

# **Клеточные ядра растений — Экспрессия и реконструкция**



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, 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup> 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

## ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ИНТЕРФАЗНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР РЖИ ПРИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОМА

Ненадович Р.А., Горбацевич В.И., Рощенко М.В.  
Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск  
220012, ул. Сурганова, 2В, e-mail: biolog@it.org.by

---

Проведено сравнительное изучение распределения внутриядерных липидов между отдельными компартментами клеточных ядер, изолированных из зародышей покоящихся семян и 24- и 72-часовых проростков озимой ржи, а также 72-часовых проростков, находящихся в состоянии стресса, вызванного тепловым шоком. Показана его зависимость от активности генома. Подтверждено участие в регуляции генной экспрессии, а также в прикреплении ДНК к ядерному матриксу наряду с фосфолипидами и нейтральных липидов.

Участие липидов в качестве компонентов хроматина и ядерного матрикса в функционировании генома в настоящее время не вызывает сомнений. Однако до конца не выясненными остаются вопросы относительно того, какие именно группы липидов и какие конкретно функции выполняют в ядерном геноме клетки. Наименее изученными остаются как ядерные структуры, так и входящие в их состав и функционирующие в них липидные вещества растительной клетки.

Ранее нами был определен липидный состав, включающий фосфолипиды и нейтральные липиды хроматина и ядерного матрикса дифференцированных и дедифференцированных тканей растений [1-4]. Показано, что содержание фосфолипидов и отдельных групп нейтральных липидов значительно изменяется в зависимости от функционального состояния клетки, в том числе, от степени активности генома. Дана характеристика по липидному составу транскрипционно активного хроматина, а также ядерного матрикса активного генома [5,6].

Задачей настоящей работы было изучение распределения липидов между отдельными внутриядерными структурами клеток ржи и его вероятной зависимости от уровня экспрессии генома. С этой целью использовались зародыши семян, находящихся в состоянии покоя, и выращенные из них 24- и 72-часовые проростки озимой ржи сорта Пуховчанка (естественное изменение экспрессии генома), а также 72-часовые проростки, подвергнутые воздействию

стрессовых условий (влияние на экспрессию генома повышенных температур). Тепловой шок создавался экспонированием 72-часовых проростков при 40°C в течение 3-х часов.

Клеточные ядра выделяли методом дифференциального центрифугирования с очисткой в градиенте плотности сахарозы; чистоту полученных ядер контролировали в окрашенных препаратах с помощью светового микроскопа.

Очищенные ядра фракционировали, последовательно экстрагируя буферами разной ионной силы.

Фракцию №1 получали в результате экстракции ядер средой следующего состава: 10мМ трис-НСl, рН 7,5; 10 мМ NaCl; 3 мМ MgCl<sub>2</sub>; 20 мМ NH<sub>4</sub>Cl.

Фракцию №2 – 10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 0,2 мМ MgCl<sub>2</sub> (ТМ-буфер).

Фракцию №3 – 2 М NaCl; ТМ-буфер.

Фракцию №4 – 1%-ный тритон X-100, ТМ-буфер.

Остаток, полученный после этих обработок, обозначили как фракцию №5.

Экстракцию липидов проводили после частичного концентрирования фракций методом Кейтса [7]. Общее количество липидов и отдельных групп нейтральных липидов определяли по методу Амен-та, количество фосфолипидов – по фосфору (методом Барглетта), количество белка – по методу Лоури в модификации Харти, предварительное фракционирование суммарных липидов и разделение нейтральных липидов – методом тонкослойной хроматографии [8]. Экстракцию липидных веществ и хроматографию проводили очищенными растворителями с добавлениями в качестве антиоксиданта 2-трет-бутил-4-метил-фенола (“Koch-Light”, Англия).

Как следует из рисунка 1, ядра ржи, изолированные из тканей различной метаболической активности, существенно различаются как по количеству суммарных липидов, так и по содержанию их основных классов – фосфолипидов и нейтральных липидов. В ядрах проростков значительно выше содержание суммарных липидов и, особенно, входящих в их состав фосфолипидов. Наиболее богатыми липидами и обогащенными фосфолипидами оказались ядра 24-часовых проростков, характеризующихся высокой метаболической активностью. В метаболически инертных ядрах сухих зародышей преобладают нейтральные липиды.

Изучение липидных веществ в исследуемых фракциях интер-

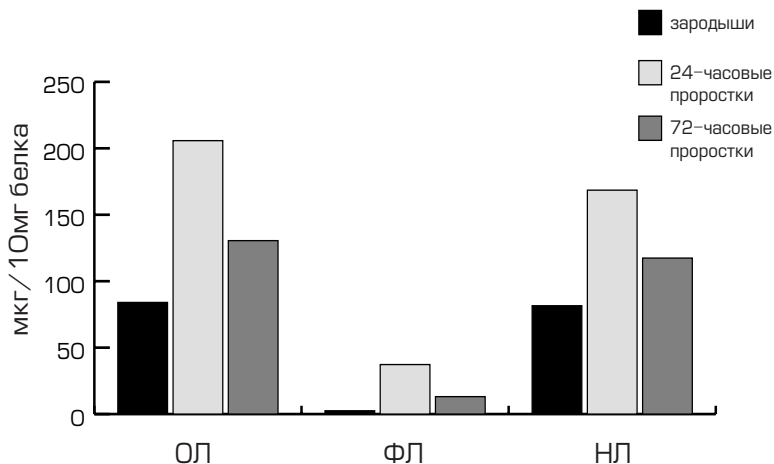


Рис.1. Динамика изменений липидов в ядрах ржи, изолированных из тканей в процессе изменения их метаболической активности (ОЛ - общие липиды, ФЛ - фосфолипиды, НЛ - нейтральные липиды)

фазных ядер ржи различной метаболической активности показало наличие во всех липидах. Их распределение по фракциям зависит от метаболической активности тканей. Обращает на себя внимание прежде всего преобладание фосфолипидов в наиболее активных ядрах 24-часовых проростков (Рис. 2). Это касается диспергированного, не имеющего точек прикрепления к ядерному матриксу, хроматина (фракция №2), хроматина, имеющего слабые контакты с ядерным матриксом (фракция №3), и самого ядерного матрикса (фракция №5). В ядрах 72-часовых проростков этот показатель сохраняется на высоком уровне только во второй фракции – фракции наиболее диспергированного хроматина. Этим подтверждается обнаруженный ранее факт обогащения транскрипционно активного хроматина фосфолипидами [1, 3-5, 9,10], которые, вероятно, принимают активное участие в регуляции генной экспрессии. Механизмов этой регуляции может быть несколько. Это изменение структуры ДНК-матрицы, энзиматические модификации, связывание гистонов хроматина при изменении прочности связи ДНК с белками.

В метаболически активных ядрах проростков обращает на себя внимание фракция №4, куда экстрагируется наиболее прочно связанная с ядерным матриксом часть хроматина и липиды, прини-

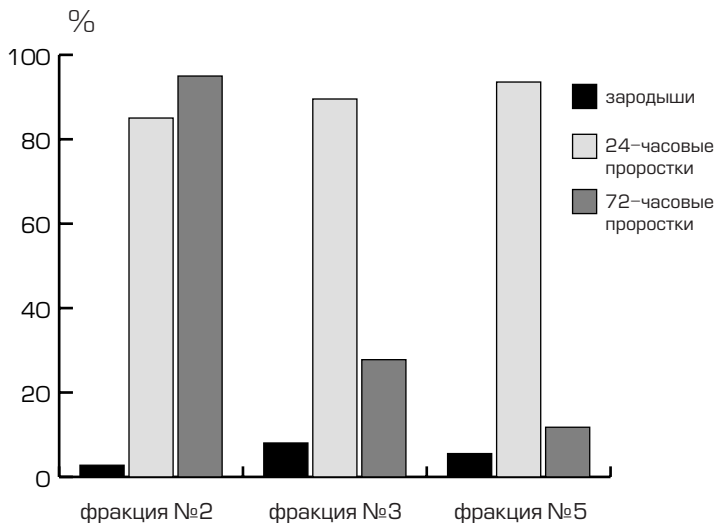


Рис.2. Изменение процентного содержания фосфолипидов во фракциях диспергированного хроматина ядер ржи, изолированных из тканей различной метаболической активности

мающие участие в осуществлении этой связи. В эту фракцию экстрагируется 90,6% (24-часовые проростки) и 76,7% (72-часовые проростки) всех внутриядерных липидов. Она состоит, в отличие от других фракций хроматина, на 88,8% (24-часовые проростки) и 97,5% (72-часовые проростки) из нейтральных липидов (Рис.3). Отсюда следует, что прикрепление ДНК к ядерному матриксу осуществляется с участием нейтральных липидов. Хотя возможно участие в нем и фосфолипидов, 56% которых в 24-часовых проростках находится в этой фракции. Вероятно, от класса липидов, участвующих в прикреплении ДНК к ядерному матриксу, зависит тип связи, определяемый ее прочностью и известный как “сильная” и “слабая” связь.

В ядрах зародышей, находящихся в состоянии покоя, фракция №4 содержит значительно меньше (31,3%) липидов, представленных также в основном нейтральными липидами. Эти данные согласуются с полученными Съяксте о разрушении некоторых связей ДНК с ядерным матриксом в состоянии покоя и их возобновлении при переходе клеток к состоянию активной пролиферации [11]. Ослабление прочности связей в ядрах покоящихся клеток подтверждает-

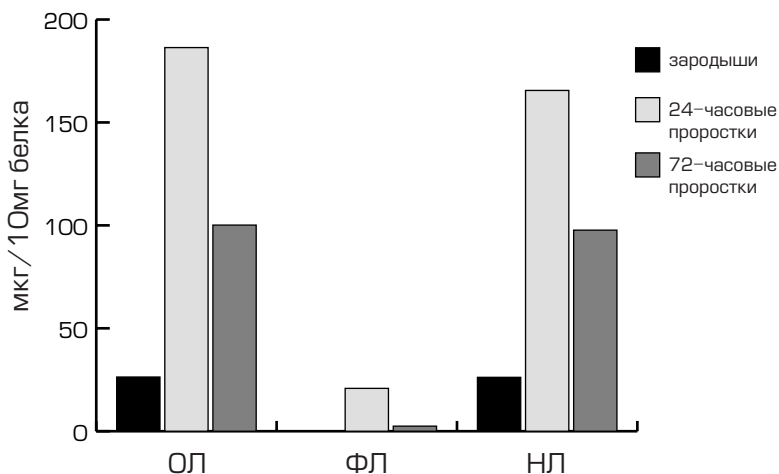


Рис.3. Характеристика липидного состава фракции прочно связанного с ядерным матриксом хроматина ржи различной метаболической активности (ОЛ - общие липиды, ФЛ - фосфолипиды, НЛ - нейтральные липиды)

ся также тем, что основная часть липидов (59%) обнаруживается в наших опытах во фракции №2, фракции наиболее диспергированного хроматина.

Изучение гетерогенности нейтральных липидов в исследуемых нами фракциях интерфазных ядер ржи с различным уровнем экспрессии генома показало наличие в наиболее активных ядрах 24-часовых проростков небольшого процента свободных жирных кислот во всех фракциях хроматина и повышенное их содержание в инертных ядрах сухих зародышей. Известно, что свободные жирные кислоты участвуют в поддержании суперспирализации ДНК и, значит, содействуют снижению транскрипционной активности хроматина [2]. Отмечено также появление во фракции №4 активных ядер нового компонента - диацилглицеролов, которые, как известно, могут играть регуляторную роль в геноме клетки, активируя ядерную протеинкиназу. Также во фракциях хроматина и ядерного матрикса этих ядер отношение эфиров стеролов к свободным стеролам (3,95 – 5,34) выше по сравнению с инертными ядрами (1,95), что характеризует обычно высокую транскрипционную активность хроматина [5].



Сравнительно недавно началось изучение влияния повышенных температур на экспрессию генома растений. Было показано, что у всех растений резкое повышение температуры (тепловой шок) вызывает индукцию синтеза белков теплового шока. Претерпевают ли какие-то изменения присутствующие в геноме липидные соединения при такого рода изменении его экспрессии, никем пока не изучалось.

На рисунке 4 представлены данные по изменению содержания липидных веществ в интерфазных ядрах 72-часовых проростков ржи и их основных фракциях под влиянием теплового шока. Из этих данных следует, что содержание суммарных липидов в исследуемых ядрах проростков, подвергнутых тепловому шоку, выше по сравнению с контрольными на 15,7%. Еще более заметное повышение наблюдалось для фосфолипидов, составив 33,8%. Соответственно выше (на 15,7%) оказалась доля фосфолипидов в суммарных липидах обработанных растений. Иным выглядит распределение липидов по исследуемым фракциям. Содержание фосфолипидов выше во всех фракциях хроматина подвергнутых тепло-

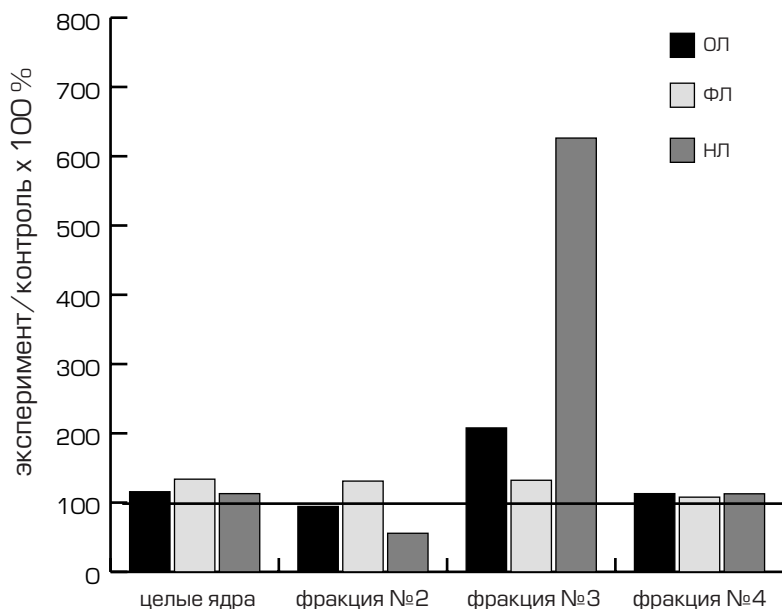


Рис.4 Влияние теплового шока на содержание липидов (ОЛ - общие липиды, ФЛ - фосфолипиды, НЛ - нейтральные липиды) в целостных ядрах и отдельных фракциях

вому шоку проростков. Однако нейтральные липиды (и за их счет суммарные) ведут себя иначе. Беднее липидами по сравнению с контрольными растениями оказывается фракция наиболее диспергированного хроматина (фракция №2) и, соответственно, значительно богаче фракция №3, которая у 72-часовых проростков в контроле, очевидно, менее активна. Обращает на себя внимание и то, что фракция №2 в обработанных растениях составляет значительно меньшую долю от всего ядра по сравнению с контрольными, если судить об этом по содержанию белка в этой фракции, которое выше в контроле в 2,9 раза.

Изучение состава нейтральных липидов основных фракций хроматина (Рис.5) показало, что те соединения, которые могут подавлять транскрипционную активность хроматина (стеролы, свободные жирные кислоты) содержатся в большем количестве во фракции №2 и в значительно меньшем – в 3-ей фракции. Последняя под влиянием теплового шока обогащена как раз теми представителями нейтральных липидов, которые могут характеризовать высокую активность [12,13]. Это диацилглицеролы, триацилглицеролы и эфиры стеролов, отсюда высокое соотношение эфиры стеролов/стеролы.

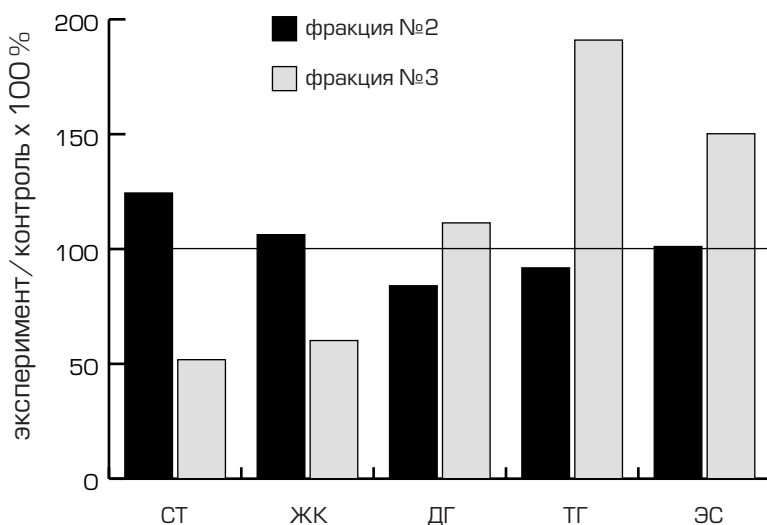


Рис.5. Влияние теплового шока на состав нейтральных липидов (СТ - стеролы, ЖК - жирные кислоты, ДГ - диацилглицеролы, ТГ - триацилглицеролы, ЭС - эфиры стеролов) фракций хроматина 72-часовых проростков ржи

Очевидно, мы можем сказать, что в ядрах проростков ржи, подвергнутых стрессу, фракция хроматина, рассматриваемая нами как имеющая слабые контакты с ядерным матриксом в силу условий эксперимента, - фракция №3 является единственной, обогащенной липидами, и с характеристиками, присущими транскрипционно активному хроматину. Возможно, такое поведение липидов характерно для состояния стресса, вызванного тепловым шоком, когда клетка находится на другом уровне жизнедеятельности, в состоянии повышенной устойчивости, при котором изменяются и внутриядерные структуры.

### Литература

- 1 Ненадович Р.А., Решетников В.Н. // Докл. АН БССР. 1988. Т. 32. С. 460-463.
- 2 Ненадович Р.А. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1990. №3. С. 14-17.
- 3 Решетников В.Н., Ненадович Р.А., Бердичевец Л.Г., Сятковская Ж.Г. // Докл. АН Беларуси. 1994. Т. 38. С. 67-70.
- 4 Решетников В.Н., Ненадович Р.А. // Докл. АН Беларуси. 1995. Т.39. С. 68-71.
- 5 Лапцева В.К., Ненадовіч Р.А., Сасноуская Т.Ф., Вяеунік А.А. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1991. №3. С. 108-114.
- 6 Решетников В.Н., Лаптева О.К., Ненадович Р.А., Сосновская Т.Ф., Веевник А.А. // Физиология растений. 1993. Т. 40. С. 72-78.
- 7 Кейтс М. Техника липидологии. М., 1975.
- 8 Техника биохимического исследования субклеточных структур и биополимеров растительной клетки. // Под ред. Акад. АН БССР А.С. Вечера. Мн., 1986.
- 9 Губский Ю.И., Левицкий Е.Л., Примак Р.Г., Голубов М.Н., Новикова С.Н. // Укр. биох. журн. 1991. Т. 63, №2. С. 83-86.
- 10 Вардеванян А.О., Паносян Г.А. // Физиология растений. 1996. Т. 43, №4. С. 616-619.
- 11 Съяксте Н.И., Календо Г.С., Лихтенштейн А.В., Шапот В.С. // Бюллетень эксперим. биол. и медицины. 1992. №12. С. 38-40.
- 12 Филиппова Г.Н., Боровкова О.В., Алесенко А.В. // Биохимия. 1991. Т. 56, вып. 5. С. 892-902.
- 13 Пушкарева М.Ю., Боровкова О.В., Алесенко А.В. // Биохимия. 1991. Т. 56, вып. 5. С. 903-912.

## **Summary**

The relative analysis of intranuclear lipids location between separate compartments of cell nuclei, isolated from germs of resting seeds, 24- and 72-hours seedlings of winter rye and from 72-hours seedlings of winter rye after exposition to heat shock was carried out. Its relation from genome activity was established. Participation in gene expression regulation, and also in DNA attaching to nuclear matrix alongside with phospholipids and neutral lipids was fortified.