

1. Grant-Downton R.T., Dickinson H.G. Epigenetics and its Implications for Plant Biology. 1. The Epigenetic Network in Plants // *Annals of Botany*.- 2005.- vol. 96.- P.1143-1164.
2. Mikula S. Environmental programming of heritable epigenetic changes in paramutant *r*-gene expression using temperature and light at a specific stage of early development in maize seedlings // *Genetics*.- 1995.- vol. 140.- P.1379-1387.
3. Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V., Ishin A.G. Nuclear-cytoplasmic interactions in restoration of male fertility in the '9E' and A4 CMS-inducing cytoplasms of sorghum // *Theor. and Appl. Genet.*- 1998.- vol. 97.- P. 626-632.
4. Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V., Ishin A.G. Influence of water availability on fertility restoration of CMS lines with the 'M35', A4 and '9E' CMS-inducing cytoplasms of sorghum // *Plant Breeding*.- 2005.- vol.134.- P.565-571.
5. Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V. Cytoplasmic reversions as a possible mechanism of male-fertility restoration in the '9E' CMS-inducing cytoplasm of sorghum // *Intern. Sorghum and Millet Newslett.*- 2000.- № 41.- P. 30-31.
6. Chase C.D., Gabay-Laughnan S. Cytoplasmic male sterility and fertility restoration by nuclear genes. In: H. Daniell, C.D. Chase (eds.) *Molecular biology and biotechnology of plant organelle*. Springer. Netherlands. 2004. P.593-621.

#### Резюме

Установлено, что экспрессия генов-восстановителей у гибридов F<sub>1</sub> сорго на стерильной цитоплазме «9E» активируется высоким уровнем влагообеспеченности в период развития метелки, а также коротким фотопериодом на ранней стадии онтогенеза растений. Будучи «включенными» гены-восстановители сохраняют активный (доминантный) статус при самоопылении и выращивании в «неиндуктивных» условиях.

Встановлено, що експресія генів-відновників у гібридів F<sub>1</sub> сорго на стерильній цитоплазмі «9E» активується високим рівнем вологозабезпеченості на період розвитку суцвіття, а також коротким фотоперіодом на ранній стадії онтогенезу рослин. «Вмикаючись», гени-відновники зберігають активну (домінантну) позицію при самозапиленні і вирощуванні в «неіндуктивних» умовах.

Expression of fertility restoring genes in the F<sub>1</sub> sorghum hybrids with the '9E' CMS-inducing cytoplasm was shown to be activated by high level of water availability at panicle development or short photoperiod at the early stage of plant development. Being 'switched on' fertility restoring genes maintain their active (dominant) status in self-pollinated progenies grown at 'non-inductive' conditions.

**ЯМСКОВА В.П.<sup>1</sup>, СКРИПНИКОВА В.С.<sup>2</sup>, КРАСНОВ М.С.<sup>1</sup>, БИТКО С.А.<sup>2</sup>,  
БЕРЕЗИН Б.Б.<sup>2</sup>, ЯМСКОВ И.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,  
Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова 26, e-mail: embrmsk@mail.ru

<sup>2</sup>Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,  
Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова 28

#### **МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, ДЕЙСТВУЮЩИХ В МИКРОДОЗАХ**

Нами были исследованы регуляторные белки (РБ), выделенные из тканей заднего отдела глаза крупного рогатого скота (сетчатки, пигментного эпителия, стекловидного тела, радужки, цилиарного тела) (Краснов и др., 2003а, б; Скрипникова

и др., 2007). РБ представляют собой низкомолекулярные белки, которые оказывают влияние на основные биологические процессы (адгезия, миграция, дифференцировка, клеток), способствуют поддержанию гистоструктуры ткани при культивировании *in vitro*, увеличивая жизнеспособность клеток. Показано, что РБ взаимодействуют с белками, модулирующими их биологическую активность, и в этом взаимодействии участвуют ионы  $Ca^{2+}$ . Методом электрофореза в ПААГ было показано, что белки-модуляторы имеют молекулярную массу 66-70 кДа. На модели органоспецифического культивирования сетчатки и пигментного эпителия в составе заднего отдела глаза тритона было показано, что полученные таким способом фракции РБ сетчатки и пигментного эпителия в микродозах тканеспецифично влияли на клеточную адгезию, жизнеспособность и дифференцировку [Краснов и др., 2003а]. Разработана концепция создания фармакологических препаратов на основе РБ данной группы [Ямсков, Ямскова, 1998].

#### **Материалы и методы**

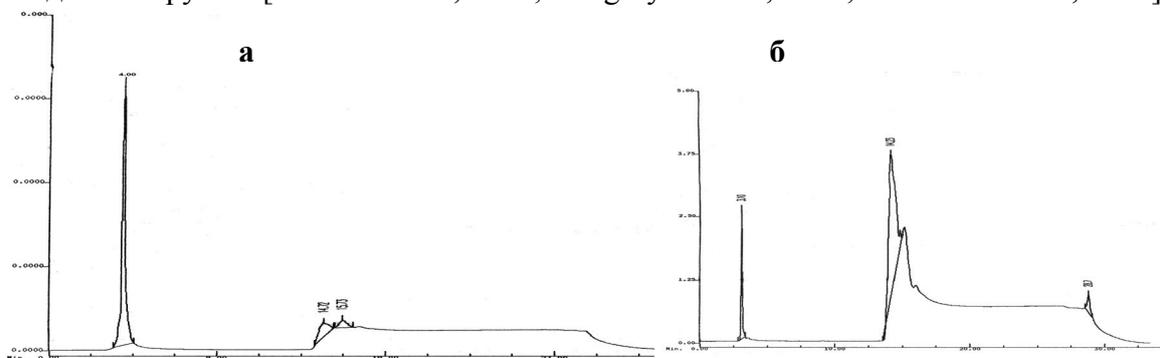
РБ были выделены из различных тканей глаз крупного рогатого скота по разработанной методике. Ткани отдельно экстрагировали в растворе, содержащем 1мМ  $CaCl_2$ , 0,15М  $NaCl$ , 1мМ HEPES, при 4-6 °С в течение 2,5-3,0 ч [Краснов и др., 2003б]. Высаливание тканевых экстрактов осуществляли, прибавляя при перемешивании сухой сернокислый аммоний до образования насыщенного раствора соли. После центрифугирования (10000 g, 30 мин) собирали фракции осадков и надосадочных жидкостей – супернатантов, которые длительно диализовали до полного удаления сернокислого аммония, осуществляя многократную смену воды. В отдельном эксперименте после диализа во фракции осадков добавляли ЭДТА (до образования  $10^{-2}$  М раствора) и оставляли на 48 ч при 4 °С, а затем прибавляли сухой сернокислый аммоний до образования насыщенного раствора соли, которые выдерживали в течение 70 ч при 4 °С. После центрифугирования при 105000 об/мин, с помощью пипетки аккуратно собирали флотирующую фракцию, оставшийся раствор сливали и отделяли от осадка. Сернокислый аммоний и ЭДТА удаляли из фракций длительным диализом против дистиллированной воды.

Для обращено-фазовой ВЭЖХ применяли хроматограф Agilent 1100 Series (США), колонка Биохиммак С8-200 (4.6 мм x 150 мм), градиент вода (0,1% ТФА)–ацетонитрил, скорость элюции 0.5мл/мин. Электрофорез в ПААГ проводили по методу Лэммли [Laemmli, 1970]. Western-блоттинг проводили в системе Bio-Rad, используя перенос белков в буфере на PVDF мембрану и проявление с помощью ECL-kit. Для биотестирования фракций РБ использовали ранее разработанный адгезиометрический метод [Ямскова и др., 1978]. Биологическое действие исследуемых РБ в микродозах ( $10^{-10}$ - $10^{-12}$  мг/мл) изучали на моделях органного культивирования заднего отдела глаза тритона *Pl. waltl* (Краснов и др., 2003а,б).

#### **Результаты и обсуждение**

Нами было показано, что РБ тканей витреоретинальной области глаза прочно связаны с белками, модулирующими их биологическую активность, и что это взаимодействие опосредовано ионами  $Ca^{2+}$ . Об этом свидетельствует тот факт, что при высаливании сернокислым аммонием экстрактов этих тканей, РБ переходят в осадок, и только после обработки ЭДТА растворяются в насыщенном растворе соли. Исследование РБ-содержащих фракций методом электрофореза в ПААГ показало, что комплекс РБ и белков-модуляторов характеризуется значением «кажущейся» молекулярной массы 66-70 кДа. Можно предположить, что обнаруженные во всех фракциях белки с молекулярной массой 66-70 кДа относятся к семейству альбуминов. Методом Western-блоттинга, используя поликлональные антитела к БСА, было выявлено, что белки-модуляторы имеют к ним сродство. В пользу этого предположения свидетельствуют также данные, полученные при обращено-фазовой ВЭЖХ фракций, флотирующих при 105000 g: время удержания БСА и данных белков-

модуляторов соответствовало 19,0-19,8 мин. Ранее для РБ сыворотки крови также был выявлен белок-модулятор, относящийся к семейству альбуминов (Ямсков и др., 2004). Только при обработке хелатирующим агентом (ЭДТА) и используя обращено-фазовую ВЭЖХ удалось разделить этот комплекс и получить фракции, в которых преобладали РБ (Рис. 1а) и фракции, в которых преобладали белки-модуляторы (Рис. 1б). Обращает на себя внимание присутствие гидрофильной фракции с временем удержания 3,2 мин, которая присутствует во всех изучаемых фракциях и соответствует времени удержания РБ данной группы [Krasnov et al., 2007; Margasyuk et al., 2007; Yamskova et al., 2007].



**Рис. 1.** Обращено-фазовая ВЭЖХ (вода-ацетонитрил): а). комплекс «РБ ПЭ – белок-модулятор» во фракции супернатанта; б). комплекс «РБ ПЭ – белок-модулятор» во фракции, флотирующей при 105000g. По оси абсцисс – время элюции (мин). По оси ординат – детекция при длине волны 280 нм.

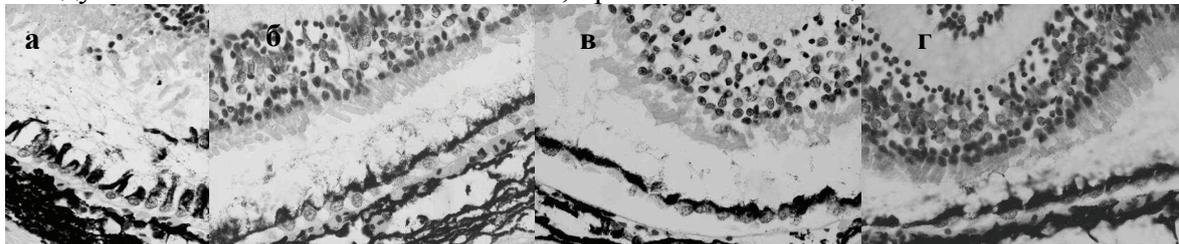
Таким образом, результаты этого исследования показывают, что во фракциях осадков, выделенных из экстрактов тканей витреоретинальной области глаза, содержатся комплексы РБ и белков-модуляторов, которые при воздействии  $\text{Ca}^{2+}$ -хелатирующих агентов и дальнейшем разделении обращено-фазовой ВЭЖХ распадаются на отдельные компоненты, при этом происходит изменение биологической активности РБ. Методом биотестирования было установлено, что мембранотропная активность в микродозах, в основном, соответствует гидрофильным фракциям, содержащим РБ в чистом виде, либо комплексу РБ с белками-модуляторами. Фракции, содержащие только белки-модуляторы, не обладали такой активностью. Для проверки специфической биологической активности РБ, белков-модуляторов и их комплекса нами в условиях *in vitro* был восстановлен комплекс из очищенного методом ВЭЖХ РБ и белка-модулятора в растворе, содержащем ионы  $\text{Ca}^{2+}$  (Рис. 2).



**Рис. 2.** Восстановление комплекса «РБ - белок-модулятор» в условиях *in vitro* из отдельных высокоочищенных компонентов.

Методом биотестирования было показано, что РБ и комплекс «РБ – белок-модулятор» проявляют различный характер мембранотропного действия. Для тестирования специфической биологической активности была использована модель культивирования тканей заднего отдела глаза тритона. На данной модели были протестированы белки, выделенные из пигментного эпителия. В контроле мы наблюдали изменение состояния клеток пигментного эпителия: нарушалась адгезия в пласте между отдельными клетками, пигмент смещался на апикальную сторону, наблюдали частичную гибель клеток (Рис. 3а). При добавлении в среду культивирования РБ или белка-модулятора соответствующего РБ также наблюдали изменение состояния клеток пигментного эпителия и смещение пигмента в клетках,

правда, в менее выраженной форме, чем в контроле (Рис. 3б,в). Совершенно иную картину наблюдали при добавлении в среду культивирования в микродозах восстановленного комплекса «РБ – белок-модулятор» (Рис. 3г). В данном случае комплекс оказывал выраженное протекторное действие на состояние клеток пигментного эпителия, выражающееся в поддержании адгезивных взаимодействий между клетками и их жизнеспособности, препятствии вымещения пигмента из клеток.



**Рис. 3.** Культура заднего отдела глаза тритона. а). контроль; б). РБ пигментного эпителия; в). Белок-модулятор для РБ пигментного эпителия; г). комплекс «РБ пигментного эпителия – белок-модулятор».

Таким образом, в данном случае для РБ, выделенных из витреоретинальной области тканей глаза было показано, что только в комплексе с белками-модуляторами они обладают выраженным действием на соответствующие ткани. Эти данные отличаются от данных, полученных для РБ, выделенных из таких тканей глаза, как склера, роговица и хрусталик, где выраженным действием обладают сами РБ, а не комплекс. В тканях заднего отдела глаза, в которых транспорт биологически активных веществ из кровяного русла и в пределах ткани осуществляется, в основном, за счет переноса веществ по межклеточному пространству, эти комплексы, возможно, функционируют не только как биорегуляторы, но играют принципиальную роль в процессах метаболизма и транспорта. Выяснение этого вопроса будет являться предметом наших дальнейших исследований.

Следует отметить, что на основе РБ, выделенных из тканей глаза, разработаны и в настоящее время находятся на стадии клинических испытаний фармакологические препараты нового поколения - глазные капли, предназначенные для лечения таких распространенных глазных заболеваний, как катаракта, повреждения роговицы, миопия, витреоретинальные патологии, дистрофии сетчатки и др.

#### **Выводы**

РБ, выделенные из тканей витреоретинальной области глаза, отличались от РБ других тканей глаза способностью образовывать устойчивые комплексы с белками-модуляторами, последние можно отнести к суперсемейству альбуминов. Было показано, что находясь в комплексе изучаемые РБ обладают выраженным действием на соответствующие ткани глаза. При диссоциации комплекса биологическая активность РБ меняется..

#### **Литература**

1. *Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П.* Модель органотипического культивирования сетчатки вместе с тканями заднего сектора глаза тритона для изучения действия адгезивных гликопротеинов // Изв. Акад. наук. серия биологическая. -2003а N1. -с. 22-36.
2. *Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П. и др.* Регуляторные белки тканей глаза позвоночных // Радиционная биология и радиоэкология. -2003б. N3. -с. 265-268.
3. *Краснов М.С., Ямскова В.П., Гурмизов Е.П., Григорян Э.Н., Маргасюк Д.В.* Модели органотипического культивирования тканей глаза in vitro для тестирования регуляторных молекул // Сборник научных трудов III Международной научной конференции “Факторы экспериментальной эволюции организмов”, Алушта (Автономная Республика Крым, Украина), 25-28 сентября. ред. М.В. Роик. К.: -Логос. - 2006. т. 3. -с. 590-595.

4. Ямсков И.А., Ямскова В.П. Фармакологические препараты нового поколения на основе ранее неизвестных биорегуляторов-гликопротеинов клеточного микроокружения // Рос. хим. ж. (ЖРХО им. Д.И. Менделеева). -1998. -Т.42. N3. -с.85-90.
5. Ямскова В.П. Роль ионов кальция в стабилизации адгезионного фактора печени крыс // Биофизика. -1978. -т.23. -с.428-432.
6. Ямскова В.П., Рыбакова Е.Ю., Виноградов А.А., Вечеркин В.В., Ямсков И.А. Исследование белка-инактиватора адгезивного гликопротеина из сыворотки крови млекопитающих.// Прикладная биохимия и микробиология. -2004. -т.40, №4, -с.407-413.
7. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. "Analysis of a Regulatory Peptide from the Bovine Eye Lens: Physicochemical Properties and Effect on Cataract Development in vitro and in vivo" pp. 21-33 // In the book "Biochemical Physics Frontal Research", Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 126.
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4// Nature. -1970. -V. 227. -P. 680-685.
9. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Grigoryan E.N., Yamskova V.P., Yamskov I.A. "Regulatory Protein from Bovine Cornea: Localization and Biological Activity", pp. 47-59 // In the book "Biochemical Physics Frontal Research", Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 126.
10. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G. Blagodatskikh I.V. and Yamskov I.A. "Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 1. Isolation, purification and physicochemical properties.", pp. 57-67 // In the book "Biochemical Physics Frontal Research", Ed. by Varfolomeev S.D., Burlakova E.B., Popov A.A. and Zaikov G.E., Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 126.

#### **Резюме.**

Из тканей витреоретинальной области глаза были выделены РБ, которые образуют комплекс с белками-модуляторами, относящимися к альбуминам. Данный комплекс обладал выраженным биологическим действием в микродозах.

From vitreoretinal tissue of eye have been allocated regulatory proteins which form a complex with the protein-modulators concerning to albumin. The given complex possessed the expressed biological action in microdozes.

**ЯЦИШИН В. Ю.<sup>1,2</sup>, ЩУК О. П.<sup>2</sup>, ВОРОНОВСЬКИЙ А. Я.<sup>2</sup>, ФЕДОРОВИЧ Д. В.<sup>1,2</sup>, СИБІРНИЙ А. А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Львівський національний університет імені Івана Франка,

<sup>2</sup> Інститут біології клітини НАН України,

Україна, 75005, Львів, вул. Грушевського, 4

e-mail: yatsyshyn.v@gmail.com

#### **УТВОРЕННЯ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ РЕКОМБІНАНТНИМИ ШТАМАМИ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FALMATA*, ЩО МІСТЯТЬ ГЕН *FMN1* ПІД ПРОМОТОРОМ *TEF1***

Перетворення рибофлавіну (РФ) до його біологічно активної форми – флавінмононуклеотиду (ФМН) – це АТФ-залежний процес, який здійснює РФ-кіназа (синоніми: флавокіназа, ФМН-синтетаза, АТФ:РФ-5'-фосфотрансфераза) (Е.С. 2.7.1.26). На відміну від ферментів біосинтезу РФ, її синтез не регулюється іонами заліза. Не