

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. №3. -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.^{1,2}, ЩУК О. П.², ВОРОНОВСЬКИЙ А. Я.², ФЕДОРОВИЧ Д. В.^{1,2}, СИБІРНИЙ А. А.²

¹ Львівський національний університет імені Івана Франка,

² 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

зважаючи на те, що існує досить багато природних надсинтетиків РФ, досі не виявлено здатності мікроорганізмів до синтезу значних кількостей ФМН. В той же час, препарати ФМН, отримані ферментативним способом, можуть знайти застосування як лікарські препарати, як реактиви високого ступеня чистоти, а також як компоненти системи біоломінесцентного аналізу.

Попри високу активність РФ-кінази, порівняно з іншими ферментами синтезу флавінів, у клітинах та культуральній рідині флавіногенних дріжджів *Candida famata* нагромаджуються лише слідові кількості вільного ФМН. Причини такого явища невідомі і пов'язуються з дією фосфатаз [4]. Раніше ми показали, що заміна нативного промотора гену *FMNI* (кодує РФ-кіназу) дріжджів *Debaryomyces hansenii* на сильний, конститутивний промотор *TEF1* *C. famata* дає можливість отримати рекомбінантні штами дріжджів із підвищеною активністю РФ-кінази, які здатні виділяти ФМН у середовище [1]. Однак, попри високу активність РФ-кінази, крім ФМН, в культуральній рідині виявлено значні кількості РФ. Дана робота присвячена пошуку причин нагромадження РФ та умов, які б забезпечили максимальну продукцію ФМН такими штамми.

Матеріали та методи

У роботі використовували отримані нами раніше рекомбінантні штами дріжджів *Candida famata*, що містять ген *FMNI* *D. hansenii* під контролем промотора *TEF1* *C. famata*. Схема конструювання плазмід з геном *FMNI* під контролем промотора *TEF1* та отримання трансформантів описані в [1].

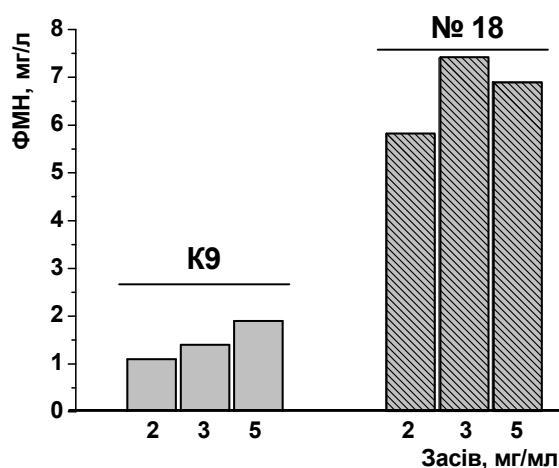
Дріжджі вирощували при 30⁰С у багатому середовищі YPD (дріжджовий екстракт, 0,5%; пептон, 1%; глюкоза, 2%), та мінімальному середовищі Беркгольдера [5].

Вміст флавінів у культуральній рідині визначали флуориметрично на флуорометрі ЕФ-3М після хроматографічного розділення, з використанням синтетичного РФ як стандарту [6]. Безклітинні екстракти отримували шляхом руйнування суспензії клітин в гомогенізаторі для клітин і бактерій Л-17 скляними кульками. Діаліз проводили проти фосфатного буферу при 4⁰С протягом 12 год., вміст білка у зразках визначали за Лоурі [7]. Визначення активності РФ-кінази проводили за [1], лужної фосфатази за [4], кислої фосфатази за [3]. За одиницю активності фермента [U] приймали його кількість, яка забезпечує синтез 1 мкмоль продукту реакції за 1 хв.

Дані представлено як середнє ± похибка середнього ($M \pm m$). Статистичну обробку здійснювали з використанням коефіцієнта Ст'юдента. Математичне опрацювання результатів виконували за допомогою програмного пакета Microsoft Office Excel 2003.

Результати та обговорення

Введення гену *FMNI* *D. hansenii* під контролем сильного конститутивного промотора *TEF1* *C. famata* в геном флавіногенних дріжджів *C. famata* призводило до 6-7-кратного підвищення активності РФ-кінази [1]. У таких штамів вміст ФМН у культуральній рідині за умов вирощування протягом 3 діб у рідкому синтетичному середовищі (СБ) був вищим, ніж у контрольних в 5-6 разів, при цьому частка ФМН від



загального вмісту флавінів становила біля 30%. Для оптимізації умов нагромадження ФМН було використано інкубацію клітин. Продукція ФМН суттєво залежала від кількості інкубованих клітин. Виявилось, що найкращий вихід ФМН спостерігається при засіві 3мг/мл клітин (рис.1), а подальше підвищення їх кількості знижує ефективність синтезу ФМН, можливо внаслідок дефіциту поживних речовин. На відміну від штаму дикого типу L20105 та контрольного штаму K9 (трансформованого плазмідом, що не містила гена *FMNI*), у яких нагромадження ФМН було однаково низьким, незалежно від кількості інкубованих клітин та часу їх інкубації, усі рекомбінантні штами, що містили ген *FMNI* під контролем промотора *TEF1*, характеризувалися суттєвим підвищенням синтезу ФМН на 17-20 год. інкубації. Подальша інкубація клітин не приводила до зростання кількості ФМН в культурі.

Рис.1. Вміст ФМН у культуральній рідині трансформанта №18 та контрольного штаму K9 у залежності від густини засіву

Використовуючи короткочасну інкубацію 3 мг клітин, досліджено активність РФ-кінази та флавіногенну активність рекомбінантних штамів *S. famata*, що містять ген *FMNI* під контролем *TEF1* промотора. Виявилось (табл.), що аналізовані рекомбінантні штами характеризуються вищою в 4-6 разів активністю РФ-кінази, в порівнянні з контрольними штамми L20105 і K9. За сумарною кількістю флавінів у культуральній рідині трансформанти практично не відрізнялися від контрольних штамів, проте нагромаджували до 4,4 мг/л ФМН (в 7 разів більше, ніж вихідний штам). Відсотковий вміст ФМН становив 24-33% у трансформантів та 7% у контрольного та вихідного штамів.

Незважаючи на суттєве підвищення активності РФ-кінази та зростання вмісту ФМН при короткотривалій інкубації клітин рекомбінантних штамів, його кількість була незначною, а РФ складав понад 60% загального вмісту флавінів. Було висловлено припущення про можливість гідролізу синтезованого ФМН неспецифічними клітинними фосфатазами.

Таблиця

Активність РФ-кінази та рівень флавіногенезу в рекомбінантних штамів *S. famata*, що містять ген *FMNI* під контролем *TEF1* промотора

Штам	Активність РФ-кінази, мкмоль х 10^{-5} / хв х мг білка *	Флавіни культуральної рідини, мг/л		
		ФМН **	Сумарна кількість флавінів **	% ФМН
L20105	7,38±0,51	0,6±0,02	8,8±0,90	7
K9	11,07±1,02	0,9±0,07	13,0±1,25	7
трансформант 3	48,38±4,44	2,4±0,11	10,0±0,98	24
трансформант 9	48,79±3,92	4,4±0,39	13,3±1,45	33
трансформант 18	43,05±4,50	4,1±0,37	13,9±1,11	30
трансформант 33	46,74±4,53	2,7±0,30	9,7±1,00	27

Вірогідно відрізняється від відповідних контрольних значень із $p < 0,05$ (*) та $p < 0,025$ (**)

Для дріжджів *Pichia guilliermondii* було показано, що активність фосфатаз, здатних до гідролізу ФМН, інгібується іонами Be^{2+} , F^- , їх сумішшю, а також Ca^{2+} [2, 3]. Інкубація клітин рекомбінантних штамів *S. famata* в середовищі з різними концентраціями $BeSO_4$, NaF та $CaCl_2$ призвела до зростання вмісту ФМН у

культуральній рідині на 12-25% (рис.2). Оптимальною для нагромадження ФМН концентрацією NaF виявилась 0,2 мМ (на 15% більше ФМН), а суміші – 0,2 мМ NaF і 0,5 мМ BeSO₄ (на 23% більше ФМН). Цікаво, що лише одночасне додавання іонів берилію та фториду призводить до зростання продукції ФМН, при цьому додавання лише іонів берилію пригнічує утворення ФМН інкубованими клітинами на 16%. За підвищення у середовищі інкубації вмісту CaCl₂ продукція ФМН зростала на 12%. Приведені дані свідчать, що гідроліз ФМН є однією із причин нагромадження в культуральній рідині, крім ФМН, РФ. Однак токсичність цих інгібіторів виключає застосування їх у процесі ферментації з метою отримання препаратів ФМН.

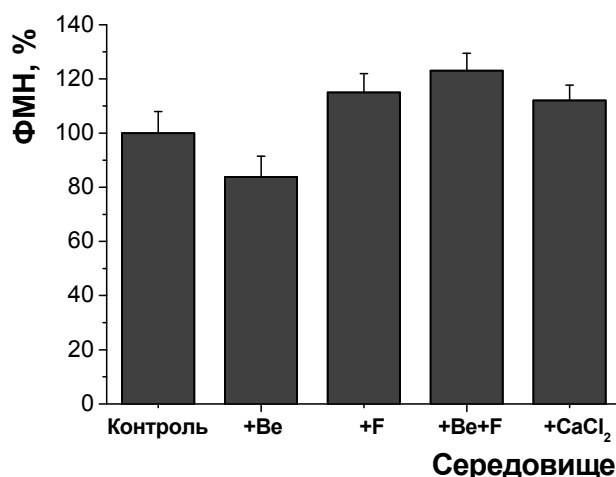


Рис. 2. Вміст ФМН у культуральній рідині штамів *C. famata*, що містять ген *FMN1* під контролем промотора *TEF1*, при інкубації в середовищі з інгібіторами фосфатаз

Цікавою виявилася спроба пригнічення активності фосфатаз шляхом внесення в середовище інкубації підвищених кількостей фосфату калію. Активність кислої фосфатази інгібувалась фосфатом на 18-20%, проте активність лужної фосфатази під впливом KН₂РO₄ зростала на 25%, однак вона є малоактивною в середовищі інкубації дріжджів, рН якого є нижчим 5. За таких умов вміст ФМН у культуральній рідині зростав у 2,5 рази. Таким чином, продукцію ФМН можна регулювати шляхом зміни компонентів середовища.

Наведені результати свідчать про те, що генно-інженерне конструювання штамів із високим рівнем експресії гену *FMN1* є перспективним для створення дріжджових надсинтетиків цього нуклеотиду. Подальші зусилля повинні бути спрямовані на забезпечення РФ-кінази субстратом – РФ, а також делеції генів, які відповідають за гідроліз ФМН.

Література

1. Ішук О.П., Яцишин В.Ю., Дмитрук К.В., Вороновський А.Я., Федорович Д.В., Сибірний А.А. Генно-інженерне конструювання штамів флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінкінази // Укр. біохім. журнал. – 2006. – Т. 78, № 5. – С.53-59.
2. Сибірний А.А., Шавловський Г.М. Об ингибировании щелочной фосфатазы I дрожжей *Pichia guilliermondi* *in vitro* и *in vivo* // Укр. биохим. журн. – 1978. – Т. 50, № 2. – С. 212-218.
3. Струговицкова Л.П., Федорович І.П., Сенюта Е.З., Шавловський Г.М. Дослідження кислої фосфатази II дріжджів *Pichia guilliermondi* // Укр. біохім. журн. – 1976. – Т. 48, № 3. – С. 320-324.

4. Струговщицова Л.П., Шавловський Г.М., Федорович І.П., Кучерас Р.В. Очищення та деякі властивості лужної фосфатази І дріжджів *Pichia guilliermondii* // Укр. біохім. журн. – 1973. – Т. 45, № 3. – С. 312-317.

5. Шавловский Г.М., Жарова В.П., Щелокова И.Ф., Трач В.М., Сибирный А.А., Кушминская Г.П. Флавиногенная активность природных штаммов дрожжей *Pichia guilliermondii* // Прикл. биохимия и микробиология. – 1978. – Т.14. – С. 184-189.

6. Bessey O.A., Lowry J.Y., Love R.H.J. The fluorometric measurement of the nucleotides of riboflavin and their concentration in tissues // J. Biol. Chem. – 1949. – Vol. 180, N 2. – P. 378-381.

7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.

Резюме

Досліджено флавіногенну активність рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata*, що містять ген РФ-кінази *FMN1* під контролем сильного конститутивного промотора *TEF1*. Оптимізовано умови нагромадження ФМН у культуральній рідині.

Изучена флавиногенная активность рекомбинантных штаммов дрожжей *Candida famata*, содержащих ген РФ-киназы *FMN1* под контролем сильного конститутивного промотора *TEF1*. Оптимизированы условия накопления ФМН в культуральной жидкости.

The flavinogenic activity of recombinant strains of the yeast *Candida famata* that express the *FMN1* gene encoding riboflavin kinase under control of the strong constitutive *TEF1* promoter was studied. Conditions for flavinmononucleotide production were optimized.

LYPOVA N.M., SINDAROVSKA Y.R., GERASYMENKO I.M., SHELUDKO Y.V., BANNIKOVA M.A., KUCHUK N.V.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine,
Zabolotnogo str. 148, Kiev 03680, Ukraine, e-mail: ysheludko@ukr.net*

COMPARISON OF DIFFERENT SYSTEMS FOR PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEINS PRODUCED BY TRANSIENT EXPRESSION IN PLANTS

Plants as source of recombinant proteins have important advantages over microbial or animal cell systems. Plant cells, unlike bacteria, are able to produce proteins with post-translational modifications, as well as correctly folded and assembled multimeric proteins, e. g. antibodies [1]. In contrast to animal cells, plants are free from human pathogens like viruses and prions, so the recombinant proteins of plant origin are considered to be safer [2]. The main obstacle on the way of using transgenic plants for high-scale production of recombinant proteins is the low level of foreign gene expression in case of stable integration into plant nuclear genome (usually about 0.1-0.5 % TSP) [3]. Transient gene expression may allow for rapid accumulation of considerably larger amount of recombinant proteins (in the range 0.5-10 % TSP or sometimes more) [4], but even in this case an efficient purification system can substantially improve the yield of pure target product.

Here we describe comparative analysis of different approaches for purification of transiently expressed recombinant proteins from plants using green fluorescent protein (GFP) as a reporter. The purification scheme including ammonium sulfate precipitation and anion-exchange chromatography was compared with two tag-based protocols applying metal affinity chromatography with a 6xHis tag (Qiagen) and intein mediated purification with a chitin-binding affinity tag (New England Biolab).