

# **Arg-X Proteo-Processing as Model System for Organization of Karyogenomics Interphase Chromatin of Mature Germs of Wheats, Formed in the Conditions of Cold Stress**

Ivanova E.A.

*Ufa institute of biology of the Russian Academe of Sciences, Ufa, Russia*

\*E-Mail: [evilinaai@mail.ru](mailto:evilinaai@mail.ru)

Received August 21, 2017

First experimental data on the epigenetics mechanisms of karyogenomics interphase chromatin of hexaploidy wheat are driven to terminologies of karyogenomics and epibiochemistry. The zones of localization of Arg-X of proteo-processing are educed in nonhistones and core histones, topological associated domens, in the cellular nuclear of mesocotyle of vegetative period of growth morphogeny of mature germs of wheat adapted to cold stress.

These data will be useful for those who involved in the development of mathematical logic schemes of the theory and practice of biological specificity, and it could be included in the ontology of the stages karyogenomics plant growth and development.

*Key words: Arginine-protease-processing, interphase, karyogenomics, winter wheat*

Пшеница – главный хлебный злак планеты. Ей занимались и занимаются многочисленные исследователи-селекционеры, улучшая её хозяйственно-полезные признаки методами селекции и гибридизации. Некоторые из созданных ими сортов стали эталонами современной селекции. На сложнейший экспериментальный поиск сочетаемости необходимых высококачественных признаков зерна и выведение уникальных сильных сортов уходят многие годы работы селекционеров, причем не всегда успешные. Поэтому над пониманием базовой основы закономерностей морфогенетического развития, особенно в условиях гибридизации растений, занимается биоинформационная наука, которая с этой целью разрабатывает эффективные информационно-компьютерные технологии, исходя из того, что в основе любого признака лежит генная сеть – функциональная группа координированно экспрессирующихся генов (Гунбин *и др.*, 2008; Омелянчук *и др.*, 2009). В ряде таких работ виртуально выделен их блочно-модульный характер, где блоки генных сетей образуют иерархическую структуру, в которой включение порядка и времени соответствуют формированию морфофизиологических компартментов (Гунбин *и др.*, 2008; Разин *и др.*, 2017). Связь между блоками генных сетей осуществляют сигнальные молекулы. По сравнению с биохимическими признаками, молекулярные механизмы адаптивной эволюции морфогенетических признаков изучены относительно слабо.

В настоящее время методический прогресс сильно продвинул понимание молекулярно-генетической организации интерфазного ядра. Становится очевидным, что функциональная динамика доменной топологии интерфазного хроматина вовлечена в контроль регуляции различных взаимосвязанных базовых процессов в определенных областях ядра. Мы предполагаем, что одним из механизмов в супрадоменной реорганизации хроматиновой матрицы, может являться Arg-X протеазо-процессинг. Это предположение основывается на том, что хроматин ядра богат аргинином (Иванова, Ахметов, 1987) и из

всех аминокислот только он способен связываться с ДНК (Волькенштейн, 1985; Патрушев, 2000; Смирнов, 2009).

Целью данной работы было рассмотрение кариогеномного анализа локализации Arg-X процессинга в топологически ассоциированных супраблоках гексаплоидной системы интерфазного хроматина в зрелых зародышах пшениц, адаптированных к холодному стрессу.

## MATERIALS AND METHODS

Объектом исследования служили семена суперэлиты пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Артемовки (*liform* – яровая; *SUBTAXA* - *lutescens*; *ORIGIN\_COUNTR* – Украина), Мироновской 808 (*liform* – озимая; *SUBTAXA* - *lutescens*; *ORIGIN\_COUNTR* – Украина), полученные из коллекции Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова. Использовался метод В.Н. Ремесло при выведении озимого сорта Мироновской 808 из яровой Артемовки.

Состояние воздушно-сухого семени и зародыша, находящиеся в состоянии биологического покоя, мы условно приняли за 0ч. Из воздушно-сухих семян (0ч), набухающих под водой в течение 3ч, а далее высеванных для прорастания (6ч); отделяли от эндосперма зародыши (Рис. 1А), из которых выделяли клеточные ядра, их надмолекулярные - топологически ассоциированные супраблоки: лабильный хроматин - нуклеоплазму (Нп), хроматин непрочно- (Хр-I) и прочно- (Хр-II) связанный с ядерным матриксом (ЯМ) и собственно ЯМ (Рис. 1В). Отделение негистоновых белков (Нгб) от гистонов, из выделенных супраструктур клеточных ядер (Рис. 1В), проводили методом ионообменной хроматографии. Трипсиноподобные комплексы (ТПК) из Нгб и гистоновых белков, 21ч-24ч проклюнувшихся из семени зародышах, выделяли методом аффинной хроматографии (Рис. 2). Arg-X протеазоактивность в супраблоках (Рис. 1В), а также в выделенных из них негистоновых и гистоновых белках (Рис. 1С) и, выделенных из последних ТПК, 21ч-24ч супраструктур клеточных ядер зародышей (рис.2) оценивали по расщеплению Arg-X связей в аргинин-

обогащенном белке – протамине- *Salmine-A-I* («Merk»).

Весь экспериментальный объем работы был разработан ранее (1970-1972гг) в аспирантуре по высокомолекулярным соединениям при институте химии БФ АН СССР в процессе выполнения кандидатской диссертации: Э.А. Ивановой «Модификация гистонов у растений и её физиологическое значение», а также в лаборатории математической и молекулярной генетики института биологии Уфимского научного центра РАН при выполнении (1986-1996гг) докторской диссертации: Э.А. Ивановой «Анализ клеточных ядер и их надмолекулярных структур при прорастании семян пшеницы». Подробно оформленные ссылки на вышеизложенный экспериментальный ход работы представлены ранее (Ivanova *et al.*, 2015; Ivanov *et al.*, 2015; Ivanov *et al.*, 2016).

## RESULTS

Для более наглядного восприятия экспериментальных данных представлено схематическое изображение распределения *Arg-X* протеолитической активности в супраблоках тотального интерфазного кариогеномного хроматина (Рис. 1В). Показано, что *Arg-X* активность усиливается у зародышей озимого сорта на уровне ядерного матрикса (рис 1В, 6ч) и не проявляется на уровне Хр-I (Рис. 1В, 0ч-6ч) по отношению к исходному сорту Артемовки (Рис. 1В, 0ч-6ч). Следующий этап работы заключался в выявлении конкретных ядерных белковых блоков, которые экспонируются к протеазо-чувствительности для восприятия позиционной информации. Схематично эти данные представлены на рис. 1С. Подробное графическое выражение содержания в супраблоках белка (пг/ядро), и локализации в них *Arg-X* процессинга (нмоль аргинина / (с · мкг белка), а также и в негистоновых и гистоновых белках тотального интерфазного кариогеномного хроматина представлено в работах (Иванова *и др.*, 2012; Иванова *и др.*, 2014; Ivanova *et al.*, 2015).

Экспериментальные данные схемы (Рис. 1) представлены в виде характеристики инициации физиологических особенностей набухающих семян (Рис. 1А) и описания динамики состояния тотального хроматина клеточных ядер (Рис. 1D). В супраблоках тотальной кариогеномной хроматиновой матрицы зрелых зародышей клеточных ядер озимой пшеницы в процессе набухания семян (Зч) происходит сначала экспонирование *Arg-X* протеазо-чувствительных зон в НI → ЯМ и в Нгб → Хр-I (Рис. 1С). В период активации морфогенетических процессов супраблоков тотального хроматина (Рис. 1С, 6ч) усиливается экспонированность Нгб → ЯМ, Хр-I, Хр-II, а также в коровых гистонах Н2А+Н2В → ЯМ, в отличие от ярового сорта Артёмовки, где происходит относительно равномерная экспонированность *Arg-X* активности гистонового кора Н3+Н4 → Нп (Рис. 1С, 0ч-6ч).

Ранее в работах (Ivanova *et al.*, 2015; Ivanov *et al.*, 2015) была подробно представлена характеристика: массы семян, их всхожести, массы зародышей в период воздушно-сухого состояния (0ч), набухания семян (Зч) и индукции ростовых морфогенетических процессов в интервалах через каждые Зч (Зч-18ч) до проклёвывания зародыша (21ч-24ч). Было показано, что различия между яровыми и озимыми семенами, используемыми в нашем эксперименте, уже проявляются на уровне их морфологической целостности. Эта особенность характеризовалась и по увеличенной всхожести семян озимой пшеницы по сравнению с яровой. Групповая – популяционная всхожесть семян (от 50-80% их жизнеспособности) характеризует коллективную сумму наследственных свойств фона «генетической целостности» генотипа всей группы. По массе семена озимой пшеницы также тяжелее яровой. По-видимому, это связано с накоплением трофической и защитной основы, необходимой зародышу, для выживания в стрессовых условиях окружающей среды. Кроме того, в период перед проклёвыванием и при проклёвывании происходит интенсивное увеличение массы зародыша озимых семян в сравнении с массой зародыша семян исходного ярового сорта.

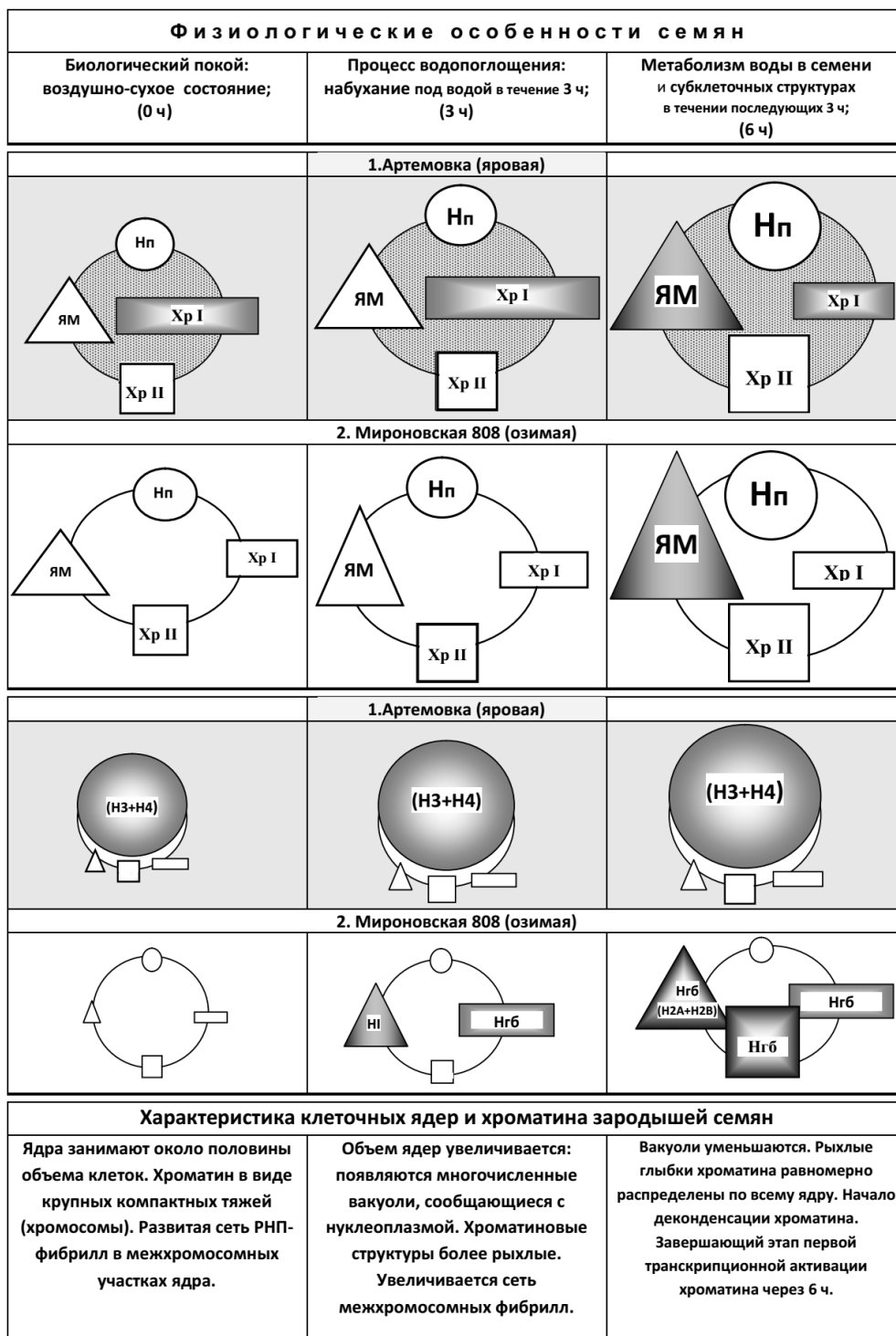
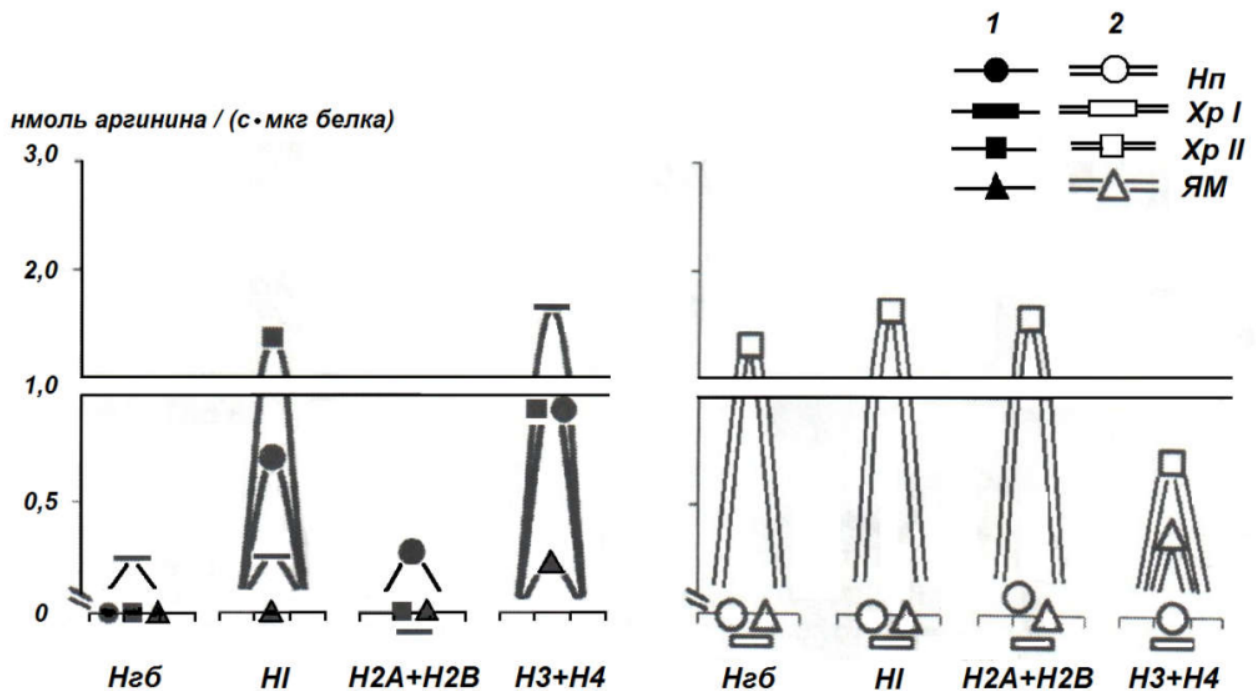


Figure 1. Схема локализации Arg-X системы протеазо-процессинга в супраблоках (B); Hгб и гистонах (C) интерфазных клеточных ядер зрелых зародышей пшеницы.

Примечание:

- Nп - нуклеоплазма-лабильный хроматин: диспергированные 10нм нити ДНК
  - ▭ XpI - хроматин → непрочн. зу. 30 нм нити ДНК
  - XpII - хроматин → прочносвязанный (гетеро-) с ЯМ
  - △ ЯМ - ядерный матрикс
- } супраструктуры клеточного ядра
- Hгб - негистоновые белки
  - HгI - линкерный лизинбогатый гистон
  - H2A+H2B - умеренно лизинбогатые } коровые нуклеосомные гистоны
  - H3+H4 - аргининбогатые
- РНП - рибонуклеопротеидные фибриллы.  
 Черный цвет указывает в каких супраструктурах (B) происходит локализация протеолитического процессинга негистоновых и гистоновых белков (C).



**Figure 2.** *Arg-X* протеазочувствительность в ТПК-негистоновых (H<sub>2</sub>б), линкерных гистоновых (H<sub>1</sub>) и коровых гистоновых (H<sub>2</sub>A+H<sub>2</sub>B; H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>) блоках супраструктур клеточных ядер зрелых 21ч-24ч проклюнувшихся зародышей пшениц сортов «Артемовки» (яровая) (1) и выведенной из неё, «Мионовской 808» (озимая) (2).

Примечание: нуклеоплазма (H<sub>n</sub>); хроматин непрочносвязанный с ЯМ (Xp I); хроматин прочносвязанный с ЯМ (Xp II); ядерный матрикс (ЯМ).

Глубинные молекулярные процессы вегетативного морфогенетического периода, связанные с памятью экологического стресса, мы решили рассмотреть на уровне *Arg-X* протеазо-процессинга белков супраблоков хроматиновой матрицы клеточных ядер, а также выделенных из H<sub>2</sub>б и гистонов ТПК проклюнувшихся зародышей (Рис. 2). Мы специально сфокусировали своё внимание на *Arg-X* протеазо-чувствительных ТПК, исходя из роли аргинина, участвующего в эволюционной стабильности аргининбогатых гистонов, и представили двухслойный рисунок, чтобы нагляднее показать участки в гетерополимерных супраблоках хроматиновой матрицы, где наиболее активно могут происходить динамические перестройки ядерного протеома (Рис. 2). Из представленного рисунка видно, что у озимого сорта (Рис. 2) наиболее

чувствительные к *Arg-X* протеолизу ТПК находятся в супраблоках хроматина - Xp-II.

## DISCUSSION

С целью проникновения в новую суть познания явления на другом уровне, для того, чтобы более четко осознать особенности объекта исследования, в настоящее время считают необходимым введение новых базисных терминов в биоинформатике. Для уточнения особенностей объекта исследования полиплоидной геномной организации был введен термин «кариотип» с целью обозначения систематической единицы (рода), объединяющей группу видов, кариологически однотипных. Ядро гексаплоидной пшеницы (*Triticum aestivum* L.) состоит из 3-х гаплоидных наборов хромосом: **A<sup>U</sup> B D**. Таким образом, это уже является комплексом - совокупностью «геномов», кариогеномика которого

представлена тремя кариотипами, в каждом из которых по 7 хромосом. Направление науки, которое исследует особенности организации и эволюции «геномов» и субгеномов в исходно полиплоидных ядрах предлагают называть «кариогеномикой» (Зеленин *и др.*, 2016). Известно, что филогенетика работает на матричном полногеномном анализе, включающим в себя транскриптомику и протеомику.

Следует отметить, что специфика современного этапа развития «геномики» эукариот состоит в том, что до настоящего времени активно секвенируются, в основном, «геномы» диплоидных организмов, с целью полногеномного анализа, притом на модельных растениях с малым геномом. Однако известно, что магистральный путь эволюции геномов растений – это межвидовая гибридизация и полиплоидизация. Трудности в изучении гексоплоидного генома пшеницы *Triticum aestivum* состоят в том, что его размер составляет 16 000-18 000 миллионов пар нуклеотидов (Зеленин, 2003). В своё время термин «геном» был предложен для обозначения гаплоидного (единого) набора хромосом (Зеленин *и др.*, 2016).

Предложено в условиях эпигенетической адаптации организмов к окружающей среде применять термин «эпибиохимия» (Бурьянов, 2015). К числу таких условий относится яровизация растений как эпигенетически адаптивный процесс, сопровождающийся изменением конформационной структуры кариогеномного интерфазного хроматина. В связи с этим обсуждаются особенности эпигенетических механизмов наследования приобретенных признаков и границ биологической эволюции (Бурьянов, 2015; Яблоков, 2017).

В нашем эксперименте яровизация пшеницы, в её филогенетическом статусе - озимости, выполняет роль наиболее яркого модельного объекта для исследования эпигенетического адаптивного процесса ускорения цветения растений (в результате раннего вегетативно-длительного периода действия пониженной температуры), сопровождающийся перепрограммированием экспрессии генов, контролирующих цветение. Таким образом, регулярно повторяющиеся факторы окружающей

среды и ответные реакции организма на них запоминаются и эпигенетически перепрограммируются в виде адаптивного ответа. Другими словами, формирование адаптивного ответа у всех организмов осуществляется через эпигенетические изменения с целью образования фенотипов (эпигеномов), наиболее приспособленных к условиям окружающей среды, что наводит на мысль о том, что развертываемые формы уже предсуществуют в готовом матричном плане биологии развития организма (Бурьянов, 2015; Яблоков, 2017).

Геном высших растений характеризуется большим количеством ядерной ДНК, что связано с наличием повторяющихся последовательностей. Нуклеотидные последовательности, в зависимости от их повторяемости, делят на многократно ( $10^3$  -  $10^6$  раз) и умеренно повторяющиеся ( $10^2$  -  $10^3$  раз). К первым относят обращенные повторы, сателлитную ДНК, рибосомные гены (Шапошников, Кадыков, 1986).

При реассоциации ДНК ведет себя как многокомпонентная система. О функциональном значении палиндромов в организации ДНК высказываются многочисленные предположения. Последовательности сателлитной ДНК расположены в гетерохроматиновых областях хромосом. Одной из характерных особенностей этих зон является их способность к слиянию гетерохроматиновых зон гомологичных и негомологичных хромосом с образованием центромеров.

До периода установления определенной стабильности возникшего кариотипа, в каждом из исходных предковых геномов происходили множественные изменения, и только 10% генов из тех, что содержались в каждом исходном предковом геноме, остались активны, поскольку большинство паралогических генов в гомеологах утрачиваются или инактивируются. Логическим развитием функциональной «геномики» стала протеомика. Эта новая область науки, изучающая протеом, под которым подразумевают полный набор белков в клетке (в нашем случае: это полный набор белков в пространственно - временной тотальной

реорганизации кариогеномного интерфазного ядра) в конкретный момент.

В данной работе в качестве возможного механизма архитектурной топологической реорганизации кариогеномной хроматиновой матрицы рассматриваются особенности *Arg-X* протео-процессинга в связи с состоянием клеточных ядер зрелых зародышей при инициации динамики набухания семени (Рис. 1) и формировании в проросшем зародыше (Рис. 2), сигнального «языка» апикальных меристем побега и корня, обеспечивающих пластичность, координированный и одновременный рост различных тканей.

ДНК растений относится к нуклеиновым кислотам АТ-типа, содержащим много рибосомных генов. Считается, что участки обогащенные АТ-парами, топологически связаны с гомологичными повторами, то есть входят в их состав и локализуются рядом. Вполне вероятно, что выявленная позиционирующая *Arg-X* активность, имеющая место в определенных супраблоках (Рис. 1В; 2), при участии ядерного протеома (Рис. 1С; 2), может способствовать перепрограммированию кариогеномной хроматиновой матрицы при комплексировании с АТ-богатыми участками двухтяжевой ДНК, в которых происходит изгиб макромолекулы (Смирнов, 2009). На V-ом съезде биофизиков России (2015) в докладе: «О белок/ДНК узнавании и их взаимодействии» М.С. Гельфанд сообщил, что есть подтверждение того, что из всех аминокислот только аргинин узнает любой гуанин и тимин.

В интерфазном хроматине пшеницы 42 хромосомы развернуты в виде хромонемной нити. В последнее время появились работы, которые подтверждают, что физическую связь между хромосомами осуществляет межхромосомная нить, которая разрывается под действием ДНК-азы, а под действием трипсина и РНК-азы она становится менее упругой. Межхромосомная нить состоит из сателлитной ДНК и сателлитсвязывающих белков (Подгорная и др., 2005).

К наиболее значительным открытиям настоящего времени принадлежит выяснение расположения хромосом в интерфазных ядрах и то, что их

структура контролируется как генетическими, так и экологическими факторами (Pawlowski, 2010; Tiang et al., 2012).

В зоне ассоциации интерфазных хромосом с ЯМ имеются два типа последовательностей: короткие (150 п.н.) и длинные, которые идентифицированы как сателлитная ДНК (Иванова, Вафина, 2006). При воздействии низких положительных температур происходит накопление рРНК в клетках апикальной меристемы озимых сортов пшеницы и увеличение синтеза рРНК. Интенсивное чередование у злаковых коротких и уникальных последовательностей, вероятно, отражает путь развития кариогенома.

Таким образом, вышеприведенные результаты экспериментального анализа эпигенетических механизмов кариогеномной реализации эпигенетической информации выявили зоны локализации *Arg-X* протеазо-процессинга находящиеся, главным образом, в Hgб и коровых гистонах H2A+H2B ядерных супраблоков в мезокотиле вегетативного периода ростового морфогенеза зрелых зародышей пшеницы адаптированной к холодному стрессу (Рис. 1, Рис. 2).

Основная задача кариогеномики – создание методических основ в направлении изучения происхождения видов, их эволюции и сравнительной геномики, а также определения синтении (сцепление генов) хромосом в родственных геномах. О регуляции и стабилизации протеомики в сложной системе динамики кариотипа вообще нет никаких данных. Однако протеомика является тем связующим звеном, которое определяет закономерности структурной организации генетической матрицы при познании путей эволюции.

В базах данных хранится большое количество информации, но она не всегда позволяет провести полноценный сравнительный анализ. В связи с этим интересны разработки более гибких систем, основанных на моделировании непрерывных сигналов. Возможно вышеприведенные экспериментальные данные позволят установить связь с виртуальными данными относительно полимерной самоорганизации (Разин и др., 2017) при

участии аргинина в топологически ассоциированных доменах хроматиновой фибриллы.

## ACKNOWLEDGEMENT

Выражаю огромную благодарность за терпеливую, насыщенную работу в проведении хода эксперимента, научному коллективу сотрудников: Г.Х. Вафиной, Р.С. Иванову, Л.М. Карповой-Терещенко; особо ценю оригинальную неоднозначность д.б.н., проф. Р.Н. Чураева.

## REFERENCES

- Бурьянов Я.И. (2015) Адаптивная эпигенохимия и эпигенетика. *Биохимия*, **80(9)**, 1376-1390.
- Волькенштейн М.В. (1985) Биополимеры и эволюция. *Молекулярная биология*, **19(1)**, 55-65.
- Гунбин К.В., Суслов В.В., Колчанов Н.А. (2008) Молекулярно-генетические системы развития: динамика функционирования и молекулярная эволюция. *Биохимия*, **73(2)**, 270-282.
- Зеленин А.В. (2003) Геном растений. *Вестник РАН*, **73(9)**, 797-806.
- Зеленин А.В., Родионов А.В., Большова Н.Л., Бадаева Е. Д., Муравенко О.В. (2016) Истоки «генома»: происхождение и эволюция термина. *Молекулярная биология*, **50(4)**, 611-620.
- Иванова Э.А., Ахметов Р.Р. (1987) Модификация негистоновых белков в проростках растений. *Физиология растений*, **34(3)**, 507-512.
- Иванова Э.А., Вафина Г.Х. (2006) Анализ надмолекулярных структур клеточного ядра при активации хроматина. *Доклады Академии Наук*, **406(3)**, 419-421.
- Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С. (2012) Анализ локализации протеазо-чувствительных сайтов Арг-Х в динамике супраструктур интерфазного хроматина при индукции ростового морфогенеза зрелых зародышей пшеницы. *Физиология и биохимия культурных растений*, (Киев). **44(6)**, 495-502.
- Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С. (2014) Анализ локализации протеазо-чувствительных сайтов Арг-Х в динамике супраструктур интерфазного хроматина при индукции ростового морфогенеза зрелых зародышей яровой и озимой пшеницы. *Физиология растений и генетика*, (Киев). **46(3)**, 202-211.
- Омельянчук Н.А., Миронова В.В., Колчанов Н.А. (2009) Генетика развития растений: интеграция информации из различных наблюдений и экспериментов в базах данных. *Генетика*, **45(11)**, 1476-1492.
- Патрушев Л.И. (2000) Экспрессия генов. М. Наука, 830с.
- Подгорная О.И., Кузнецова И.С., Енукашвили Н.И., Шатрова А.Н., Аксёнов Н.Д., Зенин В.В., Нониашвили А.Н., Дыбан А.П. (2005) Исследование «нити», связывающей хромосомы. *Цитология*, **47(9)**, 825.
- Разин С.В., Гаврилов А.А., Кос П., Ульянов С.В. (2017) Самоорганизация хроматиновой фибриллы в топологически-ассоциированные домены. *Биоорганическая химия*, **43(2)**, 115-123.
- Смирнов А.Ф. (2009) Структурно-функциональная организация хромосом. Санкт-Петербург: Нестор-История, 204 с.
- Шапошников Я.Д., Кадыков В.А. (1986) Структура ядерного генома высших растений. *Успехи современной биологии*, **102(1(4))**, 142-154.
- Яблоков А.В. (2017) О механизме эволюции на экосистемном уровне организации жизни. *Журнал общей биологии*, **78(2)**, 74-80.
- Ivanov R.S., Ivanova E.A. and Vafina G.H. (2016) Features of localization of Arg-X protease-processing in the suprastructures of interphase chromatin under conditions of cell cycle arrest by sodium butyrate, upon induction of growth morphogenesis of mature embryos of winter and spring wheat. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, **12(3)**, 57-69.
- Ivanov R.S., Tereshchenko L.M., Vafina G.H. and Ivanova E.A. (2015) Molecular mechanisms of Processing Proteome Reorganization of Interphase Chromatin During Stress and Adaptation to Winter in Wheat. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, **11(2)**, 5-15.
- Ivanova E.A., Vafina G.H. and Ivanov R.S. (2015) Initial



- 
- morphogenetic features of proteome of suprastructures of interphase chromatin for germination of mature germs in conditions of adapting to winter in wheat. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, **11(4)**, 29-42.
- Pawłowski W.P. (2010) Chromosome organization and dynamics in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **13**, 640–645.
- Tiang C.L., He Y. and Pawłowski W.P. (2012) Chromosome organization and dynamics during interphase, mitosis, and meiosis in plants. *Plant Physiol.*, **158**, 26–34.