

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ЯДЕР РЖИ И ГОРОХА

Е.В. СПИРИДОВИЧ, О.В. ЧИЖИК, Д.Л. ЯНОВИЧ

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск

Целью данной работы было адаптировать метод аффинной хроматографии для выделения ДНК-связывающих белков из интерфазных клеточных ядер представителей разных таксонов и провести электрофоретический анализ фракции ДНК-связывающих белков ядер ржи и гороха.

ВВЕДЕНИЕ. ДНК-связывающие белки играют ключевую роль в процессах репликации, рекомбинации и генетической экспрессии. Матрица этих процессов — молекула ДНК — образует хроматин ядра, структура и динамика (компактизация и декомпактизация) которого поддерживается несколькими группами белков [1–4]. Большинство из этих белков является ДНК-связывающими: 1) H2A, H2B, H3, H4 — структурные гистоны, участвующие в образовании нуклеосомы и линкерный гистон H1 [5, 6]; 2) HMG — типичные негистоновые хромосомные белки, которые связывают и удерживают ДНК, выполняя роль “архитекторов” [7, 8]; 3) ДНК-метилтрансферазы — ферменты, участвующие в метилировании ДНК; 4) АТФ-зависимые хроматин-ремодулирующие факторы — большие мультибелковые комплексы, которые за счет энергии АТФ изменяют структуру укладки нуклеосом, обеспечивая работу РНК-полимеразы.

Материалы и методы

Для выделения ядер использовали 72-часовые проростки ржи (*Triticale cereale*) сорта Пуховчанка и гороха (*Pisum sativum*) сорта Полешка. Для наиболее эффективного разрушения ядерных оболочек насадок ядер ресуспендировали в буфере, содержащем 2 мМ ТЕА, 0,2 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ DFP (диизопропилфлюорофосфат), а затем разрушали ультразвуком, используя ультразвуковой дезинтегратор (MSE), при амплитуде 16m (трижды по 30 с при 22 кГц) в ледяной бане. Затем концентрацию NaCl в лизате доводили до 4 М и добавляли DFP.

После 15-мин инкубации при комнатной температуре лизат осветляли центрифугированием 30 мин и обессоливали на колонке HiTrap (Desalting Biosciences (5 мл)) на хроматографе AKTApriime (Amersham Biosciences). Обессоленную фракцию, соответствующую белковому пику (максимум поглощения при 280 нм) центрифугировали и супернатант наносили в 2 этапа на 5-мл колонку для афинной 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 [9] в 14% ПААГ с последующим окрашиванием гелей Кумасси R-250 и серебром [10].

Результаты и обсуждение

Целью данной работы было адаптировать метод афинной хроматографии для выделения ДНК-связывающих белков из интерфазных клеточных ядер представителей разных таксонов и провести электрофоретический анализ фракции ДНК-связывающих белков ядер ржи и гороха. Связывание белков с гепарином основано на взаимодействии противоположных зарядов и лигандной специфичности, что дает возможность отделить группу ДНК-связывающих белков от остальных, присутствующих в ядре.

На рис. 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 свя-

завшиеся с колонкой; II — белки средней афинности; III — белки высокой афинности.

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 разнообразных ДНК-связывающих белков (рис. 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. Качественный состав соответствующих белковых фракций двух сравниваемых видов растений существенно различался, что следовало из малой доли белков идентичного размера в препаратах ржи и гороха (менее 20%).

В нижней части спектра белков высокой афинности (фракция III, мМ 14–22 кДа, рисунок 2) число белковых полос у ржи и гороха было сходным, около 10, однако размеры индивидуальных полипептидов различались. На хроматограмме ДНК-связывающих белков ржи присутствовало пять мажорных полос, которые на наш взгляд представляли собой компоненты нуклеосомы: две полосы соответствовали, наиболее вероятно, гистонам H4 (мМ 14,9) и H3 (мМ 17,3 кДа) и три другие (мМ 19,3; 19,9; 20,8 кДа) — гистонам H2A, H2B и одной из форм гистона H1. Неожиданно, у ДНК-связывающих белков ядер гороха две упомянутые мажорные полосы (мМ 14,9 и 17,3 кДа) сходили с колонки во II-ой

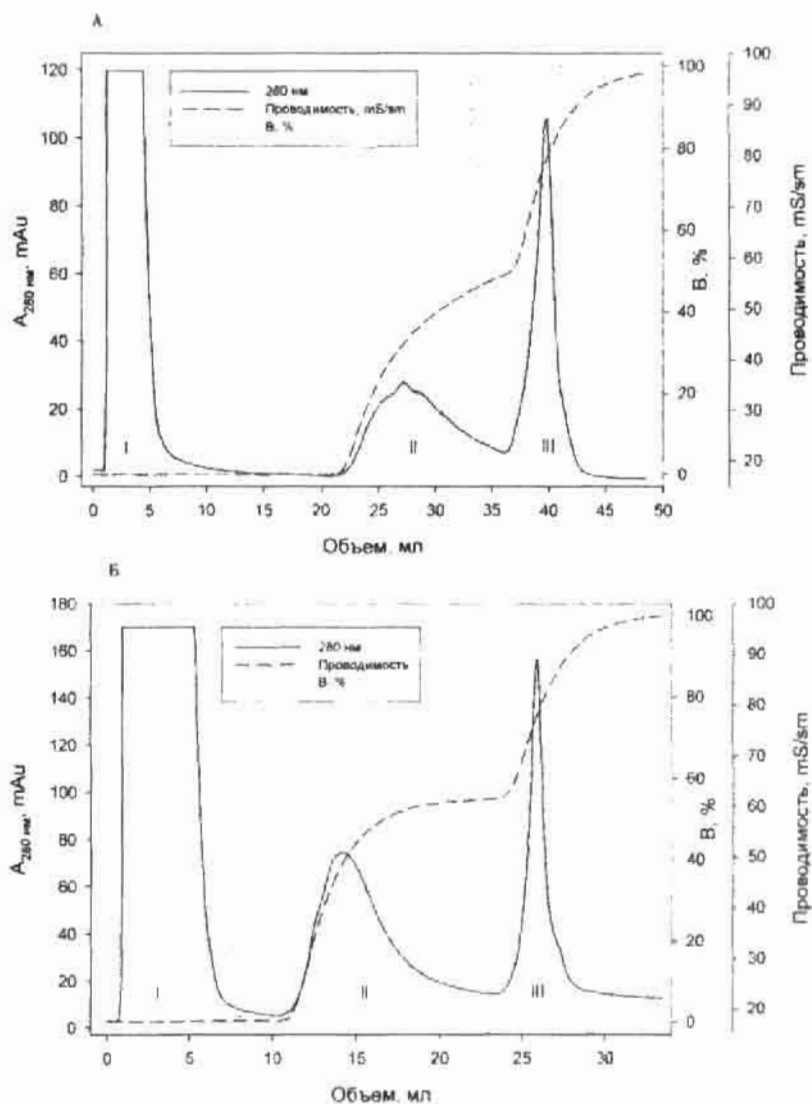


Рисунок 1. Хроматограммы разделения ДНК-связывающих белков ядер ржи (А) и гороха (Б) на колонке HiTrap Heparin HP 5 ml. Элюция ступенчатым 0,9 и 1,5 М градиентом NaCl. Римские численные обозначают белковые фракции, сходящие с колонки

фракции, и, следовательно, отличались от своих ржаных партнеров более низкой степенью аффинности к колонке. Таким образом, нами были отмечены межвидовые различия консервативных (Н4 и Н3) компонентов хроматина.

Наиболее вероятным объяснением этих различий является, скорее всего, дивергенция аминокислотных последовательностей вследствие мутаций в изофункциональных генах белков растительного ядра, которые были накоп-

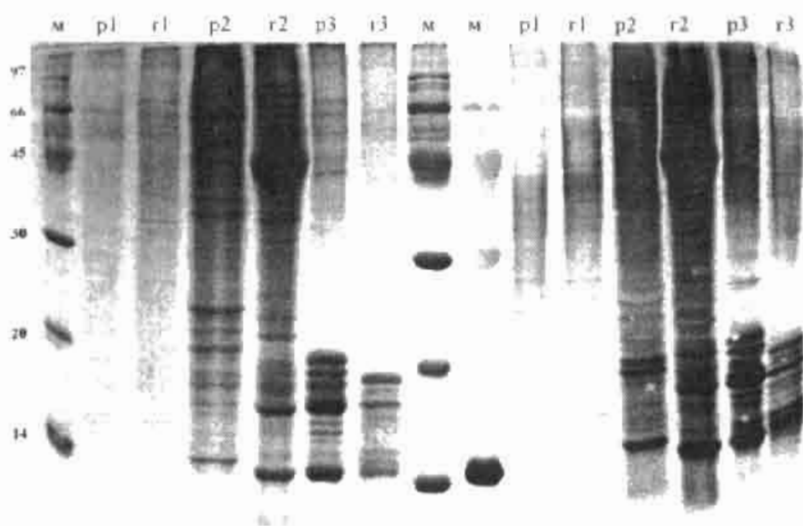


Рисунок 2. Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях белковых фракций ядер ржи (р) и гороха (г), выделенных на колонке HiTar Nerafil HP в ступенчатом 0,9 и 1,5 М градиента NaCl. м, белковые стандарты Мм; р1 и г1, белки, не связавшиеся с колонкой (фракция I, белки сильно деградировали); р2 и г2, белки 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

лены за время, прошедшее с момента эволюционного расхождения таксонов двудольных и однодольных. Свой вклад в наблюдаемое межвидовое разнообразие внесли также альтернативный сплайсинг и видоспецифические белки, вовлеченные в регуляцию процессов развития, которые у ржи и гороха различаются. Поэтому проведение детального сравнительного анализа ДНК-связывающих белков будет в значительной мере зависеть от накопления информации о физических свойствах и функциях индивидуальных белков каждого из анализируемых видов растений в отдельности.

Идентификация отдельных белковых полос в полученных нами спектрах ДНК-связывающих белков представляет собой сложную задачу по ряду

причин. Важнейшей среди них является ограниченность доступной информации об аминокислотных последовательностях и физических свойствах ядерных белков непосредственно у таких культур как горох и рожь (в отличие от модельного вида *Arabidopsis* геном которого секвенирован), и техническая сложность разделения многочисленных полипептидов близкой молекулярной массы в ПААГ. Тем не менее, мы можем предположительно отнести некоторые из выделенных нами белков к ранее функционально охарактеризованным компонентам растительных ядер.

В таблице суммированы опубликованные ранее данные по негистоновым (не HMG) ядерным белкам гороха и приведены близкие по молекулярной

Таблица. Функционально охарактеризованные ядерные (негистоновые) белки гороха фракциях ДНК-связывающих белков, полученных в данной работе

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

массе ДНК-связывающие белки гороха, полученные в данной работе.

В спектре выделенных нами ДНК-связывающих белков ядер гороха присутствуют по меньшей мере 10 полипептидов, которые по Мм соответ-

ствуют таким классам ядерных белков, как белки ядерного матрикса (MAR-связывающие белки) [11], хеликазы (вовлеченные в процессы транскрипции и репликации [12], и киназы — важнейшие ферменты, контролирую-

щие активность транскрипционных факторов и гистонов и, соответственно, контролирующие состояние хроматина). Отсутствие в представленном нами спектре 47 кДа PHD47 хеликазы показательно, т. к. PHD47 является белком, который экспрессируется экспрессируемом в условиях осмотического шока, и в нормальных условиях, как в данном эксперименте, не обнаруживается. Отличительной чертой спектра белков средней афинности 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 электрофоретический анализ фракции ДНК-связывающих белков ядер ржи и гороха. В результате для каждого вида были получены 3 четко разделяющиеся белковые фракции: белки, не связавшиеся с колонкой; белки средней афинности и белки высокой афинности. Электрофоретическое разделение полученных фракций подтвердило высокую степень гетерогенности ДНК-связывающих белков ядер исследованных растительных объектов. Качественный состав соответствующих белковых фракций двух сравниваемых видов растений существ-

венно различался. Были отмечены межвидовые различия консервативных (H4 и H3) компонентов хроматина

Список литературы

1. 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. — Vol. 84. — P. 1397–1401.
2. Datta N., Cashmore A.R. Binding of a Pea Nuclear Protein to Promoters of Certain Photoregulated Genes is Modulated by Phosphorylation // *Plant Cell.* — 1989. — Vol. 1. — P. 1069–1077.
3. Guo Y.L., Roux S.J. Partial purification and characterization of an enzyme from pea nuclei with protein tyrosine phosphatase activity // *Plant Physiol.* — 1995. — Vol. 107, № 1. — P. 167–175.
4. 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. — Vol. 125, № 1. — P. 9–17.
5. Zlatanova J., Caiata P., Van Holde K. FASEB J. — 2000. — Vol. 14. — P. 1687–1704.
6. Thornsens M., Franken L., Launholt D., Foian P., Grasser K. *Biochemistry.* — 2004. — Vol. 43. — P. 8029–8037.
7. Angelov D., Yitolo J., Mutskov V., Dimitrov S., Hayes J. *PNAS.* — 2001. — Vol. 98, № 12. — P. 6599–6604.
8. Cates F., Yang H., Tracey K., Reeves R., Misteli T., Bustin M. *Molecular and Cellular Biology.* — 2004. — Vol. 24, № 10. — P. 4321–4328.
9. Laemmli U.K. *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
10. Chevallet M., Luche S., Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels // 2006. *Nat. Protoc.* — 2006. — Vol. 1. — P. 1852–1858.
11. Hatton D., Gray J.C. Two MAR DNA-binding proteins of the pea nuclear matrix

Identify a new class of DNA-binding proteins // *Plant J.* — 1999. — Vol. 18, № 4. — P. 417–249.

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. — Vol. 44, № 1. — P. 76–87.

Представлено М.В. Кучуком
Надійшла 17.10.2007

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ
ДНК-ЗВ'ЯЗУЮЧИХ БІЛКІВ ЯДЕР ЖИТА
І ГОРОХУ

Є.В. Спіридович, О.В. Чижик, Д.Л. Янович

Центральний ботанічний сад НАН Беларусі,
Мінськ

Адаптовано метод афінної хроматографії для виділення ДНК-зв'язуючих білків з інтерфазних клітинних ядер представників різних таксонів Gramineae (*Secale cereale*)

і Fabaceae (*Pisum sativum*) та проведено електрофоретичний аналіз фракції ДНК-зв'язуючих білків ядер жита і гороху. Виявлено, що якісний склад відповідних білкових фракцій суттєво відрізняється.

Ключові слова: ДНК-зв'язуючі білки, ядрова хроматографія, електрофорез.

COMPARATIVE ANALYSES OF DNA-BINDING PROTEINS FROM GRAMINIAE AND POACEAE NUCLEI

H.V. Spiridovich, V.V. Chyzyk, D.L. Yanovici

The method of affinity chromatography for DNA-binding proteins from cell nuclei of different taxons representatives — Gramineae (*Secale cereale*) and Fabaceae (*Pisum sativum*) — was adapted. By means of electrophoresis the high level of heterogeneity of DNA-binding protein fractions from Fabaceae and Gramineae was confirmed. The qualitative composition of corresponding protein fractions from two comparative plant species was essentially differ.

Key words: DNA-binding proteins, nucleus chromatography, electrophoresis.