

УДК 576.315:341.29.25.17:633.11

## АНАЛИЗ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА МИКРОСПОРОЦИТОВ ПЫЛЬНИКА ПШЕНИЦЫ ПРИ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ IN SITU

Э.А. ИВАНОВА, Г.Х. ВАФИНА

*Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук  
450054 Уфа, просп. Октября, 69  
e-mail: evilina@anrb.ru*

Проведен биохимический анализ клеточных ядер сформированных микроспороцитов (МкСпц I) в поздней интерфазе и микроспороцитов пшеницы, вступивших в профазу I (МкСпц II) в нормальных и стресс-холодовых условиях *in situ*. Показано изменение динамики содержания белков как в целых ядрах, так и на уровне хроматина, непрочного связанного с ядерным матриксом (ЯМ), и в самом ЯМ микроспороцитов в нормальных условиях. Под воздействием холода на третьи сутки значительно увеличилось содержание белка в ядрах МкСпц II. МкСпц I отличаются от МкСпц II по активности реализации Арг-Х протеазо-процессинга и ингибированию трипсина в супраструктурах хроматина. В МкСпц I активность ингибиторов выше.

*Ключевые слова:* *Triticum aestivum* L., пшеница, клеточное ядро, нуклеоплазма, хроматин, ядерный матрикс, Арг-Х протеолиз, МкСпц I, МкСпц II, пыльник.

В результате развития спорогенной ткани в пыльнике образуются материнские клетки пыльцы — микроспороциты [1]. В генезисе пыльника злаков Круглова [3, 5, 6] выделила период перехода спорогенной ткани в сформированный микроспороцит I (МкСпц I) с последующим преобразованием последнего в микроспороцит II (МкСпц II), вступивший в стадию профазы I мейоза — наиболее продолжительную фазу, что вероятнее всего обусловлено высоким ядерно-плазменным отношением [1]. В микроспороцитах значительно изменяются объемы их ядер, деспирализованность хромосом в мейотической профазе I позволяет им сохранять высокую метаболическую активность [1]. В отличие от профазы митоза в профазе I мейоза синтезируются РНК и белки, необходимые как для прохождения мейоза, так и для дальнейшего развития микроспор, что обеспечивает их нормальное постмейотическое формирование. Любые нарушения как в стенке пыльника, так и в микроспороцитах могут привести к прекращению или аномальному развитию микроспор, что наблюдается при разных типах мужской стерильности [1]. Динамические изменения структуры хроматина профазы I мейоза, в ходе которого, в частности, происходят синапсис и рекомбинация гомологичных хромосом, представляют огромный интерес для исследователей.

Целью нашей работы был анализ белков хроматина МкСпц I, МкСпц II в нормальных условиях и при холодовом воздействии на фоне динамики содержания белков целых ядер, их супраструктур (нуклеоплазмы, хроматина, ядерного матрикса), а также процессинга при участии Арг-Х протеолиза.

## Методика

Объектом исследования была яровая мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. (Московская 35). Сорт среднеспелый, пластичный, способен формировать высокие урожаи в разных по климатическим условиям зонах. В разные годы вегетационный период (от всходов до полной спелости зерна) длится 79—97 сут.

Для экспериментов использовали растения, выращенные на опытном участке Института биологии Уфимского научного центра РАН, семена которых любезно предоставлены д-ром биол. наук Н.Н. Кругловой, посев осуществлен ее сотрудником канд. биол. наук Д.А. Зайцевым. При определении фаз развития репродуктивных клеток (МкСпц I, МкСпц II) строго использована периодизация, разработанная Кругловой [3, 5, 6].

В данном эксперименте период сформированного МкСпц I приходился на 48-е сутки от посева семян, период МкСпц II профазы I мейоза — на 50-е сутки. Для цитогистологической идентификации фаз развития репродуктивных клеток МкСпц I, МкСпц II использован общепринятый метод приготовления временных давленных препаратов пыльников, которые готовили согласно методике Прозиной [8]. В качестве красителя использовали 2—4 %-й ацетокармин. Временные давленные препараты просматривали с помощью светового микроскопа Биолам Р4 при увеличении объектива  $\times 350$ . Стрессовое воздействие *in situ* на срезанные колосья, содержащие МкСпц I, МкСпц II, проводили помещением их в холододовую камеру температурой  $4 \pm 1$  °C на 5 сут без освещения. Использование холододовых условий, близких к природным, т.е. с дневным освещением и ночной темнотой, привело к тому, что в колосьях уже через 1—2 сут начали формироваться диады и тетрады микроспор. Поэтому период дневного освещения при холододовых условиях мы исключили. Через каждые 24 ч пыльники исследовали цитогистологически и консервировали в глицерине для биохимического анализа по предложенному нами методу [14]. Количество выделенных микроспороцитов пыльника [7] в определенной фазе развития, а также выделенных из них ядер подсчитывали с помощью камеры Фукса—Розенталя. Для подсчета клеток брали по 5 проб на двух сетках, что составляло 10-кратную повторность. Репродуктивные клетки пыльника (МкСпц I, МкСпц II) выделяли методом центрифугирования в градиенте глицерина с последующей обработкой тритоном X-100 [15]. Для получения клеточных ядер из МкСпц I, МкСпц II отбирали пыльники (в количестве 15 шт.), раздавливали их в яшмовой ступке при температуре 0 °C в растворе, приготовленном на 0,02 М триэтаноламине (ТЭА-НСI) (рН 6,8), содержащем 20 %-й глицерин, 0,005 М  $MgCl_2$ , 0,025 М KCl, 0,003 М  $CaCl_2$ , 0,005 М NaCl, 0,004 М *n*-октиловый спирт и 0,004 М  $\beta$ -меркаптоэтанол. Растительный материал фильтровали через 4 слоя капрона с диаметрами пор 17 мкм, сложенного продольно и поперечно, центрифугировали при 15 000 об/мин (К-24, ГДР) в течение 15 мин с целью осаждения генеративных клеток, осадок собирали суспендированием в среде гомогенизации (1,5 мл) и наслаивали на ступенчатый глицериновый градиент, состоящий из пяти слоев (по 0,5 мл) глицерина возрастающей концентрации (мас. доля 50, 60, 70, 80, 90 %/объем), приготовленном на ТЭА-НСI-буфере (рН 6,8) со всеми перечисленными выше компонентами гомогенизационной среды, исключая 20 %-й глицерин. Градиентное центрифугирование проводили при 2500 об/мин в течение 1 ч (К-23,

ГДР). Осадок клеток промывали 1 %-м тритоном X-100 на среде гомогенизации для снятия клеточной оболочки, но без глицерина, с последующим центрифугированием при 2700 об/мин (К-23, ГДР) в течение 15 мин. После этого осажденные ядра дважды промывали в среде следующего состава: 0,005 М  $MgCl_2$ , 0,025 М  $KCl$ , 0,003 М  $CaCl_2$ , 0,005 М  $NaCl$ , 0,01 М *трис*-HCl (pH 6,8) с последующим центрифугированием при указанных выше условиях.

Состояние клеточных ядер контролировали также микроскопически, затем спектрофотометрически и по компонентному составу. Выход ядер из микроспороцитов составлял приблизительно 60 %. Ядерные фракции получали с помощью градиента возрастающих концентраций солей (0,14 М  $NaCl$ , 0,35 М  $NaCl$ , 2,0 М  $NaCl$ , 6 М гуанидин-гидрохлорид + 0,004 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол), что соответствовало надмолекулярным структурам: нуклеоплазме, хроматину, непрочно и прочно связанному с ядерным матриксом, и собственно ядерному матриксу [15]. Белок определяли по методу Бредфорд в нашей модификации [15]. Активность трипаз и ингибиторов трипсина оценивали по расщеплению связей Arg-X в низкомолекулярном ядерном белке протамине «Merk» и выражали в наномолях аргинина в секунду на 1 микрограмм белка [15]. Точки на графиках представляют собой среднеарифметические из не менее пяти аналитических и 2–3 биологических повторностей. Ошибка определения составляла 1–5 %.

### Результаты и обсуждение

Согласно результатам работ Батыгиной [1, 2], на стадии мейотического периода в микроспороцитах значительно возрастает объем перинуклеарного пространства и самого клеточного ядра. Эта морфологическая особенность клеточного ядра позволяет предположить возможность ионной регуляции реорганизации хроматина. Гипотезу этого механизма предложил Оловников [7]. Перинуклеарное пространство ядра необходимо как резервуар, поддерживающий оптимальную концентрацию ионов для дозированного поступления их через ионспецифические каналы внутриядерной мембраны к определенным сегментам хромосом. Таким образом ионное окружение может влиять как на конформационные свойства ДНК, белков, так и на метаболическую активность ядра.

На рис. 1 (0 сут) представлена динамика содержания белка в ядре от сформированного микроспороцита (МкСпц I) до перехода его в состояние профазы I (МкСпц II). Этот период в зависимости от погодных условий длится от одних до нескольких суток. В данном случае мы отмечаем резкое снижение содержания белка в клеточном ядре МкСпц II. Возможно, это связано с тонкой спецификой ориентации протеома с деспирализованными нитями хроматина, готовыми к реализации последовательных стадий (лентонемы, зигонемы, пахинемы

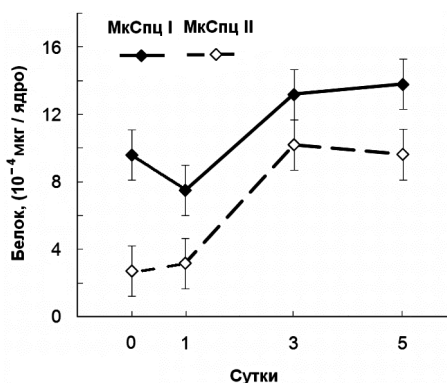


Рис. 1. Содержание белка во фракциях МкСпц I, МкСпц II в условиях холодового стресса (+4 °C) в течение 5 суток

и т.д.) профазы I и освобождением клеточного ядра от других белковых компонентов, осуществляющих сигнальную или какую-либо другую функцию.

На рис. 2, б показано, что период МкСпц I (0 сут, Хр-I) характеризуется повышенной активностью Арг-Х протеолиза на уровне хроматина-I и проявляет слабую активность на уровне ядерного матрикса, которая сохраняется в клеточном ядре МкСпц II (см. рис. 2, б, 0 сут, ЯМ). Что касается соотношения белка в ядерных надмолекулярных структурах при переходе от МкСпц I к МкСпц II (см. рис. 2, а, 0 сут), то оно резко изменяется только на уровне ядерного матрикса (ЯМ) и хроматина, непрочно связанного с ним (Хр-I). Следует отметить, что активность Арг-Х протеолиза в ядерном матриксе МкСпц I (см. рис. 2, б, 0 сут, ЯМ) находится под контролем ингибиторов трипсина (см. рис. 2, в, 0 сут, ЯМ). По-видимому, это связано со специфичностью контроля избирательности протеолитического процессинга в этот период. Известно, что тотальная структура хроматина меняется в течение профазы I мейоза [11]. По данным Строкова [11], поздняя интерфаза—начало профазы характеризуется экстремальной декомпактизованностью хроматина, полной репликацией ДНК; гистоны синтезированы лишь на 75 % количества, требующегося для соотношения гистон/ДНК = 1. Все это, по-видимому, необходимо для обеспечения нормального постмейотического формирования микроспор. Отклонение температуры от нормы может приводить к изменению биохимических процессов в результате нарушений, в частности «слабых взаимодействий» между атомами и молекулами из-за изменений их кинетической энергии [12].

В связи с температурными эффектами следует помнить о двух особенностях гидрофобных взаимодействий. Во-первых, подобно другим слабым взаимодействиям, они легко могут быть разорваны под влиянием тепловой энергии. Во-вторых, в отличие от слабых связей других типов гидрофобные взаимодействия более эффективны при температурах порядка 25 °С, чем около 0 °С [12]. Из всех слабых связей и взаимодействий, стабилизирующих структуру высших порядков, только гидрофобные ослабевают с понижением температуры [12]. Стрессовое воздействие холодом в течение 5 сут на МкСпц I, МкСпц II, представленное на рис. 1, показало, что динамика содержания белка в них имеет одинаковую тенденцию (1—5 сут), т.е. в 1-е сутки воздействия холодом содержание белка в микроспорах остается на прежнем уровне, а затем повышается, по-видимому, в результате активации в стрессовых условиях работы рибосомной системы и синтеза белков, функционирующих в условиях холода. Особенно четко это проявляется в МкСпц II. На уровне гетерополимерных структур клеточного ядра наиболее чувствительной в 1-е сутки холодового воздействия оказалась нуклеоплазма МкСпц II, содержание белка в которой снизилось приблизительно на 25—30 % (см. рис. 2, а, НП; 1 сут).

Известно, что в нуклеоплазме находятся шапероны, часть которых относится к стрессовым белкам, другие участвуют в сборке нуклеосом [13]. В предыдущей работе по исследованию воздействия холода на сильновакуолизованные микроспоры (СВМ) [4] мы также обнаружили чувствительность нуклеоплазмы к стрессу, которая выражалась в резком увеличении содержания белка в этой супраструктуре клеточного ядра. По-видимому, в ответ на стресс физиолого-биохимические изменения в нуклеоплазме МкСпц II и СВМ имеют свои строго специфические про-

АНАЛИЗ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА МИКРОСПОРОЦИТОВ ПЫЛЬНИКА ПШЕНИЦЫ

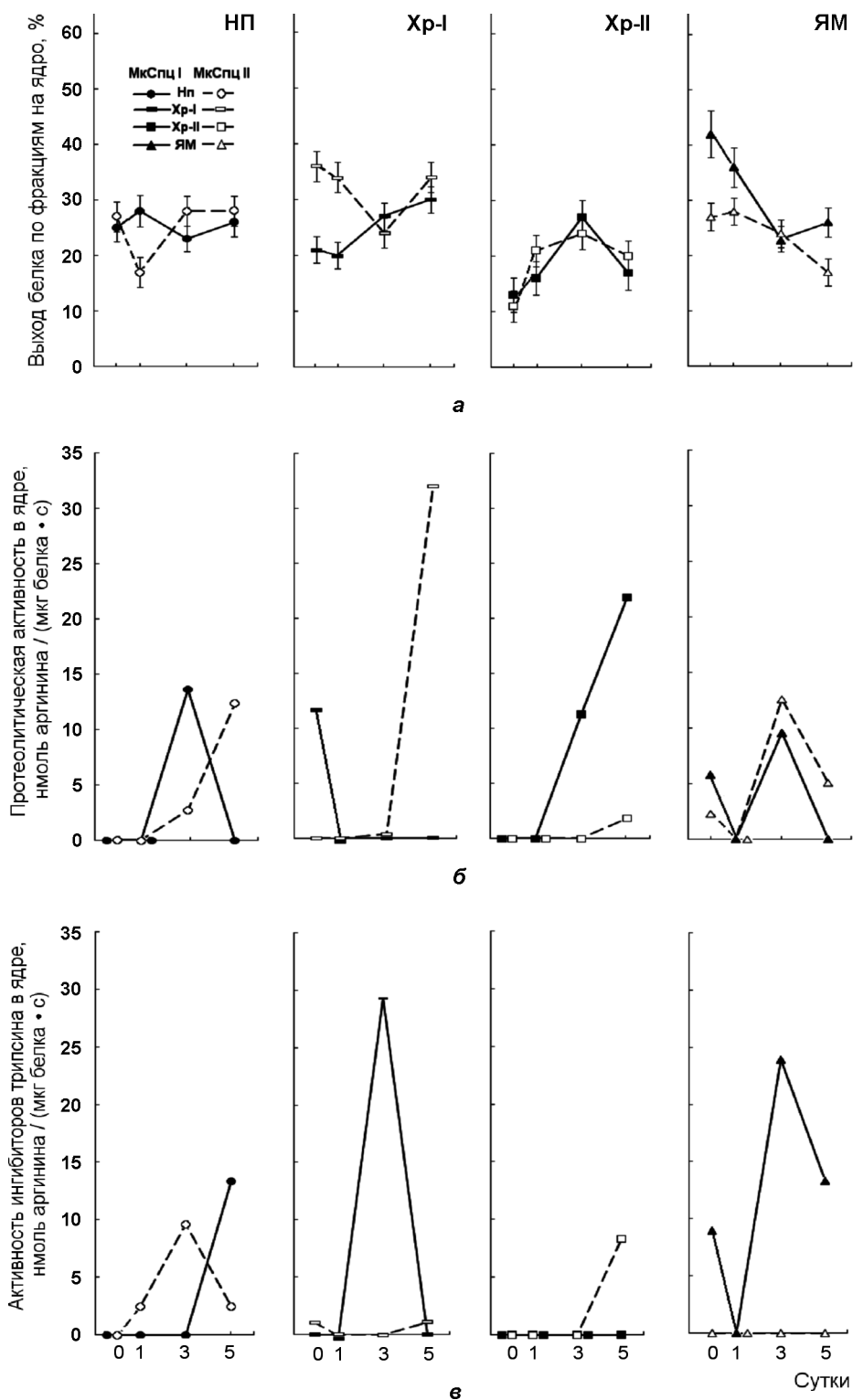


Рис. 2. Процентный выход белка (а), активность триптаза (б) и ингибиторов трипсина (в) во фракциях МкСпц I, МкСпц II в условиях холодного стресса (+4 °С) в течение 5 суток:

НП — нуклеоплазма; Хр-I — хроматин, непрочно связанный с ЯМ; Хр-II — хроматин, прочно связанный с ЯМ; ЯМ — ядерный матрикс

явления. Так, в нуклеоплазме МкСпц II они могут быть связаны со сборкой нуклеосом. Возможно, поэтому некоторые авторы [11] отмечают, что клетка входит в профазу I с недостатком нуклеосом на единицу длины ДНК. На 3-и сутки воздействия холодом на фоне повышения содержания белка в ядре МкСпц I, МкСпц II (см. рис. 1, 3–5 сут), четко выраженных различий между ними в содержании белка во внутриядерных супраструктурах не обнаружено (см. рис. 2, а, 3–5 сут). На рис. 2, в (НП, 1–3 сут) показано, что нуклеоплазма МкСпц II на воздействие холодового стресса реагирует проявлением ингибитор-трипсиновой активности, которая на 5-е сутки воздействия холодом распространяется на хроматин, прочно связанный с ядерным матриксом (см. рис. 2, в, Хр-II, 5 сут). Это может быть связано с ингибированием трипсиноподобного процессинга белков, находящихся в пространственной взаимосвязи с гетерохроматином теломер и центромер, ассоциированных на ядерном матриксе. В свою очередь, Арг-Х процессинг белка МкСпц II наиболее активно проявлялся на 5-е сутки воздействия холодом в зонах открытого хроматина, т.е. непрочно связанного с ядерным матриксом (см. рис. 2, а, Хр-I, 5 сут), и нуклеоплазмы (НП 5 сут). Очевидно, это объясняется изменением структуры хроматина в данный период.

Таким образом, анализ Арг-Х протеазо-процессинга в клеточных ядрах МкСпц I и МкСпц II в условиях стрессового воздействия холодом показал, что различия наблюдаются на уровне нуклеоплазмы и хроматина, а на уровне ядерного матрикса они имеют одинаковую тенденцию (см. рис. 2, б, ЯМ; 1–5 сут). Следует отметить, что МкСпц I в условиях холода проявляют высокую трипсинингибиторную активность. По-видимому, они более защищены от холодового воздействия этой ингибиторной системой, чем МкСпц II. По мнению Свердлова [10], главное — выяснить, как все компоненты клетки взаимодействуют в пространстве и времени, образуя динамические биологические системы. Клеточное ядро является уникальной природной системой, где осуществляется сложнейшая реорганизация хроматина в пространстве и времени. Для того чтобы более конкретно определить роль перинуклеарного пространства, а через него выйти на подтверждение гипотезы ионной регуляции хроматина в период МкСпц II, необходимо сузить пространственно-временной интервал исследований от суток до часов. Возможно при таком экспериментальном подходе будет расшифрована биохимическая основа последовательности стадий профазы I мейоза у растений.

Мы благодарны д-ру биол. наук Н.Н. Кругловой за ценные консультации по морфогенезу пыльника пшеницы и постоянный интерес к нашей работе.

1. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно. — Л.: Наука, 1987. — С. 16–17.
2. Батыгина Т.Б., Яковлев М.С. Порядок 15. Poales. Семейство Poaceae // Сравнительная эмбриология цветковых. — Л.: Наука, 1990. — С. 217–235.
3. Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Куксо П.А., Круглова Н.Н. Активность трипсаз репродуктивных клеток в процессе морфогенеза пыльника пшеницы // Вестн. Харьков. аграр. ун-та. Сер. Биология. — 2004. — № 2 (5). — С. 65–71.
4. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Протеолитический процессинг в надмолекулярных структурах клеточных ядер критической стадии микроспор пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в условиях холодового стресса *in situ* // Там же. — 2005. — № 2 (7). — С. 62–67.
5. Иванова Э.А., Куксо П.А., Круглова Н.Н. Значение ограниченного протеолиза в биохимической регуляции морфогенеза пыльника пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. — 2003. — 35, № 2. — С. 160–165.

## АНАЛИЗ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА МИКРОСПОРОЦИТОВ ПЫЛЬНИКА ПШЕНИЦЫ

6. *Круглова Н.Н.* Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход. — Уфа: Гилем, 2001. — С. 21; 38—39.
7. *Оловников А.М.* Заметки о «принтомерном» механизме клеточной памяти и ионной регуляции конфигураций хроматина // Биохимия. — 1999. — **64**, № 12. — С. 1689—1698.
8. *Прозина Н.И.* Ботаническая микротехника. — М.: Высш. шк., 1960. — 206 с.
9. *Савченко Н.И.* Пыльцевая продуктивность и производство гибридных семян культурных растений на основе ЦМС // Цитолого-эмбриологические и генетико-биохимические основы опыления и оплодотворения растений. — Киев: Наук. думка, 1982. — С. 41—47.
10. *Свердлов Е.Д.* Биологический редукционизм уходит? Что дальше? // Вестн. РАН. — 2006. — **76**, № 8. — С. 707—721.
11. *Строков А.А.* Структура хроматина в профазе I мейоза // Генетика. — 2007. — **43**, № 11. — С. 1468—1477.
12. *Хочачка П., Сомеро Дж.* Биохимическая адаптация. — М.: Мир, 1988. — С. 206—220.
13. *Ellis R.* Molecular chaperones: the plant connection // Science. — 1990. — **250**, N 4983. — P. 954—959.
14. А.с. 1701747 СССР, МКИ4 С12 N9/50. Способ выделения растительных клеточных ядер / Э.А. Иванова, Г.Х. Вафина. — Оpubл. 30.12.91, Бюл. № 48.
15. А.с. 1733471 СССР, МКИ4 С12 N9/50. Способ получения ядерных фракций, обладающих протеиназной и ингибирующей активностью / Э.А. Иванова, Г.Х. Вафина. — Оpubл. 15.05.92, Бюл. № 18.

Получено 31.03.2009

## АНАЛІЗ БІЛКІВ ХРОМАТИНУ МІКРОСПОРОЦИТІВ ПИЛЯКА ПШЕНИЦІ ЗА ХОЛОДОВОГО СТРЕСУ IN SITU

*Е.О. Иванова, Г.Х. Вафина*

Інститут біології Уфимського наукового центру Російської академії наук, Уфа

Проведено біохімічний аналіз клітинних ядер сформованих мікроспороцитів (МкСпц I) у пізній інтерфазі й мікроспороцитів пшениці, що вступили у профазу I (МкСпц II) за нормальних і стрес-холодових умов in situ. Показано зміну динаміки вмісту білків як у цілих ядрах, так і на рівні хроматину, німічно зв'язаного з ядерним матриксом (ЯМ) і в самому ЯМ мікроспороцитів за нормальних умов. За дії холоду на третю добу значно збільшувався вміст білка в ядрах МкСпц II. МкСпц I відрізняються від МкСпц II за активністю реалізації Arg-X протеазо-процесингу та інгібування трипсину у супраструктурах хроматину. В МкСпц I активність інгібіторів вища.

## ANALYSIS OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF CELL NUCLEI OF ANTHER MICROSPOROXYTES OF WHEAT UNDER COLD STRESS CONDITIONS IN SITU

*E.A. Ivanova, G.H. Vafina*

Institute of Biology of Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Sciences  
69 Octyabrya Pr., Ufa, 450054, Russia

Biochemical analysis of cell nuclei of formed microsporocytes (McSpc I) in the late interphase and wheat microsporocytes, which entered in the prophase I (McSpc II) in normal and cold stress conditions in situ was carried out. Changes in the protein content in microsporocyte nuclei on the level of chromatin weakly bounded with the nuclear matrix (NM) and also in NM in the normal conditions was observed. Cold stress has increased protein content in the nuclei of McSpc of prophase I on the third day. McSpc I and McSpc II differed in their activity of realization Arg-X proteasoprocessing and inhibition of trypsin in the chromatin suprastructures. McSpc I was in the upper range of inhibitor activity.

*Key words:* *Triticum aestivum* L., wheat, cell nucleus, nucleoplasm, chromatin, nuclear matrix, Arg-X proteolysis, McSpc I, McSpc II, anther.