

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

УДК 582.31/9:581.17

Научные рецензенты:

В.М.Юрин, доктор биологических наук, профессор (БГУ)

З.Я.Серова, доктор биологических наук (ИЭБ им. В.Ф.Купревича)

Изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер высших растений, путей регуляторного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы взаимодействия генома и пластома, чужеродных геномов, а также вопросы регуляторного воздействия на органеллы и клетки фитогормонов.

Редакционная коллегия:

В.Н.Решетников, Н.В.Гетко, О.П.Булко,

Т.И.Фоменко, Е.В.Спиридович

Материалы конференции изданы благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований

НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ ИНТЕРФАЗНОГО ЯДРА РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Решетников В.Н.

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

Познание живых организмов проводится на разных уровнях: популяционном, целостного организма, тканевом, клеточном, молекулярном.

Основываясь на положении, что основной минимальной единицей живого является клетка, биохимические исследования лаборатории биохимии и биотехнологии растений были традиционно связаны с изучением клетки и внутриклеточных органелл, в которых локализованы процессы накопления и утилизации веществ и энергии.

Такие исследования были начаты в 60-е годы А.С.Вечером и М.Т.Чайка и касались пластид растений — хлоропластов, лейкопластов, хромопластов, амилопластов. Изучался их состав, структура, функции.

В 80-е годы в число исследуемых структур автором этой статьи было включено клеточное ядро, поскольку именно эта органелла является центром информационного обеспечения клетки и организма — примерно 95 % всей информации сосредоточено в ядре. Его основными функциями являются ключевые биологические процессы — репликация (самоудвоение ДНК) и транскрипция (образование информационных РНК, кодирующих биосинтез белков клетки) [1, 4, 5].

Разумеется, изучение этих процессов находится в центре внимания крупных научных коллективов многих стран, однако проблема настолько многосторонняя и многоуровневая, что в ней и в настоящее время выявляются перспективные неисследованные аспекты.

Одним из важных аспектов является изучение организации и свойств надмолекулярного дезоксирибонуклеопротеидного (ДНП) комплекса клеточного ядра растений (хроматина), поскольку ДНК

“работает” в условиях “спайки” с белками и липидами в ограниченном объеме ядра. Мы считаем, что такое изучение даст новые подходы в отдельных сферах генноинженерной реконструкции клетки, регуляции ее развития, позволит найти новые пути стабилизации генома в условиях напряженной экологической ситуации.

Прежде чем перейти к сугубо биохимической части проблемы, приведем некоторые основные параметры изучаемого объекта — интерфазного, функционально активного клеточного ядра (табл.1, рис.1, 2). Данные таблицы иллюстрируют, что количественную основу ядра составляют белки и нуклеиновые кислоты. Остановимся на роли белков, входящих в состав клеточного ядра. Одна из них — укладка в ядре гигантской по длине молекулы ДНК, линейные размеры которой приведены в таблице 2.

Таблица 1.

Содержание основных компонентов в интерфазных ядрах зародышевой семян озимой ржи в состоянии покоя, пг/ядро

Компонент	Диплоидные сорта		Тетраплоидные сорта	
	Белорусская 23	Восход 1	Белга	Журавинка
ДНК	10,6	11,3	23,4	22,5
РНК	1,4	1,3	2,0	2,0
Общие липиды	8,0	4,8	15,0	11,3
Суммарный белок, в том числе:				
Гистоны	15,1	11,7	25,7	25,1
Негистоновые белки	12,0	12,0	27,5	23,4
Глобулины	14,8	18,1	20,0	19,8
"Остаточный белок"	7,5	7,6	16,6	15,6
Минеральные вещества (металлы)	3,1	—	4,2	—

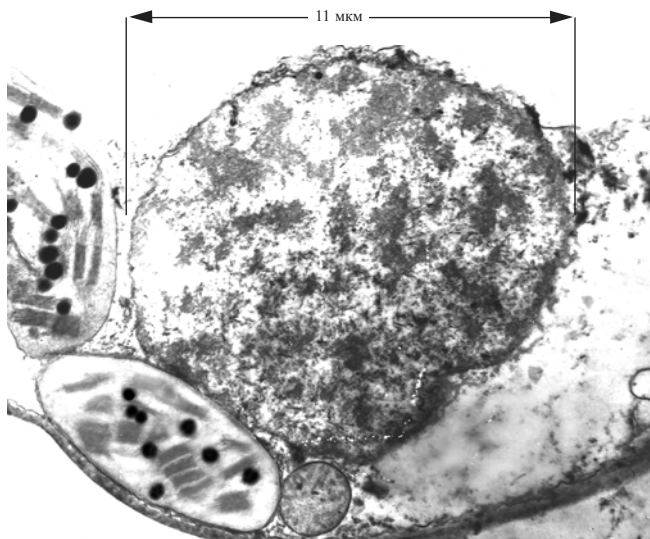


Рис. 1. Электронная микрофотография среза клеточного ядра ржи.

Таблица 2.

Характеристика ДНК различных биологических объектов

Объект	Линейная длина	Количество пар оснований	Молекулярная масса	Примечания
Фаг 1	0,017 мм	48 тыс.	32×10^6	—
<i>E. coli</i>	1,4 мм	4 млн.	26×10^9	В 700 раз превышает размер клетки
Клетки злаков	~ 3 мм	—	$20-50 \times 10^9$	—
46-я хромосома человека	~ 30 мм	—	—	—
Клетка человека	до 2 м	—	—	—

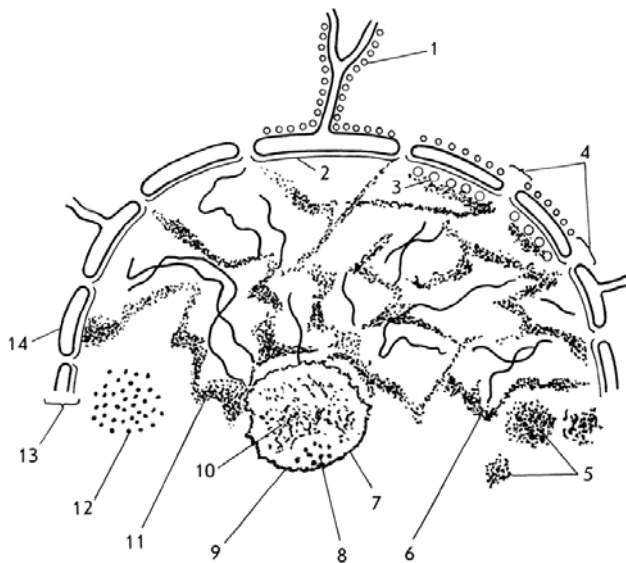


Рис. 2. Схема строения интерфазного ядра: 1 - эндоплазматическая сеть и рибосомы; 2 - фиброзный слой матрикса; 3 - перихроматиновые фибриллы и гранулы (анкосомы); 4 - ядерные поры; 5 - ядерные тельца; 6 - хроматиновые фибриллы разной степени конденсации, включая фибриллярно-гранулярную сеть матрикса; 7 - фибриллярная часть ядрышка; 8 - гранулярная часть ядрышка; 9 - ядрышко; 10 - фибриллярный центр (ядрышковый организатор); 11 - кариоплазма (ядерный сок); 12 - интерхроматиновые гранулы; 13 - ядерная оболочка; 14 - перинуклеарные цистерны .

Такие громадные молекулы ДНК надо уложить в объем относительно небольшого ядра, диаметр которого у эукариот составляет примерно 10-11 мкм [3]. Осуществляется укладка ДНК с помощью белков и липидов на нескольких структурных уровнях, которые рассмотрим по мере усложнения.

Первый уровень — нуклеосомный, образующий так называемые 11-нм фибриллы. Основу этого уровня составляют нуклеосомы (рис. 3), открытые Вудкоком, Олинсом и Хевисом [4] и в настоящее время хорошо изученные. Нуклеосомы растительных объектов полностью укладываются в существующую общую модель этих внутриядерных структур: белковый кор, образованный гистонами H2a,

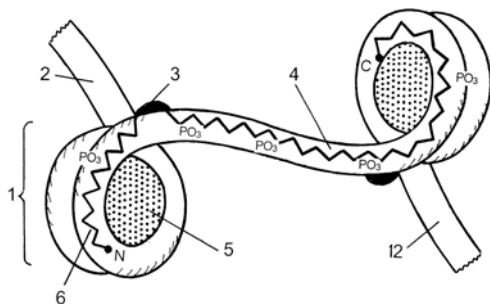


Рис. 3. Схема первого (нуклеосомного) уровня укладки ДНК в ядре. по С.Г.Бавыкину, 1988.

H2b, H3 и H4 и окруженный 1,8 витком ДНК, линкерный участок ДНК (50-200 пар нуклеотидов), связанный с гистонem H1. Нуклеосомный уровень позволяет сократить длину ДНК в 7 раз.

Второй уровень — “30-нм фибриллы” (рис. 4), образуемые за счет образования специфических соленоидообразных и других структур (тип “спирализованной ленты”, “аккордеона”, “зигзага” и др.). В образовании “30-нм фибриллы” важная роль принадлежит гистону H1 и группе HMG-белков, найденных Гудвином, Сандерсом, Джонсом. Второй уровень укладки ДНК позволяет сократить ее длину еще в 6 раз.

Следующий, 3-ий уровень структуры ДНП (хроматина), предусматривает размещение фибрилл (1-го и 2-го уровня) и их пространственную ориентацию в трехмерном внутриядерном пространстве.

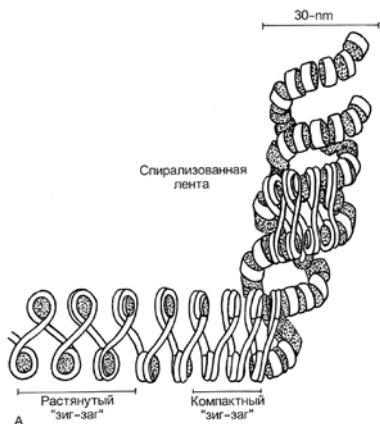


Рис. 4. Схема второго (“30-нм фибриллы”) уровня укладки ДНК в ядре. (по С.Г. Бавыкину, 1988.)

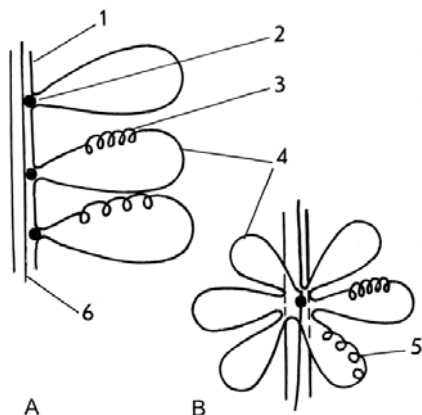


Рис. 5. А. Схема третьего уровня укладки ДНК в ядре по типу “петля” (по Laemmli, 1979); Б. Хромомерная модель ДНК (по Egenpreis, 1990): 1 – ДНК; 2 – компонент петли; 3 – “соленид”; 4 – петля ДНК (домен); 5 – нуклеосомы; 6 – скаффолд.

Это происходит с участием негистоновых белков и матрикса ядра, к которому прикрепляются участки ДНП, образующие петли-домены или розетки (модели Лэммли, Эренпрейса, Съяксте и др., рис. 5). Этот уровень обеспечивает компактизацию ДНК еще в 25 раз. Напомним, что матрикс ядра — это его белковый скелет, остающийся после элюирования растворимых белков, ДНК и других компонентов ядра.

Затем существуют высшие порядки компактизации ДНК и ДНП, превращающие фибриллы и петли в 100-нм и более толстые тяжи. Они представлены, в основном, нерегулярными соленидными структурами.

Наиболее компактизованной “сверхконденсированной” точкой являются метафазные хромосомы делящейся клетки, видимые в световой микроскоп (рис. 6). Этот уровень сокращает линейную длину молекулы ДНК еще в 10 раз.

В цитобиохимии высшие порядки компактизации условно относят к так называемому конденсированному хроматину (или гетерохроматину). В нем ДНК “закрывается” структурными белками и



Рис. 6. Высший уровень компактизации хроматина — метафазная хромосома

функционально мало активна или неактивна. Первые порядки компактизации (1-3) образуют диффузный хроматин (эухроматин), в котором ДНК активна.

Таким образом, рассмотренные уровни организации и компактизации ДНК в составе хроматина обеспечивают ее укладку в объеме ядра клетки: они сокращают линейную длину ДНК примерно в 10000 раз ($7 \times 6 \times 25 \times 10$). Особо отметим, что эта укладка динамична, постоянно сохраняется возможность модуляции структуры ДНП, что и является предметом экзо- и эндогенной регуляции.

На 1-ом, нуклеосомном уровне, регуляция структуры и функции ДНП осуществляется, в основном, модификацией гистонов, к которой относят метилирование, фосфорилирование, ацетилирование, поли-АДФ-рибозилирование, убихитинилирование, окисление-восстановление SH-групп, гидролиз специфических пептидных связей.

На 2-ом уровне специфику и динамичность 30-нм фибрилл обеспечивают гистон H1 и группа негистоновых белков (в частности, HMG-белки). В нашей лаборатории изучался состав субфракций гистона H1 и его участие в репрессии или активации генома. Двумерным электрофорезом обнаружено наличие подфракций гистона H1 в ядрах проростков ржи (рис. 7), а также наличие белков, относимых к HMG-белкам. Показано также, что усиление роста и развития ткани связано с уменьшением доли прочносвязанного гистона в диффузном хроматине (табл. 3).

Таблица 3.

Содержание гистона H1 в ядрах каллуса ржи

48-дневный каллус (активный рост)	→	48-дневный каллус на среде дифференциации (активный)
9.3±0.9		8.5±0.7
↓		
70-дневный каллус (стареющий, неактивный рост)	→	70-дневный каллус на среде дифференциации (активный)
15.4±1.6		9.0±1.2

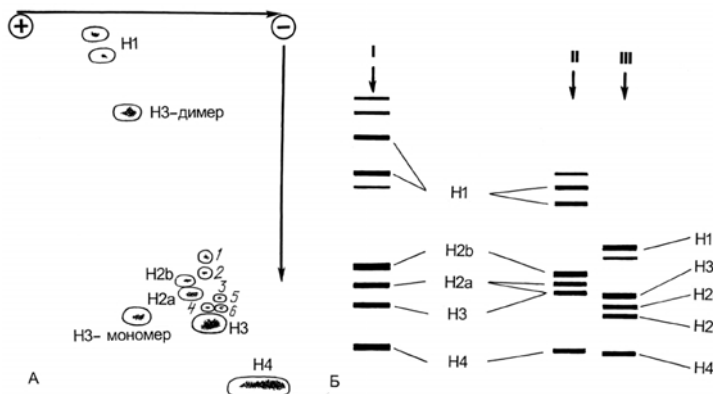


Рис. 7. А. Электрофореграмма двумерного разделения гистонов хроматина ячменя: H1, H2A, H2B, H3, H4 - гистоны, 1-6 - сопутствующие белки; Б. Электрофореграмма разделения гистонов: I - рожь, II - горох, III - тимус телянка

На петельном уровне объектами регуляторного воздействия являются белки матрикса (группа негистоновых белков) и липиды — малоизученная группа веществ ядра растительной клетки [6, 7]. Наши данные представлены в таблице 4.

Модуляция и динамичность укладки ДНК и ДНП во многом определяется контактами с матриксом, который недостаточно изучен у высших растений. По нашим исследованиям, матрикс состоит из группы скелетных белков типа тубулина и актина, имеет характерный триплет белков в области Мм 63-69 кД, подобный

Таблица 4.
Липидный состав хроматина ржи (в мкг на 1 мг ДНК)

	Зародыш	24-часовые проростки	72-часовые проростки
Общие липиды	270 / 0	270 / 370	180 / 220
Фосфатидилэтаноламин	17,7 / 0	79,2 / 98,6	58,7 / 78,3
Фосфатидилхоллин	17,4 / 0	77,9 / 174,9	55,3 / 84,2
Фосфатидилин-озитол	14,9 / 0	62,8 / 86,4	45,9 / 47,4

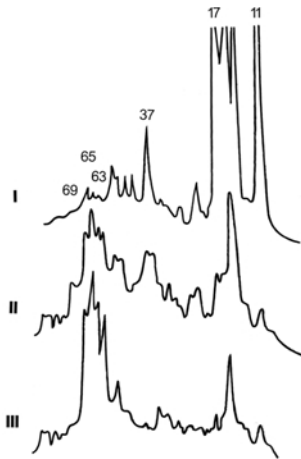


Рис. 8. SDS - ПААГ- электрофорез белков ядерного матрикса из озимой ржи: I - зародыши покоящихся семян; II - 24- часовые проростки; III - 72 - часовые проростки

ядрам клеток животных (рис.8). В процессе роста экспрессии генома белки матрикса претерпевают изменения, выражающиеся в снижении доли низкомолекулярных белков в 11 и 17 кД, возрастании количества прочносвязанных ДНК и РНК [2, 3].

Модуляция и динамичность высших уровней укладки хроматина — 100 нм фибрилл, комплекса фибрилл с матриксом — определяется, по-видимому, изменениями ионной силы кариоплазмы, белок-липидными взаимодействиями, гормонами и другими факторами. Правда, данных по этим вопросам в литературе явно недостаточно.

Высшая степень компактизации — метафазные хромосомы — к регуляторным воздействиям невосприимчивы.

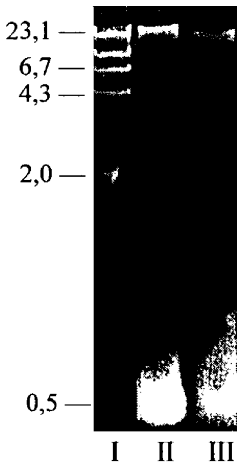


Рис. 9. Электрофоретическое разделение ДНК ядерного матрикса из озимой пшеницы в 1% агарозном геле в Трис- боратном буфере (рН 8.0). I - ДНК фага I, обработанного Hind III; II - ДНК покоящихся семян; III - ДНК 72 - часовых проростков



Рис. 10. Схема возможного регуляторного воздействия на ядро с учетом структуры и состава ДНП-комплекса

В составе матрикса также подтверждено наличие низкомолекулярных фрагментов ДНК (размером около 500 пар оснований) как участков прикрепления этого биополимера к белкам матрикса (рис. 9), эти участки как бы “утоплены” в белковую основу и закрепляют цепь ДНК в объеме ядра.

Общим показателем активности хроматина является увеличение или уменьшение относительного количества слабосвязанной с белками ДНК, что может вызываться самыми разными факторами. Доля слабосвязанной ДНК коррелирует с функциональным состоянием клетки и ткани. Схема регуляторного воздействия на ядро приведена на рис. 10.

Изучение организации структуры интерфазного ядра с нашей точки зрения важно при проведении генноинженерной реконструкции растений, в частности, трансгенезе. Основным мотивом является

положение, что ДНК каждого организма (вида, сорта) имеет специфические участки, которые связываются с матриксом (ламинами и внутренним матриксом) и контактируют с вполне определенными его белками и липидами. Замена достаточно большого участка ДНК при трансгенезе может изменить эти специфически расположенные по длине ДНК контакты (ДНК — белково-липидные связи), вследствие чего конформация и компактизация ДНП изменятся, что приведет к ряду биологических последствий, возможно, и гибели объекта реконструкции. Детальное изучение надмолекулярной организации хроматина и учет специфичности укладки ДНК поможет избежать этих последствий и обеспечит биологически безболезненное встраивание больших участков чужеродных ДНК в геном хозяина.

Что же касается гормональной регуляции функциональной активности клеточного ядра, то из-за многофакторности воздействия необходимо создание динамических математических моделей и соответствующих программ с использованием ЭВМ.

Литература.

- 1 Структурная организация и функция генома эукариот./ Итоги науки и техники. М., 1982. — Т. 16. — 211 с.
- 2 Генетика и селекция на рубеже XXI века. Минск, 1999. — 212 с.
- 3 Решетников В.Н. Клеточные ядра высших растений: состав, структура, функции. Минск, 1992. — С.88
- 4 Ленинджер А. Основы биохимии. Москва, 1985. — 717 с.
- 5 Giannasca P.J., Horowitz R.A., Woodcock. Transitions between in situ and isolated chromatin // J. of Cell Science. — 1993.- V. 105. — P. 551-561.
- 6 Стручков В.А., Стражевская Н.Б. ДНК-связанные липиды.: состав и возможные функции. Биохимия. — 1993. — Т. 58, вып.8. — С. 1154 — 1174.
- 7 Reshetnikov V.N., Lapteva O.K., Nenadovich R.A., Sosnovskaya T.F.,