

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ И ЯДЕРНАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ WEN1 И WEN2 ИЗ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L. И МОДУЛЯЦИЯ КОРОТКИМИ ПЕПТИДАМИ ИХ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Л.И. Федорева^{1,2}, *Б.Ф. Ванюшин*^{1,2}

¹ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН, Москва, e-mail: fedlara@inbox.ru

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, e-mail: vanyush@belozersky.msu.ru

В стареющих колеоптилях проростков пшеницы обнаружены везикулы, представляющие собой различного размера фрагменты цитоплазмы, содержащие одну или несколько митохондрий (Bakeeva, 1999). Цитоплазма в обнаруженных везикулах не имеет признаков деструкции, в отличие от содержимого окружающей их гигантской вакуоли. Из фракции везикул нами выделены и охарактеризованы две эндонуклеазы WEN1 и WEN2 (Fedoreyeva, 2007, Федорева, 2008).

Эндонуклеазы WEN1 и WEN2 чувствительны к статусу метилирования ДНК. Эндонуклеаза WEN2 предпочтительно расщепляет неметилированную, а WEN1 метилированную ДНК. S-аденозил-L-метионин (SAM) значительно усиливает действие эндонуклеазы WEN2 и ингибирует WEN1. Тем самым, открыт новый механизм разнонаправленной регуляции активности растительных эндонуклеаз SAMом. Нуклеазы WEN1 и WEN2 являются нейтральными Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимыми ферментами. Ионы Mg^{2+} активируют эндонуклеазу WEN1 и эндонуклеазу WEN2. Ионы Ca^{2+} сильно активируют эндонуклеазу WEN1 и заметно ингибируют эндонуклеазу WEN2. Такая разнонаправленная зависимость действия эндонуклеаз WEN1 и WEN2 от ионов Ca^{2+} вероятно является важной для их функционирования в клетке.

В молодых проростках активность WEN1 локализуется в митохондриях. В процессе развития проростков WEN1 обнаруживается в ядрах и везикулярной фракции, содержащей митохондрии. Нуклеазная активность (НА) WEN2 в молодых проростках локализуется в ядерной фракции, в процессе развития проростков этот фермент обнаруживается в везикулярной фракции. Резкое увеличение НА после 6-го дня развития проростка, по-видимому, связано с нуклеазами, участвующими в апоптозной межнуклеосомной фрагментацией ДНК. При выращивании этиолированных проростков в присутствии этрела (продуцент этилена) в них наблюдается резкое увеличение (примерно в 6 раз) НА. В присутствии антиоксиданта ионола (ВНТ) в проростках ингибируется апоптозная фрагментация ДНК. Мы установили, что при этом суммарная нуклеазная активность в проростках уменьшается и фрагментация ДНК не происходит. WEN1 и WEN2 в стареющих колеоптилях индуцируются при увядании и стимулируются «гормоном старения» – этиленом.

В изолированных ядрах фермент WEN2 расщеплял ядерную ДНК на крупные, а WEN1 – на более короткие фрагменты. При одновременном воздействии эндонуклеаз WEN1 и WEN2 на изолированные ядра проростков пшеницы выявлялась типичная картина межнуклеосомной фрагментации ДНК с образованием так называемой «лестницы» из фрагментов ДНК.

Из везикулярной фракции стареющих колеоптилей проростков пшеницы выделена и охарактеризована адениновая ДНК-метилтрансфераза (WAD). Это – первая адениновая ДНК-метилтрансфераза, обнаруженная у эукариот вообще (Fedoreyeva, 2002).

WAD предпочитает метилировать одноцепочечную ДНК, ее максимальная активность связана с репликацией митохондриальной ДНК. Предполагается, что WAD участвует в репликации мтДНК. Не исключено, что контроль за репликацией мтДНК аде-

ниновым ДНК-метилованием в известной мере сходен с явлением хозяйской рестрикции-модификации (R-M), свойственной бактериям

Не исключено, что эндонуклеазы WEN1 и WEN2 могут принимать участие и в репарации и рекомбинации митохондриальной активно реплицирующейся ДНК.

Короткие пептиды (из 2–4 аминокислотных остатков) модулируют гидролиз ДНК эукариотическими CNG- и CG-сайт специфическими пшеничными эндонуклеазами WEN1 и WEN2 в зависимости от статуса метилирования ДНК. Модуляция активности этих ферментов пептидами может быть обусловлена тем, что пептиды связываются с определенными сайтами ДНК. Кроме того, действие пептидов может быть опосредовано гистонами. Это очень важный факт, поскольку в клетке пептиды изначально должны найти в хроматине те места, которые доступны для связывания с ДНК, а эта доступность может определяться гистонами. Все исследованные нами пептиды модулируют также гидролиз одотяжевых и двутяжевых олигонуклеотидов, содержащих CNG и CG-сайты, и эта модуляция зависит от наличия метильной группы в олигонуклеотидах (Хавинсон, 2011). Предполагается, что сайт-специфические взаимодействия пептидов с ДНК могут эпигенетически контролировать генетические функции клетки.

Работа выполнена по госзаданию АААА-А17-117091460012-8 и поддержана РФФИ (№ 18-016-00150).

Литература

Федорева Л.И., Александрушкина Н.И., Дунаевский Я.Е., Белозерский М.А., Ванюшин Б.Ф. Влияние продуцента этилена этрела и антиоксиданта ионола (ВНТ) на протеолитический аппарат в колеоптилях проростков пшеницы при сопровождающем ранний онтогенез апоптозе // Биохимия. – 2003. – Т. 68. – С. 570–576.

Федорева Л.И., Соболев Д.Е., Ванюшин Б.Ф. S-аденозил-L-метионинзависимая и чувствительная к статусу метилирования ДНК. эндонуклеаза WEN2 из колеоптилей пшеницы // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – С. 1243–1251.

Хавинсон В.Х., Федорева Л.И., Ванюшин Б.Ф. Короткие пептиды модулируют действие эукариотических эндонуклеаз из проростков пшеницы // Докл. РАН. – 2011. – Т. 437. – С. 124–127.

Bakeeva, L.E., Kirnos, M.D., Aleksandrushkina, N.I., Kazimirchuk, S.B., Shorning, B.Yu., Zamyatnina, V.A., Yaguzhinsky, L.S., and Vanyushin, B.F. Subcellular reorganization of mitochondria producing heavy DNA in aging wheat coleoptiles // FEBS Lett. – 1999. – V. 457. – P. 122–125.

Fedoreyeva L. I., Vanyushin B. F. N6-Adenine DNA-methyltransferase in wheat seedlings. // FEBS Letters. – 2002. – V. 514. – P. 305–308.

Fedoreyeva L.I., Sobolev D.E., Vanyushin B.F. Wheat endonuclease WEN1 dependent on S-adenosyl-L-methionine and sensitive to DNA methylation status // Epigenetics. – 2007. – V. 2. – P. 50–53.