

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

# БЕЛКИ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР РЖИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭПИБРАССИНОЛИДОМ И АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТОЙ

Спиридович Е.В., Гончарова Л.В., Чижик О.В.

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

---

Обсуждаются результаты исследований по воздействию двух разных регуляторов роста (абсцизовая кислота и эпибрасинолид) на содержание основных биополимеров ядра и компонентный состав белков ядерных фракций. Разборку ядра на фракции проводили буферами различной ионной силы. Показано влияние обоих гормонов на белковый состав ядра.

**Введение.** Исследование механизмов действия фитогормонов на такие процессы в растительной клетке, как репликация и транскрипция, синтез белков и других биополимеров, являются актуальными на сегодняшний день, так как именно на этом уровне можно понять механизм гормональной регуляции жизнедеятельности растений. Гормоны являются посредниками физиологических процессов в растениях, они преобразуют специфические сигналы окружающей среды в биохимическую информацию, способны приводить к заметным изменениям в метаболизме растительной клетки, поэтому становится очевидной важность изучения их экзогенного влияния на ДНП-комплексы интактных клеточных ядер. Ядерный аппарат растений изучен недостаточно, в связи с этим в наших исследованиях основное внимание было сосредоточено на изучение состава интерфазного клеточного ядра злаковых культур под действием гормональных веществ, которые способны вызывать изменения спектра или уровень экспрессии синтезируемых в клетках белков в результате воздействия на процессы транскрипции и трансляции.

В качестве фитогормонов были выбраны синтетический эпибрасинолид (ЭБ) и абсцизовая кислота (АБК). Имеются литературные и собственные данные о том, что эпибрасинолид в концентрации  $10^{-7}$  М стимулирует протекание биологических процессов [1]. Именно поэтому данная концентрация была выбрана для изучения влияния данного биологического регулятора роста на белковый состав дезоксирибонуклеопротеидного комплекса ин-

терфазных ядер ржи на начальных этапах прорастания. В свою очередь абсцизовая кислота (АБК) является ингибитором роста растений [2], поэтому ее действие на компонентный состав белков ядра интересен особенно в сравнении с действием ЭБ. Как и другие гормональные регуляторы, АБК принимает участие в контроле интенсивности разнообразных биохимических процессов, не подавляя реализацию активности всех других эндогенных регуляторов роста.

**Материалы и методы.** Обработка фитогормонами заключалась в замачивании семян ржи в дистиллированной воде с добавлением эпибрасинолида в концентрации  $10^{-7}$  М (опыт) в течение 3 часов. Замачивание производилось в кюветах, что способствует нормальному поступлению влаги и кислорода, после чего семена прорастивались в термостате при 26°C. Для изучения влияния АБК на состояние ДНП-комплекса интерфазных ядер растений на начальных этапах прорастания необходимо было подобрать оптимальную концентрацию этого ингибитора. С этой целью семена исследуемых растений прорастивались на дистиллированной воде (контроль) и растворах АБК 2 - 15 мг/л. В результате оптимальной была выбрана концентрация АБК 2,65 мг/л, т.е.  $10^{-5}$  М. Указанная концентрация оказывала заметное ингибирование процесса прорастания по сравнению с контрольными растениями.

Из 72-часовых проростков выделяли интерфазные ядра по методу [3]. Общие (или суммарные) ядерные белки экстрагировали, используя метод Giannasca P.J.[4], структурно-функциональные группы белков извлекали из ядер следующими растворами (табл. 1):

Таблица 1

**Растворы, применяемые для экстракции  
ядерных белков (ТМ-экстракция)**

№	Состав растворов	Качественный состав извлекаемых белков
1	10mM Tris-HCl pH 7,5 + 10mM NaCl + 3mMMgCl <sub>2</sub> + 20mM NH <sub>4</sub> Cl -фракция1;	Белки нуклеоплазмы
2	10mM Tris-HCl pH 7,5 + 0,2mM MgCl <sub>2</sub> -фракция 2;	Слабосвязанные с матриксом белки
3	10mM Tris-HCl pH 7,5 + 2M NaCl - фракция 3;	Гистоны нуклеосом, негистоновые белки

Получаемые растворы белков осветляли центрифугированием, осаждали ацетоном и разделяли методом электрофореза, который проводили в градиентных (12-24%) полиакриамидных гелях в денатурирующих условиях [5]. Гели сканировали на денситометре LKB 2202 Ultrascan, подсоединенном к интегратору LKB 2220 Recoding Inregrator.

**Результаты и обсуждение.** Предварительный анализ ядерной фракции включал обязательную процедуру определения количественного соотношения основных компонентов: ДНК, РНК и белков, причем содержание ДНК принималось за единицу. Этот показатель является постоянным в определенных пределах и может служить свидетельством чистоты выделенных ядер[6]. Для контрольных и опытных вариантов соотношение основных биополимеров приведено в табл.2

Данные таблицы 1 дают основание полагать, что обработка растений ЭБ и АБК приводит к увеличению доли белков во фракции № 3 (белки гетерохроматина). Отличие в действии препаратов заключается в том, что обработка АБК снижает долю белка во второй фракции (активный диффузный хроматин), а также относительное содержание РНК. Поскольку АБК является репрессором роста и развития, то ее воздействие проявляется на показателях клеточного ядра, связанных с экспрессией.

Следующим этапом работы было электрофоретическое разде-

Таблица 2.

**Компонентный состав интерфазных клеточных ядер 72-часовых проростков ржи (сорт Пуховчанка) при воздействии фитогормонами**

	Контроль	ЭБ	АБК
Соотношение ДНК: РНК: белок (суммарный экстракт)	1 : 0,18 : 1,35 1 : 0,18 : 2,4	1 : 0,18 : 2,13	1 : 0,17 : 1,37
Белки фракция №1 (% от суммы)	8-13	8	9
Белки фракция №2 (% от суммы)	27-41	28	23
Белки фракция №3 (% от суммы)	51-59	63	68

ление общих ядерных белков и белков ядерных фракций. Электрофореграммы общих ядерных белков представлены на рис 1 и 2. Следует отметить, что ядерные белки включают гистоны, которые обеспечивают два первых уровня компактизации эукариотического генома и в значительной мере изучены и негистоновые белки (НГБ), причем структура хроматина в значительной степени определяется взаимодействием ДНК с гистонами. В эволюционном отношении коровые гистоны, т.е. гистоны, создающие нуклеосомное ядро, отличаются поразительным консерватизмом. Тесные контакты гистон-гистон, гистон-ДНК накладывают серьезные ограничения на их изменчивость. В то же время гистон Н1 меняет свою структуру сравнительно легко. Межвидовые различия по гистону Н1 обнаруживаются довольно часто. По молекулярным

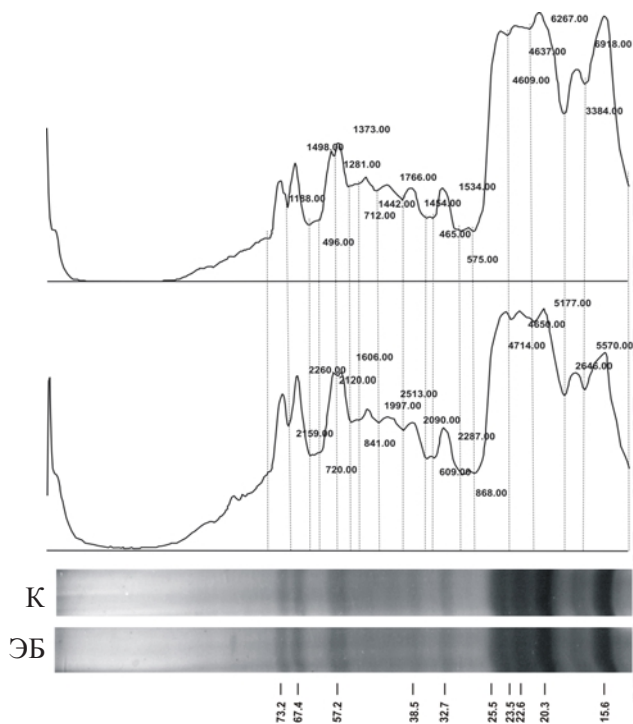


Рис.1. Электрофореграммы и денситограммы общих ядерных белков из 72-часовых проростков ржи в контрольных условиях (К) и под действием эпибрасинолида (ЭБ). Цифрами указаны молекулярные массы.

массам белки-гистоны были разделены на пять высоко подвижных компонента с М.м. от 11 до 25,5 кДа [6]. Кроме гистонов в клеточных ядрах обнаруживается множество компонентов НГБ, которые высоко гетерогенны по свойствам и функциям. Большинство из них присутствует в небольших количествах и не обнаруживаются в цитоплазме клетки. Интерес к НГБ обусловлен их возможным участием в регуляции активности генов. К этим белкам относится большое число ферментов, включая РНК-полимеразу, топоизомеразу и др., так называемые высокоподвижные НМГ-белки также относятся к этой группе [7-9]. Кроме того, в ядрах содержатся определенные репрессоры генов, белки, связывающие гормоны и многие другие, влияющие на структуру ядра [10-13].

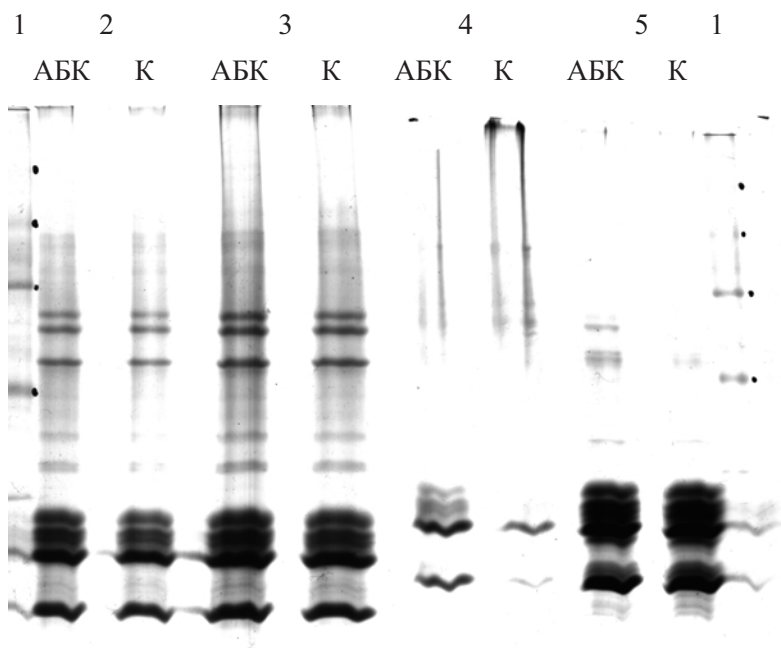


Рис.2. Электрофореграммы белковых фракций ядер 72-часовых проростков ржи Пуховчанка — в контрольных условиях (К) и под действием абсцизовой кислоты (АБК):

- 1 – белковые маркеры;
- 2, 3 – общие ядерные белки, нанесенные на гель в разной количественной пропорции;
- 4 – прочносвязанные белки гетерохроматина;
- 5 – белки эухроматина.

На электрофоретических спектрах ядерных белков отмечено не менее 20 компонентов, 5 из которых – мажорные и находятся в области 25-15 кДа, где обычно локализованы гистоны и НМГ-белки. Ярко выражены еще 3 низко подвижных компонента с М.м. от 57 до 73 кДа. В целом электрофоретическое разделение обнаруживает две группы белков – средне- и высокомолекулярная (32-72 кДа) и низкомолекулярная (13-25 кДа) области, которые находятся в разном количественном соотношении (по величине пиков, рис.1). Анализ электрофореграмм общей фракции белков ядра, полученных в опытах с использованием фитогормонов, показал их разное, хотя и не ярко выраженное, воздействие на экспрессию белковых фракций.

Стероидный фитогормон (ЭБ) повышал относительное соотношение высокомолекулярных и снижал относительное содержание низкомолекулярных белков, а также репрессировал фракцию с М.м. примерно 25 кДа, которую можно отнести к гистонам Н1 и его модифицированным формам. Снижение гистона Н1 обычно связывают с активацией метаболических процессов, экспрессией генома. Т.е. можно предполагать воздействие ЭБ на ядерный аппарат озимой ржи и активизацию его функций.

Обработка проростков АБК не вызвала отличий в гетерогенности и экспрессии отдельных белков ни по группам, ни по отдельным фракциям. Поскольку разделение общих белков не позволяет достаточно полно изучить гетерогенность белков ядра и учитывая сложный состав и природу, разнородный характер распределения белков ядра по компартментам (нуклеоплазма, эухроматин, гетерохроматин, ядерный матрикс), был применен способ ступенчатой экстракции ядерных белков растворами разной ионной силы и состава. Наше внимание было сосредоточено на первых трех фракциях. Анализ электрофореграмм (рис.2) позволил обнаружить дополнительную белковую зону в области М.М. 67-70, т.е в случае с обработкой АБК выявлено влияние фитогормона на экспрессию белков клеточного ядра.

В целом, полученные данные свидетельствуют о воздействии гормонов на белковый состав ядра и, вероятно, их регуляторное воздействие проявляется через ядерный аппарат клетки.



## Литература

- 1 Marquardi V. and Adam G. Recent advances in brassinosteroid research. *Chemistry of Plant Protection*, 1991 (7), p. 103-139.
- 2 Grill E., Himmelbach A. ABA signal Transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 1998, 1: 412-418.
- 3 А.с. № 1701747, СССР.
- 4 Giannasca P.J., Horowitz R.A. and Woodcock C.L. Transitions between in situ and isolated chromatin// *J.of Cell Science*.1993. V.105. PP.551-561
- 5 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4// *Nature*.-1970.-V.227.-P.680-685.
- 6 Георгиев Г.П., Ермалаева Л.П., Збарский И.Б. Количественное соотношение белковых и нуклеопротеидных фракций в клеточных ядрах, выделенных из разных тканей // *Биохимия*.1960.-Т.25.-С.318-322.
- 7 Ivanchenko M.; Tasheva B.; Stoilov L.; Christova R.; Zlatanova J. Characterization of some nuclear matrix proteins in maize . *Plant Sc.*, 1993; Vol.91,N 1 -P. 35-43
- 8 Sutton F.; Kenefick D.G.; Chang L.-Y. A high mobility group protein cDNA clone from barley. *Plant Physiol.*, 1995; Vol.107,N 1 -P. 269-270
- 9 Leprince O.; Colson P.; Houssier C.; Deltour R. Changes in chromatin structure associated with germination of maize and their relation with desiccation tolerance. *Plant Cell Environm.*, 1995; Vol.18,N 6-P. 619-629
- 10 Van den Broeck D.; Van der Straeten D.; Van Montagu M.; Caplan A. A group of chromosomal proteins is specifically released by spermine and loses DNA-binding activity upon phosphorylation. *Plant Physiol*, 1994; Vol.106,N 2-P. 559-566
- 11 Ivanova E.A.; Vafina G.K. Functional activity of cellular nuclei in tissues of the first true leaf of wheat seedlings. *Biologija*, 1996; N 1-P. 3-8
- 12 Strouboulis J and A. P. Wolffe. Functional compartmentalization of the nucleus., *Journal of Cell Science* 109:, 1996 p 1991 -2000

## Summary

Polypeptide spectra of different nuclear proteins from rye plants were investigated by the methods of electrophoresis under control conditions and under phytohormone factors. The received results have allowed to assume the influence of different hormones on the nuclear protein contents.