

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
ОТДЕЛ БИОХИМИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

**КЛЕТОЧНЫЕ ЯДРА И ПЛАСТИДЫ
РАСТЕНИЙ:
БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Сборник материалов Международной конференции,
г. Минск,
26-28 мая 2004 г.

Минск
УП «ТЕХНОПРИНТ»
2004

**Клеточные
ядра
и пластиды
растений:**

биохимия и биотехнология

26-28
Май 2004 МИНСК



**ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *ipt* НА ЛИПИДНЫЙ
СОСТАВ ИНТЕРФАЗНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР
*NICOTIANA TABACUM***

Ненадович Р.А., Спиридович Е.В., Горбацевич В.И.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси,
220012, Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова, 2В,
e-mail: biolog@it.org.by

Участие липидов в качестве важного компонента таких внутриядерных генетических структур, как хромосома, хроматин и ядерный матрикс, а также в функционировании генома в настоящее время не вызывает сомнений. Но до сих пор недостаточно данных по составу нейтральных липидов хроматина и ядерного матрикса. Наименее изученными остаются ядерные структуры и входящие в их состав липидные вещества растительной клетки. Ранее нами был определен липидный состав хроматина и ядерного матрикса злаковых культур. Показано, что содержание фосфолипидов и отдельных компонентов 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 [1,2]. В данной работе было проведено изучение распределения внутриядерных липидов между отдельными компартментами ядер и возможного его изменения в трансгенных растениях табака, на функционирование генома которого может оказывать влияние введенный в него ген чужеродного происхождения. Это особенно вероятно при включении генов, изменяющих гормональный статус растения [3]. В нашей работе это ген изопентилтрансферазы (*ipt*) – ключевого фермента биосинтеза цитокининов. Наряду с дифференцированной листовой тканью табака была использована дедифференцированная каллусная ткань, чтобы по возможности исключить влияние тканевой специфичности и ряда факторов среды [4].

Объектами исследования служили интерфазные клеточные ядра, выделенные из:

а) листьев контрольных и трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) с включенным геном изопентилтрансферазы (ipt) – ключевого фермента биосинтеза цитокининов. Растения клонировали *in vitro*. В возрасте 30-40 дней их пересаживали в грунт и выращивали в вегетационных условиях в течение 2 мес.

б) двухмесячного каллуса 1-го пассажа (в качестве экспланта использовали лист контрольных и трансгенных растений).

Трансгенные растения любезно предоставлены лабораторией генетической инженерии растений ИОГен РАН (г. Москва) под руководством профессора Э.С. Пирузян. К моменту постановки наших экспериментов в 1997 г. был проведен их анализ NPT-тестом, методом ПЦР, блот-гибридизацией, который подтвердил включение и сохранность гена *ipt* в геноме трансгенных растений.

Культуральные работы проводили по методикам, изложенным в [5]. 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 их буферами различной ионной силы.

Фракцию №1 получали в результате экстракции ядер средой следующего состава: 10 mM трис-HCl, pH 7,5; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 20 mM NH₄Cl.

Фракцию №2 – 10 mM трис-HCl, pH 7,5; 0,2 mM MgCl₂ (ТМ-буфер).

Фракцию №3 – 2 M NaCl; ТМ-буфер.

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

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

Экстракцию липидов проводили после частичного концентрирования фракций методом Кейтса [6]. Общее количество липидов и отдельных групп нейтральных липидов определяли по методу Амента, количество фосфолипидов – по фосфору (методом Бартлетта), предварительное фракционирование суммарных липидов и разделение нейтральных липидов – методом тонкослойной хроматографии [7]. Экстракцию липидных веществ и хроматографию проводили очищенными раствори-

телями с добавлениями в качестве антиоксиданта 2-трет-бутил-4-метилфенола («Koch-Light», Англия).

В таблицах представлены средние арифметические из трех биологических повторностей и их стандартные ошибки.

Таблица 1

Содержание суммарных липидов и отдельных классов липидов во фракциях интерфазных ядер листьев контрольных и трансгенных растений табака

Ядерные фракции	Общие липиды		Фосфолипиды		Нейтральные липиды	
	мкг*	%	мкг	%	мкг	%
Лист, контроль						
Нуклеоплазма	3,6±0,2	2,8	1,4±0,1	11,7	2,2±0,2	1,9
Свободный хроматин	7,8±0,7	6,1	2,7±0,2	22,2	5,1±0,1	4,4
Слабосвязанный хроматин	3,7±0,1	2,9	1,2±0,1	10,0	2,3±0,2	2,1
Прочносвязанный хроматин	107,3±4,4	83,4	4,9±0,1	41,0	102,3±2,3	87,8
Ядерный матрикс	6,3±0,1	4,8	1,8±0,1	15,1	4,4±0,1	3,8
Итого	128,6±3,8	100,0	12,2±0,1	100,0	116,5±2,0	100,0
Лист, опыт						
Нуклеоплазма	10,3±0,1	9,5	0,7±0,1	8,6	9,60±	9,5
Свободный хроматин	7,9±0,1	7,2	2,4±0,1	28,1	5,5±0,3	5,4
Слабосвязанный хроматин	3,1±0,1	2,8	0,9±0,1	10,1	2,2±0,1	2,2
Прочносвязанный хроматин	80,6±3,6	74,0	2,1±0,1	23,9	78,6±2,1	78,2
Ядерный матрикс	7,1±0,1	6,5	2,5±0,1	29,3	4,6±0,1	4,6
Итого	108,9±2,3	100,0	8,5±0,1	100,0	100,4±1,8	100,0

* – мкг липидов на 10 мг белка ядра.

Проведенные исследования показали, что количество общих липидов, фосфолипидов и нейтральных липидов в расчете на

белок ядра в трансгенных растениях табака ниже, чем в контроле (табл. 1). Несколько иным оказалось и распределение липидов по исследуемым ядерным фракциям. Значительно обогащена липидами нуклеоплазма (фракция №1) трансгенных растений. Это значит, что в ядрах трансгенных растений намного больше легкоэкстрагируемых (слабосвязанных) липидов. Фракция №4 трансгенных растений, наоборот, содержит меньше липидов.

Последняя фракция, куда экстрагируется наиболее прочно-связанная с ядерным матриксом часть хроматина и липиды, вероятно, принимающие участие в осуществлении этой связи. В эту фракцию экстрагируется 83,37% (контроль) и 74 % (ipt) внутриядерных липидов. Они представлены в основном нейтральными липидами. Поэтому можно предположить, что в прикреплении ДНК к ядерному матриксу наряду с фосфолипидами принимают участие нейтральные липиды. Аналогичное предположение было сделано также на основании анализа пока единичных работ по изучению состава нейтральных липидов в ядерном матриксе животных клеток [8]. Что же касается фосфолипидов, их состав в ядерном матриксе животных изучен достаточно хорошо и получены данные, из которых следует, что ДНК в матриксе может быть связана непосредственно через сфингомиелин, доминирующий фосфолипид ядерного матрикса печени крыс [9]. Возможно, от класса липидов, участвующих в прикреплении ДНК к ядерному матриксу, зависит тип и прочность связи, что в литературе определяется как «сильная» или «слабая» [10], или стабильная – прочная за счет нейтральных липидов [11] и динамичная – функциональная за счет фосфолипидов, возможно, кардиолипина [8] и сфингомиелина [9].

Сравнение содержания суммарных липидов в отдельных компартментах ядра трансгенных и контрольных растений показало (табл. 1), что нуклеоплазма трансгенных растений (фракция №1) значительно обогащена липидами. Остальные исследуемые фракции по содержанию суммарных липидов мало отличаются в контрольных и опытных растениях.

Интересным казалось проследить за распределением фосфолипидов, определяющих, по нашим и литературным данным [1,8], наряду с другими показателями транскрипционную актив-

ность хроматина. Все исследуемые нами фракции хроматина трансгенных растений оказались беднее фосфолипидами по сравнению с контрольными. В 1-й фракции трансгенных растений, которые характеризуются повышенным содержанием липидов, также ниже доля фосфолипидов по сравнению с контрольными, т. е. это повышение идет за счет нейтральных липидов. Значительное увеличение доли нейтральных липидов в первой фракции ядра может свидетельствовать об изменении структуры ядра при введении гена ipt, что может выразиться в изменении его функциональной активности. Меньше фосфолипидов содержит и наиболее богатая липидами 4-я фракция. Исключением явилась только фракция ядерного матрикса, которая оказалась у трансгенных растений обогащенной фосфолипидами.

Известно, что фосфолипиды активно включаются в регуляцию процессов репликации, репарации и транскрипции ДНК либо на уровне матрицы ДНК, либо на уровне соответствующих ферментов [11]. Однако очень малоизученные нейтральные липиды значительно (в 1,4-6,8 раз) преобладают над фосфолипидами в составе ДНК-связанных липидов различных клеток эукариот и их количество, в отличие от количества фосфолипидов, широко варьирует в зависимости от метаболической активности клетки [8]. Также обнаружено, что в хроматине асцита Эрлиха присутствуют все триацилглицерины и эфиры холестерина ядра, но только 2,4% фосфолипидов ядра.

Проведено изучение гетерогенности нейтральных липидов в исследуемых фракциях интерфазных ядер контрольных и трансгенных растений табака (рис. 1). Содержание диацилглицеринов во всех фракциях трансгенных растений значительно выше, чем у контрольных, и особенно высоко в 3, 4 и 5-й фракциях, где они являются количественно преобладающим компонентом нейтральных липидов. Выше по сравнению с контрольными и содержание моноацилглицеринов в 3, 4 и 5-й фракциях трансгенных растений, хотя оно и сравнительно невелико. Заметно уменьшение свободных жирных кислот и триацилглицеринов. Последние являются основным компонентом нейтральных липидов контрольных растений во всех фракциях за исключением ядерного матрикса, очевидно, более

постоянной по своему составу структуры по сравнению с различными формами хроматина, хотя также достаточно динамичной.

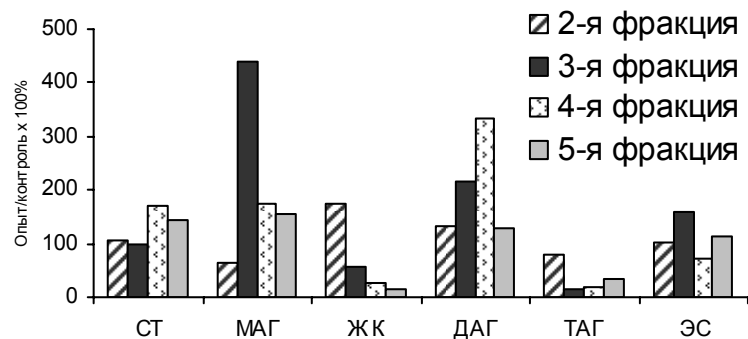


Рис. 1. Влияние экспрессии введенного в растения гена *ipt* на состав нейтральных липидов ядерных фракций листьев табака: 2 – свободный хроматин, 3 – слабосвязанный хроматин, 4 – прочносвязанный хроматин, 5 – ядерный матрикс; СТ – стерины, ЭС – эфиры стерина, ЖК – жирные кислоты, МАГ – моноацилглицерины, ДАГ – диацилглицерины, ТАГ – триацилглицерины.

К сожалению, пока трудно говорить о структурно-функциональной роли отдельных нейтральных липидов в ядерном геноме. Однако известно, что холестерин и свободные жирные кислоты активно взаимодействуют с ДНК *in vitro*, участвуют в поддержании суперспирализации ДНК, содействуя снижению транскрипционной активности хроматина. Диацилглицерины также могут играть регуляторную роль в геноме клетки, активируя наряду с кислыми фосфолипидами протеинкиназу С [12]. Кроме того, предполагается [11], что именно диацилглицерины могут принимать участие в прикреплении ДНК к ядерному матриксу.

Для дополнительного выяснения влияния трансгена (гена *ipt*) на ядерный аппарат растения аналогичные исследования были проведены на каллусных тканях контрольных и трансгенных растений. В табл. 2 представлены данные по липидному

составу интерфазных ядер каллусных тканей. Наблюдалось обогащение липидами 1-й фракции у каллусов трансгенных растений, как и в опыте с дифференцированной тканью.

Таблица 2

Содержание суммарных липидов и отдельных классов липидов во фракциях интерфазных ядер каллусных тканей контрольных и трансгенных растений табака

Ядерные фракции	Общие липиды		Фосфолипиды		Нейтральные липиды	
	мкг*	%	мкг	%	мкг	%
Каллус, контроль						
Нуклеоплазма	4,7±0,1	0,9	1,6±0,1	10,2	3,1±0,1	0,6
Свободный хроматин	3,9±0,1	0,7	1,9±0,1	12,4	1,9±0,1	0,4
Слабосвязанный хроматин	23,7±0,1	4,4	1,9±0,1	12,5	21,8±0,2	4,2
Прочносвязанный хроматин	494,2±3,5	92,1	6,6±0,1	43,4	487,6±6,1	93,5
Ядерный матрикс	10,3±0,1	1,9	3,3±0,1	21,5	7,1±0,1	1,3
Итого	536,8±3,4	100,0	15,3±0,1	100,0	521,5±5,2	100,0
Каллус, опыт						
Нуклеоплазма	24,8±0,2	5,1	1,8±0,1	12,2	23,0±0,2	4,8
Свободный хроматин	5,2±0,1	1,1	2,4±0,1	16,6	2,8±0,1	0,6
Слабосвязанный хроматин	57,9±0,3	11,8	1,3±0,1	9,4	56,6±0,3	11,8
Прочносвязанный хроматин	394,9±4,1	80,1	5,7±0,1	39,9	389,2±7,1	81,4
Ядерный матрикс	10,0±0,1	2,1	3,1±0,1	21,9	6,9±0,1	1,4
Итого	492,8±3,5	100,0	14,3±0,1	100,0	478,5±6,1	100,0

* – мкг липидов на 10 мг белка.

Распределение по исследуемым фракциям фосфолипидов в каллусных тканях также подтвердило картину, характерную для хроматина ядер листьев. В 1, 2 и 3-й фракциях, которые характеризуются повышенным содержанием суммарных липидов в

трансгенных растениях, доля фосфолипидов ниже по сравнению с контролем.

Однако количественный состав нейтральных липидов в каллусных тканях отличается от таковых в листьях. Это касается, прежде всего, отношения форм стерина (рис. 2), которое значительно выше в каллусах по сравнению с листьями и значительно выше в каллусах трансгенных растений по сравнению с контрольными, чего не наблюдалось в листьях. Следует отметить, что в прежних работах неоднократно было показано, что этот показатель четко коррелирует с транскрипционной активностью хроматина [1,14].

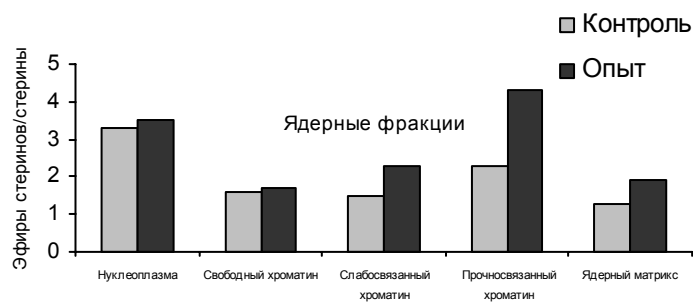


Рис. 2. Соотношение форм стерина в различных фракциях интерфазных ядер каллусных тканей контрольных и трансгенных растений табака.

Наряду с эфирами стерина преобладающим компонентом нейтральных липидов каллусных тканей являются триацилглицерины, и их содержание во всех фракциях трансгенных растений выше по сравнению с контрольными (рис. 3). Обратная закономерность наблюдается для свободных жирных кислот, которыми ядра каллусных тканей трансгенных растений намного беднее. Хотелось отметить резкое падение содержания свободных жирных кислот и возрастание количества триацилглицеринов, наблюдаемое в ядрах регенерирующей печени крыс в период синтеза ДНК [15].

Таким образом, полученные данные по распределению внутриядерных липидов между отдельными компартментами интер-

фазных ядер листовой и каллусной тканей контрольных и трансгенных растений табака свидетельствует о том, что липидный состав ядерного генома трансгенных *ipt*-растений претерпел определенные изменения. Это может свидетельствовать о влиянии введенного в растения чужеродного гена на активность собственных растительных генов, участвующих в метаболизме липидов. Возможно, это гормоноопосредованная регуляция метаболизма ядерных липидов, так как ген *ipt* это ген изопентилтрансферазы – ключевого фермента биосинтеза цитокининов.

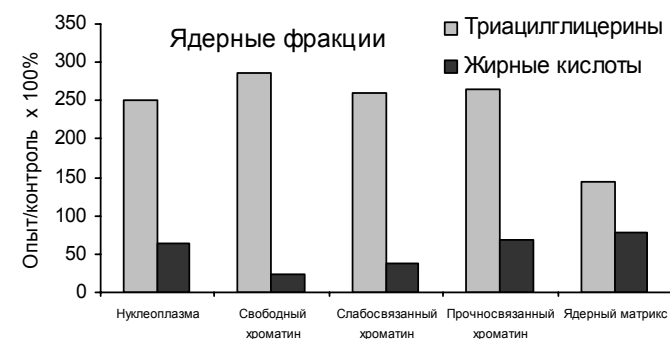


Рис. 3. Влияние экспрессии введенного в растения гена *ipt* на содержание триацилглицеринов и свободных жирных кислот в ядерных фракциях каллусных тканей растений табака.

Анализ конкретных изменений содержания и распределения внутриядерных липидов под влиянием экспрессии введенного в растения табака гена *ipt* позволяет сделать и другие выводы. Такие показатели, как уменьшение доли фосфолипидов в суммарных липидах, увеличение доли слабосвязанных липидов и уменьшение количества липидов в хроматине, прочносвязанном с ядерным матриксом, свидетельствуют, с одной стороны, о более низкой общей активности трансформированного генома [13]. Но, с другой стороны, обогащение фосфолипидами ядерного матрикса трансгенных растений и обнаружение изменения в составе нейтральных липидов указывают на более активные обменные процессы и превращения, происходящие в геноме этих растений. Принимая во внимание имеющиеся

литературные и собственные данные о возможной структурно-функциональной роли липидов, можно полагать, что появляются изменения в структуре и активности генома ядра после введения в него гена *ipt*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лапцева В.К., Ненадовіч Р.А., Сасноўская Т.Ф., Вееўнік А.А. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1991. №3. С. 108-114.
2. Решетников В.Н., Лаптева О.К., Ненадович Р.А., Сосновская Т.Ф., Веевник А.А. // Физиол. растен. 1993. Т.40. С. 72-78.
3. Андрианов В.М. Влияние чужеродных генов на рост и фитогормональный статус трансгенных растений: Автореф. дис. д-ра биол. наук. М., 1992.
4. Соловьян В.Т. // Биополимеры и клетка. 1991. Т.7. С.50-54.
5. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980. С. 62, 77, 140.
6. Кейтс М. Техника липидологии. М., 1975. С. 76-77.
7. Техника биохимического исследования субклеточных структур и биополимеров растительной клетки / Под ред А.С. Вечера. Мн., 1986. С. 97, 164, 173, 175, 176.
8. Стручков В.А., Стражевская Н.Б. // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 1154-1175.
9. Алесенко А.В., Красильников В.А., Бойков П.Я. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 273, № 1. С. 231-234.
10. Съяксте Т.Г. // Изв. АН Латв. ССР. 1989. №5. С. 118-121.
11. Стручков В.А., Стражевская Н.Б. // Биохимия. 2000. Т.65. С. 620-643.
12. Филиппова Г.И., Боровкова О.В., Алесенко А.В. // Биохимия. 1991. Т.36. С. 892-902.
13. Решетников В.Н., Ненадович Р.А., Горбацевич В.И. // Докл. НАН Беларуси. 2000. Т. 44, №6. С. 56-59.
14. Решетников В.Н., Лаптева О.К., Сосновская Т.Ф., Фоменко Т.И., Рощенко М.В. // Докл. АН Беларуси. 1993. Т. 37, № 4. С. 69-73.
15. Пушкарева М.Ю., Боровкова О.Н., Алесенко А.В. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 903-912.
16. Филиппова Г.И., Боровкова О.В., Алесенко А.В. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 892-902.