

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS
CENTRAL BOTANICAL GARDENS
Laboratory of Plant Biochemistry and Biotechnology

CELL NUCLEI OF PLANTS — EXPRESSION AND RECONSTRUCTION

After Materials of I Regional Conference,
Minsk, 28th-29th of July, 2001)

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Лаборатория биохимии и биотехнологии растений

Клеточные ядра растений — Экспрессия и реконструкция

Материалы I Региональной научной конференции
г. Минск, 28–29 мая 2001 г.

Минск
2001

БЕЛКИ НУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИНТЕРФАЗНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ОЗИМОЙ РЖИ ПРИ ПРОРАСТАНИИ

Чижик О.В., Спиридович Е.В., Решетников В.Н.
Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск
220012, ул. Сурганова, 2В, e-mail: biolog@it.org.by

Рассматриваются вопросы гетерогенности белков интерфазных клеточных ядер озимой ржи при прорастании, а также динамики содержания ядерных ДНК и РНК. Определено, что выход ядра из неактивного состояния характеризуется: возрастанием доли белка (от его общего количества) в кариоплазме и остаточных структурах матрикса; широкой вариацией содержания белков во 2 – 4 фракциях; снижением содержания белков во 2 и 3 фракциях (“0” – 71%; “24час.” – 60%; “72час.” – 46%); возрастанием содержания РНК в кариоплазме и матриксе; появлением четких белковых зон в области низкомолекулярных полипептидов (коровых гистонов и гистона H1).

Введение. Интерфазные клеточные ядра высших растений являются важным объектом исследования, поскольку они являются главным информационным центром развития и продуктивности растения, важнейшим объектом регуляторного воздействия рострегулирующими веществами и генноинженерной реконструкции [1-5].

Целью данной работы было биохимическое изучение клеточных ядер злаковых при прорастании зерновки с использованием разных методических подходов, в число которых была включена избирательная экстракция отдельных составных частей ядра растворами различного состава.

Материалы и методы. Одним из распространенных способов экстракции специфических комплексов клеточных ядер является солевая экстракция. Установлено, что раствор 0,14М NaCl экстрагирует белки кариоплазмы, 0,35М NaCl экстрагирует белки нуклеопротеидов, не связанных с матриксом ядра; в 0,6М NaCl переходят гистоны ядра; 2М NaCl диссоциирует компактный хроматин и извлекает большей частью негистоновые белки.

Другим способом “разборки” ядра является “ТМ-экстракция”, когда используют растворы с различными концентрациями ионов двухвалентных металлов (например, магния). Поскольку ни один из указанных способов в отдельности не позволяет достаточно

четко экстрагировать НМГ-белки нуклеопротеидов разной степени компактизации и функциональной активности, в данной работе использовали, кроме упомянутых двух систем растворителей, третий способ разделения белков интерфазного ядра – избирательное осаждение трихлоруксусной кислотой (2, 10 и 20% конечная концентрация раствора). Считается, что из суммарного раствора белка ядра при добавлении трихлоруксусной кислоты (ТХУ) до конечной концентрации 2% выпадают белки кариоплазмы; при 10% концентрации выпадают гистоны и НМГ-белки, а при 20% - оставшиеся НМГ-белки. Учитывая незначительные сведения о НМГ-белках ядер высших растений, явилось целесообразным использовать и эту “кислотную” систему осаждения ядерных белков.

Следует отметить, что информативность, качество и, как следствие, воспроизводимость результатов экспериментальных работ с изолированными интерфазными клеточными ядрами зависит от чистоты полученных препаратов. Используя в качестве объекта исследования зародыши и проростки злаков (озимая рожь, тритикале), в лаборатории был испытан ряд методов получения препаратов клеточных ядер. На основе использования микроскопического контроля препаратов, был выбран метод градиентной очистки ядер в модификации О.П.Булко [6].

Используя вышеназванные методы выделения интерфазных ядер, разделения содержащихся в них белков, проводилась характеристика состава и гетерогенности ядерных белков при экспрессии генома.

В качестве биологической модели эксперимента использовали клеточные ядра зародышей зерновок озимой ржи, находящихся в состоянии покоя (репрессированный геном), и ядра проростков этой культуры (24, 72 часа после замачивания и выдерживания при температуре 20 °С).

Результаты и их обсуждение. Ядерные белки представляют собой гетерогенную группу, которую, руководствуясь положениями Караванова [7], мы также разделяем на 4 группы по следующим основным критериям:

по методам экстракции – водорастворимые, солерастворимые, кислоторастворимые, кислотонерастворимые;

по степени диссоциации в водных растворах различной ионной силы – диссоциирующие в 0,35M NaCl (непрочно связанные в составе хроматина); диссоциирующие в интервале

0,35M – 2M NaCl (средняя сила связи); диссоциирующие в растворе 3-5M мочевины (прочно связанные); остаточные белки (экстракция возможна фенолом и SDS);

по функции – регуляторы транскрипции и репликации; взаимодействующие с гормонами и рецепторными комплексами; структурные; ферменты – полимеразы, репаразы, лигазы, топоизомеразы и др;

по характеру взаимодействия с основными компонентами хроматина – взаимодействующие только с ДНК; взаимодействующие только с белками; взаимодействующие и с ДНК, и с белками;

по характеру взаимодействия с РНК и липидами.

Исследование белков клеточных ядер проводилось с учетом их биохимической природы, сравнивая гетерогенность и количественный состав белков и полипептидов репрессированного и экспресированного ядра, т.е. соответственно ядер зародыша “сухой” зерновки (в состоянии покоя) и проростков озимой ржи.

Ядра зародышей зерновок ржи, находящиеся в состоянии покоя, и ядра 24-часовых и 72-часовых проростков имели сложную картину количественного и качественного распределения белков, ДНК и РНК по частям ядра (табл.1). При прорастании наблюдается устойчивое увеличение белка кариоплазмы (фракция 1) с 8 до 17 % белка и остаточных структур (фракция 5) - с 11 до 24%. Во вторую фракцию из ядер “сухих” и 24-часовых проростков переходит значительное количество белков (более 40%), тогда как ядра 72-часовых проростков характеризуются низкими показателями содержания белков во второй фракции – 13,5%.

Мы объясняем это изменением компактизации хроматина. У 72-часовых проростков происходит перераспределение количественного состава фракций белков ядра и основной из них является уже третья фракция. Эту фракцию, согласно данным электронной микроскопии, мы относим к компактному дезоксирибонуклеопротеиду, связанному с внутренним матриксом ядра. Особенностью фракции является то, что основная часть белков представлена, судя по электрофореграммам, гистонами при незначительном количестве негистоновых белков. Действительно, данные электрофореза белков показали, что в ней по всем вариантам опыта полипептидных

Таблица 1
 Процентное (от суммы) содержание белка и нуклеиновых кислот
 в экстрагируемых растворами фракциях ядер ржи

фр.-ядра п/п	ДНК			РНК			Белок		
	часы проращивания	часы проращивания		часы проращивания		часы проращивания		часы проращивания	
	"0"	"24"	"72"	"0"	"24"	"72"	"0"	"24"	"72"
1	0,25	1,1	0,72	15,65	20,91	30,43	8,44	13,9	16,98
2	14,81	46,82	6,0	52,84	65,98	23,42	41,26	46,88	13,50
3	84,66	51,46	93,41	26,08	8,42	32,32	30,0	13,45	32,53
4	0,17	0,37	0,62	4,48	2,92	6,33	9,05	7,31	12,53
5	0,10	0,24	0,26	0,96	1,77	7,49	11,25	18,45	24,38

зон меньше, чем во фракциях 1 и 2 (табл.2) и они располагаются, в основном, в области М.м. 12-27 кД, где локализуются гистоны.

Таблица 2

Количество зон во фракциях белков клеточных ядер ржи, выявленных электрофорезом

Номер фракции белков ядра	Объект исследования					
	Ядра зародышей сухих зерновок		Ядра 24-часовых проростков		Ядра 72-часовых проростков	
	Кол-во зон	% от контр.	Кол-во зон	% от контр.	Кол-во зон	% от контр.
1	16	100	22	137,5	26	162,5
2	20	100	20	100	34	170
3	9	100	13	144,4	14	155,5
4	9	100	14	155,5	14	155,5
5	7	100	7	100	7	100
Всего	61	100	76	124,6	95	155,6

Подсчитывалось количество зон, явно различаемых после окраски Кумасси

Следует отметить, что 2 и 3 фракции наиболее богаты как белками, так и РНК и ДНК. Основное количество белка во всех вариантах содержится во второй фракции (37-41%). Однако ДНК представлена в большей степени в 3-ей фракции.

Таблица 1 иллюстрирует, что выход зародыша из неактивного состояния сопровождается перераспределением ДНК и РНК по компартментам ядра. Так, 24-часовые зародыши имеют высокое и сопоставимое содержание ДНК во второй и третьей фракциях, в то время как ядра покоящихся проростков показывают основное количество ДНК (85%) в третьей фракции. Это может быть объяснено тем, что ядрам 24-часовых зародышей характерна высокая репликационная активность, сопровождающаяся “разрыхлением” ДНП, в результате чего раствор с низкой ионной силой (№ 2) экстрагирует значительную часть белков ядра (~47%) и вместе с ними - ДНК. В ядрах 72-часовых проростков (активное клеточное деление) ДНК

закрепляется в зоне основного, достаточно компактного ДНП-комплекса, для “расплетания” которого уже необходима высокая концентрация NaCl (2M), содержащаяся в растворе № 3.

Скелетная структура ядра - матрикс - характеризуется тем, что содержание ДНК в его составе нарастает с началом экспрессии генома. Из литературных данных известно [8], что в состоянии покоя в клетке возникают двунитевые разрывы ДНК, происходит открепление ДНК от ядерного матрикса, а при переходе клеток к состоянию активной пролиферации эти разрывы исчезают. Одновременно происходит нарастание активности ДНК-топоизомеразы II, которая составляет значительную часть белков скелетной структуры ядра. Поэтому вполне логично, что в ядерном матриксе активнорастущей ткани содержание ДНК приблизительно в 2,5 раза больше, чем в матриксе неактивных ядер [табл.1].

Процесс прорастания сопровождался нарастанием количества РНК в кариоплазме (фракция 1, табл. 1). Электронно-микроскопические исследования показали, что процесс активации хроматина сопровождается существенными изменениями в строении ядрышка, вследствие чего начинается активация ядрышкового организатора, о чем свидетельствует появление в нем РНП-гранул. Считают, что в первые часы прорастания процессинг рРНК несколько задерживается, что приводит к накоплению РНК в виде необычных гранул в области ядрышкового организатора, которые впоследствии исчезают [8, 9]. Вероятно этим можно объяснить, что почти 87 % РНК извлекается из хроматина 24-часовых проростков растворами № 1 и № 2, тогда как к 72-часам прорастания эта цифра уменьшается до 54 %. В сухих семенах ржи из интерфазных клеточных ядер растворами № 1 и № 2 в сумме извлекается 68% РНК, по всей вероятности, это долгоживущая иРНК, которая необходима для первоначального синтеза белка в первые часы прорастания. Часть РНК непосредственно связана с фиброзным слоем матрикса, гранулами поровых комплексов и фибриллярно-гранулярным компонентом внутриядерного матрикса. Прочность связи отдельных типов РНК с белками матрикса неодинакова и сильно зависит от метаболической активности ткани. Вероятно, поэтому в растворы 3-4 переходит разное количество РНК. В остаточной структуре ядра содержание РНК устойчиво нарастает с 1 до 7,5 %.

Электрофоретическое разделение белков каждой из 5 фракций подтвердило высокую гетерогенность белков ядра (табл.2). При сравнении числа полипептидов по фракциям в большинстве случаев отме-

чается близкая электрофоретическая картина при разной интенсивности белковых зон. Первая и вторая фракции по полипептидам были наиболее гетерогенны (наибольшее количество зон). Экспрессия генома сопровождается явным различием в белковом спектре, что подтвердило электрофоретическое разделение фракции ядерных белков на стадии 24 и 72 часов проращивания. В “стартовых” ядрах часть низкомолекулярных белков представлена одной не разделившейся интенсивно окрашенной зоной, а при прорастании в этом месте появляются 7 зон (М.м. 12-24 кД). “Стартовым” ядрам и ядрам 24-часовых зародышей характерно наличие 2 белковых полос в области М.м. 30 кД, которые полностью исчезают в ядрах 72-часовых проростков. Электрофоретические треки третьей фракции отличаются отсутствием фона, что свидетельствует о незначительной концентрации в исходном растворе гетерогенных полипептидных и нуклеопротеидных фрагментов. В процессе прорастания наблюдается появление дополнительных зон в области высокоподвижных белков и исчезновение двух интенсивных полипептидных треков в верхней части электрофореграммы у 72-часовых проростков.

Результаты, отличные от солевой и ТМ-экстракции, дает ступенчатое осаждение белков ТХУ. В этом случае более достоверно вычлениаются гистоны и НМG-белки. Основываясь на положении, что 10% ТХУ осаждаются гистоны и НМG-белки, можно считать, что в ядрах озимой ржи имеется 4-5 зон НМG-белков, электрофоретическая подвижность которых близка к гистонам, хотя не исключено, что это остаточные количества указанных белков (рис1.).

При разделении гистонов двумерным электрофорезом, проведенном в лаборатории А.Ленец и др., наблюдалось 5 подзон, сопутствующих гистонам, которые также можно отнести к НМG-белкам. Количественные изменения этих белков имеют тенденцию, подобную гистонам (Рис. 2).

Таким образом можно заключить, что выход ядра из неактивного состояния характеризуется: возрастанием доли белка (от его общего количества) в кариоплазме и остаточных структурах-компартаментах; широкой вариацией содержания белков во 2-4 фракциях; снижением суммы белков второй и третьей фракций (“0”-71 %; “24-час” - 60% ; “72-час”- 46%); возрастанием содержания РНК в кариоплазме и матриксе; появлением четких белковых зон в области низкомолекулярных полипептидов (коровых гистонов и гистона H1).

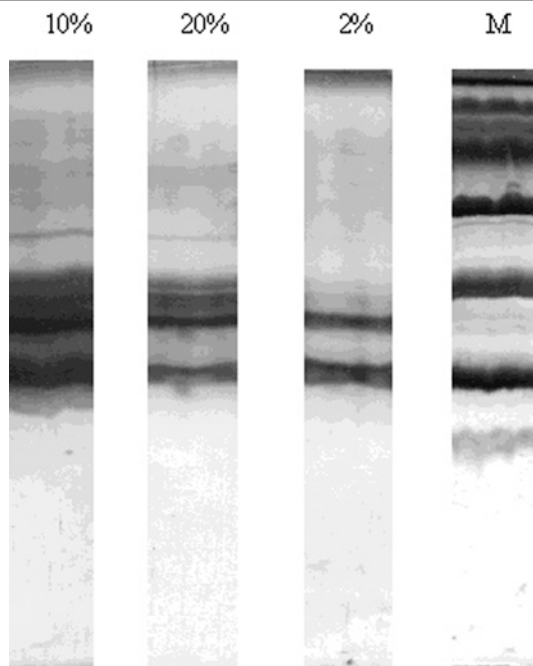


Рис. 1. Электрофореграммы фракций ядерных белков озимой ржи, полученные при кислотном осаждении

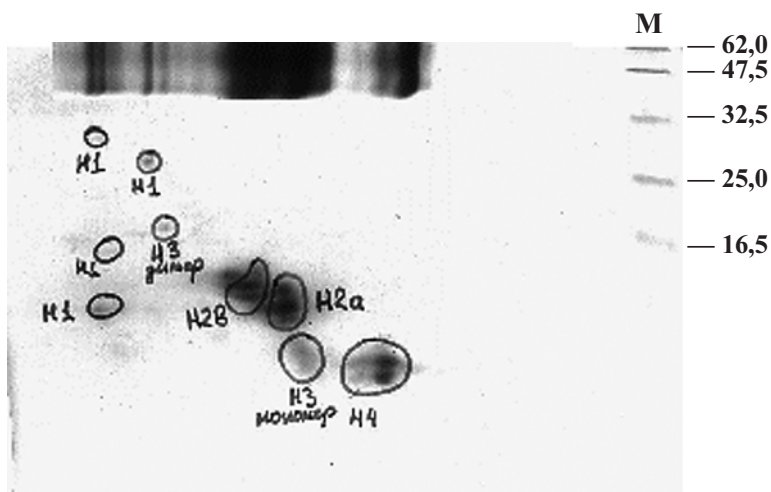


Рис. 2 Карта двумерного электрофореза гистонов 72-часовых проростков ржи (M — маркеры).

Литература

- 1 Решетников В.Н. Пластиды и клеточные ядра высших растений.- Минск, Наука и техника, 1982. – С.126.
- 2 Nagl W. Nucleas organization. – Ann.Rov.Plant Physiol., 1976, Vol.27, P.39.
- 3 Мельничук Ю.П., Лишко А.Н., Калинин Ф.Л. Ядерные белки в функционально различных тканях растений. – Физиология и биохимия культурных растений., 1975, Т.7, вып.1, С.52-58.
- 4 Ку.Е., Цудзевич б.А., Блюм Я.Б., Бабенко Ю.Д. Биохимическая модель регуляции активности хроматинаю – Киев: Наукова думка., 1983. – С.245.
- 5 Spiker S. Chromatin structure and gene regulation in higher plants. – Advances in Genetics, 1984, Vol.22, P.145-208.
- 6 Техника биохимического исследования субклеточных структур и биополимеров. – Минск: Наука и техника, 1977. – С.150.
- 7 Караванов А.А. Транскрипционно активные участки хроматина. – Онтогенез., 1983, Т.14, №4, С.339-389.
- 8 Мирзабеков А.Д. Структура хроматина и других ДНК-белковых комплексов. Динамические структурные изменения в хроматине при его активации. Общие проблемы физико-химической биологии., М.,1985. С.4-48.
- 9 Зеленин А.В., Куш А.А. Активация хроматина и некоторые проблемы регуляции генетической активности в эукариотических клетках. – Мол. биология., 1985. Т.19, вып.1, С.285-293.

Summary

The questions of heterogeneity of proteins from interphase cell nuclei of winter rye during the growing and dynamics of nuclear DNA and RNA content is regarded.

It have been defined that nuclei egress from inactive condition is characterized by:

The increasing of protein portion (from its common quantity) in caryoplasm and remains of matrix structures; the wide variation of protein content in 2 –4 fractions; the decreasing of sum content of proteins in the 2-nd and the 3-rd fractions (“0” – 71%; “24-h” – 60%; “72-h” – 46%); the increasing of RNA content in caryoplasm and matrix; the appearing of clear protein zones in the region of low molecule polypeptides (core histones and histone H1).