

УДК 577.152.34:576.315.4:633.11

**АРГ-Х ПРОТЕОЛИЗ В НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУРАХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ПРИ ИНДУКЦИИ РОСТОВОГО МОРФОГЕНЕЗА**

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

Описаны особенности динамики содержания белковых компонентов, *Арг-Х* протеолиза на разных уровнях пространственно-временной реорганизации интерфазного хроматина при прорастании семян яровой, выведенной из нее озимой и вновь выведенной из последней яровой пшениц. Показано, что *Арг-Х* протеолитическая активность ярко выражена и сохранена в пространственно-временной реорганизации яровых пшениц на уровне хроматина, прочно связанного с ядерным матриксом.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., клеточное ядро, *Арг-Х* протеолиз, озимость и яровость.

Удивительная пластичность растений приспосабливаться к новому образу жизни, быть то в яровой, то в озимой форме, и, особенно, биохимические механизмы этого явления интересовали ученых давно [1]. В процессе адаптации живых организмов к температурным условиям среды происходят изменения на всех уровнях организации – организменном, тканевом, клеточном и молекулярном [2]. В настоящее время активно изучается пространственно-временная организация эукариотического генома в связи с работой эпигенетических механизмов [3]. Многократная пространственно-временная реорганизация хроматина происходит при сохранении доступности определенных участков ДНК для регуляторных факторов и ферментов транскрипции в ходе исполнения морфогенетических подпрограмм развития [3]. Удобной моделью для исследования некоторых особенностей биохимической адаптации на уровне молекулярно-генетических механизмов клеточного ядра является триада сортов пшениц: яровая Артемовка, выведенная из нее озимая Мироновская 808 и выведенная из последней вновь Мироновская яровая. Ранее было предположено, что в процессе перевода яровости в озимость сигналы как

внешней, так и внутренней среды могут вызывать эпигенетические модификации в растении [4]. Работы конца XX в. [5] показали, что в клеточных ядрах, а также и в нуклеосомах функционирует система протеиназ, специфический эффект которых связан с конформационными перестройками биополимерных структур. Наиболее ярким представителем ядерных протеиназ являются трипсиноподобные протеиназы, действие которых направлено на *Арг-Х* связи, которыми богаты негистоновые и гистоновые блоки белков, ассоциированные с нуклеиновыми кислотами [6]. Доказано, что активность протеиназ в течение клеточного цикла четко коррелирует с началом синтеза ДНК, а ингибирование приводит к задержке синтеза ДНК на определенное время [7].

Целью данной работы был анализ *Арг-Х* протеолиза на уровне тотального хроматина при индукции ростового морфогенеза зрелых зародышей яровой пшеницы, выведенной из нее озимой и выведенной из последней вновь яровой пшеницы.

Объектом исследования были элитные семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сортов Артемовка (яровая), выведенный из нее сорт Мироновская 808 (озимая) и выведен-

КАРПОВА Лидия Михайловна, Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: evilina@anrb.ru  
ИВАНОВ Руслан Сергеевич – к.б.н., Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: evilina@anrb.ru  
ВАФИНА Гюльнар Хамидовна – к.б.н., Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: evilina@anrb.ru  
ИВАНОВА Эвилаина Алексеевна – д.б.н., Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: evilina@anrb.ru

ный из последнего сорт Мироновская яровая (коллекция семян Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова). Подробное описание процесса выведения этих сортов представлено в работах [8–9]. В определенные интервалы времени, а именно: 0 ч (воздушно-сухое семя, находящееся в состоя-

нии биологического покоя) и через 21 ч от начала замачивания у проращиваемых семян отделяли от эндосперма зародыши, из которых были выделены клеточные ядра [10]. Надмолекулярные структуры: нуклеоплазму (Нп), хроматин, непрочно-(Хр-I) и прочно-(Хр-II) связанный с ядерным матриксом

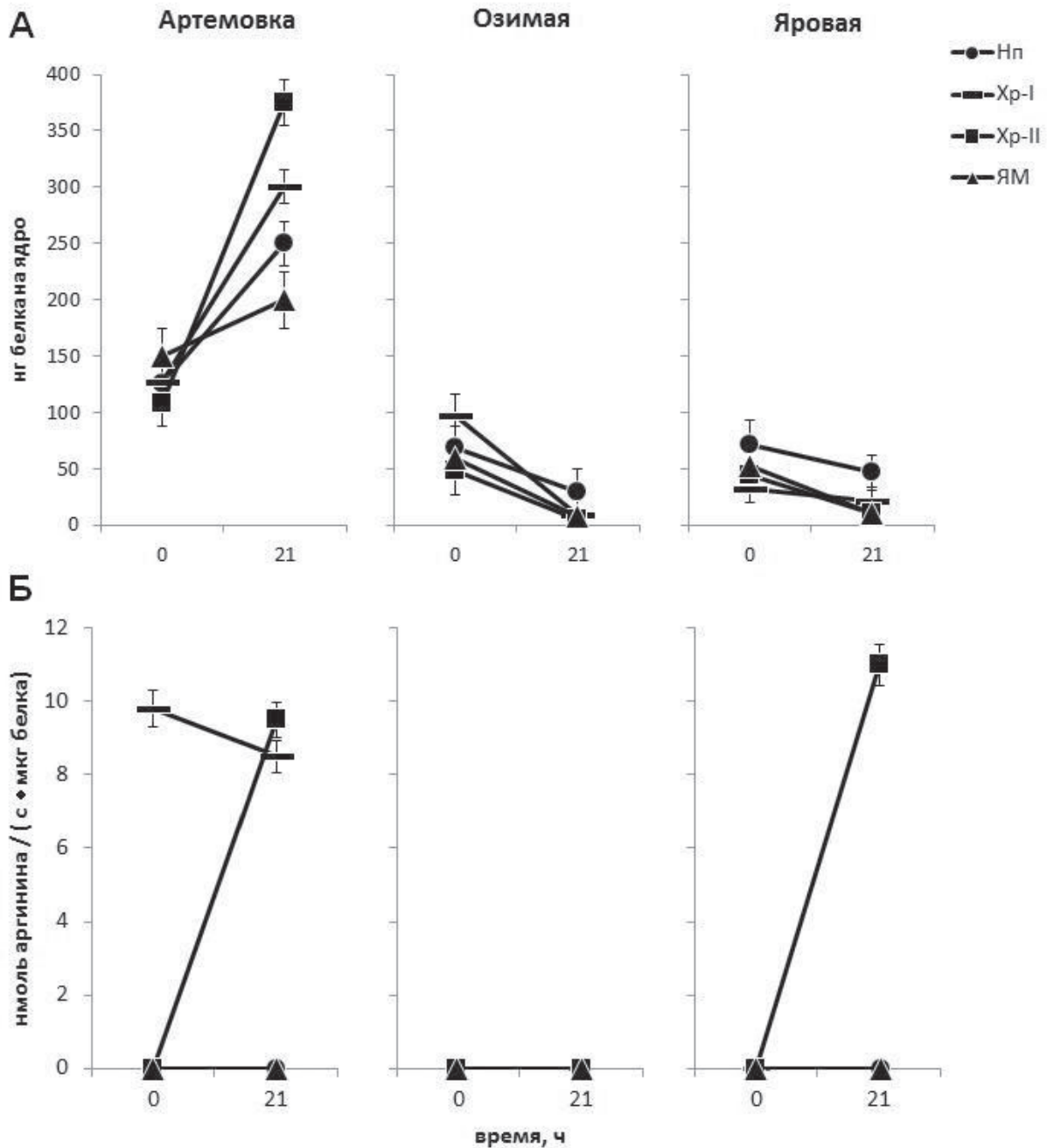


Рис. Динамика содержания белка (А) и Arg-X протеолитической активности (Б) в надмолекулярных структурах клеточных ядер при индукции ростовых процессов зрелых зародышей пшеницы сортов: Артемовка (яровая), Мироновская 808 (озимая) и Мироновская яровая. Надмолекулярные структуры: Нп – нуклеоплазма; Хр I – хроматин непрочно связанный с ядерным матриксом; Хр II – хроматин прочно связанный с ядерным матриксом; ЯМ – ядерный матрикс

(ЯМ), и собственно ЯМ выделяли из клеточных ядер при повышении ионной силы раствора (Нп – 0,14М NaCl; Хр-I – 0,35М NaCl; Хр-II – 2М NaCl; ЯМ – 6М гуанидингидрохлоридом с β-меркаптоэтанолом) способом, подробно описанным в работе [11]. Количество белка в ядрах и ядерных надмолекулярных структурах определяли методом Бредфорда в нашей модификации [11]. Активность *Arg-X* протеолиза оценивали по расщеплению *Arg-X* связей в аргининобогатом белке – протамине *Salmine-A-1* («Мерк») – молекула которого состоит из 33 аминокислот (22 молекулы *Arg*, 4 – *Ser*, 3 – *Pro*, по 2 – *Gln* и *Val*) во всех фракциях ядер [11]. Активность протеолиза выражали в наномолях аргинина за 1 с на 1 мкг белка (нмоль / (с · мкг белка)).

Один из элементов анализа молекулярно-генетических основ озимости и яровости на примере сортов пшеницы Мироновская 808 (озимая) и выведенной из нее Мироновской яровой представлен в наших предыдущих работах [12–13]. Было показано, что молекулярные механизмы при инициации ростовых процессов находятся на уровне слабых химических взаимодействий компартментов клеточного ядра и ядерного матрикса, ответственного за сборку мультиферментативных комплексов репликации и транскрипции. Анализ динамики протеома, представленный на рис. а, выявил заметное увеличение содержания белка во всех фракциях (наиболее ярко в хроматине) клеточных ядер зародышей яровой пшеницы сорта Артемовка, тогда как во фракциях клеточных ядер зародышей пшеницы сорта Мироновская 808 (озимая) и Мироновская яровая отмечалась относительно одинаковая динамика снижения содержания белка. Исследование *Arg-X* ограниченного протеолиза, способного модулировать структуру хроматина, и тем самым, возможно, оставлять в нем определенные эпигенетические метки, представлено на рис. б. Из всех трех исследуемых сортов наибольшее проявление *Arg-X* протеазоактивности наблюдалось у исходного сорта Артемовка. Было обнаружено присутствие *Arg-X* протеазоактивности на уровне хроматина, непрочно связанного с ядер-

ным матриксом, в воздушно-сухом зародыше и при его проклевывании (рис. б, 0 ч, 21 ч) с последующим появлением *Arg-X* протеазоактивности в хроматине, прочно связанном с ядерным матриксом (рис. б, 21 ч). Что касается озимого сорта пшеницы Мироновская 808, то ни в одной из фракций мы не обнаружили проявления *Arg-X* протеазоактивности. Анализ надмолекулярных структур Мироновской яровой вновь выявил *Arg-X* протеолитическую активность на уровне хроматина прочно связанного с ядерным матриксом – Хр-II (рис. б, 21 ч). Эта фаза клеточного цикла у пшеницы интересна тем, что в этот временной период наблюдается переход к репликации и синтезу ДНК.

Таким образом, в представленной работе показано, что в процессе инициации ростового морфогенеза зрелых зародышей яровой Артемовки и выведенной из нее Мироновской 808 озимой и вновь выведенной из последней Мироновской яровой пшеницы функционируют механизмы пространственно-временной реорганизации хроматиновых структур при участии *Arg-X* протеолиза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вавилов Н.И. Избранные труды. М.; Л.: Наука, 1965. Т. 5. С. 312–313.
2. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. С. 286.
3. Разин С.В. Пространственная организация эукариотического генома и работа эпигенетических механизмов // Генетика. 2006. Т. 42, № 12. С. 1605–1614.
4. Кэрри Н. Эпигенетика / Пер. с англ. Ростов н/Д: Феникс, 2012 (Nessa Carey. The Epigenetic Revolution. Icon Books Ltd. Omnibus Business Centre, 39-41 North Road, London №7 9DP, 2011)
5. Diaz B.M., Walker I.O. Trypsin digestion of core chromatin // Bioscience Reports. 1983. № 3. P. 283–292.
6. Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С. Анализ локализации протеазочувствительных сайтов *Arg-X* в динамике супраструктур интерфазного хроматина при индукции ростового морфогенеза зрелых зародышей пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений. 2012. Т. 44, № 6. С. 495–502.

7. Wong R. L., Gutowski J.K., Katz M., Goldfarb R.H., Cohen S. Induction of DNA synthesis in isolated nuclei by cytoplasmic factors: inhibition by protease inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84, № 1. P. 241–245.
8. Ремесло В.Н. Озимая пшеница Мироновская 264 и Мироновская 808. М.: Колос, 1964. С. 52–53.
9. 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.
10. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Способ выделения растительных клеточных ядер: а.с. 1701747, МКИ С12 № 9/50. Оpubл. 01.09.91, Бюл. № 48.
11. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Способ получения ядерных фракций, обладающих протеиназной и ингибирующей активностью: а.с. 1733471, МКИ С12 №9/50. Оpubл. 15.01.92, Бюл. № 18.
12. 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.
13. 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.



## **ARG-X PROTEOLYSIS IN SUPRAMOLECULAR STRUCTURES OF CELL NUCLEI DURING INDUCTION OF GROWTH AND MORPHOGENESIS**

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

This paper describes the peculiarities in protein dynamics and *Arg-X* proteolysis at different levels of spatial-temporal reorganization of interphase chromatin during germination of summer wheat, winter wheat converted from the summer crop and summer wheat reconverted from the same winter crop. It has been shown that the *Arg-X* proteolytic activity is clearly expressed and retained in the spatial-temporal reorganization at the level of chromatin bound tightly to the nuclear matrix of summer wheat.

Key words: *Triticum aestivum L.*, cell nucleus, *Arg-X* proteolysis, winter and summer wheats.