

УДК 57.016.64:576.315.42:577.152.34:633.11

Э. А. ИВАНОВА, Г. Х. ВАФИНА, Р. С. ИВАНОВ, Л. М. ТЕРЕЩЕНКО

## АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ КОМПЛЕКСОВ В СУПРАСТРУКТУРАХ ИНТЕРФАЗНОГО ХРОМАТИНА ПРИ ИНДУКЦИИ РОСТОВОГО МОРФОГЕНЕЗА ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM*)

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, e-mail: evilina@anrb.ru

(Поступила в редакцию 05.05.2014)

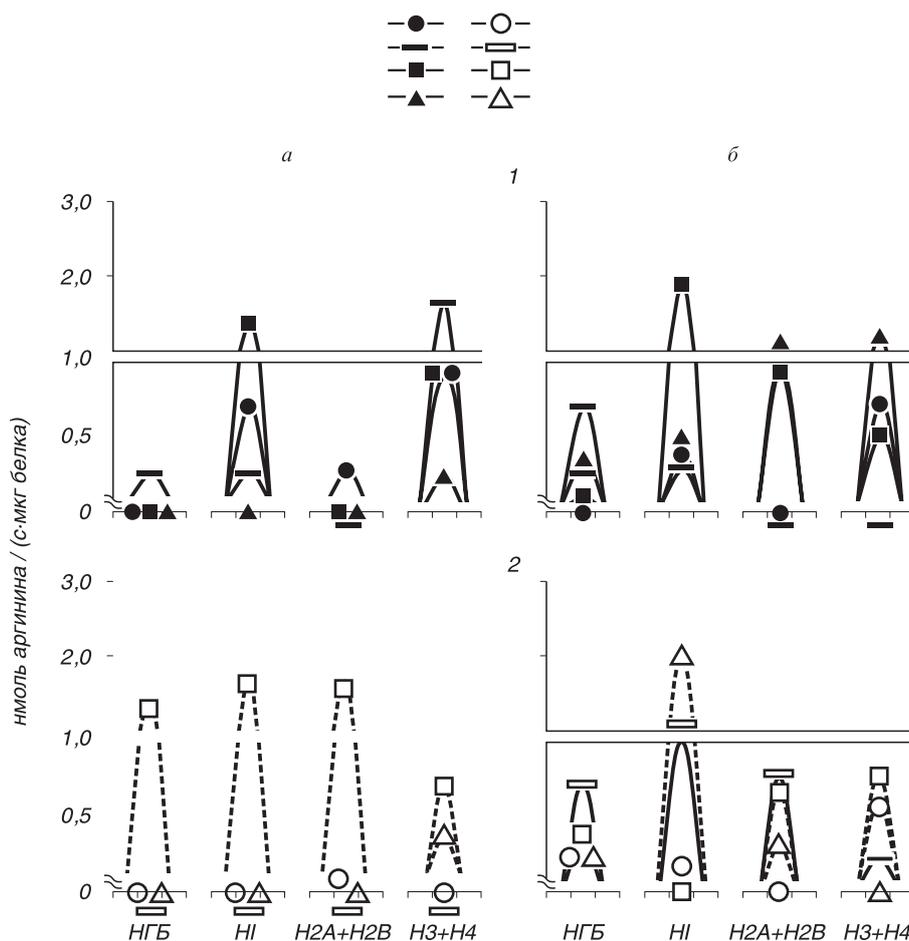
**Введение.** Хроматин является динамической структурой, реагирующей на различные факторы доступности к регулированию транскрипционной активности ДНК. В настоящее время определенный прогресс достигнут в исследовании структуры хроматина в масштабе целого ядра [1]. Растения имеют сложную эпигенетическую систему, способную к модификации гистоновых белков и ДНК практически аналогично животным, и во многих случаях используют эпигенетические ферменты, очень подобные тем, которые встречаются у животных и даже у человека [2, 3]. Многие реакции растений на условия окружающей среды непосредственно связаны с изменением программы развития клеток [4]. Однако до настоящего времени молекулярные механизмы адаптивной эволюции признаков у растений изучены значительно хуже [5–7]. Сегодня проявляется определенный интерес к выявлению роли протеолиза на уровне гистонов, протеолитической модификации гистонов триптазой [8, 9], а также эпигенетической регуляции экспрессии генов яровизации [10]. В работе [11] обсуждаются морфологические ограничения и эпигенетические воздействия на архитектуру ядра, эволюционную стабильность механизмов хромосомных территорий и изменения их структуры во время транскрипции и репарации, т. е. в целом динамика хромосом в интерфазных ядрах все еще недостаточно изучена для построения адекватных логико-математических схем теории биологической специфичности развития. В данной работе клеточные ядра зрелых зародышей исходной яровой и выведенной из нее озимой пшеницы используются как модельная система, в которой произошло адаптивное формирование функциональной группы, координировано экспрессирующихся генов. Вопросы самоорганизации биологических систем находятся в центре внимания специалистов по высокомолекулярным соединениям, а именно биополимерам [12]. Хроматин представляет собой супрагетерополимерный, «когерентный и чрезвычайно жизнеспособный организм», где осуществлено межмолекулярное взаимодействие различных супермолекулярных структур: ДНК, РНК, белков и полисахаридов, имеющих свои пространственные (геометрические, топологические) характеристики, которые в зависимости от условий окружающей среды проявляют способность к адаптации.

Целью данной работы был анализ локализации Арг-Х протеазочувствительных сайтов в трипсиноподобных комплексах (ТПК) негистоновых и (НГБ) гистоновых блоках гетерополимерных супраструктур (нуклеоплазмы, хроматина, ядерного матрикса: S-фазы клеточного цикла) как возможных зон, влияющих на конформационные перестройки тотального интерфазного хроматина при индукции ростового морфогенеза зрелых зародышей-проростков яровой и выведенной из нее озимой пшеницы.

**Объекты и методы исследования.** Для исследования были выбраны элитные семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сортов Артемовка (яровая) и выведенный из нее сорт Мироновская 808

(озимая) (коллекция семян Всероссийского института растениеводства им. Н. И. Вавилова). Подробное описание метода выведения озимого сорта Мироновская 808 из ярового сорта Артемовка представлено в работе [13]. Для замачивания семян и индукции прорастания зародышей соответственно в контрольном варианте использовалась дистиллированная вода, а в опытном варианте (по ингибированию деацетилирования ядерного протеома) – 0,004 мМ NaВ (бутират натрия) [14]. Проклюнувшиеся зародыши-проростки проращиваемых семян отделяли от эндосперма через 24 ч от начала замачивания, из которых выделяли клеточные ядра [15]. Надмолекулярные супраструктуры: 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 [16]. Из выделенных супраструктур клеточных ядер (НГБ) отделяли от гистонов способом, представленным в работе [17]. Смолу для ионообменной хроматографии готовили по методике [18]. Через колонку с полиметакриловой синтетической смолой ИРЦ-50 (Amberlite, IRC-50, Serva, Heidelberg) пропускали гетерополимерные блоки исследуемых супраструктур (Нп, Хр-I, Хр-II, ЯМ). Соответственно НГБ и гистоновые (Н1, Н2А+Н2В; Н3+Н4) блоки элюировали в ступенчатом градиенте (6,0; 8,9; 10,6; 40 %) гуанидин-гидрохлорида. ТПК из НГБ и гистоновых блоков выделяли методом аффинной хроматографии по способу, описанному ранее в работах [9, 16]. Протеазочувствительность Арг-Х в негистоновых и гистоновых блоках оценивали по расщеплению Арг-Х 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 [16]. Активность протеолиза выражали в наномолях аргинина за 1 с на 1 мкг белка (нмоль / (с · мкг белка).

**Результаты и их обсуждение.** В 24-часовом зародыше-проростке апекс колеоптиля и кончик корня – это сенсорные органы, специфически реагирующие на то или иное индуцирующее воздействие. В период, предшествующий проклевыванию корешком зародыша, происходит формирование метаболической системы регуляции на уровне сигнализационного «языка» апикальных меристем побега и корня, что обеспечивает пластичность, координационный и одновременный рост различных тканей проростка в тесной взаимосвязи между собой. В растущих за счет растяжения клеток, сплошных клеточно-тканевых массах всегда будут возникать механические натяжения из-за пассивно-плавного деформируемых клеточных пластов [19]. Причем клеточно-тканевые пласты могут приводить к поразительным по геометрической сложности формам [20]. У растений это наблюдается в ходе морфогенеза конусов роста побегов. Взаимосвязь роста с механическими напряжениями, закономерно распределенными в обширных областях растущих тканей, свидетельствует о том, что рост, несомненно, подчинен определенным формам целостного контроля организма [21]. Ранее в работе [8] на уровне гетерополимерных супраструктур клеточных ядер, индуцированных к росту зародышей (21 ч), а также впоследствии по выявлению из последних гиперчувствительных к протеолизу сайтов на уровне НГБ, линкерных и коровых гистонов [22] была показана динамика функционирования Арг-Х протеолиза. На следующем этапе представленной экспериментальной работы мы решили выделить из блоков протеома вышеперечисленных НГБ, линкерных и коровых гистонов ТПК и определить в них сайты Арг-Х протеазочувствительности. Данные рисунка контрольного варианта (а) и в условиях ингибирования деацетилирования белков (б) показывают, что гиперчувствительные к Арг-Х протеолизу сайты в ТПК 24-часовых зародышей-проростков яровой и выведенной из нее озимой пшеницы имеют свои особенности локализации в гетерополимерных структурах клеточных ядер. Следует отметить, что бутират натрия как ингибитор деацетилирования белков должен на какой-то определенный период поддерживать исходное внутриклеточное ацетилирование некоторых белков. Ранее было показано, что модификация ядерных белков путем их ацетилирования активирует транскрипционную функцию хроматина [23]. Мы специально сфокусировали свое внимание на Арг-Х протеазочувствительных сайтах исходя из роли аргинина, участвующего в эволюционной стабильности аргининбогатых гистонов и представили двухслойный рисунок, чтобы нагляднее показать участки в гетерополимерных структурах хроматиновой матрицы, где наиболее активно происходят динамические изменения ядерного протеома. По всей вероятности, «хроматиновая



Арг-Х протеазочувствительность в ТПК негистоновых, линкерных и коровых блоках протеома клеточных ядер прораставших 24-часовых зародышей-проростков пшениц сортов Артемовка (яровая) (1) и выведенной из нее Мироновской 808 (озимая) (2) в нормальных (а) и в условиях ингибирования деацетилирования белков (б): ТПК – трипсиноподобные комплексы, выделенные методом аффинной хроматографии. Блоки белков клеточного ядра: НГБ – негистоновые белки; НI – линкерный лизинбогатый гистон; коровые: Н2А+Н2В – умеренно лизинбогатые гистоны; Н3+Н4 – аргининбогатые гистоны. Супраструктуры клеточного ядра: Нп – нуклеоплазма, Хр-I – хроматин, непрочносвязанный с ЯМ, Хр-II – хроматин, прочносвязанный с ЯМ; ЯМ – ядерный матрикс

матрица – это физиологически важный субстрат, на котором разворачиваются ремоделинг и механизм транскрипции» [24]. Из представленного рисунка видно, что у озимого сорта (а, 2) наиболее чувствительные к Арг-Х протеолизу сайты находятся в структурах Хр-II, хроматина, прочносвязанного с ЯМ. В случае поддержания посттрансляционных модификаций ядерного протеома путем его ацетилирования Арг-Х протеазочувствительность переходит на линкерный гистон в ядерном матриксе (б, 2). У ярового сорта такой переход связан с коровыми гистонами ЯМ (б, 1).

Предполагают, что протеолитический процессинг является одним из способов необратимой посттрансляционной модификации, осуществляемой в процессе ремоделирования хроматина [25]. Наиболее чувствительны к протеолизу N-терминальные/С-терминальные хвосты гистонов, в то время как глобулярные домены относительно устойчивы к этой модификации при условии, что гистоны находятся в составе хроматина [25]. В гипотезе гистонного кода протеолиз рассматривается как новый вид необратимых пост-трансляционных модификаций гистонов. Предполагается, что сайт-специфичный протеолиз гистонов является процессом удаления эпигенетических меток гистонов, т. е. в гипотезе гистонного кода эти протеазы ответственны за модуляцию эпигенетических меток [25]. Однако экспериментальное подтверждение удаления эпигенетических меток с гистоновых хвостов с помощью такой протеазы все еще не осуществлено. Тем не менее поиск такой протеазы продолжается. По-видимому, Арг-Х гиперчувствительные зоны представляют собой один из элементов LCR (locus control regions), которые связаны

с НАТ (histoneacetyltransferase) [26]. Возможно, наши экспериментальные данные будут полезны для тех, кто занимается разработкой логико-математических схем теории биологической специфичности, о которых писали Р. Том, Ж. М. Лен [12, 20].

**Заключение.** В данной работе в качестве возможного механизма архитектурной реорганизации хроматиновой матрицы рассматриваются особенности Арг-Х протеолиза в связи с физиологией роста и развития зародыша-проростка. Возможно, гиперчувствительность в ТПК к Арг-Х активности коровых блоков хроматина, прочно связанного с ЯМ, закрепились при выведении озимого сорта из исходного ярового. В целом ядерный матрикс рассматривается как активная динамическая структура, которая участвует в формировании больших энзиматических и регуляторных комплексов, контролирующих топологию и функцию ДНК, и активно реагирует на внешние и внутренние раздражители, регулируя фундаментальные биологические процессы.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-31243).

## Литература

1. The Nucleus / Eds T. Mistelli, D.L. Spector. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
2. Zentner G. E., Henikoff S. // Nat Struct Mol Biol. 2013. Vol. 20, N3. P. 259–266.
3. Narlikar G. J., Sundaramoorthy R., Owen-Hughes T. // Cell. 2013. Vol. 154, N3. P. 490–503.
4. Cantone I., Fisher A. G. // Nat Struct Mol Biol. 2013. Vol. 20, N3. P. 282–289.
5. Губин К. В., Сулов В. В., Колчанов Н. А. // Биохимия. 2008. Т. 73, № 2. С. 270–282.
6. Luger K., Dechassa M. L., Tremethick D. J. // Nat Rev Mol Cell Biol. 2012. Vol. 13, N7. P. 436–447.
7. Tropberger P., Schneider R. // Nature structural & molecular biology. 2013. Vol. 20, N6. P. 657–661.
8. Ivanov R. S., Vafina G. H., Ivanova E. A. // Journal of Life Sciences. 2012. Vol. 6, N 12. P. 1351–1355.
9. Иванова Э. А., Вафина Г. Х. // Физиол. растен. 1991. Т. 38, № 3. С. 574–579.
10. Щербань А. Б., Салина Е. А. // Цитология. 2013. Т. 55, № 4. С. 234–237.
11. Schubert I., Shaw P. // Trends in Plant Science. 2011. N 16. P. 273–281.
12. Лен Ж. М. Супрамолекулярная химия: Концепции и перспективы: Пер. с англ. Новосибирск, 1998.
13. Ремесло В. Н. Озимая пшеница Мироновская 264 и 808. М., 1964.
14. Иванова Э. А., Вафина Г. Х. Способ оценки влияния ингибитора деацетилирования белков на индукцию ростового морфогенеза растений: Пат. № 2404585 от 27 ноября 2010.
15. Иванова Э. А., Вафина Г. Х. Способ выделения растительных клеточных ядер: а. с. № 1701747 от 01 сентября 1991 г.
16. Иванова Э. А., Вафина Г. Х. Способ получения ядерных фракций, обладающих протеиназной и ингибирующей активностью: а. с. № 1733471 от 15 января 1992 г.
17. Иванова Э. А., Вафина Г. Х. Способ препаративного выделения основных белков из супраструктур клеточных ядер растений: пат. № 2408602 от 10 января 2011.
18. Иванова Э. А. // Материалы третьей науч. конф. молодых ученых. Уфа, 1972. С. 54–55.
19. Белоусов Л. В. // Генетика. 2006. Т. 42, № 9. С. 1165–1169.
20. Том Р. Структурная устойчивость и морфогенез. М., 2002. С. 253.
21. Белоусов Л. В. Биологический морфогенез. М., 1987. С. 186–204.
22. Иванова Э. А., Вафина Г. Х., Иванов Р. С. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук Беларусі. 2012. № 4. С. 11–15.
23. Иванова Э. А. Модификация гистонов у растений и ее физиологическое значение: Дис. ... канд. биол. наук. М., 1977.
24. Эллис С. Д., Дженювейн Т., Рейнберг Д. // Эпигенетика: Пер. с англ. М., 2010. С. 33–70.
25. Purohit J. S., Chaturvedi M. M., Panda P. // Int. J. Int. sci. Inn. Tech. 2012. Sec. B. Vol. 1. Is. 1. P. 51–60.
26. Разин С. В., Быстрицкий А. А. Хроматин: упакованный геном. М., 2009. С. 9.

E. A. IVANOVA, G. H. VAFINA, R. S. IVANOV, L. M. TERESHCHENKO

### ACTIVITY OF TRYPSIN-LIKE COMPLEXES IN THE SUPRASTRUCTURES OF THE INTERPHASE CHROMATIN AT THE INDUCTION OF GROWTH MORPHOGENESIS OF MATURE WHEAT GERMS *TRITICUM AESTIVUM*

#### Summary

In this paper, as a possible mechanism of architectural reorganization of chromatin matrix are considered properties of Arg-X proteolysis in due to the physiology of growth and development of the embryo-seedling. Perhaps hypersensitivity in the trypsin complexes to Arg-X activity of core blocks of chromatin strongly bound with nuclear matrix entrenched at forming of winter variety from original spring.