

**О ВОЗМОЖНОСТИ УЧАСТИЯ АРГ-Х ПРОТЕАЗОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
В ПРОСТРАНСТВЕННОЙ РЕОРГАНИЗАЦИИ СУПРАСТРУКТУР ХРОМАТИ-
НА КАК ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКТОРА
МЕХАНИЗМА АДАПТАЦИИ И УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ**

© 2011 Р.С. Иванов, Г.Х. Вафина, Э.А. Иванова

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 04.04.2011

Описаны особенности динамики содержания белковых компонентов, Арг-Х протеолиза на разных уровнях пространственно-временной реорганизации интерфазного хроматина G₁-фазы клеточного цикла зародышей при прорастании семян яровой (Артемовки) и последовательно выведенных из неё озимой (Мироновской 808) и яровой (Мироновской яровой) пшеницы в нормальных условиях и 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.

Как известно в процессе приспособляемости живых организмов к температурным условиям среды происходят изменения на всех уровнях организации – организменном, тканевом, клеточном и молекулярном. Большой интерес с молекулярной точки зрения представляет гипотеза, выдвинутая В.Я. Александровым [1], согласно которой макромолекулы белка для осуществления присущих им функций должны совершать конфигурационные переходы. Для того чтобы макромолекула белка могла осуществить конфигурационный переход, пептидная цепь должна обладать определенной степенью подвижности (гибкости), что определяется внутримолекулярными силами, стабилизирующими структуру высших уровней организации белка. Конфигурационная подвижность макромолекулы зависит от температуры. В новых температурных условиях происходит изменение сил, стабилизирующих структуры высших порядков организации, в результате этого белковые молекулы обретают то состояние, которое необходимо для выживания в новых условиях. Т.е. происходит адаптация (приспособление) – комплекс морфофизиологических особенностей. Биохимическая адаптация часто является, по-видимому, «крайним средством», к которому организм прибегает тогда, когда у него нет других физиологических способов избежать неблагоприятного воздействия среды [11]. Удивительная пластичность растений приспособляться к новому образу жизни, быть то в яровой, то в озимой форме и особенно «крупные биохимические различия» этого явления интересовала 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], то есть при сохранении нормального фенотипа без изменений последовательностей ДНК. 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 работают на уровне N-концевых аргининовых и лизиновых остатков гистонов, не входящих в состав нуклеосомной глобулы [10]. Таким образом, архитектура 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 переход определенных его зон в состояние активности к транскрипции является ацетилирование нуклеосомных гистонов. Уже в ранних работах было обнаружено, что это процесс быстрый и обратимый [4], 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 выбора части информации, которая реализуется в признаки при изменяющихся условиях 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], а это значит, что имеется возможность ионной регуляции конфигураций хроматина, способной 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 гиперацилированном состоянии протеома ярового и выведенных последова-

Иванов Руслан Сергеевич, канд. биол. наук; *Вафина Гюльнар Хамидовна*, канд. биол. наук; *Иванова Эвилина Александровна*, докт. биол. наук, e-mail: evilina@anrb.ru

тельно из него озимого и вновь ярового сортов пшениц.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили элитные семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сортов Артемовка (яровая), а также выведенной из неё сорта Мироновской 808 (озимая) и вновь выведенной из последней Мироновской яровой (коллекция семян ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова). Проращивание семян в контрольном варианте опыта, в присутствии - 0,004 мМ бутират натрия (NaB) с последующим (в определённые интервалы времени - 0ч (воздушно-сухое семя) и от начала замачивания семян (3ч, 6ч, 9ч, 12ч, 15ч, 18ч, 21ч), выделением клеточных ядер и их надмолекулярных структур: нуклеоплазмы (Нп), хроматина непрочно- (Хр-I) и прочно- (Хр-II) связанного с ядерным матриксом (ЯМ), а также ЯМ проводили по способу, подробно описанному в работах [6, 7]. Количество белка в ядрах и ядерных фракциях определяли методом Бредфорд в нашей модификации [12]. Арг-Х активность оценивали по расщеплению Арг-Х связей в аргининбогатом белке – протамине- *Salmine-A-I* («Merk») (молекула которого состоит из 33 аминокислот: 22-х молекул Арг; 4-х молекул Сер; 3-х молекул Про; по 2 молекулы Глу и Вал) во всех вышеперечисленных фракциях ядер [12]. Активность протеолиза выражали в нмоль аргинина·с⁻¹·мг⁻¹ белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущих работах [6, 7] был представлен один из элементов анализа молекулярно-генетических основ озимости и яровости на примере сортов пшениц Мироновской 808 (озимой) и выведенной из неё Мироновской яровой. Эти данные показали, что молекулярные механизмы перепрограммирования процессов роста и развития находятся на уровне слабых химических взаимодействий компартментов клеточного ядра и ядерного матрикса, ответственного за сборку мультиферментативных комплексов репликации и транскрипции. Мы считаем, что удобной моделью для исследования молекулярных основ экологии растений, позволяющей выявить некоторые особенности биохимической адаптации на уровне молекулярно-генетических механизмов клеточного ядра, является триада сортов пшениц: яровая Артемовка, выведенная из неё озимая Мироновская 808 и выведенная из последней вновь Мироновская яровая.

В данной работе представлен экспериментальный анализ динамики внутриядерного протеома яровой пшеницы Артемовки и выведенного из неё озимого сорта Мироновской 808 и вновь из последнего – Мироновской яровой. Этот процесс рассмотрен с двух позиций: 1) индукции ростовых процессов зрелых зародышей за счет растяжения клеток на стадии G₁ фазы клеточного цикла; 2) эпигенетических механизмов пространственной реор-

ганизации ядерного генома. Изложенные выше два аспекта экспериментального анализа проводили сравнением контрольного варианта опыта (индукция ростового морфогенеза без бутирата натрия) (рис. 1) и при использовании бутирата натрия (рис. 2), который подавляет деацетилирование ядерных белков и приводит к усилению ацетилирования и транскрипции, а также другим эффектам, опосредствующим действие ростовых факторов [3].

Как было сказано выше, в аспекте влияния протеома клеточного ядра на пространственно-временную реорганизацию хроматина наше внимание было сфокусировано на участки белков, где находятся протеазо-чувствительные зоны Арг-Х связей. Ранее было показано [4], что аргинин в составе белков активно участвует в процессах структурирующих упаковку ДНК, то есть участвует в сократительных процессах, особенно при модификации гуанидиновой группы. Сжатие или растяжение нуклеопротеидных супраструктур клеточного ядра способно экранировать гидро-фобные или гидрофильные поверхности белка для межмолекулярных взаимодействий и тем самым влиять на плотность упаковки ДНК и ее транскрипционную активность. Такое воззрение на проблему реализации молекулярных основ морфогенетических подпрограмм развития и связанных с ними эпигенетических механизмов, по нашему мнению формирует рассмотрение этого сложного вопроса с одной стороны: анализа процессов на электронном уровне; с другой – на биогетерополимерном или супраструктурном. При описании динамики белкового процессинга на супраструктурном уровне клеточного ядра в пространственно-временном аспекте уже имеет место естественная спонтанная интеграция многих молекул (рис. 1б, 2б). На рис. 1 (а, б) представлен сравнительный анализ состояния протеома клеточных ядер покоящихся и индуцированных к росту зародышей (Артемовки (а, 1), Мироновской озимой (а, 2) и Мироновской яровой (а, 3)) в течение G₁ → S фазы клеточного цикла. Показано, что исходный сорт – Артемовка (а, 1) в период вступления в S фазу клеточного цикла (18→21ч) содержит значительное количество белка на ядро.

Вполне возможно, что это связано с активацией белок-синтетических 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 G₁ фазе клеточного цикла, при изменении морфогенетических подпрограмм развития, вызванных холодным стрессом (а, 2), происходит уменьшение содержания белка при переходе G₁ фазы в S фазу клеточного цикла (18→21ч), которое сохраняется при переводе озимой формы в Мироновскую яровую (а, 3). В условиях ингибирования деацетилирования белков (рис. 2, а-2; а-3) эта тенденция сохраняется, но значительно активируются белок-синтетические процессы в клеточных ядрах

Артемовки (рис. 2, а-1; 18→21ч). По-видимому, сорт Артемовка (рис. 2, а-1) более пластичен, восприимчив к процессу ингибирования деацетилирования белков и отвечает пролонгированием белок-синтетических процессов в S-фазе клеточного цикла (рис. 2, а-1; 21ч).

На рис. 1б, 2б также показано, что в период индукции ростового морфогенеза зрелых зародышей (рис. 1б, 2б; 1-3) наблюдаются резкие отличия в содержании белка во внутриядерных супраструктурах. Особенно наглядно это происходит на уровне нуклеоплазмы, отметим, что она богата шаперонами, которые участвуют в сборке нуклеосом [14].

Возможно, перевод ярового сорта Артемовки (при воздействии условий стресса) в озимый – Мироновскую 808 сопровождается реорганизацией нуклеосомной сборки в архитектуру хроматина и открытию его определенных зон, необходимых для выживания в этих условиях. В этом случае условия гипер-ацетилирования ядерного протеома заметно (кроме некоторых временных интервалов) не отразились на выходе белковых компонентов надмолекулярных структур хроматина и ядерного матрикса (рис. 1б, 2б; Хр-I, Хр-II, ЯМ).

Что касается анализа молекулярно-генетических основ онтогенетической адаптации озимости и яровости на примере Мироновской 808 (озимой) и выведенной из неё Мироновской яровой пшеницы, то эти экспериментальные данные подробно представлены в работах [6, 7].

Известно [15], что в структуре нуклеосомы существует «ядро» аргининбогатых гистонов, N-концевые участки которых находятся на поверхности нуклеосомы, по-видимому, они участвуют в изменении плотности скручивания ДНК на разных уровнях упаковки хроматина. Вполне возможно, 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 поступления в матриксные структуры зародыша воды, по-видимому, образуются активированные каналы, по которым начинают активно функционировать регуляторные сигналы.

Следует отметить, что хромосомы совместно с микрофиламентами, микротрубочками рассматриваются как линейные структуры, вдоль которых передвигаются сигналы за счет локальной ассоциации и диссоциации молекул [13].

По боковым цепочкам биогетерополимерных структур, погруженных в водную систему адсорбированную на макромолекулах, сосредоточены метаболические процессы. В результате этого процесса в пространственно-временном аспекте может изменяться состояние факультативного гетерохроматина.

Анализ локализации Арг-Х протеазочувствительности в надмолекулярных структурах хроматина (рис. 1в, 2в) показал, что как у яровой, так и у озимой пшеницы наблюдается цикличность активности этого фермента, которая имеет свои особенности.

Ранее в работе [5] мы предположили, что проявление цикличности активности Арг-Х протеолиза может быть связано с этапной компартиментализацией интерфазного хроматина в течение G₁ фазы клеточного цикла.

В экспериментальных условиях, представленных в данной работе (рис. 1в, 2в), мы не обнаружили ярко выраженных различий в проявлении активности Арг-Х протеолиза при использовании ингибиторов деацетилирования ядерных белков у Артемовки (рис. 1в, 2в; 1) и Мироновской яровой пшеницы (рис. 1в, 2в; 3).

Что касается зародышей озимой пшеницы (рис. 1в, 2в; 2), то протеазочувствительность компартиментов клеточного ядра в присутствии ингибиторов деацетилирования ядерных белков резко влияет на экранированность определенных участков ядерного матрикса (рис. 2в; 9ч), нуклеоплазмы (рис. 2в; 15ч), при сохранении Арг-Х протеолиза на уровне ядерного матрикса в контрольном варианте опыта (рис. 1в, 2в; 18ч).

18ч фаза клеточного цикла у пшеницы интересна тем, что в этот временной период наблюдается репликация и синтез ДНК, а для клетки, и организма в целом, важно сохранить в митозе её генетическую память. И если такая память сохраняется в ряду клеточных поколений, то, возможно, на этом уровне структурной организации ДНК работает особый эпигенетический механизм.

Что это за эпигенетический механизм и насколько он связан с гистоновым кодом, мы пока не можем ответить конкретно, так как в нашем эксперименте использовался суммарный ядерный белок. Чтобы приблизиться к анализу работы гистонового кода, необходимо четко отделить негистоновые белки от гистонов. Как известно, негистоновые белки в своем составе также имеют аргинин, к тому же они активно модифицируются [4]. Эти данные показывают, насколько сложен гистоновый код.

Таким образом, в представленной работе показано, что в процессе инициации ростового морфогенеза зрелых зародышей яровой Артемовки и выведенной из неё Мироновской озимой и вновь выведенной из последней Мироновской яровой пшеницы, в присутствии ингибитора деацетилирования белков, в течение G₁ фазы клеточного цикла, функционируют механизмы ремоделирования хроматиновых структур при участии Арг-Х протеолиза, которые ярко выражены в пространственно-временном ритме у озимой пшеницы Мироновской 808.

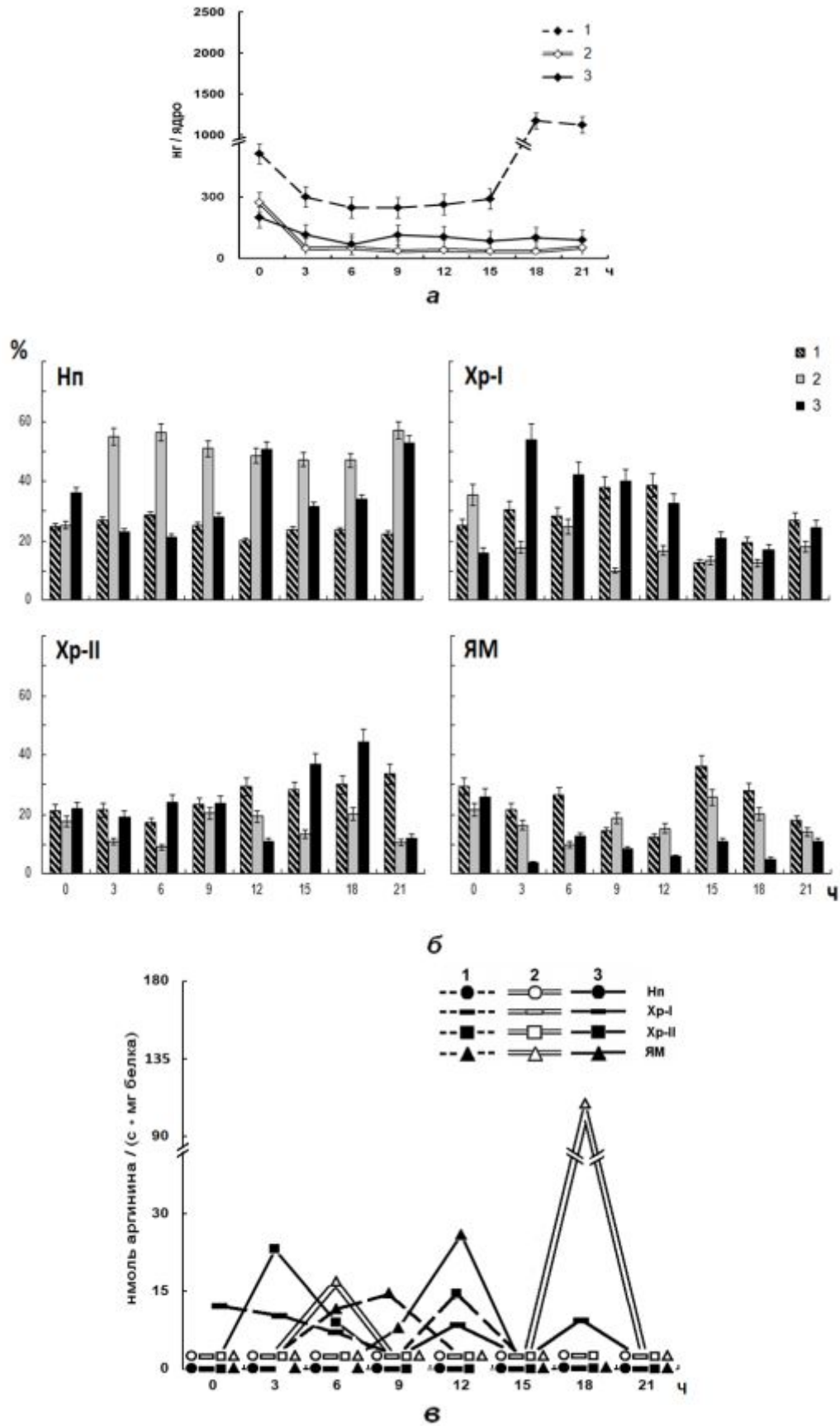


Рис. 1. Динамика внутриядерного протеома (а), выход белковых компонентов (б) и Арг-Х активность (в) фазы G₁ клеточных ядер зрелых зародышей пшениц сортов Артемовка (1), Мироновская 808 озимая (2) и Мироновская яровая (3) в нормальных условиях; Нп – нуклеоплазма, Хр-I – хроматин непрочносвязанный с ЯМ, Хр-II – хроматин прочносвязанный с ЯМ, ЯМ – ядерный матрикс.

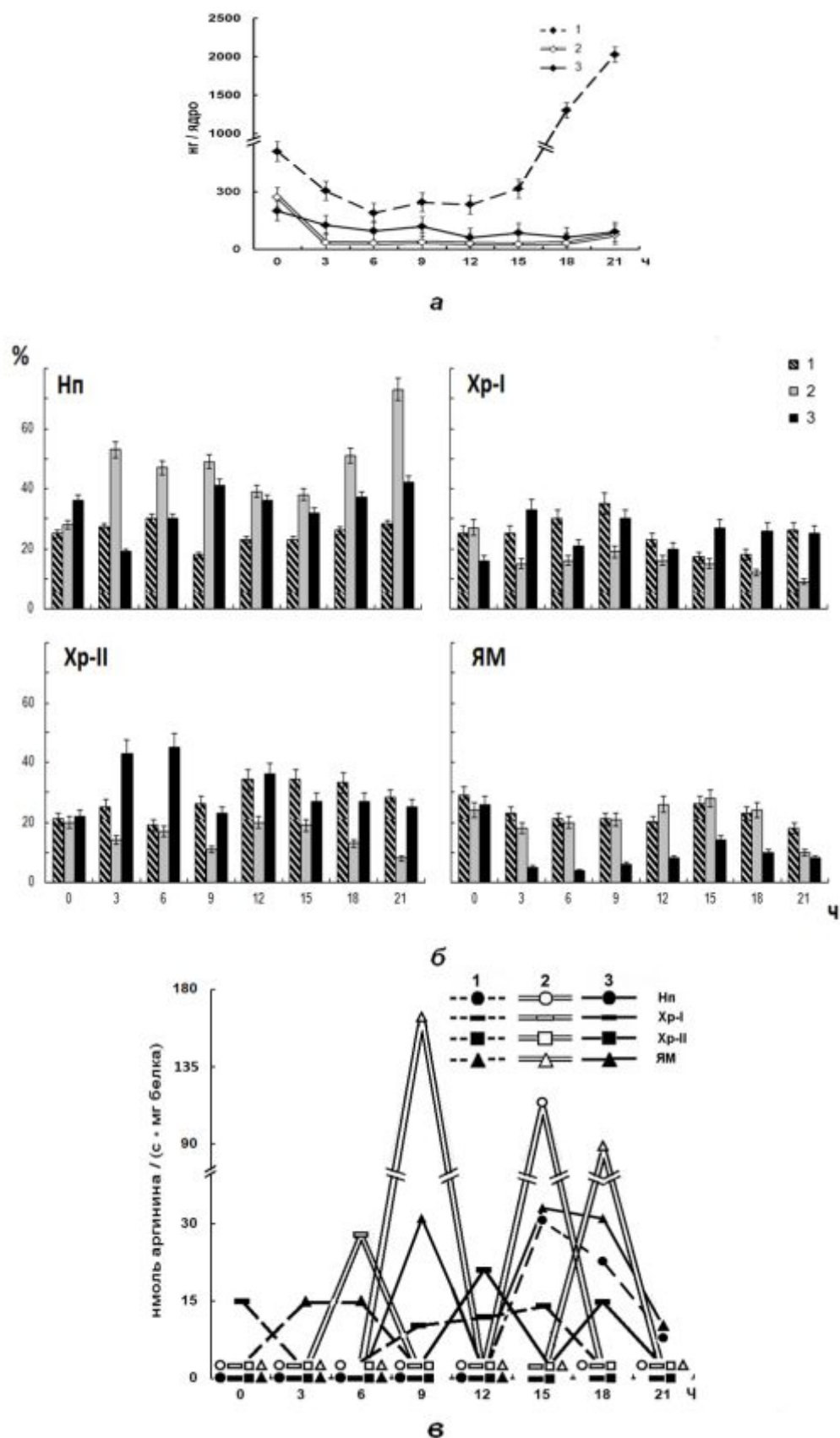


Рис. 2. Динамика внутриядерного протеома (а), выход белковых компонентов (б) и Арг-Х активность (в) фазы G₁ клеточных ядер зрелых зародышей пшениц сортов Артемовка (1), Мироновская 808 озимая (2) и Мироновская яровая (3) в условиях ингибирования деацетилирования белков; Нп – нуклеоплазма, Хр-I – хроматин непрочносвязанный с ЯМ, Хр-II – хроматин прочносвязанный с ЯМ, ЯМ – ядерный матрикс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров В.Я. Клетки, макромолекулы и температура. Л.: Наука, 1975. 200 с.
2. Вавилов Н.И. Избранные труды. Т. 5. М.-Л.: Наука, 1965. С. 312-313.
3. Збарский И.Б. Организация клеточного ядра. М.: Медицина, 1988. С. 58.
4. Иванова Э.А. Модификация гистонов у растений и ее физиологическое значение: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1977. 20 с.
5. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Анализ надмолекулярных структур клеточного ядра при активации хроматина // Доклады Академии наук. 2006. Т. 406. № 3. С. 419-421.
6. Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С. Особенности динамики содержания белков и Arg-X протеолиза в пространственной реорганизации хроматина при индукции ростовых процессов в зародышах озимой и яровой пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений. 2008. Т. 40. № 2. С. 135-141.
7. Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С. Анализ Arg-X протеолиза в пространственной реорганизации хроматина под влиянием ингибитора деацетилирования белков при индукции ростовых процессов зрелых зародышей озимой и яровой пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. № 1. С. 38-35.
8. Лобов В.П., Даскалюк А.П. Сравнительное исследование ДНК озимых и яровых форм пшеницы // Доклады Академии наук СССР. 1984. Т. 275. № 1. С. 218-221.
9. Оловников А.М. Заметки о «принтомерном» механизме клеточной памяти и ионной регуляции конфигураций хроматина // Биохимия. 1999. Т. 64. № 12. С. 1689-1698.
10. Разин С.В. Хроматин и регуляция транскрипции // Молекулярная биология. 2007. Т. 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. Опубл. 15.01.92, Бюл. № 18.
13. Albrecht-Buelier G. // Int. Rev. of Cytology. 1990. Vol. 120. P. 191-241.
14. Ellis R. Molecular chaperones: the plant connection // Science. 1990. V. 250, № 4983. P. 954-959.
15. Rill R., Oosterhof D. The accessibilities of histones in nucleosome cores to an arginine-specific protease // J. Biol. Chemistry. 1982. V. 257. № 24. P. 14875-14880.

**ABOUT THE POSSIBILITY OF PARTICIPATION ARG-X
PROTEASE-SENSITIVES IN SPATIAL REORGANIZATION OF CHROMATIN
SUPRASTRUCTURES AS A PHYSIOLOGICAL FACTOR OF THE MECHANISM
OF ADAPTATION AND STABILITY OF PLANTS**

© 2011 R.S. Ivanov, G.Kh. Vafina, E.A. Ivanova

Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

Properties of dynamics of the contents of protein components, Arg-X proteolysis at different levels of spatial-temporal reorganization of interphase chromatin during the G₁-phases of the cell cycle of embryos are described during germination of seeds summer (Artemovka) and consistently transformed from it winter (Mironovskaya 808) and summer (Mironovskaya summer) wheat in the normal conditions and in the presence of a protein deacetylation inhibitor. The participation Arg-X proteolysis in the epigenetic mechanisms is discussed.

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