

УДК 575.16:576.315.42:577.112'315.42:633.11

АНАЛИЗ АРГ-Х ПРОТЕОЛИЗА В ПРОСТРАНСТВЕННОЙ РЕОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА ПРИ ИНДУКЦИИ РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

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

*Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук
450054 Уфа, просп. Октября, 69
e-mail: evilina@anrb.ru*

Описаны особенности динамики содержания белковых компонентов, Арг-Х протеолиза на разных уровнях пространственно-временной реорганизации интерфазного хроматина фазы G_1 клеточного цикла зародышей при прорастании семян яровой (сорт Артемовка) и последовательно выведенных из нее озимой (сорт Мироновская 808) и яровой (сорт Мироновская яровая) пшеницы в нормальных условиях и при наличии ингибитора деацетилирования белков. Обсуждено участие Арг-Х протеолиза в эпигенетических механизмах.

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

Как известно, в процессе приспособляемости живых организмов к температурным условиям среды происходят изменения на всех уровнях организации — организменном, тканевом, клеточном, молекулярном. С точки зрения молекулярной теории большой интерес представляет гипотеза, выдвинутая Александровым [1], согласно которой макромолекулы белка для реализации присущих им функций должны совершать конформационные переходы. Чтобы они могли осуществить такой переход, пептидная цепь должна обладать некоторой степенью подвижности (гибкости), что определяется внутримолекулярными силами, стабилизирующими структуру высших уровней организации белка. Конформационная подвижность макромолекулы зависит от температуры. При изменении температурных условий силы, стабилизирующие структуру высших порядков организации, изменяются, в результате чего белковые молекулы обретают состояние, необходимое для выживания организма в новых условиях, т.е. происходит адаптация (приспособление), сопровождающееся появлением комплекса морфобиологических особенностей. Биохимическая адаптация, по-видимому, часто является «крайним средством», к которому прибегает организм, когда у него нет других физиологических способов избежать неблагоприятного воздействия среды [11]. Удивительная способность растений приспосабливаться к новым условиям жизни, быть в яровой или в озимой форме и, особенно, значительные биохимические различия этого явления интересовали ученых давно [2]. Современные работы по выяснению молекулярно-генетической основы «яровости» и «озимости» привели к предположению, что различия между ними находятся на уровне регуляции экспрессии генов [8].

Пространственная реорганизация хроматина в ядре при сохранении доступности определенных участков ДНК для регуляторных факторов и ферментов транскрипции способна выполнять важную роль в работе эпигенетических механизмов, которые функционируют на уровне N-концевых аргининовых и лизиновых остатков гистонов, не входящих в состав нуклеосомной глобулы [10]. Таким образом, архитектоника хроматина и его специфических участков как формы эпигенетического контроля онто- и филогенеза эукариот реализуется при прямом участии как гистонов, так и негистоновых белков. Кроме того, по-видимому, одним из эпигенетических механизмов пространственной реорганизации хроматина и перехода определенных его зон в состояние готовности к транскрипции является ацетилирование нуклеосомных гистонов. Уже в первых работах было обнаружено, что это процесс быстрый и обратимый [7], но лишь недавно стало ясно, как много ферментов принимает участие в реорганизации хроматина. Мы считаем, что хроматин клеточных ядер представляет собой систему, способную обеспечить возможность выборочной реализации информации при изменении условий внешней среды. Установлено, что структура хроматина и состояние его белков зависят не только от стадии развития организма, но и от изменения ионных параметров пренуклеарного пространства клеточного ядра [9]. Это значит, что возможна ионная регуляция конфигурации хроматина, способная отражать адаптацию организма к среде его обитания.

Целью данной работы было исследование локализации Арг-Х чувствительных зон протеолиза (релаксации) в надмолекулярных структурах клеточных ядер как одного из молекулярно-генетических механизмов пространственно-временной реорганизации хроматина в нормальных условиях и при гиперацетилированном состоянии протеома ярового и выведенных из него последовательно озимого и вновь ярового сортов пшеницы.

Методика

Объектом исследования служили элитные семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Артемовка (яровая), а также выведенного из нее сорта Мироновская 808 (озимая) и выведенного из последнего сорта Мироновская яровая (коллекция семян Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова). В контрольном варианте семена проращивали на воде, в опытном — при наличии 0,004 мМ бутирата натрия (NaB). В определенные интервалы времени — 0 ч (воздушно-сухое семя) и через 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 ч от начала замачивания семян выделяли клеточные ядра и их надмолекулярные структуры: нуклеоплазму (Нп), непрочный (Хр-I) и прочный (Хр-II) связанный с ядерным матриксом (ЯМ) хроматин, а также ЯМ по способу, подробно описанному в работах [5, 6]. Количество белка в ядрах и ядерных фракциях определяли по методу Бредфорда в нашей модификации [12]. Арг-Х-активность во всех вышеперечисленных фракциях ядер оценивали по расщеплению Арг-Х-связей в аргининбогатом белке — протамине-Salmine-A-I («Merk»), молекула которого состоит из 33 аминокислотных остатков (22 молекулы Арг; 4 молекулы Сер; 3 молекулы Про; по 2 молекулы Глу и Вал) [12]. Активность протеолиза выражали в наномолях свободного аргинина в секунду на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение

В предыдущих работах [5, 6] представлен один из элементов анализа молекулярно-генетических основ «озимости» и «яровости» на примере пшеницы сорта Мироновская 808 (озимая) и выведенного из нее сорта Мироновская яровая. Согласно полученным результатам, 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. Мы считаем, что удобной моделью для исследования молекулярных основ экологии растений, позволяющей выявить особенности биохимической адаптации на уровне молекулярно-генетических механизмов клеточного ядра, является триада сортов пшеницы: яровая Артемовка, выведенная из нее озимая Мироновская 808 и выведенная из последней Мироновская яровая.

В данной работе представлен экспериментальный анализ динамики внутриядерного протеома яровой пшеницы сорта Артемовка, выведенного из нее озимого сорта Мироновская 808 и из последнего — Мироновская яровая. Процесс рассмотрен с двух позиций: 1) индукция ростовых процессов зрелых зародышей вследствие растяжения клеток в фазе G_1 клеточного цикла; 2) эпигенетические механизмы пространственной реорганизации ядерного генома. Анализ проводили сравнением результатов контрольного варианта опыта (индукция ростового морфогенеза без бутирата натрия) (рис. 1) и с использованием бутирата натрия (рис. 2), который подавляет деацетилирование ядерных белков и приводит к усилению ацетилирования и транскрипции, а также другим эффектам, опосредующим действие ростовых факторов [3]. Как уже указывалось, в аспекте влияния протеома клеточного ядра на пространственно-временную реорганизацию хроматина наше внимание было сфокусировано на участках белков, где находятся протеазочувствительные зоны Арг-Х-связей. Ранее показано [7], что аргинин белков принимает активное участие в процессах, структурирующих упаковку ДНК, т.е. в сократительных процессах, особенно при модификации гуанидиновой группы. Сжатие или растяжение нуклеопротеидных супраструктур клеточного ядра способно экранировать гидрофобные или гидрофильные поверхности белка, участвующие в межмолекулярных взаимодействиях, и тем самым влиять на плотность упаковки ДНК и ее транскрипционную активность.

При описании динамики белкового процессинга на супраструктурном уровне клеточного ядра в пространственно-временном аспекте наблюдается естественная спонтанная интеграция многих молекул (см. рис. 1, б, 2, б). На рис. 1, а, б представлены результаты сравнительного анализа состояния протеома клеточных ядер, покоящихся и индуцированных к росту зародышей семян пшеницы сортов Артемовка (а, 1), Мироновская озимая (а, 2), Мироновская яровая (а, 3) в течение $G_1 \rightarrow S$ фаз клеточного цикла. Показано, что исходный сорт Артемовка (а, 1) в период вступления в фазу S клеточного цикла (18 → 21 ч) содержит значительное количество белка на ядро. Вполне возможно, что это связано с активизацией белоксинтетических процессов, необходимых для формирования вновь образующихся нуклеопротеидных систем ядра. Кроме того, из рис. 1, а (1—3) видно, что в исследованном временном интервале в ядрах клеток зародышей пшеницы, находящихся в фазе G_1 клеточного цикла, при изменении морфогенетических подпрограмм разви-

АНАЛИЗ Arg-X ПРОТЕОЛИЗА

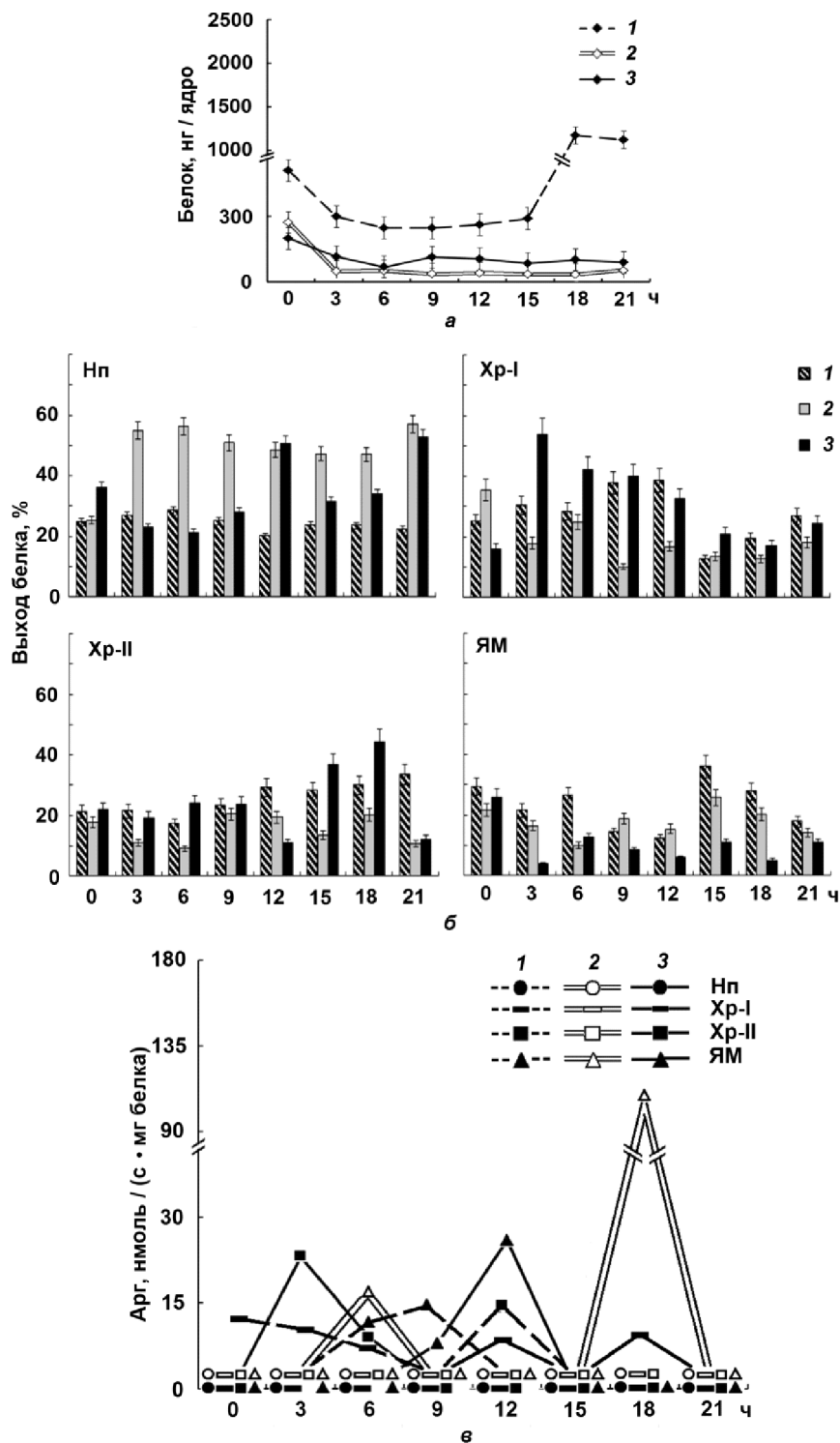


Рис. 1. Индукция ростового морфогенеза (контроль). Здесь и на рис. 2:

a — динамика внутриядерного протеолиза; *б* — выход белка в супраструктурах хроматина (за 100 % принято общее содержание белка, указанное на рис. 1, 2, *a*); *в* — Arg-X-активность фазы G₁ клеточных ядер зрелых зародышей семян пшеницы сортов Артемовка (1), Мироновская 808 озимая (2) и Мироновская яровая (3); Нп — нуклеоплазма; Хр-I — хроматин, непрочно связанный с ЯМ; Хр-II — хроматин, прочно связанный с ЯМ; ЯМ — ядерный матрикс

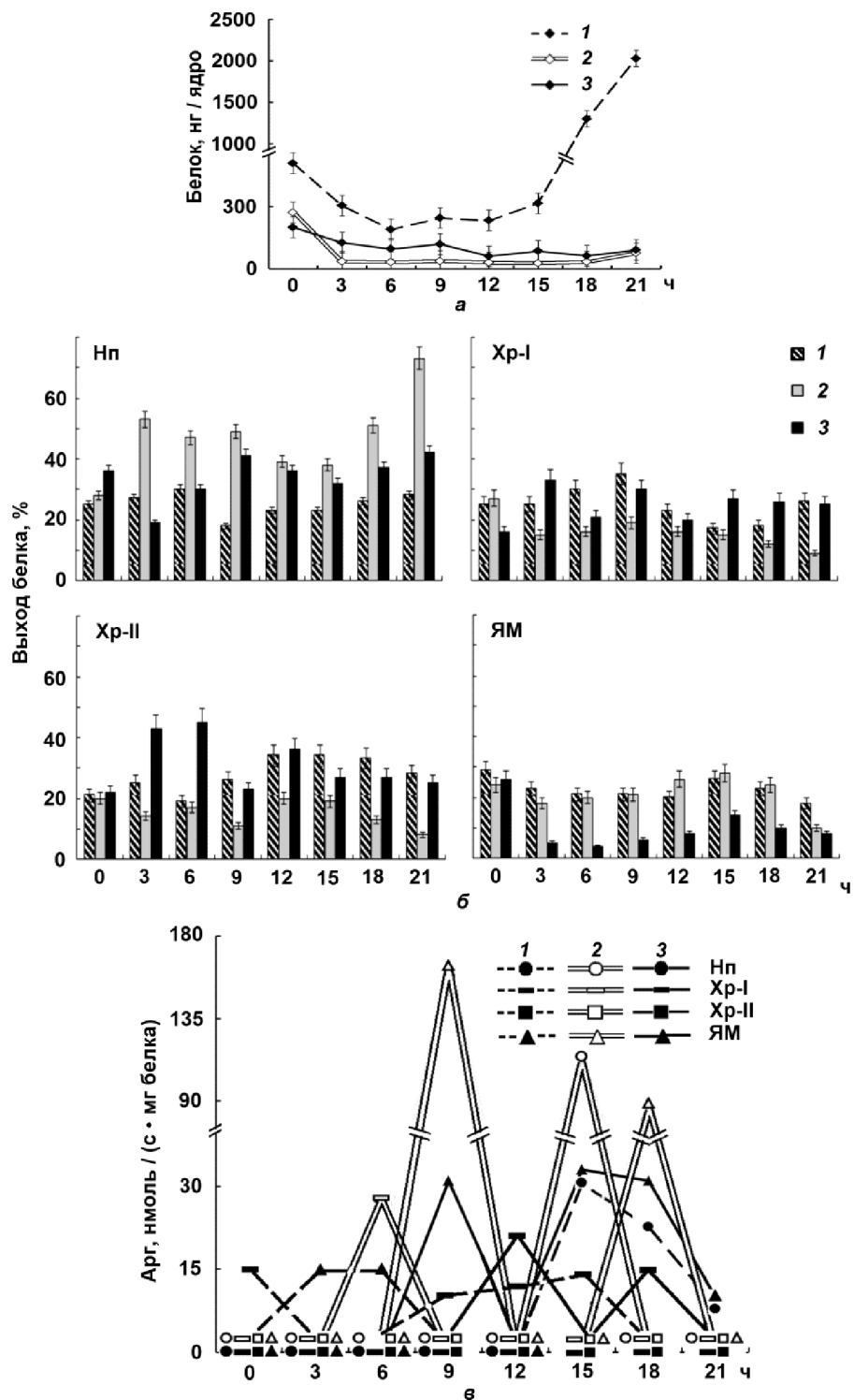


Рис. 2. Индукция ростового морфогенеза в условиях ингибирования деацетилирования белков

тия на озимый тип (а, 2), содержание белка при переходе из фазы G_1 в фазу S клеточного цикла (18 → 21 ч) уменьшается и этот эффект сохра-

няется при переводе озимого сорта Мироновская 808 в Мироновскую яровую (а, 3). В условиях ингибирования деацетилирования белков (см. рис. 2, а; 2, 3) эта тенденция сохраняется, но значительно активизируются белоксинтетические процессы в клеточных ядрах семян сорта Артемовка (см. рис. 2, а, 1; 18 → 21 ч. По-видимому, сорт Артемовка более пластичен, восприимчив к процессу ингибирования деацетилирования белков и отвечает пролонгированием белоксинтетических процессов в фазе S клеточного цикла (см. рис. 2, а, 1; 21 ч).

В период индукции ростового морфогенеза зрелых зародышей (см. рис. 1, б, 2, б; 1—3) содержание белка во внутриядерных супраструктурах резко отличается, особенно на уровне нуклеоплазмы. Отметим, что последняя богата шаперонами, которые участвуют в сборке нуклеосом [14]. Возможно, перевод ярового сорта Артемовка (при воздействии стресса) в озимый — Мироновская 808 сопровождался реорганизацией нуклеосомной сборки в архитектуру хроматина и открытием его определенных зон, необходимых для выживания в новых условиях. В этом случае условия гиперацетилирования ядерного протеома заметно (кроме некоторых временных интервалов) не отразились на количестве белковых компонентов надмолекулярных структур хроматина и ядерного матрикса (см. рис. 1, б, 2, б; Хр-I, Хр-II, ЯМ). Экспериментальные результаты анализа молекулярно-генетических основ онтогенетической адаптации «озимости» и «яровости» на примере пшеницы сорта Мироновская 808 (озимый) и выведенного из него сорта Мироновская яровая подробно представлены в работах [5, 6].

Известно [15], что в структуре нуклеосомы существует «ядро» аргининбогатых гистонов, N-концевые участки которых находятся на поверхности нуклеосомы. По-видимому, с ними связано изменение плотности скручивания ДНК на разных уровнях упаковки хроматина. Вполне возможно, что на разных уровнях интерфазной реорганизации хроматина функционирует Арг-Х-протеолитическая система, являющаяся молекулярной формой биологического контроля и дающая быстрый физиологический ответ на изменяющиеся условия внешней среды. При инициации ростового морфогенеза под влиянием проникновения воды в матриксные структуры зародыша, по-видимому, образуются активированные каналы, по которым начинают интенсивно поступать регуляторные сигналы. Хромосомы совместно с микрофиламентами, микротрубочками рассматриваются как линейные структуры, вдоль которых перемещаются сигналы за счет локальной ассоциации и диссоциации молекул [13]. На боковых цепочках биогетерополимерных структур, погруженных в водную систему, адсорбированную на макромолекулах, протекают метаболические процессы. В результате в пространственно-временном аспекте может изменяться состояние факультативного гетерохроматина.

Анализ локализации Арг-Х-протеазочувствительности в надмолекулярных структурах хроматина (см. рис. 1, в, 2, в) показал, что у яровой, и у озимой пшеницы наблюдается цикличность активности этого фермента, которая имеет свои особенности. В работе [4] мы предположили, что проявление цикличности активности Арг-Х протеолиза может быть связано с этапной компартиментализацией интерфазного хроматина в течение фазы G₁ 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 у сортов пшеницы Артемовка (см. рис. 1, в, 2, в; 1) и Мироновская яровая (см. рис. 1, в, 2, в; 3). Что касается зародышей озимой пшеницы (см. рис. 1, в, 2, в; 2), то протеазочувствительность компартментов клеточного ядра при наличии ингибиторов деацетилирования ядерных белков резко влияет на экранированность определенных участков ядерного матрикса (см. рис. 2, в; 9 ч), нуклеоплазмы (см. рис. 2, в; 15 ч) при сохранении Арг-Х протеолиза на уровне ядерного матрикса в контрольном варианте опыта (см. рис. 1, в, 2, в; 18 ч). Фаза клеточного цикла 18 ч пшеницы интересна тем, что в этот период наблюдаются репликация и синтез ДНК, а для клетки и организма в целом важно сохранить в митозе генетическую память. Если такая память сохраняется в ряду клеточных поколений, то, возможно, на этом уровне структурной организации ДНК работает особый эпигенетический механизм. Что это за механизм и насколько он связан с гистоновым кодом, мы пока не выяснили, так как в нашем эксперименте использован суммарный ядерный белок. Чтобы приблизиться к анализу работы гистонового кода, необходимо четко отделить негистоновые белки от гистонов. Как известно, негистоновые белки также содержат аргинин, к тому же они активно модифицируются [7].

Таким образом, показано, что в процессе инициации ростового морфогенеза зрелых зародышей семян яровой пшеницы сорта Артемовка, выведенного из него сорта Мироновская озимая и вновь выведенного из последнего сорта Мироновская яровая при наличии ингибитора деацетилирования белков в течение фазы G_1 клеточного цикла функционируют механизмы ремоделирования хроматиновых структур с участием Арг-Х протеолиза, которые четко выражены в пространственно-временном ритме у озимой пшеницы сорта Мироновская 808.

1. Александров В.Я. Клетки, макромолекулы и температура. — Л.: Наука, 1975. — 200 с.
2. Вавилов Н.И. Избранные труды. — М.-Л.: Наука, 1965. — Т. 5. — С. 312—313.
3. Збарский И.Б. Организация клеточного ядра. — М.: Медицина, 1988. — С. 58.
4. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Анализ надмолекулярных структур клеточного ядра при активации хроматина // Докл. РАН. — 2006. — **406**, № 3. — С. 419—421.
5. Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С. Анализ Арг-Х протеолиза в пространственной реорганизации хроматина под влиянием ингибитора деацетилирования белков при индукции ростовых процессов зрелых зародышей озимой и яровой пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — **41**, № 1. — С. 28—35.
6. Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С. Особенности динамики содержания белков и Арг-Х протеолиза в пространственной реорганизации хроматина при индукции ростовых процессов в зародышах озимой и яровой пшеницы // Там же. — 2008. — **40**, № 2. — С. 135—141.
7. Иванова Э.А. Модификация гистонов у растений и ее физиологическое значение: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1977. — 20 с.
8. Лобов В.П., Даскалюк А.П. Сравнительное исследование ДНК озимых и яровых форм пшеницы // Докл. АН СССР. — 1984. — **275**, № 1. — С. 218—221.
9. Оловников А.М. Заметки о «принтомерном» механизме клеточной памяти и ионной регуляции конфигураций хроматина // Биохимия. — 1999. — **64**, № 12. — С. 1689—1698.
10. Разин С.В. Хроматин и регуляция транскрипции // Молекул. биология. — 2007. — **41**, № 3. — С. 387—394.
11. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — С. 286.
12. 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.
13. Albrecht-Buelier G. In defense of «nonmolecular» cell biology // Int. Rev. Cytol. — 1990. — **120**. — P. 191—241.

14. *Ellis R.* Molecular chaperones: the plant connection // *Science*. — 1990. — **250**, N 4983. — P. 954—959.
15. *Rill R., Oosterhof D.* The accessibilities of histones in nucleosome cores to an arginine-specific protease // *J. Biol. Chem.* — 1982. — **257**, N 24. — P. 14875—14880.

Получено 06.05.2010

АНАЛІЗ Арг-Х ПРОТЕОЛІЗУ В ПРОСТОРОВІЙ РЕОРГАНІЗАЦІЇ ХРОМАТИНУ ЗА ІНДУКЦІЇ РОСТОВИХ ПРОЦЕСІВ ЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ ПШЕНИЦІ

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

Інститут біології Уфимського наукового центру Російської академії наук

Описано особливості динаміки вмісту білкових компонентів, Арг-Х протеолізу на різних рівнях просторово-часової реорганізації інтерфазного хроматину фази G_1 клітинного циклу зародків за проростання насіння ярої (сорт Артемівка) і послідовно виведених із неї озимої (сорт Миронівська 808) та ярої (сорт Миронівська яра) пшениці за нормальних умов і наявності інгібітора деацетилювання білків. Обговорено участь Арг-Х протеолізу в епігенетичних механізмах.

ANALYSIS OF Arg-X PROTEOLYSIS IN SPATIAL REORGANIZATION OF THE CHROMATIN DURING GROWTH PROCESSES INDUCTION IN MATURE EMBRYOS OF WHEAT

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

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

Peculiarities of the protein components contents, and Arg-X proteolysis dynamics at different levels of spatial-temporal reorganization of interphase chromatin during the phase G_1 of the cell cycle of embryos are described at germination of seeds spring (Artemovka) and consistently transformed from it winter (Mironovskaya 808) and spring (Mironovskaya spring) wheat in the normal conditions and in the presence of a protein deacetylation inhibitor. The participation of Arg-X proteolysis in the epigenetic mechanisms is discussed.

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