

Обзоры, проблемы, итоги

УДК 633/635:576.31

**ЦЕНТРОМЕРНЫЕ БЕЛКИ ХРОМОСОМ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ.
СООБЩЕНИЕ I. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ЦЕНТРОМЕРНЫХ
КОМПЛЕКСОВ**

(обзор иностранной литературы)

Л.П. ВЛАСЕНКО¹, Ю.В. ЧЕСНОКОВ²

Обобщены данные о роли центромерных белков в клеточном делении. Особое внимание уделено центромерному варианту гистона H3 — гистону CENP-A и фосфорилированию гистонов H3 и CENP-A аврора-киназами.

Ключевые слова: кинетохор, CENP-A (CENH3), аврора.

Key words: kinetochore, CENP-A (CENH3), aurora.

Митоз (от греч. *mítos* — нить) (синонимы — кариокинез, непрямоe деление клетки) — наиболее распространенный способ ее воспроизведения (репродукции). Биологическое значение митоза определяется удвоением хромосом за счет продольного расщепления с последующим равномерным распределением между дочерними клетками, обеспечивающим тождественность генетического материала. Началу митоза предшествует период подготовки, включающий накопление энергии, синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и, что характерно для животных клеток, репродукцию центриолей. Следует напомнить, что у высших растений в клеточном центре, который организует деление хромосом, центриолей нет, источником энергии служат макроэргические соединения. Митоз не сопровождается усилением дыхания, поскольку окислительные процессы происходят в интерфазе. Периодическое наполнение и опустошение «энергетического резервуара» составляет энергетическую основу митоза.

Продолжительность митоза зависит от размеров клеток, их плоидности, числа ядер, а также от условий внешней среды, в частности от температуры. В животных клетках митоз обычно длится 30-60 мин, в растительных — 2-3 ч. Более длительны стадии митоза, связанные с процессами синтеза (препрофаза, профаза, телофаза); самодвижение хромосом (метакинез, анафаза) осуществляется быстро.

Важную роль в процессах митоза, включающих организацию микротрубочек веретена деления, сцепление гомологичных хромосом, проверку их выстраивания в анафазе, расхождение, цитокинез и т.д., играют центромерные белковые комплексы. Однако до сих пор не все события, происходящие в клетках высших организмов при митозе, детально описаны. В частности, значение центромерных белковых комплексов в регуляции прохождения митоза у растений раскрыто не полностью.

Цель представляемого обзора — обобщить накопленные к настоящему времени данные о строении и функционировании компонентов центромерных белковых комплексов в высших растениях.

Центромерные белковые комплексы. Центромерные белковые комплексы (крупные конгломераты, расположенные на центромерах) ответственны за процессы, связанные с клеточным делением: соединение хромосом с микротрубочками веретена деления, движение хромосом к метафазной пластинке, проверку выстраивания хромосом в метафазе и расхождение хромосом к полюсам веретена деления. Термином «центромерные белковые комплексы», который шире определения «кинетохоры», дополнительно обозначают расположенные на центромере белки,

ответственные за сцепление сестринских хроматид, а также белки с неизвестными функциями. У высших растений по сравнению с другими таксонами исследования центромерных белковых комплексов приобретают особую значимость, поскольку имеют принципиальное значение при разработке и использовании искусственных хромосом в качестве векторов для направленного тканеспецифичного трансгеноза.

Накоплены лишь разрозненные единичные сведения о центромерных белках (ЦБ) в высших растениях; некоторые были обнаружены посредством иммунохимического анализа по взаимодействию кинетохоров с антителами против соответствующих белков животных. Известные ЦБ высших растений (1-3) представлены в таблице.

Известные центромерные белки высших растений

Клеточный процесс/ временная точка/ структура/роль белка	Название	Вид растения	Клонирование соответствующего гена
Структурная роль	CENP-A	<i>Zea mays</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	+
	CENP-B	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Нет данных
	CENP-C	<i>Z. mays</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Hordeum vulgare</i>	+ (из <i>Z. mays</i>)
Контрольная точка веретена деления	MAD2	<i>Z. mays</i>	+
	3F3/2-антиген	<i>Z. mays</i>	-
Движение хромосом	CENP-E	<i>V. faba</i> , <i>H. vulgare</i>	-
		<i>Allium sativum</i> , <i>Tulbaghia violacea</i>	-
Фосфорилирование гистонов, регулирование прохождения контрольной точки веретена деления и цитокинеза	γ-Тубулин	<i>V. faba</i>	-
	Авроры	<i>N. benthamiana</i> , <i>A. thaliana</i>	+
Роль неизвестна	CBF5	<i>V. faba</i> , <i>H. vulgare</i>	+ (из <i>H. vulgare</i>)
	CENP-F	<i>H. vulgare</i>	-
	Мейотический гистон H1	<i>Lilium longiflorum</i>	+
	MPM2-антигены	<i>Vicia faba</i>	-
	SKP1	<i>Vicia faba</i> , <i>Hordeum vulgare</i>	-

Примечание. «+» или «-» — ген соответственно был или не был клонирован.

Сравнительно небольшая группа белков была выявлена в центромерном районе как в делящихся, так и в неделящихся клетках. Эти белки взаимодействуют непосредственно с ДНК и служат якорем для некоторых других ЦБ. К указанной группе принадлежат центромерный вариант гистона H3 — CENP-A (centromeric protein A) (1, 4), а также белки CENP-B (5) и CENP-C (3). Считается, что кинетохор растений имеет шарообразную форму; одно его полушарие, обращенное к сестринской хроматиде, представлено в основном белком CENP-C, другое, направленное к микротрубочкам, — белками MAD2 и 3F3/2-антигеном (6).

Роль белков контрольной точки веретена деления (в растениях были обнаружены белок MAD2 и белок, распознаваемый антителом 3F3/2) (6) состоит в передаче сигнала о достигнутой правильной метафазной ориентации хромосом компонентам комплекса, определяющего начало анафазы (anaphase-promoting complex, APC). CENP-E — моторный белок из семейства кинезинов — обнаружен в растениях по иммунохимическому взаимодействию кинетохоров с антителами против CENP-E человека (7). Хотя в качестве основного центра организации микротрубочек в растениях рассматривается ядерная оболочка, имеются экспериментальные данные о роли кинетохоров в организации веретена деления. Так, в кинетохорах растений были обнаружены два белка с высокой гомологией к центросомальным белкам

животных: γ -тубулин (8) и так называемый 6С6 антиген (белок, распознаваемый антителом 6С6 против центросомального теллячьего антигена) (9).

К ЦБ с неизвестными функциями относятся CBF5, CENP-F (предполагается его участие в ранней стадии созревания кинетохоров) (7), центромерный вариант мейотического гистона H1 (несет эпитоп, распознаваемый специфическим антителом лишь в центромере) (10, 11), MPM2-антигены (большая группа фосфорилированных эпитопов неизвестной белковой принадлежности) (12), SKP1 (компонент убиквитин-лигазного комплекса, иницирующего протеолиз разнообразных белков, в том числе кинетохорных) (7).

Известно о двух масштабных исследованиях центромерных белковых комплексов у человека на культуре опухолевых клеток HeLa (13, 14), подтвердивших общность принципов и подходов к изучению комплексов ЦБ и позволивших получить данные, которые могут быть использованы для сравнительного анализа белков, а также поиска возможных ортологов соответствующих генов в растениях. В одном из экспериментов (13) гены CENP-A (центромерный вариант гистона H3) и H3.1 (обычный вариант гистона H3) были сшиты с последовательностью TAP (tandem affinity purification, концевой полипептид для афинной хроматографии) и экспрессированы в клетках HeLa. Как известно, афинная хроматография с TAP-полипептидом проводится в относительно мягких условиях, не разрушающих связи между белками, в результате чего выделяются целые комплексы, связанные с белком, содержащим TAP-область. Авторы получили два набора белков (связанных с гистоном CENP-A-TAP и гистоном H3.1-TAP), которые идентифицировали масс-спектрометрией. Для выявления центромерных белков второго порядка полученные таким образом белки были экспрессированы в сшивке с LAP-концевым полипептидом, содержащим GFP (зеленый флюоресцирующий белок). С использованием антител против GFP удалось не только провести очистку белковых комплексов, но и подтвердить центромерную локализацию меченных им белков. Компонентами исследованных комплексов были негистонные белки, которые различались почти полностью, и варианты гистона H2A. В частности, тасгоH2a и H2A.Z, участвующие в регуляции генной экспрессии, присутствовали в CENP-A-TAP комплексе, а H2A.X, ассоциированный с репарацией ДНК, — в H3.1-TAP-комплексе. На основе полученных данных была предложена модель белкового комплекса, ассоциированного с CENP-A-содержащей центромерной нуклеосомой. Согласно этой модели CENP-A-содержащая нуклеосома непосредственно связана с проксимальным комплексом CENP-A-NAC (CENP-A-nucleosome associated complex), состоящим из центромерных белков CENP-M, CENP-N, CENP-T, CENP-U(50), CENP-C и CENP-H. Взаимодействие CENP-A-NAC с центромерой обусловлено присутствием CENP-M, CENP-N и CENP-T. Белок, облегчающий транскрипцию хроматина (FACT) (вовлечен в транскрипционную перестройку хроматина), и нуклеофосмин-1 (многофункциональный ядерный шаперон) отсутствуют в H3-содержащей нуклеосоме, но независимо от CENP-A-NAC стабильно обнаруживаются в CENP-A-нуклеосоме. Дистальный центромерный комплекс CAD (CENP-A-nucleosome distal complex) состоит из центромерных компонентов CENP-K, CENP-L, CENP-O, CENP-P, CENP-Q, CENP-R и CENP-S, ассоциированных с CENP-A-NAC. CENP-A-NAC необходим для стабилизации связи центросомы с микротрубочками, а также выстраивания хромосом в анафазе и расхождения.

В другом исследовании (14) центромерный комплекс был выделен посредством иммунопреципитации хроматина с антителами против CENP-A. Масс-спектрометрический анализ этого комплекса выявил около 40 белков. Показано, что один из них (DDB-1) присутствует в центромерном районе в течение всего клеточного цикла и полифункционален. В частности, он служит фактором репарации ДНК и кофактором регуляции транс-

крипции. Для другого обнаруженного компонента центромерного комплекса (ВМ1-1) была показана локализация в центромерном районе в интерфазе. Кроме ВМ1-1, в центромерный комплекс входят другие белки поликомбной группы (PcG). Как известно, такие белки служат эпигенетической меткой хроматиновой матрицы, поддерживая состояние молчания генов. Иными словами, в интерфазном ядре регуляция генного молчания может осуществляться через центромерный комплекс. Функции примерно 20 выявленных компонентов центромерного комплекса неизвестны.

А в р о р ы. Авроры представляют собой класс высококонсервативных киназ, участвующих в клеточном делении, которые регулируют формирование комплекса контрольной точки веретена деления и цитокинез, осуществляя фосфорилирование гистонов (например, H3 и CENP-A), а также некоторых других центромерных белков. Многие организмы содержат несколько типов аврор, различающихся по клеточной локализации и субстратной специфичности (2).

Авроры у животных. У животных авроры изучены гораздо полнее, чем у растений. Из-за вовлеченности аврор в регуляцию клеточного деления ингибиторы животных аврор способны подавлять рост опухолевых клеток: если традиционно используемые противоопухолевые средства воздействуют на микротрубочки как делящихся, так и неделящихся клеток, что приводит к тяжелым побочным эффектам, то ингибиторы аврор специфически воздействуют на делящиеся клетки. В настоящее время разработки ингибиторов животных аврор находятся на стадии предклинических испытаний (15). Один из таких ингибиторов — хесперадин — используют в исследованиях на растительных аврорах (16). Накопленные данные по аврорам у животных дают возможность выдвинуть некоторые предположения о роли аврор у растений и определить направления дальнейших исследований.

Аврора А (Aurora A) — важный фактор, контролирующий вовлечение в центросому γ -тубулина, белка D-TACC («Drosophila transforming acidic coiled-coil») и центросомина у дрозофилы. При этом аврора А может как осуществлять непосредственное фосфорилирование (в случае D-TACC), так и выполнять структурные функции (в случае центросомина). Показано, что аврора А регулирует клеточное деление независимо от ее центросомального эффекта дополнительными, пока что не изученными способами (17).

Как известно, двухполярная организация веретена деления основывается на балансе связанных с микротрубочками, ориентированных соответственно на минус- и плюс-полос моторных белков — динеина и Eg5. Предполагается, что аврора А участвует в сборке веретена деления, осуществляя прямое фосфорилирование и активацию Eg5. Другой важный белок в организации веретена деления — RanGTP — вовлечен в этот процесс через общий с авророй А метаболический путь. RanGTP стимулирует высвобождение TRX2 из комплекса с ингибирующими импортинами α и β . Свободный TRX2, связавшись с авророй А, может вызвать ее активацию вследствие аутофосфорилирования. Кроме того, активная конформация связанной с TRX2 авроры А защищает ее от дезактивации фосфатазой 1 (PP1) (18).

Аврора В (Aurora B) у животных играет роль каталитического компонента во временном хромосомальном комплексе (ВХК). Он также включает по меньшей мере три других компонента — внутренний центромерный белок INCENP, сурвивин и бореалин/DasraB (двумя дополнительными служат CSC-1 и TD-60). Локализация ВХК в течение клеточного цикла значительно изменяется. В прометафазе и метафазе он расположен на центромере, в начале анафазы — перемещается на центральное веретено, в телофазе и на этапе цитокинеза — располагается по границе центрального тела (19). В соответствии с такой локализацией ВХК играет важную роль в регуляции расхождения хромосом, а также в управлении анафазой и цитокинезом (20, 21). Разрушение пространственной структу-

ры или ингибирование функции авроры В либо любой другой субъединицы ВХК приводит к нарушению конгрессии хромосом, соединения кинетохора и микротрубочек, запаздыванию хромосом в анафазе и, в конечном счете, к невозможности реализации цитокинеза (19, 21, 22).

Функциональный подкомплекс ВХК может связываться с центромерой независимо от авроры В. На основании биохимических исследований и анализа *in vitro* и *in vivo* было показано, что этот подкомплекс состоит из 58 N-терминальных аминокислот INCENP, а также по меньшей мере димеров как сурвивина, так и бореалина. В составе этого модуля бореалин может обеспечивать расположение комплекса на центромере за счет прямого связывания с ДНК (21).

Данные, полученные в одном из недавно выполненных исследований, свидетельствуют, что, несмотря на общность локализации в процессе митоза, белки ВХК значительно различаются между собой по нуклеоцитоплазматической локализации в период до разрушения ядерной мембраны. Более того, специфические эффекты INCENP и сурвивина на локализацию соответственно авроры В и бореалина указывают на возможность существования разных комплексов ВХБ не только в период митоза, но и до начала разрушения ядерной оболочки (23).

Будучи «ферментной сердцевиной» ВХК, аврора В выполняет по меньшей мере три различные киназные функции, связанные с гистонами, проверкой выстраивания веретена деления и цитокинезом (24).

Хотя ВХК связывается с центромерой без непосредственного участия авроры В (которая, тем не менее, требуется для стабильности INCENP), ее киназная активность совершенно необходима для присоединения к центромере других белков, таких как МСАК и иерархически низшие компоненты проверки выстраивания веретена деления — BubR1, CENP-E и Mad2. В этой связи было продемонстрировано, что аврора В фосфорилирует находящиеся у центромеры белки CENP-A и МСАК, а также белки, расположенные на центральном веретене и центральном теле при цитокинезе (Mklp1, MgcRacGap и виментин) (21).

Аврора В давно рассматривается как регулятор хромосомной биориентации, но ее субстраты (такие как гистон H3, CENP-A, виментин, десмин, GFAP, топоизомераза II, mgcRacGAP и легкая регуляторная цепь миозина, ранее обнаруженные в клетках метазоа) с биориентацией явно не связаны. Сравнительно недавно показано, что МСАК, необходимый для хромосомной конгрессии, биориентации, формирования веретена деления и расхождения хромосом в анафазе, служит субстратом для авроры В *in vitro* и *in vivo* в клетках человека и ксенопуса. Имеющиеся данные свидетельствуют, что МСАК — ключевой компонент в запускаемых авророй В процессах. Фосфатаза 1 (PP1), находящаяся на внешнем кинетохоре, регулирующая активность авроры В и дефосфорилирующая ее субстраты, представляется вероятным модулятором МСАК (15).

Авроры в высших растениях. Считается, что авроры дивергировали на семейства после эволюционного расхождения между животными и растениями и, по-видимому, произошли от единственного предшественника, обнаруженного у дрожжей (2).

Локализация аврор в растениях была изучена на примере модельного вида *Arabidopsis thaliana* (2, 25). Авроры 1 и 2 в интерфазе сосредоточены в ядре (главным образом в ядерной мембране и в небольшом количестве — на периферии ядра), в профазе перемещаются к обоим концам ядра в соответствии с полюсами клеточного деления, формируя подобие «шапки», в прометафазе располагаются на фибрах, в метафазе зона их локализация напоминает веретено, с анафазы до телофазы они находятся на половинках веретена, которые движутся к полюсам. На стадии телофазы аврора 1 также обнаруживается в клеточной пластинке. Когда начинается

деконденсация митотических хромосом, авроры 1 и 2 постепенно возвращаются на периферию ядра. Такая локализация аврор 1 и 2 в течение клеточного цикла (кроме размещения авроры 1 в клеточной пластинке) совпадает с расположением γ -тубулина — компонента центра организации микротрубочек у растений, что позволяет предположить участие аврор 1 и 2 в деятельности этого центра.

Аврора 3 по локализации отличается от аврор 1 и 2. В интерфазе аврора 3 находится в цитоплазме вокруг ядра, в профазе, когда хромосомы начинают конденсироваться, на них появляется точечный сигнал авроры 3, который в прометафазе перемещается к метафазной пластинке одновременно с перемещением хромосом, в метафазе обнаруживается в середине метафазной пластинки, в анафазе при расхождении хромосом распределяется примерно равномерно по всей их длине, а после завершения клеточного деления возвращается в ядерную мембрану и цитоплазму вокруг ядра. Таким образом, локализация авроры 3 в начале митоза совпадает с локализацией авроры В у животных с той разницей, что после метафазы аврора 3 равномерно распределяется по хромосоме, тогда как аврора В остается в метафазной пластинке для регуляции цитокинеза. По локализации на стадии профазы—анафазы аврора 3 подобна гистону H3, фосфорилированному по серину-10 (2), что указывает на фосфорилирование этой аминокислоты авророй 3 *in vivo*.

На основании первичных аминокислотных последовательностей аврор арабидопсиса в базе данных EMBL (European Molecular Biology Laboratory) были обнаружены экспрессируемые последовательности EST (expressed sequence tag), кодируемые аврора-подобными генами, в растениях следующих видов: *Citrus sinensis*, *Malus domestica*, *Gossypium raimondii*, *G. arboreum*, *Phaseolus coccineus*, *Lupinus albus*, *Populus tremula* × *P. tremuloides*, *Anthirrhium majus*, *Zinnia elegans*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Saccharum officinarum*, *Oryza sativa*, а также *Allium cepa* и *Vitis aestivalis* (25).

Несмотря на то, что у животных и дрожжей известно значительное число белков, взаимодействующих с аврорами, в геноме арабидопсиса и у целого ряда других растений с помощью сравнительного анализа аминокислотных последовательностей программой blastp в базе данных NCBI не удалось обнаружить гомологов для партнеров авроры В — INCENP, сурвивина и бореалина/DasraB (2).

Ф о с ф о р и л и р о в а н и е г и с т о н а H3. Было показано, что фосфорилирование гистона H3 связано с хромосомной конденсацией/сегрегацией, активацией транскрипции, апоптозисом и восстановлением поврежденной ДНК (26). На основании имеющихся данных гистон H3 может рассматриваться как основной субстрат аврор (17).

У некоторых эукариотов в интерфазе уровень фосфорилирования H3 низкий, однако при клеточном делении он возрастает. У животных связанное с клеточным циклом фосфорилирование гистона H3 по серину-10 (H3S10) и серину-28 (H3S28) возникает в перичентромере, распространяется по всей хромосоме на стадии G₂—M и, по-видимому, связано с началом конденсации хромосом. При этом у млекопитающих при ингибировании фосфорилирования H3S10 белок HP1 (heterochromatic protein 1) не высвобождается из митотических хромосом (27).

До сих пор нет единого мнения о первичной функции фосфорилированного гистона H3. Возможно, такое фосфорилирование служит меткой хромосомальных доменов, необходимой для прохождения хромосомами контрольной точки веретена деления (28).

В целом предполагается, что модификация гистонов служит для контроля связывания негистонных белков с волокнами хроматина. Было показано, что некоторые хромодомены связываются с метилированным, а бромодомены — с ацетилированным лизином. При этом до сих пор не известны

белки, взаимодействующие с фосфорилированными гистонами в митозе (27). Недавно показано, что у млекопитающих белки эpsilon- и zeta-14-3-3 взаимодействуют с фосфорилированными H3S10 и H3S28 промотора гена HDAC1, активируя транскрипцию этого гена. Однако эpsilon- и zeta-14-3-3 полностью отсутствуют в митотических хромосомах, что указывает на узнавание ими фосфорилированного гистона H3 только в интерфазе (29).

У животных гистон H3, в значительной степени фосфорилированный по серину-10, обнаружен в транскрипционно неактивных конденсированных хромосомах в митозе; в то же время в интерфазе участки распределения такого фосфорилированного гистона H3 соответствуют области активного деконденсированного хроматина. Возможное объяснение состоит в том, что фосфорилирование H3S10 играет регуляторную роль в высвобождении хромосомы из клеточного матрикса. Например, переключение с двойного метилирования лизина-9 (H3K9me2) на фосфорилирование серина-10 предотвращает связывание белка HP1 и гетерохроматизацию. Таким образом, в интерфазе фосфорилирование H3S10 способно вызывать отсоединение соответствующего хромосомного района от клеточного матрикса, его деконденсацию и, как следствие, генную экспрессию, тогда как дефосфорилирование восстанавливает гетерохроматиновый статус и приводит к молчанию генов. Переключение между метилированием и фосфорилированием обеспечивало бы гибкую регуляцию генной экспрессии в зависимости от стадии развития организма или внешних условий. В метафазе хромосомы должны целиком отделиться от интерфазного матрикса, и высвобождение связанных с метилированными гистонами белков в результате равномерного значительного фосфорилирования H3S10 было бы эффективным способом такого открепления, позволяющего хромосоме перестроиться для митотических взаимодействий (30). Работает ли механизм H3K9me2/H3S10ph в растениях, остается под вопросом.

В растениях гистон H3 фосфорилирован по серину-10 с профазы до телофазы в перицентромерных районах (31) и по серину-28 — с поздней профазы до ранней телофазы в центральной части перицентромерных районов (32), то есть фосфорилирование по серину-28 проявляется позже и перестает обнаруживаться раньше.

Локализация гистона H3, фосфорилированного по серину-10 и серину-28, у растений ограничена перицентромерными районами на стадии митоза и мейоза II, тогда как при первом мейотическом делении обе аминокислоты фосфорилированы по всей длине хромосомы. Эти данные приводят к предположению, что в растениях перицентромерное фосфорилирование серина-10 и серина-28 в течение митоза и метафазы II требуется скорее для сцепления сестринских хроматид, чем для хромосомной конденсации (27). Действительно, у мутанта кукурузы *afd1*, дефектного по сцеплению сестринских хроматид, у унивалентов в метафазе I наблюдается обильное фосфорилирование H3 только в перицентромерных районах (33), а в дицентрических хромосомах кукурузы гистон H3 гиперфосфорилирован только в функциональной центромере (34).

В растениях серин-10 и серин-28 дефосфорилируются в интеркинезе и заново фосфорилируются в профазе II. Было продемонстрировано, что фосфорилирование серина-10 и серина-28 обратимо и не зависит от репликации ДНК (35). *In vitro* все три авроры арабидопсиса могут фосфорилировать H3 по серину-10 (2). Локализация фосфорилированных H3S10, H3S28 и авроры 3 сходна (2). Рекомбинантная аврора 3 фосфорилировала *in vitro* не только H3S10, но и H3S28 (16), а аврора 1 — лишь H3S10 (25). На культуре клеток табака BY-2 показано, что NtAUR, ортолог авроры 3 арабидопсиса и единственная известная аврора *Nicotiana benthamiana*, фосфорилирует H3 по обоим серинам. База данных BY-2 EST (expressed sequence tag) содержит один гомолог авроры 3 (гомологи аврор 1 и 2 отсутствуют) (16).

CENH3. *CENH3* (у животных известный также как *CENP-A*) — центромерный вариант гистона H3. У дрожжей присутствие всех известных компонентов кинетохора связано с наличием нуклеосом, специфичных для центромеры; аналогичные данные получены на высших эукариотах — млекопитающих и цветковых растениях (36, 37). Центромерный хроматин включает как *CENP-A*, так и обычный H3 гистон и, вероятно, иногда H3.3, при этом предполагается, что *CENP-A* и H3 расположены в разных длинных нуклеосомных последовательностях. Было показано (38), что размер единичных *CENP-A*- и H3-содержащих последовательностей у дрозофилы составляет около 15-40 т.п.н. Считается, что *CENP-A*-содержащие последовательности обращены наружу (к микротрубочкам), H3-содержащие — во внутреннюю область, где происходит сцепление сестринских хроматид. Гипотеза о существовании отдельных *CENP-A*- и H3-содержащих нуклеосомных последовательностей нашла подтверждение в случае центромеры риса и человеческой нецентромеры (37). Кроме того, продемонстрировано, что 90 % *CENP-A*-нуклеосом у человека — гомотипные (содержат две копии *CENP-A*) и 10 % — гетеротипные (включают по одной копии *CENP-A* и обычного гистона H3) (13). На ячмене выявили отличное от описанных ранее пространственное расположение вариантов H3 на хромосоме: немодифицированный гистон распределен по всей длине хромосом при значительно меньшей плотности в зоне первичной перетяжки, фосфорилированный по серину-10 — в перичентромерной области при отсутствии в районе первичной перетяжки, а *CENP-A* идентифицирован в месте первичной перетяжки в виде двух кластеров, расположенных латерально хромосомной оси. Области размещения этих вариантов гистона H3 частично перекрываются, при том что на некоторых участках явного присутствия ни одного из изученных вариантов не обнаружили (39).

Центромерный вариант гистона H3, известный как *CENH3*, *CENP-A* и *HTR12*, гомологичный гистону *CENP-A* млекопитающих, был найден в *A. thaliana* (1). Экспрессия *CENP-A* арабидопсиса зависит от репликации, поскольку связана с S-фазой клеточного цикла, когда гистоны взаимодействуют с реплицированной ДНК, создавая двойной набор хроматина (40). Однако имеются данные, что встраивание *CENP-A* в хроматин у арабидопсиса происходит главным образом на стадии фазы G₂ (4).

У человека *CENP-A* первоначально фосфорилируется по серину-7 авророй A, что необходимо для последующего фосфорилирования *CENP-A* авророй B и размещения последней на центромере в прометафазе (41). Аналогичную кинетику фосфорилирования серина-50 гистона *CENH3* и серина-28 гистона H3 наблюдали у кукурузы, что указывает на участие в этих процессах одной и той же гистонной киназы, которая сначала связывается с *CENH3*, после чего реакция распространяется на H3, определяя границы перичентромеры (42). Однако вопрос, осуществляется ли в растениях фосфорилирование гистона *CENP-A* аврорами, как это было показано на других организмах, остается пока открытым.

Итак, к настоящему времени накоплены свидетельства роли центромерных белков в процессах деления растительных клеток и иерархической организации центромерного белкового комплекса. Установлено, что структурные белки *CENP-A*, *CENP-B* и *CENP-C* присутствуют на центромерах как в делящихся, так и в неделящихся клетках, в то время как белки *MAD2*, *CENP-E*, *3F3/2*- и *6С6*-антиген, γ -тубулин и некоторые другие свойственны только центромерам делящихся клеток. Выявленное значение аврора-киназ в управлении клеточным делением позволяет предположить, что авроры 1 и 2 участвуют в реализации работы митотического центра организации микротрубочек у растений. Аврора 3 по локализации

отлична от аврор 1 и 2, однако в период с профазы до анафазы подобна гистону H3, фосфорилированному по серину-10 (2), что указывает на фосфорилирование этой аминокислоты авророй 3 *in vivo*. *In vitro* все три авроры арабидопсиса фосфорилируют H3 по серину-10. В интерфазе фосфорилирование H3S10 способно вызывать отделение соответствующего хромосомного участка от клеточного матрикса, что обеспечивает возможность деконденсации и активации генной экспрессии, тогда как дефосфорилирование восстанавливает гетерохроматиновый статус и приводит к молчанию генов. Такое переключение с метилирования на фосфорилирование и наоборот, по-видимому, представляет собой чрезвычайно гибкий эпигенетический механизм, с помощью которого достигается регуляция экспрессии генов в зависимости от стадии развития организма или внешних условий. В то же время данные о том, происходит ли подобное переключение (H3K9me2/H3S10ph) в растениях, пока не получены.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Talbert P.B., Masuelli R., Tyagi A.P. e.a. Centromeric localization and adaptive evolution of an *Arabidopsis* histone H3 variant. *Plant Cell*, 2002, 14: 1053-1066.
2. Kawabe A., Matsunaga S., Nakagawa K. e.a. Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant Mol. Biol.*, 2005, 58: 1-13.
3. Yu H.G., Hiatt E.N., Dawe R.K. The plant kinetochore. *Trends Plant Sci.*, 2000, 5: 543-547.
4. Lermontova I., Schubert V., Fuchs J. e.a. Loading of *Arabidopsis* centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *Plant Cell*, 2006, 18: 2443-2451.
5. Barbosa-Cisneros O., Fraire-Velazquez S., Moreno J. e.a. CENP-B autoantigen is a conserved protein from humans to higher plants: identification of the aminoterminal domain in *Phaseolus vulgaris*. *Rev. Rhum. Engl. Ed.*, 1997, 64: 368-374.
6. Yu H.G., Muszynski M.G., Kelly Dawe R. The maize homologue of the cell cycle checkpoint protein MAD2 reveals kinetochore substructure and contrasting mitotic and meiotic localization patterns. *J. Cell Biol.*, 1999, 145: 425-435.
7. Ten Hoopen R., Manteuffel R., Dolezel J. e.a. Evolutionary conservation of kinetochore protein sequences in plants. *Chromosoma*, 2000, 109: 482-489.
8. Binarova P., Hause B., Dolezel J. e.a. Association of gamma-tubulin with kinetochore/centromeric region of plant chromosomes. *Plant J.*, 1998, 14: 751-757.
9. Schmit A.C., Stoppin V., Chevrier V. e.a. Cell cycle dependent distribution of a centrosomal antigen at the perinuclear MTOC or at the kinetochores of higher plant cells. *Chromosoma*, 1994, 103: 343-351.
10. Suzuki T., Ide N., Tanaka I. Immunocytochemical visualization of the centromeres during male and female meiosis in *Lilium longiflorum*. *Chromosoma*, 1997, 106: 435-445.
11. Riggs C.D. Meiotin-1: the meiosis readiness factor? *Bioassays*, 1997, 19: 925-931.
12. Binarova P., Cihalikova J., Dolezel J. Localization of MPM-2 recognized phosphoproteins and tubulin during cell cycle progression in synchronized *Vicia faba* root meristem cells. *Cell Biol. Int.*, 1993, 17: 847-856.
13. Foltz D.R., Jansen L.E., Black B.E. e.a. The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat. Cell Biol.*, 2006, 8: 458-469.
14. Obuse C., Yang H., Nozaki N. e.a. Proteomics analysis of the centromere complex from HeLa interphase cells: UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB-1) is a component of the CEN-complex, while BMI-1 is transiently co-localized with the centromeric region in interphase. *Genes to Cells*, 2004, 9: 105-120.
15. Andrews P.D. Aurora kinases: shining lights on the therapeutic horizon? *Oncogene*, 2005, 24: 5005-5015.
16. Kurihara D., Matsunaga S., Kawabe A. e.a. Aurora kinase is required for chromosome segregation in tobacco BY-2 cells. *Plant J.*, 2006, 48: 572-580.
17. Andrews P.D., Knatko E., Moore W.J. e.a. Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Cur. Opin. Cell Biol.*, 2003, 15: 672-683.
18. Ducat D., Zheng Y. Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp. Cell Res.*, 2004, 301: 60-67.
19. Vagnarelli P., Earnshaw W.C. Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma*, 2004, 113: 211-222.
20. Adams R.R., Carmona M., Earnshaw W.C. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.*, 2001, 11: 49-54.
21. Klein U.R., Nigg E.A., Gruneberg U. Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Mol. Biol. Cell*, 2006, 17: 2547-2558.
22. Meraldi P., Honda R., Nigg E.A. Aurora kinases link chromosome segregation and

- cell division to cancer susceptibility. *Cur. Opin. Genet. Dev.*, 2004, 14: 29-36.
23. Rodriguez J.A., Lens S.M., Span S.W. e.a. Subcellular localization and nucleocytoplasmic transport of the chromosomal passenger proteins before nuclear envelope breakdown. *Oncogene*, 2006, 25: 4867-4879.
 24. Giet R., Petretti C., Prigent C. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol.*, 2005, 15: 241-250.
 25. Demidov D., Van Damme D., Geelen D. e.a. Identification and dynamics of two classes of aurora-like kinases in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Cell*, 2005, 17: 836-848.
 26. Houben A., Demidov D., Caperta A.D. e.a. Phosphorylation of histone H3 in plants — a dynamic affair. *Biochem. Biophys. Acta*, 2007, 1769(5-6): 308-315.
 27. Fuchs J., Demidov D., Houben A. e.a. Chromosomal histone modification patterns — from conservation to diversity. *Trends Plant Sci.*, 2006, 11: 199-208.
 28. Prigent C., Dimitrov S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Cell Sci.*, 2003, 116: 3677-3685.
 29. Winter S., Simboeck E., Fischle W. e.a. 14-3-3 Proteins recognize a histone code at histone H3 and are required for transcriptional activation. *Embo J.*, 2008, 27: 88-99.
 30. Johansen K.M., Johansen J. Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Res.*, 2006, 14: 393-404.
 31. Houben A., Wako T., Furushima-Shimogawara R. e.a. The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *Plant J.*, 1999, 18: 675-679.
 32. Gernand D., Demidov D., Houben A. The temporal and spatial pattern of histone H3 phosphorylation at serine 28 and serine 10 is similar in plants but differs between mono- and polycentric chromosomes. *Cyt. Gen. Res.*, 2003, 101: 172-176.
 33. Kaszas E., Cande W.Z. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *Cell Sci.*, 2000, 113: 3217-3226.
 34. Han F.P., Lamb J.C., Birchler J.A. High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize. *PNAS*, 2006, 103: 3238-3243.
 35. Manzanero S., Rutten T., Kotseruba V. e.a. Alterations in the distribution of histone H3 phosphorylation in mitotic plant chromosomes in response to cold treatment and the protein phosphatase inhibitor cantharidin. *Chromosome Res.*, 2002, 10: 467-476.
 36. Collins K.A., Castillo A.R., Tatsutani S.Y. e.a. De novo kinetochore assembly requires the centromeric histone H3 variant. *Mol. Biol. Cell*, 2005, 16: 5649-5660.
 37. Dawe R.K., Henikoff S. Centromeres put epigenetics in the driver's seat. *Trends Biochem. Sci.*, 2006, 31: 662-669.
 38. Blower M.D., Sullivan B.A., Karpen G.H. Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev. Cell*, 2002, 2: 319-330.
 39. Houben A., Schroeder-Reiter E., Nagaki K. e.a. CENH3 interacts with the centromeric retrotransposon cereba and GC-rich satellites and locates to centromeric substructures in barley. *Chromosoma*, 2007, 116: 275-283.
 40. Okada T., Endo M., Singh M.B. e.a. Analysis of the histone H3 gene family in *Arabidopsis* and identification of the male-gamete-specific variant AtMGH3. *Plant J.*, 2005, 44: 557-568.
 41. Kunitoku N., Sasayama T., Marumoto T. e.a. CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev. Cell*, 2003, 5: 853-864.
 42. Zhang X., Li X., Marshall J.B. e.a. Phosphoserines on maize centromeric histone H3 and histone H3 demarcate the centromere and pericentromere during chromosome segregation. *Plant Cell*, 2005, 17: 572-583.

¹Институт Лейбница генетики растений
и исследования возделываемых культур,

Гатерслебен, D-06466, Германия;

²ГНУ ГНЦ РФ Всероссийский НИИ
растениеводства им. Н.И. Вавилова,

190000 г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 44,
e-mail: yu.chesnokov@vir.nw.ru

Поступила в редакцию
15 января 2009 года

CHROMOSOMAL CENTROMERIC PROTEINS IN HIGHER PLANTS. I. STRUCTURE AND FUNCTION OF CENTROMERIC COMPLEXES (review)

L.P. Vlasenko¹, Yu.V. Chesnokov²

S u m m a r y

Known centromeric proteins in plants are reviewed. Attention is focused on CENP-A (CENH3) histone — centromeric variant of H3 histone — and on phosphorylation of CENP-A and H3 by aurora kinases during cell division.