для получения бактерий, осуществляющих нитратное дыхание [9], в среду добавляли 10 мМ нитрата натрия. Количество бактерий в единице объема определяли колориметрически и подсчетом колоний после высева суспензии на твердые среды.

Изолирование мембран. Мембраны изолировали путем осмотического лизиса сферопластов, полученных после обработки клеток с помощью лизоцима (Boehringer, Германия), по методу Кэбака [8]. Мембраны бактерий, осуществляющих нитратное дыхание, выделяли по тому же методу и модификации Конингса и Кэбака [9]. Количество белка определяли колориметрически с помощью реагента—биснитронинновой кислоты по методу фирмы «Pierce», США.

Транспорт катионов. Перенос катионов через мембраны бактерий изучали путем определения их активности в среде с помощью ионоселективных электродов. Определение кинетических констант и стехиометрии $H^+ - K^+ - O_2$ не отличалось от ранее описанного [5, 11].

АТФазная активность. Об АТФазной активности судили по высвобождению неорганического фосфата (P_i) после реакции мембран (50—80 м.г) с 5 мМ АТФ-Трис (Sigma, США) в 50 мМ Трис HCl буфере (pH 7.5), содержащем 2,5 мМ сульфата магния и хлористый калий. В случае с мембранами из бактерий, осуществляющих нитратное дыхание, добавляли 10 мМ фермента и 10 мМ нитрата натрия. Реакцию ингибировали введением АТФ и останавливали в отбираемых во времени (через 15 или 30 мин) пробах с помощью 5% ного раствора сульфата натрия (Sigma). P_i определяли спектрофотометрически по методу Норгенсена и Петерсена [7]. Величину ДЦКД-чувствительной АТФазной активности рассчитывали как разность между значениями АТФазной активности в отсутствие и присутствии ДЦКД (Sigma), при этом мембраны инкубировали с реагентом в течение 10—15 мин.

Результаты обрабатывали статистически с определением средней величины и стандартной ошибки

Результаты и обсуждение. Анаэробно выращенные *E. coli* при перенесении в свежую среду с глюкозой и умеренным содержанием K^+ и при положительном осмотическом шоке интенсивно выводят H^+ из клеток с помощью F_1F_0 —АТФазы и накапливают K^+ через Tgk систему. При этом такое поглощение K^+ имеет K_m порядка 2 мМ и непродолжительно во времени. Оно подавляется с помощью ДЦКД. Стехиометрия ДЦКД-чувствительного ионного обмена равна $2H^+ - K^+$ (табл. 2). В отличие от такого характерного для дикого типа [3, 5, 11] и предшественника (табл. 2) поглощения K^+ , анаэробно выращенные мутанты *E. coli* с исподеленной в тех же условиях накапливают K^+ менее интенсивно, поглощение K^+ имеет такую же величину K_m , но не подавляется с помощью ДЦКД (табл. 2). Все это свидетельствует о том, что Tgk система может функционировать в мутантах с исподеленной и что ДЦКД-чувствительность этой системы поглощения K^+ связана с F_1F_0 —АТФазой.

Нами было показано, что АТФазная активность мембран, изолированных из анаэробно выращенных бактерий, зависит от концентраций

K⁺ в среде [14]. Действительно, как суммарная, так и ДЦКД-чувствительная АТФазная активность изолированных мембран не только дикого типа, но и *trkG* мутанта существенно, почти в 2 раза, возрастает с увеличением концентрации K⁺ в среде от нуля до 100 мМ (табл. 3). И если такая активность определяется F₁F₀-АТФазой, объединенной с Trk системой в суперкомплекс, а не самой Trk системой, то она должна исчезнуть при ипс-делеции, ведущей к отсутствию F₁F₀-АТФазы. Действительно, АТФазная активность мембран из *trkG* мутанта с ипс-делецией существенно ниже, чем у предшественника (табл. 3, ср. *E. coli* TK2685 и *E. coli* FRAG116).

Таблица 1. Характеристика мутантов *E. coli*, использованных в работе

Штамм	Генотип	Литература
TK2076	<i>mal lacZ nadA trp pyrF kdp</i> Δ 3 <i>trkD1</i>	[4]
TK2685	TK 2076 <i>trk392</i>	[4]
FRAG99	<i>lacZ gal kdpABC5 trkD1</i>	[4]
FRAG115	FRAG99 <i>del (unc)</i>	**
FRAG116	FRAG99 <i>trk382 del (ada del</i>	**

* Все штаммы выращены на 1%.

** Штаммы выведены по оп. В. Энгельман и Г. Г. Голубович (Ленинградский институт биофизики Академии наук СССР).

Таблица 2. Характеристики поглощения K⁺ и ДЦКД-чувствительности мембран *E. coli* с ипс-делецией

Штамм	Дефектный или отсутствующий белок	Поглощение K ⁺ (нмоль/г белка/мин)		Стехиометрия H ⁺ -K ⁺ -насоса, чувствительного к ДЦКД, 0,5 мМ
		K _{0.5} (мМ)	ДЦКД-чувствительность	

TK2076	предшественник	2,1	+	2,0±0,1*
TK2685	<i>TrkG</i>	2,1	+	2,0±0,1
FRAG115	F ₁ F ₀ -АТФаза	2,9	—	—

* Из трех экспериментов.

Таблица 3. АТФазная активность изолированных мембран анаэробно выращенных мутантов *E. coli* с ипс-делецией при различных концентрациях K⁺

Штамм	Дефектный или отсутствующий белок	Концентрация K ⁺ в среде, мМ	АТФазная активность, мМоль Ф _H /мг белка/мин. Суммарная	ДЦКД-чувствительная
TK2685	<i>TrkG</i>	0	57,8±1,4*	29,7±0,3 (100%)
		5	74,0±3,2	40,3±0,3 (136%)
		100	90,0±3,2	56,3±0,9 (190%)
FRAG116	<i>TrkG</i>	0	12,6±0,4	1,5±0,8
		5	11,2±0,4	0,0±0,2
		100	14,9±1,0	0,4±0,2

* Из трех экспериментов.

Такая низкая АТФазная активность незначительно возрастает с увеличением концентрации K^+ в среде и не чувствительна к ДЦКД. Эти данные указывают на то, что, во-первых, K^+ -зависимая и ДЦКД-чувствительная АТФазная активность определяется F_1F_0 -АТФазой и, во-вторых, сама Tgk система не обладает АТФазной активностью.

Обсуждение результатов, полученных при анализе мутантов бактерий, всегда связано с определенными трудностями. Поэтому было бы правильнее также показать, что, по предположению [3] отдельно работающая Tgk система в *E. coli*, осуществляющих нитратное дыхание, не обладает АТФазной активностью. На самом деле, АТФазная активность мембран бактерий, выращенных в присутствии нитрата натрия, имеет такое же значение, как и АТФазная активность мембран из анаэробно выращенных бактерий, осуществляющих гетероферментативное молочнокислое брожение. Однако как суммарная, так и ДЦКД-чувствительная АТФазная активность не зависит от концентрации K^+ в среде (табл. 4). Более того, АТФазная активность мембран мутанта с инсерцией, выращенного в присутствии нитрата натрия, значительно ниже и не зависит от концентрации K^+ в среде (табл. 4). Необходимо отметить, что АТФазная активность протопластов анаэробно выращенных бактерий, определенная ранее [10], не зависела от концентрации ионов натрия, так что присутствие последних не сказывается на изучаемом эффекте, и сами ионы натрия не переносятся через Tgk систему [4, 10, 16].

Таблица 4. АТФазная активность изолированных мембран, выращенных в присутствии нитрата натрия мутантов *E. coli* с инсерцией при различных концентрациях K^+

Штамм	Дефектный или отсутствующий белок	Концентрация K^+ в среде, мМ	АТФазная активность, мМоль $ФН$ / мин. м.г белка	
			суммарная	ДЦКД-чувствительная
TK2685	TgkG	0	$47.1 \pm 15^*$	32.1 ± 1.6 (100%)
		5	44.5 ± 18	29.5 ± 1.3 (92%)
		100	41.1 ± 12	23.4 ± 1.3 (73%)
FRA0116	TgkG	0	8.3 ± 0.4	0.3 ± 0.1
	F_1F_0 -АТФ-азы	5	8.0 ± 0.4	0.2 ± 0.1
		100	8.0 ± 0.2	0.2 ± 0.1

* Из трех экспериментов.

Таким образом, совокупность результатов указывает на очень важный и принципиальный факт. Tgk система может работать отдельно и анаэробно выращенных бактериях в отсутствие F_1F_0 -АТФазы и не обладает собственной АТФазной активностью. Мы подтверждаем, что ДЦКД-чувствительная АТФазная активность, возрастающая с увеличением концентрации K^+ , определяется F_1F_0 -АТФазой и Tgk системой,

которые могут взаимодействовать друг с другом внутри мембраны и формировать суперкомплекс.

Авторы благодарят проф. В. Эпштейна за выведение мутантов бактерий и проведение части исследований в лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии Чикагского университета, США.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грчунян А. А. Биолог. журн. Армении, 40, 267—275, 1987.
2. Грчунян А. А., Оганджанян Е. С. Биотехнология, 1, 11—12, 1992.
3. Bagratyan K. A., Martirosou S. M. FEBS Lett., 146, 249—252, 1989.
4. Dosch D. C., Helmer G. L., Sutton S. H., Salacion F. F., Epstein W. J. Bacteriol., 173, 687—695, 1991.
5. Durgaryan S. S., Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 567—573, 1978.
6. Epstein W. FEMS Microbiol. Rev., 49, 63—78, 1986.
7. Jorgensen P., Petersen J. Biochim. Biophys. Acta, 715, 28—47, 1982.
8. Kaback H. R. Meth. Enzymol., 22, 99—120, 1971.
9. Konings W. N., Kaback H. R. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 70, 3375—3381, 1993.
10. Martirosou S. M., Oganjanian E. S., Trehounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 19, 353—357, 1983.
11. Martirosou S. M., Trehounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 17, 417—425, 1986.
12. Rhoads D. B., Waters F. B., Epstein W. J. Gen. Physiol., 67, 324—341, 1976.
13. Rhoads D. B., Epstein W. J. Biol. Chem., 252, 1394—1401, 1977.
14. Trehounian A. A., Oganjanian E. S. Stud. Biophys., 132, 231—234, 1989.
15. Trehounian A. A., Oganjanian E. S., Miranova G. D. Bioelectrochem. Bioenerg., 27, 363—373, 1992.
16. Walderhaug M. O., Dosch D. C., Epstein W. In: Ion Transport in Prokaryotes B. P. Rosen, S. Silver, eds., 5—130, N. Y., Acad. Press., 1987.

Получено 22 IV 1992

Биолог. журн. Армении, № 1 (47), 1994

УДК 613.63:577.1:18

О ВЗАИМОСВЯЗИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ЦИНКА С ПАТОГЕНЕЗОМ ЯЗВЕННОГО ПРОЦЕССА

К. Л. ЕРЗНИКЯН, В. А. ТРАНКОВ, С. Л. ГОБЕДЖАНИДЖИ

Научно-практический медицинский центр, Москва

Установлено гастропротективное действие сульфата цинка при экспериментальном ulcerogenesis. Обсуждены механизмы возникновения дефицита цинка в организме. Показана взаимосвязь недостаточности цинка с патогенезом язвенного процесса.

Համախմբված է օրգանիզմի դիսմետաբոլիզմի ազդեցությունը արհեստականորեն ստեղծված ուլցերոզի առաջացմանը և ցինկի պակասի առաջացման մեխանիզմները որոշվելու մասին։ Թվյալ է տրվում օրգանիզմի և ինքցիան պրոցեսի պատոգենեզի փոխադարձ կապը։

The gastroprotective action of zinc sulfate on experimental ulcerogenesis is revealed. The mechanisms of the origin of zinc deficiency in organism are discussed. The correlation of zinc deficit and the pathogenesis of ulcer process is shown.

Язвенный процесс—цинк.