

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгенеза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

УДК 582.542:582.236:581.19:576.315:577.112+577.113

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ЯДЕР РЖИ И ГОРОХА

Спиридович Е.В., Сенчило В.С., Чижик О.В., Гончарова Л.В., Янович Д.Л.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» Минск 220012, ул. Сурганова 2в, e-mail: spiridovich@cbg.basnet.by

*Из ядер ржи (*Secale cereale*) и гороха (*Pisum sativum*) выделена группа ДНК-связывающих белков. С помощью аффинной хроматографии на колонке HiTrap Heparin HP получены четко разделяющиеся фракции: белки, не связавшиеся с колонкой; белки средней аффинности и белки высокой аффинности. Проведен сравнительный электрофоретический анализ в денатурирующих условиях полученных фракции ДНК-связывающих белков ядер ржи и гороха. Выявлено, что качественный состав соответствующих белковых фракций у двух сравниваемых видов существенно различается.*

Введение. В клеточном ядре белки составляют до 75 % сухой массы, большинство из них – ДНК-связывающие, они играют центральную роль во всех аспектах генетической активности. Так, ДНК-связывающие белки играют ключевую роль в процессах репликации, рекомбинации и генетической экспрессии. Матрица этих процессов – молекула ДНК – образует хроматин ядра, структура, динамика и функции (компактизация и декомпактизация) которого поддерживается несколькими группами ДНК-связывающих белков. Прежде всего, это белки, ответственные за поддержание структуры ДНК – гистоны, негистоновые белки матрикса; регуляторы транскрипции – репрессоры, активаторы и другие белки; метилтрансферазы и эндонуклеазы; РНК-полимераза и сайт-специфические ДНК-полимераза; АТФ-зависимые хроматин-ремодулирующие факторы – большие мультибелковые комплексы, которые за счет энергии АТФ изменяют укладку нуклеосом. Сейчас общепринятой считается классификация по структуре белка, входящего в комплекс с ДНК [1].

Материалы и методы исследования. Для выделения ядер использовали 72-часовые проростки ржи (*Secale cereale*) сорта «Пуховчанка» и гороха (*Pisum sativum*) сорта «Пелюшка». Для разрушения ядерных оболочек осадок ядер ресуспендировали в буфере, содержащем 2 мМ ТЕА (триэтанолламин), 0,2 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ DFP (диизопропилфлюорофосфат), а затем обрабатывали ультразвуком, используя ультразвуковой дезинтегратор (MSE), при амплитуде 16 м в (трижды по 30 с при 22 кГц) в ледяной бане. Белки из ядер экстрагировали 2М NaCl с 0,1 мМ DFP. После 15 мин инкубации при комнатной температуре лизат осветляли центрифугированием 30 мин и обессоливали на

колонке HiTrap Desalting (Amersham Biosciences, 5,0 мл) на хроматографе АКТАprime (Amersham Biosciences). Обессоленную фракцию, соответствующую белковому пику (максимум поглощения при 280 нм) центрифугировали и супернатант наносили в 2 этапа на 5-мл колонку для аффинной хроматографии HiTrap Heparin HP (Amersham Biosciences). При этом нанесение белков на колонку проводили в 0,2 М NaCl, чтобы исключить неспецифическое связывание. После разделения проводили анализ полученных фракций методом электрофореза в 14% ПААГ с последующим окрашиванием гелей Кумасси R-250 и серебром [2].

Результаты и обсуждение. Целью данной работы было адаптировать метод аффинной хроматографии для выделения ДНК-связывающих белков из интерфазных клеточных ядер представителей разных таксонов и провести сравнительный электрофоретический анализ фракции ДНК-связывающих белков ядер ржи и гороха. Высокая плотность отрицательно заряженных остатков серной кислоты в структуре гепарина мимикрирует полианионную структуру нуклеиновых кислот, что и обеспечивает связывание (как правило, положительно заряженных) ДНК-связывающих белков с колонкой. В процессе хроматографии на колонке HiTrap Heparin HP в градиенте NaCl разнообразные белки ядра разделяются на фракции в соответствии с их аффинностью. Предварительные эксперименты в линейном градиенте NaCl выявили 3 концентрации элюанта, позволяющие в ступенчатом градиенте разделить белки ядра на три большие фракции: 0,2М – для нанесения белков, 0,9 и 1,5М – для элюции двух фракций ДНК-связанных белков различной аффинности.

На рисунке 1 приведена хроматограмма разделения белков клеточных ядер гороха на колонке HiTrap Heparin HP в ступенчатом градиенте NaCl (0,9 М и 1,5 М). В результате для каждого вида были получены 3 четко разделяющиеся белковые фракции, условно обозначенные нами, как: I – белки, не связавшиеся с колонкой; II – белки средней аффинности; III – белки высокой аффинности.

Анализ полученных фракций ДНК-связывающих белков в 14% ПААГ с последующим окрашиванием гелей Кумасси R-250 и серебром показал, что в ядрах обеих культур присутствует множество ДНК-связывающих белков с достаточно широким диапазоном молекулярных масс (рисунок 2).

Суммарное число четко распознаваемых белковых полос во фракции II и III у ржи и гороха было приблизительно равным и – при окраске Кумасси R-250 – составляло 46 полипептидов. При окрашивании серебром, однако, выявилось большее число полос: 65 полипептидов у ржи и 60 – у гороха, что обусловлено более высокой чувствительностью этого метода.

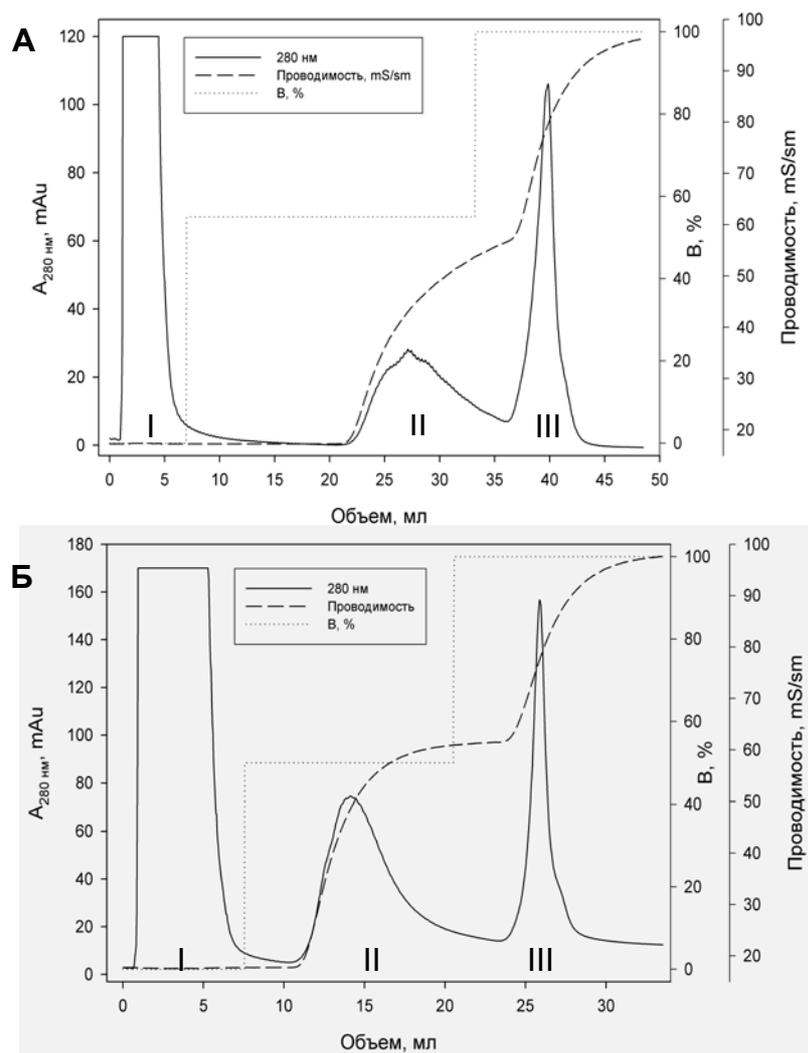


Рис. 1. Хроматограммы разделения ДНК-связывающих белков ядер ржи (А) и гороха (Б) на колонке HiTrap Нераpin НР. Элюция ступенчатым 0,9 и 1,5 М градиентом NaCl. Римские числительные обозначают белковые фракции, сходящие с колонки (см. текст)

Качественный состав соответствующих белковых фракций двух сравниваемых видов растений существенно различался, доля идентичных в препаратах ржи и гороха составила менее 20 %.

При сравнении фракций III – белков высокой аффинности (части спектра в области мМ 14–22 кДа, рисунок 2) – число белковых полос у ржи и гороха было сходным, около 10, однако размеры индивидуальных полипептидов различались. На электрофореграмме ДНК-связывающих белков ржи присутствует пять мажорных полос, которые на наш взгляд могут представлять собой компоненты нуклеосомы – коровые гистоны (H4, H3, H2В, H2А), линкерный гистон H1 и HMG-подобные белки. Молекулярные массы указанных белков находятся в диапазоне от 11 до 22 кДа. Во II-ой фракции ДНК-связывающих бел-

ков ядер гороха выявлены две мажорные полосы (мМ 14,9 и 17,3 кДа). Соответствующие им по массе мажорные белки ядер ржи, однако, элюировались с белками высокой аффинности (фракция III), что предполагает более высокую аффинность у последних по сравнению с аналогичными белками гороха. Таким образом, нами были отмечены межвидовые различия по силе связывания белков сходной молекулярной массы и предположительно сходной функции с колонкой (и, следовательно, с ДНК).

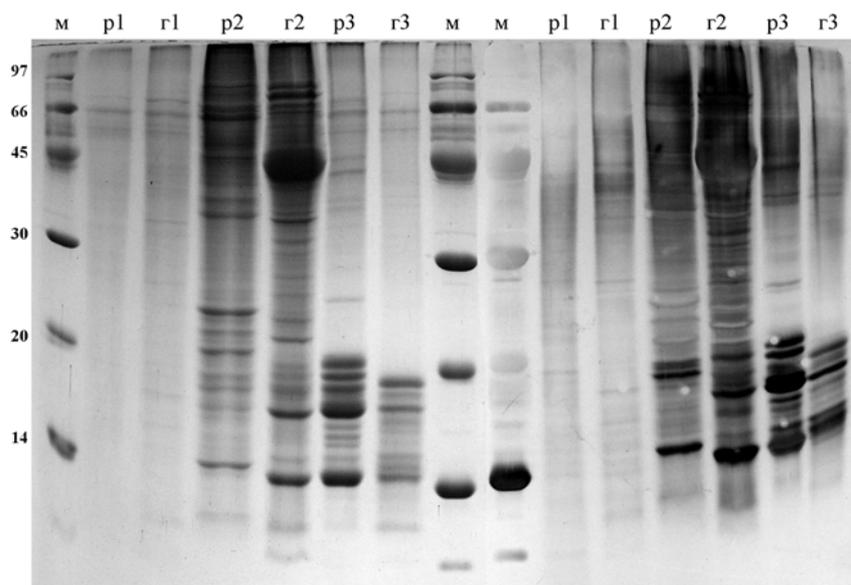


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях белковых фракций ядер ржи (р) и гороха (г), выделенных на колонке HiTrap Нерагін НР в ступенчатом 0,9 и 1,5 М градиенте NaCl. М – белковые стандарты Мм; р1 и г1 – белки, не связавшиеся с колонкой (во фракции I белки сильно деградировали); р2 и г2 – белки средней аффинности, элюируемые с колонки 0,9 М NaCl (фракция II); р3 и г3 – белки высокой аффинности, элюируемые 1,5 М NaCl (фракция III). Левая часть геля окрашена Кумасси R-250, правая – серебром

Дальнейшее проведение детального сравнительного анализа ДНК-связывающих белков будет в значительной мере зависеть от накопления информации о физических свойствах и функциях индивидуальных белков и применении протеомного подхода, т.е. выделении отдельных групп ядерных белков, их масс-спектрометрический анализ, определение молекулярной массы и последовательности полипептидных цепей.

Идентификация отдельных белковых полос в полученных нами одномерных спектрах ДНК-связывающих белков представляет собой сложную задачу. Сегодня для этих целей используют протеомный подход – комбинация двумерного электрофореза и масс-спектрометрии с последующей идентификацией пептидов или пептидных фрагментов. Тем не менее, мы можем предположительно отнести некоторые из выделенных

нами белков к ранее функционально охарактеризованным доминантным компонентам растительных ядер, основываясь на знании молекулярных масс индивидуальных белков.

В таблице 1 суммированы опубликованные ранее данные по негистоновым (не НМГ) ядерным белкам гороха и приведены близкие по молекулярной массе ДНК-связывающие белки гороха, полученные в данной работе.

Таблица 1

Функционально охарактеризованные ядерные (негистоновые) белки гороха в сравнении с ДНК-связывающими белками, полученными в данной работе

| Название белка | М.м. (кДа) | М.м. (кДа)/ фракция белка, полученного в данной работе | Функция белка и участие в ядерных процессах | Ссылка |
|--------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| PsCCaMK | 72 | 72,0/II | Ca ²⁺ /CaM зависимая киназа, регуляция ответа на стресс | [3] |
| | 40 | 39,9/III | Субстрат для PsCCaMK, возможный регулятор транскрипции | [3] |
| PDH45, DEAD-box helicase, | 45 | 44,8/II | DEAD-бок хеликаза/АТФ-аза, регулятор солевой устойчивости, активирует топоизомеразу I | [4] |
| PDH65 helicase | 65 | 65,6/III | локализуется в области ядрышка, служит субстратом для СК-2, предположительно участвует в транскрипции rRNA | [10] |
| major nucleoside triphosphatase (NTPase) | 47 | – | Основная нуклеозид-трифосфатаза хроматина | [5] |
| pea nuclear casein kinase NII | 36 | 36,4/II | Фосфорилирует ДНК-связывающий фактор АТ-1, регулирующий экспрессию Rubisco | [6] |
| Ca ²⁺ -dependent protein kinase | 90, pI 6,7-6,4 | 90,2/II | Фосфорилирует гистон H3-S и др. белки хроматина, в частности неизвестный белок с Мм 43 кДа | [7] |
| Protein tyrosine phosphatase | 90, pI 5,9-6,2 | 90,2/II | Тирозиновая киназа, роль неизвестна | [8] |
| СК-2 pea nuclear casein kinase | 36 | 36,4/II | Каталитическая субъединица 126-кДа-гетеротетрамера (36×2+24×2 кДа). Фермент связан с ламинной, фосфорилирует ламиноподобные белки | [9] |
| PCNA, proliferating cell nuclear antigen | 30 | 30,5/II 29,5/II | Участвует в регуляции клеточного цикла, регулирует активность топоизомеразы I | [11] |
| PDH47 | 47 | – | Хеликаза, регулирует биосинтез белков связанных с устойчивостью к осмотическому и солевому стрессу | [12] |
| MAR-binding proteins | 60, 65, 70, 72 | 65,6/III 72/II | Играют роль в организации хроматина, участвуют в биогенезе рибосом | [11] |

В спектре выделенных нами ДНК-связывающих белков ядер гороха присутствуют по меньшей мере 10 полипептидов, которые по Мм соответствуют таким классам ядерных белков, как белки ядерного матрикса (MAR-связывающие белки) [11], хеликазы (вовлеченные в процессы транскрипции и репликации) [12] и киназы – важнейшие ферменты, контролирующие активность транскрипционных факторов и гистонов и, соответственно, контролирующие состояние хроматина). Отсутствие в представленном нами спектре 47 кДа РНД47 хеликазы показательно, т. к. РНД47 является белком, который экспрессируется в условиях осмотического шока, однако, в нормальных условиях, как в данном эксперименте, не обнаруживается. Отличительной чертой спектра белков средней аффинности у гороха явилось высокое содержание полипептида с Мм 45 кДа, что предполагает выполнение данным белком структурной функции. Альтернативно, доминирование 45 кДа белка может быть артефактом, связанным, например, с загрязнением ядерной фракции одним из положительно заряженных белков клеточного скелета. Решение данного вопроса требует дальнейших исследований.

Заключение. В результате проведенных экспериментов адаптирован метод аффинной хроматографии для выделения ДНК-связывающих белков из интерфазных клеточных ядер представителей разных таксонов (представители злаковых и бобовых) и проведен сравнительный электрофоретический анализ фракции ДНК-связывающих белков ядер ржи и гороха. В результате для каждого вида были получены четко разделяющиеся белковые фракции: белки, не связавшиеся с колонкой; белки средней аффинности и белки высокой аффинности. Электрофоретическое разделение полученных фракций выявило высокую степень гетерогенности ДНК-связывающих белков ядер обоих исследованных растительных объектов, а также межвидовые различия качественного состава соответствующих белковых фракций.

Литература:

1. Luscombe N.M., Austin S.E., Berman H.M., Thornton J.M. An overview of the structures of protein-DNA complexes// *Genome Biology*. – 2000. – I (I): reviews 001.1–001.37.
2. Laemmli U.K. // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P.680–685.
3. Pandey S., Tiwari S.B., Tyagi W., Reddy M.K., Upadhyaya K.C., Sopory S.K. A $Ca^{2+}/CaMg$ -dependent kinase from pea is stress regulated and in vitro phosphorylates a protein that binds to AtCaM5 promoter// *Eur J Biochem*. – 2002. – V. 269(13). – P.3193–3204.
4. Sanan-Mishra N., Pham X.H., Sopory S.K., Tuteja N. Pea DNA helicase 45 overexpression in tobacco confers high salinity tolerance without affecting yield// *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2005. – V. 102(2). – P. 509–514.

5. Datta N., Schell M.B., Roux S.J. // Spermine stimulation of a nuclear NII kinase from pea plumules and its role in the phosphorylation of a nuclear polypeptides // *Plant Physiol.* – 1987. – V. 84. – P.1397–1401.
6. Datta N., Cashmore A.R. Binding of a pea nuclear protein to promoters of certain photoregulated genes is modulated by phosphorylation // *The Plant Cell.* – 1989. - Vol. 1. - P. 1069–1077.
7. Li H., Dauwalder M., Roux S.J. Partial purification and characterization of a Ca^{2+} dependent protein kinase from pea nuclei// *Plant Physiol.* – 1991. – V. 96. – P. 720–727.
8. Guo Y.L., Roux S.J. Partial purification and characterization of an enzyme from pea nuclei with protein tyrosine phosphatase activity// *Plant Physiol.* – 1995. - V.107, №1. - P.167-175.
9. Li H., Roux S.J. Casein kinase II protein kinase is bound to lamina-matrix and phosphorylates lamin-like protein in isolated pea nuclei// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 1992. – V. 89(18). – P. 8434–8438.
10. Tuteja N., Beven A.F., Shaw P.J., Tuteja R. A pea homologue of human DNA helicase I is localized within the dense fibrillar component of the nucleolus and stimulated by phosphorylation with CK2 and cdc2 protein kinases// *Plant J.* – 2001. – V. 25, № 1. – P. 9–17.
11. Van Hop D., Gaikwad A., Yadav B.S., Reddy M.K., Sopory S., Mukherjee S.K. Suppression of pea nuclear topoisomerase I enzyme activity by pea PCNA// *Plant J.* – 1999. – V. 19(2). – P. 153–162.
12. Vashisht A.A., Pradhan A., Tuteja R., Tuteja N. Cold- and salinity stress-induced bipolar pea DNA helicase 47 is involved in protein synthesis and stimulated by phosphorylation with protein kinase C// *The Plant Journal.* – 2005. – V. 44:1. – P. 76-87.

Summary

A method of affinity chromatography for isolation of DNA-binding proteins from cell nuclei of different taxons' representatives – *Gramineae* (*Secale cereale*) and *Fabaceae* (*Pisum sativum*) – was adapted. Subsequent electrophoretic analysis of fractionated DNA-binding proteins revealed rich and heterogeneous groups of proteins with varying affinities to the heparin column to be present in the nuclei of the studied plants, whose composition was clearly taxon/species specific.