

ИЗМЕНЧИВОСТЬ СУБФРАКЦИЙ ГИСТОНА H1, ИЗОФЕРМЕНТНЫЕ СПЕКТРЫ АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗЫ, КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ЛИСТОВОЙ ТКАНИ *NICOTIANA TABACUM* L. РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОСТИ

О.Г. ЛЕНЬКО; О.В. ЧИЖИК, *кандидат биологических наук*

Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Введение

ДНК-связывающие белки играют ключевую роль в процессах репликации, рекомбинации и генетической экспрессии. Прежде всего это белки, ответственные за поддержание структуры ДНК – гистоны и негистоновые белки. Коровые гистоны (белки, образующие нукleosомы) консервативны. В то же время гистон H1, не являющийся коровым гистоном, меняет свою структуру сравнительно легко. Особенностью этого гистона является наличие субфракций. Известно, что субфракции гистона H1 существенно различаются по физическим свойствам, а также по способности конденсировать хроматин [8].

Соотношение субфракций непостоянно. Оно может быть различным в разных типах клеток, зависит от физиологического состояния организма, его органов и тканей. Изменение субфракционного состава гистона H1 может оказать мягкий эффект на процессы развития и дифференцировки. Таким образом, изменение субфракционного состава гистона H1 можно рассматривать как маркерные элементы ряда процессов развития растений. Исходя из этого, особый интерес представляет изучение соотношения субфракций гистона в тканях различной степени дифференцированности.

Существуют различные методы, позволяющие маркировать изменчивость генетического материала. Наиболее доступным способом одновременной оценки изменчивости структурных генов и соответствующего ей полиморфизма отдельных биохимических систем является метод анализа генетически детерминированного полиморфизма белков [1].

Оценку экспрессии генов растений на разных этапах дифференцировки проводили, анализируя изоферментные спектры каталазы, пероксидазы, аскорбатпероксидазы (АПО) и супероксиддисмутазы (СОД), выступающие как маркерные ферменты ряда процессов развития

растений. Антиоксидантные ферменты кодируются целым семейством генов с различной регуляцией и локализацией, их субстраты могут выступать в роли сигнальных молекул, вследствие чего в клетках выявляется ряд изоформ.

Объекты и методы исследования

Исследовали изоферментные спектры ферментов каталазы, супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы из общей фракции легкорастворимых белков ткани листа *N. tabacum* L. разной степени дифференцированности: 1) эксплант листа; 2) первичный каллус, полученный из экспланта листа на среде для каллусогенеза; 3) длительно культивируемый каллус, полученный в ходе многократных пассажей (72 пассажа) первичного каллуса.

Для анализа использовали листья 40-дневных растений табака, выращенных в колбах в стерильных условиях на $\frac{1}{2}$ среде Мурасиге и Скуга (МС) при температуре 22-25°C, освещенности 3-5 клк. и 16-часовом фотопериоде. Образование первичного каллуса индуцировали переносом эксплантов листа на среду МС, содержащую 1 мг/л ИУК и 0,1 мг/л БАП, с последующим пассированием каллусов на этой же среде.

Гистон H1 экстрагировали из растительного материала по методу Johns' [5] с модификациями. Разделение гистонов проводили в щелочной электрофоретической системе с додецилсульфатом натрия (SDS) по методу U.K. Laemmli [6]. Для электрофореза использовали 5%-ный концентрирующий и 14%-ный разделяющий полиакриламидный гель.

После электрофореза гель фиксировали в 15%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ), окрашивали 0,1%-ным Кумасси R-250, отмывали и центрифугировали. Цифровое изображение обрабатывали с использованием компьютерной программы Phoretix 1D.

Экстракцию изоформ каталазы, супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы вели по методу Сафоновых [2]. Все операции по получению белкового препарата, содержащего антиоксидантные ферменты, проводили при +4°C. Содержание белка в образцах определяли по Bredford [4]. В каждой отдельной точке эксперимента образцы уравнивались по белку. Электрофоретическое разделение изоформ каталазы, супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы проводили в 7,5% ПААГ в нативной щелочной системе. Изоформы каталазы выявляли методом Woodbury et al. [9]. Активность изоформ супероксиддисмутазы выявляли методом Beauchamp, Fridovich [3]. Электрофорез аскорбатпероксидазы проводили в тех же условиях, что и для каталазы, но с модификациями Mittler, Zilinskas [3].

Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента изучено содержание субфракций гистона H1 в дифференцированных и дедифференцированных тканях табака. Линкерный гистон в тканях табака может быть представлен шестью субфракциями: две (H1A и H1B) главные (мажорные) и четыре минорные (H1C, H1D, H1E и H1F) [7]. На рис. 1 приведены электрофореграммы гистонов из тканей табака различной степени дифференцированности. Для листовой ткани были выявлены шесть субфракций, а для дедифференцированных тканей табака нулевого и 72 пассажей – по пять фракций для каждой ткани. Для дедифференцированной ткани табака нулевого и 72 пассажей общими были субфракции с молекулярными массами белка 20 и 25 кДа. В листовой ткани данные субфракции не были обнаружены. Так как электрофоретический спектр гистонов – генетически детерминированный признак, то можно предположить, что эти субфракции выступают в роли белкового маркера дедифференцированной ткани табака. Субфракция с Мм белка 21 кДа была выявлена как в ткани листа, так и в дедифференцированной ткани нулевого пассажа, однако в тканях длительного пассирования не обнаружена (рис. 1).

Полученные результаты показали, что количество наблюдаемых изоформ СОД в дедифференцированных тканях снизилось. Изоформа СОД с R_f 0,55 была обнаружена во всех исследуемых образцах, тогда как изоформы с R_f 0,47 и 0,59 были характерны только для дифференцированной ткани, что позволяет считать эти изоформы маркерами полностью дифференцированных тканей табака (рис. 2 в, г, д).

В ходе эксперимента было установлено, что процессы дедифференцировки сопровождаются значительным снижением активности каталазы. На этапе нулевого и длительно пассируемого каллуса активность каталазы не выявляется используемыми нами методами. На этапе полностью

дифференцированной ткани табака была выявлена только одна изоформа каталазы с R_f 0,12, которая в свою очередь может являться маркером дифференцированной ткани табака (рис. 2 е).

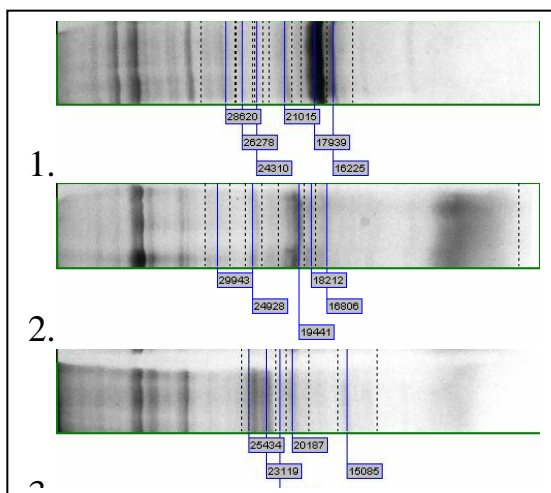


Рис. 1. Разделение гистонов в щелочной электрофоретической системе с додецилсульфатом натрия (SDS) у табака: 1 – ткань листа; 2 – каллус 72 пассажа; 3 – каллус нулевого пассажа

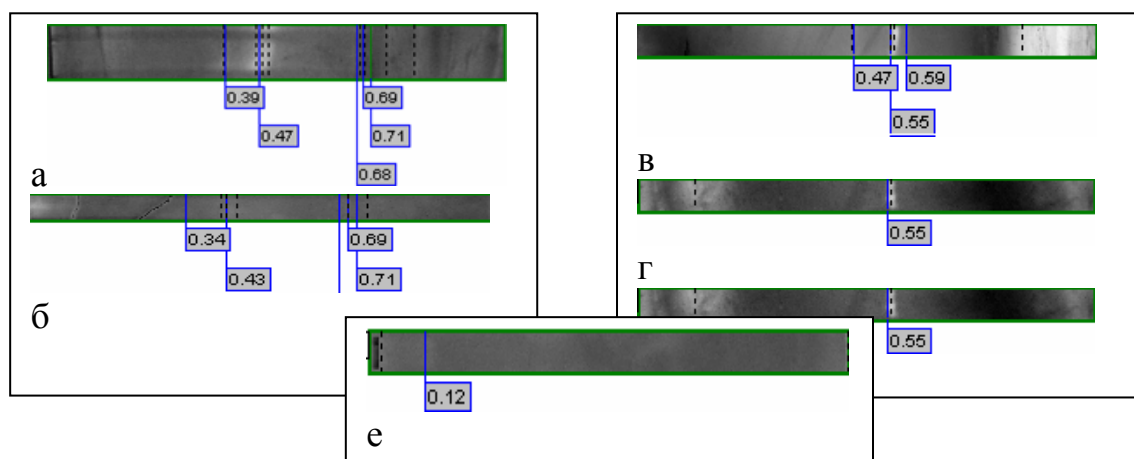


Рис. 2. Зимограммы изоформ антиоксидантных ферментов тканей табака различной степени дифференцировки: а, б – зимограммы изоформ АПО: а – ткань листа; б – каллус нулевого пассажа; в, г, д – зимограммы изоформ СОД: в – ткань листа; г – каллус нулевого пассажа; д – каллус 72 пассажа; е – зимограмма каталазы общей клеточной фракции ткани листа табака

Показано, что экспрессия аскорбатпероксидазы с R_f 0,69 и 0,71 характерна для тканей табака с различной степенью дифференцировки. В свою очередь, изоформу АПО с R_f 0,47 обнаруживали только в дифференцированных тканях, что позволяет считать ее маркерной изоформой АПО дифференцированных тканей табака. При этом в экспланте листа инициация каллусогенеза индуцировала активность новых изоформ с R_f 0,34 и 0,43, что позволяет им претендовать на роль молекулярных маркеров каллусогенеза в табаке. Истинными маркерами процессов дедифференциации клеток табака служат изоформы с R_f 0,1; 0,65; 0,74 и 0,75, обнаруживаемые только в длительно культивируемом каллусе табака (рис. 2 а, б).

Выводы

Таким образом установлено, что: 1) субфракции гистона Н1 с Мм белка 20 и 25 кДа – маркерные белки дедифференцированной ткани табака; 2) изменение изоферментного спектра каталазы, СОД и АПО связано с реализацией генетической программы дедифференциации клеток

табака; 3) АПО с R_f 0,1; 0,65; 0,74 и 0,75 – маркерные ферменты дедифференциации клеток табака; 4) экспрессия СОД с R_f 0,47 и 0,59, каталазы с R_f 0,12 и АПО с R_f 0,47 – это особенность полностью дифференцированных тканей листа табака; 5) изоформы СОД с R_f 0,55 и АПО с R_f 0,69 и 0,71 не имеют четкой функции в реализации программы дедифференцировки тканей табака.

Список литературы

1. Кубрак С.В., Юренкова С.И. Белковые спектры стебля как метаболические маркеры у льна-долгунца // Докл. Нац. АН Беларуси. – 2001. – Т. 45, № 1. – С. 79-82.
2. Сафонов В.И. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохимические методы в физиологии растений: Сб. ст. – М.: Наука, 1971. – С. 113-119.
3. Beauchamp C. Superoxide dismutase // Analytical Biochemistry. – 1971. – Vol. 44. – P. 276-287.
4. Bredford M.M. A rapid sensitive method for the action of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
5. Johns E.W. Studies on histones. 7. Preparative methods for histone fractions from calf thymus // Biochemical Journal. – 1964. – Vol. 92. – P. 55-59.
6. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
7. Prymakowska-Bosak M., Przewloka M. Linker Histones Play a Role in Male Meiosis and the Development of Pollen Grains in Tobacco // The Plant Cell. – 1999. – Vol. 11. – P. 2317-2329.
8. Widom O. Chromatin structure: Linking structure to function with histone H1 // Current Biology. – 1998. – Vol. 8. – P. 788-791.
9. Woodbury W. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes // Analytical Biochemistry. – 1971. – Vol. 44. – P. 301-305.

Рекомендовано к печати к.б.н. Палий А.Е.