

Властивості високомолекулярної АТР-залежної протеїнази з еритроїдних клітин поросят

Г. Л. Антоняк

Інститут землеробства і біології тварин УААН, Львів
Вул. В. Стуса, 38, Львів, 084, Україна

Представлено результати досліджень властивостей високомолекулярної АТР-залежної протеїнази, виділеної з еритроїдних клітин крові поросят раннього віку. Молекулярна маса протеїнази становить 700 ± 50 кДа, найвища активність виявляється при рН 8,5. Активність ферменту знижується під впливом інгібіторів серинових і цистеїнових протеїназ та підвищується за присутності додецилсульфату натрію і лінолевої кислоти. Активність протеїнази досягає високого рівня в проліферуючих еритробластих кісткового мозку та зменшується при дозріванні еритроїдних клітин. В еритроїдних клітинах новонароджених і 30-добових поросят активність протеїнази є вищою, ніж у клітинах 5–10-добових тварин. Обговорюється роль високомолекулярної АТР-залежної протеїнази у функціональній активності еритроїдних клітин.

Вступ. Процеси протеолізу відіграють важливу роль у функціональній активності організму тварин і людини, забезпечуючи не лише обмін білкових молекул і поповнення амінокислотного пулу клітин, але й активацію проферментів, утворення пептидних гормонів та інших біологічно активних поліпептидів [1–5]. У ряді експериментальних робіт встановлено стимулюючий вплив АТР на інтенсивність внутрішньоклітинного розщеплення білків [6, 7]. У клітинах тварин і людини виявлено протеолітичні системи, які функціонують за участю цього або інших макроергічних фосфатів. Серед АТР-залежних внутрішньоклітинних протеаз важливе місце посідає високомолекулярний комплекс під назвою «мультикаталітична протеїназа», виявлений в більшості типів клітин тварин і людини [8, 9]. Показано, що цей комплекс може локалізуватися як у цитоплазмі, так і в ядрі клітин, а його субстратами є недовговічні внутрішньоклітинні білки, рецептори, фактори транскрипції [10–12]. У зв'язку з цим вважають, що високомолекулярна протеїназа виконує регуляторну роль у клітинах, для яких характерна висока швидкість проліферації і диференціації [2, 7, 9, 13]. Роль високомолекулярної протеїнази в гемопоезі — процесі, при якому відбувається постійне утворення і

диференціювання клітин, а також у змінах білкового складу еритроцитів при їхньому дозріванні на даний час з'ясована мало [14, 15], що зумовлює актуальність проведення експериментальних робіт у цьому напрямку.

З огляду на вищевикладене в представленій роботі досліджувалися властивості ферменту, виділеного з еритроїдних клітин поросят, та змін активності протеїнази, пов'язаних з віком тварин, а також при дозріванні еритробластів до функціонально активних клітин крові.

Матеріали і методи. Для досліджень використовували гемопоетичну тканину кісткового мозку і кров новонароджених, 1, 3, 5, 10 і 30-добових поросят.

Кістковий мозок виділяли зі стегнових кісток після декапітації та обезкровлення тварин. Гемопоетичну тканину вимивали розчином А, який містив: 0,3 М лактозу, 0,002 М EDTA, 0,153 М NaCl, 0,005 М MgCl₂ [16, 17]. Тканину кісткового мозку суспендували в десятикратному об'ємі розчину А за допомогою шприца і голки № 25 та фільтрували через потріпаний шар нейлону для усунення агрегатів клітин. Суспензію клітин центрифугували протягом 5 хв при 3000 об/хв і тричі промивали розчином А з наступним центрифугуванням за тих же умов. Всі маніпуляції проводили при температурі 0–4 °С. Отримані клітини повторно суспендували в розчині А і фракціонували в градієнті

густини фіколу-верографіну методом [17]. Фракцію, в якій містилися еритробласти, промивали розчином А, центрифугували при 3000 об/хв протягом 5 хв і використовували в дослідях. Для отримання окремих популяцій еритробластів суспензію еритроїдних клітин фракціонували в градієнті густини сахарози на колонці (1,5 × 30 см) з використанням 30, 24, 18, 12 і 6 %-х розчинів дисахариду [18]. Після цитологічного аналізу в клітинах одержаних фракцій досліджували активність протеїнази.

Для виділення еритроїдних клітин з крові тварин застосовували скляну колонку, заповнену сумішшю α -целюлози і мікрокристалічної целюлози у співвідношенні 1:1 [19]. Ретикулоцити отримували фракціонуванням суспензій еритроїдних клітин крові в градієнті густини сахарози згідно з вищевказаним способом. При цьому клітини суспендували в 0,85 % NaCl (1:10) і вносили в колонку в об'ємі 0,5 мл. На суспензію клітин нашаровували по 2 мл 30, 24, 18, 12 і 6 %-х розчинів сахарози. Клітини двох верхніх фракцій об'єднували і повторно фракціонували. Для досліджень активності протеїнази використовували верхню фракцію, яка містила 90 % ретикулоцитів.

Для видалення ендogenous АТР еритроїдні клітини кісткового мозку і крові інкубували в присутності 20 мМ 2-деоксиглюкози і 0,2 мМ 2,4-динітрофенолу [20]. Лізис клітин здійснювали 2,5 мМ Na-фосфатним буфером (рН 7,5) шляхом трикратного заморожування і відтаювання в рідкому азоті. Лізати центрифугували при 15000 об/хв протягом 30 хв на рефрижераторній центрифугі, надосадову рідину використовували для досліджень активності ферменту.

Очищення ферменту з еритроїдних клітин крові 10-добових поросят здійснювали згідно з методом, розробленим у роботі [21], в нашій модифікації. Для цього зразки периферійної крові відбирали у тварин, яким за 5 днів перед дослідом проводили кровопускання. Виділення еритроїдних клітин і їхній лізис здійснювали методом, описаним вище. Процедура очищення протеїнази включала такі етапи: фракціонування сульфатом амонію, іонообмінна хроматографія на DEAE-Toyopearl 650M (10 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,5; для елюції ферменту застосовували лінійний градієнт концентрації 0—0,4 М NaCl), гель-фільтрація на Toyopearl HW-55 (0,1 М Na-фосфатний буфер, рН 7,0), хроматографія на гідроксилапатиті (5 мМ Na-фосфатний буфер, рН 7,0; для елюції ферменту застосовували лінійний градієнт концентрації 5—300 мМ фосфату). Отримані білкові фракції з протеолітичною активністю діалізували проти 5 мМ

Na-фосфатного буферу, концентрували і використовували для досліджень властивостей ферменту. Протеолітичну активність у лізатах еритроїдних клітин та в препаратах ферменту, одержаних на окремих стадіях очистки, визначали за інтенсивністю розщеплення ^{14}C -метилказеїну або немічених білкових субстратів у присутності АТР та за інтенсивністю гідролізу синтетичного пептидного субстрату Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA [21].

При дослідженні інтенсивності гідролізу ^{14}C -метилказеїну інкубаційна суміш містила 100 мкг ^{14}C -метилказеїну (50000 розпадів за хвилину), 5 мкг очищеного ферменту або аліквоту лізату клітин з відомою концентрацією білка, 2 мМ АТР, 2 мМ MgCl_2 , 20 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,5. Об'єм проби становив 1 мл. Інкубацію проводили протягом 1 год при температурі 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 20 %-го розчину трихлороцтової кислоти. Радіоактивність аліквоти супернатанту вимірювали на сцинтиляційному лічильнику LKB у середовищі ЖС-8. Активність протеїнази виражали в одиницях активності в перерахунку на 1 мкг білка, приймаючи за одиницю активності інтенсивність протеолізу 1 мкг казеїну за 1 год. При дослідженні інтенсивності протеолізу немічених білкових субстратів (казеїну, гемоглобін, інсулін, альбумін, гексокінази, гліцеральдегідфосфатдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, лактатдегідрогенази) їхній вміст у реакційній суміші становив 1 мкг/мл. Концентрації інших компонентів реакційної суміші були такими ж, як і при дослідженні інтенсивності гідролізу ^{14}C -метилказеїну. Активність протеїнази виражали в мікрограмах субстрату, гідролізованого за 1 хв у перерахунку на 1 мкг білка.

При дослідженні інтенсивності гідролізу синтетичного пептидного субстрату Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (0,02 мМ) активність ферменту виражали в пікомолях продукту реакції, утвореного за 1 хв у перерахунку на 1 мкг білка.

При вивченні впливу інгібіторів і активаторів на активність протеїнази застосовували такі реагенти: 0,1 мМ *n*-хлормеркурибензоат, 1 мМ фенол-метилсульфонілфторид, 0,01 %-й соєвий інгібітор трипсину, 1 мМ азид натрію, 1 мМ ванадат амонію, 1 мМ молібдат амонію, 1 мМ KCl, 1 мМ NaCl, 1 мМ CuSO_4 , 1 мМ CaCl_2 , 1 мМ HgCl_2 , 1 мМ ZnSO_4 , 1 мМ FeSO_4 , 10 мМ EDTA, 0,1 мМ лінолеву кислоту, 0,05 %-й додецилсульфат натрію. При дослідженні впливу нуклеозидфосфатів на активність ферменту в реакційну суміш замість 2 мМ АТР вносили відповідно 2 мМ CTP, GTP, ITP, ADP, AMP або cAMP.

Молекулярну масу протеїнази визначали мето-

дом гель-фільтрації на колонці з Тоуорearl HW-65 із застосуванням білків-маркерів тиреоглобуліну (669 кДа), уреазу (545 кДа), феритину (440 кДа), каталази (240 кДа), альдолази (158 кДа). Білкові зони ідентифікували спектрофотометрично при 280 нм.

При дослідженні впливу рН на активність ферменту величину рН інкубаційного середовища змінювали в діапазоні 6,0—10,0. Вплив температури на активність протеїнази вивчали шляхом інкубації реакційної суміші при температурах 20, 30, 40, 50 і 60 °С.

Результати та обговорення. В процесі експериментальних робіт вивчено деякі властивості високомолекулярної протеїнази, виділеної з лізатів еритроїдних клітин периферійної крові поросят 10-денного віку. Після очистки фракціонуванням сульфатом амонію, іонообмінної хроматографії на DEAE-Тоуорearl 650M (при рН 7,5), гель-фільтрації на Тоуорearl HW-55 та хроматографії на гідроксилпатиті досягнуто 116-разового очищення протеїнази (табл. 1). В отриманій після останньої стадії очистки білковій фракції виявлялася АТР-залежна протеолітична активність відносно казеїну, а також гідролітична активність відносно синтетичного пептидного субстрату Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA, який застосовується при дослідженнях активності високомолекулярних мультикаталітичних протеїназ [9, 21, 22].

За результатами гель-фільтрації, молекулярна маса протеїнази становить 700 ± 50 кДа. Подібною молекулярною масою характеризується фермент, виділений з клітин печінки (згідно з результатами окремих авторів: 650; 700; 720—760 кДа) [6, 23], гіпофізу (700 кДа) [24] та ретикулоцитів (700—1000 кДа) [22], тоді як молекулярна маса протеїнази з м'язової тканини становить 800—1300 кДа [25].

Виявлено, що оптимальний рівень рН для протеолітичної активності ферменту становить 8,5. Проте діапазон рН каталітичної дії протеїнази є широким, зокрема, при рН 7,0 і 9,0 виявляється відповідно 60 і 80 % протеолітичної активності [15]. Згідно з результатами досліджень, фермент характеризується значною термостабільністю, а найвища активність виявляється при 45—50 °С. Деякі автори вважають, що високомолекулярні протеїнази перебувають у клітинах у латентній формі, а дія високої температури є одним із факторів, що зумовлюють зміни в конформації молекул і активацію цих ферментів [9, 26].

При аналізі впливу окремих катіонів на активність протеїнази в присутності аніонів Cl^- або SO_4^{2-} встановлено, що інтенсивність гідролізу ^{14}C -метилказеїну знижується під впливом іонів K^+ і Na^+ (табл. 2). Іони Hg^{2+} також пригнічують активність ферменту, проте в присутності 2-меркаптоетанолу активність протеїнази частково відновлюється, що свідчить про наявність в активному центрі ферменту сульфгідрильних груп.

Разом з тим здійснений нами інгібіторний аналіз не дає можливості віднести протеазу до жодного з відомих типів протеолітичних ферментів згідно з номенклатурою Мак-Дональда і Баретта [27]. Так, у присутності в середовищі інкубації *n*-хлормеркурисобензоату (*n*-ХМБ) — інгібітора протеїназ цистеїнового типу — фермент зазнає лише часткової інактивації (залишкова активність становить 29 %). Подібне явище спостерігається і під впливом інгібіторів серинових протеїназ фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ) та соєвого інгібітора трипсину (залишкова активність становить 41 та 55 % відповідно) (табл. 2). В попередніх дослідженнях встановлено, що при одночасній наявності в середовищі 0,1 мМ *n*-ХМБ і 1 мМ ФМСФ фермент виявляє близько 10 % своєї максимальної

Таблиця 1
Очищення протеїнази з еритроїдних клітин периферійної крові поросят 10-добового віку

Стадія очистки	Об'єм, мл	Вміст білка, мг	Загальна активність, од. акт. · 10 ³	Специфічна активність, од. акт. · мг ⁻¹	Кратність очистки
Лізат клітин	200	1360,0	70,6	51,90	1
DEAE-Тоуорearl 650M	60	75,0	27	360,0	6,9
Тоуорearl HW-65	20	4,80	8,8	1833	35,3
Гідроксилпатит	22,5	1,12	6,75	6027	116,1

Примітка. Наведені дані є характерними для трьох окремих процедур.

Таблиця 2

Вплив інгібіторів і активаторів на казеїнолітичну активність АТР-залежної високомолекулярної протеїнази з еритроїдних клітин поросят ($n = 3$)

Застосована сполука	Концентрація, мМ	Гідроліз ^{14}C -метилказеїну, %
Контроль	—	100
<i>n</i> -Хлормеркурибензоат	0,1	29
Фенілметилсульфонілфторид	1,0	41
Соевий інгібітор трипсину	0,01 %	55
NaCl	1,0	48
KCl	2,0	67
HgCl	1,0	34
*HgCl	1,0	75
ZnSO ₄	1,0	39
FeSO ₄	1,0	120
CaCl ₂	1,0	540
CuSO ₄	1,0	27
Ванадат амонію	0,1	65
Молибдат амонію	1,0	12
Додецилсульфат натрію	0,05 %	350
Лінолева кислота	0,1	480

*Протеолітичну активність визначали за присутності в середовищі 10 мМ 2-меркаптоетанолу.

АТР-залежної протеолітичної активності відносно казеїну в лужній області рН [15]. Отримані результати дають підставу стверджувати, що фермент належить до мультікаталітичних АТР-залежних протеїназ [6].

Слід відмітити, що протеїназа виявляє гідролітичну активність відносно казеїну не лише при наявності АТР в середовищі, але й за присутності інших макроергічних фосфатів, зокрема, GTP, CTP і ADP. Проте, казеїнолітична активність ферменту за присутності в інкубаційному середовищі 2 мМ CTP або ADP була значно нижчою, ніж активність протеїнази в присутності 2 мМ АТР або 2 мМ GTP (табл. 3). Разом з тим активність протеїнази пригнічувалася під впливом сполук ванадію і молибдену (табл. 2), які, як відомо, є інгібіторами активності клітинних АТРаза [22, 25]. Це свідчить, з одного боку, про певну роль гідролізу макроергічних зв'язків нуклеозидфосфатів у механізмі активації протеїнази, а з іншого — про наявність у молекулі ферменту субодиниць, яким притаманна АТРазна активність. Виявлене в процесі досліджень зниження активності ферменту під впливом EDTA (табл. 2), очевидно, зумовлюється

здатністю останнього утворювати хелатний комплекс з іонами Mg^{2+} , що веде до руйнування необхідного для функціональної активності протеїнази АТР/ Mg^{2+} -комплексу.

Згідно з отриманими даними активність ферменту різко зростає у присутності в середовищі лінолевої кислоти (табл. 2). Згідно з даними літератури, підвищення активності під впливом лінолеату та інших жирних кислот є характерним і для високомолекулярної протеїнази, виділеної з м'язової тканини [28]. Оскільки концентрація лінолеату в еритроцитах свиней значно перевищує рівень цієї сполуки в еритроцитах інших видів ссавців [29], то ця кислота, ймовірно, може відігравати певну роль у молекулярних механізмах регуляції активності протеїнази в клітині.

Значне підвищення активності ферменту спостерігається за присутності додецилсульфату натрію при застосуванні його у невисокій концентрації (0,05 %) (табл. 2). Подібною властивістю характеризується високомолекулярна протеїназа, виділена з ретикулоцитів кроля, скелетного м'яза шура та інших джерел, проте механізм активації протеїназ під впливом додецилсульфату натрію на даний час

Таблиця 3
 Інтенсивність гідролізу ¹⁴C-метилказеїну за присутності нуклеозидфосфатів (n = 3)

Застосований нуклеозидфосфат	Концентрація, мМ	Розщеплення ¹⁴ C-метилказеїну, %
АТР	2	100
GTP	2	97
CTP	2	45
ITP	2	0
ADP	2	20
AMP	2	0
c-AMP	2	0

не з'ясований [21, 26]. Згідно з результатами роботи [21], активуючий вплив цієї сполуки не зумовлюється стимуляцією дисоціації молекули ферменту на субодиниці. Можливо, в даному випадку дія активатора спричиняє зміни в конформації молекули протеїнази, що полегшує доступ субстрату до активних центрів ферменту і сприяє більш ефективному протеолізу.

При дослідженні розщеплення окремих білкових субстратів, у тому числі ферментів, за участю АТР-залежної протеїнази встановлено, що найвищу гідролітичну активність протеїназа виявляє відносно казеїну і гліцеральдегідфосфатдегідрогенази. Активність протеолізу гемоглобіну, гексокінази і піруваткінази є значно нижчою, а інсулін, альдолаза і альбумін практично не розщеплюються за участю вказаного ферменту. За нашими даними, відповідними субстратами протеїнази є й денатуровані молекули білків, зокрема, гемоглобіну (n = 3):

Субстрат	Гідроліз субстрату, %
Казеїн	100
Казеїн*	35
Гемоглобін	54
Гемоглобін*	30
Альбумін сироватки крові	2
Гексокіназа	65
Гліцеральдегідфосфат-дегідрогеназа	100
Піруваткіназа	50
Лактатдегідрогеназа	5
Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа	10
Альдолаза	2
Інсулін	5

Зірочками позначено білки, денатуровані під впливом гідроперекису третинного бутилу.

Для з'ясування питань стосовно функцій протеїнази в клітинах досліджували зміни активності ферменту в еритроїдних клітинах поросят у зв'язку з віком, а також при дозріванні еритробластів кісткового мозку до функціонально активних еритроцитів. Встановлено, що серед досліджуваних популяцій еритроїдних клітин найвищою активністю протеїнази характеризуються проліферуючі еритробласти, в яких інтенсивність гідролізу Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA є майже в 9 разів вищою, ніж у зрілих еритроцитах (табл. 4). Отримані результати, а також дані літератури щодо високого рівня експресії молекул протеїнази в проліферуючих мієлоїдних клітинах [30, 31] можуть свідчити про специфічну роль цього ферменту в процесах проліферації клітин.

Виявлено, що активність АТР-залежної протеїнази є високою в популяціях еритроїдних клітин новонароджених поросят, проте поступово знижується до 10-ї доби після народження (табл. 5). У подальшому розвитку активність досліджуваної протеїнази підвищується і досягає вірогідних змін у клітинах 30-добових тварин (p < 0,001) (табл. 5).

Таким чином, експериментально доведено присутність у клітинах еритроїдного ряду свині АТР-залежної протеолітичної системи, активність якої сягає значного рівня в еритроблестах та знижується при їхньому дозріванні. Каталітична активність ферменту зменшується під впливом інгібіторів серинових і цистеїнових протеїназ та підвищується за присутності додецилсульфату натрію і лінолевої кислоти. Субстратами протеїнази є такі білки, як казеїн, гемоглобін, гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа, гексокіназа, піруваткіназа. Актив-

Таблиця 4

Інтенсивність АТР-залежного розщеплення ¹⁴С-метилказеїну і гідролізу Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA в еритроїдних клітинах свині ($M \pm t$, $n = 5$)

Номер фракції	Популяція клітин	Відносний вміст клітин у фракціях, %	Гідроліз ¹⁴ С-метилказеїну, кількість розпаді $\cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг білка}^{-1}$	Гідроліз Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA, пмоль $\cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг білка}^{-1}$
1	Проеритробласти	40	3600 ± 554	27,50 ± 3,25
	Базофільні еритроцити	55	—	—
	Поліхроматофільні еритроцити	5	—	—
2	Базофільні еритроцити	60	1420 ± 180*	15,80 ± 2,16*
	Поліхроматофільні еритроцити	35	—	—
	Ортохроматофільні еритроцити	5	—	—
4	Базофільні еритроцити	5	1090 ± 97	12,34 ± 1,75
	Поліхроматофільні еритроцити	50	—	—
	Ортохроматофільні еритроцити	45	—	—
4	Ретикулоцити	90	960 ± 63	8,50 ± 0,60
5	Еритроцити	100	625 ± 52**	3,20 ± 0,18***

Вірогідність відмінностей у показниках між суміжними фракціями клітин: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Таблиця 5

Вікові зміни активності АТР-залежної протеїнази в еритроїдних клітинах кісткового мозку і крові поросят (на субстраті $\cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг білка}^{-1}$, $M \pm t$, $n = 5$)

Клітини	Вік тварин					
	Новонароджені	1-добові	3-добові	5-добові	10-добові	30-добові
Еритроцити	12,9 ± 0,6	10,20 ± 0,96	8,70 ± 0,52	7,35 ± 0,84	7,72 ± 0,70	16,50 ± 1,02*
Ретикулоцити	8,60 ± 0,47	5,24 ± 0,32*	3,97 ± 0,28*	4,19 ± 0,25	3,58 ± 0,20	8,65 ± 0,50*
Еритроцити	3,74 ± 0,02	1,85 ± 0,11*	1,28 ± 0,09*	1,66 ± 0,12	1,20 ± 0,15	2,83 ± 0,17*

Вірогідність відмінностей у показниках між суміжними віковими групами тварин: * $p < 0,05$ —0,001.

ність АТР-залежної протеїнази є високою в еритроїдних клітинах новонароджених поросят, проте зменшується протягом неонатального періоду. Виявлені зміни можуть зумовлюватися низкою факторів, зокрема, зниженням інтенсивності еритропоезу в тварин у неонатальному періоді та гормональною перебудовою в організмі новонароджених [32—35]. Водночас висока активність досліджуваного ферменту в проліферуючих еритроїдних клітинах, а також дані літератури щодо ролі АТР-залежної протеолітичної системи в регуляції окремих ланок у механізмі мієлопоезу [30, 31, 36] свідчать

про те, що протеїназа має важливе значення в процесах гемопоезу та в функціональній активності кровотворних клітин. У ряді досліджень показано, що АТР-залежна протеїназа відіграє функціональну роль в елімінації білків зі зміненою структурою, які утворюються в клітинах при деяких фізіологічних і патологічних станах організму [37—39]. У зв'язку з цим можна зробити припущення про те, що фермент бере участь і в деградації модифікованих білкових молекул, які утворюються в клітинах новонароджених тварин внаслідок оксидативного стресу [34, 35]. Не виключено, що цей фер-

мент бере участь і в змінах білкового складу еритробластів при їхньому дозріванні, на що вказують результати досліджень інших авторів стосовно здатності АТР-залежної протеїнази до розщеплення нативних білків [40].

Г. Л. Антоняк

Свойства высокомолекулярной АТР-зависимой протеиназы из эритроидных клеток поросят

Резюме

Представлены результаты исследований свойств высокомолекулярной АТР-зависимой протеиназы, выделенной из эритроидных клеток крови поросят раннего возраста. Молекулярная масса протеиназы составляет 700 ± 50 кДа, наивысшая активность проявляется при рН 8,5. Активность фермента снижается под влиянием ингибиторов сериновых и цистеиновых протеиназ и возрастает в присутствии додецилсульфата натрия и линолевой кислоты. Активность протеиназы достигает высокого уровня в пролиферирующих эритроблестах костного мозга и уменьшается при созревании эритроидных клеток. В эритроидных клетках новорожденных и 30-суточных поросят активность протеиназы более высокая, чем в клетках 5–10-суточных животных. Обсуждается роль высокомолекулярной АТР-зависимой протеиназы в функциональной активности эритроидных клеток.

Н. Л. Antonyak

Properties of high-molecular-mass АТР-dependent proteinase from the erythroid cells of piglets

Summary

The present article reports the characterization of high-molecular-mass АТР-dependent proteinase from the erythroid cells of neonatal piglets. The enzyme was purified by DEAE-Toyopearl 650M, Toyopearl HW-55 gel filtration and hydroxyapatite chromatographies. The molecular mass of enzyme has been found to be 700 ± 50 kDa by gel filtration, the optimum activity was observed at around pH 8.5. The enzyme hydrolysed synthetic substrate Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA and showed proteolytic activity towards casein and several other proteins in the presence of АТР. The degradation of the protein substrates was stimulated by 0.05 % sodium dodecyl sulfate and linoleic acid. The casein-hydrolyzing activity decreased in the presence of phenylmethylsulfonylfluoride and n-chloromercuribenzoic acid. The enzyme activity reached high levels in the proliferating erythroblasts of animal bone marrow and decreased as the cells matured. The high levels of the proteinase activity were observed in the erythroid cells of newborn piglets, whereas in the cells of 10-days-old animals the enzyme activity was significantly lower. A role of АТР-dependent high-molecular-mass proteinase in functional activity of animal erythroid cells in the neonatal period is discussed.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bond J. S., Butler P. E. Intracellular proteases // Ann. Rev. Biochem.—1987.—56.—P. 333—364.
2. Сологуб Л. І., Пашковська І. С., Антоняк Г. Л. Протеази клітин та їх функції.—К.: Наук. думка, 1992.—194 с.
3. Jarett L., Kiechle F. L., Parker J. C. Chemical mediator or mediators of insulin action, response to insulin and mode of action // Fed. Proc.—1982.—41, N 11.—P. 2730—2735.
4. Сологуб Л. І., Пашковська І. С., Сухорська І. Е., Антоняк Г. Л. Роль протеолізу в посттрансляційних модифікаціях

- біологічно активних пептидів і поліпептидів // Укр. біохім. журн.—1991.—63, № 5.—С. 3—14.
5. Сологуб Л. І., Пашковская И. С., Антоняк Г. Л. Участие протеиназ в инвазии злокачественных опухолей // Эксперим. онкология.—1992.—14, № 6.—С. 7—13.
6. Rivett A. J. High molecular mass intracellular proteases // Biochem. J.—1989.—263, N 2.—P. 625—633.
7. Gronostajski P. M., Pardee A. B., Goldberg A. L. The АТР-dependence of the degradation of short- and long-lived proteins in growing fibroblasts // J. Biol. Chem.—1985.—260.—P. 3344—3349.
8. Dahlmann B., Kopp E. The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria // FEBS Lett.—1989.—251, N 1.—P. 125—131.
9. Orłowski M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system // Biochemistry.—1990.—29, N 45.—P. 10289—10297.
10. Reits E. A. J., Benham A. M., Plougastel B., Neefies J., Trowsdale J. Dynamics of proteasome distribution in living cells // EMBO J.—1997.—16, N 20.—P. 6087—6094.
11. Hicke L. Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins // FASEB J.—1997.—11, N 14.—P. 1215—1226.
12. Palombella V. J., Rando O., Goldberg A. Ubiquitin and the proteasome are required for processing of the NF-κB I precursor and the activation of NF-κB // Cell.—1994.—78.—P. 773—785.
13. Peters J. M. Proteasomes: protein degradation machines of the cell // TIBS.—1994.—19, N 9.—P. 377—382.
14. Harris J. R. Some high molecular-weight oligomeric proteins and enzymes of reticulocytes and erythrocytes // Blood Cell Biochemistry / Ed. J. R. Harris.—New York: Plenum press, 1990.—Vol. 1.—P. 251—298.
15. Антоняк Г. Л., Снітинський В. В., Сологуб Л. І., Верніковська Я. І. Дослідження властивостей високомолекулярної АТР-залежної протеїнази еритроїдних клітин свиней // Тези доп. Міжнар. симпоз. «Біологічні механізми старіння».—Харків, 1996.—С. 13.
16. Стародуб Н. Ф., Назаренко В. И. Гетерогенная система гемоглобина.—К.: Наук. думка, 1987.—200 с.
17. Harrison F. L., Beswick T. M., Chesterton C. J. Separation of haemopoietic cells for biochemical investigation // Biochem. J.—1981.—194.—P. 789—796.
18. Сизова И. А., Каменская В. В., Феденков В. И. Безаппаратурный способ фракционирования красных клеток крови в градиенте плотности сахарозы // Изв. Сиб. отд-ния. АН СССР.—1980.—3, № 15.—С. 119—122.
19. Beutler E., West D., Blume K. G. The removal of leukocytes and platelets from whole blood // J. Lab. Clin. Med.—1976.—88, N 2.—1976.
20. Rapoport S., Dubiel W., Muller M. Proteolysis of mitochondria in reticulocytes during maturation is ubiquitin-dependent and is accompanied by a high rate of АТР hydrolysis // FEBS Lett.—1985.—180, N 2.—P. 249—252.
21. Ishiura S., Sano M., Kamakura K., Sugita H. Ingensin — a high molecular weight protease from rabbit reticulocyte lysate // FEBS Lett.—1985.—189.—P. 119—123.
22. Hough R., Pratt G., Rechsteiner M. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate // J. Biol. Chem.—1987.—262, N 17.—P. 8303—8317.
23. Tanaka K., Li R., Ichihara A. A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver // J. Biol. Chem.—1986.—261, N 32.—P. 15197—15203.
24. Wilk S., Orłowski M. Evidence, that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex // J. Neurochem.—1983.—40.—P. 842—849.

25. *Dahlmann B., Kuehn L., Rutschmann M., Reinauer H.* Purification and characterization of a multicatalytic high-molecular mass proteinase from rat skeletal muscle // *Biochem. J.*—1985.—228, N 1.—P. 161—170.
26. *Coux O., Tanaka K., Goldberg A. L.* Structure and functions of the 20 S and 26 S proteasomes // *Annu. Rev. Biochem.*—1996.—65.—P. 801—847.
27. *McDonald J. K.* An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification // *Histochem. J.*—1985.—17.—P. 773—785.
28. *Dahlmann B., Rutschmann M., Kuehn L., Reinauer H.* Activation of the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle by fatty acids or sodium dodecyl sulfate // *Biochem. J.*—1985.—228, N 1.—P. 171—177.
29. *Wessels J. M. C., Veerkamp J. H.* Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes. III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // *Biochim. et biophys. acta.*—1973.—291.—P. 190—196.
30. *Shimbara N., Orino E., Sone S., Ogura T., Takashina M., Shono M., Tamura T., Gasuda H., Tanaka K., Ishihara A.* Regulation of gene expression of proteasomes (multi-proteases complexes) during growth and differentiation of human hematopoietic cells // *J. Biol. Chem.*—1992.—267, N 25.—P. 18100—18109.
31. *Kumatori A., Tanaka K., Inamura N., Sone S., Ogura T., Matsumoto T., Tachikawa T., Shin S., Ichihara A.* Abnormally high expression of proteasome in human leukemic cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87, N 18.—P. 7071—7075.
32. *Антоняк Г. Л.* Влияние тироксина и инсулина на процесс кроветворения у животных в неонатальном периоде развития // *Цитология.*—1999.—41, № 6.—С. 512—516.
33. *Антоняк Г. Л., Снітинський В. В., Данчук В. В., Бабич Н. О., Іскра Р. Я., Бальковський В. В., Крехтун Б. В., Бучко О. М.* Вплив екзогенних гормонів на функціональну активність ендокринних залоз поросят у неонатальному періоді онтогенезу // *Вісн. Білоцерків. держ. аграр. ун-ту.*—1998.—5, № 1.—С. 150—153.
34. *Girard J., Ferre P.* Metabolic and hormonal changes around birth // *Biochemical Development of the Fetus and Neonate* / Ed. C. T. Jones.—New York etc.: Elsevier, 1982.—P. 517—551.
35. *Biochemical development of the fetus and neonate* / Ed. C. T. Jones.—New York etc.: Elsevier, 1982.—685 p.
36. *Антоняк Г. Л.* Роль протеолитических ферментов в функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов // *Успехи соврем. биологии.*—1999.—119, № 5.—С. 475—485.
37. *Hams J. R.* Some high molecular-weight oligomeric proteins and enzymes of reticulocytes and erythrocytes // *Blood Cell Biochemistry* / Ed. J. R. Harris.—New York. etc.: Plenum Press, 1990.—V. 1—P. 251—298.
38. *Hershko A., Ciechanover A.* The ubiquitin system for protein degradation // *Ann. Rev. Biochem.*—1992.—61.—P. 761—807.
39. *Bush K. T., Goldberg A. L., Nigam S. K.* Proteasome inhibition leads to a heatshock response, induction of endoplasmic reticulum chaperons and thermotolerance // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 14.—P. 9086—9092.
40. *Ciechanover A., Schwartz A. L.* The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins // *FASEB J.*—1994.—8.—P. 182—191.

УДК 591.3:599.731

Надійшла до редакції 30.06.99