

На правах рукописи

СТЕПАНОВА
Ирина Сергеевна

**ОРГАНИЗАЦИЯ И ДИНАМИКА ТЕЛЕЦ КАХАЛА
И КЛАСТЕРОВ ИНТЕРХРОМАТИНОВЫХ ГРАНУЛ
В ООЦИТАХ ДОМОВОГО СВЕРЧКА *ACHETA DOMESTICUS***

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2006

**Работа выполнена в Институте цитологии РАН,
Санкт-Петербург**

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Боголюбов Дмитрий Сергеевич
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор
Гагинская Елена Романовна
Биологический НИИ СПбГУ, Санкт-Петербург

доктор биологических наук,
профессор
Скопичев Валерий Григорьевич
Санкт-Петербургская государственная академия
ветеринарной медицины

Ведущая организация: ГУ НИИ Экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Защита состоится «16» февраля 2007 года в 13 час на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: Тихорецкий пр., д. 4, 194064, Санкт-Петербург. cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан «15» января 2007 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е. В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние годы достигнут значительный прогресс в понимании различных аспектов экспрессии генов, однако вопросы структурной организации молекулярно-биологических процессов в трехмерном пространстве ядра, участие в них различных экстрахромосомных ядерных образований, или доменов, остаются открытыми.

В этой связи актуальной проблемой представляется изучение внутриядерного распределения основных «участников» экспрессии генов, в том числе РНК-полимераз, включая РНК-полимеразу II (РНК-пол II), факторов транскрипции и процессинга разных типов РНК. Следует учитывать, что в настоящее время преобладают представления о том, что на регуляцию экспрессии генов и координацию составляющих ее многостадийных событий наряду с особенностями упаковки генетического материала в хроматине и расположения собственно хромосом в ядре существенное влияние оказывают экстрахромосомные домены нуклеоплазмы (Misteli and Spector, 1998; Cremer et al., 2004).

Часть таких доменов представлена в виде перихроматиновых фибрилл, являющихся морфологическим «выражением» первичных транскриптов мРНК (Fakan, 1994), а другая оформлена в виде различных ядерных телец (nuclear bodies) (Brasch and Ochs, 1992). Среди ядерных телец, очевидно, имеются универсальные для разных типов клеток структуры, а также такие, которые характеризуют лишь определенный тип клеток или существуют лишь в определенных физиологических условиях (Gall et al., 2004).

На роль наиболее универсальных ядерных телец, по современным представлениям, подходят кластеры интерхроматиновых гранул (КИГ) и тельца Кахала (ТК) (Gall et al., 2004). В настоящее время можно считать установленным, что ТК и КИГ участвуют в ядерном биогенезе малых ядерных (мя) РНК, однако морфодинамика этих структур, их функциональная взаимосвязь друг с другом и непосредственная роль в процессинге РНК остаются до конца не изученными (Cioce and Lamond, 2005).

Весьма перспективными модельными объектами для изучения доменной организации экстрахромосомной части ядра в настоящее время становятся ооциты в силу крупных размеров их ядер и внутриядерных структур, динамичности самого процесса оогенеза, что позволяет одновременно выделять различные стадии развития яйцеклетки – от активных до инертных. Особенную привлекательность подобного рода исследованиям придают сложные и разнообразные взаимоотношения половых и вспомогательных клеток в оогенезе, при которых ядро ооцита может быть активным, либо инактивироваться. В последнем случае ядерные синтетические функции принимают на себя питающие клетки.

Имеющиеся в литературе данные по организации экстрахромосомных ядерных доменов ооцитов насекомых и по локализации в них компонентов ТК и КИГ весьма ограничены и касаются в основном видов с мероистическими яичниками, характеризующимися инактивацией ядра ооцита (Bogolyubov and Parfenov, 2001; Biliński and Kloc, 2002; Żelazowska and Jaglarz, 2004; Batalova et al., 2005; Jaglarz et al., 2005). Кроме того, использование традиционных подходов по локализации маркерных компонентов ТК и КИГ в ооцитах насекомых привело к противоречивым результатам, что подчас затрудняет даже простую их идентификацию в связи с высокой гетерогенностью по размерам, количеству, ультраструктурной организации на разных стадиях оогенеза, а в ряде случаев – и по молекулярному составу.

Таким образом, в связи с отсутствием четких и адекватных критериев идентификации ТК и КИГ, противоречивыми данными по их молекулярному составу и преобладанием работ, выполненных на ядрах ооцитов в период их инактивации, представляется актуальным изучение организации, состава, динамики поведения и взаимоотношений друг с другом ТК и КИГ в активных ядрах ооцитов насекомых, характеризующихся паноистическими яичниками. В настоящей работе мы по существу впервые обращаемся к изучению ядерных доменов ооцитов таких насекомых на примере домового сверчка *Acheta domestica*.

Цель и задачи исследования. Основной целью данной работы являлась идентификация и анализ экстрахромосомных структур, содержащих компоненты транскрипции и процессинга РНК, в диплотенных ядрах ооцитов *Acheta domesticus*.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие экспериментальные задачи.

1. Охарактеризовать транскрипционный статус ядер ооцитов *A. domesticus* на стадии диплотены.
2. Описать экстрахромосомные структуры интерхроматиновой области ядер ооцитов этого вида.
3. Проанализировать внутриядерное распределение компонентов транскрипции, осуществляемой РНК-пол II (факторов, непосредственно входящих в состав голоэнзима РНК-пол II или функционально с ним связанных), а также факторов процессинга РНК.
4. Идентифицировать структуры, соответствующие КИГ. С целью усиления сравнительного подхода и поиска возможных общих принципов организации КИГ ооцитов выявить гомологичные структуры в ооцитах животных, обладающих другими типами оогенеза: *Sarcophaga sp.* и *Tenebrio molitor* (нутриментарный оогенез), а за пределами класса насекомых – у моллюска *Achatina fulica*, обладающего типичным солитарным оогенезом.
5. С помощью комплексного подхода идентифицировать ТК ооцитов *A. domesticus*, исследовать динамику их основных компонентов, оценить структурно-пространственные взаимоотношения ТК с КИГ, хромосомами и ядрышками.
6. Изучить поведение внутриядерных структур, содержащих факторы созревания РНК, в транскрипционно активных ядрах и при подавлении транскрипции с помощью ингибиторов.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. В ядрах ооцитов домового сверчка *A. domesticus* присутствуют ТК и КИГ – универсальные ядерные органеллы половых и соматических клеток, содержащие ведущие компоненты экспрессии генов.

2. ТК диплотенных ооцитов *A. domesticus* содержат маркерный белок – коилин, фактор процессинга пре-мРНК – фибрилларин, факторы сплайсинга пре-мРНК – мяРПП и белок SC35, компоненты РНК-пол II-транскрипции – базальный фактор транскрипции TFIID и белки-коактиваторы транскрипции СВР/p300, но не содержат РНК-пол II.

3. КИГ ооцитов насекомых различных систематических групп имеют сходную ультраструктурную организацию и молекулярный состав.

4. Подавление транскрипции с помощью ингибиторов с разными механизмами действия вызывает сходные эффекты: существенную сегрегацию ультраструктурных компонентов ТК и КИГ и увеличение количества КИГ в нуклеоплазме. Действие ингибиторов не приводит к перераспределению основных молекулярных компонентов ТК и к накоплению в ТК РНК-пол II, которая аккумулируется в фибриллярных областях КИГ.

Научная новизна работы. Впервые в транскрипционно активных ядрах ооцитов насекомых с помощью различных адекватных критериев идентифицированы ТК и КИГ и доказана их гомология соответствующим структурам ооцитов других животных и соматических клеток млекопитающих. Впервые представлены сведения об особенностях организации, состава ТК и КИГ и их связи на разных стадиях оогенеза в нормальных условиях и после подавления транскрипции с помощью ингибиторов. Впервые с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии выявлена колокализация ряда ведущих компонентов процессинга разных типов РНК в ТК и КИГ ооцитов насекомых.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты работы могут быть использованы для дальнейшего изучения структуры, функции и динамики ядерных структур, содержащих компоненты экспрессии генов; и способствуют углублению знаний о перераспределении факторов транскрипции и процессинга РНК на разных стадиях оогенеза. Полученные в работе данные создают базис для перспективного изучения

проблемы взаимосвязи различных ядерных доменов. Кроме этого, результаты работы используются в учебных спецкурсах, читаемых на кафедре биологии развития биолого-почвенного факультета СПбГУ, на факультете медицинской физики СПбГТУ, а также в учебно-методических пособиях для студентов.

Апробация работы. Основные положения работы были доложены и обсуждены на XIII, XIV и XV Всероссийских симпозиумах «Структура и функция клеточного ядра», (Санкт-Петербург, 1999, 2002, 2005), I Всероссийском съезде клеточных биологов (Санкт-Петербург, 2003), конгрессе ELSO (European Life Scientist Organization) (Ницца, Франция, 2004), XIV школе-конференции «Актуальные проблемы биологии развития и биотехнологии» (Звенигород, 2005), межинститутском семинаре «Современные конфокальные микроскопы фирмы Leica и их применение в биологии» (Санкт-Петербург, 2006), научных семинарах Лаборатории морфологии клетки Института цитологии РАН.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 03-04-49389, 04-04-48080, 06-04-48904) и Администрации Санкт-Петербурга.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 5 статей и 8 тезисов.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения экспериментальных данных, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 194 страницах машинописного текста и иллюстрирована 31 рисунком и 2 таблицами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Основным объектом исследования являлись нимфы и взрослые самки домового сверчка *Acheta domesticus* L. (Insecta, Orthoptera: Gryllidae). В качестве дополнительных объектов были использованы самки серой мясной мухи *Sarcophaga sp.* L. (Insecta, Diptera: Sarcophagidae) и скорпионницы *Panorpa communis* L. (Insecta, Mecoptera: Panorpidae), а также мучного хрущака *Tenebrio molitor* L. (Insecta, Coleoptera: Tenebrionidae), а помимо насекомых – особи гигантской африканской улитки *Achatina fulica* (Gastropoda, Stylommatophora: Helicidae).

Подготовка материала для флуоресцентной микроскопии. Гонады изолировали в растворе Рингера для насекомых (0.75 % NaCl; 0.035 % KCl; 0.021 % CaCl₂) или в физиологической среде OR2 (Wallace et al., 1973). Для флуоресцентного окрашивания использовали давленные препараты, приготовленные по методике Хулсебоса с соавторами (Hulsebos et al., 1984).

Антитела и иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов. Препараты инкубировали в течение 10 мин в 10 %-ном растворе фетальной сыворотки, приготовленной на PBS, а затем – в растворе соответствующих первых антител (Таблица) в течение ночи во влажных камерах при 4 °С, после чего инкубировали в растворе вторых антител в течение 1.5 ч при комнатной температуре. В качестве вторых антител использовали антитела, конъюгированные с флуорохромами FITC или Alexa 594 при разведении 1:200.

При проведении двойного иммунофлуоресцентного окрашивания препараты инкубировали в смеси соответствующих антител (Smarco et al., 1999). После обработки антителами препараты заключали или в 50 %-ный раствор глицерина на PBS, содержащий 1 мг/мл парафенилендиамина, с добавлением DAPI (1 мкг/мл) или йодистого пропидия (2.5 мкг/мл), или в среду Vectashield[®], предварительно окрашивая в течение 2-3 мин с помощью ДНК-специфичного флуорохрома To-Pro-3 (1 мкг/мл).

Использованные в работе антитела

Таблица.

	Антитела	Выявляемый антиген	Разведение/концентрация	Источник
Мышь Моноклональные антитела	C-30	Двухцепочечная ДНК	1:20	Chemicon International, USA
	8WG16	Нефосфорилированный СТД РНК-пол II	1:200	Thompson et al., 1989 Santa Cruz, USA
	ARNA3	Эпитоп вне СТД РНК-пол II	5 мкг/мл	Krämer et al., 1980
	Y12	Sm-эпитоп мяРНК	1:1	Lerner et al., 1981
	K121	Триметилгуанозиновый кэп мяРНК	1 мкг/мл	Krainer, 1988
	α SC35	SR-белок SC35	5 мкг/мл	Fu and Maniatis, 1990
	Кролик Поликлональные антитела	α RNAP	Гиперфосфорилированный СТД РНК-пол II	1:800
R288		С-концевой фрагмент молекулы коилина р80.	1:200	Andrade et al., 1991
SI-1		Базальный фактор транскрипции TFIID	1:50	Santa Cruz, USA
N-15		Н-конец белка коактиватора транскрипции р300	1:50	Santa Cruz, USA
C-20		С-конец коактиватора транскрипции CBP	1:50	Santa Cruz, USA

Микроинъекции U7 мяРНК. В ооциты инъекцировали меченную флуоресцеином U7 мяРНК шпорцевой лягушки (Wu et al., 1996). В качестве контроля использовали меченую РНК, не гомологичную ни одной из известных клеточных РНК (обе конструкции предоставлены проф. Дж. Голлом). Инъекции проводили с помощью микроинъектора Eppendorf 5242. После микроинъекций овариолы инкубировали в среде Грейса для насекомых в течение 12 ч во влажных камерах при комнатной температуре. Затем готовили давленные препараты овариол, которые докрашивали в течение 2 мин в растворе To-Pro-3, заключали в среду Vectashield и анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL.

Микроинъекции 5-бромουридин-5'-трифосфата (бromo-УТФ). Для инъекций использовали раствор 100 мМ бромo-УТФ (Sigma), приготовленный на инъекционном буфере (140 мМ KCl, 2 мМ PIPES, pH 7.4) (Wansink et al., 1994). После инъекций овариолы инкубировали в среде Грейса в течение 0.5-2 ч во влажных камерах при комнатной температуре. Затем готовили давленные препараты овариол, которые обрабатывали моноклональными антителами к бромодезоксиуридину (Sigma) при разведении 1:500 – 1:1000, затем FITC-конъюгированными вторыми антителами (1: 200) и докрашивали To-Pro-3. В качестве контроля использовали препараты не инъекцированных ооцитов, окрашенные с помощью антител к бромодезоксиуридину.

Обработка актиномицином D. Изолированные ооциты *A. fulica* инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в среде OR2, содержащей 5 мкг/мл актиномицина D. Овариолы *A. domesticus* инкубировали в течение ночи при комнатной температуре в среде Грейса, содержащей 100 мкг/мл актиномицина D. Концентрация ингибитора была выбрана так, чтобы заблокировать транскрипцию, осуществляемую всеми тремя РНК-полимеразами (Perry and Kelley, 1970), а также с учетом видовых особенностей объектов (Методы биологии развития, 1974). Время инкубации подбирали экспериментальным путем. Контрольные препараты инкубировали в тех же условиях, но без добавления ингибитора в среду.

Обработка DRB. Овариолы *A. domesticus* инкубировали при комнатной температуре в среде Грейса, содержащей 500 мкМ DRB (Morgan et al., 2000). Время инкубации подбирали экспериментальным путем.

Флуоресцентная и конфокальная микроскопия. Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SL (Heidelberg, Germany), с использованием аргонового (488 нм) и гелий-неоновых (543 нм и 633 нм) лазеров. Для предотвращения возможного перекрытия спектров флуоресценции красителей при анализе препаратов с тройной обработкой использовали последовательное сканирование кадров по каждому каналу, предварительно осуществляя корректировку спектральных каналов, а затем совмещали полученные изображения.

Микроскопия по Номарскому и выявление ДНК в нефиксированных ядрах. Нефиксированные овариолы или изолированные ядра помещали в каплю физиологического раствора (около 5 мкл), содержащего 1 мкг/мл DAPI, и просматривали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM IRB, оснащенного оптикой по Номарскому. Настройку дифференциального интерференционного контраста проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Изображения записывали с помощью цифровой камеры Leica DFC 320.

Стандартная электронная микроскопия. Гонады фиксировали в 2.5%-ном растворе глутаральдегида, приготовленном на 0.05 М какодилатном буферном растворе (pH 7.4) в течение ночи при 4 °С, отмывали в нескольких сменах какодилатного буфера, после чего дофиксировали в 4 %-ном растворе OsO₄, приготовленном на том же буфере, в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Образцы заключали в смолу Эпон-812. Полутонкие срезы толщиной 1-1.5 мкм окрашивали в смеси 1 %-ного раствора метиленового синего и 1 %-ного раствора буры при нагревании. Ультратонкие срезы контрастировали в насыщенном спиртовом растворе уранилацетата и затем цитратом свинца, после чего просматривали в электронном микроскопе JEM 7A при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Иммуноэлектронная микроскопия. Материал фиксировали в растворе, содержащем 4 % параформальдегида и 0.5 % глутаральдегида на PBS, в течение 2 ч при комнатной температуре, после чего дофиксировали в 2 %-ном растворе параформальдегида на PBS в течение ночи, отмывали в течение 10 мин в PBS, содержащем 0.05 М NH₄Cl, и заключали в смолу LR White. Для предотвращения неспецифического связывания антител ультратонкие срезы инкубировали в PBS, содержащем 0.5 % желатина, 0.05 % Tween 20 (pH 7,4) в течение 10 мин, после чего – в растворе первых антител (Таблица) во влажных камерах в течение ночи при 4 °С. Сетки отмывали в PBS, содержащем 0.1 % желатина, 0.05 % Tween 20 (pH 7,4), и инкубировали 1.5 ч при комнатной температуре в растворе вторых антител, в качестве которых использовали козы антигена против иммуноглобулинов мыши при разведении 1:10 или иммуноглобулинов кролика при разведении 1:20, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром частиц 10 или 15 нм соответственно (BBInternational). Срезы контрастировали в насыщенном спиртовом растворе уранилацетата. В случае двойного мечения сетки последовательно инкубировали в течение 2 ч в растворе соответствующих первых антител, а затем в течение 1.5 ч в смеси растворов вторых антител при комнатной температуре.

Электрофоретическое разделение белков и иммуноблоттинг. Выделенные вручную ядра ооцитов *A. domesticus*, *T. molitor* (около 100 ядер на дорожку) или гомогенизированные овариолы *P. communis* и *Sarcophaga* помещали в буфер, содержащий 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10 % глицерина, 2 % SDS, 5 % 2-меркаптоэтанола (Laemmli, 1970). Белковые экстракты разделяли в 10 %-ном ПААГ в присутствии SDS, используя установку Mini-PROTEIN® II (BIO-RAD), и переносили на нитроцеллюлозную мембрану, которую инкубировали в 5 %-ном растворе BSA на PBS, содержащем 0.1 % Tween-20 (PBST) в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем – в растворе антител R288 (1:5000) в течение ночи при 4 °С. После отмывки в PBST мембрану на 2 ч помещали в раствор вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1:10000, при комнатной температуре. Белки выявляли методом усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Строение овоариол домового сверчка. Морфодинамика ядерных структур диплотенных ооцитов *Acheta domesticus*. Парные женские гонады домового сверчка *Acheta domesticus* состоят примерно из 100-120 яйцевых трубок паноистического типа. Длительная стадия диплотены, соответствующая периоду большого роста ооцитов, была нами разделена на три последовательные стадии по состоянию хромосомно-ядрышкового аппарата, а также количеству и внутренней организации телец Кахала (ТК) (Степанова и др., 2007).

В ядрах ооцитов I стадии присутствуют 1-2 нуклеолярные массы, образованные множеством мелких амплифицированных ядрышек, расположенных вокруг так называемого большого хромомера, представляющего собой результат амплификации рДНК 6-й хромосомы; хромосомы равномерно распределены по ядру. Кроме ядрышек в ооцитах I стадии присутствуют несколько различающихся по размеру структур правильной сферической формы, представляющих собой ТК (см. ниже).

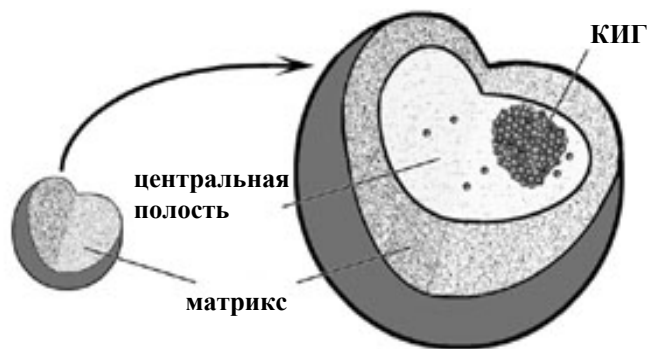


Рис. 1. Схема организации и морфодинамики ТК в ядрах ооцитов *A. domesticus*. КИГ – «внутренний» кластер интерхроматиновых гранул.

В ядрах ооцитов II стадии хромосомы по-прежнему распределены по всему объему ядра, в котором все еще различим хромомер, значительно уменьшающийся в размерах этой стадии. Нуклеолярные массы фрагментируются, а ядрышки неравномерно распределяются по нуклеоплазме. Количество ТК в ядре уменьшается, и к концу II стадии обнаруживается, как правило, единственное ТК. На данной стадии ТК могут иметь как однородную организацию, подобно

таковой на I стадии, так и усложненную внутреннюю структуру (рис. 1).

На III стадии хромосомы имеют вид ламповых щеток и по-прежнему распределены по всему ядру. Хромомер более не обнаруживается. В ядрах всегда присутствует лишь одиночное крупное ТК (до 30 мкм в диаметре), которое всегда имеет сложную внутреннюю организацию (рис. 1; 2, а).

Оценка транскрипционной активности хромосом ооцитов *A. domesticus* с помощью микроинъекций бромо-УТФ. В ядрах ооцитов всех трех стадий выявлено включение бромо-УТФ, что свидетельствует о сохранении ими синтетической активности. Сигнал выявлялся дискретно, в виде небольших флуоресцирующих пятен.

Ультраструктурная организация телец Кахала в ооцитах домового сверчка. На ультраструктурном уровне ТК ооцитов домового сверчка, находящихся на I и в начале II стадии, выглядят однородными образованиями, состоящими из плотно упакованных тонких (примерно 5 нм) фибрилл. «Сложное» ТК ооцитов III стадии включает три области: а) тонкофибрилярный матрикс, состоящий из плотно упакованных фибрилл толщиной около 5 нм; б) центральную полость (ЦП), внутри которой обнаруживаются отдельные гранулы (диаметром около 40 нм); в) фиброгранулярное тельце, эксцентрично расположенное внутри ЦП, – «внутренний» КИГ, который состоит из гранулярного материала (гранулы диаметром 35-45 нм), ассоциированного с участками, образованными тонкими (порядка 5 нм), очень плотно упакованными фибриллами (рис. 2, б) «внутреннего» КИГ неровная, возможно, из-за постоянного присоединения-отсоединения от его поверхности гранул, обнаруживаемых в ЦП (Stepanova et al., 2007).

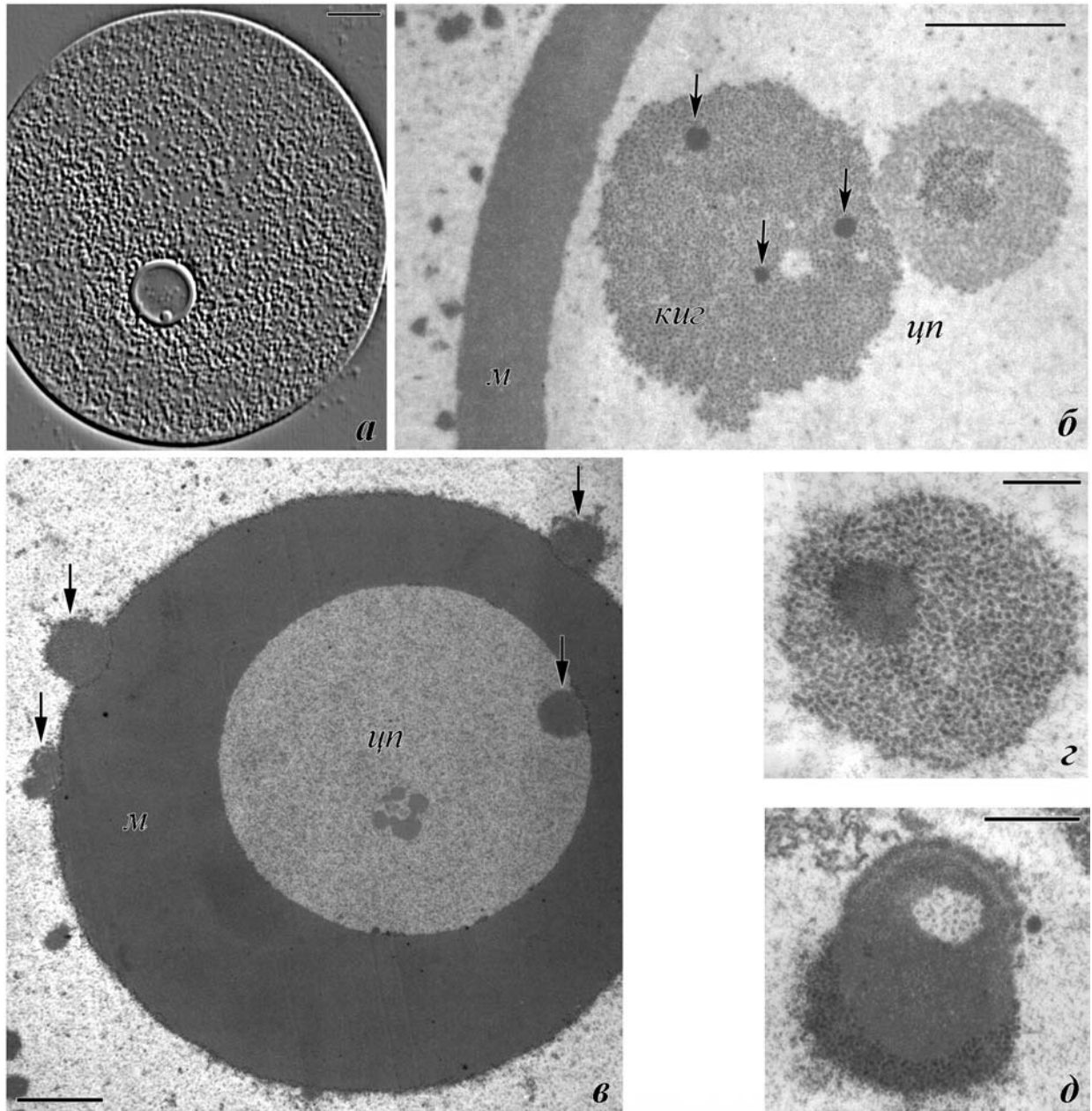


Рис. 2. Ядерные структуры диплотиенных ооцитов домового сверчка *Acheta domesticus* в норме (*а, б, з*) и после обработки овариол с помощью ингибитора транскрипции DRB (*в, д*).

а – изолированное ядро диплотиенного ооцита III стадии. Оптика по Номарскому. *тк* – тельца Кахала.

б – ультратонкий срез фрагмента «сложного» ТК. В центральной полости (*цп*) расположен кластер интерхроматиновых гранул (*киг*), в состав которого входят фибриллярные зоны (*стрелки*). *м* – матрикс ТК.

в – Тельце Кахала вителлогенных ооцитов *A. domesticus* после инкубации овариол в среде с DRB. На периферии его видны многочисленные КИГ (*стрелки*). *м* – матрикс ТК; *цп* – центральная полость.

з – ультраструктурная организация кластеров интерхроматиновых гранул ядер диплотиенных ооцитов сверчка в норме.

д – кластеры интерхроматиновых гранул (*киг*) в нуклеоплазме ядер ооцитов домового сверчка, после инкубации овариол в среде с DRB.

Масштабные линейки – 20 мкм (*а*); 1 мкм (*б, в, д*); 0,5 мкм (*з*).

Идентификация и молекулярный состав ТК в ооцитах домового сверчка. Для окончательного решения вопроса о гомологии ТК ооцитов сверчка соответствующим структурам других клеток мы предприняли их комплексное изучение, нацеленное на их идентификацию и описание молекулярного состава.

В качестве одного из маркеров ТК был использован белок коилин.

Вестерн-блот анализ белков ядер ооцитов *A. domesticus* с антителами к р80-коилину человека выявил единственную полосу специфического окрашивания, соответствующую белку с молекулярной массой примерно 38 кДа (рис. 3, I) (Stepanova et al., 2007), что значительно меньше массы р80-коилина млекопитающих, которая составляет 80 кДа (Andrade et al., 1991).

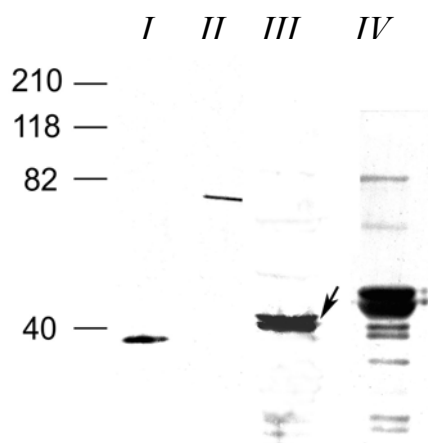


Рис. 3. Иммуноблот содержимого выделенных ядер ооцитов (I, II) и лизатов овариол (III, IV) после обработки антителами R288 к коилину.

Иммуноблотинг белков овариол *P. communis* показал, что данные антитела связывают белок массой около 43 кДа; при этом на мембране выявляются две близко расположенные полосы (рис. 3, III, стрелка), которые, по-видимому, соответствуют нефосфорилированной и фосфорилированной формам коилина в случае использования гомогенатов целых овариол, содержащих разнородный клеточный материал. В ядерных экстрактах *T. molitor* антитела к коилину связываются с белком молекулярной массой около 70 кДа (рис. 3, II), что соответствует ранее полученным данным (Bogolyubov and Parfenov, 2001). Что касается экстракта белков овариол *Sarcophaga*, то четкой специфической реакции выявлено не было (рис. 3, IV).

При непрямом иммунофлуоресцентном окрашивании давленных препаратов овариол домового сверчка с помощью сыворотки R288 к коилину обнаружено, что только ТК окрашиваются с помощью этих антител. В случае ТК со сложной организацией метка выявлялась только в фибриллярном матриксе.

Однако использование антител к коилину в иммуноцитохимических опытах, очевидно, не может служить единственным подходом для идентификации этих структур на всех объектах. Так, мы получили отрицательные результаты при попытке электронного иммуномечения с помощью антител R288 ядерных структур *Sarcophaga* и *A. fulica*.

Идентификация телец Кахала с помощью микроинъекций U7 мяРНК. В опытах по микроинъекциям в ооциты *Acheta* флуоресцентно меченной U7 мяРНК оказалось, что через 12 ч после инъекции специфическое накопление сигнала происходит именно в ТК, а в случае сложных ТК – исключительно в их матриксе. Проведенные опыты окончательно подтвердили, что данная структура ооцитов домового сверчка представляет собой ТК.

Иммунологическая характеристика ТК ооцитов сверчка с помощью антител к факторам транскрипции, сплайсинга пре-мРНК и процессинга пре-рРНК.

Фибрилларин – мажорный компонент ТК ооцитов домового сверчка. В опытах по иммунофлуоресцентному окрашиванию ядер при помощи антител к фибрилларину – белку плотного фибриллярного компонента ядрышек – наблюдалось свечение как многочисленных ядрышек, так и матрикса ТК. В опытах по двойному иммуномечению была выявлена колокализация коилина и фибрилларина в матриксе ТК (рис. 4, I a).

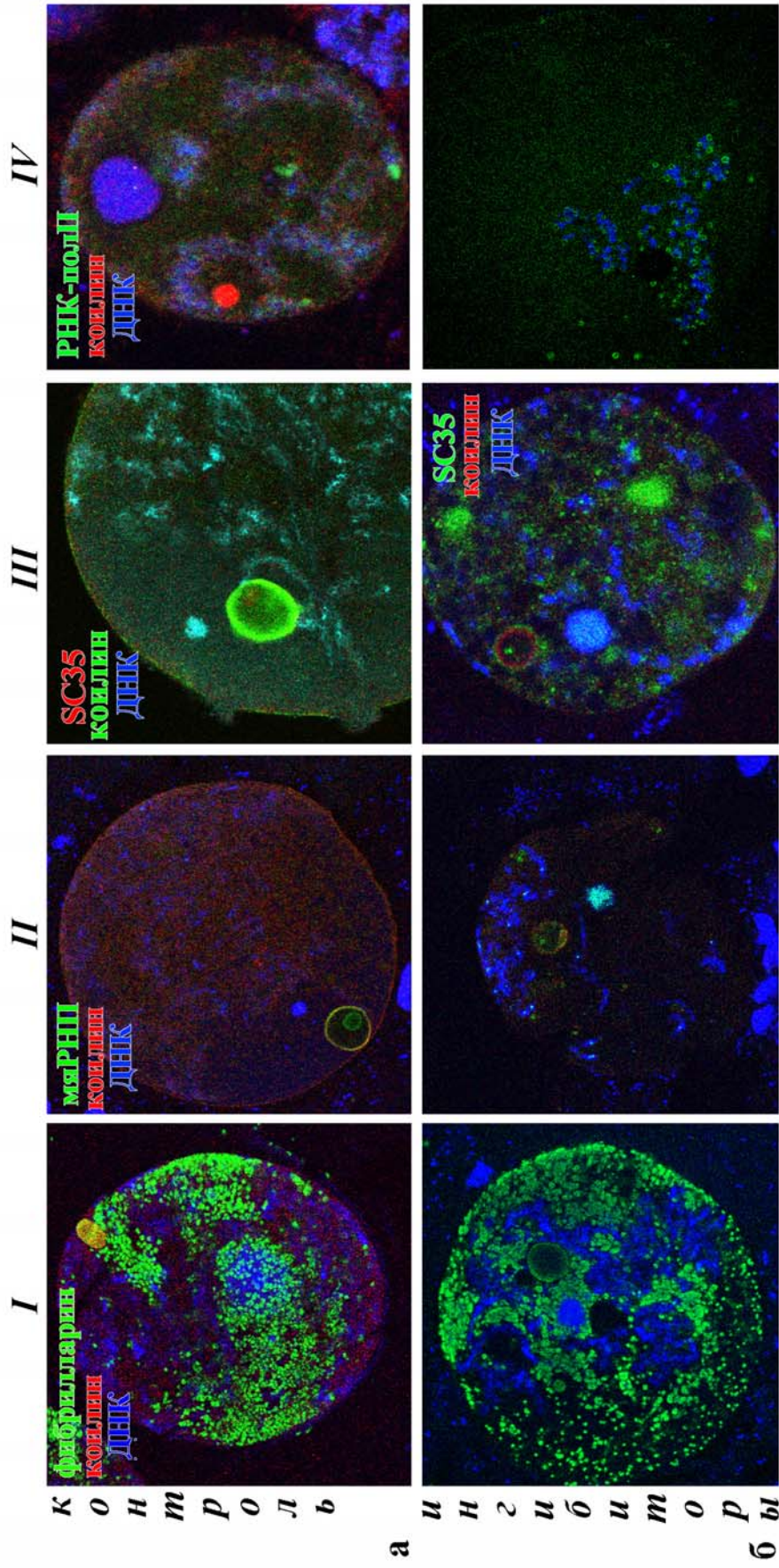


Рис. 4. Ядра диплогенных ооцитов *Achetia domestica* в норме (а) и после инкубации овариол в среде с ингибиторами (б). Каждая иллюстрация представляет собой совмещение конфокальных изображений одного и того же ядра после обработки соответствующими антителами и окраски ДНК с помощью красителя То-Рго-3.

Распределение факторов сплайсинга (мяРНП и SR-белка SC35) в составе сложных ТК ооцитов домового сверчка. Использование антител к Sm-эпитопу мяРНП и триметилгуанозинового (ТМГ) кэпу мяРНК выявило интенсивное окрашивание ТК, а в случае сложноорганизованных ТК – как матрикса ТК, так и внутреннего КИГ. При двойном окрашивании препаратов антителами против мяРНП и коилина наблюдалась колокализация флуоресцентных сигналов только в матриксе ТК (рис. 4, II, a). На ультраструктурном уровне при использовании антител к Sm-эпитопу мяРНП и ТМГ-кэпу мяРНК было выявлено интенсивное равномерное включение метки в матрикс ТК.

В ядрах ооцитов I и II стадий однородные по структуре ТК не реагируют с антителами против белкового фактора сплайсинга SC35, что подтверждает более ранние наблюдения других авторов (Gall et al., 1995). На более поздних стадиях (поздняя II и III стадии) с помощью конфокальной микроскопии после обработки препаратов антителами к белку SC35 была обнаружена не только флуоресценция внутреннего КИГ, но и слабое, но тем не менее различимое свечение матрикса сложных ТК (рис. 4, III, a). Эти данные нашли подтверждение в ходе наших экспериментов по двойному иммуномечению ультратонких срезов, в ходе которых выявлена колокализация белка SC35 и коилина в матриксе ТК.

ТК ооцитов домового сверчка содержат коактиваторы транскрипции СВР/p300 и базальный фактор транскрипции TFIID, но не содержат РНК-пол II. Анализ ультратонких срезов ТК после обработки их с помощью антител к белкам-коактиваторам транскрипции СВР/p300 и к белку ТВР – ТАТА-связывающему компоненту базального фактора транскрипции TFIID – выявил равномерное и весьма интенсивное мечение матрикса ТК. Материал, расположенный в ЦП, включая внутренний КИГ, практически не метился с помощью этих антител.

Для выявления РНК-пол II были использованы антитела к двум ее формам – фосфорилированной и нефосфорилированной по С-концевому домену (СТД) большой субъединицы, а также антитела к эпитопу СТД вне сайтов фосфорилирования. В этих опытах все эти антитела не реагировали с матриксом ТК (рис. 4, IV, a).

Идентификация и ультраструктурная организация КИГ в ооцитах насекомых. Для идентификации КИГ были использованы два критерия: высокая концентрация в них факторов сплайсинга, особенно белка SC35, и присутствие в их составе гранулярного материала – интерхроматиновых гранул. По этим признакам среди экстрахромосомных структур ооцитов *A. domesticus* идентифицированы КИГ, лежащие свободно в нуклеоплазме (до 5 на ядро), и «внутренний» КИГ, расположенный в центральной полости ТК. Все эти структуры – фиброгранулярные образования размером 0.5-3 мкм, состоящие из гранулярного материала (диаметр гранул 35-45 нм), включающие хорошо выраженные фибриллярные области (толщина фибрилл около 5 нм), а также участки, образованные слабо оформленными гранулами, заключенными в тонкофибриллярный матрикс (рис. 2, z). При использовании антител к ТМГ-кэпу мяРНК и белку SC35 в ядрах ооцитов было обнаружено интенсивное связывание этих антител с КИГ, преимущественно с гранулярным материалом.

В ооцитах некоторых других насекомых, имеющих по сравнению с *A. domesticus* гонады иного типа, КИГ по составу и ультраструктурной организации оказались сходными.

В диплолетних ядрах ооцитов мясной мухи *Sarcophaga* в состав КИГ, имеющих размеры от 0.5 до 5 мкм, входят обособленные фибриллярные и гранулярные (диаметр гранул около 20-40 нм) зоны. После обработки ультратонких срезов антителами к белку SC35, а также к Sm-эпитопу мяРНП и ТМГ-кэпу мяРНК было выявлено интенсивное включение метки в гранулярный материал КИГ. Кроме того, было выявлено включение метки в фибриллярные области КИГ после обработки срезов антителами к РНК-пол II.

В ядрах вителлогенных ооцитов *T. molitor* обнаруживаются относительно мелкие (в среднем около 2 мкм) КИГ. На ультраструктурном уровне они также имеют

фиброгранулярную организацию. В их составе можно обнаружить как гранулы 30-40 нм в диаметре, так и фибриллы около 10 нм толщиной. В большинстве случаев в состав КИГ входит материал обоих типов. В одних случаях материал разного типа может занимать довольно обособленные области, а в других – располагаться в составе телец вперемешку. При анализе ультратонких срезов, обработанных антителами к белку SC35, было выявлено интенсивное мечение гранулярного материала в составе КИГ.

За пределами класса насекомых – у моллюска *Achatina fulica*, обладающего типичным солитарным оогенезом, – в нуклеоплазме ооцитов обнаружены единичные структуры, имеющие сложную морфологическую организацию (Степанова и Боголюбов, 2003). На периферии их центрального фибриллярного матрикса расположена область, образованная крупными (диаметром около 55-60 нм) гранулами и тонкими фибриллами. Гранулярный материал при этом интенсивно метится антителами к белку SC35. Мы считаем, что он представляет собой интерхроматиновые гранулы.

Морфологические эффекты действия DRB и актиномицина D на ядерные структуры ооцитов домового сверчка. В экспериментах по искусственному подавлению транскрипции нами были использованы два ингибитора транскрипции: актиномицин D и DRB. Несмотря на разный механизм их действия, морфологические изменения ядер оказались во многом сходными.

На светооптическом уровне четко выраженные изменения организации ядер были отмечены через 6 ч инкубации овариол в среде с ингибиторами. На ультратонких срезах ядер ооцитов, обработанных ингибиторами транскрипции, отчетливо выявляли участки конденсированного хроматина и ядрышки, лишенные гранулярного компонента. В связи с хромосомами обнаружены мелкие (около 0.5-1 мкм) КИГ. Кроме того, многочисленные КИГ были выявлены и в нуклеоплазме вне связи с хромосомами, причем их количество по сравнению с контролем увеличилось в несколько раз. Появившиеся после обработки ингибиторами КИГ разнообразны по морфологической организации. В состав отдельных КИГ может входить только гранулярный материал, в состав других – и гранулярный, и фибриллярный материал с разной плотностью упаковки фибрилл (рис. 2, д). При этом в КИГ происходит еще большая, по-сравнению с нормой, сегрегация фибриллярного и гранулярного материала.

Отмечены значительные изменения организации не только КИГ, но и ТК ооцитов сверчка после обработки овариол их ингибиторами транскрипции. На серийных ультратонких срезах на периферии ТК обнаружено появление сплошного слоя гранул диаметром около 35-45 нм, что соответствует размеру гранул в КИГ, а также выявлены образования, по организации сходные со «свободными» КИГ (рис. 2, б). В случае сложных ТК на поверхности матрикса, обращенной к центральной полости, также появляются гранулярные области. Внутри центральной полости значительно увеличивается объем, занимаемый внутренним КИГ, который лежит в непосредственном контакте с матриксом ТК. В состав внутреннего КИГ, как и в норме, входят четко сегрегированные зоны, образованные гранулярным и фибриллярным материалом. Однако после обработки ооцитов ингибиторами наблюдается существенное увеличение фибриллярных зон.

Иммуноцитохимическая характеристика ядерных структур (ТК и КИГ) ооцитов домового сверчка при действии ингибиторов транскрипции. На давленных препаратах ядер ооцитов, обработанных ингибиторами транскрипции, после окраски То-Про-3 отчетливо выявляется конденсация хромосом, имеющая место при подавлении транскрипции; при этом происходит ретракция боковых петель ламповых щеток. Обработка ооцитов как актиномицином D, так и DRB, не влияла на распределение в ядре коилина: как и в норме, антитела к коилину неизменно связывались только с матриксом ТК; так же не изменился характер окрашивания ядерных структур и с помощью антител к фибрилларину. Как и в норме, с помощью этих антител интенсивно метились многочисленные ядрышки и ТК (рис. 4, I, б).

При окрашивании препаратов с помощью антител к ТМГ-кэпу мяРНК, также как и в норме, обнаружено свечение ТК, но по сравнению с контролем, увеличилось количество светящихся доменов в нуклеоплазме (рис. 4, II, б), которые на ультраструктурном уровне соответствуют интенсивно включающим метку КИГ; причем в этом случае метка выявлялась исключительно в гранулярном материале, а фибриллярные зоны КИГ оставались немечеными.

Появление многочисленных, различающихся по размеру светящихся доменов наблюдали в нуклеоплазме и после окрашивания ядер с использованием антител к белку SC35. В данном случае часть таких образований находилась в непосредственном контакте с ТК. При анализе оптических срезов сложного ТК было обнаружено свечение вокруг внешней границы матрикса и вдоль границы центральной полости. При двойном иммуномечении препаратов с использованием антител к SC35 и коилину значительной колокализации этих белков в матриксе ТК обнаружено не было. Внутри центральной полости наблюдали флуоресценцию области, соответствующей внутреннему КИГ (рис. 4, III, б). На ультратонких срезах, обработанных антителами против белка SC35, на периферии ТК выявлено интенсивное включение метки в гранулярный слой на периферии ТК. Матрикс ТК ооцитов, обработанных ингибиторами, с помощью этих антител не метился. Гранулярный материал в составе КИГ, появившихся в нуклеоплазме при действии DRB и актиномицина D, интенсивно метится с помощью антител к белку SC35.

При иммунофлуоресцентном окрашивании ядер с помощью антител к РНК-пол II не удалось выявить сколько-нибудь заметных ее количеств в ТК как на контрольных препаратах, так и на препаратах ядер ооцитов, обработанных актиномицином D и DRB. В то же время наблюдали появление мелких светящихся доменов (рис. 4, IV, б), которые на ультраструктурном уровне, вероятно, соответствуют фибриллярным зонам КИГ, метящимся с помощью антител к РНК-пол II.

Иммуноэлектронная микроскопия не выявила изменений по сравнению с контролем в характере мечения ТК ооцитов, обработанных актиномицином D, при использовании антител к белкам CBP/p300. При этом отмечалось накопление этих белков в КИГ.

ОБСУЖДЕНИЕ

О транскрипционной активности хромосом при автотрофном типе оогенеза. В гонадах *Acheta domesticus*, относящихся к паноистическому типу, отсутствуют питающие клетки, и следует ожидать, что потребность растущей яйцеклетки в разных типах РНК обеспечивается ядром самого ооцита. Полученные нами результаты вполне соответствуют данному предположению. Действительно, мы никогда не наблюдали конденсации хромосом на стадии диплотены и их объединения в кариосферу, как это происходит в оогенезе многих животных и служит признаком определенной инактивации хромосомного аппарата (Gruzova and Parfenov, 1993).

В настоящей работе с помощью микроинъекций в ооплазму бром-УТФ нам удалось выявить синтетическую активность ядер ооцитов *A. domesticus*. Интенсивность включения предшественника была примерно одинакова на всех стадиях роста (ядра ооцитов I, II и III стадий по нашей классификации), хотя и не очень высока.

Экстрахромосомные ядерные структуры ооцитов насекомых с паноистическими яичниками. Сведения о составе ядерных телец ооцитов таких насекомых до недавнего времени ограничивались светооптическими данными (Gall et al., 1995).

В настоящей работе нам удалось показать ультраструктурную организацию ТК ооцитов сверчка и проследить их динамику в ходе стадии диплотены. Было обнаружено, что по мере роста ооцита ТК приобретают сложную внутреннюю организацию и включают три области: тонкофибрилярный матрикс, центральную полость и «внутренний» КИГ. Причем если на II стадии можно найти ТК обоих типов, то на III стадии ядра всех исследованных ооцитов содержали только «сложные» ТК.

Природа внутреннего КИГ была установлена не только по присутствию в его составе гранулярного материала, но и на основании связывания с этим материалом антител к

мяРНП и SR-белку SC35 – ведущим компонентам КИГ (Mintz et al., 1999; Lamond and Spector, 2003).

Присутствие же в ядре ооцитов как свободных КИГ, так и ассоциированных с ТК, хорошо известно на примере ооцитов амфибий (Wu et al., 1991; Gall et al., 1995, 2004). Исследуя организацию и состав различных компонентов сложных ТК ооцитов домового сверчка, в настоящей работе мы впервые документировали факт присутствия в их составе фактора сплайсинга SC35, что придает данным по составу ТК ооцитов и соматических клеток противоречивый характер, поскольку белок SC35 – характерный компонент другого ядерного домена, КИГ.

Проблема идентификации экстрахромосомных ядерных структур в ооцитах. В настоящее время не существует единого критерия для идентификации отличных от ядрышек ядерных органелл (например, ТК или КИГ).

Очевидно, что для этого совершенно не достаточен морфологический критерий, поскольку морфологические особенности экстрахромосомных доменов ооцитов насекомых не только видоспецифичны, но и отличаются довольно широкой изменчивостью в пределах одного вида (Gruzova and Parfenov, 1993).

В настоящее время для идентификации ядерных доменов стал уже традиционным иммунофлуоресцентный подход, хотя и он не является самодостаточным, поскольку обнаруживаемые в той или иной ядерной органелле компоненты присутствуют и в других ядерных компартментах. Тем не менее, в ряде случаев для идентификации ядерных структур удастся использовать антитела к определенным «маркерным» компонентам, которые в довольно высокой концентрации локализуются в структуре конкретного типа.

Поскольку экстрахромосомные ядерные структуры ооцитов, как правило, имеют отличную от соматических клеток морфологическую организацию, более объективным, на наш взгляд, является выявление в интересующей структуре комплекса факторов, характерных для конкретной органеллы, в том числе ТК и КИГ. Наиболее адекватными маркерами КИГ, на наш взгляд, являются SR-белок SC35 и мяРНП, а маркером ТК – мяРНП (прежде всего U7 мяРНП) и коилин.

Коилин как маркерный компонент телец Кахала. В настоящее время коилин является наиболее распространенным молекулярным маркером ТК в клетках различного происхождения, хотя он не является консервативным белком.

Однако в нашей работе мы обнаружили специфическую реакцию данных антител с ТК ооцитов сверчка, что позволило использовать их в опытах по двойному иммуномечению данной структуры и подтвердило полученные ранее данные других авторов (Gall et al., 1995). Специфичность работы данных антител на материале ооцитов насекомых была проверена с помощью Вестерн-блоттинга, который выявил полосы специфического окрашивания при использовании белковых экстрактов ядер ооцитов или овариол *Acheta*, *Tenebrio* и *Panorpa*. Исключение составили экстракты овариол *Sarcophaga*. Молекулярный вес выявляемых белков в значительной степени отличался у насекомых разных видов. Так, в ядерных экстрактах ооцитов *A. domesticus* и *T. molitor* молекулярная масса белка оказалась равной примерно 38 кДа и 70 кДа соответственно, а в экстракте белков овариол *P. communis* – около 43 кДа. Во всех случаях масса выявляемого белка отличалась от молекулярной массы коилина (80 кДа) человека и шпорцевой лягушки (Andrade et al., 1991; Tuma et al., 1993).

В настоящее время полученных нами данных не достаточно для объяснения различий в молекулярной массе белков, выявляемых на блотах материала овариол и ооцитов разных насекомых с помощью антител к коилину. Мы можем лишь предположить, что этот факт связан с разницей в длине вариабильного срединного участка молекулы коилина у разных видов при наличии консервативного С-концевого домена молекулы, с которым реагируют антитела R288 (Andrade et al., 1991).

Требуют дополнительного изучения наши данные об отсутствии специфического связывания антител против коилина и других компонентов ТК с какими-либо ядерными

тельцами в ооцитах *Sarcophaga*. Отметим, что морфологическая организация ядра ооцитов *Sarcophaga*, по нашим наблюдениям, оказывается весьма похожей на таковую *Drosophila* (Liu et al., 2006b), принадлежащей к тому же отряду Diptera, а в геноме *D. melanogaster* пока не найдено последовательности, гомологичной коилину человека (Liu et al., 2006a).

U7 мяРНК и тельца Кахала. Помимо присутствия коилина другим адекватным критерием идентификации ТК, на наш взгляд, является связывание с ними U7 мяРНК. Известно, что U7 мяРНК входит в состав ТК соматических клеток млекопитающих (Frey and Matera, 1995) и ооцитов *X. laevis*, в которых основная ее часть (до 85 %) локализуется именно в ТК (Wu and Gall, 1993). Проведенные недавно специальные эксперименты убедительно доказали, что при инъекции в ооплазму ооцитов *X. laevis* флуоресцентно меченной U7 мяРНК она ассоциирует с Sm-белками, образуя стабильные U7 мяРНП-комплексы, которые затем импортируются в ядро и концентрируются в ТК точно так же, как и эндогенные U7 мяРНП (Handwerker et al., 2003). Установлено также, что U7 мяРНК и коилин могут формировать специфичные комплексы (Bellini and Gall, 1998). Именно коилин, представляющий собой, как известно, челночный белок, способен доставлять в ТК различные молекулярные комплексы, в том числе и U7 мяРНП (Bellini and Gall, 1999).

Наши эксперименты по микроинъекциям в ооплазму *A. domesticus* меченной флуоресцеином U7 мяРНК, выполненные с целью дополнительной идентификации ТК в ооцитах *A. domesticus*, показали отчетливое накопление этого компонента в матриксе этих внутриядерных образований. Следует подчеркнуть, что ни с какими другими ядерными структурами ооцитов *A. domesticus* связывания U7 мяРНК не наблюдали. Ранее подобные эксперименты позволили идентифицировать ТК среди чрезвычайно гетерогенной популяции экстрахромосомных ядерных структур ооцитов *P. communis* (Batalova et al., 2005). В то же время, в клетках *Drosophila* накопление U7 мяРНК было выявлено не в ТК, а в отдельных ядерных доменах, расположенных в связи с гистоновыми генными локусами на 2-й хромосоме и получивших название HLB (histone locus body) (Liu et al., 2006a). Чем вызвано разделение компонентов ТК на две различные структуры в ооцитах *Drosophila*, остается неясным; во всяком случае, в ооцитах *A. domesticus* такого разделения мы не наблюдаем и структуры, подобные HLB, не обнаруживаются.

О присутствии белка SC35 в тельцах Кахала ооцитов насекомых. Белок SC35, как известно, не является компонентом ТК соматических клеток млекопитающих (Raška et al., 1991; Spector et al., 1991; Matera, 1999). В транскрипционно активных ядрах ооцитов амфибий белок SC35 присутствует в ТК только в составе расположенных на их поверхности В-снёрпосом (КИГ) и в морфологически подобных им внутренних включениях, но не в матриксе ТК (Wu et al., 1991; Gall et al., 1999).

В настоящей работе мы подтвердили более ранние наблюдения других авторов (Gall et al., 1995), что белок SC35 не выявляется в гомогенных ТК молодых ооцитов *A. domesticus*. Однако нам удалось показать присутствие некоторого количества белка SC35 и в матриксе сложных ТК.

Таким образом, ТК ооцитов *A. domesticus*, в отличие от ТК соматических клеток млекопитающих, участвуют, вероятно, не только в перераспределении мяРНП, но и белка SC35. В ТК активно транскрибирующих ядер ооцитов сверчка этот белок, в отличие от мяРНП, действительно не накапливается, однако при подавлении транскрипции с помощью ингибиторов происходит его накопление в связи с ТК в виде гранул, подобно тому, как это имеет место в нормальных условиях на неактивных стадиях оогенеза насекомых с мероистическими яичниками (Bogolyubov et al., 2000; Batalova et al., 2005).

Выявление компонентов РНК-пол II-транскрипции в ТК ооцитов сверчка. Несмотря на то, что вновь синтезированные пре-мРНК отсутствуют в ТК (Raška, 1995; Starco et al., 1999), компоненты, принимающие участие в транскрипции, осуществляемой РНК-пол II, включая многие транскрипционные факторы, обычно являются компонентами ТК соматических клеток млекопитающих (Ciocce and Lamond, 2005). В матриксе ТК ооцитов амфибий была обнаружена фосфорилированная по серину-5 РНК-пол II (Doyle et

al., 2002), транскрипционные факторы (TBP и TFIIF), а также факторы дробления и полиаденилирования CstF77 и CPSF100 (Morgan et al., 2000) и была предложена гипотеза об участии ТК в регуляции процессов транскрипции. Неожиданные данные были получены при выявлении РНК-пол II в ТК ооцитов некоторых насекомых с мероистическими овариолами: *P. communis*, *T. molitor* и *Vespula germanica* (Баталова и др., 2000; Batalova et al., 2005; Jaglarz et al., 2005). Оказалось, что в ТК ооцитов этих насекомых присутствуют обе (фосфорилированная и нефосфорилированная) формы РНК-пол II, причем, поскольку известно, что синтез РНК в ТК не происходит, роль двух форм РНК-пол II в составе ТК остается неясной.

Что касается ооцитов сверчка, то с помощью конфокальной и иммуноэлектронной микроскопии при использовании антител к трем различным эпитопам РНК-пол II нам не удалось выявить сколько-нибудь заметных количеств РНК-пол II в матриксе ТК. Однако другие компоненты, ассоциированные с голоэнзимом РНК-пол II, представлены в ТК ооцитов сверчка. Здесь накапливается белок TBP, являющийся ТАТА-связывающей субъединицей базального фактора транскрипции TFIID (Thompson et al., 1993), а также белки-коактиваторы транскрипции CBP/p300, функция которых состоит в облегчении связывания голоэнзима РНК-пол II и регуляторных белков с ДНК при инициации транскрипции (von Mikecz et al., 2000).

Поскольку нельзя было исключить, что в активно транскрибирующих ядрах ооцитов *A. domesticus* РНК-пол II быстро проходит через ТК и в конкретный момент времени присутствует в нем в количествах, которые невозможно обнаружить иммуноцитохимически, мы блокировали транскрипцию с помощью ингибиторов – DRB и актиномицина D, ожидая при этом выявить заметное накопление РНК-пол II в ТК. Однако этого не наблюдалось: РНК-пол II выявлялась не в ТК, а в фибриллярных зонах, ассоциированных с КИГ.

Обработка ингибиторами заметно не повлияла на содержание TFIID и CBP/p300 в ТК; наряду с этим, отмечалось накопление белков CBP/p300 в КИГ подобно тому, как это происходит в соматических клетках млекопитающих (von Mikecz et al., 2000).

Факт отсутствия заметных количеств РНК-пол II в ТК ооцитов *A. domesticus* заслуживает специального обсуждения в связи с активно разрабатываемой в настоящее время моделью функционирования ТК (Gall et al., 1999; Gall, 2000, 2001), которая, прежде всего, основывается на обнаружении в ТК ооцитов *Xenopus* компонентов транскрипции, осуществляемой всеми тремя РНК-полимеразами. Основная идея этой модели заключается в том, что ТК представляет собой первичный ядерный домен, в котором собираются сложные структурные комплексы (транскриптосомы), вовлеченные в процессинг разных видов РНК. После сборки такие комплексы перераспределяются к соответствующим участкам хроматина.

Очевидно, что к ТК ооцитов сверчка данная модель применима лишь с большими оговорками и требует серьезных уточнений, построенных на дальнейших экспериментальных работах. В настоящей работе мы не обнаружили в ТК ооцитов сверчка РНК-пол II и потому предполагаем, что они, по-видимому, действительно участвуют во внутриядерном распределении некоторых компонентов транскрипции и процессинга пре-мРНК, но их роль в распределении РНК-пол II, вероятно, менее существенна. Эту функцию, по-видимому, принимает на себя другой ядерный компартмент, а именно фибриллярные области в составе КИГ.

Кластеры интерхроматиновых гранул ооцитов насекомых. В ооцитах *A. domesticus* нам впервые удалось идентифицировать КИГ, которые в соматических клетках, по-видимому, представляют собой ядерные домены, в которых происходит накопление-сборка-рециклирование факторов сплайсинга (Puvion et al., 1984; Spector et al., 1991; Puvion and Puvion-Dutilleul, 1996).

В ядрах ооцитов всех исследованных нами насекомых КИГ имеют сложную и весьма характерную организацию: в состав этих структур входит как гранулярный, так и

фибрилярный материал. Последний часто выявляется в виде хорошо оформленных областей. Правда, неизвестно, насколько такие фибриллярные области по составу и функциям соответствуют фибриллярным зонам, ассоциированным с КИГ (interchromatin granule associated zones, IGAZ), иногда обнаруживаемым в соматических клетках (Visa et al., 1993a; Smarco et al., 1999) и ооцитах млекопитающих и человека (Parfenov et al., 1998). В фибриллярных зонах КИГ ооцитов *A. domesticus* и *Sarcophaga* обнаружена нефосфорилированная форма РНК-пол II, что отличает их, например, от В-снёрпосом (КИГ) ооцитов амфибий, в составе которых не было выявлено РНК-пол II (Doyle et al., 2002). Гранулярный материал (собственно интерхроматиновые гранулы) и в том, и в другом случае всегда содержит белок SC35 – маркерный компонент КИГ.

При действии ингибиторов транскрипции на ооциты *A. domesticus* было отмечено накопление в КИГ факторов сплайсинга. Наши результаты находятся в соответствии с известными данными о том, что в соматических клетках млекопитающих в ответ на блокирование транскрипции с помощью ингибиторов пропадает диффузное распределение факторов сплайсинга в нуклеоплазме и происходит их накопление в составе многочисленных КИГ (Lamond and Carmo-Fonseca, 1993; Malatesta et al., 1999). Однако, очевидно, подавление транскрипции может приводить и к другим эффектам. Так, при подавлении транскрипции в ооцитах моллюска *Achatina fulica*, мы не наблюдали увеличения количества КИГ, а факторы сплайсинга при этом концентрировались вокруг конденсированного хроматина. Подобную картину наблюдали и на другой неактивной модели – в ядрах эмбрионов мыши в состоянии «2-клеточного блока *in vitro*» (Bogolyubova et al., 2006). С чем связаны такие различия, пока сказать трудно.

Наше исследование является по существу первым, в котором проведен комплексный анализ ядерных структур ооцитов насекомого с паноистическими яичниками. Многие результаты проделанной работы, безусловно, еще требуют детальной проверки в будущем с целью систематического поиска фундаментальных закономерностей организации и функций ядерных доменов. Несомненно одно: ядра ооцитов *A. domesticus* демонстрируют яркий пример морфофункционального единства различных экстрахромосомных доменов – ТК и КИГ.

ВЫВОДЫ

1. Хромосомы ооцитов *Acheta domesticus* в течение диплотены сохраняют транскрипционную активность; конденсации хромосом и их объединения в кариосферу, характерных для оогенеза многих насекомых, не происходит.
2. Среди экстрахромосомных ядерных доменов идентифицируются ТК и КИГ.
3. ТК ооцитов *A. domesticus* имеют сложную организацию и обнаруживают структурную связь с другим ядерным доменом – КИГ.
4. ТК диплотенных ооцитов *A. domesticus* содержат коилин, фактор процессинга пре-РНК фибрилларин, факторы сплайсинга пре-мРНК (мяРНП и, в отличие от ТК клеток других типов, – белок SC35), ряд компонентов РНК-пол II-транскрипции (базальный фактор транскрипции TFIID и белки-коактиваторы СВР/p300), но не содержат РНК-пол II.
5. КИГ ооцитов *A. domesticus* состоят из четко выраженных гранулярных и фибриллярных областей. Организация и молекулярный состав КИГ оказываются сходными у насекомых различных систематических групп, а за пределами класса насекомых – у моллюска *Achatina fulica*. Их характерная особенность – присутствие SR-белка SC35.
6. Подавление транскрипции с помощью ингибиторов вызывает существенное изменение морфологии ТК, увеличение количества КИГ в нуклеоплазме, сегрегацию ультраструктурных компонентов ТК и КИГ, но не приводит к перераспределению коилина, фибрилларина, мяРНП, TFIID и СВР/p300 и к накоплению в ТК РНК-пол II, которая аккумулируется в фибриллярных областях КИГ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Баталова Ф.М., Степанова И.С., Боголюбов Д.С. 2000. В ядрах ооцитов скорпионницы *Panorpa communis* отсутствуют ядрышки. Цитология. 42 (3): 263.
2. Баталова Ф.М., Степанова И.С., Боголюбов Д.С. 2000. Тельца Кахала в ядрах ооцитов скорпионницы *Panorpa communis*. Цитология. 42 (11): 1037-1047.
3. Боголюбов Д.С., Цветков А.Г., Степанова И.С., Парфенов В.Н. 2002. Кариосфера и тельца Кахала в ооцитах жука-чернотелки. Цитология. 44 (9): 863.
4. Степанова И.С., Боголюбов Д.С. 2002. Ядро диплотенных ооцитов гигантской африканской улитки: ультраструктурное и иммуноцитохимическое исследование. Цитология. 44 (9): 907-908.
5. Степанова И.С., Боголюбов Д.С. 2003. РНК-полимераза II и факторы сплайсинга пре-мРНК в ядрах диплотенных ооцитов гигантской африканской улитки *Achatina fulica*. Цитология. 45 (2): 166-178.
6. Боголюбов Д.С., Степанова И.С. 2003. Идентификация и структурно-функциональная характеристика телец Кахала в ооцитах насекомых. Цитология. 45 (9): 850-851.
7. Parfenov V., Stepanova I., Batalova F., Pochukalina G., Bogolyubov D. 2004. Nuclear bodies in insect and mammalian oocytes. ELSO 2004 Proceedings. Nice: 278.
8. Баталова Ф.М., Сквородкин И.Н., Степанова И.С., Боголюбов Д.С., Парфенов В.Н. 2005. Особенности организации ядерных структур ооцитов скорпионницы *Panorpa communis*. Цитология. 47 (9): 792-793.
9. Степанова И.С., Боголюбов Д.С. 2005. Организация и состав внутриядерных телец ооцитов домового сверчка в норме и при искусственном подавлении транскрипции. Цитология. 47 (9): 834-835.
10. Степанова И.С., Боголюбов Д.С. 2005. Тельца Кахала в ядрах ооцитов домового сверчка *Acheta domesticus*. Онтогенез. 36 (5): 395.
11. Batalova F.M., Stepanova I.S., Skovorodkin I.N., Bogolyubov D.S., Parfenov V.N. 2005. Identification and dynamics of Cajal bodies in relation to karyosphere formation in scorpionfly oocytes. Chromosoma. 113: 428-439.
12. Степанова И.С., Боголюбов Д.С., Парфенов В.Н. 2007. Тельца Кахала в ооцитах насекомых. II. Новые данные по молекулярному составу телец Кахала ооцитов домового сверчка. К вопросу о взаимосвязи телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул. Цитология. 49 (1): 5-20.
Английская версия:
- Stepanova I.S., Bogolyubov D.S., Parfenov V.N. 2007. Cajal bodies in insects. II. Molecular composition of Cajal bodies in oocytes of house cricket. Relationship between Cajal bodies and interchromatin granule clusters. Cell and Tissue Biology. 1(1): 14-29.
13. Stepanova I.S., Bogolyubov D.S., Skovorodkin I.N., Parfenov V.N. 2007. Cajal bodies and interchromatin granule clusters in cricket oocytes: composition, dynamics and interactions. Cell Biol. Int. 31: doi: 10.1016/j.cellbi.2006.04.010

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Баталова Ф.М., Степанова И.С., Боголюбов Д.С. 2000. Цитология. 42 (11): 1037-1047. **Методы биологии развития**. 1974. М.: Наука, 619 с. Степанова И.С., Боголюбов Д.С. 2003. Цитология. 45 (2): 166-178. Степанова И.С., Боголюбов Д.С., Парфенов В.Н. 2007. Цитология. 49 (1): 5-20. **Andrade L.E.C.**, Chan E.K.L., Raška I., Peebles C.L., Roos G., Tan E.M. 1991. J. Exp. Med. 173: 1407-1419. **Bakken A.**, Morgan G., Sollner-Webb B., Roan J., Busby S., Reeder R.H. 1982. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 56-60. **Batalova F.M.**, Stepanova I.S., Skovorodkin I.N., Bogolyubov D.S., Parfenov V.N. 2005. Chromosoma. 113: 428-439. **Bellini M.**, Gall J.G. 1998. Mol. Biol. Cell. 9: 2987-3001. **Bellini M.**, Gall J.G. 1999. Mol. Biol. Cell. 10: 3425-3434. **Biliński S.M.**, Kloc M. 2002. Chromosoma 111: 62-68. **Bogolyubov D.**, Parfenov V. 2001. Tissue and Cell. 33: 549-561. Tissue and Cell. 36: 13-17. **Bogolyubov D.**, Alexandrova O., Tsvetkov A., Parfenov V. 2000. Chromosoma. 109: 415-425.

Bogolyubova I.O., Bogoliubova N.A., Bogolyubov D.S. Parfenov V.N. 2006. *Tissue and Cell*. 38: 389-398. **Brasch K.**, Ochs R.L. 1992. *Exp. Cell Res.* 202: 211-223. **Cioce M.**, Lamond A.I. 2005. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21: 105-131. **Cmarco D.**, Verschure P.J., Martin T.E., Dahmus M.E., Krause S., Fu X.-D., van Driel R. Fakan S. 1999. *Mol. Biol. Cell*. 10: 211–223. **Cremer T.**, Kupper K., Dietzel S., Fakan S. 2004. *Biol. Cell*. 96: 555-567. **Doyle O.**, Corden J.L., Murphy C., Gall J.G. 2002. *J. Struct. Biol.* 140: 154–166. **Fakan S.** 1994. *Trends Cell Biol.* 4: 86-90. **Frey M.R.**, Matera A.G. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 5915-5919. **Fu X.-D.**, Maniatis T. 1990. *Nature*. 343: 437–441. **Gall J.G.** 2000. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16: 273-300. **Gall J.G.**, Tsvetkov A., Wu Z., Murphy C. 1995. *Dev. Genet.* 16: 25-35. **Gall J.G.**, Bellini M., Wu Z., Murphy C. 1999. *Mol. Biol. Cell*. 10: 4385-4402. **Gall J.G.**, Wu Z., Murphy C., Gao H. 2004. *Exp. Cell Res.* 296: 28-34. **Gruzova M.N.**, Parfenov V.N. 1993. *Int. Rev. Cytol.* 144: 1-52. **Handwerker K.E.**, Murphy C., Gall J.G. 2003. *J. Cell Biol.* 160: 495-504. **Hulsebos T.**, Hackstein J., Henning W. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 16: 9415-9429. **Jaglarz M.K.**, Biliński S.M., Kloc M. 2005. *Differentiation*. 73: 99-108. **Kim W.-Y.**, Dahmus M.E. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 14219-14225. **Krainer A.** 1988. *Nucl. Acids Res.* 16: 9415-9429. **Krämer A.**, Haars R., Kabisch R., Will H., Bautz F.A., Bautz E.K. 1980. *Mol. Gen. Genet* 180: 193-199. **Laemmli U.K.** 1970. *Nature*. 227: 680-685. **Lamond A.I.**, Carmo-Fonseca M. 1993. *Trends Cell Biol.* 3: 198-204. **Lamond A.I.**, Spector D.L. 2003. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 605-612. **Lerner E.A.**, Lerner M.R., Janeway C.A., Steitz J. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 2737-2741. **Liu J.-L.**, Murphy C., Buszczak M., Clatterbuck S., Goodman R., Gall J.G. 2006a. *J. Cell Biol.* 172: 875-884. **Liu J.-L.**, Buszczak M., Gall J.G. 2006b. *Chromosome Res.* 14: 465-475. **Malatesta M.**, Cardinali A., Battistelli S., Zancanaro C., Martin T.E., Fakan S., Gazzanelli G. 1999. *Anat. Rec.* 254: 389-395. **Matera A.G.** 1999. *Trends Cell Biol.* 9: 302-309. **Matera A.G.** 2006. Drosophila Cajal bodies: accessories not included. *J. Cell Biol.* 172: 791-793. **von Mikecz A.**, Zhang S., Montminy M., Tan E.M., Hemmerich P. 2000. *J. Cell Biol.* 150: 265-274. **Mintz P.J.**, Patterson S.D., Neuwald A.F., Spahr C.S., Spector D.L. 1999. *EMBO J.* 18: 4308-4320. **Misteli T.**, Spector D.L. 1998. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 323-331. **Morgan G.T.**, Doyle O., Murphy C., Gall J.G. 2000. *J. Struct. Biol.* 129: 258-268. **Parfenov V.N.**, Davis D.S., Pochukalina G.N., Kostyuchek D., Murti K.G. 1998. *J. Cell Biochem.* 69: 72-80. **Perry R.P.**, Kelley D.E. 1970. *J. Cell Physiol.* 76: 127-139. **Puvion E.**, Viron A., Assens C., Leduc E.H., Jeanteur P. *J. Ultrastruct Res.* 87: 180-189. **Puvion E.**, Puvion-Dutilleul F. 1996. *Exp. Cell Res.* 229: 217-225. **Raška I.** 1995. *J. Cell Biochem.* 59: 11-26. **Raška I.**, Andrade L.E.C., Ochs R.L., Chan E.K.L., Chang C.M., Roos G., Tan E.M. 1991. *Exp. Cell Res.* 195: 27-37. **Spector D.L.**, Fu X.-D., Maniatis T. 1991. *EMBO J.* 10: 3467-3481. **Stepanova I.S.**, Bogolyubov D.S., Skovorodkin I.N., Parfenov V.N. 2007. *Cell Biol. Int.* 31: doi: 10.1016/j.cellbi.2006.04.010. **Thompson C.M.**, Koleske A.J., Chao D.M., Young R.A. 1993. *Cell*. 73: 1361-1375. **Thompson N.E.**, Steinberg T.H., Aronson D.B., Burgess R.R. 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 11511-11520. **Tuma R.**, Stolk J.A., Roth M.B. 1993. *J. Cell Biol.* 122: 767-773. **Visa N.**, Puvion-Dutilleul F., Harper F., Bachellerie J.P., Puvion E. 1993. *Exp. Cell Res.* 208: 19-34. **Wallace R.A.**, Jared D.W., Dumont J.N., Sega M.W. 1973. *J. Exp.Zool.* 184: 321-333. **Wansink D.G.**, Nelissen R.L., de Jong L. 1994. *Mol Biol Rep.* 19: 109-113. **Wu C.-H.**, Gall J.G. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 6257-6259. **Wu C.-H.**, Murphy C., Gall J.G. 1996. *RNA*. 2: 811-823. **Wu Z.**, Murphy C., Callan H.G., Gall J.G. 1991. *J. Cell Biol.* 113: 465-483. **Wu Z.**, Gall J.G. 1997. *Chromosoma*. 105: 438-443. **Żelazowska M.**, Jaglarz M.K. 2004. *Arthr. Struct. Dev.* 33: 161-172.