

На правах рукописи

Сидорчук
Юрий Владимирович

**ДИНАМИКА МИКРОТРУБОЧКОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В АНОМАЛЬНОМ
МЕЙОЗЕ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА (*N. tabacum* L.)**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск
2010

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии растений Учреждения Российской академии наук Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Дейнеко Е.В.
Институт цитологии и генетики СО
РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Высоцкая Л.В.
Новосибирский государственный
университет, г. Новосибирск

кандидат биологических наук
Киселева Е.В.
Институт цитологии и генетики СО
РАН, г. Новосибирск

Ведущая организация: Томский государственный университет, г. Томск

Защита диссертации состоится _____ 2010 г. на утреннем заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук Д 003.011.01 при Институте цитологии и генетики СО РАН в конференц-зале института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева, 10. Тел/факс (383)333-12-78; e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН.

Автореферат разослан «_____» _____ 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хлебодарова Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Микротрубочковый цитоскелет играет исключительно важную роль в таком фундаментальном биологическом процессе как клеточное деление. В клетках растений цитоскелет представлен различными системами микротрубочек (МТ), поочередно сменяющими друг друга в ходе клеточного деления. К таким системам относятся кортикальные и радиальные пучки, препрофазное кольцо (ППК), веретено и фрагмопласт (Mineyuki, 2007). Структура этих основных конфигураций цитоскелета изучена достаточно хорошо, однако их происхождение, механизмы образования и способы перехода из одной конфигурации в другую все еще не вполне понятны и остаются предметом дискуссий (Murata, Hasebe, 2007).

Динамика цитоскелета в ходе деления эукариотической клетки осуществляется центрами организации микротрубочек (ЦОМТ), особыми морфологическими структурами, которые служат затравками для полимеризации МТ. В клетках животных ЦОМТ сконцентрированы в centrosомах, специализированных морфологических структурах, регулирующих динамику микротрубочек на субклеточном уровне, что позволяет довольно легко наблюдать перестройки цитоскелета в ходе клеточного цикла (Мамон, 2008). В клетках высших цветковых растений centrosома не идентифицирована как самостоятельная морфологическая структура, а ЦОМТ сконцентрированы на поверхности ядерной оболочки, что в значительной степени затрудняет изучение динамики цитоскелета на тех стадиях клеточного цикла, где ядерная оболочка отсутствует. Несмотря на значительный фактический материал, накопленный к настоящему времени по динамике микротрубочкового цитоскелета в ходе клеточного цикла растений, остаются значительные пробелы в понимании этого процесса на всех уровнях его организации (Chan, Cande, 1998; Smirnova, Bajer, 1998; Shamina, 2005; Murata, Hasebe 2007). В частности, это относится к пониманию структурно-морфологических основ реорганизации цитоскелета, изучение которых осложняется его деполимеризацией на некоторых переходных этапах цикла, что в большинстве случаев не позволяет представить динамику МТ систем в виде непрерывного процесса. В результате этого механизмы, регулирующие перестройки цитоскелета в ходе клеточного цикла растений, до сих пор не вполне понятны, а их изучение остается важнейшей задачей клеточной биологии. Одним из подходов к решению этой задачи является анализ возможно большего количества разнообразных аномалий цитоскелетного цикла и выявление детальной картины морфологических преобразований цитоскелета, происходящих во время деления растительной клетки.

В настоящее время для решения целого ряда задач, связанных с изучением процессов клеточного деления, в том числе и для исследования цикла реорганизации микротрубочкового цитоскелета, активно используют мейотическое деление в материнских клетках пыльцы (МКП). Использование трансгенных растений в качестве источника аномалий мейоза и модели для изучения процессов клеточного деления, на наш взгляд, имеет ряд преимуществ, по сравнению с традиционными источниками, такими как отдаленная гибридизация, анеуплоидия, гаплоидия, мейотические мутации. Это связано с возникновением у них мутационной изменчивости различной природы (инсерционной и

соматической), а также с потенциальной возможностью поиска и клонирования мутантных генов (Latham et al., 2006).

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является изучение цикла микротрубочкового цитоскелета в МКП табака посредством сравнительного анализа этапов его реорганизации в ходе нормального и аномального мейоза.

Задачи исследования:

1. Изучить структурную организацию и динамику микротрубочкового цитоскелета в ходе нормального мейоза в МКП растений табака.
2. Выявить механизм формирования и реорганизации систем микротрубочек, функционирующих в процессе построения веретена деления.
3. Провести цитологический скрининг аномалий микроспорогенеза у трансгенных растений табака с мутантным фенотипом.
4. Установить феноменологическую связь выявленных аномалий мейотического деления с микротрубочковым циклом.

Научная новизна и практическая ценность работы. Детальный цитологический анализ трансгенных растений табака с мутантным фенотипом позволил выявить сложный комплекс нарушений мейотического деления, таких как цитомиксис, внеплановая активация цитокинеза после первого деления, образование деформированных ядер в профазе 2, изменение ориентации веретен в метафазе второго деления мейоза. Методом иммунофлюоресцентного анализа детально исследован нормальный и аномальный цикл динамики микротрубочкового цитоскелета в МКП растений табака. Цикл цитоскелета представлен в виде непрерывного процесса реорганизации одной микротрубочковой системы в другую. Установлено, что нарушение процессов цитоскелетного цикла, таких как соединение и размыкание (+)-концов микротрубочек на стадии формирования и разборки неподвижного фрагмента, приводит к изменению положения телофазных ядер и, в дальнейшем, к нарушению позиций веретен второго деления. Показано, что для формирования веретена деления необходимым является этап элонгации микротрубочковых пучков на стадии перехода от перинуклеарной системы к веретену деления. Детальный структурно-морфологический анализ профазной реорганизации цитоскелетных структур в ходе нормального и аномального мейоза позволил предложить «outside-in» (по направлению к хромосомам) модель формирования фибрилл веретена деления в МКП табака. Это противоречит существующему на сегодняшний день представлению о том, что фибриллы веретена деления в мейоцитах формируются посредством «inside-out» (по направлению от хромосом) механизма. Впервые исследована структура и динамика микротрубочкового цитоскелета в цитомиктичных клетках. Установлено, что микротрубочковый цитоскелет не играет видимой роли в процессе межклеточного перемещения ядерного материала. Исследован механизм преждевременного цитокинеза в аспекте динамики микротрубочкового цитоскелета. Показано, что причиной разобщения временной координации между карио- и цитокинезом является не аномальная динамика цитоскелетных структур, а «внеплановая» активация сигнала, обуславливающего запуск процесса образования плазматической мембраны.

Практическая ценность данной работы заключается в создании схемы, отражающей общие принципы реорганизации микротрубочкового цитоскелета,

характерные для мейоза двудольных растений. Впервые предложен механизм взаимной ориентации веретен второго деления мейоза, в основе которого лежит поворот ядер в профазе 2 и динамика (+)-концов микротрубочек на этапе перехода от радиальной системы в телофазе 1 к перинуклеарной в профазе 2. Полученные трансгенные растения табака с аномальным мейозом представляют большой интерес в качестве модели для дальнейшего изучения структуры и динамики актинового цитоскелета в МКП.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту. Цикл цитоскелета в МКП табака осуществляется посредством реорганизации двух системных структур – радиального интерфазного цитоскелета и веретена деления. Фрагмопласт как отдельная цитоскелетная структура не строится. Формирование фибрилл веретена происходит от коротких пучков дезинтегрированного перинуклеарного кольца МТ по направлению к хромосомам посредством «outside-in» механизма. Поворот ядер в профазе 2 является частью механизма ориентации веретен второго деления.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на следующих конференциях, симпозиумах и конгрессах: международном симпозиуме «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология», Москва (18-21 ноября) – Минск (22-24 ноября) 2001 г. (доклад удостоен второй премии); 1-м международном конгрессе «Биотехнология-состояние и перспективы развития», Москва, 14-18 октября 2002 г.; международном симпозиуме по проблемам мейоза, Санкт-Петербург, 17 октября 2003 г.; III-й международной конференции «Проблема вида и видообразования», Томск, 20-22 октября 2004 г.; международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология», Минск, 24-26 ноября 2004 г.; молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии, Владивосток, 16-23 сентября 2005 г.; VIII-м съезде Украинского общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова, Алушта, 24-28 сентября 2007 г. Материалы диссертационной работы представлялись в устных докладах на отчетных сессиях ИЦиГ СО РАН в 2001, 2004, 2008 гг.

Публикации. По теме работы опубликовано 10 научных работ, из них 1 статья – в рецензируемом зарубежном журнале, и 7 статей – в рецензируемых отечественных научных журналах из перечня ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 137 страницах, содержит 21 рисунок, 7 таблиц. Список литературы включает 219 источников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом для исследований послужили трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. (Res79; Res61; Res73; 16.70; 121.57; 121.86; 121.92) с мутантным фенотипом, характеризовавшимся измененным строением цветка и пониженным уровнем фертильности пыльцы. Растения были получены в лаборатории гетерозиса растений Института цитологии и генетики СО РАН д.б.н. Дейнеко Е.В. и к.б.н. Маренковой Т.В. на основе линии SR1 и являлись спонтанными полиплоидами с удвоенным числом хромосом ($4n=96$). В качестве

контроля при сравнительном анализе трансгенных растений табака с измененной морфологией цветка использовали растения табака исходной линии SR1 (контроль 1), полученные на ее основе растения-регенеранты R₀ (контроль 2), растения-трансформанты T₀ с неизменной структурой цветка (контроль 3), а также полиплоидные растения с удвоенным числом хромосом (контроль 4).

Трансформацию растений проводили методом агробактериального переноса по общепринятому протоколу (Horsch et al., 1985) с использованием штамма *A.tumefaciens* C58C1RifR (PGV2260) (Deblaere et al., 1987). Для трансформации табака использовали различные типы генетических конструкций, сконструированные в секторе генной инженерии растений ИЦиГ СО РАН к.б.н. А.В. Кочетовым, М.В. Пилюгиным, В.В. Лукашевой (1991-1995 гг.). Регенеранты растений табака (R₀) получали по стандартной методике (Horsch et al., 1985) из листовых эксплантов линии SR1.

Для световой микроскопии применяли фиксацию по Навашину (Wada, Kusunoki, 1964) и по Карнуа (Паушева, 1980) с окрашиванием препаратов ацетокармином. Для иммуноокрашивания микротрубочек цитоскелета и визуализации хромосом в мейозе материал фиксировали параформальдегидом и инкубировали с антителами к α -тубулину (monoclonal anti- α -tubulin, clone B-5-1-2, SIGMA, product number T5168). В качестве вторичных антител использовали противомышьи антитела, меченные FITC (anti-mouse IgG FITC conjugate, SIGMA, product number F0257). Ядра и хромосомы окрашивали DAPI.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Общая схема цитоскелетного цикла в нормальном мейозе растений табака.

В растительных клетках в ходе клеточного цикла происходит последовательная смена нескольких системных структур цитоскелета, к которым относятся кортикальные спирали, ППК, веретено деления, радиальные пучки МТ и фрагмопласт. Материнские клетки пыльцы (МКП) отличаются от соматических клеток особой динамикой микротрубочкового цитоскелета. Кортикальные спирали и ППК в данном типе клеток отсутствуют, и цикл цитоскелета должен определяться закономерной сменой трех оставшихся системных структур: радиальных пучков микротрубочек (МТ), веретена деления и фрагмопласта.

Согласно нашим наблюдениям, в МКП табака переход цитоскелета от радиальной интерфазной конфигурации к веретену деления в метафазе осуществляется посредством формирования промежуточной конфигурации МТ фибрилл – профазного перинуклеарного кольца (Шамина, Сидорчук, 2006). Формируется эта структура одинаково как в первом, так и во втором делениях мейоза в результате реорганизации радиальных пучков МТ (рис. 1 а, и) в течение профазы. Процесс реорганизации происходит в несколько этапов, включающих реориентацию пучков из радиального положения в тангенциальное, их приближение к поверхности ядерной оболочки (рис. 1 б, к), изгибание и интеграцию в перинуклеарное кольцо (рис. 1 в, л). Отличие между первым и вторым делением состоит только в том, что во втором делении мейоза профазы начинается с деполимеризации интерзональной радиальной системы МТ (рис. 1 и).

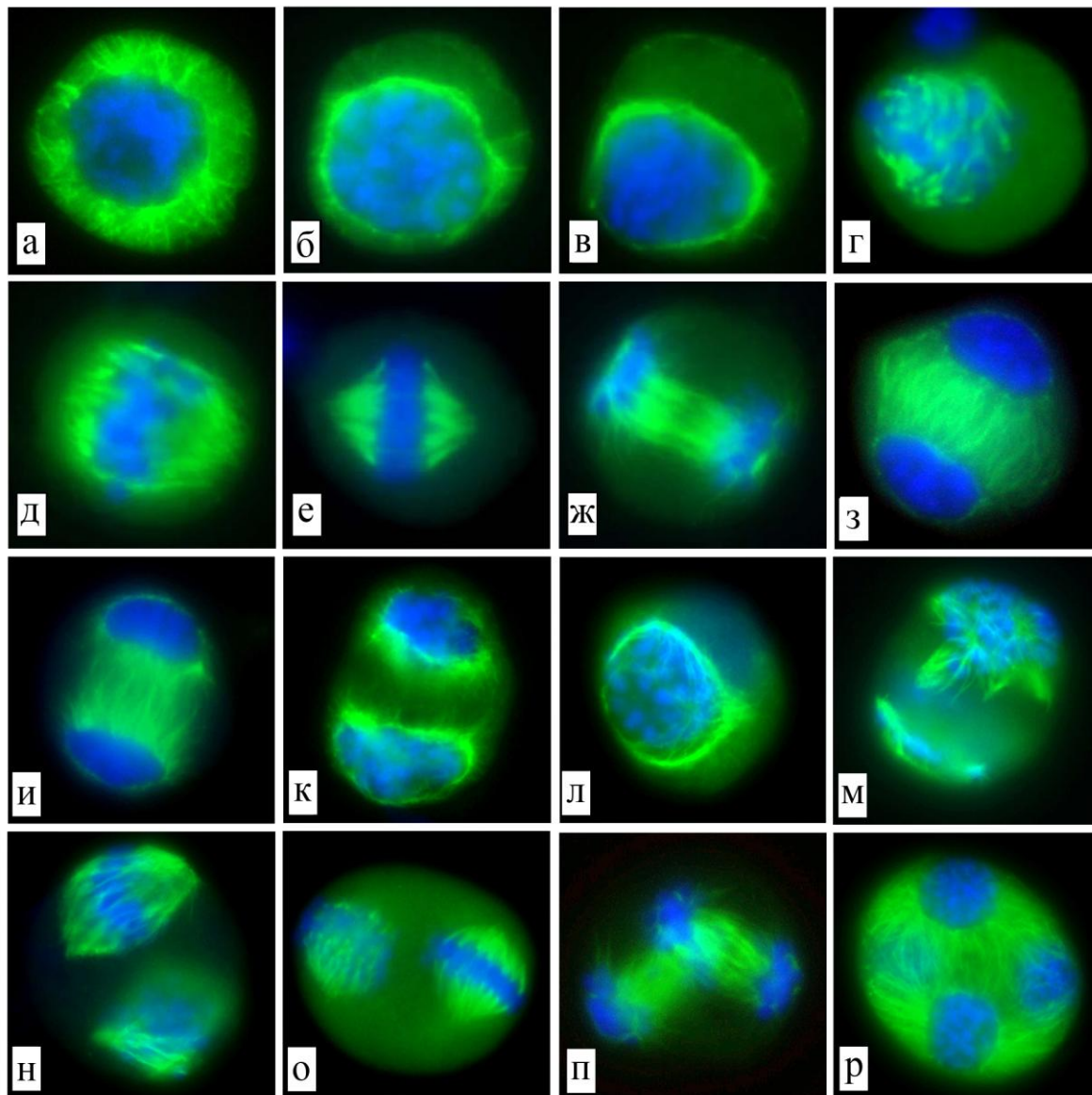


Рис. 1. Цикл реорганизации цитоскелета в мейотическом делении в МКП растений табака в норме. Иммуноокрашивание на α -тубулин. Увеличение: 10x100.

а-з – первое деление; и-р – второе деление.

а, и – системы радиальных МТ фибрилл в профазе; б, к – приближение МТ пучков к поверхности ядерной оболочки и формирование перинуклеарной системы цитоскелета; в, л – формирование перинуклеарного кольца МТ в поздней профазе; г, м – хаотическая фигура в средней прометафазе; д, н – параллельная коориентация и конвергенция МТ на полюсах в поздней прометафазе; е, о – метафазное веретено деления; ж, п – полюсные МТ в ранней телофазе; з – развитая интерзональная цитоскелетная система на стадии интеркинеза; р – единая тетраэдрическая система радиальных МТ фибрилл в телофазе 2. *Обозначения:* зеленый цвет – цитоскелет; синий цвет – хроматин в составе ядра, хромосомы.

Фибриллы веретена в обоих делениях мейоза формируются из коротких пучков МТ, образующихся в результате распада перинуклеарного кольца в ранней прометафазе. В средней прометафазе происходит соединение (+)-концов МТ с

кинетохорами хромосом и друг с другом, формируются кинетохорные и центральные фибриллы веретена. На этой стадии цитоскелет представлен хаотической системой биполярных МТ фибрилл. (рис.1 г, м). В поздней прометафазе биполярные фибриллы координируются параллельно, конвергируют на полюсах (рис.1 д, н) и реорганизуются в метафазное веретено деления (рис.1 е, о).

Аналогичная картина формирования веретена деления была показана для однодольных растений и для картофеля (Шамина, 2003; Conicella et al., 2003; Shamina et al., 2005). Это позволяет судить о консервативности механизмов построения веретена деления в МКП у растений и о том, что такая промежуточная цитоскелетная структура, как перинуклеарное кольцо МТ, играет в этом процессе весьма значимую роль. Учитывая динамику МТ пучков на ранних этапах ее формирования и то, что веретено деления строится из МТ пучков предыдущей цитоскелетной системы, можно полагать, что перинуклеарное кольцо выполняет функции профазного веретена соматических клеток (Chan et al., 2005). Это, в свою очередь, свидетельствует в пользу «outside-in» (к хромосомам) механизма формирования веретена деления в МКП. Тем не менее, существующие в настоящий момент в научной литературе данные не определяют точной функции перинуклеарного кольца в мейотическом делении. Этот факт, наряду с существованием альтернативного механизма построения веретена в растительных клетках, позволяет отнести его к системным структурам цитоскелета лишь условно.

После деполимеризации кинетохорных пучков МТ и расхождения хромосом в анафазе веретено деления представляет собой систему интерзональных фибрилл, которые соединяют расположенные на полюсах группы хромосом. Полимеризация новых радиальных МТ пучков начинается в ранней телофазе от полюсов веретена (рис. 1 ж, п). В средней и поздней телофазе этот процесс происходит уже от поверхности восстановленных ядерных оболочек и продолжается до тех пор, пока весь объем цитоплазмы не будет заполнен (рис. 1 з, р). Восстановление массы радиального цитоскелета происходит абсолютно единообразно в первом и втором делениях мейоза. Различие состоит лишь в том, что в МКП табака после первого деления мейоза цитокинез не происходит. В интеркинезе ядра разделены мощной системой интерзональных радиальных фибрилл (рис. 1 з), по своей структуре являющихся полноценным фрагмопластом, в котором заблокировано построение клеточной пластинки (Conicella et al., 2003; Дорогова, Шамина, 2005). Цитокинез в МКП табака осуществляется однократно по завершению второго деления мейоза, когда уже все четыре дочерних ядра объединены друг с другом системой радиальных пучков в форме тетраэдра (рис. 1 р). В отличие от однодольных растений, в цитокинезе которых система МТ фрагмопласта совершает центробежное движение, фрагмопласт двудольных растений является неподвижным.

Таким образом, процессы реорганизации цитоскелета в обоих мейотических делениях растений табака идентичны и представляют собой смену в ходе клеточного деления двух основных системных структур – радиального интерфазного цитоскелета и веретена деления. Фрагмопласт как специальная самостоятельная цитоскелетная структура не строится. Для его осуществления утилизируется система радиальных МТ пучков (радиальный цитоскелет), сформированная в телофазе 2.

2. Динамика микротрубочкового цитоскелета в материнских клетках пыльцы трансгенных растений табака при различных аномалиях мейоза.

Согласно цитологическому анализу изученные нами трансгенные растения с мутантным фенотипом характеризовались рядом аномалий, которые обнаруживались в ходе обоих мейотических делений. К числу таких аномалий в первом делении мейоза относились массовый цитомиксис и внеплановая активация цитокинеза. Во втором делении мейоза наблюдались деформация профазных ядер, нарушение формирования веретен деления и их неправильная пространственная ориентация в общем объеме цитоплазмы. Подобный спектр аномалий позволил предположить, что в основе их проявления лежат структурно-морфологические нарушения МТ цитоскелета.

2.1. Цитомиксис в материнских клетках пыльцы. Цитомиксис или миграция ядерного материала из одного мейоцита в другой по цитомиктическим каналам наблюдалась во всех исследованных группах растений. В МКП трансгенных растений с мутантным фенотипом частота цитомиксиса составила $23,3 \pm 5,3\%$, а в МКП нетрансгенных растений табака с удвоенным числом хромосом (контроль 4) – $18,0 \pm 0,7\%$. Максимального проявления данная аномалия достигала в средней профазе первого деления мейоза, хотя с незначительной частотой обнаруживалась и на других стадиях, включая стадию тетрад. В контрольных группах растений с нормальным фенотипом (контроли 1-3) цитомиксис встречался с невысокой (3-4%) частотой.

В научной литературе был высказан ряд предположений о возможной роли нарушений структуры и функций микротрубочкового цитоскелета в межклеточной миграции ядерного материала (Feijó, Pais, 1989; Шамина и др., 2000). Например, одна из основных функций цитоскелета – организующая, то есть функция по распределению органелл в определенных областях цитоплазмы и по удержанию их в этом положении. Цитоскелет удерживает ядро в центре клетки. Если же эта функция им не выполняется, ядро может мигрировать по току цитоплазмы и контактировать с областью расположения цитомиктических каналов.

В норме в ранней–средней профазе цитоскелет в МКП представлен ретикулярной радиальной системой МТ пучков, расходящихся от всей поверхности ядерной оболочки к кортикальному слою цитоплазмы. Исследование структуры цитоскелета в цитомиктических клетках в средней профазе первого деления мейоза, то есть на стадии максимального проявления цитомиксиса, не выявило каких-либо отличий от структуры ретикулярного радиального цитоскелета характерного для нормальных клеток. Более того, полученные нами данные показали, что не только структура, но также и динамика микротрубочкового цитоскелета не имеет каких-либо отличий в нормальных клетках и клетках с цитомиксисом. Даже образование микроядер и потеря клеткой большей части ядра в результате цитомиксиса не препятствовали процессу реорганизации радиальной системы цитоскелета в перинуклеарную. В ходе дальнейших фаз как первого, так и второго мейотических делений формирование биполярных веретен в метафазе и формирование интерзональных систем микротрубочек в телофазе–интеркинезе проходили единообразно без нарушений как в цитомиктических клетках, так и в нормальных.

Таким образом, нами не выявлено каких-либо нарушений в динамике или организации микротрубочковой части цитоскелета материнских клеток пыльцы табака, которые позволили бы связать их с межклеточными перемещениями ядерного материала. Проявление цитомиксиса на самых ранних стадиях профазы 1, когда цитоскелет еще представлен ретикулярной системой МТ, ставит его закорнивающую роль под сомнение.

2.2. Преждевременный цитокинез в материнских клетках пыльцы трансгенных растений табака. Нормальное прохождение цитокинеза, как фазы клеточного цикла, обеспечивается не только правильной пространственной организацией плана деления, полноценным формированием системы фрагмопласт–клеточная пластинка, но и четкой временной координацией между карио- и цитокинезом (Guertin et al., 2002; Дорогова, Шамина, 2005). Разобщение этих процессов может приводить к нарушению цикла клеточного деления и, в том числе, к несвоевременному запуску цитокинеза и даже к смене типа деления цитоплазмы (Siddiqi et al., 2000).

В части материнских клеток пыльцы у изученных нами трансгенных растений табака наблюдалась инициация дополнительного раунда цитокинеза уже после первого деления мейоза, что не характерно для двудольных. В незначительной части клеток деление проходило полностью и заканчивалось формированием обычной диады. Однако в большинстве случаев в клетках, где наблюдался данный феномен, клеточная пластинка была не способна пересечь всю цитоплазму и дочерние мембраны образовывались в виде полого цилиндра, «тоннеля», пронизывающего объем цитоплазмы. В среднем данная аномалия встречалась в группе трансгенных растений с мутантным фенотипом с частотой $2,0 \pm 0,5\%$. Ни в одной из контрольных групп растений данной аномалии обнаружено не было.

Полученные нами данные показали, что процесс построения характерной для мейоза двудольных интерзональной системы микротрубочек на стадии телофазы 1 проходил единообразно как в клетках с преждевременным цитокинезом, так и в клетках контрольных растений. Следует отметить, что наличие мембранного «тоннеля», возникшего в результате внеплановой активации цитокинеза после первого деления мейоза, никак не влияло на формирование веретен второго деления, а также на кариокинез, которые проходили без видимых нарушений. Цикл кариокинеза в таких клетках заканчивался образованием четырех ядер, расположенных симметрично вокруг мембранного «тоннеля» первого деления. При этом все морфологические процессы динамики цитоскелета, связанные с переходом от веретена деления к интерзональной системе цитоскелета во втором делении мейоза оставались без изменений. Особенность заключалась лишь в том, что ядра оказывались связанными друг с другом интерзональными пучками микротрубочек не тетраэдрически, как в норме, а по кольцу. Установленный нами факт, что преждевременный цитокинез не препятствует цитокинезу после второго деления мейоза, свидетельствует о смене в части клеток у трансгенных растений табака симультанного типа цитокинеза на сукцессивный.

У видов двудольных растений, в том числе и у табака, первое деление мейоза заканчивается формированием интерзональной цитоскелетной системы, которая играет роль неподвижного фрагмопласта и одновременно выполняет функцию радиального цитоскелета в интеркинезе. В норме отсутствие цитокинеза на данном

этапе клеточного цикла обеспечивается, по-видимому, запрограммированным блоком образования клеточной пластинки. Описанная нами аномалия свидетельствует о том, что интерзональная система МТ, сформированная в МКП табака после первого деления мейоза, вполне функциональна, чтобы обеспечить формирование клеточной пластинки и дальнейшее ее преобразование в дочернюю мембрану.

Согласно имеющимся на сегодняшний день в научной литературе данным преждевременное образование дочерних мембран может свидетельствовать о существовании специального механизма запуска цитокинеза. И хотя этот механизм сопряжен с ядерным циклом, связь эта далеко не жесткая. Даже когда ядерный цикл не закончен или блокирован, цитокинез все равно может инициироваться и завершиться образованием дочерних мембран (Magnard et al., 2001; Дорогова, Шамина, 2005). Таким образом, причиной описанного фенотипа является нарушение в регуляторной системе цитокинеза, которое вызывает преждевременную, «внеплановую» активацию сигнала, обуславливающего запуск процесса образования плазматической мембраны.

2.3. Аномалии формирования веретена деления в клетках с деформированными ядрами. В норме дочерние ядра в МКП табака, сформировавшиеся в ходе первого деления мейоза, имеют округлую форму. Однако в части клеток у изученных нами мутантных растений в позднем интеркинезе – профазе 2 оба дочерних ядра начинали сильно растягиваться в длину, приобретая серповидную или веретеновидную форму (рис. 2 а). Данная аномалия встречалась в МКП трансгенных растений с мутантным фенотипом, а также в МКП нетрансгенных растений табака с удвоенным числом хромосом (контроль 4) с частотой $23,1 \pm 2,5\%$ и $27,8 \pm 1,9\%$ соответственно. В контрольных группах растений с нормальным фенотипом (контроли 1-3) каких-либо изменений формы дочерних ядер в позднем интеркинезе – профазе 2 не выявлено.

Подобное изменение формы дочерних ядер имело серьезные последствия для дальнейшего хода мейоза. В таких клетках после распада ядерной оболочки прометафазное движение хромосом было блокировано, они оставались в области бывших ядер. Метафазные пластинки и веретена второго деления не строились. В результате этого на стадии условной метафазы 2 хромосомы оказывались беспорядочно разбросанными в цитоплазме клетки. В дальнейшем группы хромосом объединялись ядерной оболочкой, что приводило к появлению в телофазе 2 многоядерных клеток.

Согласно нашим исследованиям, в клетках с деформированными ядрами процессы деполимеризации интерзональной системы МТ (рис.2 б) и формирование перинуклеарной системы цитоскелета в профазе 2 (рис.2 в) происходили без отклонений от нормы. Однако этап реорганизации перинуклеарной системы микротрубочек в перинуклеарное кольцо отсутствовал. Перинуклеарная система цитоскелета, окружавшая деформированные ядра, вплоть до окончания профазы 2 сохраняла структуру «чехла», а не кольца МТ (рис. 2 в). После распада ядерной оболочки в течение всей прометафазы цитоскелет был представлен только короткими прямыми пучками МТ, которые не удлинялись и, как следствие, не входили в зону ядра и не контактировали с хромосомами (рис. 2 г). Короткие МТ пучки были не способны формировать биполярные элементы цитоскелета, и

процесс построения веретен второго деления был полностью заблокирован.

Следует отметить, что дальнейшие процессы формирования вторичных веретен и цитокинеза нарушены не были. Однако, в отличие от нормы, радиальные пучки микротрубочек, являющиеся также и фибриллами фрагмопластов, в многоядерных клетках в телофазе 2 начинали полимеризоваться не от полюсных районов, а уже непосредственно от поверхности оболочек микроядер (рис. 2 д). Растущие навстречу друг другу от оболочек соседних ядер радиальные пучки МТ соединялись (+)-концами, образуя ядерно-цитоплазматические домены (Brown, Lemmon, 2001) и определяя, таким образом, план деления многоядерной МКП. После формирования дочерних мембран такая клетка разделялась, образуя на стадии тетрад полиаду с числом членов равным числу микроядер.

Полученные нами данные свидетельствовали о том, что блок формирования веретен второго деления в клетках с деформированными ядрами был обусловлен как минимум двумя причинами: отсутствием формирования перинуклеарного кольца МТ в поздней профазе и нарушением динамики цитоскелета в период ранней прометафазы. Тот факт, что в клетках при отсутствии оформленного профазного перинуклеарного кольца МТ не строится веретено деления, позволяет говорить о системной роли этой конфигурации цитоскелета в процессе формирования веретена деления в МКП табака посредством «outside-in» механизма.

Выделяют несколько событий, обеспечивающих реорганизацию цитоскелета в ранней прометафазе. К ним относятся дезинтеграция предыдущей цитоскелетной структуры, удлинение (элонгация) МТ, вход цитоскелета в зону бывшего ядра, выпрямление МТ, входивших в состав перинуклеарного кольца (Шамина, 2005). Нарушение какого-либо из этих событий в ранней прометафазе может являться причиной аномалий в формировании веретена деления. В клетках с деформированными ядрами был нарушен этап удлинения (элонгации) МТ. В результате чего биполярные элементы цитоскелета не формировались. Таким образом можно утверждать, что элонгация микротрубочек перинуклеарной системы на стадии ранней прометафазы является обязательным условием формирования фибрилл веретена деления.

Причины, по которым нарушена элонгация МТ в прометафазе в МКП с деформированными ядрами, не вполне понятны. Тем не менее, можно предположить, что элонгация МТ пучков и весь последующий комплекс событий, необходимых для построения веретен деления, зависит от наличия какого-то сигнального фактора. На субклеточном уровне таким сигнальным фактором вполне может служить перинуклеарное кольцо МТ. Его отсутствие блокирует дальнейшие события прометафазы даже при наличии затравочного материала в виде коротких МТ пучков.

Аномалия формы дочерних ядер позволила наблюдать феномен, который, вероятно, имеет большое значение для дальнейшего хода мейоза у двудольных. Поскольку дочерние ядра сильно вытянуты в длину, можно было наблюдать, что в большинстве таких клеток они занимали взаимно перпендикулярное положение. В части клеток такие ядра занимали произвольное положение. Полученные данные позволяли предположить, что в профазе второго деления мейоза ядра совершают поворот друг относительно друга на 90° . Следует отметить, что именно такое взаимно перпендикулярное положение занимают веретена деления в метафазе 2.

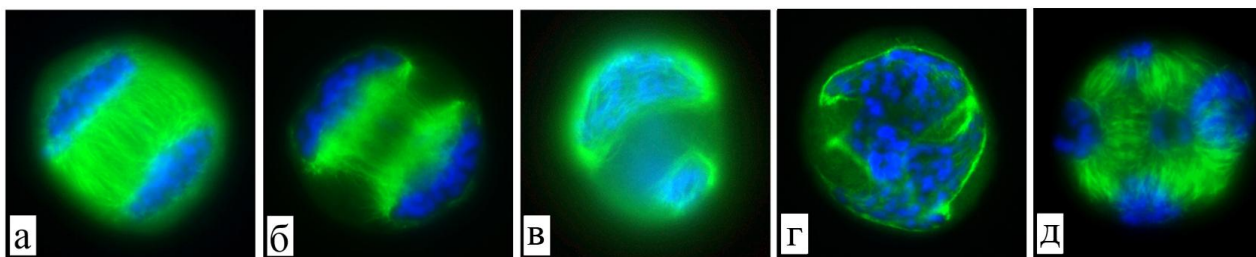


Рис. 2. Динамика цитоскелета во втором делении мейоза в МКП трансгенных растений табака с деформированными ядрами. Иммуноокрашивание на α -тубулин. Увеличение: 10x100.

а – изменение формы ядер в позднем интеркинезе; б – деполимеризация интерзональной системы микротрубочек в ранней профазе 2; в – укорочение радиальных пучков МТ и формирование перинуклеарной системы МТ вокруг ядер; г – дезинтеграция перинуклеолярной системы МТ при переходе от профазы 2 к прометафазе 2, блок построения прометафазной фигуры цитоскелета (пучки МТ не входят в зону бывшего ядра и не контактируют с хромосомами); д - система цитоскелета в телофазе 2 в многоядерной клетке, радиальные пучки МТ отходят от оболочек микроядер.

Обозначения: зеленый цвет – цитоскелет, синий цвет – ядра.

Известно, что ядерная оболочка является крупнейшим центром организации микротрубочек в растительной клетке (Meier, 2001). Таким образом, можно полагать, что приобретение ядрами определенной ориентации в пространстве клеточной цитоплазмы в профазе 2 является событием, определяющим ориентацию веретен второго деления в мейозе двудольных растений.

2.4. Аномалии положения веретен во втором делении мейоза. В норме во втором делении мейотического цикла у табака, характеризующегося симультанным типом цитокинеза, веретена занимают взаимно перпендикулярное положение (рис. 3 а, б). После расхождения хромосом в таких клетках формируются тетрады микроспор, в которых гаплоидные ядра располагаются по вершинам тетраэдра (рис. 3 в). У изученных нами трансгенных растений с мутантным фенотипом в значительной части МКП взаимная ориентация веретен второго деления была резко нарушена. Нами было выделено несколько аномальных положений веретен деления: трехполосное, параллельное и сближенное положение веретен, а также соответствующие им продукты мейоза на стадии тетрад (рис. 3 г-м).

Наиболее часто, в $25,2 \pm 1,5\%$ случаев, встречались МКП с трехполосным положением веретен деления. Параллельное положение веретен деления встречалось с частотой $9,5 \pm 0,7\%$. Наиболее редким нарушением в МКП мутантных растений было сближение веретен, которое встречалось с частотой $4,2 \pm 0,6\%$. В контрольной группе, представленной нетрансгенными растениями с удвоенным числом хромосом (контроль 4), были обнаружены те же самые нарушения положения веретен второго деления, что и у трансгенных растений с мутантным фенотипом, хотя и с более низкой частотой.

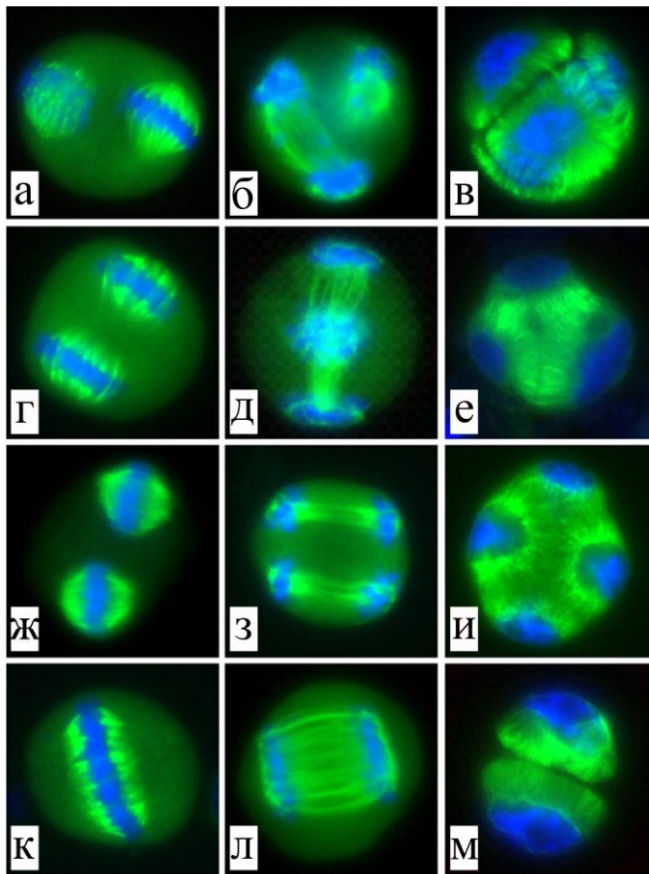


Рис. 3. Типы нарушений пространственной ориентации аппарата веретена во втором делении мейоза и их последствия на стадии тетрад. Иммуноокрашивание на α -тубулин. Увеличение: 10x100.

а, б – нормальное тетраэдрическое положение веретен деления; в – нормальная тетрада; г, д – трехполюсное расположение веретен деления; е – триада; ж, з – параллельное расположение веретен; и – копланарная тетрада; к, л – формирование общего веретена деления при аномальном сближении веретен; м – диада.

Обозначения: зеленый цвет – цитоскелет, синий цвет – ядра и хромосомы.

Появление среди продуктов мейоза в МКП табака диад и триад свидетельствовало о наличии процесса реституции гамет. Одним из основных механизмов реституции у двудольных является дезориентация веретен второго деления (Genuardo, 1998; Mariani et al., 2000; Conicella et al., 2003). Однако, в большинстве случаев нарушения, изменяющие позиции веретен деления, являются инертными и никак не влияют на дальнейшее развитие предшественников пыльцы, а лишь изменяют их положение в тетраде (Dorogova et al., 1999). Следует отметить, что нарушения пространственной ориентации веретен деления в МКП трансгенных растений табака с мутантным фенотипом встречаются с более высокой частотой, чем возможные продукты этих нарушений. Это обусловлено тем, что в телофазе 2 сначала от полюсных районов веретена, а затем и от поверхности восстановленных ядерных оболочек начинается полимеризация новых МТ пучков. Если процесс полимеризации на данном этапе цитоскелетного цикла не нарушен, то вновь образованные пучки МТ способны растолкнуть сближенные телофазные группы хромосом и ядра, вернув их в нормальное положение и предотвратив тем самым процесс реституции. Таким образом, изменение положения веретен второго деления является необходимым, но не всегда достаточным условием восстановления плоидности гамет.

2.5. Особенности реорганизации микротрубочкового цитоскелета в МКП растений табака при формировании аномального положения веретен. Полученные нами данные по динамике микротрубочкового цитоскелета в МКП мутантных растений и в норме позволили выделить два события цитоскелетного цикла, которые оказывают влияние, во-первых, на пространственное положение

веретен второго деления (на их сближение) а, во-вторых, на их взаимную ориентацию, то есть на их полярность. Первое событие – это формирование мощной системы интерзональных фибрилл в интеркинезе. Второе событие – это специфическая реорганизация цитоскелета (размыкание (+)-концов и деполимеризация фибрилл МТ) в профазе второго деления.

Аномалии формирования системы интерзональных фибрилл в телофазе 1 – интеркинезе. В норме в МКП растений табака в средней телофазе 1 на полюсах начинается массовая полимеризация новых пучков микротрубочек. Постепенно удлиняясь, пучки микротрубочек достигают экватора и объединяются там (+)-концами. В ходе телофазы эта система вновь образующихся фибрилл постоянно расширяется и движется по направлению к периферии клетки, в результате чего в интеркинезе дочерние ядра максимально удалены друг от друга и разделены мощным каркасом микротрубочковых пучков (рис. 4 а, б).

При анализе динамики цитоскелета на стадии телофазы 1 - интеркинеза было установлено, что в МКП у растений с мутантным фенотипом происходил частичный блок полимеризации микротрубочковых фибрилл и нарушение соединения их (+)-концов в области экватора (рис. 4 в, г). Следует отметить, что во всех проанализированных нами клетках выявленные нарушения проявлялись несимметрично относительно оси первого деления, то есть часть микротрубочковых пучков развивалась обычным образом, а часть – аномально. Таким образом, в результате блока полимеризации и соединения микротрубочек (+)-концами с одной стороны и нормального центробежного движения системы микротрубочкового цитоскелета с другой стороны позиции телофазных ядер смещались от оси первого деления, а интерзональная система микротрубочек выглядела однобокой.

У двудольных растений, в том числе и у табака, цитокинез после первого деления блокирован. Однако отсутствие дочерней мембраны после первого деления мейоза компенсируется мощной каркасной системой интерзональных МТ, процесс формирования которой мы рассмотрели выше. Известно, что недостатки в организации интерзональных фибрилл могут нарушать их стабилизирующую, каркасную функцию и приводить к возвратному движению телофазных ядер от периферии клетки к ее центру, нарушая тем самым их пространственную ориентацию и изолированность (Drogova et al., 1999; Conicella et al., 2003; Шамина и др., 2004). Таким образом, основная роль интерзональной системы МТ заключается в фиксации дочерних ядер в диаметрально противоположной позиции на периферии мейоцита.

Обнаруженный нами в телофазе 1 – интеркинезе частичный блок полимеризации микротрубочковых фибрилл и соединения их (+)-концов в области экватора в мейоцитах мутантных растений приводил к смещению позиции телофазных ядер от оси первого деления и друг относительно друга, нарушая, таким образом, фиксирующую функцию интерзональной системы МТ. Изменение же позиции ядер в телофазе 1, в свою очередь, напрямую влияло на положение веретен второго деления, нарушая их пространственную разобщенность в общем объеме МКП.

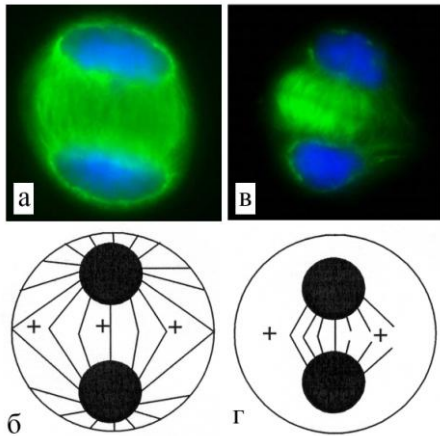


Рис. 4. Динамика микротрубочкового цитоскелета в МКП табака в телофазе 1 – профазе 2. Иммуноокрашивание на α -тубулин. Увеличение: 10x100.

а, б – интерзональная система цитоскелета в интеркинезе; в, г – нарушение полимеризации и соединения микротрубочек «+» концами в поздней телофазе 2 – интеркинезе.

Обозначения: зеленый цвет – цитоскелет, синий цвет – ядра и хромосомы; знак «+» – обозначает положение (+)-концов МТ.

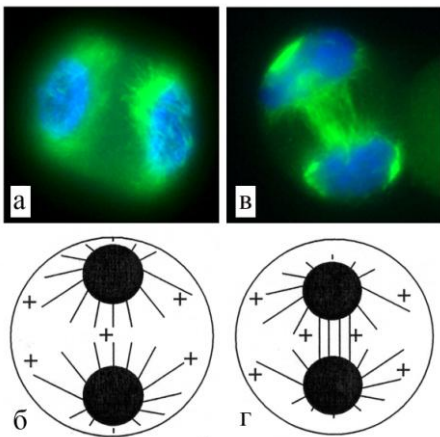


Рис. 5. Динамика микротрубочкового цитоскелета в МКП табака в телофазе 1 – профазе 2. Иммуноокрашивание на α -тубулин. Увеличение: 10x100.

а, б – деполимеризация интерзональной системы микротрубочек, переход от интеркинеза к профазе 2; в, г – нарушение деполимеризации интерзональной системы микротрубочек в профазе 2.

Обозначения: зеленый цвет – цитоскелет, синий цвет – ядра и хромосомы; знак «+» – обозначает положение (+)-концов МТ.

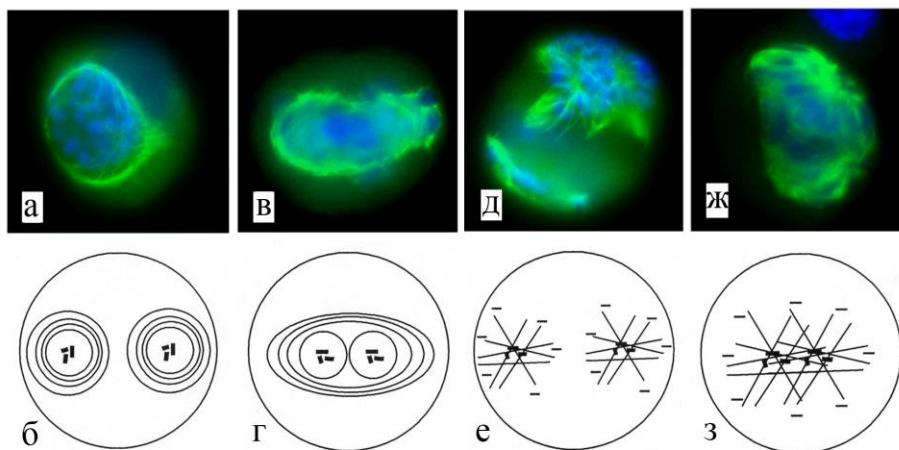


Рис. 6. Реорганизация цитоскелета в профазе - прометафазе 2 в норме и при сближении ядер. Иммуноокрашивание на α -тубулин. Увеличение: 10x100.

а, б – формирование перинуклеарных колец в ранней прометафазе 2 в норме; в, г – формирование общего перинуклеарного кольца в ранней прометафазе 2 у трансгенных растений с мутантным фенотипом; д, е – хаотические фигуры в общей цитоплазме в средней прометафазе 2 в норме; ж, з – хаотические фигуры в общей цитоплазме в средней прометафазе 2 у мутантных растений.

Обозначения: зеленый цвет – цитоскелет, синий цвет – ядра; знак «-» – обозначает положение (-)-концов МТ.

Реорганизация радиальной системы МТ в перинуклеарную во втором делении мейоза. В МКП табака переход от интеркинеза к профазе второго мейотического деления осуществляется посредством ряда перестроек интерзональной системы цитоскелета в общей цитоплазме, среди которых выделяются размыкание (+)-концов МТ в зоне экватора, их деполимеризация и формирование перинуклеарной системы (рис. 5 а, б). При анализе динамики цитоскелета на этой стадии у трансгенных растений табака с мутантным фенотипом нами был обнаружен частичный блок процессов размыкания и деполимеризации интерзональной системы микротрубочек. В результате этого нарушения к моменту формирования перинуклеарной системы микротрубочечного цитоскелета дочерние ядра, образовавшиеся в результате редукционного деления мейоза, не обособлялись, а оставались соединенными частично сохранившимися пучками интерзональных фибрилл микротрубочек (рис. 5 в, г).

В настоящее время механизм пространственной ориентации ацентросомных веретен деления у растений не ясен (Smirnova, 2003). Наши наблюдения позволяют предположить, что полярность веретен второго деления устанавливается еще в ходе профазы 2. На этой стадии ядра, окруженные перинуклеарной системой микротрубочек, совершают поворот друг относительно друга на 90^0 , то есть располагаются в цитоплазме таким образом, как в дальнейшем должны быть ориентированы веретена второго деления. Такая специфическая ориентация ядер и ассоциированных с ними перинуклеарных структур цитоскелета, если и не определяет полярность веретен деления сама по себе, то, по крайней мере, является значимой частью этого механизма. Соответственно, любые нарушения, в том числе и нарушения динамики интерзональной системы микротрубочечного цитоскелета, изменяющие профазную ориентацию ядер, могут приводить к изменению позиционирования веретен и их взаимной ориентации (изменению сайтов расположения полюсов).

Полученные нами данные указывают на то, что таким нарушением является блокировка процессов размыкания (+)-концов и деполимеризации интерзональной системы микротрубочек в профазе второго деления мейоза. Остаточные интерзональные фибриллы, на наш взгляд, препятствуют не только пространственной ориентации профазных ядер, фиксируя их положение, но и правильной сборке перинуклеарной системы МТ. Соответственно, прямым следствием такой аномальной динамики является изменение позиций веретен второго деления.

2.6. Динамика цитоскелетных структур при формировании слитного веретена деления. Заключительным этапом профазы второго деления мейоза в норме является формирование двух автономных ядер, каждое из которых окружено перинуклеарным кольцом микротрубочек (рис. 6 а) и, что важно, занимает диаметрально противоположную позицию в общем пространстве мейоцита (рис. 6 б). В дальнейшем при переходе от профазы к прометафазе перинуклеарная система МТ дезинтегрируется, а ядерная оболочка распадается. Разрушение ядерной оболочки означает начало прометафазы второго деления. В этот момент пучки микротрубочечных фибрилл удлиняются, входят в контакт с хромосомами в зоне бывшего ядра, и начинается процесс формирования веретен второго деления (рис. 6д). Следует отметить, что позиции прометафазных групп хромосом остаются диаметрально противоположными (рис. 6 е).

При анализе МКП на данной стадии мейоза в мутантной группе растений нами были выявлены клетки, в которых профазные ядра располагались аномально близко друг к другу. В таких клетках происходило формирование общей перинуклеарной системы и общего перинуклеарного кольца микротрубочек для обоих ядер (рис. 6 в, г). После распада ядерной оболочки хромосомы двух ядер объединялись в одну прометафазную группу, а из общего кольца формировалась общая хаотическая прометафазная цитоскелетная фигура (рис. 6 ж, з) и затем – общее веретено деления (рис. 3 к). Анафазное движение хромосом, построение фрагмопласта и клеточной пластинки в таких клетках происходили без отклонений (рис. 3 л) и завершались образованием диады микроспор (рис. 3 м).

Наиболее вероятной причиной сближения ядер у изученных нами трансгенных растений табака с мутантным фенотипом было нарушение каркасной функции интерзональной системы МТ, формирующейся между дочерними ядрами в интеркинезе. Аналогичный механизм образования слитного веретена был описан в мейозе клона картофеля CE10 (Conicella et al., 2003).

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что цикл МТ цитоскелета в МКП табака осуществляется посредством реорганизации двух системных структур – радиального интерфазного цитоскелета и веретена деления. Фрагмопласт как отдельная цитоскелетная структура не строится. Его функции выполняет система радиальных пучков МТ, сформированных в телофазе.
2. Формирование веретена деления в МКП табака происходит посредством механизма «outside-in», то есть формирование фибрилл веретена происходит от коротких пучков дезинтегрированного перинуклеарного кольца МТ по направлению к хромосомам.
3. Выявлен ряд аномалий мейоза в МКП трансгенных растений табака с мутантным фенотипом, являющихся удобной моделью для изучения динамики цитоскелета.
4. Показано, что цитомиксис и преждевременный цитокинез в первом делении мейоза в МКП трансгенных растений табака с мутантным фенотипом не являются следствием нарушений динамики микротрубочкового цитоскелета. Преждевременный цитокинез обусловлен внеплановой активацией сигнала, запускающего процесс образования плазматической мембраны.
5. Установлено, что поворот ядер в профазе 2 является частью механизма ориентации веретен второго деления.
6. Причиной нарушения положения профазных ядер и, соответственно, веретен второго деления является нарушение процессов полимеризации-деполимеризации и взаимодействия (+)-концов МТ в поздней телофазе 1 – интеркинезе и в профазе 2.
7. Элонгация микротрубочек перинуклеарной системы на стадии ранней прометафазы является обязательным условием формирования фибрилл веретена деления.
8. Формирование слитных веретен второго деления происходит в результате формирования объединенных структур цитоскелета в профазе - прометафазе 2 при аномальном сближении ядер.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Shamina N.V., Dorogova N.V., Sidorchuk Iu.V., Zagorskaya A.A., Deineko E.V. and Shumny V.K. Abnormalities of meiotic division caused by T-DNA tagged mutation in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) // Cell Biol. Int. 2001. V. 25. № 4. P. 367-369.
2. Сидорчук Ю.В., Дорогова Н.В., Шамина Н.В., Дейнеко Е.В. Сравнительный анализ цитологических нарушений у трансгенных растений табака с мутантным фенотипом // Международная научная конференция «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология». Минск, 24-26 ноября, 2004 г. С. 187-188.
3. Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Цитомиксис в материнских клетках пыльцы у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) // ДАН. (Перечень ВАК). 2004. Т. 394. № 2. С. 282-285.
4. Сидорчук Ю.В., Шаталина М.Н., Дейнеко Е.В. Наследование и цитологические особенности цитомиксиса в материнских клетках пыльцы трансгенных растений табака // Вестник ТГУ. (Перечень ВАК). 2004. № 10. С. 112-115.
5. Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Шумный В.К. Изменение морфологии цветка и снижение уровня фертильности у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L., линия SR1) // Материалы Всероссийской научной конференции «Структура и экспрессия митохондриального генома растений». Иркутск, 3-7 сентября 2006 г. С. 94-97.
6. Шамина Н.В., Дорогова Н.В., Сидорчук Ю.В. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе у высших растений. IX. Завершение цикла. Переход от фрагмопласта к интерфазной системе цитоскелета // Цитология. (Перечень ВАК). 2006. Т. 48. № 5. С. 418-426.
7. Шамина Н.В., Сидорчук Ю.В. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе у высших растений. X. Общая схема цитоскелетного цикла // Цитология. (Перечень ВАК). 2006. Т. 48. № 5. С. 427-437.
8. Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Особенности цитомиксиса в материнских клетках пыльцы у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) с мутантным фенотипом. Цитология. (Перечень ВАК). 2007. Т. 49. № 10. С. 870-875.
9. Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Роль микротрубочкового цитоскелета и каллозных оболочек в проявлении цитомиксиса в материнских клетках пыльцы растений табака (*N. tabacum* L.) // Цитология. (Перечень ВАК). 2007. Т. 49. № 10. С. 876-880.
10. Сидорчук Ю.В., Дорогова Н.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Преждевременный цитокинез в материнских клетках пыльцы трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) // Цитология. (Перечень ВАК). 2008. Т. 50. № 5. С. 447-451.

Подписано к печати 26.03.2010 г.
Формат бумаги 60x90 1/16. Печ. л. 1. Уч. изд. л. 0,7
Тираж 110 экз. Заказ 27.

Ротапринт Института цитологии и генетики СО РАН
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10