

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

УДК: 576.312.32

КОМПАКТИЗАЦИЯ ХРОМАТИНА И ОСОБЕННОСТИ «ГИСТОНОВОГО КОДА» У РАСТЕНИЙ

Решетников В.Н.

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси» Минск 220012, ул. Сурганова 2В, e-mail: biolog@it.org.by

Геном, упакованный в хроматин, несет всю необходимую для построения растительного организма информацию. В то же время функциональное состояние клеток и тканей при их дифференцировке и дальнейшем развитии растения определяется дополнительной эпигенетической информацией, которая представлена метилированием цитозина ДНК и маркированием коровых гистонов различными пост-трансляционными модификациями. Если природа кода ДНК универсальна для всех живых организмов, то природа гистонного кода и механизмы его расшифровки отличны у животных и растений. Клетки растений обладают особой способностью (тотипотентностью) генерировать целое растение из одной клетки, что обусловлено специфическим контролем эпигенетической информации у растений, отличным от животных. В статье представлен обзор современных данных по структурной организации хроматина с акцентированием внимания на различных вариантах и модификациях гистонов как одного из основных механизмов эпигенетического контроля над реализацией генетических программ, заложенных в геноме растений.

Уровни организации хроматина. У высших растений количество ДНК на клетку варьирует между видами и может отличаться в сотни раз. Например, такой представитель однодольных растений как рожь имеет размер генома 9000 Мбр, тогда как арабидопсис – 130–140 Мбр, в то же время геном многолетней сосны состоит из 23000 Мбр, а дуба – из 200 Мбр. Длинные цепи хромосомной ДНК в эукариотическом ядре компактизованы по длине приблизительно в 10000 – 30000 раз в хромосомы, форма которых позволяет регуляторным белкам получать доступ к ДНК и включать или выключать определенные гены (транскрипция) или удвоить хромосомную ДНК (репликация). Разные виды растений сильно отличаются друг от друга по числу хромосом в диплоидном наборе: $2n$ варьирует от 4 до более 1000. Разделение геномной ДНК на независимые хромосомы является фундаментальной чертой строения генома эукариот. Компактизация ДНК в хроматин достигается с помощью белков, основную функцию среди которых выполняют гистоны. Связываясь с ДНК, гистоны образуют белок-ДНК структуры – нуклеосомы, чем достигается первый уровень упаковки хроматина. Формирование нуклеосомы компактизует ДНК приблизительно в 7 раз в ее линейном измерении. Под электронным

микроскопом нуклеосомы представляют из себя бусины диаметром 10-11 нм, вокруг которых распределяются ~ 2 нм нити ДНК [1, 2]. Фрагмент ДНК из 146 пар оснований обернут вокруг кора –основы нуклеосомы, который образован 4 парами гистонов: по 2 гистона H2A, H2B, H3 и H4. В гистоновом коре различают два домена. Первый домен – глобулярный центральный – состоит из наиболее консервативных участков гистонов, в которых преобладают гидрофобные аминокислотные остатки, необходимые для белок-белкового узнавания. Именно на этих участках образуются специфические гистоновые комплексы – тетрамер из 2-х гистонов H3 и 2-х H4 и димер H2A-H2B. Второй домен – концевые неструктурированные области белка с высоким содержанием положительно заряженных аминокислотных остатков, так называемые N- терминальные "хвосты" гистонов H3 и H4 и N- и C-терминальные и лабильные "хвосты" H2A и H2B гистонов.

«Линкерный» гистон H1 связывается с 40-70 парами оснований линейной ДНК, которая отделяет смежные коровые частицы, и определяет второй уровень компактизации ДНК, при котором нуклеосомные нити укладываются в фибриллы диаметром ~30 нм [3, 4]. Под электронным микроскопом эти фибриллы кажутся спиральными структурами приблизительно с шестью нуклеосомами на оборот. Данный уровень компактизации упаковывает ДНК ~ в 40 раз в ее линейном измерении.

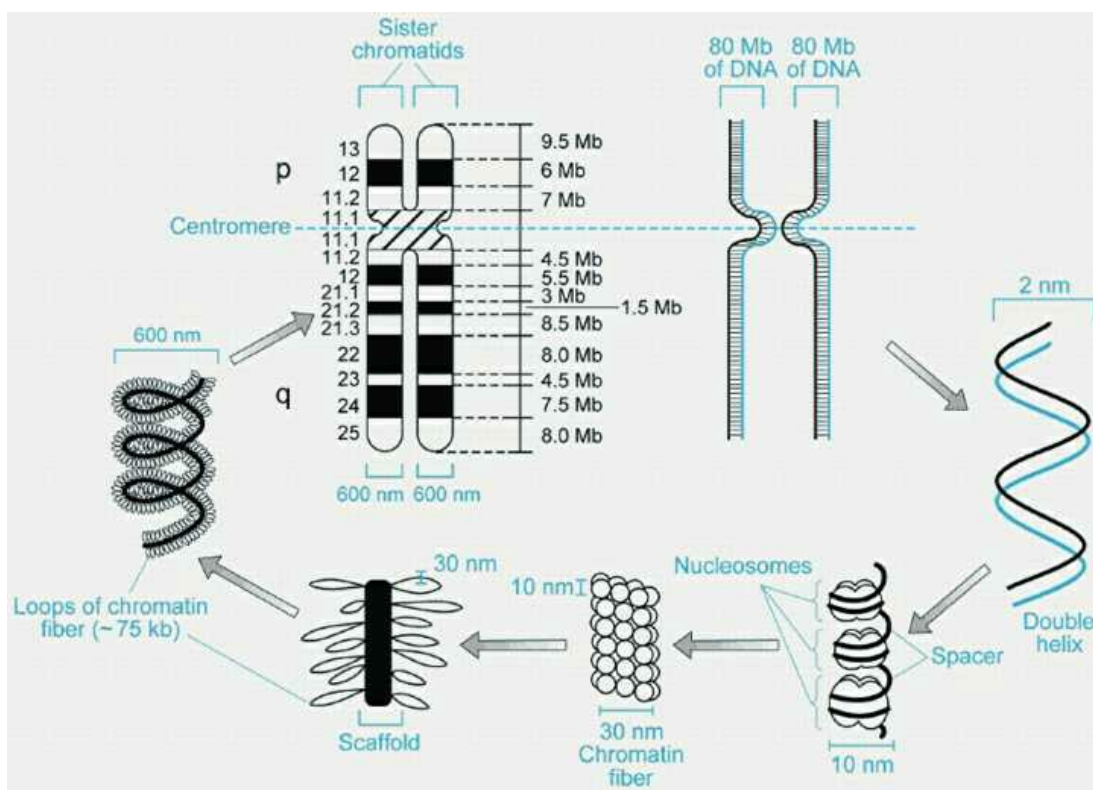


Рис.1 Схема многоуровневой организации хроматина у эукариот (ссылка)

Уровни организации хромосом сверх 30 нм нитей хроматина менее поняты. Электронные микрографии, сделанные Laemmli и его коллегами в конце 1970-х годов [5,6] обеспечили основу для современных моделей высших уровней компактизации ДНК, одной из которых является петельная структура хроматиновых фибрилл. Эти петли начинаются и заканчиваются в одной и той же точке, где ДНК привязана к каркасу в основании петель. Петли хроматина состоят из 180 – 300 нуклеосом, закрученных в 30 нм фибриллу [6]. Каждая петля, организованная таким способом, объяснила бы ~ 700-кратную упаковку ДНК относительно длинной оси хромосомы. На поперечном разрезе петли исходят лучами от каркаса, как лепестки в ромашке. Полагают, что места прикрепления соседних петель расположены по спирали по длинной оси метафазного каркаса [6, 7]. Организация из 15-18 таких петель на оборот вдоль хроматиды насчитывала бы ~1,2 миллиона пар оснований ДНК [8]. (8 Nelson и др., 1986). Эта структура предсказывает укладку петель в цилиндр хроматина ~800-1000 нм по толщине, который хорошо согласуется с диаметром метафазной хромосомы [6, 8].

Транскрипционно активный и неактивный хроматин. Хромосомы в клеточных ядрах могут находиться в двух структурно-функциональных состояниях: 1) в состоянии метаболического покоя на стадии митоза при максимальной конденсации хромосом, когда происходит распределение и перенос генетического материала в дочерние клетки; 2) в рабочем состоянии в интерфазе, когда протекают процессы транскрипции и репликации. Эукариотические хромосомы в интерфазных ядрах образуют особые области, которые различимы при световой микроскопии с высоким разрешением. Эти области состоят из двух хроматиновых форм: рыхло упакованного эухроматина, содержащего большинство активно экспрессирующихся генов, и более конденсированного гетерохроматина, преимущественно связанного с транскрипционно неактивными, имеющими мало генов последовательностями ДНК.

Существует два типа гетерохроматина: конститутивный и факультативный. Области хромосом, которые конденсируются во всех клетках организма, являются конститутивным гетерохроматином, а те, что конденсируются лишь в определенных клетках – факультативным.

Функциональное значение факультативного гетерохроматина более очевидно, чем конститутивного. Он, вероятно, отражает устойчивые различия в характере генетической активности клеток различных типов. Общее количество факультативного гетерохроматина варьирует в различных клетках: в эмбриональных клетках его совсем немного, тогда как высокоспециализированные клетки отличаются чрезвычайно высоким его содержанием. Принято считать, что по мере развития клетки все больше и

больше генов становятся неактивными из-за того, что соответствующая ДНК приобретает специфическую конденсированную конформацию, и это не позволяет генам взаимодействовать с белками-активаторами. Большая часть участков конститутивного гетерохроматина содержит сателлитную ДНК, тогда как в факультативном гетерохроматине ее практически нет.

Факультативный гетерохроматин, иногда неразличимый микроскопически, встречается в различных местах внутри эухроматических областей [9]. Он может быть транскрипционно неактивным в одних клетках и на одной стадии развития и активным в других. Присутствие гетерохроматинизированных участков в нормальной эухроматической области указывает на сложность структурных изменений в хроматине. Помимо транскрипционного замолкания, другие характерные черты типичного гетерохроматина включают позднюю репликацию в течение S-фазы и ингибиторное воздействие на мейотическую рекомбинацию [10]. Гетерохроматиновое состояние способно распространяться: например, эффект замолкания одних генов может влиять на близлежащие эухроматиновые гены (феномен, известный как позиционный эффект раскрашивания (PEV – position effect variegation)) [12]. При этом важно отметить, что гетерохроматин может передаваться через митоз, формируя основу эпигенетической наследственности и клеточной памяти.

Эухроматин отличается от гетерохроматина не только структурно, но и по месту локализации в ядре. В интерфазных клеточных ядрах эукариот эухроматин располагается обычно в средней части ядра, а гетерохроматин – по периферии вдоль ядерной оболочки (рис. 2).

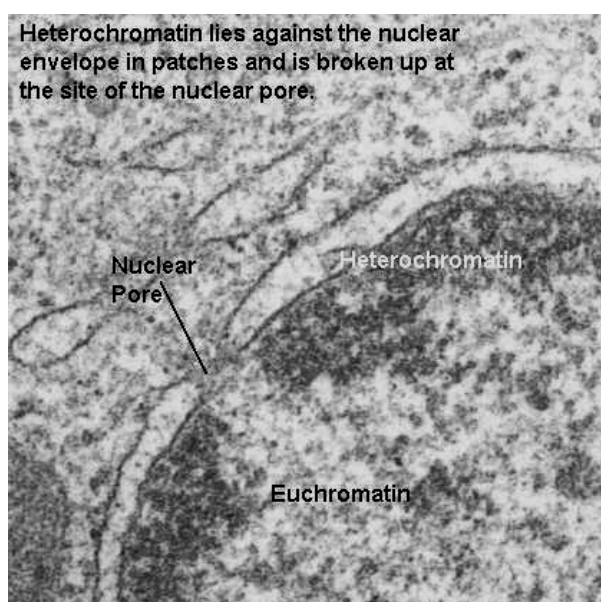


Рис. 2. Расположение эу- и гетерохроматина в ядре эукариотической клетки

Также типы хроматина клеточного ядра характеризуются определенными биохимическими свойствами. Конститутивный и факультативный гетехроматины различаются по типу последовательностей ДНК, которые они заключают в себе, но сходны по некоторым чертам модификаций белковых компонентов. В эукариотах от *Schizosaccharomyces pombe* до человека, включая растения, гетерохроматину свойственна модификация «хвоста» гистона H3, а именно – метилирование остатков лизина в позиции 9 (Lys9), что обозначается как H3K9Met (histone H3 metylated at the position lysine 9), и лизина в позиции 27 (Lys27), а также низкими уровнями ацетилирования коровых гистонов. В то же время эухроматину свойственно метилирование гистона H3 по Lys4 и высокий уровень ацетилирования коровых гистонов. Для транскрипционно неактивного гетерохроматина характерна модификация ДНК, заключающаяся в метилировании цитозина, а также присутствием в его определенных областях специфических негистоновых белков. Из них наиболее специфичными являются гетерохроматиновый белок 1 (HP1), образующий хромодомены, находящиеся преимущественно в центромерных и теломерных областях, и поликомб (Pc – polycomb), связанный с замолкнувшими эухроматиновыми генами [13]. Следует отметить, что HP1 также связан с репрессией эухроматиновых генов (1)). Оба вышеупомянутых белка способны формировать высокоупорядоченные олигомерные или мультимерные сети. Установлено, что HP1 комплементарен гистону H3, метилированному по Lys9, а Pc – гистону H3, метилированному по Lys27 [14]. В целом, отличия между эу- и гетерохроматином суммированы в таблице 1.

Модификации хроматина и генная регуляция. Гистоны, образующие нуклеосомы, принадлежат к белкам с наиболее консервативной первичной структурой в ряду от простейших эукариот до высших. "Хвосты" гистонов выходят на поверхность хроматиновой фибриллы, они очень подвижны, участвуют в межнуклеосомном взаимодействии и подвергаются многочисленным модификациям. Среди последних – ацетилирование, фосфорилирование, метилирование, убиквитинилирование и АДФ-рибозилирование. Эти модификации приводят к изменению заряда, гидрофобности и других свойств поверхности белковых глобул.

В последние годы стало ясно, что все эти свойства "хвостов" гистонов в структуре нуклеосомы имеют чрезвычайно важное значение для понимания механизмов функционирования хроматина при активации / репрессии генов и многих других процессов, связанных с доступом к ДНК. Наиболее разработанной в настоящее время моделью функционирования хроматина считается "гистоновый код", представляющий собой разнообразный набор модификаций гистоновых "хвостов" на поверхности нуклеосом, который способен меняться и передаваться по наследству. Имен-

но он и определяет функциональное состояние гена. "Гистоновый код", по-видимому, является основным эпигенетическим механизмом, контролирующим включение или выключение генов и передачу программы этого контроля по наследству от клетки к клетке. Таким образом, многочисленные модификации гистоновых "хвостов", экспонированные на поверхности хроматиновой фибриллы, и их комбинации, огромный набор специализированных ферментов и белковых комплексов, узнающих эти комбинации, позволяют записать очень сложную программу последовательности включения-выключения генов.

Таблица 1.

Сравнительная характеристика эухроматических и гетерохроматических районов интерфазных хромосом

Показатели	Эухроматин	Гетерохроматин факкультативный	Гетерохроматин конститутивный
Активность	Активный	Неактивный	Неактивный
Структура	Диффузный	Конденсированный	Конденсированный
Синтез РНК	Есть	Нет	Нет
Синтез ДНК	Есть	Есть	Есть
Тип нуклеотидных последовательностей	Уникальные, умеренные повторы	Уникальные, умеренные повторы	Высокоповторяющаяся сателлитная ДНК
Локализация в интерфазном ядре	Центральная часть ядра	По периферии вдоль ядерной оболочки	По периферии вдоль ядерной оболочки
Локализация в хромосомах	Плечи хромосом	Плечи хромосом	Центромера, теломера, интеркалярный гетерохроматин
Биохимические маркеры	гистон H3 метилированный по Lys4; общий высокий уровень ацетилирования коровых гистонов; отсутствие метилирования ДНК	Гистон H3 метилированный в позиции lysine 9 и 27; гетерохроматиновый белок 1 (HP1); общий низкий уровень ацетилирования гистонов; метилирование цитозина ДНК	Гистон H3 метилированный в позиции lysine 9 и 27; гетерохроматиновый белок 1 (HP1); поликомб (Pc – polycomb); общий низкий уровень ацетилирования гистонов; метилирование цитозина ДНК

В ходе эволюции растения приобрели специфические механизмы генетической регуляции, отличные от таковых у животных, что, по-видимому, связано с сильными различиями в системе роста и развития растений и животных. У растений морфогенез и рост продолжают в течение всего жизненного цикла и определяется клеточным делением и рас-

тяжением. Тотипотентность растительной клетки можно свести к одной клетке, которую можно выделить и она даст начало целому растению при определенных условиях культивирования. К тому же растительные клетки более подвержены влиянию условиям окружающей среды, благодаря своей иммобильности. Установлено, что гистоновый код растений отличается от такового животных, что обусловлено особенностями модификаций гистонов у растений. Данные особенности касаются специфичности сайтов модификации, всего семейства ферментов HDAC, вовлеченных в эти процессы модификаций, а также конкретных путей регулирования активности этих ферментов.

В растениях остатки лизина N-терминальных хвостов гистонов H3 и H4 подвергаются модификациям, отличающимся от других эукариот. Растительный гистон H4 может быть как метилирован, так и ацетилован по лизину-20 (рис.3). При этом образуется пента-ацетилованный гистон H4 [63]. У животных и грибов этот сайт по лизину-20 подвергается только метилированию. Таким образом, у растений данный сайт, по-видимому, может работать как функциональный переключатель. Такую же роль у растений выполняет и лизин-9 гистона H3: он может как метилироваться, так и ацетилироваться, при этом метилирование лизина-9 влияет на фосфорилирование серина-10, который в свою очередь затрагивает ацетилирование лизина-14. На рисунке 3 красной рамкой выделен лизин-9 гистона H3. Эта взаимозависимость различных модификаций, по-видимому, представляет ключевой элемент комплексного «гистонового кода» растений [65, 66]. Также было установлено, что у растений фермент ZmHAT-B специфически ацетилюет лизин 5 и 12 гистона H4, а деацетилаза ZmRpd3 – специфически деацетилюет эти сайты [67]. Только для растений характерно специфическое ацетилирование лизина 20 гистона H4 и метилирование лизинов 14, 18, 23 гистона H3. Принимая во внимание, что нуклеосома включает в себя по две молекулы каждого из коровых гистонов, модификация пары молекул H4 и пары H3 может давать начало множеству комбинаций «гистонового кода».

Растения также отличаются уникальным семейством HDAC – ферментов. В отличие от животных и грибов, растения характеризуются HD2 типом HDAC ферментов [15, 16]. HD2 немного напоминает цис-транс изомеразы по отношению к ДНК последовательностям, однако функционально отличен [15]. Ферментативная активность HD2 риса зависит от фосфорилирования [16, 17]. HD2 может выполнять разные специфические для растений функции. Проведенный детальный филогенетический анализ указывает на то, что во время эволюции у растений могла произойти дупликация гена, предполагая функциональные различия в HD2 типе ферментов[18]. В этом смысле интересно, что геном Арабидопсиса со-

держит все 16 видов HDAC белков [www.chromdb.org/], что гораздо больше числа соответствующих генов в других эукариотических организмах вне царства растений. Большинство этих HDAC еще не полностью охарактеризованы, и еще не совсем понятно, выполняют ли они гистон-специфичную функцию *in vivo*. Может случиться так, что различные суб-типы имеют разные функции для определенных генов или областей хроматина.

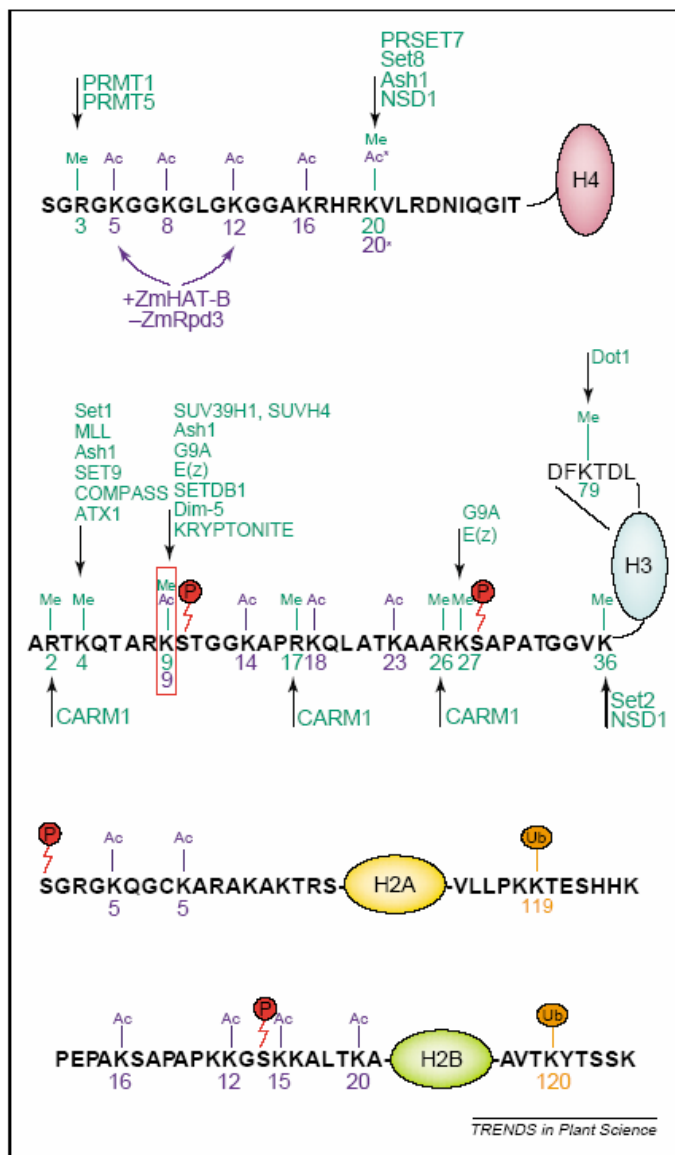


Рис.3. Коровые гистоны являются мишенями для пост-трансляционных модификаций определенных а.к. остатков. Это может быть ацетилирование (Ac), метилирование (Me), фосфорилирование (P), убиквитинирование (U).

Гистон деацетилаза ZmHDA1 пост-трансляционно регулируется ограниченным протеолизом. Недавно на рисе было показано, что активность фермента HDA1 регулируется ограниченным протеолизом.

ZmHDA1 синтезируется как ферментативно неактивный белок с М.м. 84 кД и переходит в ферментативно-активную форму при перестройке в форму 48 кД путем протеолитического удаления С-терминальной части, предположительно при помощи промежуточного белка в 65 кД. Интересно, что предшественник с мол. массой 84 кД – часть 300 кД мультибелкового комплекса с неизвестной функцией (рис. 4.).

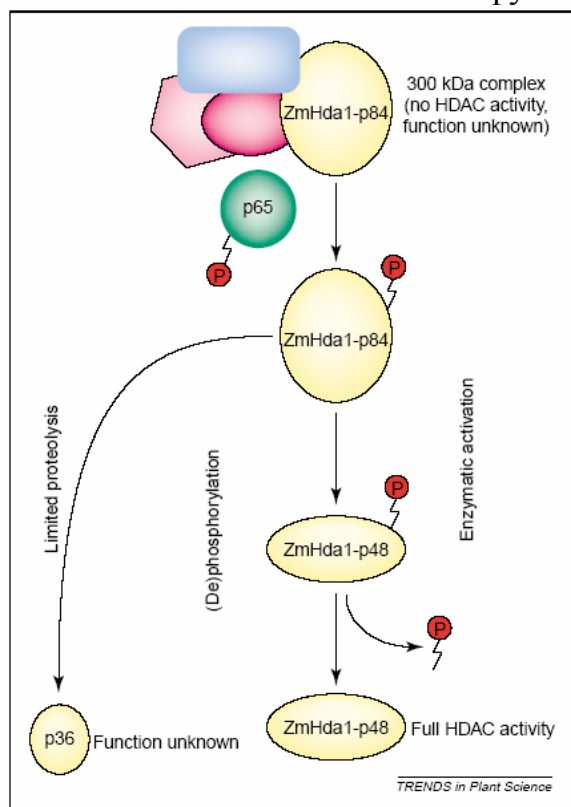


Рис. 4. На примере риса показано, что фермент HDA1 (ZmHDA1-p84) регулируется ограниченным протеолизом и (де) фосфорилированием. В рисе деацетилаза HDA1 синтезируется как ферментативно неактивный белок, который является частью 300 кД комплекса с неизвестной функцией. Активная форма фермента HDA1-p48 возникает при протеолитическом отщеплении, включающее 65 кД промежуточный белок. HDA1-p48 набирает полную силу ферментативной активности и субстратной специфичности после дефосфорилирования. После протеолитического отщепления возникает белок p36 с неизвестной функцией, идентифицированный в Арабидопсисе.

Только после процессинга 48 кД деацетилаза может эффективно участвовать в репрессии транскрипции в репортерном анализе генов. Арабидобсис содержит не только HDA1-гомологичный ген (AtHda5; NP_200914), но также отдельные гены, кодирующие малый белок в 252 а.к остатка (Atg61050; NP_200913), и этот белок высоко гомологичен С-терминальному остатку протеолитического отщепления ZmHDA1. Предшественник в 84 кД и промежуточная форма размером в 65 кД – все эти белки фосфорилированы. Дефосфорилирование белка в 48 кД стимулирует ферментативную активность и меняет субстратную специфичность [19]. У млекопитающих HDAC1-форма так же фосфорилирована, при этом показано, что эта модификация увеличивает как ферментативную активность, так и образование комплекса. Возможно фосфорилирование ZmHDA1 определяет превращение в этом ряду компонентов, т.к. ферментативно активная форма в 48 кД, которая в основном дефосфорилирована, работает как белковый мономер. Пример регулирования HDA1 у риса путем органи-

ченного протеолиза возможно является универсальным растительно-специфическим уровнем HDAC регуляции.

Варианты гистонов могут определять состояния хроматина. Несмотря на то, что основное внимание биохимиков уделяется модификациям гистонов, альтернативным способом маркировки хроматина является – включение вариантов гистонов (таблица 2). Гистоновыми вариантами называют белок, структура которого в основном совпадает со структурой гистона, но свойства несколько изменены из-за того, что по некоторым функциональным доменам происходят аминокислотные замены. Как уже было сказано ранее, межнуклеосомные взаимодействия и распознавание хроматиновой фибриллы различными факторами определяются "хвостами" гистонов, экспонированными на поверхности фибриллы. Структуру хроматина можно изменять, модифицировав "хвосты" этих гистонов, однако можно заменить целиком весь гистон (гистоновый вариант). В обоих случаях достигается заметный результат.

Таблица 2

Нуклеосомные гистоны и их варианты

Гистоны	Свойства
H2A, H2B, H3 and H4	канонические основные гистоны, которые кодируются ger- lication-coupled генами.
Архаичные гистоны	белки с гистоновой связью без хвостов, найденные в еди- нично закрученных тетрамерных единицах, которые включают нуклеосомные частицы
H2A.Z	H2A вариант, который имеет отличительный домен и за- мены в N-концевом "хвосте"; найден почти у всех эукариот
MacroH2A	Характерный для позвоночных вариант H2A с С- терминальной глобулярной областью располагается на X- хромосоме.
H2A-Bbd	Специфичный для позвоночных H2A вариант, который распространен широко; не выявлен на X-хромосоме
H2A.X	H2A вариант один из аминокислотных остатков на С- конце гистона подвергается фосфорилированию в ответ на двухцепочечный разрыв ДНК
SenH3	центромерная форма H3; с характерными N- терминальными хвостами, которые отличаются по длине и последовательности
H3.3 (H3.2 у растений)	H3 вариант, который вытесняет канонический H3 гистон из нуклео- сомы и отличается в положении 31 и несколькими остатками
Гистоны, участвующие в упаковке ДНК	Коровые и линкерные гистоновые варианты, адаптирован- ные для плотной упаковки ДНК, найденные в сперме и пыльце

Первый вариант гистона, задействованный в организации определен-
ного состояния хроматина, это центромер-специфический белок A
(CENP-A), аналог белка H3, связанный с центромерными областями у
млекопитающих [20]. Во всех эукариотических рядах встречаются анало-

ги СЕНР-А-подобные НЗ, общее название которых СепНЗ (Таблица 2). Удивителен тот факт, что СепНЗ являются более постоянной характеристикой центромер, по сравнению с быстро развивающимися рядами повторяющихся сателлитных последовательностей ДНК, которые характеризуют центромерные области в целом. Даже центромеры без сателлитных рядов содержат СепНЗ. Например, несмотря на то, что неоцентромеры человека не имеют сателлитных последовательностей, они упакованы в нуклеосомы, содержащие СЕНР-А в диапазоне 300-500 т.н. Таким же образом белки СЕНР-А из риса распространены вдоль 700 т.н. сателлитнообедненной центромеры 8 хромосомы.

И неоцентромера человека, и центромера хромосомы 8 риса состоят преимущественно из обычных геномных участков с активными генами. Эти наблюдения четко говорят о том, что центромеры маркируются белками СепНЗ, а не сателлитными последовательностями ДНК. Если только обратить внимание, что положение центромер у организмов оставалось неизменным на протяжении 30 миллионов лет, то потенциальная долговечность наследования, основанного на СЕНР-А, представляется невероятной. Поэтому, другие варианты гистонов становятся первыми кандидатами для управления эпигенетической спецификацией и наследованием.

Эукариоты имеют «замещающий» вариант НЗ, который называется НЗ.3 (таблица 2). НЗ.3 отличается от НЗ только по четырем аминокислотным позициям, он наблюдается на протяжении всего клеточного цикла, в то время как канонический гистон НЗ выявлен строго на репликационных вилках. НЗ.3 связывается с Н4 на активном ядрышковом организаторе, и, как правило, в эухроматине, а не в гетерохроматине. Сразу после транскрипционной индукции НЗ.3 замещает НЗ, который содержит метилированный лизин-9 (НЗ-К9me). Изучение вышеуказанных особенностей помогли сделать предположение, что осаждение репликационно-независимого НЗ.3 маркирует активный хроматин.

Следующий вариант гистона, ассоциируемый с активным хроматином, Н2А.Z, (таблица 2). Н2А.Z в почкующихся дрожжах включен в прилегающие области молчащих участков генома и ингибирует распространение гетерохроматина. Структуры нуклеосомного кора, содержащие Н2А и Н2А.Z, схожи; однако по биохимическим характеристикам нуклеосома с Н2А.Z значительно менее стабильна, исходя из чего было сделано предположение, что это способствует транскрипционной активации. Как и в случае с НЗ.3, группа Н2А.Z может быть способом спецификации и наследования состояния активного хроматина.

На примере ядер клеток человека обнаруживается как минимум пять разных вариантов гистона Н2А [21]. Лучшее из всех изучен гистоновый вариант Н2А.Z, обнаруженный у всех эукариот - от дрожжей до человека, при

этом он чрезвычайно консервативен. От нормального гистона H2A он отличается аминокислотной последовательностью, соответствующей домену, который ответственен за взаимодействие димера H2A-H2B с тетрамером H3-H4, а также заменами в N-концевом "хвосте". Нуклеосомы, содержащие в своем составе данный вариант гистона H2A, меняют свои поверхностные свойства. В результате меняется характер взаимодействия соответствующего гистонового "хвоста", отвечающего за межнуклеосомные взаимодействия, то есть создается определенный набор поверхностных зарядов. Из-за этого нарушается степень конденсации хроматина. Таким образом, данный гистоновый вариант приводит к стабильному деконденсированному состоянию, необходимому для активации генов. Важность такого варианта для клетки подтверждается тем, что мутации по гену этого гистона летальны.

Другой хорошо изученный гистоновый вариант – H2AX. Отличительная его особенность в том, что один из аминокислотных остатков на C-конце гистона подвергается фосфорилированию в ответ на двуцепочечный разрыв ДНК, вызванный ионизирующим излучением или другими причинами. Фосфорилированный H2AX моментально притягивает к себе репарационный комплекс белков, главная функция которого состоит в исправлении повреждений ДНК. Этот механизм используется клеткой не только при случайных повреждениях ДНК, но и при программируемом разрыве. Такие разрывы происходят, например, при созревании половых клеток, когда идет обмен участками гомологичных хромосом; при развитии иммунной системы, когда для получения огромного разнообразия антител необходим разрыв и воссоединение определенных участков ДНК; наконец, при апоптозе на начальной стадии фрагментации высокомолекулярной ДНК.

Таким образом, вовлечение вариантов гистона в спецификацию и наследование состояний хроматина имеет длительную историю. Существует несколько способов модификации нуклеопротеидного комплекса, например, изменением способности нуклеосом к компактизации, созданием сайтов для связывания или модификация хроматин-связанных белков. Но намного менее очевидно, каким образом происходит наследование, учитывая вытеснение нуклеосом полимеразми. Когда мы поймем, как варианты нуклеосом осаждаются и удаляются, мы, может быть, начнем понимать, как определяемые ими состояния передаются от одного поколения к другому. Последние исследования комплексов сборки нуклеосом начали проливать свет на данный процесс.

С этой точки зрения заманчиво рассмотреть о важность вариантов линкерного гистона в хроматине. Все больше данных указывают на то, что коровые гистоны, особенно H3 и H2A, используются как метки в нук-

леосомах и через них при сборке нуклеосом передается эпигенетическая информация. Среди типичных линкерных гистонов животных и растений существует два уровня вариаций. Первый – это минорная вариация, представленная внутри каждой группы неаллельными вариантами. Роль этой вариации неясна, однако, показано, что она является эволюционно старой и специфичной для растений, и ее экспрессия положительно коррелирует со стрессом. Это значит, что в растениях определенное содержание линкерных гистонов, по-видимому, специфически модулирует глобальный ответ хроматина на измененные внешние условия. Второй уровень вариации среди линкерных гистонов является следствием главного различия гистонов H1 у животных и растений. Глобулярному домену (GH1) растительного H1 не достает 5-ти аминокислотных последовательностей «Wing»-субдомена, которая присутствует в животном GH1. Поскольку этот субдомен вовлекается в связывание с нуклеосомами, его другая длина в растительном H1 может приводить к глобальному изменению в стабильности хроматиновых структур более высоких порядков. Необходимо отметить, что различие между гистоном H3 и вариантом H3.3, разрешающим транскрипцию в большей степени, также состоит в минорной замене 3-х аминокислот в складчатом домене гистона. Необходимо экспериментально подтвердить, связана ли вышеуказанная структурная особенность растительного H1 с уменьшенной стабильностью хроматиновых эпигенетических маркеров в растениях по сравнению с животными.

Десятилетия назад Винсент Алфрей с сотрудниками обнаружили ацетилирование и метилирование гистонов. Со временем стало ясно, что ацетилирование функционирует не просто как нейтрализация заряда на нуклеосоме, а больше как сеть специфических регуляторных сигналов с учетом других модификаций. Сейчас мы знаем, что модификации гистонов представляют дополнительную эпигенетическую информацию хроматина, который изменяет функциональные свойства текущей генетической информации; и наряду с ДНК метилированием, ремоделированием хроматина и рядом негистоновых факторов этот механизм образует сложный эпигенетический код, который правильнее назвать хроматиновым кодом. На данный момент расшифровано только несколько слов этого языка хроматина и возможно пройдут десятилетия прежде чем мы сможем перевести и прочесть весь каскад программ. Становится очевидным, что клетка не обладает единым механизмом узнавания, считывания и переключения "эпигенетического кода", а использует комбинацию разных механизмов, поиски которых весьма актуальны.

Литература

1. Kornberg, R. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA, *Science* 184, 868-871.
2. Olins, A. L., and Olins, D. E. (1974). Spheroid chromatin units (u -bodies), *Science* 183, 330-332.
3. Finch, J. T., and Klug, A. (1976). Solenoid model for superstructure in chromatin, *Proc Natl Acad Sci USA* 73, 1897-1901.
4. Thoma, F., Koller, T., and Klug, A. (1979). Involvement of H1 in the organization of the nucleosome and of salt-dependent superstructures of chromatin, *J Cell Biol* 83, 403-427.
5. Paulson, J. R., and Laemmli, U. K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes, *Cell* 12, 817-828. Marsden, M. P., and Laemmli, U. K. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model, *Cell* 17, 849-858.
6. Paulson, J. R., and Laemmli, U. K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes, *Cell* 12, 817-828.
7. Nelson, W. G., Pienta, K. J., Barrack, E. R., and Coffey, D. S. (1986). The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA, *Ann Rev Biophys Biophys Chem* 15, 457-475.
8. Grewal, S.I. Heterochromatin: new possibilities for inheritance of structure / S.I. Grewal, S.C. Elgin // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2002. – Vol.12. – P. 178–187.
9. Nuclear compartmentalization and gene activity / C. Francastel [et al.] // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2000. – Vol.1. – P. 137–143.
10. Karpen, G.H. The case for epigenetic effects on centromere identity and function / G.H. Karpen, R.C. Allshire // *Trends Genet.* – 1997. – Vol.13. – P. 489–496.
11. Dernburg, A.F. Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation / A.F. Dernburg, J.W. Sedat, R.S. Hawley // *Cell.* – 1996. – Vol.86. – P. 135–146.
12. Fahrner, J.A. Heterochromatin: stable and unstable invasions at home and abroad / J.A. Fahrner, S.B. Baylin // *Genes Dev.* – 2003. – Vol.17. – P. 1805–1812.
13. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains / W. Fischle [et al.] // *Genes Dev.* – 2003. – Vol.17. – P. 1870–1881.
14. Pandey, R. et al. (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 30, 5036–5055
15. Lusser, A. et al. (1997) Identification of maize histone deacetylase HD2 as an acidic nucleolar phosphoprotein. *Science* 277, 88–91
16. Kölle, D. et al. (1999) Different types of maize histone deacetylases are distinguished by a highly complex substrate and site specificity. *Biochemistry* 38, 6769–6773
17. Pandey, R. et al. (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 30, 5036–5055
18. Kölle, D. et al. (1999) Different types of maize histone deacetylases are distinguished by a highly complex substrate and site specificity. *Biochemistry* 38, 6769–6773
19. Palmer, D.K. et al. (1990) The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. *Chromosoma* 100, 32–36

20. Redon Ch., Pilch D., Rogakou E., Sedelnikova O., Newrock K., Banner W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ // *Current Opinion in Genetics and Development*. 2002. V. 12. P. 162-169.
21. Jones P. DNA methylation and cancer // *Oncogene*. 2002. V. 21. P. 5358-5360.

Summary

The genome, compacted in chromatin, contains all the information needed to build an organism. However, during differentiation and development, additional epigenetic information determines the functional state of cells and tissues. This epigenetic information can be introduced by cytosine methylation and by marking nucleosomal histones. The code written on histones consists of post-translational modifications, including acetylation and methylation. In contrast to the universal nature of the DNA code, the histone language and its decoding machinery differ among animals, plants and fungi. Plant cells have retained totipotency to generate the entire plant and maintained the ability to de-differentiate, which suggests that the establishment and maintenance of epigenetic information differs from animals.