

19. Ma Z. Q., M. Roder, M. E. Sorrells. Frequencies and sequence characteristics di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat // Genome.- 1996. - vol. 39. - P. 123-130.

### **Резюме**

Проведенная работа показала эффективность использования метода ISSR-ПЦР для анализа генома сахарной свеклы. Из 34 использованных ISSR праймеров к ди-, три- и тетра-нуклеотидным повторам 19 оказались пригодными к дальнейшему использованию в молекулярно-генетической работе. Наиболее эффективными оказались праймеры с динуклеотидными повторами (AG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> и (TG)<sub>n</sub>.

Проведена робота показала ефективність застосування методу ISSR-ПЛР для аналізу геному буряка цукрового. З 34 використаних ISSR праймерів до ди-, три- та тетра-нуклеотидних повторів 19 виявилися придатними для подальшого використання в молекулярно-генетичній роботі. Найбільш ефективними виявилися праймери з динуклеотидними повторами (AG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> та (TG)<sub>n</sub>.

Present work showed the efficiency of ISSR-PCR method for analysis of sugar beet genome. Among 34 ISSR to di-, tri-, and tetra-nucleotide repeats, applied in present work 19 appeared to be suitable for further molecular genetic investigation. The most effective primers were primers with di- nucleotide repeats (AG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> та (TG)<sub>n</sub>.

**ИВАНОВА Э.А., ВАФИНА Г.Х., ТРОПЫНИНА Т.С., ИВАНОВ Р.С.**

*Институт биологии Уфимского научного центра Российской Академии Наук, Россия, 450053, Уфа, пр. Октября 69, e-mail: evilina@anrb.ru*

### **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ АРГ-Х ПРОТЕОЛИЗА В ПРОТЕОМЕ ГЕНОМА ПРО- И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

Старая догма молекулярной биологии, согласно которой то, что справедливо для кишечной палочки, справедливо и для слона (афоризм Ж. Моно) сейчас подвергается пересмотру [1]. В 1990г вышла статья Гюнтер Альбрехт-Бюлера (Gunter Albrecht-Buehler) [см 2] о том, что цитоплазма клетки высоко структурирована, разделена мембранами и вся пронизана нитями цитоскелета, с этой точки зрения внутриклеточные реакции более адекватно может описывать только надмолекулярная химия иммобилизованных ферментов, где уже интегрированы взаимодействия многих макромолекул. Как известно основой жизни являются линейные гетерополимеры – нуклеиновые кислоты и белки. Многократное сокращение линейных размеров ДНК происходит таким образом, что общая протяженность 2м геномной ДНК средней эукариотической клетки упаковывается в ядре, диаметр которого составляет 8-10мкм, при сохранении доступности определенных участков ДНК для регуляторных факторов и ферментов транскрипции [3]. Что касается бактериальной клетки, то её геном упаковывается в диапазоне 1,1-1,5×2,5-6,0мкм [4]. По мнению С.В. Разина [3] крупномасштабная пространственная организация ДНК в геноме эукариотической клетки играет важную роль в работе эпигенетических механизмов, является достаточно сложной, далеко не случайной и происходит в несколько этапов: накручивание ДНК на нуклеосомы; компактизация нуклеосомной нити с образованием так называемой 30 нм фибриллы; сворачивание 30 нм фибриллы в гигантские петли закрепленные на белковой скелетной структуре ядра – ядерном матриксе. Вся изложенная схема упаковки ДНК в клеточном ядре, как показали экспериментальные данные, не может быть единообразной [5]. Каковы уровни упаковки бактериальной ДНК нам пока мало что известно. В связи с этим

возникает вопрос – в чем заключается особенность транскрипционно-активной фракции хроматина, хромосомы и каким образом транскрипция может регулироваться на уровне хроматиновой, хромосомной фибриллы? К одной из сторон анализа этого вопроса мы решили подойти, исследуя *Arg-X* протеолиз в бактериальной хромосоме и хроматине эукариотической клетки, учитывая, что основные аминокислоты, в частности аргинин, входящий в состав гистонов, (возможно, и гистоноподобных белков нуклеоида бактерии) принимают активное участие в структуризации ДНК. Известно, что протеолитическая система ответственна в эукариотическом организме за целостность отдельной ткани (она тканеспецифична), по-видимому, в бактериальной клетке она ответственна за внутриклеточную сохранность. Кроме того, протеолитическая система филогенетически древнее гормональной или нервной систем, ответственных за функционирование организма в целом. Важным свойством протеолитической системы является также и то, что это форма биологического контроля, дающая быстрый физиологический ответ на изменяющиеся условия внешней среды. Целью данной работы был экспериментальный анализ особенностей *Arg-x* протеолиза в протеоме генома про- и эукариотических клеток в процессе их функционирования.

### **Материалы и методы**

При работе с протеомом из генома прокариотической клетки использовался штамм *E. coli* JC-158 (Hfr PO1, thi1, serA6, lacI22, relA1) [6], любезно предоставленный нашими коллегами И.В. Ступак и Е.Э. Ступак (Институт биологии УНЦ РАН, лаборатория математической и молекулярной генетики). Клетки *E. coli* JC-158 выращивали на богатой питательной среде LB (Лурия-Бертани) [7] до полной логарифмической фазы, собирали центрифугированием и промывали трис-буфером. Первая проба была взята через 50 минут после начала инкубирования. Все клетки, собранные в течение от 50 мин до 430 мин с интервалами в 20 мин, были законсервированы в глицерине по методу [8].

Выделение протеома из генома клеточных ядер пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московской 35 (суперэлита) проводили по методу [9], через каждые 3ч, после замачивания семян в течение 21ч, проводили отделение зародышей от эндосперма, определяли их сырую массу и консервировали при  $-25^{\circ}\text{C}$  в 80-90% глицерине [8]. Клеточные ядра выделяли по способу [8]. Из бактериальных клеток и клеточных ядер пшеницы фракционировали надмолекулярные структуры согласно методу [8] с соответствующим обозначением, представленным ниже. Протеом *E. coli* фракционировали на основе разрыва слабых и сильных взаимодействий надмолекулярных структур с использованием ступенчатого повышения солевого градиента: 0,14 М NaCl; 0,35 М NaCl; 2 М NaCl; 6 М гуанидин – гидрохлорида с 0,004 %  $\beta$  – меркаптоэтанолом на 0,01 М трис – HCl буфере при pH 6,8. Экстракции белков с помощью повышения ионной силы солевых градиентов, приводящих к ослаблению электростатического взаимодействия между белками и адсорбентом, это обычные методы белковой химии для эукариот [9]. Обычно фракция, выходящая при низкой ионной силе 0,14 М NaCl, известна в биохимии клеточного ядра под названием: ядерный сок, нуклеоплазма (Нп) или глобулиновая фракция [10]; остальные фракции известны как соответственно: непрочно (Хр-I) - (0,35 М NaCl), прочносвязанные (Хр-II) - (2 М NaCl) с ядерным матриксом (ЯМ) и собственно ядерный матрикс (6 М гуанидин - гидрохлорида с 0,004 %  $\beta$  – меркаптоэтанолом) [11,12]. Обозначение фракций наше, с учетом выделенных фракций хроматина (Хр-I; Хр-II). По аналогии белковые фракции, выделенные из протеома *E. coli*, можно представить соответственно как: клеточный сок (цитоплазма -Цп), белки непрочно (Бн-I) – и прочносвязанные (Бп-II) с клеточным остатком (КО) и собственно клеточный остаток с жесткой клеточной оболочкой. Для выхода субфракций хроматина и надмолекулярных структур *E. coli* пользовались встряхиванием проб на Micro-shaker

(type 326m; Warszawy) в течение 2-3ч при  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ . Фракции хранили в жидком азоте. Количество белка в надмолекулярных структурах определяли методом Бредфорд в нашей модификации [9]. *Arg-X* активность оценивали по расщеплению *Arg-X* связей в аргининбогатом белке – протамине («Metk») во всех вышеперечисленных фракциях ядер [9]. Протамин- *Salmine-A-I*, его молекула состоит из 33 аминокислот: 22-х молекул *Arg*; 4-х молекул *Ser*; 3-х молекул *Pro*; по 2 молекулы *Gли* и *Вал*. Активность *Arg-X*-протеолиза выражали в нмоль аргинина·с<sup>-1</sup>·мкг белка. Числа и точки на графиках представляют среднеарифметические данные. В данной работе представлено их устное описание.

### Результаты и обсуждение

По мнению [13] главной задачей XXI века является - понять как все компоненты клетки взаимодействуют в пространстве и времени, образуя сложные динамические, биологические системы. Такую задачу ставят перед собой интенсивно развивающиеся в последние годы технологии “in vivo imaging” [13]. Пока мало известно о молекулярной подвижности и внутриклеточной молекулярной динамике при образовании временных составных структур внутри клетки. Требуется наблюдение молекул *in vivo*, чтобы проследить структурные изменения во времени. При надмолекулярном описании динамики компонентов клетки в пространственно-временном аспекте, как сообщалось выше, уже интегрированы взаимодействия многих молекул. Волькенштейн [14] считает, что сложные физико-химические взаимодействия в клетке осуществляются на основе сильных (химических) и слабых (Ван-дерваальсовых, гидрофобных и так далее) взаимодействий. Эти взаимодействия всецело определяются свойствами внешних электронных оболочек молекул. Сейчас растет понимание того, что информация о функциях, возможно заложена не только в геноме, а еще и во взаимодействиях продуктов генома [13]. Мультикомпонентные системы, составленные из множества белков, являются «машинами» со своими собственными, не запрограммированными в ДНК, правилами поведения. В этом отношении для нас представляет интерес аргинин – незаменимая аминокислота, входящая в состав белковых молекул генома эу- и прокариотов. Аргинин входит в состав сократительных белков, большей частью вовлекается в их поверхностный слой. Возможно, последующее сжатие и растяжение, экранирование гидрофобных и гидрофильных поверхностей белков способствует образованию мультикомпонентных систем. Гуанидиновая группа аргинина протонируется, стабилизируется резонансом и представляет собой центр связывания фосфатных, ацетильных групп, а также является удобной мишенью, по которой происходят биоспецифические модификации. К тому же аргининсодержащие пептиды легко иммобилизируются. Все это свидетельствует о полифункциональности белка, в составе которого есть аргинин. Особый интерес представляют белки богатые аргинином в составе хроматина клеточного ядра. Один из них H4 эволюционно консервативен и представлен высококонсервативными последовательностями из коротких пептидов, в которых почти везде присутствует аргинин. Значение этих последовательностей ещё предстоит расшифровать. В данной работе мы анализировали *Arg-X* протеолиз на разных уровнях укладки интерфазного хроматина G<sub>1</sub> фазы клеточного цикла и структурной укладки хромосомы прокариотической клетки в периоды ее активного, замедления и прекращения роста на примере бактериальных клеток *E. coli*. Анализ *Arg-X* протеолиза, на разных уровнях укладки хроматина, при его транскрипционной активации в течение G<sub>1</sub> фазы клеточного цикла зрелых зародышей пшеницы, выявил временные трехэтапные циклы, которые связаны с разворачиванием хроматиновых фибрилл при переходе от G<sub>1</sub> фазы клеточного цикла к S-фазе. В клетках бактерий хромосома уложена в виде компактной структуры, связанной с мембраной. Такой ДНК-мембранный комплекс обеспечивает структурную укладку хромосомы, ее репликацию и сегрегацию [см 15]. Путем

мягкого лизиса клеток бактерий неионными детергентами в присутствии 1 М NaCl выделили бактериальную хромосому — нуклеоид, ассоциированный с мембранным материалом [см 15]. Морфология релаксированного бактериального нуклеоида напоминает морфологию нуклеоида эукариотической клетки за тем исключением, что последний имеет большее количество отходящих от центра петель [см 15]. В нашем эксперименте в экспоненциальной фазе роста, при достаточном количестве питательных веществ в среде, клетки бактерий растут с наивысшей скоростью. Это период от 50 до 170 минут. При постепенном исчерпании необходимых питательных веществ и накоплении продуктов метаболизма скорость бактерий снижается (фаза замедления роста), это период от 170 до 290 минут. Затем рост бактерий останавливается — культура переходит в стационарную фазу, это период от 290 до 410 минут и далее 430 минут. В период активного роста от 50 до 170 минут, мы выявили некоторый этап его замедления (от 110 до 170 минут), этот этап сохраняется (от 170 до 230 минут) в периоде замедления от 170 до 290 минут и затем еще раз сохраняется это замедление (от 230 до 290 минут). В таком последнем замедленном состоянии (от 290 до 350 минут) этот этап сохраняется в периоде остановки роста бактерий от 290 до 410-430 минут. Полностью культура переходит в стационарную фазу от 350 до 410-430 минут. Считают, что при переходе бактерий в стационарную фазу запускается программа дифференциации, приводящая к тому, что клетки становятся метаболически менее активными и более устойчивыми к стрессовым факторам, в них происходят серьезные морфологические и биохимические изменения, повышается резистентность клеток к неблагоприятным воздействиям [16]. Многие функции, индуцируемые при входе культуры в стационарную фазу, активируются в это время, когда клетки растут медленно, при лимитировании питательных веществ [16]. Мы рассмотрели особенности молекулярных *Arg-X* механизмов на примере бактериальных клеток *E. coli*. При переходе клеток в стационарную фазу экспрессия большинства бактериальных генов существенно уменьшается. Однако в этих условиях происходит индукция экспрессии большого количества генов и стимулируется синтез специфических белков, прежде всего тех, которые обеспечивают устойчивость бактерий к различным неблагоприятным условиям [16]. В этот период мы отмечаем высокую непрерывную активность *Arg-X* протеолиза на уровне клеточного остатка или цитоскелета клетки. Понимание механизмов регуляции экспрессии соответствующих генов чрезвычайно важно для биотехнологии. В этом плане еще предстоит большая работа.

#### **Выводы**

В протеоме генома эукариотической клетки система *Arg-X* протеолиза функционирует циклически при транскрипционной активации хроматина на разных уровнях укладки ДНК в течение  $G_1$  фазы клеточного цикла. В протеоме генома бактериальных клеток система *Arg-X* протеолиза активно функционирует в стационарной фазе роста бактерий.

#### **Литература**

1. Киселев Л.Л. Терминация белкового синтеза у эукариот и прокариот существенно различается // Молекулярная биология. -1999.-Т.33, №6.- С.1054-1062.
2. Марголис Л.Б. Почему мы не понимаем живую клетку, или Мифы молекулярной биологии // Природа. -1991, №3. –С.97-100.
3. Разин С.В. Пространственная организация эукариотического генома и работа эпигенетических механизмов // Генетика. -2006.-Т.42, №12. С.1605-1614.

4. Определитель бактерий Берджи /Под. ред. Дж.Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж.Стейли, С.Уилльямса.-М.:Мир.-1997. –Т.1.-С.185.
5. *Разин С.В.* Хроматин и регуляция транскрипции // Молекулярная биология. - 2007.-Т.41, №3.-С.387-394.
6. *Murphy D.B., Pembroke J.T.* Transfer of the IncJ plasmid R391 to recombination deficient *E.coli* K12: evidence that R391 behaves as a conjugal transposon // FEMS Microbiology Letters. -1995. -vol.134. - P.153-158.
7. *Маниатис Т.,Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - М.:Мир. -1984.-С.84.
8. *Иванова Э.А., Вафина Г.Х.* Способ выделения растительных клеточных ядер // Пат. РФ №1701747.-Бюл.изобр. -1991. №48.
9. *Иванова Э.А., Вафина Г.Х.* Способ получения ядерных фракций, обладающих протеиназной и ингибирующей активностью // Пат. РФ №1733471.-Бюл.изобр. - 1992. №18.
10. *Збарский И.Б.* Организация клеточного ядра. –М.: Медицина. -1988. –С.24.
11. *Збарский И.Б., Кузьмина С.Н.* Скелетные структуры клеточного ядра. –М.: Наука. -1991. -С.30-39.
12. *Караванов А.А., Афанасьев Б.Н.* Негистоновые белки хроматина // Молекулярная биология. -1983.-Т.47, №2.-С.213-233.
13. *Свердлов Е.Д.* Биологический редуccionизм уходит? Что дальше? // Вестник РАН. -2006. -Т.76, №8. –С.707-721.
14. *Волькенштейн М.В.* Биополимеры и эволюция // Молекулярная биология. -1985.- Т.19, №1.-С.55-66.
15. *Газиев А.И., Фоменко Л.А., Закржевская Д.Т., Сигаева В.А.* Прочно связанные с ДНК белки в составе нуклеоида *E.coli* // Биохимия. -1985.-Т.50, №5.-С.814-819.
16. *Хмель И.А.* Регуляция экспрессии бактериальных генов в отсутствие активного роста клеток // Генетика. -2005.-Т.41, №9.-С.1183-1202.

#### **Резюме**

Показано, что молекулярный механизм *Arg-X* протеолиза функционирует в протеоме генома эу-, так и прокариотов.

Molecular mechanism of *Arg-X* proteolysis acts in the proteom of genome as eu- as prokaryotes is shown.

**КАМЫШ Н.А., МИХАЙЛОВА М.Е., ВОЛЧОК Н.М., БЕЛАЯ Е.В.**

*ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,  
Республика Беларусь, 220027, г. Минск, ул. Академическая, 27,  
e-mail: L.Belaya@igc.bas-net.by*

#### **ДНК-ТИПИРОВАНИЕ БЕЛОРУССКИХ ПОПУЛЯЦИЙ СВИНЕЙ ПО ГЕНУ *h-FABP*, ДЕТЕРМИНИРУЮЩЕМУ СОДЕРЖАНИЕ ВНУТРИМЫШЕЧНОГО ЖИРА**

С развитием молекулярной генетики становится возможным идентификация генов, напрямую или косвенно связанных с хозяйственно-полезными признаками. Выявление предпочтительных с точки зрения селекции вариантов таких генов (маркер-сопутствующая селекция) позволяет наряду с традиционным отбором животных, например, по толщине шпика, приросту живой массы и т.п., проводить селекцию непосредственно на уровне ДНК, т.е. по генотипу. В настоящее время известен спектр генов-кандидатов, полиморфные варианты которых оказывают прямое или косвенное