

7. Witty M., Harvery W.J. Sensory evaluation of transgenic *Solanum tuberosum* producing rthaumat II. NZ. J. Crop Hort. Sci. – 1990. – Vol. 18. – P. 77-80.
8. Pham N.B., Schäfer H., Wink M. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures // Biotechnol J. – 2012. – Vol. 7. – P. 537-545.
9. Bartoszewski G., Niedziela A., Szwacka M., Niemirowicz-Szczytt K. Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth // Plant Breeding. – 2003. – Vol. 122. – P. 347-351.
10. Szwacka, M., Krzymowska M., Osuch A., Kowalczyk M. E., Malepszy S. Variable properties of transgenic cucumber plants containing the thaumatin II gene from *Thaumatococcus daniellii*. // Acta Physiol. Plant. – 2002. – Vol. 24. – P. 173-185.
11. Schestibratov K.A., Dolgov S.V. Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea* // Sci Hortic. – 2005. – Vol. 106. – P. 177-189.
12. Hanhineva K., Kokko H., Siljanen H., Rogachev I., Aharoni A., Karenlampi S.O. Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria ananassa*) // J. Exp. Botany. – 2009. – Vol. 60. – P. 2093-2106.
13. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – Vol. 12. – P. 13-15.
14. Klochenko P.D., Elanskaya I.A., Shevchenko T.F., Sokolova E.V. Antifungal activity of freshwater cyanobacteria // Algological Studies. – 2001. – Vol. 103. – P. 143-149.

**SHCHERBAK N.L.<sup>1</sup>, KURCHENKO I.N.<sup>2</sup>, YURIEVA E.M.<sup>2</sup>, KUCHUK M.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str. 148, e-mail: natasha@icb.kiev.ua*

<sup>2</sup>*D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnoho St. 154*

#### **OBTEINING OF LETTUCE AND STRAWBERRY TRANSGENIC PLANTS CARRYING SWEET-TASTE PROTEIN THAUMATIN II**

**Aim.** According to the published data protein thaumatin II of *Thaumatococcus daniellii* is capable to induced sweet taste and antifungal resistant phenotype. A possible application of thaumatin II properties is to produce transgenic disease resistant crop plants with modified fruit taste. **Methods.** Transgenic plants were obtained via *Agrobacterium* mediated transformation method. Presence of the target and selective genes was confirmed by PCR analysis. Antifungal activity of the extracts from green-house grown lettuce plants was tested. **Results.** We report here the development of transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) and strawberry (*Fragaria x ananassa*) plants with thaumatin II gene under control of CaMV 35S promoter. **Conclusion.** The leaf extract from transgenic lettuce plants carrying thaumatin II gene had no inhibiting effect on mycelium growth *in vitro* of the plant pathogenic fungus *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

**Key words:** thaumatin II, *Lactuca sativa*, *Fragaria x ananassa*, transgenic plants.

**ЯМСКОВА В.П.<sup>1</sup>, КРАСНОВ М.С.<sup>2</sup>, РЫБАКОВА Е.Ю.<sup>1</sup>, КУЛИКОВА О.Г.<sup>2</sup>, ИЛЬИНА А.П.<sup>2</sup>, ЯМСКОВ И.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, 26, e-mail: yamskova-vp@yandex.ru*

<sup>2</sup>*ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН Россия, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 28, e-mail: embbrmsk@mail.ru*

#### **НОВАЯ ГРУППА МЕМБРАНОТРОПНЫХ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ**

В середине прошлого века были сформулированы следующие положения: в основе пространственной организации ткани лежит позиционное положение формирующих ее клеток; строго фиксированное пространственное расположение каждой клетки обусловлено разнообра-

зием морфогенетических реакций ее поверхности, среди которых определяющими являются контактные и адгезионные взаимодействия; точная адгезия играет принципиальную роль в регуляции таких жизненно важных биологических процессов, как миграция, пролиферация и

дифференцировка, апоптоз клеток, геновая экспрессия, сигнальная трансдукция и морфогенез. Эти представления о значении клеточной адгезии в процессах биорегуляции стимулировали активное изучение молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий. Основной экспериментальный подход к исследованию этой проблемы заключался в идентификации молекул адгезии как антигенов межклеточного пространства с помощью методов биохимии, иммунохимии и микроскопии. Таким образом были открыты и изучены компоненты и архитектура ультраструктур межклеточных контактов (плотные; щелевые контакты, десмосомы и др.), внеклеточного матрикса, различные семейства адгезивных белков, система универсальных рецепторов в плазматической мембране (ПМ) клеток – интегринов. Нами был применен совершенно

### Материалы и методы

МГТБ экстрагировали из тканей по разработанной методике при пониженной температуре в физиологическом растворе. Полученные тканевые экстракты фракционировали в условиях насыщенного раствора сернистой аммонии. Надосадочную жидкость и осадок собирали, диализовали и исследовали методом биотестирования. Фракцию супернатанта изучали методами изоэлектрофокусирования, обращенно-фазовой ВЭЖХ, электрофореза в ПААГ, кругового дихроизма, MALDI-TOF масспектрометрии, лазерного динамического светорассеивания, атомно-силовой микроскопии [2, 4]. Детекцию фракций белков проводили спектрофотометрически при 280 нм. Биотестирование фракций биорегуляторов проводили с помощью ранее разработанного адгезиометрического метода на органотипической культуре печени мышей и оценивали параметр, отражающий мембранотропную активность. Определение мембрано-

### Результаты и обсуждение

В настоящее время МГТБ обнаружены нами в различных тканях животных и растений [4]. Показана их локализация в межклеточном пространстве (рис. 1).

С помощью физико-химических методов исследования было показано, что МГТБ проявляют высокую  $Ca^{2+}$ -связывающую активность ( $K_d=10^{-4}-10^{-6}$  мг/мл); в водных растворах присутствуют в виде наноразмерных частиц (50-200 нм), причем активность биорегуляторов зависит от их наноразмерного состояния; они ре-

иной подход к исследованию молекул адгезии. В его основе лежал поиск молекул межклеточного пространства, оказывающих влияние на вязкоупругие свойства ПМ. Были разработаны адгезиометрические методы, в которых ПМ рассматривалась как квазиупругое тело при деформационных воздействиях на ткань [5, 6]. С помощью данного экспериментального подхода были открыты молекулы адгезии, которые в последствии получили название *мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов* (МГТБ).

В настоящей статье представлены результаты исследования МГТБ, выделенных из различных тканей животных и растений, а именно их физико-химических свойств и биологического действия.

тропной активности МГТБ проводят на органотипической культуре печени мыши. Фрагменты ткани культивировали в опытной серии в среде, содержащей МГТБ; в контрольной серии в культуральную среду ничего не добавляют. После 2-х часов культивирования каждый фрагмент ткани подвергают стандартному деформационному воздействию и подсчитывают количество выделившихся ядер, которое в присутствии МГТБ выделяется на 25-60% меньше, чем в контроле. Для исследования специфической биологической активности биорегуляторов был разработан ряд новых моделей органотипического культивирования тканей позвоночных животных [3, 4]. Локализацию в тканях биорегуляторов проводили с помощью поликлональной кроличьей антисыворотки, полученной к соответствующим МГТБ и последующей иммуногистохимической реакции на срезах тканей [4].

зистентны к воздействию ряда химических и физических факторов (изменению температуры от  $-70^{\circ}C$  до  $+100^{\circ}C$ , ионного состава и pH среды, действию органических растворителей, протеаз и др.). [2]. Биорегуляторы данной группы имеют сложное строение: они содержат гликопептиды (менее 10 кДа), ответственные за биологическое действие МГТБ, и белки-модуляторы (15-70 кДа), которые влияют на активность регуляторных пептидов [7, 8].

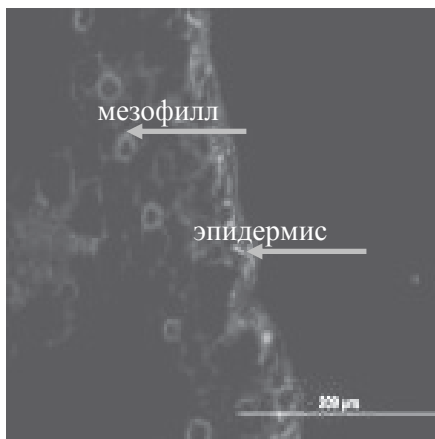


Рис. 1. Локализация биорегулятора, выделенного из лукович чеснока, на поверхности клеток эпидермиса и округлых клеток губчатого мезофилла в отростке чеснока (указано стрелками). Ув. Ок.х10, об.х20. Функция овальных клеток в мезофилле не изучена

Изучение состава компонентов биорегуляторов данной группы показало, что регуляторные пептиды содержат остатки маннозы и N-ацетилглюкозамина, которые, очевидно, N-гликозидной связью присоединяются к N-концевому остатку аспарагина пептида. Секвенирование по Эдману регуляторных пептидов,

входящих в состав МГТБ, провести не удалось из-за блокирования N-концевой аминокислоты. После дегликозилирования трифторметансульфо-кислотой гликопептида, входящего в состав сывроточного МГТБ, удалось определить его аминокислотную последовательность:



Первичная структура фрагмента регуляторного пептида, входящего в состав биорегулятора, выделенного из лука репчатого, была установлена другим способом: с помощью карбок-

сипептидазы Y был проведен последовательный гидролиз остатков аминокислот с C-конца пептида:



Изучение белков-модуляторов, входящих в состав МГТБ животного происхождения показало, что они представлены белками суперсемейства сывроточного альбумина. Причем в состав каждого МГТБ, выделенного из ткани соответствующего органа, входит определенная изоформа альбумина, которая взаимодействует только со «своим» регуляторным пептидом. Был изучен белок-модулятор сывроточного МГТБ [7]. Его вторичная структура представлена высоким содержанием  $\alpha$ -спиралей – 79%, а также  $\beta$

– складчатой структурой – 2% и статистическим клубком – 19%; третичная структура – глобула (данные дифференциальной сканирующей калориметрии); изоэлектрическая точка pI 3,90±0,03 (данные ИЭФ); обнаружена высокая гомология с сывроточным альбумином быка – изоформа (поиск гомологов по алгоритму PROSEARCH, база данных SwissProt). Тем не менее N-концевая аминокислотная последовательность молекулы сывроточного белка-модулятора:



Результаты исследования механизма взаимодействия регуляторных пептидов и их белков-модуляторов показали, что в основе самосборки биорегулятора, которая осуществляется на поверхности клеток, лежит углевод-белковое взаимодействие, причем сывроточный альбумин «узнает» как лектин углеводную компоненту регуляторного пептида. Ионы кальция играют

большую роль в организации этого комплекса. Образовавшийся комплекс всегда проявляет как мембранотропную, так и специфическую биологическую активность в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих ( $10^{-8}$ – $10^{-15}$  мг). Следует отметить, что регуляторные пептиды, выделенные, например, из тканей заднего отдела глаза быка (сетчатки, пигментного эпителия, радужной обо-

лочки, стекловидного тела) проявляли мембранотропную активность в существенно более высоких дозах ( $10^{-3}$ – $10^{-4}$  мг), а кроме того, не оказывали выраженного влияния на состояние ткани при культивировании [8]. И только комплекс, образовавшийся после взаимодействия пептида и белка-модулятора (изоформы альбумина) прояв-

лял мембранотропную активность в СМД и оказывал яркое протекторное действие на ткани заднего отдела глазного бокала в этих дозах. Методом кругового дихроизма удалось обнаружить конформационные изменения в молекуле белка-модулятора, после взаимодействия с регуляторным пептидом (рис. 2).

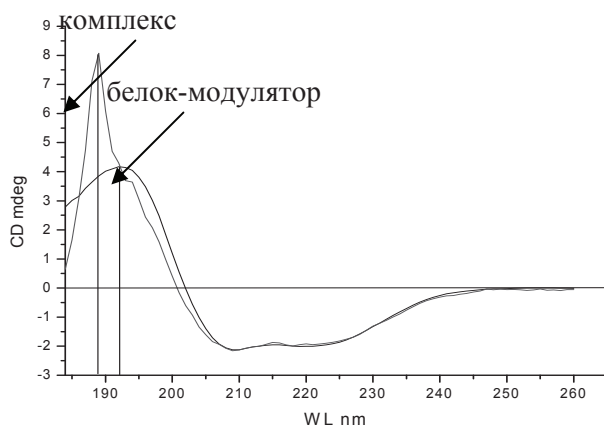


Рис. 2. КД-спектры белка-модулятора и его комплекса с регуляторным пептидом

Согласно нашим представлениям, взаимодействие между РП и белками-модуляторами лежит в основе самосборки структуры МГТБ, которые являются «тонкими настройщиками» органо-тканевого гомеостаза, то есть обеспечивают регуляцию биологических процессов, проявляя свойства тканевой, но не видовой специфичности действия. Следует отметить особую роль изоформ альбумина сыворотки крови, которые были обнаружены как белки-модуляторы, входящие в состав нескольких МГТБ. Известно, что семейство сывороточного альбумина включает в себя несколько десятков членов. До сих пор их функция оставалась совершенно не изученной. Согласно предложенной нами концепции, многочисленные изоформы сывороточного альбумина могут быть ответственны за регуляцию процессов органо-тканевого гомеостаза, входя в состав МГТБ и функционируя как шапероны в межклеточном пространстве соответствующей ткани. Такое поведение сывороточного альбумина (подобно шаперону) показано в литературе [9]. Мы полагаем, что изоформы альбумина могут проникать избирательно в межклеточное пространство соответствующего органа через гемато-органные барьеры, которые пропускают только специфический для данного органа альбумин. Это предположение подкрепляется результатами исследования альбуминов, входящих в состав МГТБ. Так, например, методами масс-спектрометрии было показано, что альбумины, входящие в состав нескольких

МГТБ, имели различные значения молекулярных весов [7, 8].

Для исследования специфической активности МГТБ были разработаны и использованы различные модели органо-типического культивирования тканей позвоночных животных (крыса *Wistar*, тритон *Pl. waltl*, лягушка *Xenopus laevis*), в том числе задний отдел глаза, хрусталик, роллерные культуры роговицы, склеры, целого глаза, кожи, печени, регенераты конечностей [3]. Некоторые опыты были выполнены на экспериментальных моделях некоторых патологий *in vivo*: кожные раны и ожоги, травмы глаза, костной и хрящевой тканей, ампутация конечностей, острый панкреатит у млекопитающих. В результате проведения этих исследований установлено, что МГТБ в СМД оказывают влияние на миграцию, пролиферацию, дифференцировку, апоптоз клеток, увеличивают жизнеспособность клеток при культивировании, стимулируют восстановительные и репаративные процессы в патологически измененных тканях за счет дополнительной активации клеточных источников регенерации в ткани [4]. Активность МГТБ характеризуется отсутствием видовой, но наличием тканевой специфичности. Результаты этого исследования объясняют также уникальное свойство биорегуляторов данной группы дополнительно активировать клеточные источники регенерации, вызывая тем самым стимуляцию процессов восстановления и репарации [4].

## Выводы

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что на поверхности клеток присутствуют определенные макромолекулярные структуры, участвующие в адгезии клеток и в регуляции основных биологических процессов. В состав этих самособирающихся структур входят биологически активные пептиды и белки,

относящиеся к суперсемейству сывороточного альбумина, которые модулируют активность пептидов. Эти компоненты взаимодействуют по механизму углевод-белкового взаимодействия, причем альбумины выполняют функцию лектинов, узнающих углеводную компоненту пептидов.

## Литература

1. Куликова О.Г., Ямска В.П., Ильина А.П. и др. Идентификация в луке репчатом нового биорегулятора, действующего в сверхмалых дозах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, №4. – С. 1-5.
2. Ямсков И.А., Благодатских И.В., Краснов М.С. и др. Физико-химические свойства биологически активных в микродозах регуляторных белков, выделенных из различных тканей млекопитающих // Изв.АН Сер. Хим. – 2009. – №3. – С. 623-628.
3. Ямска В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов нового поколения. – М.: Изд. Макс Пресс, 2009. – 84 с.
4. Ямска В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. – 136 с.
5. Ямска В.П., Модянова Е.А., Левенталь В.И. и др. Тканевоспецифические макромолекулярные факторы из печени и легкого: очистка и действие на механическую прочность ткани и клеток // Биофизика. – 1977. – Т. 22. – С. 168-174.
6. Ямска В.П., Модянова Е.А., Резникова М.М., Маленков А.Г. Высокоактивные тканевоспецифические адгезионные факторы печени и легкого // Молекулярная биология. – 1978. – Т. 11, №5. – С. 1147-1154.
7. Ямска В.П., Рыбакова Е.Ю., Виноградов А.А. и др. Исследование белка-инактиватора адгезивного гликопротеина из сыворотки крови млекопитающих // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, №4. – С. 407-413.
8. Ямска В.П., Скрипникова В.С., Молявка А.А. и др. Структурно-функциональные особенности нового биорегулятора, выделенного из ткани пигментного эпителия глаза быка // Биохимия. – 2009. – Т. 74, №9. – С. 1195-1203.
9. Marini I., Moschini R., A Del Corso, Muka U. Chaperone-like features of bovine serum albumin: a comparison with alpha-crystallin // Cell. Mol. Life Sci. – 2005. – Vol. 62. – P. 3092-3099.

YAMSKOVA V.P.<sup>1</sup>, KRASNOV M.S.<sup>2</sup>, RYBAKOVA E.Yu.<sup>1</sup>, KOULIKOVA O.G.<sup>2</sup>, IL'INA A.P.<sup>2</sup>, YAMSKOV I.A.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> N. K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences  
Russia, 119334, Moscow, Vavilov str., 26, e-mail: yamskova-vp@yandex.ru

<sup>2</sup> A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement compounds, Russian Academy of Sciences  
Russia, 119991, Moscow, Vavilov str., 28, e-mail: embrmsk@mail.ru

## STUDY OF A NEW GROUP OF MEMBRANE-ACTING TISSUE-SPECIFIC HOMEOSTATIC BIOREGULATORS

**Aim.** The study of a new group of tissue-specific homeostatic membranotropic bioregulators isolated from various tissues of animals and plants. **Methods.** Physical and chemical properties of a new bioregulator have been studied by isoelectric focusing, reversed-phase HPLC, polyacrylamide gel electrophoresis, circular dichroism, MALDI-TOF mass spectrometry, laser dynamic light scattering, atomic force microscopy. **Results.** The bioregulators of this group consist of a biologically active peptides and proteins related to the superfamily of serum albumin, which modulate the activity of these peptides. These components interact through the mechanism of carbohydrate-protein interactions, and albumin function as lectins that recognize carbohydrate component peptides. **Conclusions.** Our results indicate that the cells are present on the surface of certain macromolecular structures involved in cell adhesion and in the regulation of basic biological processes.

**Key words:** bioregulators, cell adhesion, serum albumins.