

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

ЭКСПРЕССИЯ ЯДЕРНОГО ГЕНОМА РЖИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОВЫШЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР

Шабуня П.С., Решетников В.Н.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси

Минск, 220012, ул. Сурганова, 2В, e-mail: biolog@it.org.by

Исследовали изменения экспрессии генов проростков ржи Пуховчанка под действием теплового шока на начальных стадиях онтогенеза (24-, 72- и 168-часов). Показано появление белков теплового шока (БТШ) с молекулярной массой (ММ) 29,6 кДа во фракции нуклеоплазмы 24-часовых проростков, БТШ с ММ 63,9; 62,5; 61,2; 59,3; 56,2; 14,7 кДа в нуклеоплазме 72-часовых проростков. Тепловой шок репрессировал синтез нормальных белков во фракциях нуклеоплазмы (ММ 58 кДа), слабосвязанного хроматина (ММ 23,4 кДа) и остаточных белков (ММ 59,1 кДа) в 72-часовых проростках.

Введение. Известно, что тепловой шок (ТШ) - кратковременное повышение температуры среды обитания на 8–10 °С выше оптимального уровня — вызывает в клетках растений быстрые временные трансляционные и транскрипционные изменения [1-3]. Реакции растений на ТШ характеризуются быстрым изменением экспрессии ряда ядерных генов, что приводит к индуцированию и/или репрессированию синтеза специфических мРНК или их трансляции и, в конечном итоге, к синтезу особого класса стрессовых белков – БТШ. Как правило, изучается спектр цитоплазматических и хлоропластных БТШ, в значительно меньшей степени – ядерных и митохондриальных. В то же время важность исследования ядерно-цитоплазматических взаимодействий в реагировании клеток на тепловой стресс не вызывает сомнений, поскольку синтез БТШ включает в себя как транскрипционный, так и трансляционный контроль. Кроме того, часть синтезированных в цитоплазме БТШ затем поступает в ядро, где, очевидно, принимает участие в регуляции транскрипции и процессинга РНК [4].

Целью наших исследований было изучение изменений под действием ТШ экспрессии генов проростков ржи Пуховчанка и как следствие этого — индукции стрессовых и репрессии синтеза нормальных белков в отдельных ядерных фракциях. Показано, что устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды непостоянна на всем протяжении онтогенеза и определенным обра-

зом меняется, причем в онтогенезе имеются критические периоды, когда устойчивость к различным факторам временно снижается [5]. С этих позиций нам представилось важным исследовать действие повышенных температур на ядра проростков ржи в онтогенезе.

Материалы и методы. Объектом наших исследований были проростки ржи сорта Пуховчанка разного возраста: 24 (этап прорастания семян), 72 (точка развития coleoptиля) и 168 часов (полностью сформированный 1-й лист). Проростки выращивались на покрытых марлей решетках на водопроводной воде при температуре 22°C, освещенности 3-5 тыс.лк. Световой день составлял 16 часов. Перед посевом семена замачивались в водопроводной воде на 12 часов. ТШ создавался путем кратковременного в течение 3 часов прогревания проростков в термостате при температуре +40°C. Выделение ядер проводили по Ивановой и Вафиной [6]. Фракционирование ядер проводили по Ивановой и Вафиной [7] с некоторыми нашими модификациями. Из очищенных препаратов ядер нуклеоплазматические белки экстрагировали 0,14М NaCl, 0,01М трис-HCl pH 6,8 буфером; непрочносвязанный хроматин - 0,35М NaCl, 0,01М трис-HCl pH 6,8 буфером; прочносвязанный хроматин - 2М NaCl, 0,01М трис- HCl pH 6,8 буфером. Ядерный матрикс экстрагировали 1% тритоном X-100 на 0,01М трис- HCl pH 6,8 буфере, остаточные компоненты экстрагировали 0,5М NaOH. Фракции белков анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в щелочной системе с додецилсульфатом Na (SDS) по методу Laemmli [8] с некоторыми модификациями. Для разделения использовали неградиентный ПААГ с концентрацией мономеров 16%, в качестве концентрирующего геля использовали 6% ПААГ. Электрофорез проводили при силе тока 20 - 30 мА на гель и начальном напряжении 155В. Параллельно с исследуемыми образцами разделяли белки-маркеры. Гели фиксировали 2 часа в 15% ТХУ. Гели окрашивали 0,1 % Кумасси R-250 в растворе 25 % этанола и 8% уксусной кислоты в течение 2 часов при комнатной температуре при периодическом покачивании. Некоторые гели окрашивали серебром по методу Ohsawa и Ebata [9].

Результаты и обсуждение. При одномерном электрофорезе в 24-часовых проростках БТШ обнаружены лишь во фракции нуклеоплазмы (см. рис). Используя окраску Кумасси R-250, нам удалось различить БТШ с ММ 29,6 кДа. Фракции прочно- и слабос-

вязанного хроматина, ядерного матрикса из проростков данного возраста не характеризуются присутствием БТШ.

Известно, что большинство БТШ имеют аналоги при нормальной температуре, и ТШ вызывает усиление их экспрессии [4]. Данный феномен выявлен и нами. В спектрах белков нуклеоплазмы как контрольных, так и подверженных ТШ 24-часовых проростков ржи присутствуют полипептиды с ММ 49,2; 48,3 и 43,5 кДа, но их экспрессия выше в опытном варианте (рис.).

Подобная картина наблюдается и для белков ядерного матрикса.

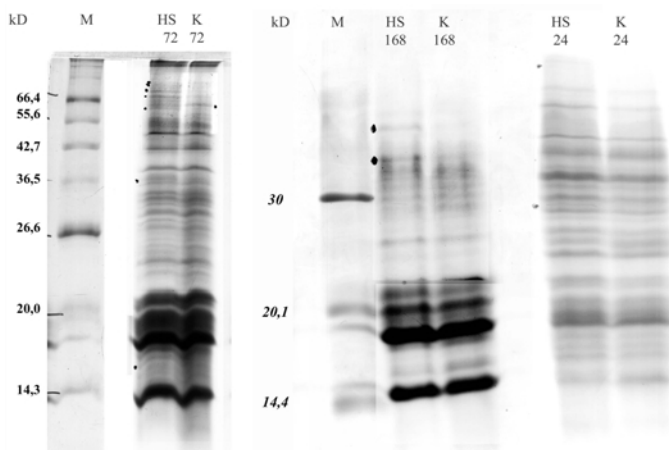


Рис. Электрофоретические спектры белков нуклеоплазмы 24-, 72- и 168-часовых проростков ржи Пуховчанка при тепловом шоке, окрашенные Кумасси R-250:

К – контрольные проростки;

HS – подверженные тепловому шоку проростки;

24-, 168-, 72- часовые проростки;

М- белковые маркеры (молекулярные массы выражены в кД).

Полипептиды с ММ от 12,3кДа до 21 кДа, а также с ММ 25 кДа свойственны и контрольным, и обработанным действием высокой температуры проросткам, но в последних экспрессия данных белков значительно выше.

Интересные результаты были получены нами при исследовании ядерных фракций 72-часовых проростков ржи Пуховчанка в условиях ТШ. Электрофоретическое разделение общих легко раство-

римых ядерных белков, выделенных из проростков на стадии развития колеоптиля, и последующее определение их ММ позволило нам идентифицировать 32 полипептида с молекулярными весами в диапазоне 12,3–62,5 кДа. Данные спектры в контрольном и опытном варианте совершенно идентичны как по белковому разнообразию, так и по уровню экспрессии отдельных полипептидов. Причем одинаковый результат был получен при использовании в качестве красителя гелей и раствора Кумасси R-250, и раствора серебра. Из этого следует, что среди исследуемых белков данной фракции нет БТШ. Фракционирование ядер из клеток 72-часовых проростков буферами разной ионной силы позволило нам обнаружить изменения в полипептидных спектрах отдельных фракций под действием повышенных температур. Особенно интересна в этом плане фракция нуклеоплазмы. Как видно из рис., ТШ стимулировал синтез целого ряда БТШ с ММ 63,9; 62,5; 61,2; 59,3; 56,2 и 14,7 кДа и усилил экспрессию БТШ с ММ 39,4 кДа. В то же время кратковременное повышение температуры репрессировало синтез белка с ММ 58 кДа. Окрашивание раствором Кумасси R-250 белковых электрофореграмм фракции слабо связанного хроматина из ядер 72-часовых проростков, как и в случае 24-часовых проростков, не выявило присутствия БТШ. Однако, используя в качестве красителя раствор серебра, нам удалось зарегистрировать ингибирование под действием ТШ экспрессии белка с ММ 23,4 кДа.

Фракция прочно связанного хроматина из ядер проростков, взятых на стадии развития колеоптиля (72 часа), не характеризуются синтезом БТШ. Практически одинаковым образом в условиях ТШ ведут себя белки ядерного матрикса и остаточные белки. Повышенная температура снизила экспрессию некоторых белков в этих фракциях и заингибировала синтез белка с ММ 59,1 кДа во фракции остаточных белков.

Ядра из проростков ржи на стадии 1-го полностью сформированного листа (168 часов) оказались наиболее толерантными к действию повышенных температур. Единственной фракцией, в белковых спектрах которой были зарегистрированы изменения в условиях ТШ, явилась нуклеоплазма (рис.). В ней белки с ММ 34,3 и 38,5 кДа экспрессировались на более высоких уровнях, чем в контроле. Обратная ситуация характерна для 16,3 кДа белка. Электрофоретическая зона, соответствующая данному полипеп-

тиду, выражена слабее в опытном варианте. ТШ не изменил белковые спектры остальных исследуемых ядерных фракций из клеток 168-часовых проростков ржи. Не выявлены изменения ни в разнообразии белков, ни в уровнях их экспрессии.

Таким образом, можно сказать, что ТШ изменяет экспрессию генов проростков ржи Пуховчанка и, как следствие, приводит к индукции БТШ и репрессии синтеза некоторых нормальных белков в отдельных ядерных фракциях. В этом плане наиболее показательными оказались проростки на стадиях прорастания и развития колеоптиля. Нуклеоплазмы ядер из данных проростков характеризуются наибольшим разнообразием БТШ.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность Ленец А.А. за оказанную методическую помощь при подготовке и проведении экспериментов.

Литература

- 1 Kimpel J.A., Key J.L. Heat shock in plants // Trends Biochem. Sci. 1985. V.10. N1. P.353-357.
- 2 Nagao R.T., Kimpel J.A., Vierling E. et al. The heat shock response: a comparative analysis // Oxford Surveys of Plant Molecular and Cellular Biology/ Ed/ Mifflin B.J. Oxford: Oxford Univ. Press. 1986. V.3. P.384-438.
- 3 Кулаева О.Н., Микулович Т.П., Хохлова В.А. Стрессовые белки растений // Современные проблемы биохимии. П/ред. Скрыбина Г.К., Одинцовой М.С. М.: Наука. 1991.С.174-190.
- 4 Hutter M.M., Sievers R.E., Barbosa V., Wolfe C.L. Heat shock protein induction in rat hearts. A direct correlation between the amount of heat shock protein induced and the degree of myocardial protection // Circulation. 1994. V. 89. N1.P.355-360.
- 5 Беликов П.С. Растительная клетка. М.: Наука. 1980. 71с.
- 6 А.с. № 1701747, СССР.
- 7 А.с. № 1733471, СССР.
- 8 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature. 1970. V.227. P.680-685.
- 9 K.Ohsawa, N.Ebata. Silver stain for detecting 10-femtogram quantities of protein after polyacrylamide gel electrophoresis. // Analytical Biochemistry. 1983. V.135. P.409-415.

Summary

The heat shock has changed an expression of genes in seedlings of rye Puhovchanka. This has resulted in an induction of heat shock proteins in nucleoplasm fractions of 24-hour and 72-hour seedlings and in an inhibition of normal proteins synthesis in fractions of nucleoplasm, chromatin with loose binding and residual proteins of 72-hour seedlings.