

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ КЛЕТКИ *CHLORELLA VULGARIS***Никандров В.Н., Ильючик И.А.**

Полесский государственный университет

ул. Днепровской флотилии, 23, г. Пинск, 225710, Республика Беларусь; e-mail: irina.iliuchik@mail.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Методом лизиса в тонком слое агарового геля показано, что низкоскоростной супернатант гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* расщеплял казеин, желатин и фибриноген при pH 7,4 и 9,0. При pH 3,0 наблюдали только желатинолиз, а расщепление гемоглобина – лишь при pH 9,0. При добавлении в реакционную систему неорганического ортофосфата продемонстрирована реализация «фосфатного эффекта» в клетках фотосинтезирующей водоросли. Однако при действии неорганического ортофосфата выявлена новая особенность – зоны угнетения протеолитической активности, что не наблюдалась нами ранее на других объектах. В присутствии АТФ в концентрации 10^{-8} М казеинолитическая активность исследуемых образцов клеток *Ch. vulgaris* возрастала на 38%, а в концентрационном диапазоне 10^{-5} – 10^{-4} М – на 24–29%. Вместе с тем, расщепление фибриногена угнеталось при концентрациях этого эффектора 10^{-8} , 10^{-5} и 10^{-2} М на 29, 23 и 21 % соответственно. Влияние $MnCl_2$ в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-2} М на протеолитическую активность исследуемых образцов характеризовалось сложной концентрационной зависимостью, а также зависело от конкретного белка субстрата. В присутствии неорганического ортофосфата влияние катионов марганца изменялось при pH 7,4 и 9,0, но не в кислой среде. Характер изменений протеолитической активности клеток хлореллы при хлорозе позволяет думать, что состояние функциональной активности фотосинтетического аппарата отражают протеиназы, способные расщеплять казеин и фибриноген.

Ключевые слова: расщепление белков, хлорелла, низкоскоростной супернатант, влияние pH, неорганический ортофосфат, АТФ, $MnCl_2$, хлороз.

К числу универсальных механизмов регуляции жизнедеятельности организма относится протеолиз. Тотальный протеолиз (расщепление белка до малых пептидов и аминокислот) в физиологическом состоянии организма реализуется при пищеварении, разрушении элиминированных из биосистемы белков, тогда как ограниченный (расщепление весьма немногих пептидных связей, нередко – даже одной) играет важную регуляторную роль в целом ряде биохимических процессов.

В целом ряде случаев значение протеолиза превосходит таковое клеточное дыхание, ибо для анаэробных организмов кислородное дыхание не является необходимым условием жизни, однако и в анаэробии без реализации реакций протеолиза жизнедеятельность организма невозможна. Реакции протеолиза играют ключевую роль и практически во всех основных патологических процессах. Более того, существует достаточно большой «набор» заболеваний, обусловленных дефектом генов, кодирующих образование в организме компонентов протеолиза. В предыдущих статьях [1-3] мы уже кратко останавливались на этих аспектах проблемы.

Несмотря на эти обстоятельства, физико-химические механизмы реализации протеолитических реакций и их регуляция на молекулярном и клеточном уровне все еще далеки от полной ясности.

Здесь следует иметь в виду следующее.

Краеугольные проблемы протеолиза принципиально остаются прежними:

- механизм разрыва пептидной связи в ходе энзиматического катализа;
- механизмы регуляции протеолитических процессов на всех уровнях;
- функциональная целевая значимость протеолитических реакций и их компонентов.

Как мы уже рассматривали ранее [4], основными механизмами регуляции протеолиза следует считать:

- уровень биосинтеза энзимов (часто в виде зимогенов и презимогенов);
- постсинтетический процессинг, включающий гликозилирование, ограниченный протеолиз (в ряде случаев активация зимогенов осуществляется именно так) и др.;
- взаимодействие с эндогенными ингибиторами;
- метаболическая регуляция (например, в случае АТФ-зависимого протеолиза, Ca^{2+} -активируемых протеиназ и т.д.);
- конформационные изменения молекулы протеиназы, зависящие, например, от локального окружения, а также рецепторных взаимодействий;
- изменения взаимодействия со специфическими рецепторами клеточных и субклеточных мембран;
- изменения физико-химических свойств молекулы белка субстрата вследствие замены аминокислотных остатков, гидратации и других причин.

Особенно сложная и многоплановая область – метаболическая (метаболическая) регуляция протеолиза. Метаболитов огромное множество, представления об их влиянии на протеолитические процессы довольно ограничены. Тем более, что в конкретных организмах таковое влияние может осуществляться по-разному.

Это касается и фотосинтетических организмов, наделенных рядом метаболических особенностей, отсутствующих у гетеротрофов. К подобным организмам относятся одноклеточные зеленые водоросли, в частности, *Chlorella vulgaris*.

Однако, несмотря на то, что в последние десятилетия *Chlorella vulgaris* признана перспективным промышленным биотехнологическим объектом для получения ряда высокоценных целевых продуктов, включая препараты медицинского назначения [5], в литературе имеются весьма скудные данные об особенностях организации и регуляции системы протеолиза этой водоросли. Отчасти, по-видимому, такое положение объясняется огромным разнообразием одноклеточных организмов. Имеющиеся в литературе данные посвящены, главным образом, влиянию на протеолитическую активность клеток хлореллы хлорида марганца [6, 7]. Это диктует необходимость углубленного исследования организации системы протеолиза клетки *Chlorella vulgaris* и регуляции этой системы.

Целью настоящей работы явилось выяснение расщепления внутриклеточными протеиназами *Chlorella vulgaris* различных белков субстратов, влияние на протеолитическую активность pH реакционной смеси и присутствия отдельных эффекторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали казеин по Гаммерстену (Россия), гемоглобин быка и фибриноген человека фирмы «Sigma» (США), желатин фирмы «Fluka» (Германия), бактоагар фирмы «Melford» (США), АТФ-динатриевая соль фирмы «CarlRoth» (Германия), кумасси ярко-голубой (Coomassie Blue Brilliant G-250) фирмы «Appli Chem» (Германия), другие реактивы были производства стран СНГ марки «хч».

Исследования проведены на культуре *Ch. vulgaris*, штамм *IBCE C-19* из коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

Водоросль выращивали на среде Тамия [8], при температуре 25 ± 1 °С, непрерывном барботаже культуры воздухом 25,0 л/ч, освещенности 5000 Лк, фотопериоде (свет/темнота) – 12 ч / 12 ч. Посевная доза составляла $2,87 \pm 0,03$ млн/мл клеток.

В фазу логарифмического роста на 7-е сутки культивирования, используя камеру Горяева, определяли концентрацию клеток, отбирали аликвоты культуры по $120 \pm 6,19$ млн клеток, трижды отмывали в бидистиллированной воде.

Образцы клеток замораживали и хранили при температуре -20 °С.

Клетки *Ch. vulgaris* разрушали в гомогенизаторе при 4 °С в 0,5 мл бидистиллированной воды, гомогенат центрифугировали в течение 10 мин, при 8000 об/мин и 4 °С.

Протеолитическую активность полученных образцов определяли по лизису гемоглобина, желатина, казеина и фибриногена в тонком слое агарового геля как подробно описано ранее [9].

В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали: 0,06 М Na-K фосфатный буфер pH 7,4; 0,2 М ацетатный буфер pH 3,0; 0,05 М Tris-HCl буфер pH 7,4 или 9,0, а также указанные буферные растворы с добавлением 0,05 М KH_2PO_4 и Na_2HPO_4 . При исследовании влияния катионов марганца (II) к аликвотам образцов добавляли MnCl_2 в конечной концентрации 10^{-8} – 10^{-2} М, а в контрольный вариант – бидистиллированную воду.

Концентрация белков-субстратов в пластине составляла – 10 г/л, агар-агара – 10 г/л, объем наносимых образцов на готовые белок-агаровые пластины супернатантов гомогенатов клеток хлореллы – 10 мкл.

Пластины инкубировали при температуре 37 °С – 20 ч. Зоны лизиса визуализировали обработкой белок-агаровых пластин 1 н хлорной кислотой.

Состояние хлороза вызывали, выращивая водоросль в условиях периодической культуры на среде Тамия при температуре 29 ± 1 °С, непрерывном барботаже суспензии воздухом со скоростью 5,0 л/ч, освещенности на поверхности сосуда ≈ 5000 Лк, фотопериоде (свет/темнота) – 12 ч / 12 ч. Посевная доза составляла $4,85 \pm 0,08$ млн/мл клеток. В питательную среду экспериментальных вариантов вносили MnCl_2 до конечной концентрации 0,01 и 137,50 мг/л. В контрольном варианте соль марганца отсутствовала. На 1 и 7-е сутки культивирования, используя камеру Горяева, определяли концентрацию клеток, отбирали аликвоты культуры содержащие по $100 \pm 5,8$ млн клеток, трижды отмывали в бидистиллированной воде. Дальнейшую обработку вели как описано выше.

Эксперименты проведены шестикратно. Результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента (Statistica-6).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что супернатанты гомогенатов клеток хлореллы способны расщеплять все четыре белка субстрата, однако интенсивность расщепления существенно зависела **от pH реакционной системы** (таблица 1). Расщепление гемоглобина наблюдалось только в щелочной среде, тогда как при pH 3,0 протеиназы супернатантов гомогенатов клеток хлореллы расщепляли только желатин. Вместе с тем, ранее мы сообщали, что в подобных супернатантах отсутствуют протеиназы, имеющие оптимум pH в кислой среде [10].

Таблица 1. Влияние pH реакционной системы на расщепление белков субстратов супернатантами гомогенатов клеток хлореллы; растворители – 0,2 М ацетатный буфер pH 3,0, 0,05 М Tris-HCl буфер pH 7,4 или 9,0 (n = 6)

Величина pH	Площадь расщепления, мм ²			
	гемоглобина	желатина	казеина	фибриногена
3,0	0	55,34 ± 0,62	0	0
7,4	следы	73,29 ± 2,13	58,52 ± 1,66	42,02 ± 1,53
9,0	59,49 ± 1,85	85,86 ± 2,52	82,50 ± 3,28	75,10 ± 2,21

По-видимому, такая разница обусловлена неодинаковым функциональным состоянием клетки этой водоросли.

Основываясь на материалах изучения протеолитической активности ряда условно-патогенных микроорганизмов, мы также отмечаем, что хотя гемоглобин достаточно часто используют в качестве субстрата при изучении протеолитических процессов, он не всегда является оптимальным субстратом [11]. Как видно из полученных результатов, расщепление гемоглобина происходило только при pH 9,0.

Протеолиз же остальных трех белков заметно изменялся при сдвиге pH от 7,4 до 9,0. Во всех случаях наиболее интенсивно расщеплялся желатин. Однако, если при pH 7,4 желатин расщеплялся протеиназами хлореллы интенсивнее, чем казеин и фибриноген в 1,25 и 1,74 раза соответственно, то при pH 9,0 расщепление желатина отличалось от такового казеина и фибриногена лишь на 4 и 13% соответственно.

Это наводит на мысль о сложной системе протеолиза в клетках *Ch. vulgaris*, представленной набором энзимов, различающихся по типу активного центра и субстратной специфичности. Такое предположение вполне согласуется с результатами ингибиторного анализа [12].

Эффект неорганического ортофосфата. Ранее на очищенных энзимах, клетках животных и субклеточных фракциях нами было описано стимулирующее действие неорганического ортофосфата на реакции протеолиза (результаты обобщены в [1, 4, 13]). Причем, судя по данным ингибиторного анализа, включая действие разобщающего агента – 2,4-динитрофенола и цианида в ряде этот эффект не связан с ресинтезом АТФ. Это послужило основанием выдвинуть представление о существовании независимого от ресинтеза АТФ пути стимуляции протеолиза неорганическим ортофосфатом – «фосфатного эффекта».

Предварительные результаты показали, что в присутствии неорганического ортофосфата интенсивность протеолиза казеина и фибриногена существенно изменялась и различалась. Так, при концентрации неорганического ортофосфата 0,001-0,009 М фибриногенолитическая 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 (рис. 1).

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 (все перечисленные сдвиги статистически достоверны, $P \leq 0,05$).

В данном случае проявилась сложная концентрационная зависимость, демонстрирующая не только интенсификацию расщепления белков-субстратов, но и зоны его подавления. При этом, эта картина, которая в предыдущих исследованиях нами не была зафиксирована, повторялась во всех случаях постановки данного эксперимента.

Причина проявления подобной особенности эффекта анионов неорганического ортофосфата может быть связана с метаболической спецификой данного фотосинтезирующего объекта и требует проведения дальнейших углубленных исследований.

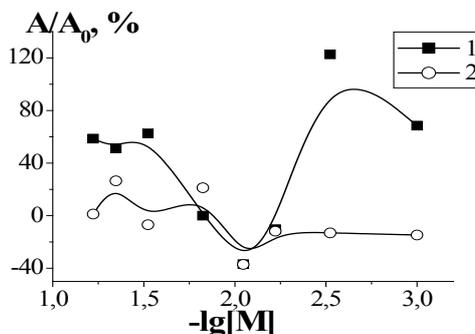


Рисунок 1. Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления казеина (1) или фибриногена (2) супернатантами гомогенатов *Chlorella vulgaris* при добавлении анионов неорганического ортофосфата, pH 7,4

Таблица 2. Расщепление белков субстратов супернатантами гомогенатов клеток хлореллы в присутствии 0,05 М KH_2PO_4 и Na_2HPO_4 ; растворители – 0,2 М ацетатный буфер pH 3,0, 0,05 М Tris-HCl буфер pH 7,4 или 9,0 (n = 6)

Величина pH	Площадь расщепления, мм ²			
	гемоглобина	желатина	казеина	фибриногена
3,0	0	53,45 ± 1,67	0	0
7,4	40,74 ± 1,20	74,13 ± 3,26	51,38 ± 0,64	83,41 ± 2,99
9,0	58,87 ± 1,73	107,55 ± 3,01	63,65 ± 1,00	80,77 ± 3,19

Дальнейшие исследования на четырех белках субстратах при разных значениях pH показали, что при pH 3,0 добавление неорганического ортофосфата (правда, в фиксированной и, весьма возможно, неоптимальной концентрации) не оказало влияния на протеолитическую активность супернатантов гомогенатов хлореллы (табл. 1 и 2). Однако при pH 7,4 в присутствии ортофосфата интенсивно расщеплялся гемоглобин, в 2 раза усиливалась фибринолитическая активность. В щелочной среде, при pH 9,0 активировалось расщепление желатина на 25 %, почти не изменялась фибринолитическая активность, а протеолиз казеина подавлялся на 23 % (табл. 1 и 2; все перечисленные сдвиги статистически достоверны, $P \leq 0,05$). Следует, тем не менее, еще раз подчеркнуть, что эффектор был использован в точечной, неоптимальной концентрации.

Эти результаты, на наш взгляд, достаточно наглядно демонстрируют, что и в фотосинтезирующем организме проявляется «фосфатный эффект». При этом действие неорганического ортофосфата имеет особенности, ранее не наблюдавшиеся в наших исследованиях.

Эффект АТФ. Как мы уже отмечали в предыдущее статье [4], в последние десятилетия обнаружен феномен АТФ-активируемого протеолиза. Именно за открытие АТФ-активируемого убиквитин-опосредованного протеолиза и его роли в физиологии клетки в 2007 году А. Цехановеру, А. Гершко и И. Розе присуждена Нобелевская премия по химии. Описан также ряд протеиназ, которые активируются добавлением АТФ, причем, замена его нуклеотидом с меньшим количеством макроэргических связей, ведет к снижению такого эффекта. Механизм этого явления пока остается неясным.

В 1987 году нами был обнаружен и описан эффект противоположного плана. АТФ оказался способным подавлять активацию плазминогена стрептокиназой [14]. Этот эффект не зависел от количества макроэргических связей в нуклеotide – SK-зависимая активация зимогена оказалась индифферентной к АДФ, ГТФ, ЦТФ и подавлялась еще лишь 3',5'-АМФ. Затем было обнаружено подавление АТФ в концентрации 0,01М фибринолитической активности протеиназы гриба *Arthrobotrys longa* [4].

В настоящем исследовании было установлено, что в присутствии АТФ в концентрации 10^{-8} М казеинолитическая активность исследуемых образцов клеток *Ch. vulgaris* возростала на 38 %, а в концентрационном диапазоне 10^{-5} – 10^{-4} М – на 24–29 % (табл. 3, рису. 2). Вместе с тем, расщепление фибриногена угнеталось при концентрациях этого эффектора 10^{-8} , 10^{-5} и 10^{-2} М на 29, 23 и 21 % соответственно.

Следовательно, действие АТФ характеризуется сложной концентрационной зависимостью и существенно зависит от белка субстрата. Это полностью согласуется с ранее полученными нами результатами в экспериментах на очищенных образцах протеиназ различного типа [15]. При этом были выявлены два момента:

– в ряде случаев было зафиксировано ингибирование АТФ в концентрации 10^{-3} М протеолитической активности пепсина, металлопротеиназы бацилл, а при большей концентрации нуклеотида – активности трипсина, химотрипсина, пепсина. Направленность и сила эффекта существенно зависели от белка субстрата. Это расширяло представления о феномене АТФ-ингибируемых реакций протеолиза, но его природа остается нераскрытой;

Таблица 3. Расщепление белков-субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* в присутствии АТФ; растворитель – 0,15 М раствор хлорида натрия pH 7,4 (n = 6)

Концентрация АТФ, М	Площадь расщепления, мм ²	
	казеина	фибриногена
Контроль (без добавок)	65,5 ± 3,8	66,2 ± 2,8
10^{-2}	77,4 ± 1,1*	52,0 ± 1,2*
10^{-3}	76,7 ± 6,7	58,7 ± 2,5
10^{-4}	84,2 ± 4,1*	64,3 ± 1,7
10^{-5}	80,6 ± 4,2*	50,9 ± 0,6*
10^{-6}	69,0 ± 2,4	60,9 ± 3,3
10^{-7}	71,6 ± 3,4	59,4 ± 2,0
10^{-8}	90,7 ± 2,5*	46,8 ± 1,3*

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

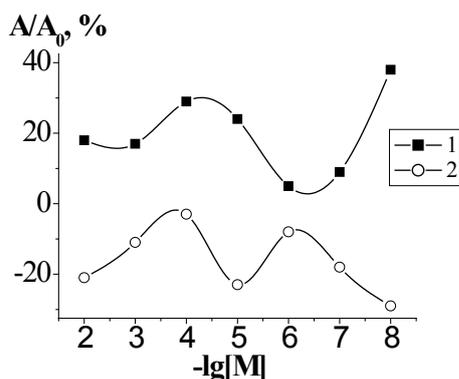


Рисунок 2. Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления казеина (1) или фибриногена (2) супернатантами гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* при добавлении АТФ, рН 7,4

– оказалось, что феномен АТФ-активированного и непосредственного убиквитином протеолиза распространен шире, чем это принято считать. Фактически до наших исследований активация протеолиза АТФ в подобной ситуации была показана только в отношении папаина. Мы же наблюдали этот эффект при расщеплении белков трипсином, химотрипсином, субтилизином, пепсином, а также металлопротеиназой бацилл. Механизм такой стимуляции также нуждается в проведении дальнейших исследований, тем более что в литературе нет сообщений о возможности аутофосфорилирования молекул использованных нами протеиназ.

Столь сложная и неодноплановая картина была установлена ранее на индивидуальных протеиназах. В настоящем же исследовании мы имели дело со сложной многокомпонентной системой – содержащими ряд внутриклеточных органоидов супернатантами гомогенатов клеток фотосинтезирующей водоросли. В этом аспекте необходимо проведение дальнейших исследований протеолитической активности субклеточных фракций клеток хлореллы.

Эффект катионов Mn^{2+} . К метаболическим факторам регуляции протеолиза вполне закономерно отнести и микроэлементы, в частности, марганец. Он входит в состав целого ряда ферментов, способствует интенсификации реакций карбоксилирования [16, 17]. Без марганца невозможен фотосинтез у растений и цианобактерий – при его отсутствии хлорофилл быстро разрушается на свету [16, 18]. В экстенсивной культуре при высоком содержании марганца длительно сохраняется жизнеспособность микроводорослей [5]. Однако, несмотря на важную роль марганца в живых организмах и обстоятельное изучение его биологической роли, данные литературы о влиянии солей марганца на протеолитические процессы фрагментарны [6, 7, 19–21].

Установлено, что влияние $MnCl_2$ на протеолитическую активность исследуемых образцов характеризовалось сложной концентрационной зависимостью. Так, при рН 3,0 изменения желатинолитической активности, в целом, не превышали 19%. Однако при концентрации эффектора 10^{-4} – 10^{-2} М наблюдалось ее снижение на 12–17 %, тогда как при концентрациях 10^{-8} и 10^{-7} М – повышение на 19 и 13 % соответственно (табл. 4, рис. 3).

Усиление расщепления желатина и казеина при рН 7,4 в присутствии данного эффектора не превысило 19 %, и лишь лизис фибриногена возрос в 1,6–1,8 раза. При рН 9,0 выявлено усиление лизиса гемоглобина в диапазоне концентраций 10^{-2} – 10^{-6} М $MnCl_2$ с максимумом эффекта при 10^{-2} М – в 2,1 раза, тогда как лизис желатина возрос только на 13 % при максимальной концентрации соли, а при более низких концентрациях угнетался на 18–27% (табл. 4, рис. 4а, б).

В присутствии неорганического ортофосфата влияние катионов марганца изменялось. Правда, в кислой среде их эффект принципиально не отличался от описанного выше: при концентрации катионов металла 10^{-5} – 10^{-4} М наблюдалось снижение желатинолитической активности на 10–12 %, тогда как при концентрации 10^{-8} – 10^{-7} М – повышение на 16 % (табл. 5, рис. 3). При рН 7,4 четко проявилось расщепление гемоглобина, оно усиливалось при добавлении хлорида марганца в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-4} М на 20–45 %, концентрационная зависимость приближалась к линейной с максимумом эффекта при концентрации $MnCl_2$ 10^{-8} – 10^{-4} М. Лизис же фибриногена в этих условиях при добавлении Mn^{2+} усилился вдвое (табл. 5, рис. 4б).

На фоне ортофосфата при добавлении $MnCl_2$ желатинолитическая активность возросла на 12–60 %, а лизис казеина – на 11–54 % в обоих случаях с максимумом при 10^{-7} М $MnCl_2$. Однако лизис фибриногена, как правило, слабо угнетался с максимумом 16 и 19 % при концентрации соли 10^{-3} и 10^{-2} М соответственно.

В щелочной среде, при рН 9,0 в присутствии неорганического ортофосфата расщепление гемоглобина, желатина и казеина (но не фибриногена) возрастало на 45, 45 и 24% соответственно (табл. 1 и 2).

Таблица 4. Протеолитическая активность супернатантов гомогенатов клеток хлореллы при добавлении $MnCl_2$ in vitro; растворители – 0,2 М ацетатный буфер pH 3,0; 0,05 М Tris-HCl буфер pH 7,4 или 9,0 (n = 6)

Концентрация $MnCl_2$, М	Площадь расщепления, мм ²			
	гемоглобина	желатина	казеина	фибриногена
	pH 3,0			
Контроль	0	55,34 ± 0,62	0	0
10 ⁻²	0	48,58 ± 1,70*	0	0
10 ⁻³	0	45,95 ± 1,06*	0	0
10 ⁻⁴	0	46,00 ± 2,35*	0	0
10 ⁻⁵	0	55,41 ± 1,66	0	0
10 ⁻⁶	0	55,54 ± 1,03	0	0
10 ⁻⁷	0	62,74 ± 1,42*	0	0
10 ⁻⁸	0	65,88 ± 2,18*	0	0
	pH 7,4			
Контроль	следы	73,29 ± 2,13	58,52 ± 1,66	42,02 ± 1,53
10 ⁻²	следы	82,32 ± 2,05*	62,61 ± 4,13	56,24 ± 2,50*
10 ⁻³	0	75,04 ± 3,91	66,15 ± 1,98*	56,94 ± 2,15*
10 ⁻⁴	0	76,09 ± 1,60	67,24 ± 2,35*	42,96 ± 1,53
10 ⁻⁵	0	80,89 ± 2,37*	64,72 ± 1,55*	74,87 ± 1,05*
10 ⁻⁶	0	78,61 ± 0,64*	68,83 ± 2,06*	42,78 ± 0,88
10 ⁻⁷	0	79,62 ± 1,05*	69,51 ± 2,65*	67,77 ± 1,44*
10 ⁻⁸	0	71,04 ± 2,73	66,99 ± 2,90*	45,68 ± 2,44
	pH 9,0			
Контроль	59,49 ± 1,85	85,86 ± 2,52	82,50 ± 3,28	75,10 ± 2,21
10 ⁻²	122,25 ± 2,88*	97,15 ± 1,98*	67,95 ± 2,58*	81,87 ± 2,60
10 ⁻³	97,77 ± 0,91*	87,73 ± 4,18	78,45 ± 2,35	74,92 ± 1,86
10 ⁻⁴	70,07 ± 1,07*	79,12 ± 2,13	69,30 ± 2,97*	66,53 ± 2,12*
10 ⁻⁵	62,12 ± 1,13	72,23 ± 2,35*	74,90 ± 2,14	68,05 ± 1,99*
10 ⁻⁶	62,08 ± 1,62	70,86 ± 2,18*	57,73 ± 1,43*	65,93 ± 1,91*
10 ⁻⁷	54,78 ± 1,02	70,75 ± 1,95*	75,72 ± 2,67	74,24 ± 1,29
10 ⁻⁸	51,96 ± 0,86*	62,61 ± 2,56*	57,31 ± 2,78*	67,49 ± 1,86*

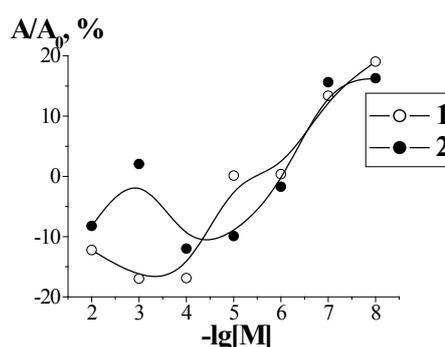


Рисунок 3. Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления желатина супернатантами гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* под действием хлорида марганца при pH 3,0 в отсутствие (1) или в присутствии (2) неорганического ортофосфата

Таблица 5. Влияние ортофосфата на расщепление белков-субстратов супернатантами гомогенатов клеток хлореллы при добавлении $MnCl_2$ in vitro; растворители – 0,2 М ацетатный буфер pH 3,0; 0,05 М Tris-HCl буфер, pH 7,4 или 9,0 (n = 6)

Концентрация $MnCl_2$, М	Площадь расщепления, мм ²			
	гемоглобина	желатина	казеина	фибриногена
	pH 3,0			
Контроль	0	53,45 ± 1,67	0	0
10 ⁻²	0	49,05 ± 0,44*	0	0
10 ⁻³	0	54,54 ± 1,47	0	0
10 ⁻⁴	0	47,03 ± 1,32*	0	0
10 ⁻⁵	0	48,15 ± 1,32*	0	0
10 ⁻⁶	0	52,53 ± 3,04	0	0
10 ⁻⁷	0	61,81 ± 1,50*	0	0
10 ⁻⁸	0	62,15 ± 1,14*	0	0
	pH 7,4			
Контроль	40,74 ± 1,20	74,13 ± 3,26	51,38 ± 0,64	83,41 ± 2,99
10 ⁻²	39,57 ± 1,03	82,93 ± 3,83	57,96 ± 0,95*	67,50 ± 2,23*
10 ⁻³	42,62 ± 0,76	83,31 ± 3,12	57,11 ± 1,54*	70,03 ± 2,67*
10 ⁻⁴	49,03 ± 1,01*	88,35 ± 3,67*	58,05 ± 1,08*	90,38 ± 4,14
10 ⁻⁵	52,61 ± 1,65*	102,59 ± 1,94*	54,00 ± 1,32	79,88 ± 1,69
10 ⁻⁶	54,43 ± 0,98*	90,51 ± 2,12*	68,58 ± 2,88*	85,41 ± 3,95
10 ⁻⁷	55,28 ± 1,74*	118,63 ± 5,01*	79,40 ± 2,27*	78,70 ± 2,55
10 ⁻⁸	59,12 ± 1,74*	102,44 ± 4,11*	74,02 ± 2,68*	82,33 ± 3,44
	pH 9,0			
Контроль	58,87 ± 1,73	107,55 ± 3,01	63,65 ± 1,00	80,77 ± 3,19
10 ⁻²	56,87 ± 2,66	78,92 ± 3,34*	39,64 ± 1,26*	76,24 ± 1,66
10 ⁻³	57,13 ± 2,42	96,56 ± 2,99*	54,71 ± 1,78*	67,73 ± 1,33*
10 ⁻⁴	54,92 ± 1,02	116,93 ± 2,42*	58,84 ± 1,33*	77,91 ± 3,05
10 ⁻⁵	55,88 ± 2,11	117,54 ± 2,48*	70,62 ± 1,36*	89,01 ± 1,39*
10 ⁻⁶	61,85 ± 2,09	132,12 ± 3,16*	64,93 ± 1,39	78,02 ± 1,97
10 ⁻⁷	61,64 ± 0,95	121,10 ± 2,68*	70,02 ± 2,09*	76,05 ± 3,59
10 ⁻⁸	64,24 ± 2,46	109,86 ± 1,62	76,31 ± 1,74*	74,81 ± 2,60

При этом во всем диапазоне концентраций $MnCl_2$ гемолизирующая активность супернатантов гомогенатов хлореллы практически не менялась: колебания не превысили 9 %. Расщепление желатина подавлялось на 27 и возросло на 23 % при добавлении соли марганца в концентрации 10⁻² и 10⁻⁶ М соответственно (табл. 5, рис. 4з). На лизис казеина добавление в данных условиях эффектора, в целом, влияло слабо – колебания активности не превысили 14 %, и лишь при концентрации 10⁻² М выявлено подавление процесса на 38 %, а при минимальной концентрации – рост на 20 %. Еще меньшие сдвиги выявлены в расщеплении фибриногена: они не превысили 10%, и лишь при концентрации $MnCl_2$ 10⁻³ М падение активности достигало 16 %.

Состояние хлороза. Учитывая, что хлорелла является фотосинтезирующим автотрофом, изучена протеолитическая активность супернатантов гомогенатов хлореллы при хлорозе, вызванном добавлением в питательную среду хлорида марганца при изменении условий культивирования (см. методическую часть).

В контроле к 7-м суткам культивирования уровень биомассы нарастал с 3,81 ± 0,14 до 5,41 ± 0,63 млн. клеток/мл, в состоянии хлороза 7-м суткам находились 32,2% клеток (n = 6). При добавлении в питательную среду хлорида марганца в концентрации 0,01 мг/л в этот период времени уровень биомассы увеличился с 3,83 ± 0,19 до 4,25 ± 0,14 млн. клеток/мл, а в состоянии хлороза находились 79,3% клеток. В то же время при увеличении содержания марганца в питательной среде до 137,5 мг/л концентрации биомассы возросла с 5,37 ± 0,42 до 11,94 ± 0,50 млн. клеток/мл, но состояния хлороза не наблюдалось.

В этих условиях в контроле на 7-е сутки желатинолитическая активность при pH 7,4 практически не менялась, тогда как казеинолитическая снижалась на 61 %, а фибринолитическая увеличилась в 2,5 раза (табл. 6).

При добавлении хлорида марганца в концентрации 0,01 мг/л на 7-е сутки (выраженный хлороз, превосходивший контроль более чем в 2 раза) казеинолитическая активность уменьшалась лишь на 37 %, а фибринолитическая возросла только на 34 %.

При максимальной концентрации хлорида марганца в питательной среде, когда явления хлороза практически не наблюдалось, на 7-е сутки культивирования казеинолитическая активность падала на 68 %, но при этом на 20 % снижалась и фибринолитическая активность.

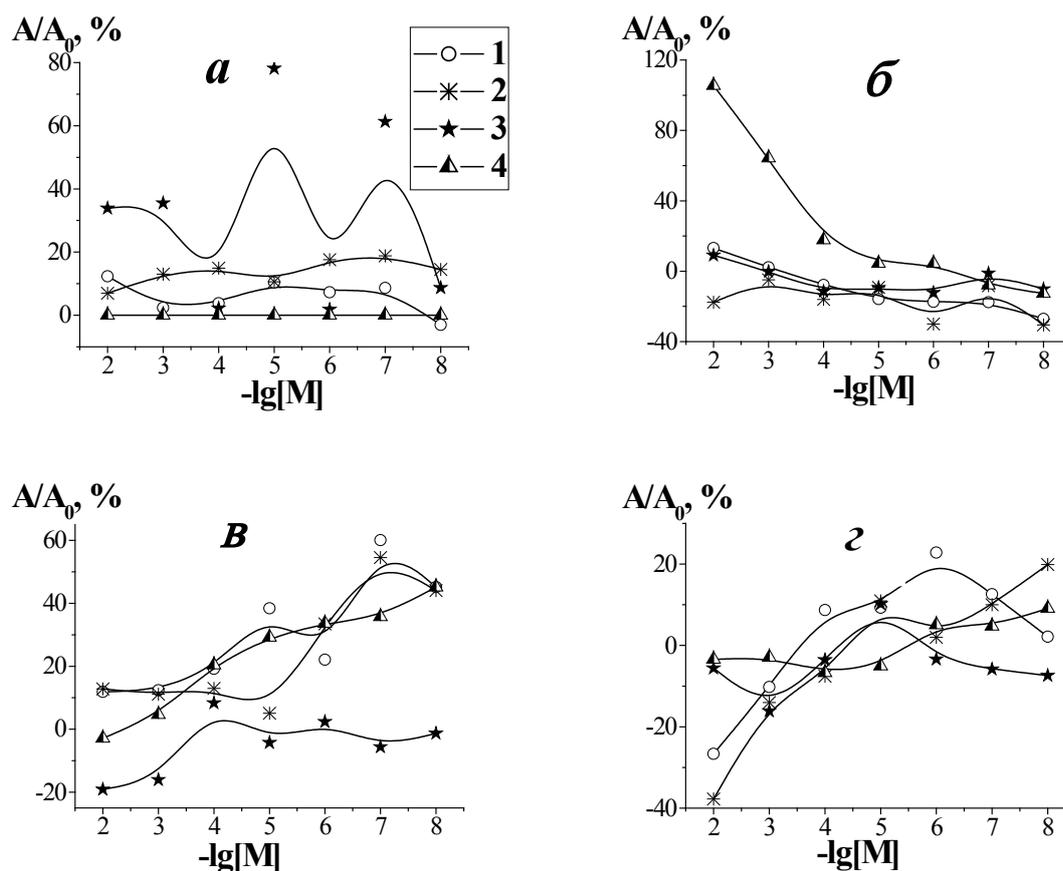


Рисунок 4. Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления желатина (1), казеина (2), фибриногена (3), гемоглобина (4) супернатантами гомогенатов клеток хлореллы при pH 7,4 (*a, б*) или pH 9,0 (*б, з*) без добавления ортофосфата (*a, б*) или при его добавлении (*б, з*)

Разумеется, эти результаты носят предварительный характер, однако складывается впечатление, что состояние функциональной активности фотосинтетического аппарата отражают протеиназы, способные расщеплять казеин и фибриноген.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты, на наш взгляд, дают основания считать, что клетка *Ch. vulgaris* обладает многоплановым развитым набором протеиназ, различающихся по типу активного центра и субстратной специфичности. Получено доказательство, что и в фотосинтезирующем организме проявляется «фосфатный эффект» в протеолизе. При этом действие неорганического ортофосфата имеет особенности, ранее не наблюдавшиеся в наших исследованиях – зоны подавления протеолитической активности. АТФ в широком

Таблица 6. Протеолитическая активность супернатантов гомогенатов клеток хлореллы при добавлении $MnCl_2$ в питательную среду; растворитель – 0,06 М фосфатный буфер, pH 7,4 (n = 6)

Концентрация $MnCl_2$, мг/л	Площадь расщепления, мм ²					
	желатина		казеина		фибриногена	
	Время культивирования, сутки					
	1-е	7-е	1-е	7-е	1-е	7-е
Контроль	49,72 ± 3,48	51,36 ± 3,75	86,66 ± 4,59	33,59 ± 1,22	14,26 ± 1,19	35,47 ± 1,27
0,01	59,99 ± 1,26*	63,46 ± 2,58*	78,67 ± 3,19	49,68 ± 1,74*	26,07 ± 1,48*	34,99 ± 2,29
137,50	57,63 ± 0,30	60,39 ± 5,03	97,24 ± 4,23	30,68 ± 3,11	48,28 ± 2,54*	38,61 ± 2,06

диапазоне концентраций (10^{-8} – 10^{-2} М), в целом, умеренно стимулировал казеинолитическую активность внутриклеточных протеиназ хлореллы, но угнетал расщепление фибриногена. Это полностью согласуется с ранее изложенными в наших статьях результатами о зависимости эффекта АТФ от белка субстрата и конкретного энзима. Влияние $MnCl_2$ на протеолитическую активность исследуемых образцов характеризовалось сложной концентрационной зависимостью, зависящей от конкретного субстрата, рН реакционной системы. Причем, в присутствии неорганического ортофосфата влияние катионов марганца изменялось, но не в кислой среде.

Изложенное наглядно демонстрирует сложную регуляцию внутриклеточного протеолиза фотосинтетической водоросли *Ch. vulgaris* и вносит вклад в развитие ранее обнаруженных феноменов «фосфатного эффекта» в протеолизе и АТФ-ингибируемых протеолитических реакций.

Более того, полученные данные позволяют предполагать, что состояние функциональной активности фотосинтетического аппарата отражают протеиназы, способные расщеплять казеин и фибриноген.

*Авторы выражают благодарность сотрудникам Республиканского альгологического центра Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси за предоставленную возможность работы со штаммом *Chlorella vulgaris*.*

Список литературы / References:

1. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Протеолиз как универсальный механизм регуляции биохимических и биологических процессов. Дискуссионные аспекты. *Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук*, 2008, № 1, с. 4-22. [Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Proteolysis as a universal mechanism of regulation of biochemical and biological processes. Discussion aspects. *Izvestiya NAN Belarusi. Seriya meditsin. nauk*, 2008, no. 1, pp. 4-22. (In Russ.)]
2. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Реализация и регуляция протеолитических процессов на молекулярном и клеточном уровне. *Здравоохранение*, 2006, № 11, с. 4-9. [Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Realization and regulation of proteolytic processes at the molecular and cellular level. *Zdravooxranenie*, 2006, no. 11, pp. 4-9. (In Russ.)]
3. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Регуляция протеолиза как патогенетического звена. Некоторые проявления на молекулярном и клеточном уровнях. *Матер. II научно-практ. конфер. «Современные проблемы инфекционной патологии человека (вирусология, микробиология, иммунология, эпидемиология, клиника)»*, Минск, 2001, с. 318-338. [Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Regulation of proteolysis as a pathogenetic link. Some manifestations at the molecular and cellular levels. *Proceedings of II Science-Practical Conference «Sovremennyye problemyi infektsionnoy patologiii cheloveka (virusologiya, mikrobiologiya, immunologiya, epidemiologiya, klinika)»*, Minsk, 2001, pp. 318-338. (In Russ.)]
4. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Нетривиальные проявления протеолиза на молекулярном и клеточном уровнях, их фундаментальное и прикладное значение. *Новости медико-биол. наук*, 2010, № 3, с. 14-28. [Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Nontrivial manifestations of proteolysis at the molecular and cellular levels, their fundamental and applied importance. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*, 2010, no. 3, pp. 14-28. (In Russ.)]
5. Лукьянов В.А., Стифеев А.И. *Прикладные аспекты применения микроводорослей в агроценозе*. Курск: Изд-во Курской гос. сельскохозяй. академии, 2014, 181 с. [Lukyanov V.A., Stifeev A.I. *Applied aspects of microalgae application in agrocenosis*. Kursk: Izdatelstvo Kurskoy gosudarstvennoy selskohozyaystvennoy akademii, 2014, 181 p. (In Russ.)]
6. Ильючик И.А., Никандров В.Н. Влияние ионов марганца *in vitro* на протеолитическую активность в супернатантах гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris*. *Сб. матер. Междунар. науч.-практ. конф. по химии и хим. образованию «Менделеевские чтения 2017»*, Брест, 2017, с. 61-66. [Ilyuchik I.A., Nikandrov V.N. Influence of manganese ions *in vitro* on proteolytic activity in supernatants of homogenates of *Chlorella vulgaris* cells. *Proceedings of International Science-Practical Conference in Chemistry and Chemistry Education «Mendeleevskie chteniya 2017»*, Brest, 2017, pp. 61-66. (In Russ.)]
7. Никандров В.Н., Ильючик И.А., Жук О.Н. Изменения расщепления белков субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* при действии анионов неорганического фосфата и марганца (II) *in vitro*. *Животноводство и ветеринарная медицина*, 2017, № 4 (27), с. 67-71. [Nikandrov V.N., Ilyuchik I.A., Zhuk O.N. Changes in the cleavage of substrate proteins by supernatants of *Chlorella vulgaris* cell homogenates under the action of inorganic phosphate and manganese (II) anions *in vitro*. *Zhivotnovodstvo i veterinarnaya meditsina*, 2017, no. 4 (27), pp. 67-71. (In Russ.)]
8. *Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / сост. С.С. Мельников [и др.]*. – Минск: Беларуская навука, 2011, 101 с. [Melnikov S.S. et al. Catalog of the genetic fund of economically useful species of algae. Minsk: *Belaruskaya navuka*, 2011, 101 p. (In Russ.)]
9. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Методы исследования протеолиза. *Современные проблемы биохимии. Методы исследований*. Минск: Выш. шк., 2013, с. 132-157. [Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Methods for the study of proteolysis. *Sovremennyye problemyi biohimii. Metody issledovaniy*. Minsk: Visheysheyshaya shkola, 2013, pp. 132-157. (In Russ.)]
10. Ильючик И.А., Никандров В.Н. Особенности расщепления белков-субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* при различном значении рН. *Сб. матер. Междунар. науч.-практ. конф. по химии и хим. образованию «Менделеевские чтения 2018»*, Брест, 2018, с. 51-55. [Ilyuchik I.A., Nikandrov V.N. Features of the cleavage of protein substrates with supernatants of *Chlorella vulgaris* cell homogenates at different pH

values. *Proceedings of International Science-Practical Conference in Chemistry and Chemistry Education «Mendeleevskie chteniya 2018»*, Brest, 2018, pp. 51-55. (In Russ.)]

11. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. Особенности набора «нейтральных» протеиназ патогенных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Сб. научн. трудов «Современные проблемы инфекционной патологии человека», вып. 7, Минск, 2014, с. 216-223. [Pyzhova N.S., Nikandrov V.N. Features of a set of «neutral» proteinases of pathogenic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Digest of scientific works «Sovremennyye problemyi infektsionnoy patologii cheloveka»*, iss. 7, Minsk, 2014, pp. 216-223. (In Russ.)]

12. Ильючик И.А., Никандров В.Н. Особенности организации системы протеолиза в клетках *Chlorella vulgaris*. Тез. докл. Междунар. науч. конф., тринадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», Минск, 2018, с. 112. [Ilyuchik I.A., Nikandrov V.N. Features of the organization of the proteolysis system in *Chlorella vulgaris* cells. *Tez. doc. Intern. sci. conference, the thirteenth congress of the Belarusian public association of photobiologists and biophysicists «Molekulyarnyye, membrannyye i kletochnyye osnovyyi funktsionirovaniya biosistem»*, Minsk, 2018, p. 112. (In Russ.)]

13. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Some unusual manifestation of proteolysis. *Cellular and Molecular Biology*, 2006, vol. 52, no. 4, pp. 30-39.

14. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Вотяков В.И. Влияние адениловых нуклеотидов на активаторную функцию стрептокиназы. *Бюлл. exper. биол. мед.*, 1987, т. 104, № 7, с. 49-51. [Nikandrov V.N., Pyzhova N.S., Votyakov V.I. Effect of adenyl nucleotides on the activator function of streptokinase. *Byulleten eksperimentalnoy biol. Meditsinyi*, 1987, vol. 104, no. 7, pp. 49-51. (In Russ.)]

15. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена. *Биорг. химия*, 2008, т. 34, № 3, с. 382-391. [Pyzhova N.S., Nikandrov V.N. Influence of biogenic phosphates on the protein splitting with proteinases and the function of plasminogen activators. *Bioorganicheskaya khimiya*, 2008, vol. 34, no. 3, pp. 382-391. (In Russ.)]

16. Schmidt S.B., Jensen P.E., Husted S. Manganese deficiency in plants: the impact photosystem II. *Trends Plant Sci.* 2016, vol. 21, no. 7, pp. 622-632.

17. Bonke E. [et al.] Manganese ions enhance mitochondrial H₂O₂ emission from Krebs cycle oxidoreductases by unducing permeability transition. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, vol. 99, pp. 43-53.

18. Lin Y.T., Hoang H., Hsieh S.I., Rangel N., Foster A.L., Sampayo J.N., Lithgow G.J., Srinivasan C. Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short-lived *Caenorhabditis elegans* mutant. *Free Radic. Biol. Med.*, 2006, vol. 40, no. 7, pp. 1185-1193.

19. Никандров В.Н., Ильюкевич В.Н., Петрова Е.И. Особенности влияния ионов Ni(II) и Mn(II) на расщепление белков-субстратов протеиназами. Матер. X междунар. научно-практ. конф. «Актуальные проблемы экологич. ч. 1», Гродно, 2014, с. 181-183. [Nikandrov V.N., Ilyukevich V.N., Petrova E.I. Features of the influence of Ni (II) and Mn (II) ions on the cleavage of protein-substrates by proteinases. *Proceedings of X International Science-Practical Conference «Aktualnyye problemyi ekologich. ch. 1»*, Grodno, 2014, pp. 181-183. (In Russ.)]

20. Ильючик И.А., Никандров В.Н., Жук О.Н. Влияние ионов марганца(II) на рост и казеинолитическую активность микроводоросли *Scenedesmus ecornis*. Сб статей Междунар. науч. конф., двенадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем, ч. 2». Минск, 2016, с. 161-164. [Ilyuchik I.A., Nikandrov V.N., Zhuk O.N. Influence of manganese (II) ions on the growth and caseinolytic activity of microalgae *Scenedesmus ecornis*. *Sat articles of the Intern. sci. Conf., the twelfth congress of the Belarusian public association of photobiologists and biophysicists «Molekulyarnyye, membrannyye i kletochnyye osnovyyi funktsionirovaniya biosistem, ch. 2»*. Minsk, 2016, pp. 161-164. (In Russ.)]

21. Жук О.Н., Ильючик И.А., Кульгавеня А.Д., Никандров В.Н. Влияние хлорида марганца (II) на протеолитическую активность гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании. *Вестник Полесского гос. ун-та. Сер. природоведения*, 2017, № 2, с. 62-68. [Zhuk O.N., Ilyuchik I.A., Kulgavenya A.D., Nikandrov V.N. The effect of manganese chloride (II) on the proteolytic activity of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with deep cultivation. *Vestnik Polesskogo gos. un-ta. Ser. prirodovedeniya*, 2017, no. 2, pp. 62-68. (In Russ.)]

PHYSICO-CHEMICAL FEATURES OF PROTEOLYTIC PROCESSES REALIZATION OF *CHLORELLA VULGARIS* CELL

Nikandrov V.N., Ilyuchyk I.A.

Polesky State University

Dnieper flotilla St, 23, Pinsk, 225710, Republic of Belarus; e-mail: irina.iliuchik@mail.ru

Abstract. It was shown that the low-speed supernatant of *Chlorella vulgaris* homogenates cleaved casein, gelatin and fibrinogen at pH 7.4 and 9.0. Only gelatinolysis was observed at pH 3.0, and hemoglobin cleavage – only at pH 9.0. When inorganic orthophosphate was added to the reaction system the "phosphate effect" in the photosynthesizing alga cells was demonstrated. The inorganic orthophosphate effect was accompanied with zones of proteolytic activity depressing. It was not observed on other objects earlier. In the presence of ATP concentrations 10^{-8} , 10^{-5} – 10^{-4} M caseinolytic activity of *Ch. vulgaris* cells was increased for 38 and 24–29%. At the same time, the fibrinogenolysis was oppressed at ATP concentrations 10^{-8} , 10^{-5} and 10^{-2} M for 29, 23 and 21% respectively. The effect of $MnCl_2$ in 10^{-8} – 10^{-2} M on proteolytic activity of the studied examples was characterized by the complex concentration dependence and also depended on concrete protein substrate. In the presence of inorganic orthophosphate, the effect of manganese cations changed at pH 7.4 and 9.0, but not in acidic environment. The nature of changes of chlorella cell proteolytic activity at a chlorosis allows us to think that the functional activity state of the photosynthetic apparatus is reflected by the proteinases degrading both casein and fibrinogen.

Key words: protein cleavage, chlorella, low-rate supernatant, pH effect, inorganic orthophosphate, ATP, $MnCl_2$, chlorosis.