

УДК 575.16:576.315.42:577.112'315.42:633.11

АНАЛИЗ АРГ-Х ПРОТЕОЛИЗА В ПРОСТРАНСТВЕННОЙ РЕОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА ПОД ВЛИЯНИЕМ ИНГИБИТОРА ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ПРИ ИНДУКЦИИ РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ОЗИМОЙ И ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ

Э.А. ИВАНОВА, Г.Х. ВАФИНА, Р.С. ИВАНОВ

*Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук
450054 Уфа, просп. Октября, 69*

Описаны особенности динамики содержания белковых компонентов, Арг-Х протеолиза на разных уровнях пространственно-временной организации интерфазного хроматина при прорастании зрелых зародышей озимой и яровой пшеницы в присутствии ингибитора деацетилирования белков. Обсуждено участие Арг-Х протеолиза в эпигенетических механизмах.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., клеточное ядро, Арг-Х протеолиз, ингибитор деацетилирования белков.

Выдающийся генетик Н.И. Вавилов в свое время писал: «... яровизация не только изменяет вегетационный период и сдвигает фазы развития растения, но меняет его технические качества, как длину волокна; мучнистое зерно превращается в стекловидное. По-видимому, яровизация вызывает крупные биохимические различия. Надо незамедлительно приступить к исследованию химических изменений яровизированных сортов ...» [2].

Как известно, протеолиз — это форма биологического контроля, дающая быстрый физиологический ответ на изменяющиеся условия. Ранее мы рассмотрели функционирование Арг-Х протеолиза на разных уровнях организации хроматина пшеницы сортов Мироновская 808 (озимая) и Мироновская яровая [8]. Перевод стандарта по морозостойкости Мироновской 808 в Мироновскую яровую был проведен «методом расщепления наследственности при холодовом воздействии факторов внешней среды» [11]. Крупномасштабная пространственная организация ДНК в ядре, при сохранении доступности определенных ее участков для регуляторных факторов и ферментов транскрипции, способна выполнять важную роль в функционировании эпигенетических механизмов, которые работают не на уровне триплетного кода ДНК, а на уровне N-концевых аргининовых и лизиновых участков, выступающих из нуклеосомной глобулы [9]. Совокупность сигналов, экспонированных на поверхности нуклеосом (включая как тот или иной спектр модификаций основных форм гистонов, так и присутствие вариантов гистонов) составляет особый эпигенетический код, называемый также гистоновым кодом [10]. Этот код может считываться различными белками, регулирующими

конденсацию хроматиновой фибриллы и участвующими тем или иным образом в репликации, транскрипции, репарации ДНК и других генетических процессах. В начале 1970-х годов мы (согласно идее Г.П. Гладышева) [5]) исследовали модификацию (ацетилирование, фосфорилирование) гистонов у растений [5]. Одним из механизмов перехода хроматина в состояние готовности к транскрипции является ацетилирование нуклеосомных гистонов [5]. Уже в ранних работах было установлено, что это процесс быстрый и обратимый, но лишь недавно стало ясно, как много ферментов принимает в нем участие [14].

Целью данной работы было исследование на уровне надмолекулярных структур клеточных ядер (нуклеоплазмы, хроматина, ядерного матрикса) локализации активности Арг-Х протеолиза при транскрипционной активации хроматина в течение инициации ростовых процессов (в присутствии ингибитора деацетилирования гистонов) зрелых зародышей озимой и яровой пшеницы.

Методика

Объектом исследования служили элитные семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сортов Мироновская 808 (озимая) и Мироновская яровая, любезно присланные нам из коллекции Мироновского научно-исследовательского института селекции и семеноводства пшеницы им. В.Н. Ремесло. Проращивание семян осуществляли в темноте при 22 ± 1 °С. В одном варианте опыта (контроль) использовали дистиллированную воду, в другом — 0,004 мМ бутират натрия (NaВ). Последний применяли для ингибирования *in vivo* процессов деацетилирования гистонов (возможно, и других негистоновых белков), т.е. для поддержания удлинённой (продолжительной) стадии повышенного уровня ацетилирования гистонов (возможно, и других ядерных белков), необходимого для стимуляции транскрипции. Бутират натрия был синтезирован в Институте органической химии УНЦ РАН. Элементный состав его находился в пределах: С — 43,5; Н — 6,3; Na — 21. Оптимальную концентрацию NaВ подбирали по увеличению всхожести семян пшеницы сорта Мироновская яровая через 21 ч после индукции ростовых процессов (таблица). В определённые интервалы времени — 0 ч (воздушно-сухое семя) и через 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 ч от начала замачивания семян проводили отделение зародышей от эндосперма. Клеточные ядра выделяли по ранее описанному методу [12]. Надмолекулярные структуры: нуклеоплазму (Нп), хроматин непрочно (Хр-I) и прочно (Хр-II) связанный с ядерным матриксом (ЯМ), а также ЯМ выделяли из очищенных клеточных ядер соответственно при повышении ионной силы раствора: 0,14 М, 0,35 М и 2,0 М NaCl в 0,01 М *трис*-HCl буфере, pH 6,8. ЯМ извлекали 6 М гуа-

Влияние бутирата натрия (NaВ) на всхожесть семян пшеницы сорта Мироновская яровая

Концентрация бутирата натрия, мМ	Всхожесть семян через 21 ч, %	Концентрация бутирата натрия, мМ	Всхожесть семян через 21 ч, %
0	80	0,5	70
0,004	92	1	72
0,010	88	2	52
0,015	76	4	32

нидингидрохлоридом ($\text{Gu} \cdot \text{HCl}$) с 0,004 %-м β -меркаптоэтанолом в том же буфере. Количество белка в ядрах и ядерных фракциях определяли методом Бредфорда в нашей модификации [13]. Арг-Х (триптазную) активность оценивали по расщеплению Арг-Х-связей в аргининбогатом белке — протамине-Salmine-A-I («Merk»), молекула которого состоит из 33-х аминокислотных остатков: 22-х молекул Арг; 4-х молекул Сер; 3-х молекул Про; по 2 молекулы Глу и Вал — во всех перечисленных выше фракциях ядер [13]. Удельную активность триптаз выражали в наномолях аргинина в секунду на 1 мг белка (нмоль Арг/(с·мг белка)).

Результаты и обсуждение

Анализ молекулярно-генетических основ озимости и яровости на примере сортов пшеницы Мироновская 808 (озимая) и Мироновская яровая, представленный в нашей предыдущей работе [8], показал, что молекулярные механизмы перепрограммирования процессов роста и развития находятся на уровне слабых химических взаимодействий компартментов клеточного ядра и ядерного матрикса, ответственного за сборку мультиферментных комплексов репликации и транскрипции. Использование бутирата натрия в данном эксперименте при индукции транскрипционной активации хроматина связано с тем, что он подавляет деацетилирование гистонов (возможно, и других ядерных белков), приводит к усилению ацетилирования и транскрипции, а также ряду других эффектов, опосредующих действие ростовых факторов [4].

На рис. 1 представлена всхожесть семян в нормальных условиях и в присутствии ингибитора деацетилирования белков. Наблюдалось различие морфофизиологической реакции озимой и яровой пшеницы в присутствии ингибитора деацетилаз, концентрация которого подбиралась только относительно всхожести семян пшеницы сорта Мироновская яровая (см. рис. 1, *a*, таблицу). Что касается всхожести семян озимой пшеницы, то мы обнаружили, что в этом случае появляется больше проростков с активным ростом за счет растяжения клеток главного корня. Однако в эксперимент были взяты выровненные по общему размеру проросшие зародыши (см. рис. 1, *a*, *II*). Измерения показали, что масса зародышей до их проклевывания не изменяется как в контрольном варианте опыта, так и в присутствии ингибитора (см. рис. 1, *b*). Данные, приведенные на рис. 2, 3, подтверждают, что использование ингибитора деацетилирования белков не влияет на содержание суммарного белка (протеома) клеточного ядра как у яровой (см. рис. 2, *a*), так и озимой (см. рис. 3, *a*) пшеницы. Не наблюдалось также «крупномасштабных» биохимических изменений межмолекулярных белок-белковых взаимодействий компартментов клеточного ядра у озимой пшеницы в интервалы $0 > 3 > 6 > 9 > 12 > 15 > 18 > 21$ ч интерфазы клеточного цикла (см. рис. 3, *b*). Что касается количества белковых компонентов в надмолекулярных структурах клеточных ядер зародышей пшеницы сорта Мироновская яровая (см. рис. 2, *b*), то следует отметить, что при выходе клеток из состояния покоя при набухании семян и увеличении объема клеточных ядер в течение 3—6 и 12 ч количество белка по отношению к контролю заметно увеличивается только во фракции, прочно связанной с ядерным матриксом и обогащенной гетерохроматином (см. рис. 2, *b*, Хр-II). Анализ локализации Арг-Х протеазочувствительности в надмолекулярных структурах хроматина показал, что как у

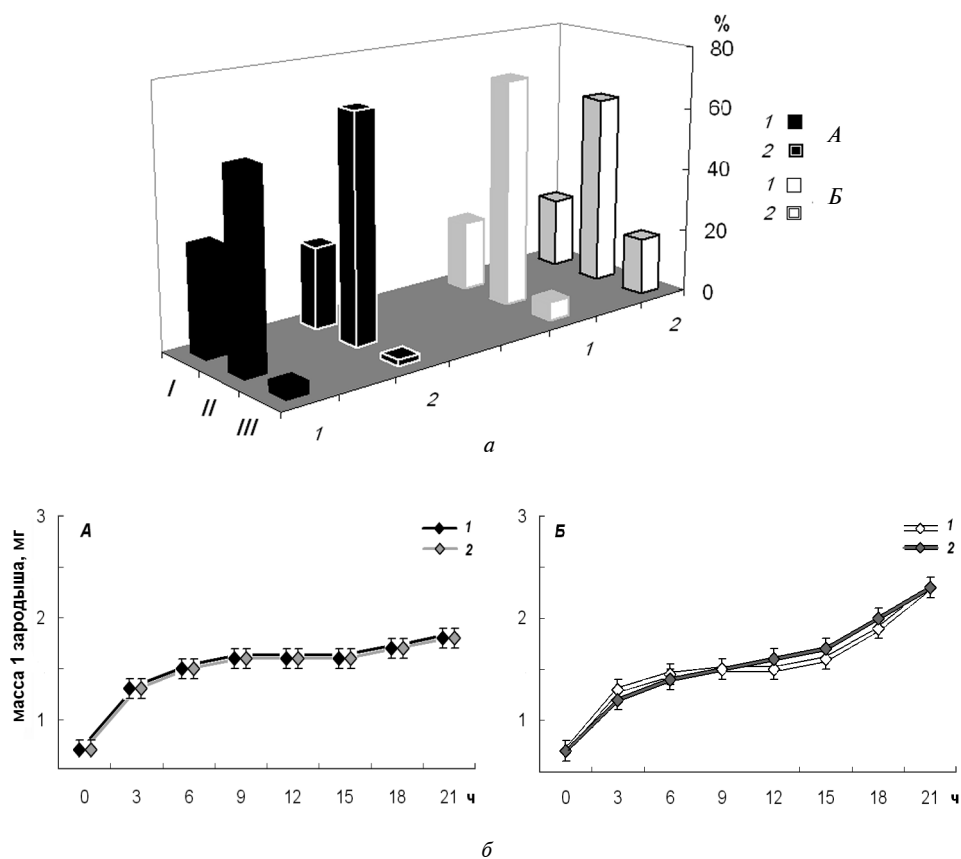


Рис. 1. Всхожесть семян через 21 ч после индукции ростового морфогенеза зрелых зародышей пшеницы *in vivo* (а) и их масса (б) в нормальных условиях (1) и в присутствии ингибитора деацетилирования белков (2):

I — не проклюнулись; II — проклюнулись, общий размер проростка 0,3—0,5 см (взяты в эксперимент); III — активный рост главного корня (более 0,1 см); А — Мироновская яровая; Б — Мироновская 808 (озимая)

яровой (см. рис. 2, в), так и озимой (см. рис. 3, в) пшеницы наблюдается цикличность активности этого фермента. Ранее [7] мы предположили, что проявление цикличности активности Арг-Х протеолиза может быть связано с последовательной пространственно-временной компартиментализацией интерфазного хроматина в течение G_1 фазы клеточного цикла. В экспериментальных условиях, представленных в данной работе, мы не обнаружили четко выраженных различий в проявлении активности Арг-Х протеолиза при использовании ингибиторов деацетилирования ядерных белков зрелых зародышей семян пшеницы сорта Мироновская яровая (см. рис. 2, в). Что касается зрелых зародышей семян озимой пшеницы (см. рис. 3, в), то протеазочувствительность компартиментов клеточного ядра в присутствии ингибиторов деацетилирования ядерных белков резко влияет на экспонированность определенных участков ядерного матрикса (9 ч) и нуклеоплазмы (15 ч) при сохранении Арг-Х протеолиза на уровне ядерного матрикса в контрольном варианте опыта (18 ч). Следует отметить, что период клеточного цикла инициации ростовых процессов зрелых зародышей пшеницы 18 ч характеризуется переходом к началу репликации и синтезу ДНК, т.е. в клетке осу-

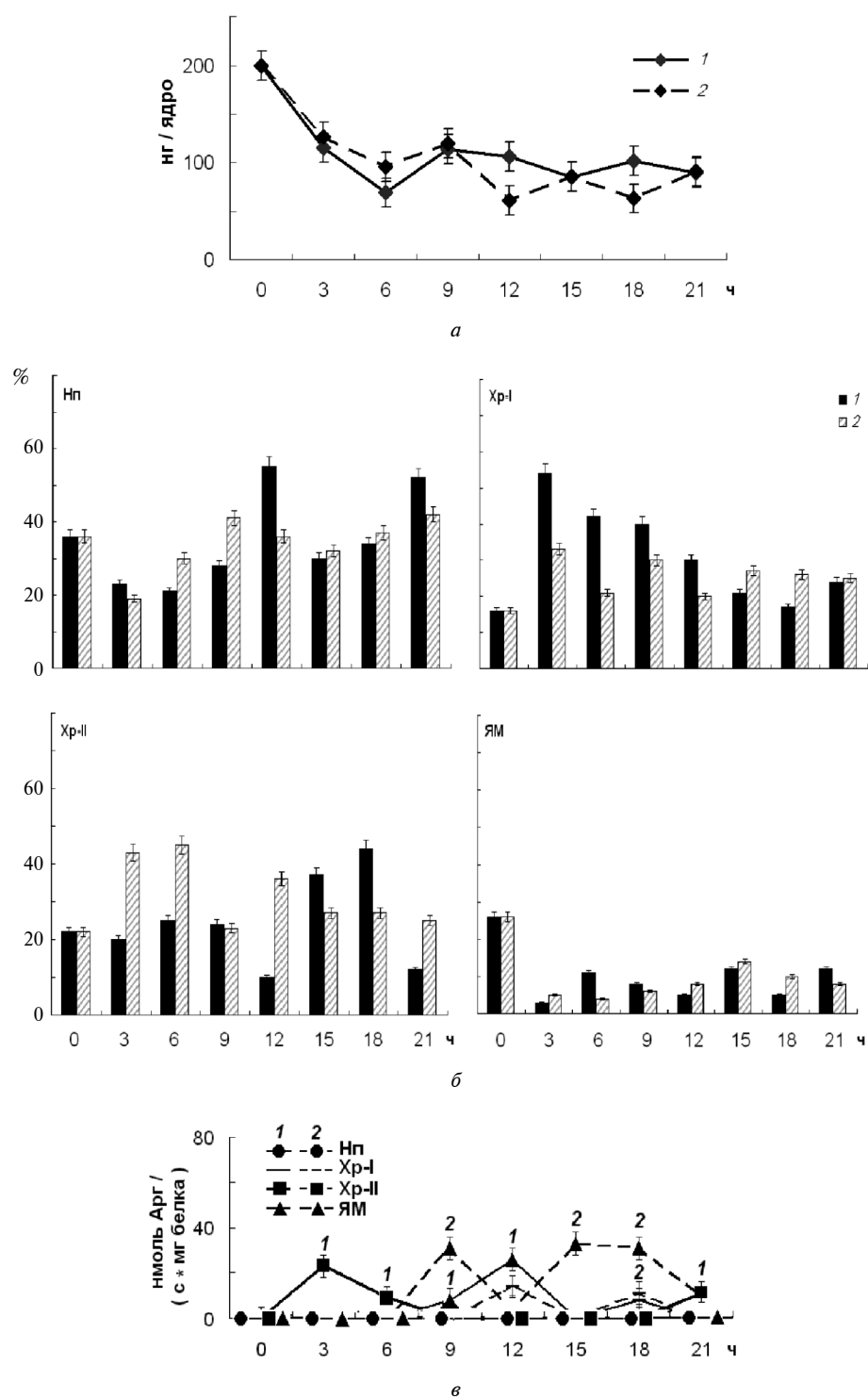


Рис. 2. Для сорта пшеницы Мироновская яровая. Динамика внутриядерного протеома (а), выход белковых компонентов (б) и Арг-Х активность (в) фазы G₁ клеточных ядер зрелых зародышей пшеницы в нормальных условиях (1) и в присутствии ингибитора деацетилирования белков (2):

Нп — нуклеоплазма; Хр-1 — хроматин, непрочно связанный с ЯМ; Хр-II — хроматин, прочно связанный с ЯМ; ЯМ — ядерный матрикс

АНАЛИЗ АРГ-Х ПРОТЕОЛИЗА

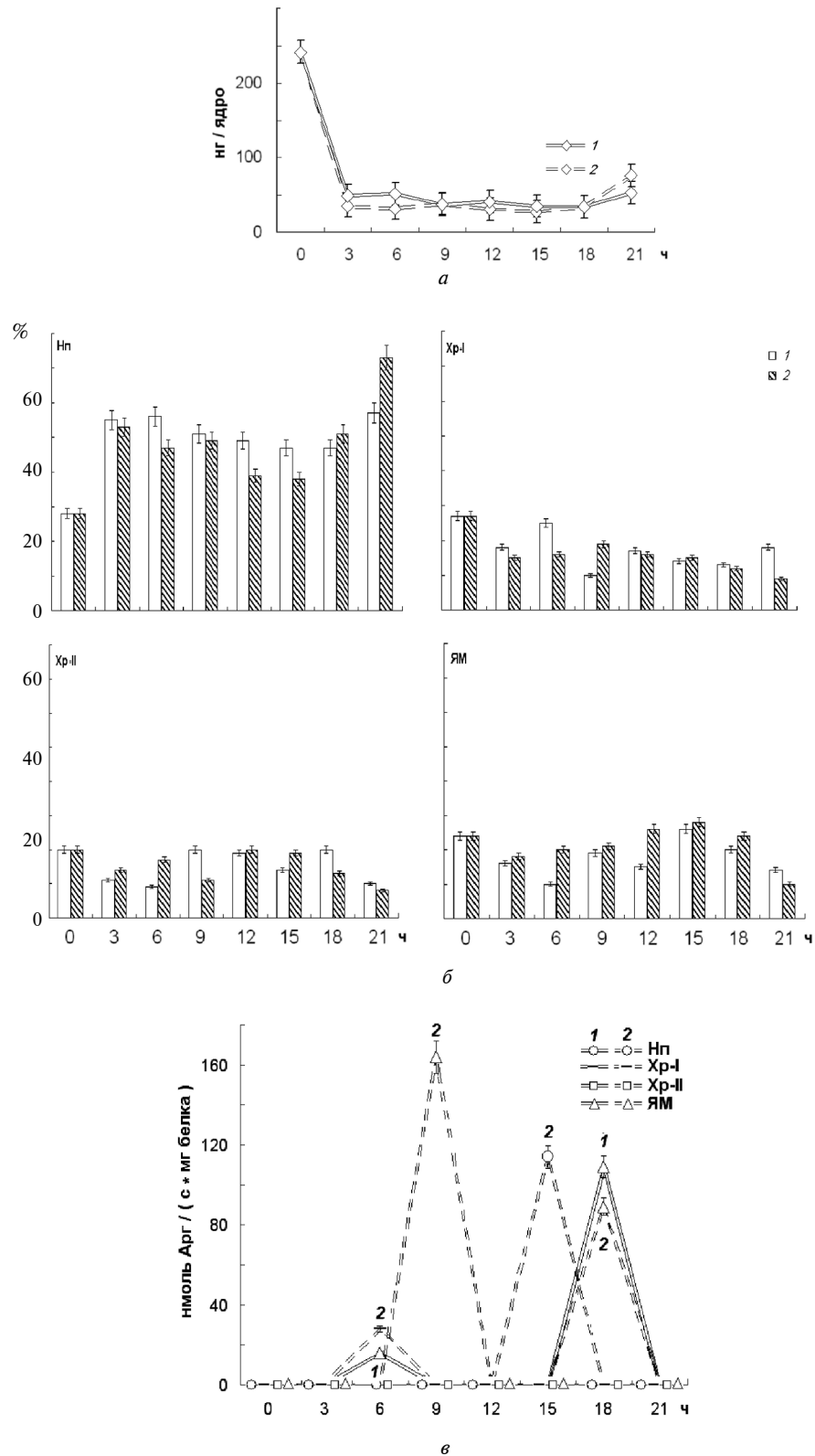


Рис. 3. Для сорта пшеницы Мироновская 808 (озимая). Обозначения те же, что и на рис. 2

шествуются процессы, поддерживающие изменения экспрессии генов в дифференцированных клетках организма, наследуемые митотически. И если такая поддержка сохраняется в ряду клеточных поколений (см. рис. 3, в, 18 ч), то по всей вероятности это может быть результатом сохранения динамики организации упаковки ДНК с помощью эпигенетических механизмов [9]. Что это за эпигенетические механизмы и насколько они связаны с гистоновым кодом мы пока не можем ответить конкретно, так как в эксперименте мы использовали суммарный ядерный белок. Чтобы приблизиться к анализу функционирования гистонового кода, необходимо четко отделить негистоновые белки от гистонов. Как известно, в состав негистоновых белков входит также аргинин, который активно модифицируется [6]. Все это свидетельствует о том, насколько сложен гистоновый код.

Исследованный в данной работе период функционирования клеточного ядра непосредственно связан с процессами набухания семян, оводненностью клеток [1] и активными ростовыми процессами за счет их растяжения в течение G_1 фазы клеточного цикла [3]. Последовательность биохимических реакций функционально связана между собой и регулируется при участии целой иерархии механизмов, запрограммированных в структурной организации хроматина и его неразрывной связи с ядерным матриксом. В процессе инициации ростового морфогенеза зрелых зародышей озимой и яровой пшеницы в присутствии ингибитора деацетилирования белков в течение G_1 фазы клеточного цикла по всей вероятности происходит модификация хроматиновых структур при участии Арг-Х протеолиза, которая наиболее ярко выражена у озимой пшеницы сорта Мироновская 808. Возможно, эта модификация внутриядерных структур отражает высокую пластичность данной культуры [11].

1. *Аветисов Л.В., Шапошников Я.Д., Кадыков В.А.* Изменение ультраструктуры ядер клеток апекса побега пшеницы в процессе прорастания // *Онтогенез.* — 1988. — **19**, № 2. — С. 181—190.
2. *Вавилов Н.И.* Избранные труды. — М.; Л.: Наука, 1965. — Т. 5. — С. 312—313.
3. *Вафина Г.Х.* Анализ протеолитической активности в ядерных фракциях при прорастании семян пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Санкт-Петербург, 1998. — 22 с.
4. *Збарский И.Б.* Организация клеточного ядра. — М.: Медицина, 1988. — С. 58.
5. *Иванова Э.А.* Модификация гистонов у растений и ее физиологическое значение: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1977. — 21 с.
6. *Иванова Э.А., Ахметов Р.Р.* Модификация негистоновых белков в проростках растений // *Физиология растений.* — 1987. — **34**, № 3. — С. 507—512.
7. *Иванова Э.А., Вафина Г.Х.* Анализ надмолекулярных структур клеточного ядра при активации хроматина // *Докл. РАН* — 2006. — **406**, № 3. — С. 419—421.
8. *Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С.* Внутриядерные надмолекулярные механизмы индукции ростового морфогенеза зрелых зародышей озимой и яровой пшениц // *Там же.* — 2007. — **417**, № 4. — С. 563—565.
9. *Разин С.В.* Пространственная организация эукариотического генома и работа эпигенетических механизмов // *Генетика.* — 2006. — **42**, № 12. — С. 1605—1614.
10. *Разин С.В.* Хроматин и регуляция транскрипции // *Молекул. биология.* — 2007. — **41**, № 3. — С. 387—394.
11. *Ремесло В.Н., Коломацкий А.В.* Династия Мироновских пшениц // *Наука и человечество.* — М.: Знание, 1980. — С. 112, 115—116.
12. *А.с. 1701747 А1 СССР, МКИ С 12 N 9/50.* Способ выделения растительных клеточных ядер / Э.А. Иванова, Г.Х. Вафина. — Оpubл. 01.09.91, Бюл. № 48.
13. *А.с. 1733471 А1 СССР, МКИ С 12 N 9/50.* Способ получения ядерных фракций, обладающих протеиназной и ингибирующей активностью / Э.А. Иванова, Г.Х. Вафина. — Оpubл. 15.01.92, Бюл. № 18.

14. *Mu Ch., Liu H., Zheng G.-Ch.* Модификации и варианты гистонов: их роль в организации хроматина // Молекул. биология. — 2007. — **41**, № 3. — С. 395—407.

Получено 12.03.2008

АНАЛІЗ Арг-Х ПРОТЕОЛІЗУ У ПРОСТОРОВІЙ РЕОРГАНІЗАЦІЇ ХРОМАТИНУ ПІД ВПЛИВОМ ІНГІБІТОРУ ДЕАЦЕТИЛЮВАННЯ БІЛКІВ ЗА ІНДУКЦІЇ РОСТОВИХ ПРОЦЕСІВ ЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ ОЗИМОЇ ТА ЯРОЇ ПШЕНИЦІ

Е.О. Іванова, Г.Х. Вафіна, Р.С. Іванов

Інститут біології Уфимського наукового центру Російської академії наук, Уфа

Описано особливості динаміки вмісту білкових компонентів, Арг-Х протеолізу на різних рівнях просторово-часової організації інтерфазного хроматину під час проростання зрілих зародків озимої та ярої пшениці за наявності інгібітору деацетилювання білків. Обговорено участь Арг-Х протеолізу в епігенетичних механізмах.

ANALYSIS OF Arg-X PROTEOLYSIS IN THE SPATIAL CHROMATIN REORGANIZATION UNDER THE INFLUENCE OF THE INHIBITOR OF PROTEINS DEACETYLATION AT GROWTH PROCESSES INDUCTION OF WINTER AND SPRING MATURE WHEAT GERMS

E.A. Ivanova, G.H. Vafina, R.S. Ivanov

Institute of Biology of Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Sciences
69 pr. Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia

The peculiarities of the dynamics of the protein components content, Arg-X proteolysis on the different levels of spatial-temporary organization of interphase chromatin at germination of winter and spring mature wheat germs under the presence of the inhibitor of proteins deacetylation are investigated. The role of Arg-X proteolysis in the epigenetic mechanisms is discussed.

Key words: *Triticum aestivum* L., cell nucleus, Arg-X proteolysis, the inhibitor of proteins deacetylation.