

## КІЛЬКІСНІ ЗМІНИ ОСНОВНИХ КОМПОНЕНТІВ ЕРИТРОЦИТАРНОЇ МЕМБРАНИ, ЩО ВИЗНАЧАЮТЬ АРХІТЕКТОНІКУ КЛІТИН ЗА НОКАУТУ ГЕНУ *pttg*

О. П. КАНЮКА<sup>1</sup>, Є. З. ФІЛЯК<sup>1</sup>, О. Р. КУЛАЧКОВСЬКИЙ<sup>1</sup>, Ю. Л. ОСИП<sup>2</sup>, Н. О. СИБІРНА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;  
e-mail: kanokaol@yahoo.com

<sup>2</sup>Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк, Україна

Нокаут гену *pttg* впливає на функціональний стан еритроциту в мишей, що може бути пов'язано зі структурними змінами в будові еритроцитарних мембран. За нокауту гену *pttg* спостерігається значна модифікація жирнокислотного складу ліпідів мембран еритроцитів мишей за рахунок зменшення вмісту пальмітинової кислоти та збільшення суми поліненасичених жирних кислот на 18%. Аналізуючи поверхневу архітектуру еритроцитів мишей в умовах нокауту гену *pttg* було встановлено, що на фоні зменшення чисельності популяції функціонально повноцінних двовогнутих дисків спостерігається збільшення кількості трансформованих клітин, що знаходяться на різних стадіях дегенерації. Проведені дослідження показали, що в мишей з нокаутом гену *pttg* порівняно з контрольною групою тварин знижується вміст протеїну цитоскелета –  $\beta$ -спектрину на 17,03%. При цьому відбувається зменшення вмісту мембранного протеїну смуги 3 на 33,04% з одночасним збільшенням вмісту аніонтранспортного протеїну смуги 4.5 на 35,2%, а смуги 4.2 – на 32,1%. За допомогою лектинблотаналізу виявлено зміни у структурі вуглеводних детермінант мембранних глікопротеїнів еритроцитів у разі спрямованої інактивзації гену *pttg*, що супроводжується зміною типу зв'язку, яким приєднується термінальний залишок у вуглеводній детермінанті глікопротеїнів.

Таким чином, за нокауту гену *pttg* спостерігається значний перерозподіл вмісту протеїнів та жирних кислот у мембранах еритроцитів, що виявляється в збільшенні кількості деформованих форм еритроцитів.

*Ключові слова:* ген *pttg*, жирні кислоти, еритроцитарна мембрана, архітектура, глікопротеїни, цитоскелет, протеїн смуги 3.

Провідна роль під час структурно-функціональних змін будь-яких клітин та тканин належить цитоплазматичним мембранам. Від стану протеїнів та ліпідів у складі мембран залежить рецепторна функція, активність та вибірковість трансмембранного транспортування речовин, енергетичний баланс і тривалість життя клітин. У попередніх дослідженнях нами було показано, що в умовах нокауту гену *pttg* (Pituitary tumor transforming gene) поверхневий заряд еритроцитів змінюється [1], що може бути зумовлене модифікацією структури мембранних протеїнів. Дестабілізація структури мембран еритроцитів зумовлює порушення поверхневої архітектури цих клітин, визначаючи їхню функціональну неповноцінність, що спричинює порушення газотранспортної функції крові. У

свою чергу, модифікація структури компонентів еритроцитарних мембран є причиною функціональної дестабілізації, з якою пов'язана система транспортування іонів (Cl<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>) і газів (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>). Таким чином, еритроцитарна мембрана забезпечує структурну і функціональну цілісність клітини, зміни якої за різних патологічних процесів відіграють вирішальну роль у функціонуванні клітин, розпізнаванні та селективному видаленні неповноцінних еритроцитів. Протеїн РТТГ (секурин) регулює розходження сестринських хроматид в анафазі мітозу через інгібування активності сепарази, а також бере участь у регуляції клітинного циклу, репарації ДНК та апоптозі [2, 3]. Однак нещодавно було показано, що ген *pttg* може опосередковано впливати на шляхи везикулярного транспорту в апараті Гольджі та на його секре-

торну функцію [4] – центральні процеси, які забезпечують метаболізм і синтез компонентів, необхідних для побудови і функціонування поверхневих мембран і поверхнево-рецепторного апарату клітини.

Метою нашої роботи було дослідження впливу нокауту гену *pttg* на структурно-функціональний стан плазматичної мембрани еритроцитів у мишей.

### Матеріали і методи

Для досліджень використовували гепаринізовану цільну кров мишей лінії BL6/C57 дикого типу (*pttg*-WT) та мишей з нокаутом гену *pttg* (*pttg*-KO), які були люб'язно надані завідувачем відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України д. б. н., проф. Стойкою Р. С. в рамках угоди про науково-технічну співпрацю. Нокаут гену *pttg* було здійснено шляхом заміни частини гену *pttg* (частини першого екзону і повністю другого та третього екзонів) на ген резистентності до неоміцину в ембріональних, стовбурових J1 клітинах миші. Одержані стабільно трансфіковані клони цих клітин було введено мікроін'єкцією у бластоцист мишей. Химерних мишей схрещували з мишами лінії BL6/C57, внаслідок чого одержували гетерозиготне потомство в розщепленні 1 : 2. У разі схрещування гетерозиготних особин були одержані гомозиготні особини (*pttg*-WT та *pttg*-KO) в розщепленні 1 : 2 : 1, генотип яких визначали методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням специфічних генних праймерів.

Дослідження поверхневої архітекtonіки еритроцитів здійснювали методом сканувальної електронної мікроскопії. Виділення, відмивання та фіксацію еритроцитів для електронної мікроскопії проводили за загальноприйнятою методикою [5]. Готові зразки вивчали на сканувальному електронному мікроскопі JEOL JSM-T 220 A Scanning microscope (Японія). Для кількісної характеристики морфологічних форм еритроцитів у кожному препараті підраховували 500 клітин, використовуючи класифікацію за В. Погореловим (2005) та В. Новицьким (2004) [6, 7].

Аналіз спектра жирних кислот проводили на газовому хроматографі «Кристалл 2000М» з капілярною колонкою DB-FFAP. Екстракцію ліпідів здійснювали методом Фолча [8]. Гідроліз

і метилювання вищих жирних кислот проводили методом К. М. Синяка [9].

Для одержання мембран еритроцити руйнували осмотичним шоком за методом J. T. Dodge [10]. Відмиті 4–6 разів 5 мМ Na-фосфатним буфером мембрани солюбілізували, використовуючи DSNa (з кінцевою концентрацією 1%). Концентрацію протеїну в пробах визначали методом О. Н. Lowry. Протеїни розділяли методом електрофорезу в 10%-му поліакриламідному гелі за наявності в ньому 0,1% DSNa. Ідентифікацію протеїнових фракцій здійснювали із застосуванням маркерних протеїнів (Protein Marker, Broad Rang, P7702S). Для візуалізації протеїнові фракції електрофореграми забарвлювали кумасі G-250. Для аналізу електрофореграм застосовували комп'ютерну програму Gel-pro 3.1. Визначення вуглеводного компонента фракцій глікопротеїнів проводили лектиноблотаналізом на нітроцелюлозних мембранах із використанням лектинів бузини чорної (SNA) і акації амурської (MAA) (Sigma, США), кон'югованих з пероксидазою хрому. Продукти виявляли за допомогою реакції ECL-детекції.

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням *t*-критерію Стьюдента.

### Результати та обговорення

Підтримання форми еритроцита у вигляді двовогнутого диска, що забезпечує адекватну участь клітини в газообміні, досягається стабільністю стану катіонтранспортних систем, іонного гомеостазу, збереженням на необхідному рівні пулу АТФ, збалансованістю молекулярної організації протеїнових та ліпідних компонентів мембрани еритроцита [11]. Збільшення поліморфізму еритроцитарної популяції, а саме поява трансформованих клітин, є відображенням порушення структури мембрани та метаболізму еритроцита [12].

Електронно-мікроскопічне дослідження еритроцитів периферичної крові дозволило встановити, що еритроцитарний пул мишей *pttg*-WT в основному (до 85%) представлено двовогнутими дискоцитами (рис. 1, табл. 1). Частина ж еритроцитів перехідної форми, здатних у фізіологічних умовах до зворотної трансформації в дискоцити, становить  $6,74 \pm 0,06\%$ . До них було віднесено еліпсоподібні клітини, дискоцити із гребенем або поодинокими виростами та ехіноцити першого і другого порядку. Ери-

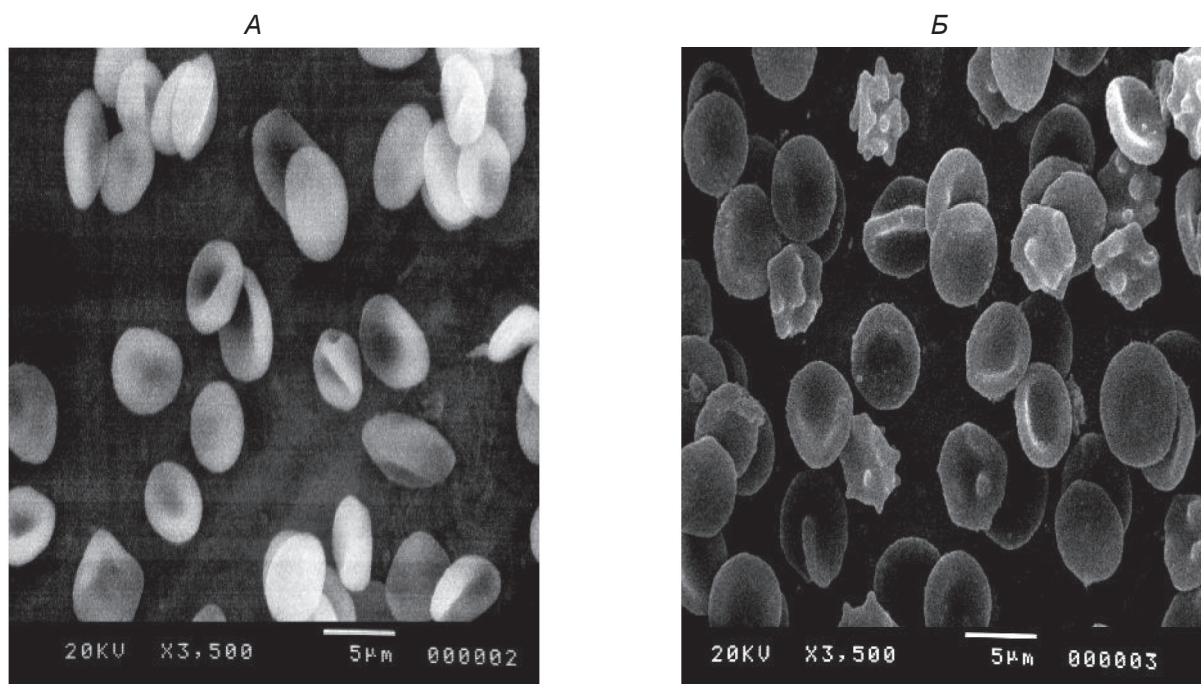


Рис. 1. Поліморфізм еритроцитів периферичної крові мишей: А – *pttg-WT*; Б – *pttg-KO*

троцитарна популяція, представлена незворотнотрансформованими еритроцитами куполо- і сфероподібної форми, а також ехіноцитами III порядку, становила  $6,74 \pm 0,65\%$ , а вміст дегенеративних клітин –  $1,75 \pm 0,05\%$ .

За вивчення поверхні еритроцитів мишей *pttg-KO* виявлено чіткий перерозподіл їх

популяції з тенденцією до збільшення трансформованих клітин. При цьому кількість двогнутих дискоцитів вірогідно нижче, ніж у мишей *pttg-WT* ( $65,0 \pm 2,5\%$ ). Кількість перехідних форм еритроцитів, в основному дискоцитів із гребенем або поодинокими виростами, в 3,14 раза перевищує аналогічний показник у ми-

Таблиця 1. Морфологічна характеристика популяції еритроцитів мишей *pttg-WT* та *pttg-KO*, % ( $M \pm m$ ,  $n = 6-8$ )

Популяції еритроцитів	Групи	
	<i>pttg-WT</i>	<i>pttg-KO</i>
Дискоцити	$84,75 \pm 1,90$	$65,0 \pm 2,5^*$
Зворотнотрансформовані еритроцити:	$6,74 \pm 0,06$	$21,19 \pm 0,50^*$
- еліпсоподібні клітини	$1,61 \pm 0,02$	$2,61 \pm 0,04^*$
- дискоцити з поодинокими виростами	$0,87 \pm 0,02$	$8,75 \pm 0,06^*$
- дискоцити із гребенем	$3,07 \pm 0,05$	$6,60 \pm 0,49^*$
- дискоцити з багатьма виростами (ехіноцити I та II порядку)	$1,17 \pm 0,09$	$5,83 \pm 0,17^*$
Незворотнотрансформовані еритроцити:	$6,74 \pm 0,65$	$10,44 \pm 1,00^*$
- куполоподібні	$3,37 \pm 0,69$	$5,99 \pm 0,21^*$
- сферичні	$1,02 \pm 0,04$	$1,07 \pm 0,04$
- дискоцити з багатьма виростами (ехіноцити III порядку)	$0,43 \pm 0,01$	$1,68 \pm 0,05^*$
- у вигляді м'яча, який спущено	$1,90 \pm 0,07$	$1,68 \pm 0,07$
Дегенеративні форми	$1,75 \pm 0,05$	$1,07 \pm 0,09^*$

Тут і в табл. 2 \* $P < 0,05$  відносно контролю (*pttg-WT*)

шей дикого типу і складає  $21,19 \pm 0,50\%$ . Також відмічено зростання вмісту незворотно трансформованих форм еритроцитів до  $10,44 \pm 1,00\%$  у периферичній крові мишей з нокаутом гену *pttg*.

Відомо, що морфологія еритроцитів залежить від перерозподілу мембранних компонентів між двома бішарами [13]. Однією з основних умов забезпечення фізіологічного статусу еритроцитарної мембрани є стабільність ліпідної фази. Ліпіди мембран беруть участь у закорюванні протеїнів у фосfolіпідному бішарі, слугують неполярним середовищем для жиророзчинних субстратів і кофакторів enzymів, забезпечують відповідну орієнтацію протеїнів у клітинній мембрані, зумовлюють їх конформаційні зміни та фолдинг, а також виступають у ролі регуляторів та модуляторів enzymатичної активності [14]. Ступінь ненасиченості жирних кислот визначає температуру фазового переходу, фізико-хімічні властивості мембранних фосfolіпідів і триацилгліцеролів, а також рідинність біологічних мембран.

Нами встановлено, що нокаут гену *pttg* у мишей спричинює значну модифікацію жирнокислотного складу ліпідів мембран еритроцитів, при цьому спостерігаються різноспрямовані зсуви в змінах відносного вмісту окремих жирнокислот-

них фракцій. Виявлено, що сума насичених жирних кислот (НЖК) в еритроцитах периферичної крові мишей *pttg*-KO знижується на  $17,2\%$  в основному за рахунок зменшення вмісту пальмітинової ( $C_{16:0}$ ) кислоти (табл. 2). Відомо, що пальмітинова кислота відіграє важливу роль у формуванні цитоскелета клітини: протеїни, ацильовані за допомогою пальмітинової кислоти, вбудовуються в ліпідний бішар із високим ступенем афінності до ліпідних рафтів, які містять сфінголіпіди з незвично довгими ацильними ланцюгами. Також показано, що протеїни мембран еритроцитів, такі як анкірин, протеїн смуги 3, протеїн смуги 4.1 та протеїн смуги 4.2, пальмітоїльовані спектри, що забезпечує їх взаємозв'язок із фосfolіпідами мембрани [15].

Неоднозначні зміни відбуваються і у відносному вмісті окремих ненасичених жирних кислот мембран еритроцитів мишей: вміст олеїнової ( $C_{18:1}$ ) та лінолевої ( $C_{18:2}$ ) кислот зменшується, а поліненасиченої арахідонової кислоти ( $C_{20:4}$ ) значно зростає (на  $33,42\%$ ) порівняно з диким типом. Підвищений вміст арахідонової кислоти в еритроцитах периферичної крові є сигналом для активації циклоокси- та ліпоксигеназних enzymатичних каскадів. Метаболізм арахідонової кислоти за участю ліпоксигеназ сприяє продукції

Таблиця 2. Жирнокислотний склад (%) мембран еритроцитів мишей *pttg*-WT та *pttg*-KO, ( $M \pm m$ ,  $n = 6-7$ )

Жирні кислоти	Групи тварин	
	<i>pttg</i> -WT	<i>pttg</i> -KO
Пальмітинова 16:0	$26,82 \pm 0,62$	$21,76 \pm 1,10^*$
Стеаринова 18:0	$15,97 \pm 0,54$	$16,54 \pm 0,37$
Олеїнова 18:1	$14,48 \pm 1,45$	$12,34 \pm 0,61$
Лінолева 18:2	$21,27 \pm 0,98$	$17,92 \pm 0,49^*$
Гондоїнова 20:1	$0,70 \pm 0,09$	$0,58 \pm 0,11$
Ейкозадієнова 20:2	$1,09 \pm 0,30$	$0,58 \pm 0,24^*$
Арахідонова 20:4	$11,95 \pm 0,92$	$17,97 \pm 0,51^*$
Ейкозапентаєнова 20:5	$1,34 \pm 0,20$	$2,48 \pm 0,11^*$
Докозадієнова 22:2	$5,82 \pm 1,81$	$4,12 \pm 0,94^*$
Докозагексаєнова 22:6	$1,36 \pm 0,23$	$2,34 \pm 0,32^*$
$\Sigma$ НЖК	$46,25 \pm 2,61$	$38,1 \pm 1,27^*$
$\Sigma$ нен. ЖК	$14,34 \pm 0,25$	$15,54 \pm 0,80^*$
$\Sigma$ ПНЖК	$39,48 \pm 2,69$	$48,17 \pm 2,61^*$

гідроксильного радикала, який має детергентну дію на біологічні мембрани. Разом з тим, у досліджуваних групах рівень однієї з основних поліненасичених жирних кислот ряду  $\omega$ -3 – ейкозапентаєнової – зростає на 39,2%, а докозагексаєнової – на 42%. Внаслідок цього сума поліненасичених жирних кислот ( $C_{20:5} + C_{22:6} + C_{20:4}$ ) мембран еритроцитів мишей із нокаутом гену *pttg* також збільшується на 18%.

Між протеїнами і ліпідами існує тісний взаємозв'язок. Ліпіди забезпечують рухливість протеїнів і визначають такі властивості мембрани, як пластичність і деформабельність. Конформаційний перехід протеїнів у мембрані залежить від щільності упаковки (мікрів'язкості) мембранних ліпідів та стану навколишніх ліпідних молекул. В еритроцитів цитоскелет зміцнює мембрану, забезпечуючи її єдність із ліпідним бішаром, надаючи мембрані внутрішню рухливість і гнучкість [16].

Проведені дослідження показали, що в мишей з нокаутом гену *pttg* порівняно з контрольною групою тварин спостерігаються помітні зміни в спектрі основних мембранних протеїнів еритроцитів ( $\beta$ -спектрину, протеїну смуги 3, аніонтранспортного протеїну смуги 4.5 та протеїну смуги 4.2). Вміст фракції, яка, за даними літератури [17], відповідає  $\beta$ -субодиниці

спектрину мембран еритроцитів в умовах інактивації гену *pttg*, знижується на 17,03% порівняно з контрольною групою (рис. 2). Вважають, що спектрин, утворюючи разом з активним протеїнову сітку на плазматичній мембрані, бере участь у підтриманні цілісності мембран і в забезпеченні високої здатності еритроцитів до деформації, а його  $\beta$ -субодиниця відіграє важливу роль у процесі полімеризації спектрину, який «прошиває» еритроцитарну мембрану, роблячи її міцнішою і стабільнішою, але менш еластичною і пружною.

Ще одним із протеїнів мембран, що зазнає змін під час спрямованої інактивації гену *pttg*, є протеїн смуги 3, вміст якого знижується на 33,04% порівняно з аналогічним показником у мишей *pttg*-WT. Протеїн смуги 3 взаємодіє з анкірином, розташованим на внутрішній поверхні мембрани, забезпечуючи міцний зв'язок ліпідного шару з периферичними протеїнами. Цей протеїн є головним транспортером аніонів в еритроцитарній мембрані, який здійснює швидкий обмін неорганічних аніонів, переважно  $Cl^-$  на  $HCO_3^-$ , крізь еритроцитарний ліпідний бішар [18]. Встановлено, що трансформація форми еритроцитів та їх старіння супроводжуються структурною модифікацією спектрину і агрегацією протеїну смуги 3, що

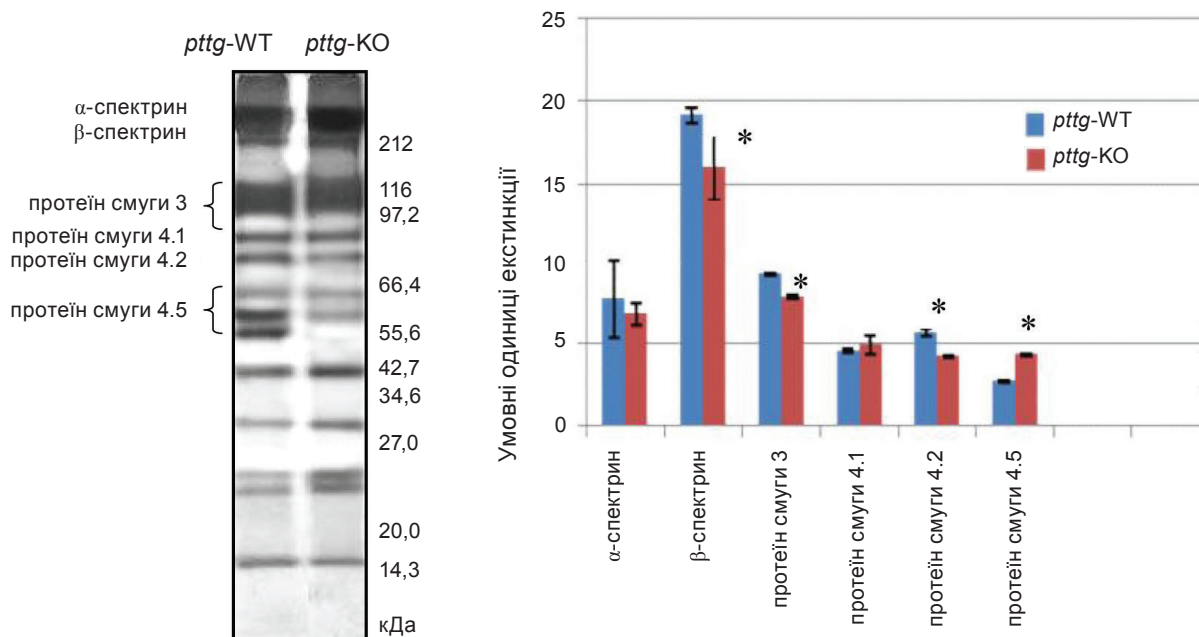


Рис. 2. Співвідношення електрофоретичних фракцій протеїнів мембран еритроцитів, солюбілізованих в 1%-му розчині DSNa, у нормі та в умовах нокауту гену *pttg* в мишей ( $M \pm m$ ,  $n = 7-8$ )

ініціює зміну антигенних детермінант мембрани, і розпізнаванням старих еритроцитів макрофагами [19].

Однак в умовах нокауту гену *pttg* відбувається збільшення рівня інших протеїнів мембран еритроцитів, а саме палідину (протеїну смуги 4.2) на 32,1% та протеїну смуги 4.5 майже в 2 рази. Протеїн смуги 4.2 в еритроцитах виконує структурну роль, об'єднуючи в цитоплазматичний домен протеїн смуги 3, анкірин, спектрин і протеїн смуги 4.1. Смуга 4.5 складається з інтегральних протеїнів – переносників нуклеозидів і глюкози крізь еритроцитарну мембрану. Основна частина протеїнів смуги 4.5 представлена транспортерами глюкози (Мм = 55 кДа). Тому збільшення кількості протеїну смуги 4.5 стимулює пластичний і енергетичний обмін в еритроцитах.

Таким чином, виходячи з функцій інтегральних і периферичних протеїнів мембран еритроцитів, можна зробити висновок, що виявлені зміни спрямовані на зменшення міцності і деформабельності еритроцитарної мембрани, підвищення загальної абсорбційної здатності еритроцитів і метаболічної активності, що прискорює процеси їх старіння.

Важливе значення у функціонуванні еритроцитів має стан поверхнево-рецепторного апарату, який залежить від структури вуглеводних детермінант, що знаходяться на поверхні їхньої плазматичної мембрани. Зі специфічною структурою вуглеводних детермінант глікопротеїнів пов'язані механізми, що забезпечують орієнтацію протеїнових молекул у ліпідному бішарі цитомембран, стабілізацію просторової структури протеїнів, трансмембранне і внутрішньоклітинне транспортування речовин (зокрема, перенесення гідролітичних ензимів із комплексу Гольджі в лізосоми), а також молекулярні механізми міжклітинного розпізнавання. Ці механізми, як відомо, відіграють важливу роль у дозріванні та диференціації клітин.

Як свідчать результати досліджень [19] у процесах адгезії, міграції, диференціювання беруть участь олігосахариди, головними з яких є: D-глюкоза, D-маноза, D-галактоза, N-ацетил-D-галактозамін, N-ацетил-D-глюкозамін, L-фукоза та N-ацетилнейрамінова (сіалова) кислота. Для дослідження структури вуглеводних детермінант мембрани еритроцитів мишею було використано такі лектини:

MAA – лектин акації амурської (специфічний до послідовності NeuNAc ( $\alpha 2 \rightarrow 3$ ) DGal/DgalNAc, проте не зв'язує при цьому дисахаридних фрагментів, сполучених ( $\alpha 2 \rightarrow 6$ ) глікозидним зв'язком);

SNA – лектин бузини чорної (специфічний до послідовності NeuNAc ( $\alpha 2 \rightarrow 6$ ) DGal/DgalNAc, проте не зв'язує при цьому послідовності NeuNAc ( $\alpha 2 \rightarrow 3$ ) DGal/DgalNAc в олігосахаридах) [20].

Нашими дослідженнями встановлено, що за нокауту гену *pttg* відбувається зміна структури та кількісного розподілу глікопротеїнових рецепторів на мембрані еритроцитів.

Легка фракція глікопротеїнів мембран еритроцитів (Мм до 45 кДа) не має в своєму складі сіалового компонента, що може говорити про присутність у складі цих глікопротеїнів олігосахаридних ланцюгів високоманозного типу, які зазвичай не сіалюються. Одержані результати лектиноблотаналізу свідчать про зниження вмісту сіалових кислот за досліджуваної патології, до яких комплементарний лектин MAA, у складі глікопротеїнів із Мм 95 та 80 кДа, які відповідають протеїну смуги 3 та протеїну смуги 4.2 (рис. 4). Також було відмічено незначне зростання вмісту сіалових кислот глікопротеїнів, до яких комплементарний лектин MAA, з Мм 260 та 225 кДа, які відповідають  $\alpha$ - та  $\beta$ -субодиницям спектрину (рис. 3). Протилежні показники, що характеризують вміст сіалових кислот у глікопротеїнах, виявлено у разі використання лектину SNA.

Встановлено зниження кількості глікопротеїнів мембран, у структурі яких присутні вуглеводні детермінанти, комплементарні до SNA (глікопротеїни з Мм 225 та 260 кДа). Також виявлено збільшення відповідних вуглеводних детермінант глікопротеїнів із Мм 95 та 80 кДа (рис. 4), що вказує на збільшення місць зв'язування для лектину SNA та зменшення сайтів зв'язування для лектину MAA і може свідчити про заміну ( $\alpha 2 \rightarrow 3$ )-зв'язаних сіалових кислот на ( $\alpha 2 \rightarrow 6$ )-зв'язані сіалові кислоти в складі цих глікопротеїнів. Такі зміни можна пояснити можливими порушеннями в біосинтезі гліканів. Відомо, що в ссавців секурин (PTTG) та протеїн сепараза асоційовані з мембранами, а зменшення кількості кожного з них зумовлює значні набряки *транс*-цистерн апарату Гольджі, ендоплазматичного ретикулула та появу вели-

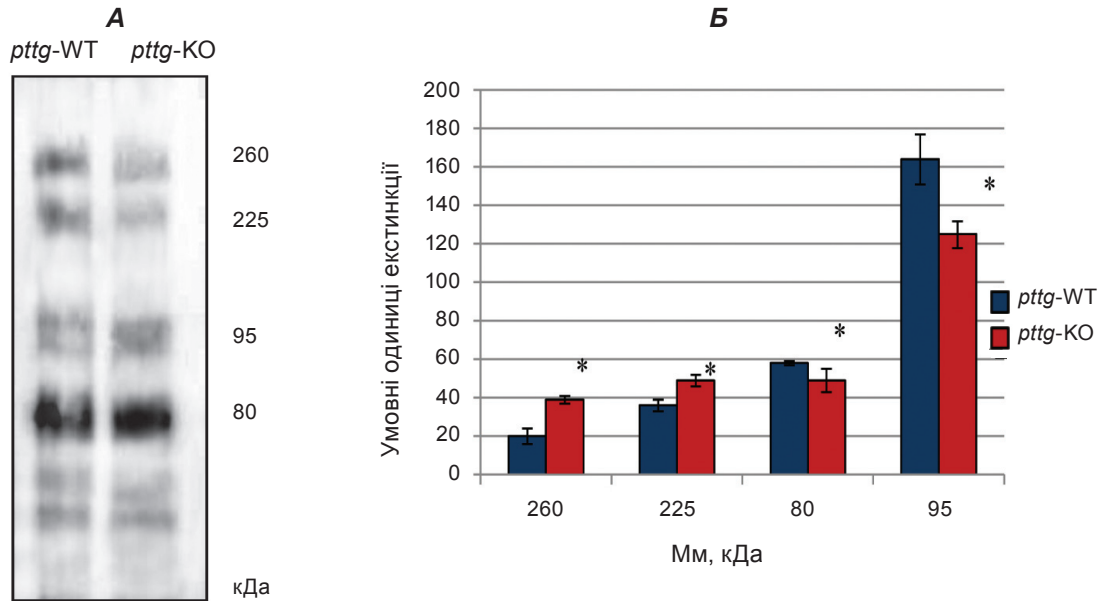


Рис. 3. Лектиноблотаналіз мембранних глікопротеїнів еритроцитів мишей дикого типу та нокаутних за геном *pttg* із лектином МАА: А – типовий лектиноблот на нітроцелюлозній мембрані; Б – оцифровані дані результатів (\* $P < 0,05$ )

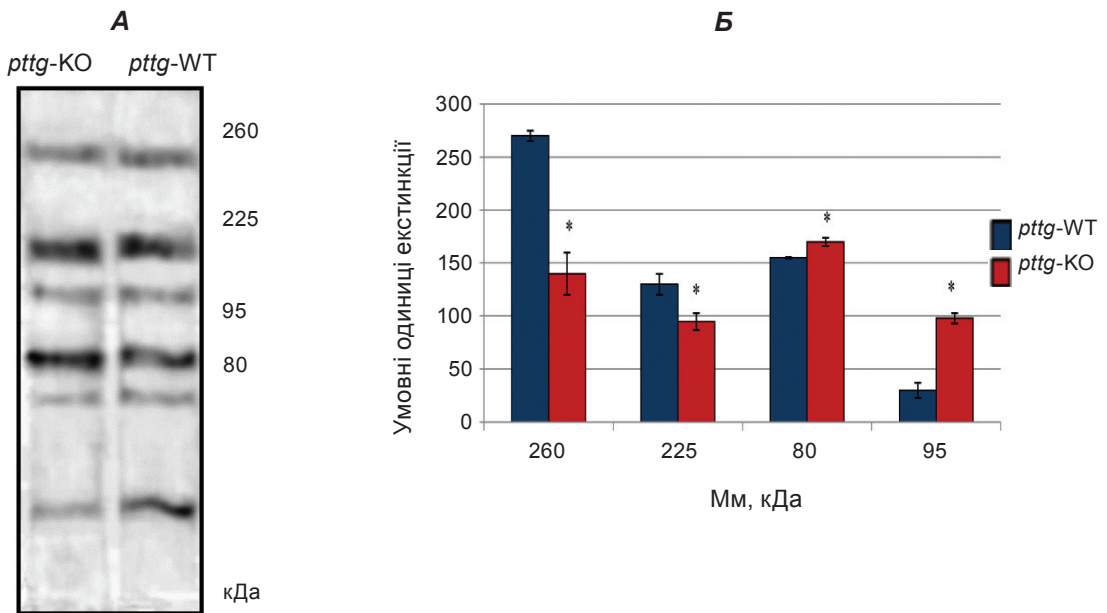


Рис. 4. Лектиноблотаналіз мембранних глікопротеїнів еритроцитів мишей *pttg-KO* та *pttg-WT* із лектином SNA: А – типовий лектиноблот на нітроцелюлозній мембрані; Б – оцифровані дані результатів (\* $P < 0,05$ )

ких ендосомних везикул. Це супроводжується зменшенням конститутивного синтезу протеїну та уповільненою рециркуляцією і деградацією рецепторіндукованих ендцитозних везикул. Збільшені розміри ранніх ендосом та зменшен-

ня їх загальної кількості, можливо, зумовлене неправильним злиттям цих органел [4]. Таким чином, за нокауту гену *pttg* у мишей може порушуватись N-глікозилювання глікопротеїнів, яке відбувається котрансляційно спочатку в ен-

доплазматичному ретикулумі, а потім в апараті Гольджі.

Узагальнюючи результати досліджень, можна дійти висновків:

– одержані експериментальні дані свідчать, що за нокауту гену *pttg* відбувається модифікація жирнокислотного складу ліпідів мембран і значний кількісний перерозподіл протеїнів мембран та цитоскелета еритроцитів. Це супроводжується зниженням вмісту  $\beta$ -субодиниці спектрину та протеїну смуги 3, збільшенням вмісту протеїнів смуги 4.2 та протеїнів смуги 4.5.

– нокаут гену *pttg* супроводжується істотними змінами структури вуглеводних детермінант мембранних глікопротеїнів еритроцитів: зміною типу зв'язку, яким приєднується термінальний залишок у вуглеводній детермінанті глікопротеїнів.

Одержані нами дані пояснюють окремі молекулярні механізми, які призводять до зміни морфології еритроцитів, що, в свою чергу, пов'язано з метаболічними та структурно-функціональними змінами еритроцитів за нокауту гену *pttg*.

#### **КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЭРИТРОЦИТАРНОЙ МЕМБРАНЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ АРХИТЕКТониКУ КЛЕТОК ПРИ НОКАУТЕ ГЕНА *pttg***

*Е. П. Канюка<sup>1</sup>, Е. З. Филяк<sup>1</sup>,  
А. Р. Кулачковский<sup>1</sup>, Ю. Л. Осип<sup>2</sup>,  
Н. А. Сибирная<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Львовський національний університет  
імени Івана Франко, Україна;  
e-mail: kanokaol@yahoo.com;

<sup>2</sup>Восточноевропейский национальный университет  
імени Леси Українки, Луцк, Україна

Нокаут гену *pttg* впливає на функціональне состояние еритрона у мишей, що може бути пов'язано со структурними змінами строения еритроцитарних мембран. При нокауте гену *pttg* спостерігається значительна модифікація жирнокислотного складу ліпідів мембран еритроцитів мишей за рахунок зменшення вмісту пальмитинової кислоти і збільшення суми поліненасичених жирних кислот на 18%. Аналізуючи поверхню архітектуру еритроцитів мишей в умовах нокауту гену *pttg*

встановлено, що на фоні зменшення численності популяції функціонально повноцінних двояковогнутих дисків спостерігається збільшення кількості трансформованих кліток, що знаходяться на різних стадіях дегенерації. Проведені дослідження показали, що у мишей з нокаутом гену *pttg* зменшується вміст протеїну цитоскелета –  $\beta$ -спектрин на 17,03%. При цьому відбувається зменшення вмісту мембранного протеїну смуги 3 на 33,04% з одночасним збільшенням вмісту аніонотранспортного протеїну смуги 4.5 на 35,2% і смуги 4.2 на 32,1%. З допомогою лектинблотаналізу виявлені зміни в структурі вуглеводних детермінант мембранних глікопротеїнів еритроцитів в умовах направленої інактивації гену *pttg*, що супроводжується зміною типу зв'язку, яким приєднується термінальний залишок у вуглеводній детермінанті глікопротеїнів.

Таким чином, при нокауті гену *pttg* спостерігається значительне перерозподілення вмісту протеїнів і жирних кислот в мембранах еритроцитів, що проявляється в збільшенні кількості деформованих форм еритроцитів.

**Ключевые слова:** ген *pttg*, жирные кислоты, эритроцитарная мембрана, архитектура, гликотеины, цитоскелет, протеин полосы 3.

#### **QUANTITATIVE CHANGES OF MAIN COMPONENTS OF ERYTHROCYTE MEMBRANES WHICH DEFINE ARCHITECTONICS OF CELLS UNDER *pttg* GENE KNOCKOUT**

*O. P. Kanyuka<sup>1</sup>, Ye. Z. Filyak<sup>1</sup>,  
O. R. Kulachkovskyy<sup>1</sup>, Y. L. Osyp<sup>2</sup>,  
N. O. Sybirna<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Ivan Franko Lviv National University, Ukraine;  
e-mail: kanokaol@yahoo.com;

<sup>2</sup>Lesya Ukrainka Eastern European  
National University, Lutsk, Ukraine

A *pttg* gene knockout affects the functional state of erythron in mice which could be associated with structural changes in the structure of erythrocyte membranes. The *pttg* gene knockout causes a significant modification of fatty acids composition of erythrocyte membrane lipids by reducing the content



of palmitic acid and increasing of polyunsaturated fatty acids amount by 18%. Analyzing the erythrocyte surface architectonics of mice under *pttg* gene knockout, it was found that on the background of reduction of the functionally complete biconcave discs population one could observe an increase of the number of transformed cells at different degeneration stages. Researches have shown that in mice with a *pttg* gene knockout compared with a control group of animals cytoskeletal protein –  $\beta$ -spectrin was reduced by 17.03%. However, there is a reduction of membrane protein band 3 by 33.04%, simultaneously the content of anion transport protein band 4.5 increases by 35.2% and protein band 4.2 by 32.1%. The lectin blot analysis has helped to reveal changes in the structure of the carbohydrate determinants of erythrocyte membrane glycoproteins under conditions of directed *pttg* gene inactivation, accompanied by changes in the type of communication, which joins the terminal residue in carbohydrate determinant of glycoproteins.

Thus, a significant redistribution of protein and fatty acids contents in erythrocyte membranes that manifested in the increase of the deformed shape of red blood cells is observed under *pttg* gene knockout.

**Key words:** *pttg* gene, fatty acid, erythrocyte membrane, architectonics, glycoproteins, cytoskeleton, protein band 3.

1. Канюка О. П., Філяк Є. З., Сибірна Н. О. // Біологічні студії. – 2011. – 5. № 1. – С. 97–101.
2. Zhang X., Horwitz G. A., Prezant T. R. et al. // Mol. Endocrinol. – 1999. – 13, N 1. – P. 156–166.
3. Wang Z., Yu R., Melmed S. // Mol. Endocrinol. – 2001. – 15, N 11. – P. 1870–1879.
4. Vasac M., Fusco C., Planche A. et al. // Traffic. – 2011. – 12(5) – P. 615–626.
5. Козинец Г. И., Шишканова З. Г., Новодержкина Ю. К. Конфигурация и поверхность клеток крови в норме и патологии. – Москва: Триада-фарм, 2004. – 17 с.
6. Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Степовая Е. А. Физиология и патофизиология эритроцита. – Томск: Изд-во Томского ун-та., 2004. – 200 с.
7. Погорелов В. М. // Гематология и трансфузиология. – 2005. – 50, № 5. – С. 13–17.
8. Folch J., Lees M., Stauley G. // J. Biol. Chem. – 1957. – 226. – P. 497.
9. Синяк К. М., Оргель М. Я., Круг В. И. // Лабор. дело. – 1976. – № 7. – С. 37–41.
10. Dodge J. T., Mitchell C., Hanahan D. J. // Arch. Biochem. Biophys. – 1963. – 100. – P. 119–130.
11. Gimsa J. // Biophys. J. – 1998. – 75, N 1. – P. 568–569.
12. Колосова М. В. Общие закономерности и механизмы нарушений периферического звена эритрона при типовых патологических процессах в клинике детских болезней: Дис. ... д-ра мед. наук. – Томск, 1999. – 468 с.
13. Chen J. Y., Huestis W. H. // Biochim. Biophys. Acta. – 1997. – 1323, N 2. – P. 299–309.
14. Nakamura M. T., Nara T. Y. // Annu. Rev. Nutr. – 2004. – 24. – P. 345–376.
15. Maretzki D., Mariani M., Lutz H. U. // FEBS Lett. – 1990. – 259. – P. 305–310.
16. Гула Н. М., Маргитич В. М. Жирні кислоти та їх похідні при патологічних станах – К.: Наукова думка, 2009. – 335 с.
17. Bodine D. M., Birkenmeier C. S., Barker J. E. // Cell. – 1984. – 37(3). – P. 721–729.
18. Low P. S. // Biochemica and Biophysica Acta. – 1986. – 846. – P. 145–167.
19. Конопля А. И. Взаимосвязь структуры и функции эритроцитов с иммунным гомеостазом. – Курск: КГМУ, 2008. – 40 с.
20. Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела. – Львів: Кварт, 2005. – 180 с.

Отримано 04.04.2013