

**БЕЛКИ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ПРИ ЭКСПРЕССИИ И МОДИФИКАЦИИ ГЕНОМА****О.В. Чижик***ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь**e-mail: office@cbg.org.by*

В настоящее время протеомика стала необходимой методологией в различных сферах клеточной биологии. Эффекты мутаций, различного рода воздействия на живой организм, изменения путей метаболизма, процессы дифференциации и дедифференциации клеток растений, можно проследить по тому, как они сказываются на уровнях биосинтеза и функциональной активности белков.

Углубление знаний о структуре белков клеточных ядер остро необходимы для развития клеточной биотехнологии и генетической инженерии, поскольку именно клеточное ядро является основной мишенью и объектом такого рода воздействий [1, 2].

В отделе биохимии и биотехнологии растений важное место в исследованиях занимает выявление гетерогенности и участия белков в формировании надмолекулярного комплекса и функциональной активности клеточных ядер высших растений при их экспрессии и модификации. Разработаны методические подходы к изучению белков интерфазного клеточного ядра: освоена, модифицирована и отработана методика получения интерфазных клеточных ядер высших растений, предложена система избирательной экстракции отдельных составных частей ядра (функциональных компартментов) [3].

На основе этих методических подходов изучали изменение белкового состава клеточных ядер растений при естественной экспрессии генома (прорастание), под воздействием различных факторов (обработка КВЧ–излучением в области коротковолнового миллиметрового диапазона нетепловой интенсивности), генетической трансформации, а также в ходе дифференциации и дедифференциации ткани.

Для изучения экспрессии генома при прорастании исследовали 5 компартментов ядра злаковых – кариоплазму, диффузный хроматин (эухроматин I, II), компактный хроматин (гетерохроматин) и ядерный матрикс (таблица 1).

Таблица 1 – Компартменты интерфазного клеточного ядра, получаемые при его ступенчатой экстракции (I – солевая; II – ТМ – экстракция)

| № фракции                                  | Компартменты ядра                    | № раствора                                                                                                                                              | Общая характеристика                                                                                                 |
|--------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                          | Кариоплазма                          | Раствор № 1<br>I: 0,14M NaCl + 10 mM Tris-HCl pH 7,5<br><br>II: 10 mM NaCl + 3 mM MgCl <sub>2</sub> + 20 mM NH <sub>4</sub> Cl + 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 | Растворимые (несвязанные) белки кариоплазмы, «свободная» ДНК, РНК и их фрагменты                                     |
| 2                                          | Диффузный хроматин (эухроматин I)    | Раствор № 2<br>I: 0,6M NaCl + 10 mM Tris-HCl, pH 7,5<br>II: 0,2 mM MgCl <sub>2</sub> + 10 mM Tris-HCl, pH 7,5                                           | Белки нуклеопротеидов, не имеющие точек связывания с матриксом ядра                                                  |
| 3                                          | Диффузный хроматин (эухроматин II)   | Раствор № 3<br>2M NaCl + 10 mM Tris-HCl, pH 7,5                                                                                                         | Белки нуклеопротеидов, связанных с внутренним матриксом динамичной связью; фрагменты нуклеопротеидов; ядерные липиды |
| 4                                          | Компактный хроматин (гетерохроматин) | Раствор № 4<br>1% Triton X-100 + 10 mM Tris-HCl pH 7,5                                                                                                  | Белки нуклео- и липопротеидов, прочно связанных с матриксом; фрагменты нуклеопротеидов; ядерные липиды               |
| 5                                          | Ядерный матрикс                      | Раствор № 5 (остаток после экстракций)<br>0,5% SDS (лизирующий раствор)                                                                                 | Белки, ДНК и РНК ядерного матрикса и их комплексы                                                                    |
| I – солевая экстракция, II – ТМ-экстракция |                                      |                                                                                                                                                         |                                                                                                                      |

Ядра зародышей зерновок, находящихся в состоянии покоя, и ядра осевых частей проростков (24, 72 ч) имели различную картину количественного распределения белков по фракциям 1 – 5 и сопутствующих им ДНК и РНК (таблица 2).

Таблица 2 – Содержание белков и нуклеиновых кислот в экстрагируемых фракциях ядер проростков ржи разного возраста (в % от суммы)

| Вещества<br>ядра | Часы<br>проращивания | Фракции клеточного ядра |                   |                    |                             |              |
|------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------|--------------|
|                  |                      | 1<br>кариоплазма        | 2<br>эухроматин I | 3<br>эухроматин II | 4<br>компактный<br>хроматин | 5<br>матрикс |
| Белки            | 0                    | 08,42                   | 41,22             | 30,08              | 9,08                        | 11,20        |
|                  | 24                   | 13,88                   | 42,43             | 23,22              | 7,32                        | 13,15        |
|                  | 72                   | 17,00                   | 40,50             | 19,00              | 7,50                        | 16,00        |
| РНК              | 0                    | 15,66                   | 52,50             | 26,32              | 4,48                        | 1,04         |
|                  | 24                   | 20,96                   | 58,84             | 15,52              | 2,88                        | 1,80         |
|                  | 72                   | 30,11                   | 42,12             | 16,35              | 6,24                        | 5,18         |
| ДНК              | 0                    | 0,34                    | 14,97             | 84,37              | 0,20                        | 0,12         |
|                  | 24                   | 1,12                    | 46,48             | 51,78              | 0,38                        | 0,24         |
|                  | 72                   | 0,58                    | 46,58             | 52,00              | 0,58                        | 0,26         |

В процессе прорастания семени в ядрах наблюдается устойчивое увеличение общего белка в кариоплазме (фракция 1) с 8 до 17%. Вторая и третья фракции оказались наиболее богатыми белками, ДНК и РНК. Особенность фракции № 3 в том, что основная часть белков, судя по данным электрофореза, представлена гистонами при незначительном количестве негистоновых белков. Рассчитанное соотношение ДНК/белок близко к единице. Все это позволяет считать, что 3-я фракция является экстрактом, обогащенным нуклеосомными фибриллами.

Т.о. было определено, что каждая из фракций представляет собой вполне определенный компартмент клеточного ядра, доля которого динамично изменяется при прорастании. Следовательно, естественная экспрессия генома определяется изменением состава компартментов ядра. Электрофоретическое разделение пяти фракций ядерных белков показало, что прорастание (активация генома) сопровождается значительным увеличением гетерогенности белков клеточного ядра, в основном, во фракциях 1–3.

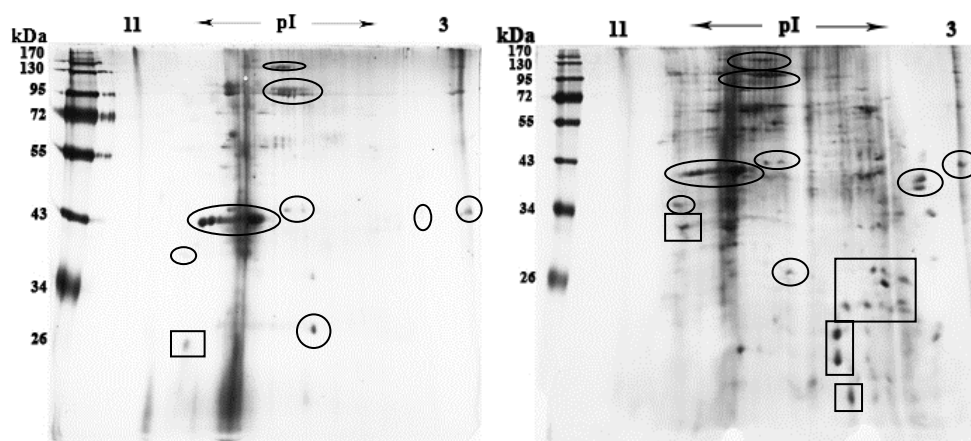
Поскольку физиологическая роль гистона H1 и HMG-белков заключается в участии в процессах изменения степени компактизации хроматина (процессе транскрипции), то проводилось изучение этих групп ядерных белков [4].

Наши данные подтвердили, что количественная и качественная изменчивость гистона H1 коррелирует с экспрессией генома при росте и развитии проростка. Снижение содержания гистона H1 в хроматине приводит к декомпактизации части неактивного ДНП-комплекса, (т.е. увеличению доли «расплетенной» соленоидной структуры ДНП), что позволяет активироваться процессу транскрипции.

Двумерный электрофорез HMG-белков ржи показал, что их молекулярные массы лежат в пределах 14 – 24 кД. Они участвуют в процессах изменения степени компактизации хроматина и могут характеризовать активность генома (транскрипцию).

Проводимое исследование биохимии клеточного ядра позволяет выявить первичные мишени для регуляторного воздействия или направленной реконструкции структуры основного информационного центра клетки – интерфазного ядра – с целью использования в биотехнологии растений.

В отделе также проводили изучение протеома озимой ржи при предпосевной обработке семян (КВЧ-излучением). Протеомный анализ показал динамичность белков нуклеоплазмы при такого рода воздействиях (рисунок 1).



А – фракция нуклеоплазмы – Б – фракция нуклеоплазмы – опыт  
контроль (обработка КВЧ-излучением)

Рисунок 1 – фракция нуклеоплазмы из ядер проростков озимой ржи сорта Лота (А – контроль, Б – опыт)

В результате сопоставления протеомных карт, полученных при 2-D электрофорезе белков нуклеоплазмы, наряду с группами протеинов, характерными для обеих фракций, в опыте зафиксированы белковые пятна, отсутствующие в контроле (в диапазоне pI 9–11). Кругами обозначены полипептиды, характерные для обоих образцов; квадратами – присущие только данной фракции (опыт). Можно предположить, что выделенная группа белков – это субфракции гистонов, наименее прочно связанные с ДНК и перешедшие во фракцию нуклеоплазмы.

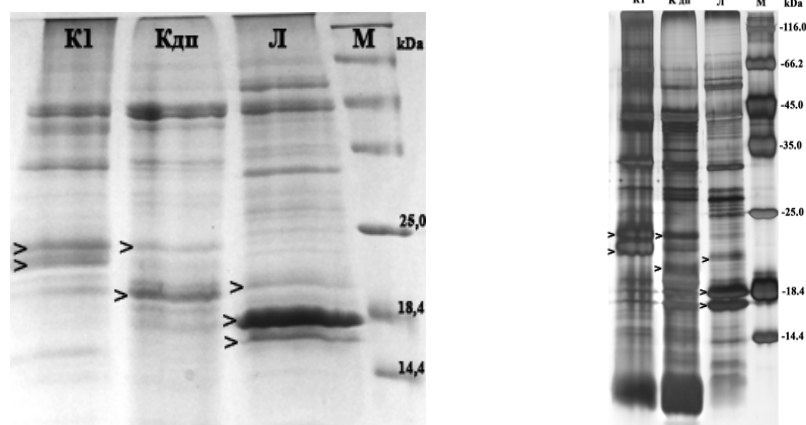
Во фракции сильно основных белков также зафиксированы изменения (рисунок 2). В опыте (обработка) отсутствуют белки (6 субъединиц) в области Мм 19–20, 17 и 14 kDa и диапазоне pI 11–10.

Так как недостаточно сведений о распределении гистона H1 во время дифференциации и дедифференциации клеток растений, процесса, включающего изменения в структуре и функциях хроматина, в отделе проводятся исследования по сравнительному анализу ядерных фракций (преимущественно, гистона H1) в дифференцированных и дедифференцированных тканях растений (каллус и лист табака).

Гистон H1 имеет ряд изоформ. Соотношение субфракций H1 непостоянно и зависит от физиологического состояния организма, типа ткани, стадии развития [5–8]. В связи с этим, изменение субфракционного состава гистона H1 можно рассматривать как маркерный элемент ряда процессов развития растений.

Фракцию гистона H1 выделяли из листьев и каллусов (первичный и длительно пассируемый) растений табака. Анализ полученных электрофореграмм показал, что в суммарной H1 гистоновой фракции каждого объекта присутствуют пептиды с Мм: K1 – 23,5, 21,7 kDa; Kдп – 23,5 и 19,6 kDa и Л – сильно экспрессирующиеся пептиды с Мм 17,9; 17,0 kDa и Мм 20,3 kDa (рисунок 3). Одновременно проводили тестирование этих же образцов на Биоанализаторе Agilent 2100. Электрофореграмма показала сходную картину.

Так как электрофоретический спектр гистонов – генетически детерминированный признак, можно предположить, что фракции гистона H1 тканей табака различной степени дифференциации могут выступать в роли белкового маркера дифференцированной (каллус) и дедифференцированной (лист) тканей данной культуры.



А – SDS-электрофорез гистоновой фракции каллуса и листа табака. Окраска Кумасси G-250 (К1 – первичный каллус; Кдп – длительно пассируемый каллус; Л – лист; М – маркер

Б – SDS-электрофорез гистоновой фракции каллуса и листа табака. Окраска серебром (К1 – первичный каллус; Кдп – длительно пассируемый каллус; Л – лист; М – маркер

Рисунок 2 – SDS-электрофорез гистоновой фракции каллуса и листа *N. tabacum*

Учитывая то обстоятельство, что конкретным объектом генноинженерных работ является ДНК клеточного ядра, можно ожидать, что включение чужеродного гена приведет к изменению экспрессии синтеза соответствующих белков. Введение чужеродного гена (изопентилтрансферазы (ipt)), изменяя баланс фитогормонов, влияет на свойства клеточного ядра, что приводит к изменению синтеза соответствующих белков и проявляется в изменении гетерогенности белкового состава при электрофорезе (отличия по количеству и интенсивности зон).

При встраивании в ядро табака бактериальной ДНК, несущей ipt-ген, наблюдается увеличение гетерогенности (таблица 3) эухроматина I в листовой ткани (с 30 до 32 зон) и ядерного матрикса (с 18 до 23 зон), тогда как в кариоплазме и гетерохроматине число зон сократилось (на 4 и 3). Эти данные свидетельствуют о влиянии ipt-гена на перераспределение белков в структурных частях ядра, поскольку общая гетерогенность белков ядра контрольных и ipt-растений оказалась одинаковой – 130 зон.

Таблица 3 – Число зон при электрофорезе ядерных белков из листовой ткани контрольных и ipt-растений табака

| № фракции | экстракция ядерных белков, лист |     |
|-----------|---------------------------------|-----|
|           | число белковых зон              |     |
|           | контроль                        | ipt |
| 1         | 29                              | 25  |
| 2         | 30                              | 32  |
| 3         | 29                              | 29  |
| 4         | 24                              | 21  |
| 5         | 18                              | 23  |
| всего     | 130                             | 130 |

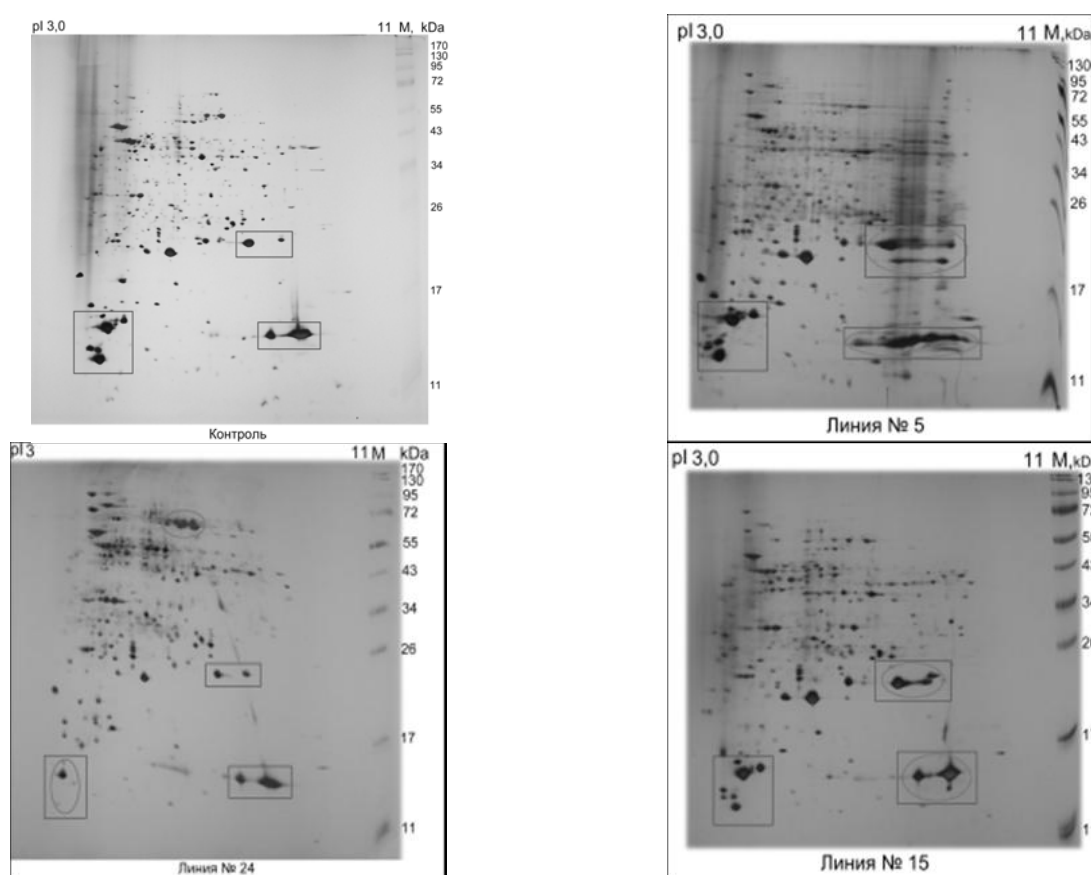
Электрофоретическое разделение ядерных белков каллусных тканей контрольных и модифицированных растений показало их значительную гетерогенность, подобную листовой ткани (таблица 4). В каллусной ткани ipt-растений имелись дополнительные зоны, наиболее

отчетливо проявляющиеся во фракции № 3 (с 23 до 28 зон), тогда как в листовой ткани наибольшие изменения наблюдались во фракциях 1 и 5.

Таблица 4 – Число зон при электрофорезе ядерных белков каллусов контрольных и *ipt*-растений табака

| № фракции<br>ядерных белков | контроль | <i>ipt</i> -каллусы | % по отношению<br>к контролю |
|-----------------------------|----------|---------------------|------------------------------|
| 1                           | 28       | 27                  | 96                           |
| 2                           | 29       | 30                  | 103                          |
| 3                           | 23       | 28                  | 122                          |
| 4                           | 22       | 22                  | 100                          |
| 5                           | 13       | 13                  | 100                          |
| всего                       | 115      | 120                 | 104                          |

Сотрудниками Отдела проведены исследования белковых спектров и экспрессии белков генетически модифицированных линий клюквы крупноплодной (введен ген тауматина II) и исходного генотипа методом 2D- электрофореза (рисунок 3).



К – контрольные растения клюквы крупноплодной

Линии № 5, 15, 24 – трансгенные растения клюквы крупноплодной (сорт Ben Lear)

Рисунок 3 – 2-D электрофорез общего протеома листа клюквы крупноплодной

Полученные протеомные карты имели сходную картину белковых пятен, только в области Мм 13,0 – 14,0; 19,0– 19,5; 23,3 – 24,0 и 65,6 – 70,0 кДа зафиксированы изоформы, отличные от таковых контроля. В дальнейшем для идентификации полученных изоформ будет проведен масс-спектрометрический анализ. Отсутствие значительных изменений в спектре общих белков в трансгенных растениях, на наш взгляд, связано с тем, что вставка гетерологичного гена *thau II* не затронула функциональной области генома. Полученные экспериментальные данные о составе белков ядра и их участии в организации его структуры создают теоретическую базу для целенаправленных биотехнических работ по созданию

форм растений с заданными свойствами, а также использованию рострегулирующих веществ, в том числе при ведении культуры ткани *in vitro*.

Известно, что культуру дедифференцированных клеток *in vitro* можно использовать как клеточные «фабрики» по производству особо ценных биологически активных веществ.

В отделе разрабатываются пути и способы получения вторичных метаболитов в культурах *in vitro* лекарственных растений на основе комбинации методов протеомики и метаболомики. Отобраны соматоклоны-гиперпродуценты БАВ *A. rugosa* и 18 культур дедифференцированных клеток, инициированных из корневых, стеблевых и листовых эксплантов. Ведутся работы по выявлению эпигенетических изменений в структуре гистоновых белков дедифференцированных клеток многоколосника, влияющих на метаболомику клеток *in vitro*.

В результате сопоставления 2-Д протеомных карт было показано, что каллусные ткани контрольных растений *A. rugosa* и соматоклона имеют отличия по распределению подфракций, что свидетельствует о том, что каллусные культуры должны рассматриваться как специфический объект с измененным протеомом.

Данные протеомных отличий можно использовать для маркирования линий-гиперпродуцентов БАВ.

Т.о. изучение структурных и регуляторных белков клеток и ядер дедифференцированных тканей лекарственных растений-продуцентов биологически активных веществ необходимо для выявления изменений протеома и эпигенетических состояний хроматина, обуславливающих функциональную активность клеток и тканей, в т.ч. накопление метаболитов и запасных веществ.

#### Список литературы

1. Клеточные ядра растений – экспрессия и реконструкция: Сб. науч. тр. I Региональной науч. конф. Минск, 28–29 мая 2001 г. / Минск, РУПП «Барановичская укрупненная типография, 2001. – 187 с.
2. Решетников, В.Н. Клеточные ядра высших растений / В.Н. Решетников – Мн.: Наука и техника, 1992. – 82 с.
3. Чижик, О.В. Клеточные ядра растений – экспрессия и реконструкция / О.В. Чижик, Е.В. Спиридович, В.Н. Решетников // Сб. науч. тр. I Региональной науч. конф. – Мн., 2001. – С. 143 – 151.
4. Network of Dynamic Interactions between Histone H1 and High-Mobility-Group Proteins in Chromatin / F. Catez [et. all] // Mol. And Cell Biol. – 2004. – Vol. 24, № 10. – P. 4321–4328.
5. Ponte, I. Complexity of Histone H1 Subtypes / I. Ponte, R. Vila, P. Suau // Mol. Biol. Evol. – 2003. – Vol. 20, № 3. – P. 371–380.
6. Widom, O. Chromatin structure: Linking structure to function with histone H1 / O. Widom // Current Biology. – 1998. – Vol. 8. – P. 788–791.
7. Alatzasi, A. Distribution of linker histone variants during plant cell differentiation in the developmental zones of the maize root, dedifferentiation in callus culture after auxin treatment / A. Alatzasi, L. Srebrev, A. Foundouli // Biol. Res. – Vol. 41, № 2. – 2008. – P. 205–215.
8. Чижик, О.В. Гистон H1 как возможный маркер для тестирования вида у представителей семейства злаковых / О.В. Чижик // Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых: Брянск, Россия, 29 июня–8 июля 2009 г. – С. 104–108.