

УДК 577.218, 577.151.042

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ ДЕКОНДЕНСАЦИИ ХРОМАТИНА СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ТЕХНИКИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

© 2011 г. Е. В. Семенова, М. В. Филатов

Отделение молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН 188300 Гатчина, Ленинградская обл., Орлова роща

E-mail: filatov@omrb.pnpi.spb.ru

Поступила в редакцию 04.02.10 г.

Окончательный вариант 11.03.10 г.

Механизмы, обуславливающие радикальное изменение структуры хроматина мужских половых клеток в процессе оплодотворения, остаются во многом неясными. В данной работе представлены аргументы, указывающие на возможность существования энзимов с протеолитической активностью в ядрах зрелых сперматозоидов человека, и обсуждается предполагаемая роль этих неизвестных ранее эндогенных протеолитических активностей в декомпактизации хроматина сперматозоидов в оплодотворенной яйцеклетке. С помощью техники проточной цитометрии продемонстрировано, что обработка ядер сперматозоидов человека SH-содержащими реагентами не только разрушает дисульфидные связи между молекулами протаминов, что необходимо для их эффективного удаления, но также индуцирует специфическую эндогенную протеазную активность, следствием чего является достаточно быстрая деконденсация хроматина, сопровождающаяся протеолизом ядерных белков. Процесс деконденсации хроматина практически полностью блокируется различными ингибиторами сериновых протеаз и компонентами семенной жидкости.

С целью визуализации мест локализации белков с протеолитической активностью в ядрах мужских половых клеток использован оригинальный цитохимический подход – связывание флуоресцентно меченого ингибитора протеаз с исследуемым объектом.

Приведенные в работе факты позволяют предположить, что одним из факторов реорганизации структуры хроматина при формировании мужского пронуклеуса в процессе оплодотворения может быть эндогенная ядерная протеаза сперматозоида, активирующаяся под действием глутатиона или других SH-содержащих реагентов, которыми богата цитоплазма яйцеклетки.

Ключевые слова: ингибиторы протеаз, оплодотворение, проточная цитометрия, сперматозоиды человека, эндогенные ядерные протеазы.

Один из важнейших этапов процесса оплодотворения у человека – радикальная реорганизация структуры ядра мужских половых клеток после слияния с яйцеклеткой. Хроматин зрелых сперматозоидов отличается от хроматина других типов клеток не только по составу, но и по значительно более высокой степени компактизации: обычные гистоны почти на 85% замещаются специфическими основными белками протаминами, что ведет к практически полному отсутствию нуклеосомной организации ДНК; кроме того, дополнительная стабилизация достигается за счет формирования дисульфидных мостиков между молекулами протаминов. Очевидно, что после проникновения сперматозоида в яйцеклетку необходима обратная реорганизация хроматина и, следовательно, должны существовать факторы, обеспечивающие эффективность данного процесса, т.к. нарушение запрограммированной структурной перестройки хроматина сперматозоидов может привести к образованию дефектного мужского пронуклеуса и негативно повлиять на ранние стадии

эмбриогенеза. В ооплазме инициируется декомпактизация плотно упакованного хроматина мужских половых клеток, сопровождающаяся заменой протаминов гистонами (Newport, 1987; Almouzni et al., 1990, 1991; Kleinchmidt, Steinbeisser, 1991; Almouzni, Wolffe, 1993; Bianchi et al., 1996; McLay, Clarke, 2003; van der Heijden et al., 2005; Ajduk et al., 2006). В результате генетический материал приобретает характерную для соматических клеток нуклеосомную структуру, что делает возможным его объединение в одном ядре с женским пронуклеусом и последующую адекватную экспрессию генетической информации. Однако молекулярно-клеточные механизмы, обуславливающие такую радикальную реорганизацию хроматина сперматозоидов, остаются во многом неясными.

Протеолиз играет весьма существенную роль при оплодотворении у млекопитающих. Известно, что протеолитические события сопровождают начальные этапы узнавания и взаимодействия яйцеклетки

и сперматозоида, лежат в основе разрушения спермийных митохондрий в ооците (Imschenetzky et al., 1999; Mochida et al., 2000; Sutovsky et al., 2000; Wójcik et al., 2000; Ziembra et al., 2002; Sutovsky, 2003; Yi et al., 2007; Chakravarty et al., 2008; Rawe et al., 2008; Zimmerman, Sutovsky, 2009). Протеазы участвуют и в реорганизации хроматина сперматозоида при формировании мужского пронуклеуса (Chang, Zirkin, 1978; Zirkin et al., 1980; Perreault, Zirkin, 1982; Marushige Y., Marushige K., 1983; Imschenetzky et al., 1997; 1999; Shimada et al., 2000; Concha et al., 2005; Monardes et al., 2005; Puchi et al., 2006; Gourdet et al., 2007; Iribarren et al., 2008; Morin et al., 2008). Что касается человека, то информация об обнаружении протеолитических ферментов в ядрах мужских половых клеток в литературе отсутствует.

В данной работе представлен ряд фактов, указывающих на то, что ядра зрелых сперматозоидов человека содержат ферменты, обладающие протеолитической активностью, определены условия их активации и места преимущественной локализации в ядре. Предполагается, что эти белки принимают участие в запрограммированной структурной перестройке хроматина в оплодотворенной яйцеклетке, по всей видимости, осуществляя протеолиз спермий-специфичных протаминов и белков ядерного матрикса, что способствует быстрой деконденсации хроматина и последующему восстановлению нуклеосомной организации мужского генома.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Стандартная процедура окрашивания клеток бромистым этидием для проточнотометрических исследований

В каждом эксперименте использовались небольшие объемы семенного материала (0.5 мл). Сперматозоиды освобождали от семенной жидкости путем центрифугирования (5 мин. при 2000 об./мин) с последующей двукратной отмывкой в стандартном фосфатном буфере (150 мМ PBS, pH 7.0) (БиолоТ, С.-Петербург, Россия). Затем клетки переводили в тот же буфер (конечная концентрация 10^6 сперматозоидов в миллилитре), содержащий неионный детергент Triton X-100 (конечная концентрация 0.1%) (БиолоТ, С.-Петербург, Россия) для разрушения цитоплазматической мембраны и освобождения ядер, стабильных в этих условиях. Окрашивание ядер интеркалирующим флуоресцентным красителем бромистым этидием (конечная концентрация 25 мкг/мл) (Sigma, St. Louis, MO, USA) проводили в течение 30 мин непосредственно перед проточнотометрическим анализом.

Исследования проводились на сконструированном и собранном в ПИЯФ РАН проточном лазерном цитофлуориметре, измеряющем интенсивность флуоресценции и использующем в качестве источника света аргоновый лазер. Суспензия клеток пода-

валась при помощи шприцевого микронасоса под давлением в проточную камеру через сопло-инжектор. Гидродинамическое фокусирование обеспечивалось оболочечной струей по мере выхода клеток из сопла. Возбуждение флуоресценции осуществлялось аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Мощность излучения около 0.5 Вт. Горизонтальный размер лазерного фокального эллипса 80×10^{-6} м, вертикальный размер — 18×10^{-6} м. Диаметр потока суспензии равен 12×10^{-6} м в момент пересечения лазерного луча. Сигнал флуоресценции после прохождения серийного объектива 30/0.9, выделялся двухмиллиметровым стеклянным светофильтром КС-10 и фокусировался на фотокатод ФЭУ-84. Импульсы с ФЭУ усиливались спектрометрическим усилителем и подавались на многоканальный амплитудный анализатор, соединенный с компьютером. Условия проведения эксперимента позволяли нам регистрировать приблизительно 500 импульсов в секунду. Обработка полученных данных производилась с помощью специальной программы накопления и графического представления, написанной в ПИЯФ РАН.

Обработка ядер сперматозоидов SH-содержащими реагентами и различными ингибиторами протеаз

После трехкратной отмывки, позволяющей избавиться от нежелательных для последующего анализа компонентов семенной жидкости (различных протеаз и ингибиторов протеаз) и инкубации с детергентом в течение 15 минут при комнатной температуре, клетки делили на 3 аликвоты и снова центрифугировали дважды (10 мин при 5000 об./мин) в изотоническом фосфатном буфере, pH 7.0. С помощью данной процедуры мы отмывались от акросомальных протеолитических активностей. Затем ядра одной из аликвот ресуспендировали в том же буфере (150 мМ PBS, pH 7.0), а двух других аликвот в 10 мМ PBS, pH 8.5 (конечная концентрация 10^6 сперматозоидов в миллилитре). Все три аликвоты обрабатывались β -меркаптоэтанолом (конечная концентрация 20 мМ) (Сигма-Алдрич, Москва, Россия) или другими SH-содержащими реагентами (дитиотрейтол, цистеамин, восстановленный глутатион (dithiothreitol, cysteamine, reduced glutathione; Sigma, St. Louis, MO, USA)), а к третьей аликвоте, кроме того, добавлялся раствор какого-нибудь ингибитора протеаз серинового типа (фенилметилсульфонил флуорид (PMSF; Sigma, St. Louis, MO, USA), N-тозил-L-фенилаланин хлорометил кетон (N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone; Sigma, St. Louis, MO, USA), бензамидин (benzamidin; Fluka, Buchs, Switzerland), ингибитор трипсина соевых бобов (SB-TI; Fluka, Buchs, Switzerland)) (конечная концентрация 5–25 мМ) или различные объемы семенной жидкости (разведение в 10, 100 и 1000 раз). В заключение ядра сперматозоидов окрашивались по стандартной методике.

Приготовление флуоресцентно меченого ингибитора трипсина соевых бобов

Ингибитор трипсина соевых бобов (SBTI; Fluka, Buchs, Switzerland) был растворен в 0.1 N содовом буфере (5 mM Na₂CO₃, 90 mM NaHCO₃; НеваРеактив, С.-Петербург, Россия), pH 8.9 до конечной концентрации 200 мг/мл. К раствору был добавлен флуорохром флуоресцеин изотиоцианат (FITC, isomer I; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (конечная концентрация 1 мг/мл), и при непрерывном помешивании смесь инкубировалась в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего была нанесена на колонку с G-50 Sephadex (Pharmacia, Uppsala, Sweden), уравновешенную водой. В заключении продукт был лиофильно высушен и проанализирован в соответствии с процедурой, предложенной Ваттом и Воссом (Watt, Voss, 1978). В среднем, по нашей оценке, с каждой молекулой ингибитора трипсина ковалентно связалось 3 остатка флуоресцеин изотиоцианата. Кроме того, обнаружено, что интенсивность флуоресценции меченого FITC ингибитора трипсина соевых бобов в фосфатном буфере не зависит от ионной силы раствора, но значительно возрастает при увеличении его pH (от 4.0 отн. ед. при pH 5.0 до 540 отн. ед. при pH 8.5). Измерения были проведены на спектрофлуориметре F-4010 фирмы "Hitachi" (Япония). Длина волны возбуждающего света 480 нм, максимум интенсивности флуоресценции зафиксирован при длине волны 520 нм.

Обработка сперматозоидов флуоресцентно меченым ингибитором трипсина соевых бобов

Сперматозоиды трижды отмывались в изотоническом фосфатном буфере (PBS), pH 7.0, обрабатывались 0.1% (v/v) Triton X-100 в том же буфере, и после 30-минутной инкубации при комнатной температуре снова трижды отмывались в 10 mM PBS, pH 7.0. Затем клетки переводились в 10 mM фосфатный буфер, pH 8.0 с добавлением 1% (v/v) бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma, St. Louis, MO, USA) для предотвращения неспецифического связывания и флуоресцентно меченого ингибитора трипсина соевых бобов (конечная концентрация 100 мкг/мл), и через 20 минут флуоресцирующие ядра наблюдались в микроскоп. Нами использовался флуоресцентный микроскоп AxioPlan фирмы "Opton" (Германия).

В эксперименте по конкурентному связыванию концентрация немеченого ингибитора трипсина в 100 раз превышала концентрацию меченого ингибитора. Т.е. первоначально суспензия сперматозоидов в течение 20 минут инкубировалась с немеченым ингибитором трипсина соевых бобов (конечная концентрация 1 мг/мл) и лишь затем к ней добавлялся меченый ингибитор трипсина.

В эксперименте по конкурентному связыванию компонентов семенной жидкости с эндогенными

протеазами сперматозоидов использовалось десятикратное разведение семенной жидкости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исключительно плотная упаковка ДНК в ядрах сперматозоидов с помощью протаминов, дополнительно стабилизируемая внутри- и межмолекулярными дисульфидными мостиками, приводит к высоко эффективной ее экранировке от взаимодействия с различными ДНК-связывающими агентами (Haaf, Ward, 1995; Bottiroli et al., 1994; Kramer, Krawetz, 1997). В частности, окрашиваемость ДНК бромистым этидием существенно ниже в ядрах сперматозоидов по сравнению с соматическими клетками.

Инкубация ядер сперматозоидов в растворе, содержащем β-меркаптоэтанол, инициирует процесс декомпактизации хроматина, сопровождающийся постепенным увеличением размеров ядра (рис. 1). При этом доступность ДНК для связывания бромистого этидия существенно возрастает, что может быть зарегистрировано с помощью техники проточной цитофлуориметрии. Кинетика этого процесса представлена на рис. 2. Последующая инкубация приводит к полной потере целостности ядер и их механической деструкции. Аналогичные результаты были получены при использовании различных SH-содержащих реагентов, таких как дитиотрейтол, цистеамин, восстановленный глутатион и унитиол.

Следует отметить, что подобная реакция в значительной степени зависит от ионной силы и pH среды: оптимальными являются условия низкой ионной силы (10 mM соли) и щелочных pH (8.0–8.5). В физиологических условиях процесс существенно заторможен.

Наблюдаемое раскрытие хроматина ядер спермиев человека может быть подавлено различными ингибиторами сериновых протеаз: фенилметилсульфонил флуоридом (PMSF), бензамидином, N-тозил-L-фенилаланин хлорометил кетоном, ингибитором трипсина соевых бобов (рис. 3). Этот факт свидетельствует об определяющей роли активируемой SH-содержащими реагентами эндогенной протеазы ядер сперматозоидов в декомпактизации хроматина. Результаты, полученные с помощью метода проточной цитометрии, подтверждаются данными белкового электрофореза: активация ассоциированной с хроматином протеазы приводит *in vitro* к постепенному протеолизу, вплоть до полной дегградации, практически всех ядерных белков сперматозоидов (данные не приводятся).

Интересным представляется тот факт, что исследуемая протеолитическая активность практически полностью блокируется компонентами семенной жидкости, даже при значительном ее разведении (рис. 3).

Предположение о ядерной локализации белков, обладающих протеазной активностью и участвующим

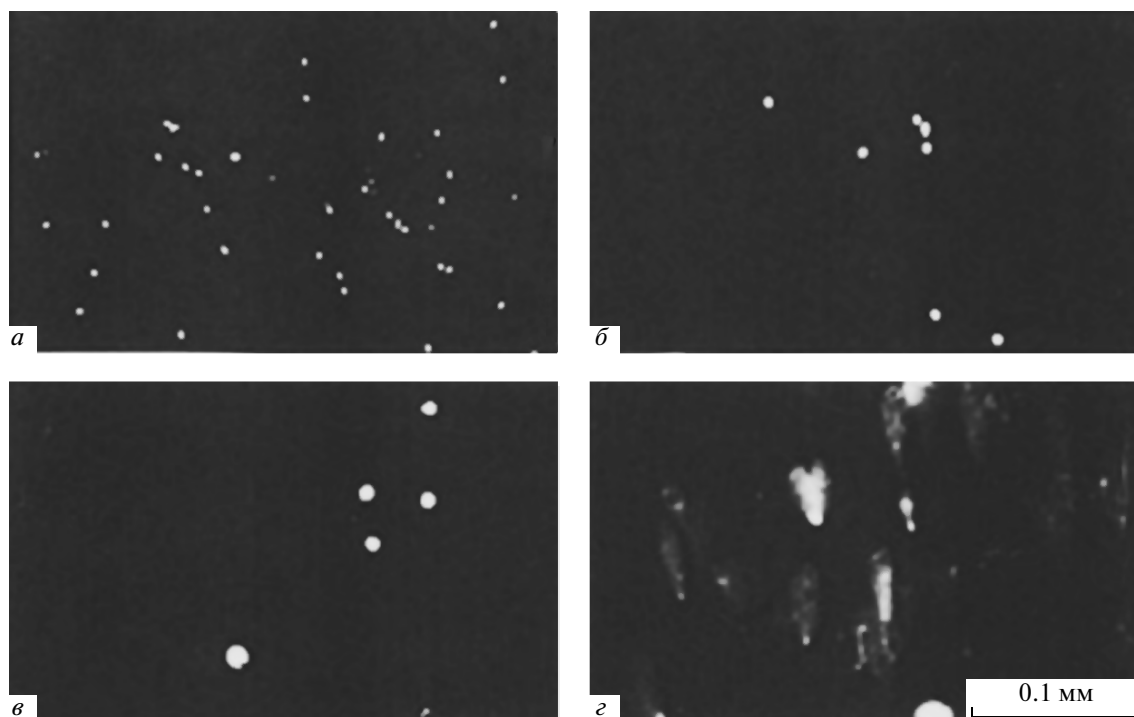


Рис. 1. Фотографии обработанных β -меркаптоэтанолом (конечная концентрация 20 мМ) и окрашенных бромистым этидием ядер сперматозоидов человека. Демонстрация деконденсации хроматина под действием эндогенной протеолитической активности, индуцированной SH-реагентом: *a* – необработанные ядра; *b* – время инкубации с β -меркаптоэтанолом 1 час; *v* – время инкубации с β -меркаптоэтанолом 2 часа; *z* – время инкубации с β -меркаптоэтанолом 24 часа (увеличение 200 \times).

щих в реорганизации хроматина мужских половых клеток при определенных условиях, может быть проверено прямой их визуализацией с помощью флуоресцентно меченого ингибитора протеаз. Известно, что протеазы образуют чрезвычайно стабильные, не менее стабильные, чем антиген–антитело, комплексы со своими ингибиторами (Tschesche, Macartney, 1981; Imajoh, Suzuki, 1985). Поэтому можно ожидать, что связывание флуоресцентно меченого ингибитора протеаз с исследуемым объектом обнаружит места локализации искомого протеаз. В наших исследованиях мы поместили соевый ингибитор трипсина флуоресцеин изотиоцианатом. Обработка ядер сперматозоидов этим ингибитором вызывает их флуоресцентное окрашивание, что указывает на ядерную локализацию рассматриваемых энзимов (рис. 4). Конкурентное связывание немеченого соевого ингибитора трипсина подавляло флуоресцентное окрашивание. Подавление окрашивания наблюдалось также при использовании для конкурентного связывания разведенной семенной жидкости, что подтверждает проточнотометрические данные о наличии в ней белковых факторов, ингибирующих эндогенную протеолитическую активность сперматозоидов человека.

Для выяснения того, ассоциированы ли эндогенные протеолитические активности с хроматином ядер спермиев, был проделан следующий экспери-

мент: образец спермы делился на 3 равные части, обрабатывающиеся различными способами. В первой пробе клетки лизировали и инкубировали в среде, содержащей β -меркаптоэтанол, в малом объеме (в 8 раз меньшем, чем по стандартной методике). Во второй и третьей пробах клетки лизировали в большом избытке буфера (объем в 2 и 25 раз превосходил стандартный), после чего осаждали, еще раз промывали и только затем инкубировали в присутствии β -меркаптоэтанола. Т.к. процедура отмывки и существенное увеличение концентрации клеток не вызвали изменения положения пика на гистограмме распределения флуоресценции при проточнотометрическом анализе, мы вправе сделать вывод о структурированности исследуемых протеолитических факторов в хроматин, поскольку известно, что зрелые сперматозоиды практически лишены цитоплазмы и весь внутренний объем этих уникальных клеток заполнен высококонденсированным хроматином.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что протеолиз весьма существенен для сперматогенеза, оогенеза, оплодотворения и раннего эмбрионального развития у млекопитающих (Mochida et al., 2000; Wójcik et al., 2000; Ziemba et al., 2002; Sutovsky, 2003; Yi et al., 2007; Chakravarty et al., 2008; Rawe et al., 2008; Zimmerman, Sutovsky, 2009).

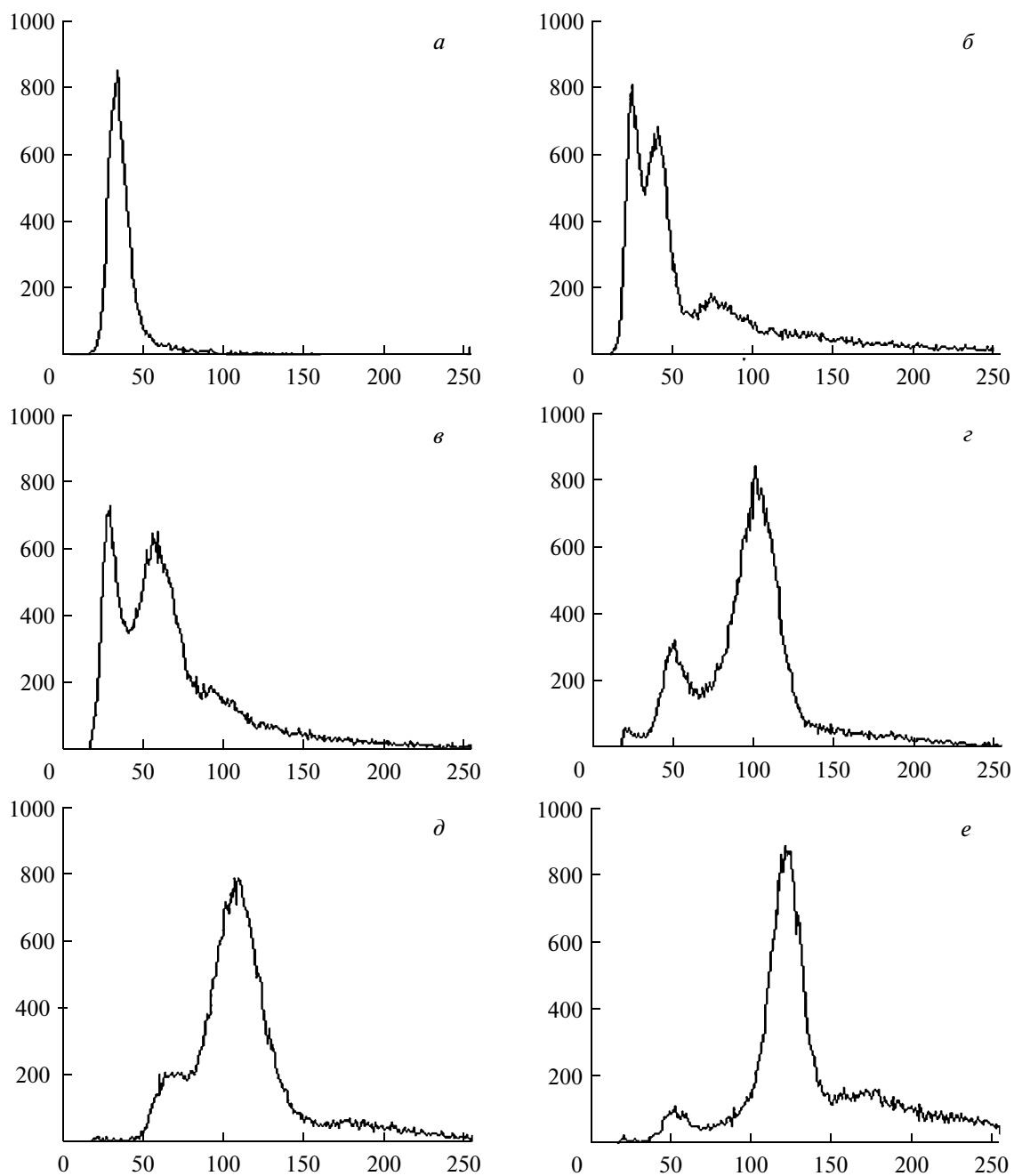


Рис. 2. Гистограмма распределения по интенсивности флуоресценции ядер сперматозоидов человека, обработанных β -меркаптоэтанолом и окрашенных бромистым этидием.

По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, отн. ед., по оси ординат – количество зарегистрированных событий.

Представлена кинетика процесса деконденсации хроматина под действием эндогенной протеолитической активности, индуцированной SH-реактантами. Время инкубации ядер сперматозоидов с β -меркаптоэтанолом: *a* – 0 минут; *b* – 15 минут; *c* – 30 минут; *d* – 60 минут; *e* – 90 минут; *f* – 120 минут.

На переднем полюсе головки мужской половой клетки под плазматической мембраной расположена особая структура – акросома. В процессе оплодотворения при контакте с яйцеклеткой оболочка акросомы разрывается и содержащиеся в ней протеолитические ферменты – гиалуронидаза и акрозин способствуют проникновению сперматозоида в

яйцеклетку. Предполагается, что протеасомальные комплексы, обнаруженные в мужских половых клетках, так же играют важную роль при слиянии половых клеток (капацитация, индукция акросомально-го экзоцитоза, проникновение через зону пеллюцида) и на ранних стадиях развития зиготы (Sutovsky et al., 2000; Sutovsky, 2003; Yi et al., 2007; Chakravarty

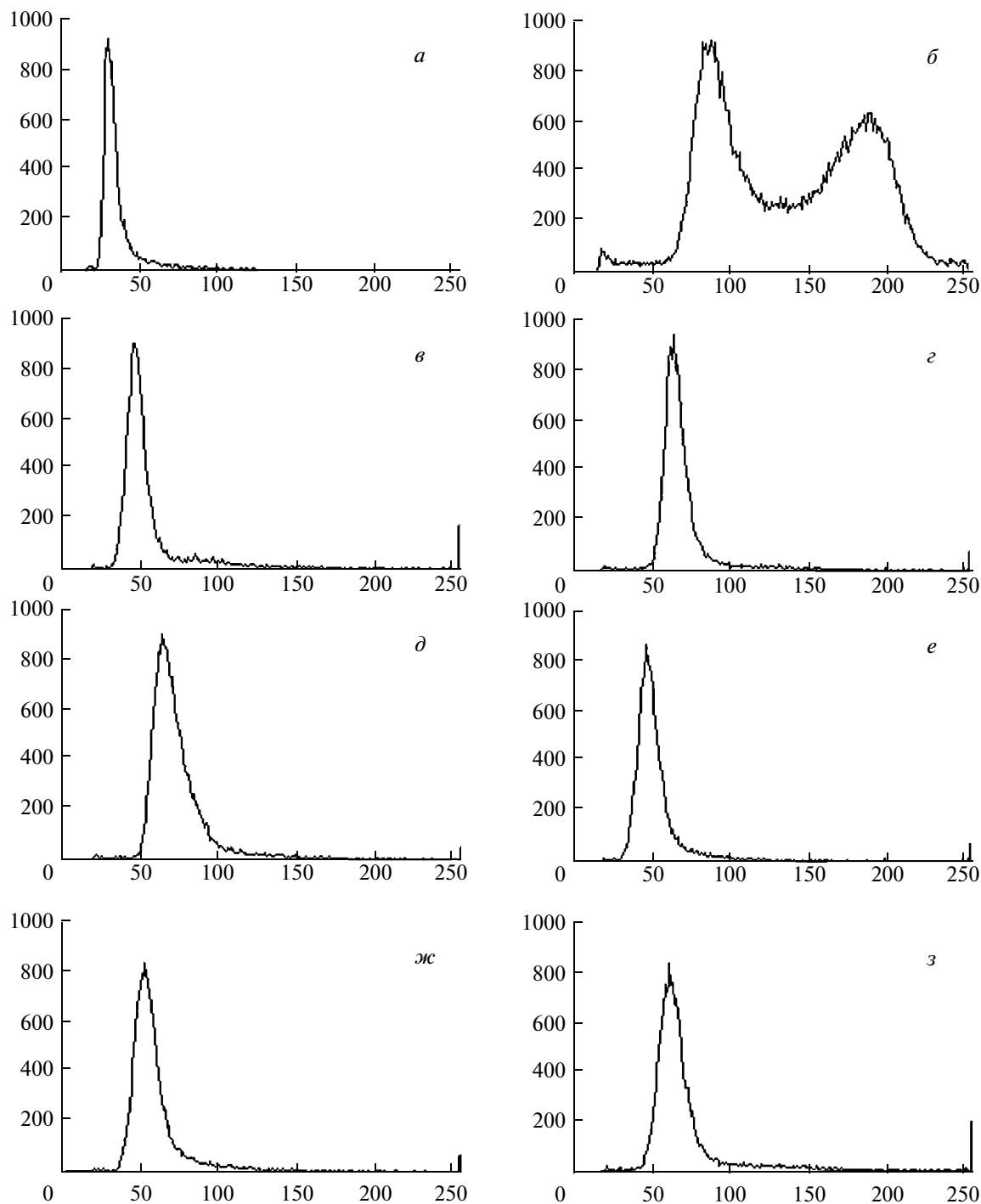


Рис. 3. Гистограмма распределения по интенсивности флуоресценции ядер сперматозоидов человека, окрашенных бромистым этидием и обработанных β -меркаптоэтанолом совместно с ингибиторами сериновых протеаз или различными концентрациями семенной жидкости.

По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, отн. ед., по оси ординат – количество зарегистрированных событий.

Демонстрация ингибирующего действия различных ингибиторов протеаз серинового типа и компонентов семенной жидкости на деконденсацию хроматина сперматозоидов, индуцируемую SH-регентом: *a* – необработанные ядра; *б* – ядра, обработанные β -меркаптоэтанолом в течение 3-х часов; *в* – ядра, обработанные β -меркаптоэтанолом совместно с фенолметилсульфонил флуоридом (PMSF) в течение 3-х часов; *г* – ядра, обработанные β -меркаптоэтанолом совместно с бензамидином в течение 3-х часов; *д* – ядра, обработанные β -меркаптоэтанолом совместно с N-тозил-L-фенилаланин хлорометил кетоном в течение 3-х часов; *е* – ядра, обработанные β -меркаптоэтанолом совместно с ингибитором трипсина соевых бобов в течение 3-х часов; *ж* – ядра, обработанные β -меркаптоэтанолом совместно с разведенной в 10 раз семенной жидкостью в течение 3-х часов; *з* – ядра, обработанные β -меркаптоэтанолом совместно с разведенной в 1000 раз семенной жидкостью в течение 3-х часов.

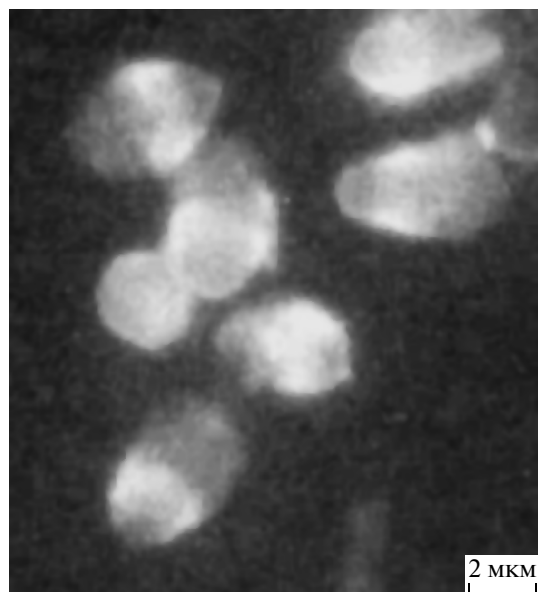


Рис. 4. Фотография обработанных ингибитором трипсина соевых бобов, меченным флуоресцеин изотиоцианатом (FITC, isomer I), сперматозоидов человека. Демонстрация ядерной локализации эндогенной протеазы сперматозоидов человека (увеличение 1000×).

et al., 2008; Rawe et al., 2008; Zimmerman, Sutovsky, 2009). Причем, протеасомальная энзиматическая активность значительно снижена в популяции дефектных человеческих сперматозоидов (Ziemba et al., 2002; Rawe et al., 2008). Показано для быков и человека, что специфические протеасомные ингибиторы нарушают процессы формирования астера, пронуклеарного развития и объединения в одном ядре отцовского и материнского геномов (Rawe et al., 2008). При этом ингибиторы протеасом не оказывали никакого влияния на подвижность мужских половых клеток и акросомальную реакцию (Wojcik et al., 2000). Посредством иммуногистохимических исследований с помощью меченых моно- и поликлональных антител были определены места локализации протеасом в сперматозоидах человека. Протеасомальные антигены были зафиксированы в акросомальной и околоакросомальной областях, в шейном отделе и в непосредственной близости от центриолей, но не в ядрах и не в хвостах сперматозоидов (Wojcik et al., 2000; Biały et al., 2001; Ziemba et al., 2002; Rawe et al., 2008). Т.е. протеасомальные энзиматические активности пространственно удалены от конденсированного хроматина зрелых мужских половых клеток.

В нашей работе представлен ряд фактов, указывающих на то, что ядра зрелых сперматозоидов человека могут содержать энзимы, обладающие протеолитической активностью. Эти активности в присутствии SH-содержащих реагентов вызывают драматическую декомпактизацию хроматина сперматозоидов (рис. 1, 2), сопровождающуюся протео-

лизом спермий-специфичных протаминов и, возможно, белков ядерного матрикса, принимающих участие в сохранении иерархических уровней организации хроматина мужских половых клеток. Мы вправе сделать такой вывод, поскольку эксперименты проводились в условиях низкой ионной силы и в отсутствие каких-либо дополнительных веществ, способных столь радикальным образом воздействовать на исключительно плотно упакованный хроматин зрелых сперматозоидов. Используя флуоресцентно меченый ингибитор протеаз, прямо продемонстрирована ядерная локализация энзимов, обладающих протеолитической активностью (рис. 4).

Определенные нами условия активации исследуемых факторов декомпактизации хроматина сперматозоидов, в первую очередь наличие SH-содержащих реагентов, наводят на мысль о возможной структурированности энзимов, обладающих протеолитической активностью, в хроматин с помощью дисульфидных мостиков. Это предположение подтверждается несколькими примерами из литературы. В частности, в ядрах тимоцитов крысы обнаружены прочно связанные с гистонами протеазы, причем распад комплекса протеаза-гистон происходил только в присутствии дитиотрейтола (Газиев и др., 1992). Кроме того, продемонстрировано для различных клеток, что эндогенные протеазы неактивны, пока они иммобилизованы в структуру хроматина, и активируются при диссоциации (Anachkova, Russev, 1977; Lipinska et al., 1980).

Восстановленный глутатион и другие SH-содержащие вещества в достаточных количествах присутствуют в ооплазме и, следовательно, могут активировать ядерную протеазу сперматозоидов человека. Более того, структурная реорганизация хроматина мужских половых клеток находится в прямой зависимости от цитоплазматических факторов оплодотворенного ооцита, включая восстановленный глутатион (Perreault et al., 1988; Sutovsky, Schatten, 1997), и необходим свободный доступ этих молекул к хроматину сперматозоидов (Poccia, Collas, 1996). В частности показано, что в процессе формирования пронуклеуса у быков участвует глутатион ооплазмы, восстанавливающий дисульфидные связи, стабилизирующие структуру хроматина зрелых сперматозоидов (Sutovsky, Schatten, 1997).

Установленный нами факт, что компоненты семенной жидкости блокируют активность эндогенной протеазы сперматозоидов, не выглядит удивительным, т.к. известно несколько ингибиторов протеиназ, входящих в состав семенной жидкости человека (HSTPL, PCI, холестерол) (Hara et al., 1993; Zheng et al., 1994; Cross, 1996). Возможно, эти молекулы не только ингибируют развитие акросомальной реакции, как считалось до сих пор, но и предохраняют ядерные белки мужских половых клеток от преждевременной деградации. Следует подчерк-

нать, что, по крайней мере, одно из этих природных веществ — HSTPI — трипсин-подобный ингибитор протеиназ (Nara et al., 1993).

Таким образом, логично предположить, что при оплодотворении отцовская эндогенная протеаза попадает в материнскую яйцеклетку в плотно ассоциированном с хроматином виде и может в дальнейшем принимать участие в запрограммированной структурной реорганизации мужского генома. Это предположение согласуется с результатами ряда работ, в которых показано для нескольких видов животных, что процесс деконденсации хроматина сперматозоидов в ооците инициируется SH-содержащими реагентами и сопровождается протеолизом спермий-специфичных белков (Marushige Y., Marushige K., 1975, 1978, 1983; Chang, Zirkin, 1978; Zirkin et al., 1980; Perreault, Zirkin, 1982; Imschenetzky et al., 1997; 1999; Shimada et al., 2000; Concha et al., 2005; Monardes et al., 2005; Puchi et al., 2006; Gourdet et al., 2007; Iribarren et al., 2008; Morin et al., 2008).

С точки зрения полученных нами результатов вызывают интерес исследования, посвященные ассоциированной с хроматином зигот морского ежа цистеиновой протеазе (Imschenetzky et al., 1997). Активность данной протеазы оказалась pH-зависимой: при pH 7.8–8.0 (pH оплодотворенной яйцеклетки) она расщепляет пять спермий-специфичных гистонов (аналогов протаминов), в то время как гистоны, характерные для стадий дробления, остаются интактными (Imschenetzky et al., 1997, 1999). По мнению авторов, ей принадлежит важная роль в замещении спермий-специфичных белков на соматические гистоны в процессе образования мужского пронуклеуса. Существенно, что трансформация первоначально плотно конденсированного хроматина сперматозоидов морских ежей в более рыхлую структуру, характерную для пронуклеуса, ингибировалась N-ethylmaleimide — веществом, блокирующим размыкание SH-групп (Imschenetzky et al., 1999). Для сперматозоидов другого вида морских животных (sand dollar) показано, что активация 26S протеасом зависит от роста внутриклеточного pH ооплазмы при оплодотворении (Chiba et al., 1999). Требование щелочных pH для индукции протеолитических активностей ядер сперматозоидов человека, возможно, является дополнительным подтверждением их участия в реорганизации хроматина при формировании мужского пронуклеуса, т.к. эти значения (8.0–8.5) совпадают с pH ооплазмы.

Очевидно, что дальнейшие исследования в этом направлении будут способствовать лучшему пониманию процесса оплодотворения у человека в целом. Поскольку даже незначительные дефекты в структурной организации ядер сперматозоидов вызывают нарушения реорганизации хроматина в ооците и последующих этапов эмбриогенеза, изучение функциональной роли при оплодотворении обнаруженных нами ядерных белков сперматозоидов

человека, обладающих протеолитической активностью, возможно, поможет в будущем для диагностики и лечения некоторых видов мужского бесплодия.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят сотрудницу нашего отдела Л.С. Исаеву-Иванову за консультации и помощь в приготовлении флуоресцентно меченого ингибитора трипсина соевых бобов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Газиев А., Куцый М., Закржевская Д. Ассоциация протеиназ с гистонами ядер тимуса крысы // Мол. Биол. 1992. Т. 26. № 3. С. 532–539.
- Ajduk A., Yamauchi Y., Ward M.A. Sperm chromatin remodeling after intracytoplasmic sperm injection differs from that of *in vitro* fertilization // Biol. Reprod. 2006. V. 75. № 3. P. 442–451.
- Almouzni G., Clark D., Mechali M. et al. Chromatin assembly on replicating DNA *in vitro* // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18. P. 5767–5774.
- Almouzni G., Mechali M., Wolffe A.P. Transcription complex disruption caused by a transition in chromatin structure // Mol. Cell Biol. 1991 V. 11. P. 655–665.
- Almouzni G., Wolffe A.P. Nuclear assembly, structure and function: the use of *Xenopus in vitro* systems // Exp. Cell Res. 1993. V. 205. P. 1–15.
- Anachkova B., Russev G. Endogenous proteolytic activity of chromatin // Acta. Biol. Med. Ger. 1977. V. 36. № 11–12. P. 1945–1950.
- Bialy L.P., Ziemba H.T., Marianowski P. et al. Localization of a proteasomal antigen in human spermatozoa: immunohistochemical electron microscopic study // Folia Histochem. Cytobiol. 2001. V. 39. № 2. P. 129–130.
- Bianchi P.G., Manicardi G., Urner F. et al. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa // Mol. Hum. Reprod. 1996. V. 2. № 3. P. 139–144.
- Bottiroli G., Croce A.C., Pellicciari C. et al. Propidium iodide and the thiol-specific reagent DACM as a dye pair for fluorescence resonance energy transfer analysis: an application to mouse sperm chromatin // Cytometry. 1994. V. 15. P. 106–116.
- Chakravarty S., Bansal P., Sutovsky P. et al. Role of proteasomal activity in the induction of acrosomal exocytosis in human spermatozoa // Reprod. Biomed. Online. 2008. V. 16. № 3. P. 391–400.
- Chang T.S., Zirkin B.R. Proteolytic degradation of protamine during thiol-induced nuclear decondensation in rabbit spermatozoa // J. Exp. Zool. 1978. V. 204. № 2. P. 283–289.
- Chiba K., Alderton J.M., Hoshi M. et al. Activation of the proteasomes of sand dollar eggs at fertilization depends on the intracellular pH rise // Dev. Biol. 1999. V. 209. № 1. P. 52–59.
- Concha C., Morin V., Bustos P. et al. Cysteine-protease involved in male chromatin remodeling after fertilization

- co-localizes with alpha-tubulin at mitosis // *J. Cell Physiol.* 2005. V. 202. № 2. P. 602–607.
- Cross N.L. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesteron: cholesterol is the major inhibitor // *Biol. Reprod.* 1996. V. 54. P. 138–145.
- Gourdet C., Iribarren C., Morin V. et al. Nuclear cysteine-protease involved in male chromatin remodeling after fertilization is ubiquitously distributed during sea urchin development // *J. Cell Biochem.* 2007. № 1. V. 101. P. 1–8.
- Haaf T., Ward D.C. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers // *Exp. Cell Res.* 1995. V. 219. P. 604–611.
- Hara I., Matsuda Y., Kaneko S. et al. Human seminal plasma proteinase inhibitor: action toward some trypsin-like arginine amidases from humans // *Arch. Androl.* 1993. V. 31. P. 23–29.
- van der Heijden G.W., Dieker J.W., Derijck A.A. et al. Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote // *Mech. Dev.* 2005. V. 122. № 9. P. 1008–1022.
- Imajoh S., Suzuki K. Reversible interaction between Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) and its endogenous inhibitor // *FEBS Lett.* 1985. V. 187. P. 47–50.
- Imschenetzky M., Diaz F., Montecino M. et al. Identification of a cysteine protease responsible for degradation of sperm histones during male pronucleus remodeling in sea urchins // *J. Cell Biochem.* 1997. V. 67. № 3. P. 304–315.
- Imschenetzky M., Puchi M., Morin V. et al. Potential involvement of post-translational modifications as a mechanism modulating selective proteolysis after fertilization // *J. Cell Biochem.* 1999. V. 32/33. P. 149–157.
- Iribarren C., Morin V., Puchi M. et al. Sperm nucleosomes disassembly is a requirement for histones proteolysis during male pronucleus formation // *J. Cell Biochem.* 2008. V. 103. № 2. P. 447–455.
- Kleinmidt J., Steinbeisser H. DNA dependent phosphorylation of histone H2A.X during nucleosome assembly in *Xenopus laevis* oocytes: involvement of protein phosphorylation in nucleosome spacing // *EMBO J.* 1991. V. 10. P. 103043–103050.
- Kramer J.A., Krawetz S.A. RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome // *Mol. Hum. Reprod.* 1997. V. 3. P. 473–478.
- Lipinska A., Krawczyk Z., Krajewska W. et al. Activity of chromatin-bound protease in histone fractions from rat liver and Morris hepatoma // *Neoplasia.* 1980. V. 27. № 4. P. 409–413.
- Marushige Y., Marushige K. Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin // *Biochim. Biophys. Acta.* 1975. V. 403. № 1. P. 180–191.
- Marushige Y., Marushige K. Dispersion of mammalian sperm chromatin during fertilization: an *in vitro* study // *Biochim. Biophys. Acta.* 1978. V. 519. № 1. P. 1–22.
- Marushige Y., Marushige K. Proteolysis of somatic type histones in transforming rat spermatid chromatin // *Biochim. Biophys. Acta.* 1983. V. 761. № 1. P. 48–57.
- McLay D.W., Clarke H.J. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals // *Reproduction.* 2003. V. 125. № 5. P. 625–633.
- Mochida K., Tres L., Kierszenbaum A. Structural features of the 26S proteasome complex isolated from rat testis and sperm tail // *Mol. Reprod. Dev.* 2000. V. 57. № 2. P. 176–184.
- Monardes A., Iribarren C., Morin V. et al. During male pronuclei formation chromatin remodeling is uncoupled from nucleus decondensation // *J. Cell Biochem.* 2005. V. 96. № 6. P. 235–241.
- Morin V., Sanchez A., Quiñones K. et al. Cathepsin L inhibitor I blocks mitotic chromosomes decondensation during cleavage cell cycles of sea urchin embryos // *J. Cell Physiol.* 2008. V. 216. № 3. P. 790–795.
- Newport J. Nuclear reconstitution *in vitro*: stages of assembly around protein-free DNA // *Cell.* 1987. V. 48. P. 205–217.
- Perreault S.D., Barbee R.R., Slott V.L. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes // *Dev. Biol.* 1988. V. 125. № 1. P. 181–186.
- Perreault S.D., Zirkin B.R. Sperm nuclear decondensation in mammals: role of sperm-associated proteinase *in vivo* // *J. Exp. Zool.* 1982. V. 224. № 1. P. 253–257.
- Poccia D., Collas P. Transforming sperm nuclei into male pronuclei *in vivo* and *in vitro* // *Curr. Top. Dev. Biol.* 1996. V. 34. P. 25–88.
- Puchi M., Quiñones K., Concha C. et al. Microinjection of an antibody against the cysteine-protease involved in male chromatin remodeling blocks the development of sea urchin embryos at the initial cell cycle // *J. Cell Biochem.* 2006. V. 98. № 2. P. 335–342.
- Rawe V.Y., Díaz E.S., Abdelmassih R. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans // *Hum Reprod.* 2008. V. 23. № 3. P. 573–580.
- Rousseaux J., Rousseaux-Prevost R. Molecular localization of free thiols in human sperm chromatin // *Biol. Reprod.* 1995. V. 52, N 5. P. 1066–1072.
- Shimada A., Kikuchi K., Noguchi J. et al. Protamine dissociation before decondensation of sperm nuclei during *in vitro* fertilization of pig oocytes // *J. Reprod. Fertil.* 2000. V. 120. № 2. P. 247–256.
- Sutovsky P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone // *Microscopy Res. and Techn.* 2003. V. 61. № 1. P. 88–102.
- Sutovsky P., Moreno R.D., Ramalho-Santos J. et al. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos // *Biol. Reprod.* 2000. V. 63. № 2. P. 582–90.
- Sutovsky P., Schatten G. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization // *Biol. Reprod.* 1997. V. 56. № 6. P. 1503–1512.

- Tschesche H., Macartney H.* A new principle of regulation of enzymic activity. Activation and regulation of human polymorphonuclear leukocyte collagenase via disulfide-thiol exchange as catalysed by the glutathione cycle in a peroxidase-coupled reaction to glucose metabolism // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 120. P. 183–190.
- Watt R., Voss E.* Characterization of affinity-labeled fluorescyl ligand to specifically-purified rabbit IgG antibodies // *Immunochem.* 1978. V. 15. P. 875–882.
- Wojcik C., Benchaib M., Lornage J. et al.* Proteasomes in human spermatozoa // *Int. J. Androl.* 2000. V. 23. № 3. P. 169–177.
- Yi Y.J., Manandhar G., Oko R.J. et al.* Mechanism of sperm-zona pellucida penetration during mammalian fertilization: 26S proteasome as a candidate egg coat lysin // *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007. V. 63. P. 385–408.
- Zheng X., Geiger M., Ecke S. et al.* Inhibition of acrosin by protein C inhibitor and localization of protein C inhibitor to spermatozoa // *Am. J. Physiol.* 1994. V. 267. № 2. P. 466–472.
- Ziemba H., Bialy L.P., Fracki S. et al.* Proteasome localization and ultrastructure of spermatozoa from patients with varicocele-immunoelectron microscopic study // *Folia Histochem. Cytobiol.* 2002. V. 40. № 2. P. 169–170.
- Zimmerman S., Sutovsky P.* The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization // *J. Reprod Immunol.* 2009. V. 83. № 1–2. P. 19–25.
- Zirkin B.R., Chang T.S., Heaps J.* Involvement of an acrosin-like proteinase in the sulfhydryl-induced degradation of rabbit sperm nuclear protamine // *J. Cell Biol.* 1980. V. 85. № 1. P. 116–121.

Study of Chromatin Decondensation Factors in Human Spermatozooids by Flow Cytometry

E. V. Semenova and M. V. Filatov

*Division of Molecular and Radiation Biophysics, Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute,
Russian Academy of Sciences, Gatchina, Leningrad oblast, Orlova Roshcha, 188300 Russia
e-mail: filatov@omrb.pnpi.spb.ru*

Abstract—To date, the mechanisms responsible for radical change of chromatin structure in male germ cells during fertilization are unclear. Evidence suggesting the existence of proteolytic nuclear enzymes in mature human spermatozooids are presented in this work. The possible role of these previously unknown proteases in decondensation of chromatin of spermatozooids in a fertilized ovum is discussed. Application of the flow cytometry technique has shown that treatment of human spermatozoid nuclei with SH-reagents leads not only to destruction of disulfide bonds between protamine molecules that is necessary for their effective utilization but also induces specific endogenous proteolytic activity that consequently results in rather fast decondensation of chromatin followed by proteolytic cleavage of nuclear proteins. A chromatin decondensation process can be almost totally blocked by serine protease inhibitors and components of seminal fluid. An original cytochemical approach of binding of fluorescently labeled protease inhibitor to the target of investigation has been used in order to visualize the localization of proteases in male germ cell nuclei. The results of our study suggest that one of the factors of chromatin reorganization involved in the formation of male pronucleus is endogenous nuclear protease of spermatozooids, which is activated by glutathione or other SH-components of ovum cytoplasm.

Keywords: protease inhibitors, fertilization, flow cytometry, human spermatozooids, endogenous nuclear proteases