

ИЗМЕНЕНИЯ РАСЩЕПЛЕНИЯ БЕЛКОВ СУБСТРАТОВ СУПЕРНАТАНТАМИ ГОМОГЕНАТОВ КЛЕТОК *CHLORELLA VULGARIS* ПРИ ДЕЙСТВИИ АНИОНОВ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ОРТОФОСФАТА И ХЛОРИДА МАРГАНЦА (II) IN VITRO

В.Н. НИКАНДРОВ, И.А. ИЛЬЮЧИК, О.Н. ЖУК

УО «Полесский государственный университет»,
г. Пинск, Беларусь, e-mail: irina.iliuchik@mail.ru

(Поступила в редакцию 12.12.2017)

Резюме. Впервые установлено, что расщепление фибриногена и казеина протеиназами супернатантов гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* заметно изменяется в присутствии анионов неорганического ортофосфата в диапазоне концентраций 0,001–0,060 М. Эффект зависит от используемого белка-субстрата и значительно более выражен в случае использования казеина. Концентрационная зависимость носит сложный характер, включающий не только зоны выраженного увеличения интенсивности протеолиза на 58,6–122,7%, но и его угнетения на 37%. В присутствии 0,1М неорганического ортофосфата существенно изменяется характер действия $MnCl_2$ в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-2} М: в целом, расщепление обоих белков под действием $MnCl_2$ усиливалось на 31–52% (ранее было показано, что в трис-НСl буфере $MnCl_2$ вызвал снижение фибринолитической активности на 27–35%, а изменения казеинолитической активности не превышали 12%). Раскрытие такой особенности эффекта ортофосфата требует дальнейших углубленных исследований.

Ключевые слова: неорганический ортофосфат, хлорид марганца (II), *Chlorella vulgaris*, казеин, фибриноген, расщепление белков.

Summary. For the first time it was demonstrated that fibrinogen and casein cleavage by proteinases of homogenate supernatants of *Chlorella vulgaris* cells was considerably changed in the presence of anions of inorganic orthophosphate in the 0.001-0.060 M concentration range. The effect depends on the used protein substrate and it was considerably more expressed in case of casein use. The concentration dependence has the complex character including not only zones of the expressed increase of proteolysis intensity by 58.6–122.7%, but also its decreasing by 37%. In the presence of 0,1M of inorganic orthophosphate the $MnCl_2$ action character in the 10^{-8} - 10^{-2} M concentration range was significantly changed: in general, the both proteins cleavage under the $MnCl_2$ action was increased for 31–52% (earlier it was shown that in tris-HCl buffer the $MnCl_2$ caused decrease in fibrinolytic activity by 27–35%, and changes of caseinolytic activity did not exceed 12%). The reason of such feature of orthophosphate effect need further studies.

Key words: inorganic orthophosphate, *Chlorella vulgaris*, casein, fibrinogen, protein cleavage.

Введение

Ранее нами было показано, что митохондриальные фракции головного мозга и печени мышей не способны расщеплять фибрин. Однако их фибринолитическая активность проявлялась в присутствии неорганического ортофосфата – P_i [1; 2].

На клетках лимфобластных линий было также продемонстрировано увеличение протеолитической активности в присутствии неорганического ортофосфата. Причем, согласно данным ингибиторного анализа, данный эффект не был связан с ресинтезом аденозинтрифосфата [3].

Это позволило нам выдвинуть идею о том, что существует независимый от аденозинтрифосфата путь стимуляции протеолиза неорганическим ортофосфатом – «фосфатный эффект» [1; 2].

В последующем было показано, что неорганический ортофосфат в конечной концентрации 0,001–0,06 М повышает плазминоген-активаторную функцию стрептокиназы, урокиназы, тканевого активатора плазминогена на 50–250% и, в целом, в 1,2–12,0 раз усиливает расщепление пяти белков-субстратов трипсином, α -химотрипсином, субтилизином, папаином, металлопротеиназой бацилл, а также пепсином при концентрации эффектора не более 0,004 М. При более высокой концентрации протеолитическая активность пепсина резко снижалась [4]. Расщепление желатина папаином, а также желатина и казеина металлопротеиназой бацилл в присутствии неорганического ортофосфата угнеталось на 40–50%.

Было также установлено, что фибринолитическая активность ряда штаммов условно патогенных микроорганизмов проявлялась только в присутствии неорганического ортофосфата [5].

Одним из истинных эссенциальных незаменимых микроэлементов является марганец. При дефиците марганца невозможны нормальный рост, развитие и продуктивность микроорганизмов, растений и животных. Ионы и соединения марганца участвуют в разнообразных метаболических процессах. Например, в растениях он выполняет функцию катализатора в кислород-выделяющем комплексе фотосистемы II [6]. Этот элемент входит в структуру или активирует ряд ферментов, участвующих в реакциях окисления-восстановления, декарбоксилирования и гидролиза. Так, достаточно упомянуть Mn-содержащие супероксид-дисмутазу и пируваткарбоксилазу [7].

Грибы *Basidiomycetes* синтезируют Mn-зависимую пероксидазу (Е.С. 1.11.1.13) – один из лигнолитических ферментов [8].

Марганец участвует в азотистом обмене в восстановлении нитратов до аммиака. В силу этого у растений, испытывающих недостаток марганца, затруднено использование нитратов в качестве источника азотного питания. Марганец связан с синтезом белка через регуляцию активности ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы, а также активирует ферменты, участвующие в окислении важнейшего фитогормона – ауксина.

Этот микроэлемент способен активировать летальный токсин *Clostridium sordelli* и В токсин *Clostridium difficile* намного сильнее, чем Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} [9].

Однако, избыточное поступление его приводит к развитию токсического эффекта – ингибированию биосинтеза хлорофилла, что сопряжено со снижением скорости фотосинтеза, увеличению накопления окисленных фенольных соединений в апопласте листьев, появлению некротических коричневых пятен на листьях, стеблях, побегах, сморщиванию (сминанию) самых молодых листьев, хлорозу [10].

Избыток марганца может ослаблять рост микроорганизмов. В экспериментах со *Streptococcus pneumoniae* продемонстрировано, что аккумуляция Mn сопровождалась изменениями процесса дефосфорилирования белков клетки вследствие гиперактивации Mn-зависимой протеин-фосфатазы [11]. Токсичность Mn связывают также с дисфункцией митохондрий и увеличением генерирования активных форм кислорода [12].

Целью настоящей работы явилось выяснение особенностей проявления эффекта неорганического ортофосфата на протеолитическую активность фракции безъядерных супернатантов гомогенатов клеток фотосинтезирующей водоросли *Chlorella vulgaris*, а также влияния MnCl_2 на эту активность в присутствии неорганического фосфата.

Основная часть

Объектом исследования служила микроводоросль *Ch. vulgaris*, штамм *IBCE C-19* из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, любезно предоставленная сотрудниками Республиканского центра альгологии.

В работе использовали казеин по Гаммерстену (Россия), фибриноген человека фирмы «Sigma», (США), бактоагар фирмы «Melford», (США), другие реактивы производства стран СНГ марки «хч».

Ch. vulgaris выращивали в условиях периодической культуры на среде Тамия [13] при непрерывном барботаже суспензии клеток воздухом с помощью аквариумного компрессора HAILEA ACO-003 – 25 л/ч; температуре окружающей среды – 25–26 °С; освещенности на поверхности сосуда (газоразрядные ртутные лампы низкого давления холодного дневного света PHILIPS TDL 18W/3) – 32 Вт/м²; фотопериоде (свет/темнота) – 12ч/12ч (программируемый таймер РТНWDG 03).

На 7 сутки роста культуры, используя камеру Горяева, определяли концентрацию клеток, отбирали аликвоты культуры, содержащие по $65 \pm 0,38$ млн/мл клеток, трижды отмывали дистиллированной водой, центрифугируя в течение 20 мин, при 3000 об/мин.

Клетки гомогенизировали с бидистиллированной водой при 4°С, гомогенат центрифугировали в течение 10 мин, при 8000 об/мин, при 4°С.

Протеолитическую активность полученных супернатантов определяли по лизису казеина или фибриногена в тонком слое агарового геля как подробно описано в предыдущих работах [14].

В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали бидистиллированную воду, в которую добавляли аликвоты $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,001 М – 0,060 М, pH 7,4) или 0,15М, pH 7,4 NaCl – контроль.

В экспериментах с добавлением хлорида марганца (II) в качестве растворителя использовали 0,1 М фосфатный буфер pH 7,4.

Концентрация белков-субстратов составляла – 10 г/л, агар-агара – 10 г/л. Пластины с нанесенными пробами (10 мкл) инкубировали при температуре 37 °С в течение 20 ч. Зоны лизиса визуализировали обработкой пластин 1 М хлорной кислотой.

Все эксперименты выполнены не менее, чем пятикратно. Полученные результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента (Statistica-6).

Судя по полученным результатам, в отсутствие неорганического ортофосфата супернатанты гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* расщепляли оба белка-субстрата, хотя казеин гидролизировали менее интенсивно, чем фибриноген – на 20,7% (таблица 1).

В присутствии неорганического ортофосфата интенсивность протеолиза этих двух белков существенно различалась (рисунок 1).

Так, при концентрации неорганического ортофосфата 0,001–0,009 М фибринолитическая активность супернатантов подавлялась на 12–37%, тогда как при концентрации эффектора 0,015 М и 0,045 М она возрастала на 21 и 27% соответственно (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1. Расщепление белков-субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* в присутствии ионов неорганического ортофосфата

Концентрация анионов ортофосфата, М	Площадь зон лизиса белков, мм ²	
	казеина (n = 20)	фибриногена (n = 15)
Контроль (без добавок)	20,3 ± 0,9	24,5 ± 0,9
0,060	32,2 ± 1,5*	24,8 ± 1,6
0,045	30,7 ± 0,8*	31,0 ± 1,0*
0,030	33,0 ± 0,7*	22,8 ± 0,8
0,015	20,3 ± 0,6	29,7 ± 0,9*
0,009	12,8 ± 0,5*	15,4 ± 0,7*
0,006	18,2 ± 0,4*	21,6 ± 0,8*
0,003	45,2 ± 1,4*	21,3 ± 1,1*
0,001	34,2 ± 1,3*	20,9 ± 0,9*

Примечание: * – изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$

Изменения казеинолитической активности носили трехфазный характер.

При концентрации эффектора 0,001 М и 0,003 М эта активность возрастала на 68,5 и 122,7% соответственно, а при концентрации неорганического ортофосфата 0,009 М она угнеталась на 37%. Вторая фаза увеличения казеинолитической активности на 58,6–62,6% наблюдалась в диапазоне концентраций анионов ортофосфата в диапазоне 0,030–0,060 М (таблица 1, рисунок 1).

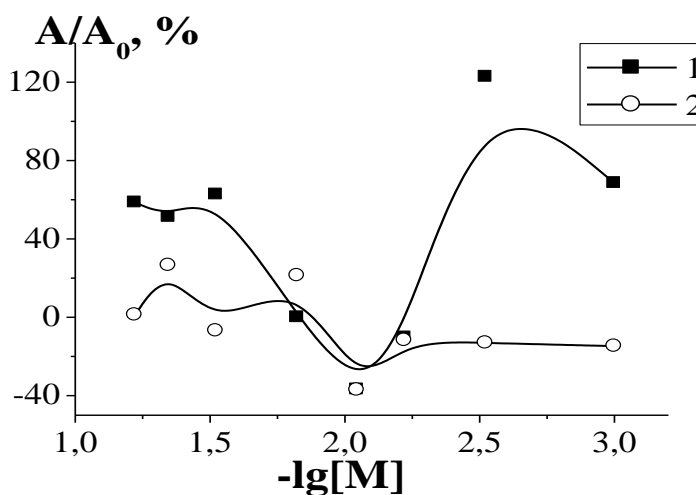


Рис. 1. Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления казеина (1) или фибриногена (2) супернатантами гомогенатов *Ch. vulgaris* при добавлении анионов неорганического ортофосфата, рН 7,4

Следовательно, как и ранее было показано [4], эффект неорганического ортофосфата на протеолитические реакции зависит от используемого белка-субстрата. В данном случае проявилась сложная концентрационная зависимость, демонстрирующая не только интенсификацию расщепления белков-субстратов, но и зоны его подавления. При этом, такая картина повторялась во всех случаях постановки данного эксперимента, которая в предыдущих исследованиях нами не была зафиксирована. Уяснение причины проявления подобной особенности эффекта анионов неорганического ортофосфата может быть связана с метаболической спецификой данного фотосинтезирующего объекта и требует проведения дальнейших углубленных исследований.

Ранее мы сообщали, что добавление хлорида магния в широком диапазоне концентраций *in vitro* к супернатантам гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* в трис-НСl буфере рН 7,4 сопровождалось снижением фибринолитической активности на 27–35%, тогда как изменения казеинолитической активности не превышали 12% [15].

Однако картина изменялась при использовании фосфатного буфера. Во-первых, в этом случае практически не наблюдалось различия в интенсивности расщепления казеина и фибриногена, а, в целом, расщепление обоих белков под действием $MnCl_2$ усиливалось (таблица 2). Более того, интенсивность расщепления белков в фосфатном буфере возрастала в 1,7 и 2,1 раза (таблицы 1 и 2).

Таблица 2. Расщепление белков-субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* в присутствии $MnCl_2$ в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4 (n = 16)

Концентрация анионов $MnCl_2$, М	Площадь зон лизиса белков, мм ²	
	казеина	фибриногена
Контроль (без добавок)	41,6 ± 1,9	41,3 ± 1,4
10 ⁻²	50,2 ± 3,7*	43,4 ± 1,9
10 ⁻³	52,8 ± 4,8*	43,6 ± 1,7
10 ⁻⁴	54,3 ± 2,8*	51,7 ± 1,7*
10 ⁻⁵	48,2 ± 2,3*	48,0 ± 2,4*
10 ⁻⁶	55,9 ± 5,1*	62,8 ± 4,0*
10 ⁻⁷	44,0 ± 2,8	54,9 ± 3,1*
10 ⁻⁸	39,0 ± 2,5	50,4 ± 1,5*

При этом расщепление казеина возрастало в диапазоне концентраций $MnCl_2$ 10⁻⁶–10⁻² М, а лизис фибриногена – при добавлении хлорида марганца в концентрации 10⁻⁸–10⁻⁴ М (таблица 2, рисунок 2).

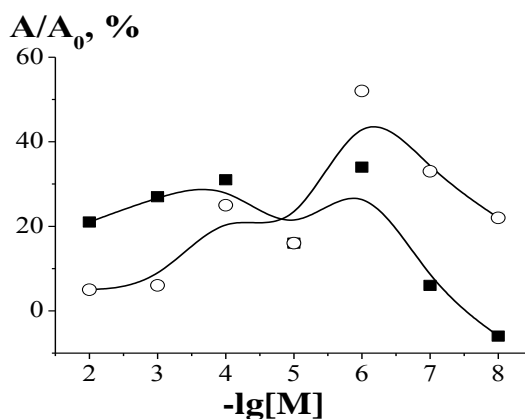


Рис. 2. Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления казеина или фибриногена супернатантами гомогенатов *Ch. vulgaris* при добавлении $MnCl_2$, pH 7,4. Обозначения те же, что в рис. 1

Максимум эффекта при использовании в качестве субстрата казеина наблюдался при концентрации $MnCl_2$ 10⁻⁶ и 10⁻⁴ М (рост казеинолитической активности на 34 и 31% соответственно), а при использовании фибриногена как субстрата – при концентрации $MnCl_2$ 10⁻⁶ и 10⁻⁷ М (рост фибриногенолитической активности на 52 и 33% соответственно) (таблица 2, рисунок 2).

Как и ранее, при исследовании эффекта хлорида марганца на расщепление белков-субстратов трипсином, α -химотрипсином и папаином [16] эффект соли марганца проявлялся на разных белках-субстратах неодинаково. Характер действия изменялся в присутствии ионов ортофосфата. Следует отметить, что в литературе данные о влиянии Mn^{2+} на процессы протеолиза весьма немногочисленны.

Так, при культивировании водоросли *Scenedesmus ecornis* с добавлением в питательную среду хлорида марганца в высокой концентрации отмечено подавление казеинолитической активности внутриклеточных «нейтральных» протеиназ на 32–61% [17].

Тем более, не изучена реализация эффекта катионов Mn^{2+} на протеолитические реакции в зависимости от состава растворителя и, в частности, в присутствии анионов неорганического ортофосфата. Ранее мы наблюдали рост протеолитической активности α -химотрипсина под действием хлорида марганца при использовании в качестве растворителя фосфатного буфера [16].

Изменения характера действия катионов марганца в присутствии неорганического ортофосфата могут быть обусловлены образованием комплексов катиона металла с анионом ортофосфата, конформационными перестройками молекулы протеиназы или молекулы белка-субстрата. Эти вопросы составляют достаточно объемную задачу, решение которой требует проведения дальнейших исследований.

Заключение

Результаты проведенных исследований показали, что расщепление фибриногена и казеина протеиназами супернатантов гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* заметно изменяется в присутствии анионов неорганического ортофосфата. Эффект зависит от используемого белка-субстрата и значительно более выражен в случае использования казеина. Концентрационная зависимость носит сложный характер, включающий не только зоны выраженного увеличения интенсивности протеолиза, но и его угнетения. Раскрытие такой особенности эффекта ортофосфата требует дальнейших углубленных исследований. Присутствие анионов неорганического ортофос-

фата существенно изменяет характер действия катионов марганца (II). Это может быть сопряжено с образованием комплексов катиона металла с анионом ортофосфата, конформационными перестройками молекулы протеиназы или молекулы белка-субстрата – моментами, раскрытие которых также требует проведения дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никандров, В.Н. Регуляция протеолиза: новые данные о роли активных форм кислорода и биогенных фосфатов / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // Актуальные вопросы гепатологии: Третий симпозиум гепатологов Белоруссии. – Минск, 1998. – С. 39.
2. Nikandrov, V.N. Some unusual manifestation of proteolysis / V.N.Nikandrov, N.S.Pyzhova // Cell. and Mol. Biol. – 2006. – Vol. 52, No 4. – P. 30-39.
3. Никандров, В.Н. Особенности проявления фибринолитической активности лимфоцитами человека / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова, Н.Л. Шатило // «Инфекция и иммунитет. Матер., приуроченные к V междунар. форуму по глобальной вакцинологии «Вакцины и иммунизация», Несси, Минск, 2001, с. 193-202.
4. Пыжова, Н.С. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена / Н.С. Пыжова, В.Н. Никандров // Биоорг. химия. – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 382-391.
5. Пыжова, Н.С. Особенности выявления протеолитической активности у штаммов условно-патогенных микроорганизмов / Н.С. Пыжова, В.Н. Никандров // «Современные проблемы инфекционной патологии человека. Сб. научн. трудов». – Вып. 2. – Минск, 2009. – С. 400-409.
6. Schmidt, S.B. Manganese deficiency in plants: the impact photosystem II / S.B. Schmidt, P.E. Jensen, S. Husted // Trends Plant Sci. – 2016. – Vol. 21, No 7. – P. 622–632.
7. Bahar, E. Polyphenolic extract of *Euphorbia supina* attenuates manganese-induced neurotoxicity by enhancing antioxidant activity through regulation of ER stress and ER stress-mediated apoptosis / E. Bahar et al // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – Vol. 18, No 2. – 10, 3390 / ijm 18020300.
8. Vrsanska, M. Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes / M. Vrsanska et al // Molecules. – 2016. – Vol. 21. – 1553.
9. Genth, H. Metal ion activation of *Clostridium sordelli* lethal toxin and *Clostridium difficile* toxin B / H. Genth, I. Schelle, I. Just // Toxins. – 2016. – Vol. 8, No 4. – 109.
10. Huang, Y.L. Manganese toxicity in sugarcane plantlets grown on acidic soil of Southern China / Y.L. Huang et al. // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, No 3. – e0 148956.
11. Martin, J.E. Perturbation of manganese metabolism disrupt cell division in *Streptococcus pneumoniae* / J.E.Martin et al. // Mol. Microbiol. – 2017. – 10.1111.
12. Bonke, E. Manganese ions enhance mitochondrial H₂O₂ emission from Krebs cycle oxidoreductases by unducing permeability transition / E. Bonke et al. // Free Radic. Biol. Med. – 2016. – Vol. 99. – P. 43–53.
13. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / сост. С.С. Мельников [и др.]. – Минск: Беларус. навука, 2011. – 101 с.
14. Никандров, В.Н. Методы исследования протеолиза / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // Современные проблемы биохимии. Методы исследований. – Минск: Выш. шк., 2013. – Гл. 5. – С. 132-157.
15. Ильючик, И.А. Влияние ионов марганца *in vitro* на протеолитическую активность в супернатантах гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // Менделеевские чтения 2017. Сб. матер. Респ. научно-практ. конф. по химии и химическому образованию., Брест, 24 февраля 2017 г./ Брестский ГУ им. А.С.Пушкина; редкол. Н.С. Ступень [и др.]. – Брест, 2017. – С. 61–66.
16. Никандров, В.Н. Особенности влияния ионов Ni(II) и Mn(II) на расщепление белков-субстратов протеиназами / В.Н. Никандров, В.Н. Ильюкевич, Е.И. Петрова // Актуальные проблемы экологии. Матер. X междунар. научно-практ. конф., Гродно, 1–3 октября 2014 г.: в 2 ч./ ГрГУ им. Я. Купалы; редкол. В.Н. Бурдь [и др.]. – Гродно, 2014. – Ч. 1. – С. 181–183.
17. Ильючик, И.А. Влияние ионов марганца (II) на рост и казеиноподобную активность микроводоросли *Scenedesmus ecornis* / И.А. Ильючик, О.Н. Жук, В.Н. Никандров // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Междунар. научн. конф. Двенадцатый съезд Белорус. обществ. объединен. фотобиологов и биофизиков. Сб. статей. Ч. 2, Минск, 28–30 июня 2016 г. Изд. центр БГУ. редкол. И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2016. – С. 161–164.