

УДК 577.152.34: 576.315.4: 633.11

## ПРОТЕОМИКА ИНТЕРФАЗНОГО ЯДРА ПРИ ИНДУКЦИИ РОСТОВОГО МОРОФОГЕНЕЗА ПШЕНИЦЫ

©2013 Р.С. Иванов, Г.Х. Вафина, Л.М. Карпова, Э.А. Иванова

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 06.06.2013

Исследованы особенности динамики биогетерополимерных структур (нуклеоплазмы, хроматина, ядерного матрикса) интерфазных ядер при индукции ростового морфогенеза зрелых зародышей яровой, выведенной из неё озимой и вновь выведенной из последней яровой пшеницы. Показано изменение локализации *Arg-X* зон протеолитической активности в гистонах и негистонах, которое может быть связано с изменением плотности натяжения и изменения структуры хроматина в процессе реализации морфогенетической программы развития растений.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* L., клеточное ядро, хроматин, гистоны, *Arg-X* протеолиз, яровая и озимая пшеница.

Исходя из современного анализа литературы, известно, что изучение протеома клеточных ядер растений до сих пор остается на начальном этапе [1]. Однако первые публикации наших сотрудников по динамике протеома клеточных ядер растений относятся к 1975 г. [2]. Представленная работа является развитием идей по дальнейшему исследованию молекулярно-генетических механизмов динамики протеома клеточного ядра.

Доказано, что хромосомы располагаются не беспорядочно внутри ядра, а формируют строго упорядоченные структуры [3]. Обращает внимание то, что из нуклеосомного кора выпячиваются неструктурированные аминотерминальные хвосты, несущие гуанидиновую группу аргининобогатых (H3, H4) и умеренно-лизинобогатых (H2A; H2B) гистонов, входящих в состав нуклеосомы. Эти хвосты подвергаются активной модификации и межнуклеосомным взаимодействиям [3]. Однако ни биохимические, ни биофизические механизмы, функционирующие в этой области протеома клеточного ядра, недостаточно изучены. Известно, что аргининбогатые гистоны по аминокислотной последовательности эволюционно стабильные белки [4], что свидетельствует об их важной роли в сохранении и реализации генетической информации у эукариот, биохимические механизмы которой в структуризации хроматина ещё предстоит расшифровать.

Целью данной работы был анализ активности *Arg-X* протеолиза в различных компартментах клеточного ядра при индукции ростового морфогенеза зародышей пшеницы.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были элитные семена

Иванов Руслан Сергеевич, к.б.н., научный сотрудник, e-mail: evilina@anrb.ru; Вафина Гюльнар Хамидовна, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: evilina@anrb.ru; Карпова Лидия Михайловна, аспирант, e-mail: evilina@anrb.ru; Иванова Эвелина Алексеевна, д.б.н., главный научный сотрудник, e-mail: evilina@anrb.ru

пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сортов Артемовка (яровая), выведенный из нее сорт Мироновская 808 (озимая) и вновь выведенный из последнего сорт Мироновская яровая (коллекция семян Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова). Подробное описание метода выведения сортов представлено в работах [5, 6]. В определенные интервалы времени, а именно: 0 ч (воздушно-сухое семя, находящееся в состоянии биологического покоя) и через 21 ч от начала замачивания, у проращиваемых семян отделяли от эндосперма зародыши, из которых выделяли клеточные ядра [7]. Надмолекулярные структуры: нуклеоплазму (Нп), хроматин непрочно (Хр-I) и прочно (Хр-II) связанный с ядерным матриксом (ЯМ), и собственно ЯМ выделяли из клеточных ядер при повышении ионной силы раствора способом, подробно описанным в работе [8]. Из выделенных супраструктур клеточных ядер негистоновые белки (НГБ) отделяли от гистонов способом, представленным в работе [9]. Через колонку с полиметакриловой синтетической смолой ИРЦ-50 (Amberlite, IRC-50, Serva, Heidelberg) пропускали гетерополимерные блоки исследуемых супраструктур (Нп, Хр-I, Хр-II, ЯМ). Смолу для ионообменной хроматографии готовили по методике [10]. Белки элюировали в ступенчатом градиенте (6,0; 8,9; 10,6; 13; 40%) гуанидингидрохлорида (Диаэм). В представленной работе данные по 13% фракции не приведены. Протеазочувствительность *Arg-X* в негистоновых и гистоновых блоках оценивали по расщеплению *Arg-X* связей в аргининобогатом белке – протамине *Salmine-A-1* («Merk»), молекула которого состоит из 33 аминокислот (22 молекулы Арг, 4 – Сер, 3 – Про, по 2 – Глу и Вал) во всех фракциях ядер [8]. Активность протеолиза выражали в наномолях аргинина за 1 с на 1 мкг белка (нмоль/(с мкг белка)).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

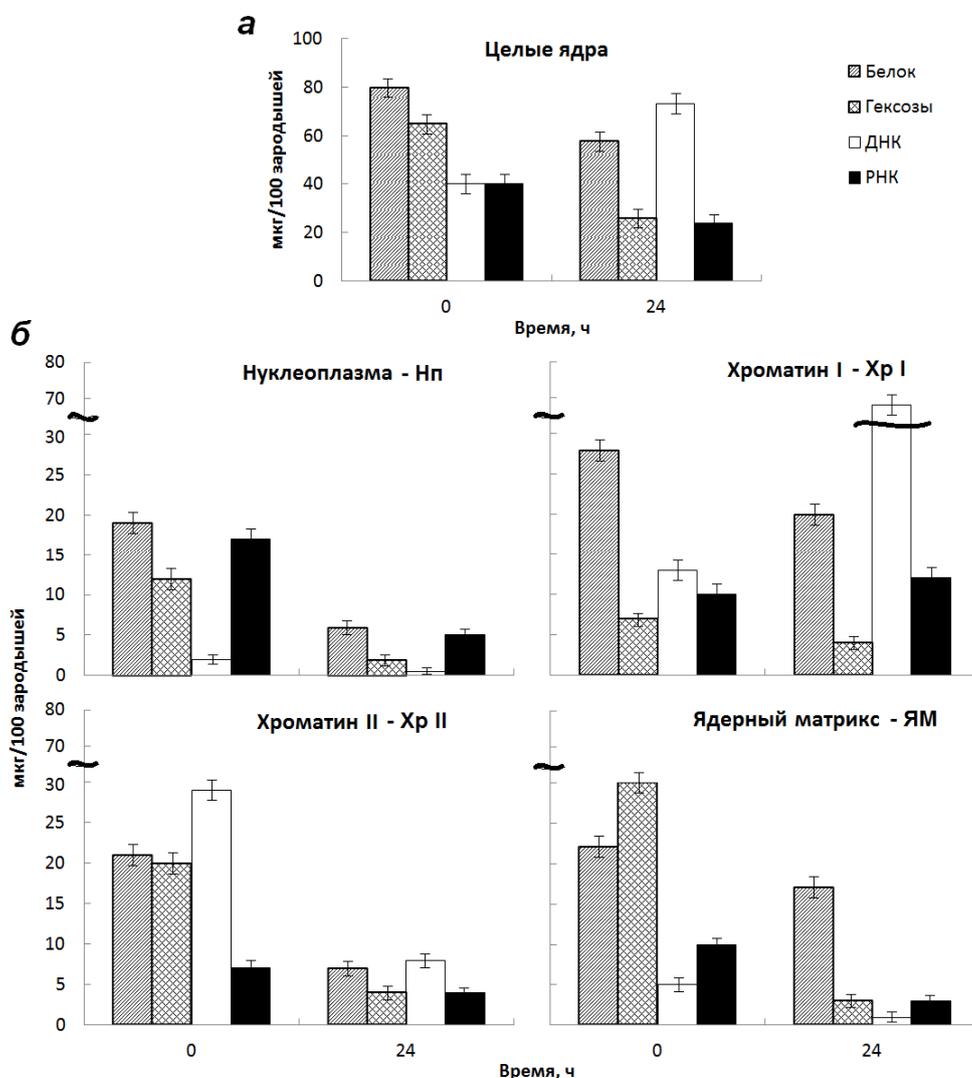
Поскольку клетка и ее органеллы – это сложнейшая организация атомных, молекулярных, надмолекулярных систем, то любое изменение внеш-

них факторов окружающей среды затрагивает пространственно-временные биохимические уровни организации живых систем. В данном случае нас интересовала взаимозависимость внутриядерных систем (нуклеоплазмы, Хр-I непрочно- и Хр-II прочносвязанных с ЯМ, а также самого ЯМ), построенных на основе сильных (т. е. ковалентных) и слабых связей.

Динамика содержания ДНК, РНК, белка и возможной степени его гексозилирования на уровне целых клеточных ядер представлена на рис. 1.

Отмечается высокий уровень синтеза ДНК в период активного роста зародыша за счет растяжения клеток (рис. 1а, 24 ч). Дальнейшее фракционирование клеточных ядер позволило получить супрамолекулярные структуры (нуклеоплазму, хроматин непрочно- и прочносвязанный с ядерным матриксом, а также ядерный матрикс), компонентный состав которых представлен на рис. 1б. Из рисунка

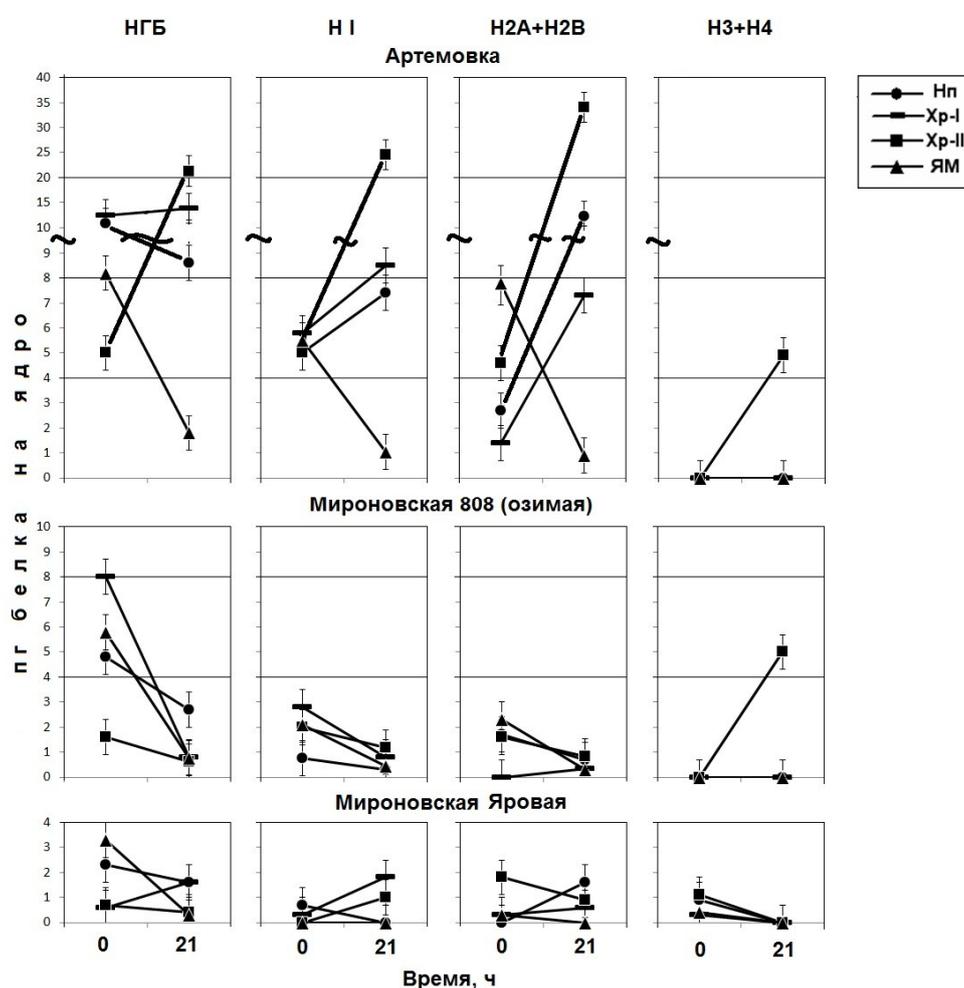
видно, что в нуклеоплазме воздушно-сухих зародышей (0 ч) отмечается наличие свободного нуклеозольного пула белков, а также запасенной РНК, по-видимому, необходимой для начальных этапов трансляции, утилизирующихся при последующем росте (рис. 1б, 0 ч → 24 ч). Подобные данные были получены на другом растительном объекте [11, 12]. Во фракции хроматина I (рис. 1б, Хр I) обнаруживается депротенинизированная ДНК (24 ч). Возможно, это активно транскрибируемая ДНК, количество которой, в период роста (0 ч → 24 ч) увеличивается, в то время как динамика содержания ДНК во фракции белков, прочносвязанных с хроматином (рис. 1б, Хр II) прямо противоположна (рис. 1б, Хр II, 0 ч → 24 ч). Содержание ДНК, РНК во фракции ядерного матрикса (0 ч → 24 ч) также понижается, как и возможная степень гексозилирования белков (рис. 1б, ЯМ).



**Рис. 1.** Динамика содержания ДНК, РНК, белка и возможной степени его гексозилирования в целом ядре и его надмолекулярных структурах (Нп – нуклеоплазма; Хр I – хроматин непрочно связанный с ЯМ; Хр II – хроматин прочно связанный с ЯМ; ЯМ – ядерный матрикс) при индукции ростовых процессов зрелых зародышей пшеницы [13]

На следующем этапе работы из описанных выше супрамолекулярных структур (рис. 1б) были выделены негистоновые и гистоновые белки, динамика содержания которых представлена на рис. 2. Показано, что исходный сорт Артемовка в период вступления в S фазу клеточного цикла содержит высокий уровень негистоновых (НГБ) и гистоновых (Н1, Н2А+Н2В) белков в супраструктуре Хр II, который заметно снижен у Мироновской озимой, что, по-видимому, связано с холодовым стрессом. Примечательно, что низкий уровень содержания НГБ и гистоновых белков сохраняется у Мироновской яровой.

Мы специально сфокусировали свое внимание на *Arg-X* протеазочувствительных зонах НГБ и гистонах тотального хроматина, исходя из роли аргинина, участвующего в эволюционной стабильности аргининбогатых гистонов, а также активности его гуанидиновой группы, способной дать резонирующий эффект биополимерной структуре. На рис. 3 представлена динамика *Arg-X* протеолиза в негистоновых и гистоновых блоках супраструктур (нуклеоплазмы, хроматина, ядерного матрикса). Анализ рисунка показывает довольно низкую *Arg-X* протеолитическую активность у исходного сорта Артемовки как во фракциях НГБ, так и гистоновых белках. Совершенно другая динамика *Arg-X* протеазоактивности наблюдается у Мироновской озимой. Увеличение *Arg-X* протеазоактивности обнаруживается в НГБ блоках всех супраструктур (рис. 3, Мироновская озимая, 0-21 ч).



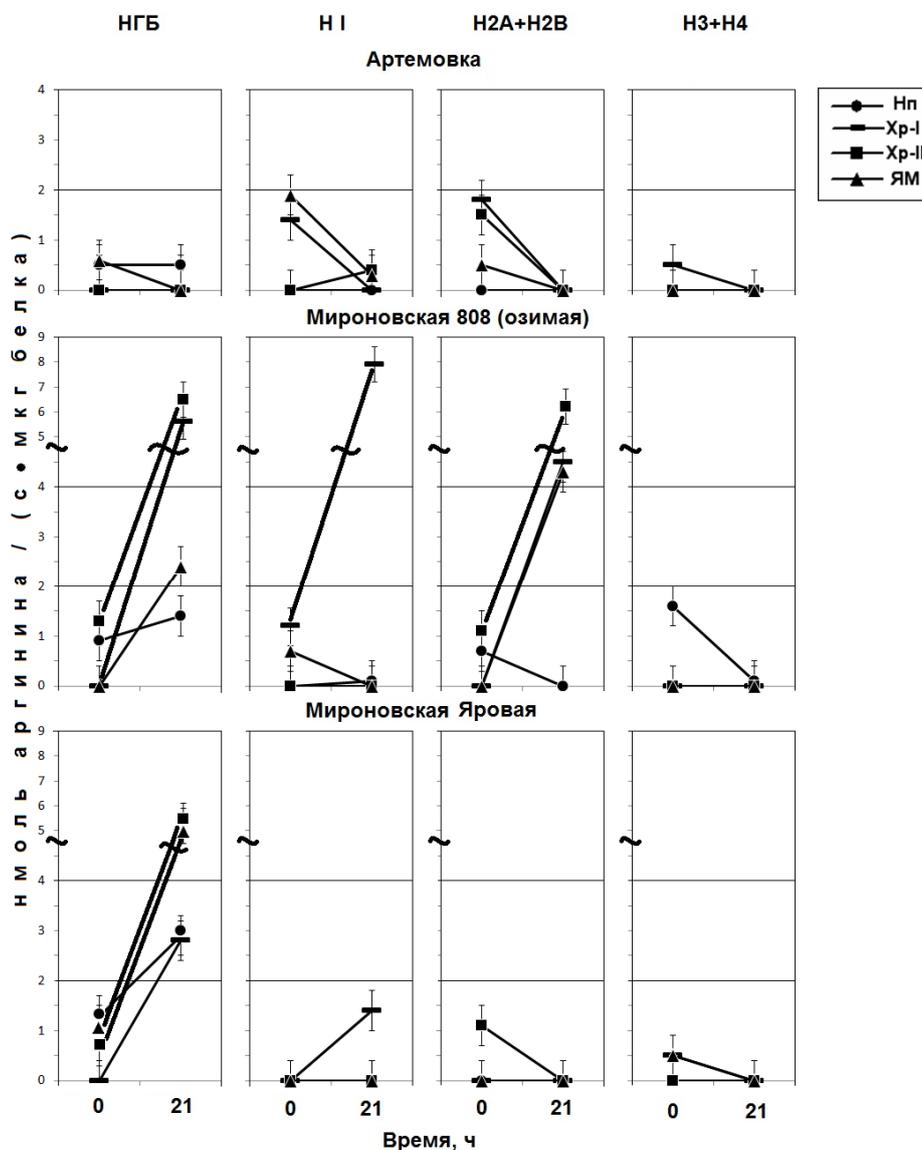
**Рис. 2.** Содержание негистоновых (НГБ) и гистоновых (Н1, Н2А+Н2В, Н3+Н4) белков в супраструктурах (Нп – нуклеоплазма; Хр I – хроматин непрочно связанный с ЯМ; Хр II – хроматин прочно связанный с ЯМ; ЯМ – ядерный матрикс) клеточных ядер при индукции ростовых процессов зрелых зародышей пшеницы: Артемовки (яровая), Мироновской 808 (озимой) и Мироновской яровой

В гистоновых блоках высокая активность обнаруживается во фракции линкерного гистона Н1 хроматина непрочно связанного с ЯМ, а также во фракции гистонов Н2А+Н2В хроматина непрочно и прочно связанного с ЯМ и в самом ЯМ (рис.3, Мироновская озимая, 21 ч). Что касается сорта Ми-

роновской яровой, на уровне негистоновых блоков супраструктур клеточных ядер существенных различий с озимым сортом выявлено не было, в то время как на уровне линкерных и коровых гистонов (Н1, Н2А+Н2В), динамика *Arg-X* протеолиза Мироновской яровой существенно отличалась от

озимой пшеницы (рис.3, Мироновская яровая, 0 ч→21 ч). В данном случае мы предполагаем, что *Arg-X* протеолиз каким-то образом связан со сборкой нуклеосом и, возможно, нуклеосомным контролем генной экспрессии [14]. Таким образом, в данной работе мы попытались показать участки в

гетерополимерных структурах хроматиновой матрицы, где наиболее активно происходят динамические изменения ядерного протеома и выявляются гиперчувствительные сайты к *Arg-X* протеолизу на уровне НГБ, линкерных и коровых гистонов.



**Рис. 3.** Активность *Arg-X* протеолиза в негистоновых (НГБ) и гистоновых (Н1; Н2А + Н2В; Н3 + Н4) блоках супраструктур (Нп - нуклеоплазма; Хр I - хроматин непрочно связанный с ЯМ; Хр II - хроматин прочно связанный с ЯМ; ЯМ - ядерный матрикс) клеточных ядер при индукции ростовых процессов зрелых зародышей пшениц: Артемовки (яровая), Мироновской 808 (озимой) и Мироновской яровой

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mistelli T., Spector D.L.* The Nucleus. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011. 463 p.
2. *Иванова Э.А., Гилязетдинов Ш.Я., Ахметов Р.Р.* Модификация гистонов растений и влияние фитогормонов на активность этого процесса // Растительные белки и их биосинтез. М: Наука, 1975. С. 301-305.
3. *Разин С.В., Быстрицкий А.А.* Хроматин: упакованный геном. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 176 с.
4. *Smith E.L., De Lange R.J., Bonner J.* Chemistry and biology of histones // *Physiol. Revs.* 1970. V. 50. N 2. P. 159-170.
5. *Ремесло В.Н.* Озимая пшеница Мироновская 264 и Мироновская 808. М.: Колос, 1964. 72 с.
6. Наука и человечество: Доступно и точно о главном в мировой науке: Международный ежегодник / Всесоюз. о-во «Знание», АН СССР. Отв. ред. Е.Б. Этингоф. М.: Знание, 1980. С. 105-117.
7. *Иванова Э.А., Вафина Г.Х.* Способ выделения растительных клеточных ядер / А.с. 1701747, МКИ С12 № 9/50. Опубл. 01.09.91. Бюл. № 48.
8. *Иванова Э.А., Вафина Г.Х.* Способ получения ядерных фракций, обладающих протеиназной и ингибирующей активностью / А.с. 1733471, МКИ С12 №9/50. Опубл. 15.01.92. Бюл. № 18.

9. *Иванова Э.А., Вафина Г.Х.* Способ препаративного выделения основных белков из супраструктур клеточных ядер растений / Пат. 2408602. Оpubл. 10.01.2011. Бюл. № 1.
10. *Иванова Э.А.* Фракционирование растительных гистонов на колонках с амберлитом ИРЦ-50 // Мат. 3-й науч. конф. молодых ученых. Уфа, 1972. С. 54-55.
11. *Ahmed I.C.M., Padayatty J.D.* Presence & Function of free pool histones in the nucleosol of rice embryos // *Indian J. Biochem. & Biophys.* 1982. V. 19. P. 155-159.
12. *Dure L.S.* Stored messenger ribonucleic acid and seed germination // *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination* Amsterdam: North-Holland' Publ. Co, 1977. P. 335-345.
13. *Иванова Э.А., Вафина Г.Х.* Физиолого-биохимический анализ интерфазных ядер в процессе прорастания семян пшеницы // *Физиология и биохимия культурных растений.* 1992. Т. 24. № 6. С. 577-583.
14. *Меркулова Т.И., Ананько Е.А., Игнатьева Е.В., Колчанов Н.А.* Регуляторные коды транскрипции генов эукариот // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 1. С. 37-54.

## PROTEOMICS OF INTERPHASE NUCLEUS DURING INDUCTION OF GROWTH MORPHOGENESIS IN WHEAT

©2013 R.S. Ivanov, G.Kh. Vafina, L.M. Karpova, E.A. Ivanova

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

The properties of the dynamics biopolymer structures (nucleoplasm, chromatin, nuclear matrix) of interphase nuclei during induction growth morphogenesis of mature embryos of spring, transformed from it winter and again transformed from last spring wheat were studied. The changes in the localization of *Arg-X* zones of proteolytic activity in histones and nonhistones, which may be due to the changes in the density of the tension and changes in chromatin structure in the implementation of the morphogenetic program of plant development were shown.

**Key words:** *Triticum aestivum* L., cell nucleus, chromatin, histones, *Arg-X* proteolysis, spring and winter wheat.

---

*Ruslan Ivanov*, Candidate of Biology, researcher, e-mail: [evilina@anrb.ru](mailto:evilina@anrb.ru); *Vafina*, Candidate of Biology, senior researcher, e-mail: [Gulnar evilina@anrb.ru](mailto:Gulnar_evilina@anrb.ru); *Lidia Karpova*, postgraduate student, e-mail: [evilina@anrb.ru](mailto:evilina@anrb.ru); *Evilina Ivanova*, Doctor of Biology, chief researcher, e-mail: [evilina@anrb.ru](mailto:evilina@anrb.ru)