

**Gly, GlyGly И GlyAsp МОДУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ  
СЕМЕЙСТВА SNF2 И ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ В РЕГЕНЕРАНТАХ  
ИЗ КАЛЛУСОВ ТАБАКА *Nicotiana tabacum***

© 2021 г. Л. И. Федорева\*, \*\*, @, Б. Ф. Ванюшин\*, \*\*

\*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной  
биотехнологии РАН, ул. Тимирязевская, 42, Москва, 127550 Россия

\*\*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский  
государственный университет им. М.В. Ломоносова, Воробьевы горы, 1, стр. 40, Москва, 119991 Россия

@E-mail: fedlara@inbox.ru

Поступила в редакцию 08.07.2019 г.

После доработки 07.10.2019 г.

Принята к публикации 07.11.2019 г.

Обнаружено, что короткие экзогенные пептиды GlyGly и GlyAsp, а также аминокислота Gly могут оказывать избирательное влияние на экспрессию генов ДНК-метилтрансфераз и белков SNF2 из регенерантов табака *Nicotiana tabacum*. Отмечено, что Gly и GlyGly уменьшают экспрессию генов ДНК-метилтрансфераз (кроме *СМТ3*), но увеличивают экспрессию *СМТ3* почти на 30%. Установлено, что присутствие кислого дипептида GlyAsp в питательной среде увеличивает экспрессию генов не только ДНК-метилтрансферазы (*СМТ3*), но и поддерживающей ДНК-метилтрансферазы (*МЕТ1*) по сравнению с контрольным вариантом. Определено, что все дипептиды и свободный глицин уменьшают (в 2–4 раза) экспрессию гена *DRM2* метилтрансферазы, осуществляющей метилирование ДНК *de novo*. Показано, что Gly, GlyGly и GlyAsp модулируют экспрессию генов, кодирующих семейство белков SNF2, уменьшая экспрессию практически всех генов семейства SNF2; только GlyGly увеличивает экспрессию генов, кодирующих актинзависимый белок и CHR12. Обнаружено, что уменьшение экспрессии генов *SNF2* приводит к уменьшению доступности свободного ДНК для метилирования, особенно для метилирования *de novo*.

10.31857/S1026347021040081

Секретируемые пептиды, как и фитогормоны, важны в регулировании многочисленных межклеточных связей, физиологических активностей и отвечают на различные воздействия. В настоящее время CLE-пептиды (CLAVATA3/Endosperm surrounding region-related) – наиболее изученные секретируемые пептиды в растениях (Tavormina *et al.*, 2015; Ванюшин и др., 2017). Эти пептиды взаимодействуют с сигнальными фитогормонами и вовлекаются в регуляцию с окружением, модулируя широкий круг биологических процессов. Установлено, что CLE-пептиды включаются в регуляцию развития семян, образование сосудов, боковых корней, в гомеостазе ствольных клеток в апикальной меристеме проростков и корней (Czyzewicz *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

Короткие экзогенные пептиды увеличивают продолжительность жизни животных и заметно улучшают физиологический статус пожилых людей (Khavinson, Malinin, 2005). Они избирательно стимулируют экспрессию генов и синтез белков, в том числе участвующих в репликации и репарации ДНК и отвечающих за клеточную дифферен-

цировку (Khavinson, Malinin, 2005). Действие таких пептидов характеризуется геноспецифичностью, сигнальной регуляторностью и, по-видимому, в основном эпигенетической природой (Ванюшин и др., 2017). Регуляторное действие коротких экзогенных пептидов выявлено как у животных, так и у растений (Khavinson, Malinin, 2005; Ванюшин и др., 2017). У растений и животных короткие пептиды индуцируют экспрессию генов, кодирующих факторы транскрипции, клеточной дифференцировки, роста и развития (Murphy *et al.*, 2012; Motomitsu *et al.*, 2015).

Молекулярные механизмы влияния экзогенных пептидов на клеточные процессы до сих пор остаются неизученными. Очевидно, что действия пептидов для всех эукариотов имеют общие молекулярные механизмы. Один из возможных механизмов действия экзогенных пептидов – регуляция транскрипции генов.

Дипептиды глицилглицин (GlyGly), глициласпарагиновая кислота (GlyAsp), а также аминокислота глицин (Gly) в концентрации  $10^{-7}$  М в

среде существенно стимулируют рост и развитие каллусов табака *Nicotiana tabacum*. GlyGly, GlyAsp и Gly влияют на клеточную дифференцировку и формообразовательные процессы у каллусов. Они стимулируют образование и рост листьев и корней. Пептиды модулируют экспрессию генов *KNOX* и *GRF* семейств, отвечающих за клеточную дифференцировку и кодирующих транскрипционные факторы (Федорева и др., 2018). Профили индукции или репрессии экспрессии генов одним и тем же пептидом в каллусе и проростке табака различны. Это указывает на клеточную (тканевую) специфичность действия пептидов у растений. Предполагается, что GlyGly, GlyAsp и Gly – новый класс регуляторов роста и развития растений. Наиболее изученный механизм регуляции транскрипции генома – эпигенетическая регуляция, включающая в себя метилирование ДНК и модификации гистоновых белков.

Метилирование ДНК участвует в защите генома, регуляции экспрессии генов, сплайсинге и связано с серьезным перепрограммированием развития растений, например, при яровизации и индукции цветения (Candaele *et al.*, 2014). Метилирование ДНК контролирует клеточную дифференцировку, рост и развитие растений (Vanushin, Ashapkin, 2011). Вместе с модификациями гистонов и ремоделированием хроматина метилирование ДНК определяет эпигенетическое состояние генома не только на глобальном уровне, влияя на большие хромосомные домены или даже на целые хромосомы, а также на специфические сайты отдельных генов (Suzuki, Bird, 2008).

У эукариот геномная ДНК организована в хроматин, что физически ограничивает доступ регуляторных белков к геному (Kwon, Wagner, 2007). На доступ к геному могут повлиять ковалентные модификации гистонов и/или ремодулирование хроматина, изменяя нековалентные взаимодействия между ДНК и гистонами (Kwon, Wagner, 2007; Archacki *et al.*, 2017). Оба способа перестройки структуры хроматина обеспечивают важные эпигенетические механизмы для регулирования экспрессии генов (Flaus, Owen-Hughes, 2011). Связанные с АТФ изменения в организации нуклеосом, катализируемые АТФазами SNF2-семейства, составляют значительную часть активности ремоделирования хроматина (Flaus, Owen-Hughes, 2011). Ремодулирующие АТФ-зависимые хеликазы способны изменять структуру хроматина и положение нуклеосом, тем самым увеличивая доступность ДНК к взаимодействиям с различными регуляторными белками.

Только несколько АТФаз семейства SNF2 могут функционировать самостоятельно, поэтому АТФазы функционируют вместе как мультибелковый комплекс SWI/SNF гигантских размеров. Белковый комплекс массой 2000 кДа проявляет

высокую консервативность во всех эукариотах. SWI/SNF-комплекс идентифицирован в дрожжах, мышцах, растениях, у людей, что подтверждает консервативную роль активации транскрипции (Knizewski *et al.*, 2008).

SWI/SNF-белки играют глобальную роль в транскрипционном активировании (Carlson, Laurent, 1994). Однако данных о регулировании экспрессии генов, кодирующих белки SWI/SNF у животных, мало, а данные о регулировании экспрессии генов, кодирующих белки SWI/SNF у растений, отсутствуют.

Мы попытались выяснить, могут ли короткие экзогенные пептиды модулировать экспрессию генов, кодирующих SWI/SNF-белки и ДНК-метилтрансферазу табака *N. tabacum*. Для решения поставленной задачи были использованы два пептида – GlyGly и GlyAsp (нейтральный и кислый дипептид соответственно), а в качестве сравнения – свободная аминокислота Gly.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена табака *N. tabacum* L. сортотипа Самсун помещали в колбы с агаризованной безгормональной средой Мурашиге–Скуга для проращивания. Образовавшиеся после прорастания семян семядоли выкладывали по 10 штук на среду в чашки Петри с агаризованной средой Мурашиге–Скуга, содержащей 6-бензиламинопуридин, нафтилуксусную и индолилмасляную кислоты, с добавлением пептидов в концентрации  $10^{-7}$  М или без пептидов. Опыты по выращиванию каллусов проводили в четырех повторностях.

Каллусы табака использовали для выделения РНК и ДНК с помощью наборов реагентов “РНК-Экстрэн” и “ДНК-Экстрэн-3” соответственно (Синтол, Россия) по рекомендуемой производителем инструкции. Концентрацию полученных препаратов нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически. кДНК получали стандартным методом с помощью набора реагентов для проведения обратной транскрипции (Синтол).

В работе использованы сведения о генах ДНК-метилтрансфераз и семействах SNF2 из базы данных NCBI. Праймеры к генам были подобраны с помощью онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST и синтезированы (Синтол) (табл. 1, 2).

Реакцию ПЦР с регистрацией в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили в термоциклере CFX 96 Real-Time System (BioRad, США). Образцы подготавливали стандартным методом с помощью набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии Sybr Green (Синтол). Реакции ПЦР-РВ проводили в одинаковых условиях для всех образцов: 95°C – 5 мин (активация ДНК-полимеразы), далее 45 циклов (94°C – 30 с, 58°C – 30 с,

**Таблица 1.** Праймеры к ДНК-метилтрансферазам табака *Nicotiana tabacum*

Ген	5'–3'-последовательность	Кодируемый белок	Функция кодируемого белка
<i>Met 1</i>	agc aga aga cag aaa gag gaa gg att cgc tgc aac tca cag ga	Цитозиновая поддерживающая ДНК-метилтрансфераза	Метилирование ДНК
<i>CMT2</i>	ggt gca ctt ccg agt gag aa cat gcc ctg taa cag ctg ga gga	Цитозиновая ДНК-хромометилтрансфераза	То же
<i>CMT3</i>	act gga cta tgc ctt ggt gc tgt ccc aac agt agt gac gc	То же	»
<i>DRM2</i>	aac aag ttc aaa gca ggc gt aag caa cgc aca gtt gga tg	Цитозиновая ДНК-метилтрансфераза	Метилирование ДНК <i>de novo</i>

**Таблица 2.** Праймеры к ремодуляторам хроматина семейства SNF2 табака *Nicotiana tabacum*

Ген	5'–3'-последовательность	Кодируемый белок	Функция кодируемого белка
<i>DDM1</i>	tgc ccg aag aaa ctg att cca gta acg gaa aca gga gag tcc ga	ATP-dependent DNA helicase DDM1-like	АТФ-зависимая хеликаза, ремоделятор хроматина, участвует в метилировании ДНК
<i>CHR12</i>	gcg gtc act gtg tct cga tt gtg gtg atc tact ac tcc cct ac	Helicase-like transcription factor CHR12	Хеликаза, участвующая в ремоделировании хроматина, в развитии и клеточной дифференциации
<i>RAD16</i>	aac cgt tgt aag tgt ttc ggc tga tgc aag acg aag gac gg	DNA repair protein RAD 16-like	Белок, участвующий в репарации ДНК
<i>CLASSY</i>	ttg ctt gga gtg ttt tgg cg tgg tat gct agt gta gct gtc a	Predicted SNF2 domain-containing protein CLASSY-4-like	Белок, участвует в ремоделировании хроматина и в метилировании ДНК
<i>Actin</i>	ctg gaa caa gct ctg ctg ga acg gca agc ttc aac aag ga	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1	Актин, участвующий в поддержании цитоскелета

72°C – 30 с). После последнего цикла реакционные смеси инкубировали при 72°C в течение 2 мин. Реакции проводили трехкратно в 2–3 параллелях. Ген *GaPDh*, кодирующий белок глицерид-3-фосфат-дегидрогеназу (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), был взят в качестве референсного гена. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с ПЦР-продуктами, полученными с праймерами к гену *GaPDh*.

Эффективность ПЦР-РВ рассчитывали как  $E, \% = (10^{-1/s} - 1) - 100$ , где  $s$  – угол наклона зависимости десятичного логарифма значений  $C_t$  от концентрации кДНК. Эффективность ПЦР-РВ с праймерами к исследованным генам была 95–96%.

ПЦР-амплификацию проводили в термоциклере DNAEngine (BioRad). Реакцию ПЦР осуществляли с ДНК в тех же условиях, что и для ПЦР-РВ с кДНК. Полученные продукты анализировали с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозе.

В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования ВНИИСБ РАН.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Короткие пептиды в среде в концентрации  $10^{-7}$  М заметно стимулируют рост и развитие каллусов табака (Федорева и др., 2018). Наряду с увеличением каллусной массы эти соединения увеличивают каллусогенез, формирование листьев и корней. Это свидетельствует о том, что GlyGly, GlyAsp, а также Gly влияют на клеточную дифференцировку и вовлечены в формообразовательные процессы у растений. Обнаруженное действие этих веществ при такой низкой концентрации их в среде может указывать на то, что они выполняют некую регуляторную сигнальную функцию в клетке.

Короткие экзогенные пептиды GlyGly, GlyAsp, а также Gly модулируют экспрессию генов семейства KNOX и GRF (Федорева и др., 2018). Один из возможных механизмов модуляции экспрессии генов короткими пептидами – связывание их со

свободными участками ДНК, тем самым модифицируя ДНК подобно метилированию. Одна из основных функций метилирования остатков цитозина в ДНК эукариот, в том числе и растений, — регуляция экспрессии генов в ходе нормального развития. Метилирование ДНК приводит к изменению взаимодействия ДНК с разными функционально важными белками, регулирующими транскрипцию генов.

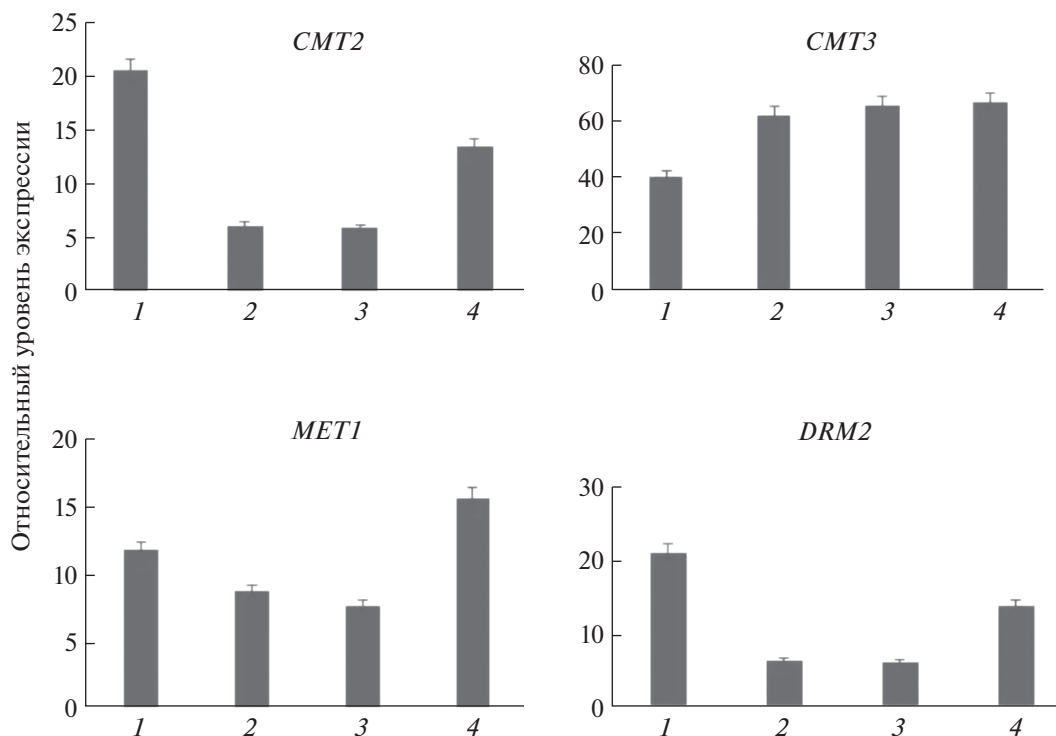
Метилирование ДНК представляет собой ковалентную модификацию нуклеотидов в ДНК. Метилирование эукариотической ДНК осуществляется ферментами ДНК-метилтрансферазами (DMT), которые переносят метильную группу из S-аденозила метионина (SAM) на углерод цитозина в пятом положении. Эти ферменты подразделяются на поддерживающие и *de novo* DMT, в зависимости от того, метилирован уже сайт распознавания или нет. В растениях существуют два типа поддерживающих DMT: ДНК-метилтрансферазы (MET) и хромометилтрансферазы (CMT) (Goll, Bestor, 2005). Растительные геномы имеют сайты метилирования трех типов (CG, CHG и CHH) в отличие от сайта метилирования одного типа (CG) у животных, за исключением сайтов у эмбриональных стволовых клеток и нейронов (Lister *et al.*, 2009, 2013).

Экспрессия генов из *N. tabacum*, кодирующих цитозиновые DMT, показана на рис. 1. В регенерантах из каллусов табака, выращенных в присутствии Gly и GlyGly, уровень экспрессии гена *MET1*, кодирующего поддерживающую цитозиновую DMT, ингибируется в 1.5–2 раза. Из полученных данных следует, что в регенерантах, выращенных в присутствии GlyAsp, уровень экспрессии гена *MET1*, наоборот, увеличивается почти на 25%. Из полученных данных следует, что короткие пептиды и глицин модулируют экспрессию гена цитозиновой DMT. Можно предположить, что короткие пептиды либо связываются с регуляторными белками и через эти взаимодействия воздействуют на экспрессию гена, либо напрямую связываются со свободными участками ДНК. Это предположение подтверждает данные, полученные методом ПЦР (рис. 2). Продукты, полученные в результате ПЦР-амплификации с праймерами к генам *MET1*, сравнивали с образцами ДНК, выделенной из регенерантов табака, выращенных в присутствии и без коротких пептидов и глицина. Методом электрофореза в агарозе были обнаружены продукты ПЦР с большей молекулярной массой в образцах ДНК с пептидами, чем в контрольной ДНК. Появление продуктов ПЦР, отличающихся от контрольного варианта, свидетельствует о том, что короткие пептиды, проникая в ядро (Федорева и др., 2018), могут связываться со свободными участками ДНК и модифицировать ее.

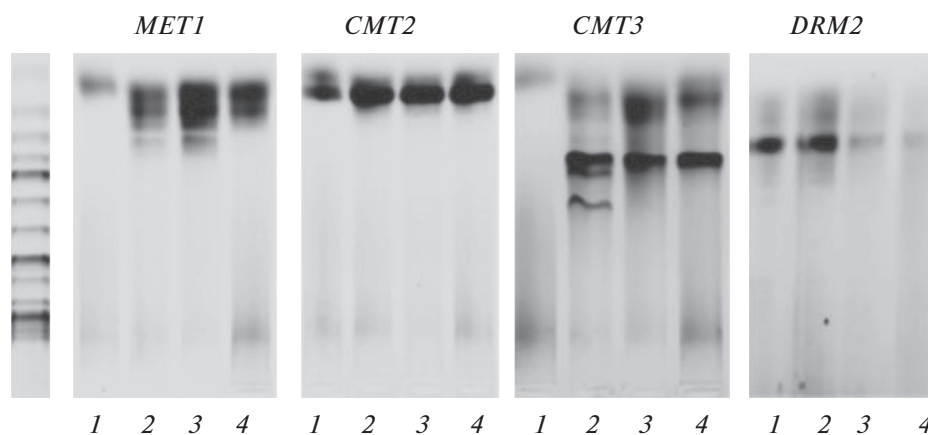
Уровень экспрессии в каллусах табака хромометилтрансферазы *CMT2* значительно ниже такового у *CMT3*. Этот факт может свидетельствовать о том, что экспрессия *CMT2* в процессе метилирования ДНК в табаке невелика по сравнению с экспрессией *CMT3*. Относительный уровень экспрессии *CMT2* в регенерантах из каллусов, выращенных в присутствии GlyAsp, уменьшается почти в 2 раза, а в присутствии Gly и GlyGly — практически в 4 раза (рис. 1). Однако в отличие от *MET1* в агарозном геле не было обнаружено ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к гену *CMT2* с образцами ДНК из табака, выращенных с пептидами, отличных от контрольной ДНК (рис. 2). Возможно, уменьшение экспрессии генов *CMT2* в присутствии пептидов будет указывать на наличие специфических сайтов связывания с белками, регулирующими экспрессию генов метилтрансфераз.

Относительный уровень экспрессии гена *CMT3* в каллусах табака значительно выше такового для *CMT2* и даже *MET1*. Во всех каллусах, выращенных в присутствии пептидов, экспрессия генов *CMT3* увеличивается по сравнению с контрольным вариантом на 25–35% (рис. 1). Отметим, что при амплификации с праймерами к гену *CMT3* со всеми образцами ДНК образуется разный набор ПЦР-продуктов (рис. 2). Этот факт может свидетельствовать о том, что все три соединения имеют как общие сайты связывания с ДНК, так и отличные от них. Образование новых продуктов может свидетельствовать о связывании пептидов с определенными участками ДНК, тем самым указывая на участие экзогенных пептидов в регуляции экспрессии генов *CMT3*.

Метилирование ранее неметилированной ДНК *de novo* осуществляется семейством DMT, названным DRM (Domains rearranged methyltransferases). Известно, что DRM в основном метилируют несимметричные сайты CHH, но способны *de novo* метилировать цитозины в любом контексте последовательности в процессе, называемом РНК-направленным метилированием ДНК (РНДМ). Короткие РНК (24 нуклеотида) образуются в результате действия специфических РНК-полимераз, которые были обнаружены только в растениях (Law, Jacobsen, 2010). Механизм метилирования цитозина в РНДМ недостаточно ясен. Ранее считалось, что метилирование *de novo* метилтрансферазами DRM в растениях происходит в транспозонах и чужеродных последовательностях ДНК, но более поздние исследования показали, что метилирование *de novo* происходит также в регуляторных областях белоккодирующих генов (Lippman *et al.*, 2004). Метилирование ДНК в *Arabidopsis* представляется более динамичным, чем считалось ранее, и может быть связано с транскрипционными ответами как на абиотические, так и на биотические стрессы (Chinnusamy, Zhu, 2009).



**Рис. 1.** Экспрессия генов цитозинных ДНК-метилтрансфераз *MET1*, *CMT2*, *CMT3* и *DRM2* в регенерантах табака *Nicotiana tabacum*, выращенных в присутствии Gly, GlyGly, GlyAsp (2–4 соответственно, 1 – контроль; для рис. 1–4).



**Рис. 2.** ПЦР-амплификация праймеров к генам цитозинных ДНК-метилтрансфераз *MET1*, *CMT2*, *CMT3* и *DRM2* и ДНК из регенерантов табака, выращенных в присутствии Gly, GlyGly, GlyAsp.

В регенерантах из каллусов табака, выращенных в присутствии коротких пептидов и глицина, уровень экспрессии гена *DRM2*, кодирующего цитозинную ДМТ, участвующую в метилировании ДНК *de novo*, ингибируется в 2–4 раза по сравнению с контрольным вариантом. В агарозном геле не было обнаружено ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к гену *DRM2*, с образцами ДНК из табака, выращенных с пептидами, отличных от контрольной ДНК (рис. 2). Более того, количество

ПЦР-продуктов сильно уменьшалось при амплификации с ДНК, выращенных в присутствии пептидов. Можно предположить, что уменьшение экспрессии гена *DRM2* в случае присутствия пептидов вызвано тем, что короткие пептиды связываются с теми участками белков, регулирующих экспрессию генов *DRM2*, которые ответственны за связывание с ДНК.

Нуклеосомы – сильное препятствие для метилирования ДНК *de novo*, а белки ремодулирова-

ния облегчают метилирование нуклеосом *in vivo*. Возможно, ремодулирующие комплексы позволяют метилтрансферазам работать непосредственно на поверхности нуклеосом или стимулировать катализ, не влияя на доступ метилтрансфераз к ДНК. Однако считается, что свободная ДНК – предпочтительная матрица для действия большинства ДНК-модифицирующих ферментов, в том числе и для цитозинового метилтрансферазы, и что ремодуляторы, такие как SNF2, обеспечивают доступ к свободной ДНК.

Белки, принадлежащие к консервативному и диверсифицированному семейству SNF2, имеют АТФ-зависимые субъединицы, которые участвуют в ремодулировании хроматина и контролируют доступность ДНК (Archacki *et al.*, 2017). Большая часть белков SNF2 у растений гомологична таковому у дрожжей и животных и сохраняет соответствующую функциональную специализацию. Однако некоторые из них были адаптированы для процессов, происходящих только у растений. Мы выбрали пять генов семейства SNF2, которые относятся к различным классам и представлены в табл. 2.

Ремодулятор нуклеосом семейства SNF2 – DDM1, т.е. АТФ-зависимая хеликаза, необходимая для нормального метилирования ДНК (Jeddeloh *et al.*, 1999; Lippman *et al.*, 2004). АТФазный домен SNF2 гидролизует АТФ, перемещаясь по ДНК хроматина, тем самым изменяя структуру хроматина, позволяя другим белкам получать доступ к ДНК (Ryan, Owen-Hughes, 2011). Мутация DDM1 вызывает сильную потерю метилирования у некоторых транспозонных элементов и повторов (Jeddeloh *et al.*, 1999; Lippman *et al.*, 2004). Предполагают, что DDM1 участвует в метилировании CNN-сайтов по механизму РНДМ (Lippman *et al.*, 2004).

В регенерантах из каллусов табака, выращенных в присутствии пептидов, наблюдается снижение активности экспрессии гена *DDM1*. Можно предположить, что уменьшение экспрессии гена *DDM1* сопровождается потерей метилирования ДНК, как и при мутации *DDM1* (Jeddeloh *et al.*, 1999; Lippman *et al.*, 2004). Как отмечено выше, предполагают, что DDM1 участвует в РНДМ – РНК-направленном ДНК-метилировании. В этом процессе участвует *DRM2*, которая метилирует цитозиновые остатки *de novo*. Уменьшение экспрессии генов, кодирующих как *DRM2*, так и *DDM1*, под влиянием экзогенных пептидов действительно может свидетельствовать о том, что эти два белка взаимосвязаны и участвуют в процессе метилирования ДНК. Однако неясно, как короткие пептиды регулируют экспрессию генов *DRM2* и *DDM1*. Вероятно, пептиды связываются со свободными участками гена *DDM1* (возможно, и в промоторной области АТФазного домена) и тем самым блоки-

руют его транскрипцию. Снижение уровня АТФ-зависимой ДНК-хеликазы DDM1 как ремодулятора хроматина приводит к уменьшению доступа к ДНК-метилтрансферазе *DRM2*. Хеликаза DDM1 может регулировать экспрессию цитозинового метилтрансферазы *DRM2*. Соответственно, уменьшение экспрессии гена *SNF2* может сопровождаться и уменьшением экспрессии гена *DRM2*.

В пользу этого предположения свидетельствуют данные, полученные методом ПЦР-амплификации (рис. 4). На рис. 4 сравниваются продукты, полученные в результате ПЦР с праймерами к генам семейства *SNF2* с ДНК, выделенной из табака, выращенного в присутствии и без коротких пептидов и глицина. В агарозном геле были обнаружены продукты ПЦР с большей молекулярной массой в образцах ДНК с пептидами, чем в контрольных ДНК. Образование новых продуктов ПЦР, отличающихся от контрольных, может быть обусловлено тем, что короткие пептиды связываются со свободными участками ДНК и модифицируют ее.

Для нормального развития растения должны реагировать на любые изменения окружающей среды и быстро адаптироваться к неблагоприятным условиям. Реакция на абиотический стресс требует модуляции экспрессии генов, которая может быть опосредована изменением структур хроматина. Было показано, что ген ремодулирования хроматина *AtCHR12* играет жизненно важную роль при временной задержке роста арабидопсиса, которая индуцируется при стрессе и обеспечивает гибкую модуляцию роста в неблагоприятных и/или иных условиях (Mlynárová *et al.*, 2007). Семейство белков CHR (chromatin-remodulator) – хеликазы, имеющие АТФазный каталитический центр, как и семейство белков DDM1. АТФ-зависимый белок CHR12 воздействует на экспрессию генов, используя энергию гидролиза АТФ для изменения взаимодействий между гистонами и ДНК, чтобы открыть доступ к ДНК (Mlynárová *et al.*, 2007).

В каллусах табака, выращенных в присутствии Gly, происходит незначительное уменьшение экспрессии генов, кодирующих белок CHR12 (рис. 3). При амплификации праймеров к гену *CHR12* с ДНК из каллусов табака, выращенных в присутствии глицина, образуется набор ПЦР-продуктов, аналогичный контрольному (рис. 4). Можно предположить, что Gly не оказывают существенного влияния на это субсемейство SNF2. Однако в присутствии GlyGly наблюдается увеличение относительной экспрессии гена *CHR12* приблизительно в 1.5 раза, а в присутствии GlyAsp происходит уменьшение относительной экспрессии гена *CHR12* приблизительно в 2 раза по сравнению с контролем. Наблюдалось также образование разных продуктов ПЦР во всех вариантах (рис. 4). Возможно, короткие пептиды связываются с раз-

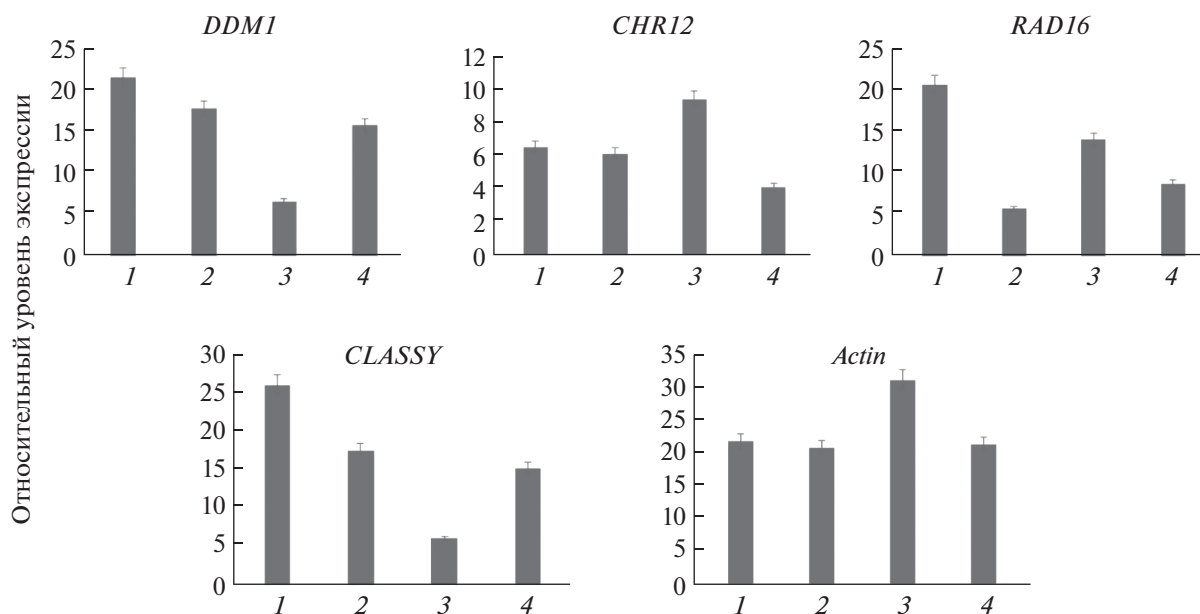


Рис. 3. Экспрессия генов семейства ремодуляторов хроматина SNF2 *DDM1*, *CHR12*, *RAD16*, *CLASSY*, *actin* в регенерантах табака *Nicotiana tabacum*, выращенных в присутствии Gly, GlyGly, GlyAsp.

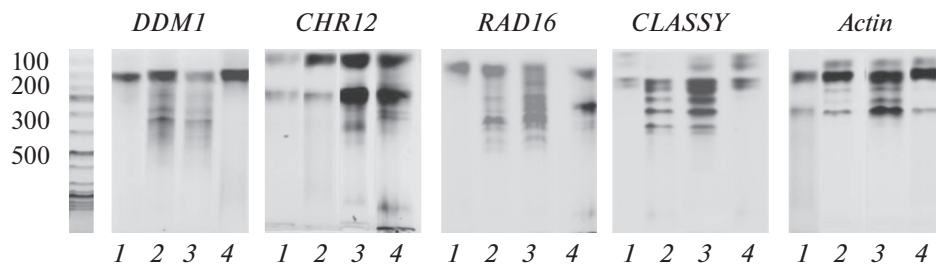


Рис. 4. ПЦР-амплификация праймеров к генам семейства ремодуляторов хроматина SNF2 *DDM1*, *CHR12*, *RAD16*, *CLASSY*, *actin* и ДНК из регенерантов табака, выращенных в присутствии Gly, GlyGly, GlyAsp.

ными участками ДНК, и это играет важную роль в активации или инактивации экспрессии гена *CHR12*.

Белок RAD16, который входит в семейство хроматинремодулирующих белков SNF2, участвует в репарации ДНК после нуклеотидного расщепления под действием УФ в транскрипционно молчащих областях генома и в нетранскрибируемых местах активных генов (Yu *et al.*, 2011). Белок Rad16 имеет два цинковых пальца и хеликазный домен. Относительно мало известно о молекулярных событиях, которые инициируют и регулируют этот процесс в контексте хроматина. Ранее было отмечено (Yu *et al.*, 2011), что в ответ на вызванное УФ-излучением повреждение ДНК происходит повышение уровня ацетилирования гистона H3 в положениях 9 и 14 лизиновых остатков, что коррелирует с изменениями в структуре хроматина. Эти изменения связаны с эффективной глобальной эксци-

зионной репарацией генома у дрожжей и зависят от присутствия белка Rad16.

Экспрессия гена *RAD16* у каллусов табака, выращенных в присутствии GlyGly, GlyAsp, особенно свободного Gly, уменьшается в 1.5–4 раза по сравнению с контрольными каллусами. Можно предположить, что инактивация экспрессии гена *RAD16* в присутствии использованных нами препаратов препятствует также ацетилированию гистона H3 и реорганизации хроматина по этому сценарию. Репарация ДНК осуществляется также другими репарационными белками, так как экспрессия гена *RAD16*, кодирующего белок, участвующий в репарации ДНК, уменьшается в табаке, выращенном в присутствии дипептидов и свободного глицина. Можно предположить, что короткие пептиды могут активировать экспрессию других репарационных белков.

Другое подсемейство SNF2 – это белки, в состав которых входит домен, определенный как

CLASSY1 или CLSY1. Они участвуют в метилировании ДНК, умалчавании транскрипционных генов и получении 24-нуклеотидных малых РНК (siRNA) (Kanno *et al.*, 2004, 2005a, b). Все шесть белков подсемейства CLSY1 в арабидопсисе имеют высокую гомологию (70%). Белки с доменом CLSY1 наиболее тесно связаны с подсемейством белков RAD16, имеющих гомологичный домен хеликазы С.

Структурное моделирование предсказало, что в домене CLASSY1 в мотивах, ответственных за связывание с кислыми остатками ДНК (фосфатными группами) и гидролиз АТФ, которые необходимы для ремодулирования хроматина, участвуют остатки Gly, Lys и Arg (Eisen *et al.*, 1995). Относительная экспрессия гена *SNF2* с доменом CLASSY1 уменьшается в регенерантах табака, выращенных в присутствии пептидов и глицина, по сравнению с контрольным вариантом (рис. 3). На основании структурных данных можно предположить, что экзогенные пептиды, в состав которых входят остатки Gly, могут конкурировать с остатками Gly в домене CLSY1 за связывание АТФ, в результате чего доступность ДНК для действия цитозинового ДМТ уменьшается. Этот факт, возможно, оказывает ингибирующее действие на экспрессию метилтрансфераз (рис. 1).

Отметим, что дипептид GlyAsp практически не оказывает влияния на состав ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к гену *SNF2* с доменом CLASSY, по сравнению с контролем. В случае Gly и GlyGly состав продуктов ПЦР аналогичен и значительно отличается от такового в вариантах с GlyAsp и контрольной ДНК (рис. 4).

Семейство актинзависимых белков (actin-related белков (ARP)) относится к ответвлению обширного суперсемейства белков, включающих в себя обычный актин, хит-шоковый белок Hsp70, хит-шоковый родственный белок Hse70 и другие АТФ-связывающие белки. В дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* семейство ARP состоит из 10 различных белков, на 38–69% идентичных обычному актину. Эти подобные актину протяженные участки включают в себя 13 блоков гомологии, которые важны для структуры и функции актина. Основные функции актина — поддержание и стабилизация цитоскелета в эукариотических клетках.

Из данных об экспрессии гена *SNF2* актинзависимого белка из регенерантов табака, выращенных в присутствии пептидов (рис. 3), следует, что у образцов с GlyGly экспрессия гена растет приблизительно на 30%, а в образцах регенерантов, выращенных в присутствии Gly и GlyAsp, относительный уровень экспрессии остается практически без изменения (как и у контрольных регенерантов). Состав ПЦР-продуктов, полученный при амплификации праймеров к гену *SNF2* актинзависимого белка и ДНК из регенерантов табака, выращенного как без, так и в присутствии пептидов и глицина, практически одинаков. Однако в случае ампли-

фикации с ДНК из табака, выращенного в присутствии GlyGly, количество ПЦР-продуктов выше, чем в других вариантах. Возможно, GlyGly связывается с регуляторным белком и комплекс белок–пептид увеличивает экспрессию гена *SNF2*. Вероятно, и свободный Gly, и GlyAsp также связываются с регуляторным белком, но с меньшей константой или с участками белка, которые не оказывают существенного влияния на экспрессию гена.

Таким образом, экзогенные Gly, GlyGly и GlyAsp могут участвовать в регуляции экспрессии генов семейств SNF2 и цитозинового ДМТ. Можно предположить, что короткие пептиды либо связываются с регуляторными белками и через эти взаимодействия воздействуют на экспрессию генов, либо напрямую связываются со свободными участками ДНК. Скорее всего, не существует специфического механизма, по которому короткие пептиды модулируют экспрессию генов. Механизм, по которому пептиды могут регулировать экспрессию, по-видимому, определяется доступностью участков ДНК либо мотивов регуляторных белков, специфически взаимодействующих с Gly и GlyGly (например, Cys-петли, или положительно заряженные участки, связывающиеся с GlyAsp). В любом случае короткие пептиды модулируют экспрессию генов ДМТ и белков семейства SNF2 и их можно использовать для регуляции экспрессии генов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ванюшин Б.Ф., Ашапкин В.В., Александрюшкина Н.И. Регуляторные пептиды у растений // Биохимия. 2017. Т. 82. С. 189–195.
- Федорева Л.И., Диловарова Т.А., Кононенко Н.В., Баранова Е.Н., Смирнова Е.А., Ванюшин Б.Ф. Глицилглицин, глицин и глициласпарагиновая кислота влияют на рост, развитие и экспрессию генов каллусной культуры табака *Nicotiana tabacum* // Изв. РАН. Сер. биол. 2018. № 4. С. 1–9.
- Archacki R., Yatusevich R., Buszewicz D., Krzyczmonik K., Patryn J., Iwanicka-Nowicka R., Biecek P., Wilczynski B., Koblowska M., Jerzmanowski A., Swiezewski S. Arabidopsis SWI/SNF chromatin remodeling complex binds both promoters and terminators to regulate gene expression // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. P. 3116–3129.
- Candaele J., Demuyne K., Mosoti D., Gerrit T., Beemster S., Inzé D., Nelissen H. Differential methylation during maize leaf growth targets developmentally regulated genes // Plant Physiol. 2014. V. 164(3). P. 1350–1364.
- Carlson M., Laurent B.C. The SNF/SWI family of global transcriptional activators // Curr. Opin. Cell Biol. 1994. V. 6. P. 396–402.
- Chinnusamy V., Zhu J.K. RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants // Sci. China C life Sci. 2009. V. 52. P. 331–343.
- Czyzewicz N., Yue K., Beeckman T., De Smet I. Message in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 5281–5296.
- Eisen J.A., Sweder K.S., Hanawalt P.C. Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct se-



- quences and functions // Nucl. Acids Res. 1995. V. 25. P. 2715–2723.
- Flaus A., Owen-Hughes T. Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodeling: the means to the end // FEBS J. 2011. V. 278. P. 3579–3595.
- Goll M.G., Bestor T.H. Eukariotic cytosine methyltransferases // Ann. Rev. Biochem. 2005. V. 74. P. 481–514.
- Jeddeloh J.A., Stokes T.L., Richards E.J. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein // Nat. Genet. 1999. V. 22. P. 94–97.
- Kanno T., Aufsatz W., Jaligot E., Mette M.F., Matzke M., Matzke A.J. A SNF2-like protein facilitates dynamic control of DNA methylation // EMBO Rep. 2005a. V. 6. P. 649–655.
- Kanno T., Mette M.F., Kreil D.P., Aufsatz W., Matzke M., Matzke A.J. Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation // Curr. Biol. 2004. V. 4. P. 801–805.
- Kanno T., Huettel B., Mette M.F., Aufsatz W., Jaligot E., Daxinger L., Kreil D.P., Matzke M., Matzke A.J. Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation // Nat. Genet. 2005b. V. 37. P. 761–765.
- Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Gerontological aspects of genome peptide regulation // Karger AG, Basel (Switzerland). 2005. P. 104.
- Knizewski L., Ginalski K., Jerzmanowski A. Snf2 proteins in plants: gene silencing and beyond // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 557–565.
- Kwon C.S., Wagner D. Unwinding chromatin for development and growth: a few genes at a time // Trends Genet. 2007. V. 23. P. 403–412.
- Law J.A., Jacobsen S.E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals // Nat. Rev. Genet. 2010. V. 11. P. 204–220.
- Lippman Z., Gendrel A.V., Black M., Vaughn M.W., Dedhia N., McCombie W.R., Lavigne K., Mittal V., May B., Kasschau K.D., Carrington J.C., Doerge R.W., Colot V., Martienssen R. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control // Nature. 2004. V. 430. P. 471–476.
- Lister R., Mukamel E.A., Nery J.R., Urich M., Puddifoot C.A., Johnson N.D., Lucero J., Huang Y., Dwork A.J., Schultz M.D. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development // Science. 2013. V. 341. P. 1237905.
- Lister R., Pelizzola M., Dowen R.H., Hawkins R.D., Hon G., Tonti-Filippini J., Nery J.R., Lee L., Ye Z., Ngo Q.M. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences // Nature. 2009. V. 462. P. 315–322.
- Mlynárová L., Nap J.P., Bisseling T. The SWI/SNF chromatin-remodeling gene AtCHR12 mediates temporary growth arrest in Arabidopsis thaliana upon perceiving environmental stress // Plant J. 2007. V. 51. P. 874–885.
- Motomitsu A., Sawa S., Ishida, T. Plant peptide hormone signaling // Ess. Biochem. 2015. V. 58. P. 115–131.
- Murphy E., Smith S., De Smet I. Small signalling peptides in Arabidopsis development: how cells communicate over a short distance // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 3198–3217.
- Ryan D.P., Owen-Hughes T. Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion // Curr. Opin. Chem. Biol. 2011. V. 15. P. 649–656.
- Suzuki M.M., Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics // Nat. Rev. Genet. 2008. V. 9. P. 465–476.
- Tavormina P., De Coninck B., Nikonorova N., De Smet, I., Cammue B. The plant peptidome: an expanding repertoire of structural features and biological functions // Plant Cell. 2015. V. 27. P. 2095–2118.
- Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in plants: past, present and future // BBA-Gene Regul. Mechan. 2011. V. 1809. P. 360–368.
- Wang G., Zhang G., Wu M. CLE peptide signaling and crosstalk with phytohormones and environmental stimuli // Front. Plant Sci. 2016. V. 6. P. 1211.
- Yu S., Teng Y., Waters R., Reed S.H. How chromatin is remodelled during DNA repair of UV-induced DNA damage in Saccharomyces cerevisiae // PLoS Genet. 2011. V. 7. P. 1002124.

## Gly, GlyGly, and GlyAsp Module Expression of Genes of the SNF2 Family and DNA Methyltransferases in Regenerants from Calluses of Tobacco *Nicotiana tabacum*

L. I. Fedoreyeva<sup>1,2,#</sup> and B. F. Vanyushin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology RAS, ul. Timiryazevskaya 42, Moscow, 127550 Russia

<sup>2</sup>Research Institute of Physical and Chemical Biology A.N. Belozersky, Moscow State University M.V. Lomonosov, Vorobyovy Gory 1, Moscow, 119991 Russia

#e-mail: fedlara@inbox.ru

It was found that short exogenous peptides GlyGly and GlyAsp and the amino acid Gly can have a selective effect on the expression of genes for DNA-methyltransferases and SNF2 proteins from *Nicotiana tabacum* regenerants. It was noted that Gly and GlyGly decrease the expression of DNA methyltransferase genes (except for *CMT3*), and increase the expression of *CMT3* by almost 30%. It was found that the presence of the acidic dipeptide GlyAsp in the nutrient medium increases the expression of genes not only of the *CMT3* DNA methyltransferase, but also of the supporting *MET1* DNA methyltransferase as compared to the control variant. It was determined that all dipeptides and free glycine reduce (by 2–4 times) the expression of the *DRM2* methyltransferase gene, which is responsible for DNA methylation *de novo*. It was shown that Gly, GlyGly, and GlyAsp modulate the expression of genes encoding the SNF2 family of proteins, decreasing the expression of almost all genes of the SNF2 family, only GlyGly increasing the expression of genes encoding an actin-dependent protein and *CHR12*. It was found that a decrease in the expression of the *SNF2* genes leads to a decrease in the availability of free DNA for methylation, especially for *de novo* methylation.