

На правах рукописи

Боголюбова Ирина Олеговна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЯДРА
В ПЕРИОД АКТИВАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ГЕНОМА
МЫШИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург
2019

Работа выполнена в Лаборатории морфологии клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Зацепина Ольга Владимировна,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Москва

доктор биологических наук
Киреев Игорь Игоревич,
Научно-исследовательский институт физико-химической
биологии им. А.Н. Белозерского Московского
государственного университета им. М.В. Ломоносова

доктор биологических наук
Кузнецова Татьяна Владимировна,
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии и репродуктологии
им. Д.О. Отта», г. Санкт-Петербург

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Институт экспериментальной медицины»,
г. Санкт-Петербург

Защита состоится 17 мая 2019 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

Сайт института: <http://www.incras.ru>

Адрес электронной почты института: cellbio@incras.ru

Факс института: (812) 297-03-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте института по адресу: <http://www.incras.ru>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2019 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Процессы индивидуального развития и механизмы, лежащие в основе формирования нового организма, традиционно находятся в центре внимания исследователей, а половые клетки и образующуюся в процессе оплодотворения зиготу без преувеличения можно считать одними из наиболее загадочных объектов биологии. Эмбрионы на стадии дробления являются перспективными моделями для анализа многих ключевых вопросов клеточной биологии, включая механизмы полипотентности и дифференцировки клеток. Как известно, сперматозоиды и яйцеклетки являются высокоспециализированными клетками, не способными к пролиферации, однако в результате их слияния формируется тотипотентная зигота, постепенно дающая начало огромному многообразию клеток в составе многоклеточного организма.

Очевидно, что столь кардинальные изменения потенций клеток к дифференцировке, а также интеграция родительских геномов не могут не сопровождаться выраженными перестройками трехмерной организации ядер зиготы и дробящихся эмбрионов. Таким образом, ранние эмбрионы представляют собой интересную и перспективную модель для изучения различных аспектов структуры и функций клеточного ядра.

Разработка концепции структурно-функциональной компартментализации клеточного ядра является классическим направлением клеточной биологии (Raška et al., 1992; Dundr, Misteli, 2001; Carmo-Fonseca, 2002; Misteli, 2005; Spector, Lamond, 2011). К настоящему времени имеются многочисленные доказательства прямого участия ряда ядерных доменов в осуществлении и регуляции всех этапов экспрессии генов (Dundr, Misteli, 2010; Mao et al., 2011), а также накапливается все больше данных о возможной роли функциональных ядерных доменов в патогенезе ряда заболеваний человека (Sahin et al., 2014; Nunes, Moretti, 2017), в связи с чем исследования структурно-функциональной организации клеточного ядра приобретают не только теоретическую, но и практическую значимость.

Наряду с этим следует констатировать, что подавляющее число работ в данной области проведено с использованием соматических клеток млекопитающих или их клеточных культур. Однако функциональные ядерные компартменты, особенно экстрахромосомные домены, могут существенно различаться по своим морфологическим особенностям и по молекулярному

составу даже в одной и той же клетке в разных физиологических и экспериментальных условиях. Еще более выраженным подобный полиморфизм ядерной организации может быть в клетках разных типов и разных видов организмов. В связи с этим для выявления универсальных закономерностей ядерной компартиментализации необходимо максимально возможное расширение спектра модельных объектов. Тем не менее структурно-функциональная организация ядер ранних эмбрионов млекопитающих в данном аспекте остается охарактеризованной в недостаточной степени. Большинство работ, затрагивающих вопросы структурной организации ядер эмбрионов млекопитающих, посвящено процессам нуклеологенеза – формированию функционально активного ядрышка (Fléchon, Kopecký, 1998; Hyttel, 2001; Zatsepina et al., 2003; Bjerregaard, Maddox-Hyttel, 2004). Имеются отдельные работы, затрагивающие вопросы динамики формирования телец Кахаля в ранних эмбрионах (Ferreira, Carmo-Fonseca, 1995; Zatsepina et al., 2003). Однако целостные представления о структурно-функциональной организации клеточных ядер в раннем эмбриогенезе млекопитающих в настоящее время еще окончательно не сформированы.

В то же время эмбрионы млекопитающих на начальных этапах дробления характеризуются не только такими уникальными свойствами, как тотипотентность и специфическая структура клеточного цикла, но и поэтапной реактивацией транскрипционной активности. Как известно, в начале эмбриогенеза ядра эмбрионов млекопитающих являются транскрипционно неактивными, тогда как комплексные процессы активации эмбрионального генома (АЭГ) начинаются спустя определенное (видоспецифичное) время после оплодотворения (Schultz, 1993; Nothias et al., 1995; Minami et al., 2007). Это дает уникальную возможность проследить процессы формирования универсальных ядерных доменов *de novo*, в условиях поэтапной активации экспрессии генов.

Тем не менее в литературе практически отсутствуют данные о динамике структурных перестроек ядер дробящихся эмбрионов в контексте реализации АЭГ, а имеющиеся сведения об особенностях ядерной организации эмбрионов тех или иных видов млекопитающих на разных стадиях развития недостаточно систематизированы. Это повышает актуальность и теоретическую значимость комплексной характеристики структурно-функциональной организации ядер ранних эмбрионов млекопитающих на разных этапах АЭГ, которая позволит значительно расширить существующие представления о пространственной организации процессов экспрессии генов.

Цель и задачи работы. Цель настоящего исследования заключалась в анализе динамики структурно-функциональной организации клеточного ядра

эмбрионов мыши в период АЭГ. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи.

1. Характеристика морфологических особенностей и молекулярного состава кластеров интерхроматиновых гранул (КИГ) и коилинсодержащих телец в ядрах эмбрионов мыши на начальных этапах дробления. Выявление специфических признаков универсальных доменов интерхроматинового пространства ядра эмбриона мыши в период АЭГ.

2. Иммуноцитохимический анализ молекулярного состава проядрышек и ассоциированного с ними гетерохроматина в ядрах доимплантационных эмбрионов мыши.

3. Сравнительный анализ структурной организации ядра и внутриядерного распределения ключевых факторов метаболизма мРНК у эмбрионов мыши с различным транскрипционным статусом, в том числе при искусственном подавлении транскрипционной активности.

4. Выявление особенностей структурно-функциональной организации клеточного ядра эмбрионов мыши в состоянии «2-клеточного блока *in vitro*».

5. Сравнительный анализ распределения ядерного актина, его ассоциации с универсальными ядерными доменами и возможного пространственного взаимодействия с компонентами посттранскрипционного метаболизма мРНК в эмбрионах мыши с различным транскрипционным статусом.

Научная новизна полученных результатов. Впервые был проведен комплексный анализ функциональной морфологии клеточных ядер на ранних стадиях дробления эмбрионов мыши и описана динамика перестроек основных ядерных компартментов и перераспределения ключевых компонентов метаболизма мРНК в период АЭГ, тем самым впервые охарактеризована структурная составляющая АЭГ. Выявлены принципиальные различия между структурой ядер транскрипционно инертных эмбрионов: до начала АЭГ, после использования ингибиторов транскрипции на транскрипционно активной (поздней двухклеточной) стадии и в блоке развития *in vitro*. Таким образом, впервые показана возможность реализации различных схем функциональной компартментализации в транскрипционно неактивных ядрах.

В частности, впервые было показано, что в ядрах ранних эмбрионов мыши в ходе начальных этапов дробления происходит постепенное формирование КИГ, выявлены основные тенденции динамики морфологии и молекулярного состава этих ядерных доменов в ходе реализации АЭГ. На эмбриональной модели впервые была продемонстрирована полифункциональность КИГ и их возможное участие в процессах посттранскрипционного метаболизма мРНК.

Впервые продемонстрирована гетерогенность популяции коилинсодержащих телец в период АЭГ как по морфологическим характеристикам, так и по молекулярному составу. Показано присутствие актина и шаперона нуклеиновых кислот YB-1 в отдельных коилин-позитивных структурах.

Получены новые факты, указывающие на возможную полифункциональность проядрышек в эмбрионах мыши. Впервые в составе этих структур обнаружены некоторые компоненты комплекса связи экзонов (exon-exon junction complex, EJC), а именно Y14 и NXF1/TAP. В составе транскрипционно инертного гетерохроматина, ассоциированного с проядрышками, обнаружены эпигенетические метки как репрессированного, так и активного хроматина (H3me3K9 и H4acK5, соответственно). Охарактеризована динамика изменения молекулярного состава ассоциированного с проядрышками гетерохроматина в период АЭГ, показано, что на ранних (транскрипционно неактивных) стадиях в его составе выявляются некоторые факторы метаболизма мРНК (фактор сплайсинга SR-белок SC35 и базальный фактор транскрипции TFIID). Обнаружена гетерогенность популяции проядрышек по составу окружающего их гетерохроматина.

Впервые проведено комплексное исследование структурно-функциональной организации ядер эмбрионов мыши при остановке развития *in vitro*, в том числе на ультраструктурном уровне. Обнаружено, что при сохранении своей ультраструктурной организации ядра заблокированных эмбрионов характеризуются значительным перераспределением ряда ключевых факторов транскрипции и сплайсинга мРНК. Показано снижение транскрипционной активности хромосом заблокированных эмбрионов, которое обнаруживается еще до остановки дробления.

Изучено распределение актина в ядрах одноклеточных и двухклеточных эмбрионов при нормальном развитии и при искусственном подавлении транскрипционной активности. Разработан комплексный подход с использованием различных флуоресцентных маркеров актина, позволяющий проводить сравнительный анализ локализации его разных функциональных форм (G-актин, F-актин и олигомеры актина). Впервые описаны различные паттерны внутриядерного распределения актина при использовании антител к С- и N-концам молекулы. Продemonстрировано отсутствие фибриллярного актина в ядрах нормально развивающихся эмбрионов и его накопление в проядрышках при искусственном подавлении транскрипции. Показана колокализация актина и факторов экспорта мРНК в области ассоциированного с проядрышками гетерохроматина, усиливающаяся при искусственном

подавлении транскрипции. С помощью FRET-анализа в проядрышках и интерхроматиновой области ядра показано тесное пространственное взаимодействие актина и факторов экспорта мРНК, которое имеет РНК-зависимый характер. Полученные данные позволяют предположить непосредственное вовлечение актина в экспорт мРНК в ранних эмбрионах мыши.

На основе полученных данных разработана модель поэтапного формирования дефинитивной структуры клеточного ядра в период АЭГ, выделены общие и специфические особенности структурной организации ядер в раннем эмбриогенезе млекопитающих.

Теоретическое и практическое значение работы. В результате работы охарактеризована принципиально новая модель для анализа ядерной компартментализации в условиях поэтапного изменения транскрипционной активности ядра. Полученные результаты расширяют представления об общих закономерностях функциональной компартментализации клеточного ядра, а также о специфике пространственной организации функционирования генома в ооцитах и эмбрионах.

С практической точки зрения полученные данные об общих и специфических особенностях организации ядер эмбрионов представляют собой теоретическую основу для разработки новых морфологических критериев для оценки качества эмбрионального материала. Методы иммуноцитохимического мечения, адаптированные в ходе работы для доимплантационных эмбрионов и позволяющие одновременно обрабатывать большое число эмбрионов в одинаковых условиях, могут существенно повысить эффективность иммуноморфологического анализа эмбрионального и проэмбрионального материала.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Структурные перестройки основных ядерных компартментов составляют обязательный морфофункциональный компонент АЭГ.
2. Структурно-функциональная организация ядра эмбрионов мыши до начала АЭГ существенно отличается от транскрипционно активных клеток после искусственного подавления транскрипции, что позволяет говорить об особом транскрипционном статусе ядер ранних эмбрионов.
3. Для ядер ранних эмбрионов мыши характерно присутствие особых «провизорных» ядерных доменов, существующих только на отдельных стадиях дробления.
4. Для основных ядерных доменов в ранних эмбрионах мыши в период АЭГ характерны мультифункциональность, а также тесные функциональные

связи между доменами интерхроматинового пространства и гетерохроматином, ассоциированным с проядрышками.

Личный вклад соискателя. Все описанные в работе экспериментальные результаты получены лично автором, ему принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов, подготовке материалов к публикации. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Достоверность полученных результатов. Данные, представленные в работе, являются воспроизводимыми. Результаты получены на сертифицированном оборудовании, все реагенты являлись сертифицированными продуктами известных фирм, оценка достоверности результатов проведена с использованием соответствующих методов статистической обработки данных.

Апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 42 работы (из них 1 глава в коллективной монографии, 19 статей в журналах, входящих в список ВАК или в международные базы данных Web of Science и Scopus, 3 статьи в сборниках, 19 тезисов докладов). Материалы диссертации представлены на 15 отечественных и международных конференциях.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты №№ 99-04-49517, 02-04-49723, 06-04-48904, 07-04-00685, 09-04-00723, 10-04-00757, 15-04-01857), гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (2007—2008), программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» (2010—2012, 2013—2017, 2018).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 564 источника. Работа изложена на 256 страницах, содержит 62 рисунка и 8 таблиц.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение эмбрионов. В работе использовали инбредных мышей линии BALB/c и гибридных животных (F1), полученных от скрещивания CBA × C57BL/6 (питомник «Рапполово», Ленинградская область). Все этапы работы проводили в соответствии с международными этическими требованиями к экспериментам на животных и с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных целях (Страсбург, 18.03.1986). Для синхронизации половых циклов и стимуляции

овуляции использовали последовательные однократные инъекции сывороточного и хорионического гонадотропина (Фоллигон и Хорулон, Intervet, Голландия). Возраст эмбрионов отсчитывали от времени инъекции хорионического гонадотропного гормона (ХГГ).

Выбор возраста эмбрионов проводили в соответствии с имеющимися в литературе данными о хронологии основных событий АЭГ у мыши (Wiekowski et al., 1997; Minami et al., 2007). В работе использованы эмбрионы следующих стадий развития: ранняя зигота (20—24 ч после ХГГ, транскрипционно инертные эмбрионы до начала АЭГ), поздняя зигота (27—28 ч, начальные этапы АЭГ), ранняя двухклеточная стадия (32—33 ч, начальные этапы АЭГ), поздняя двухклеточная стадия (46—48 ч, завершение основных событий АЭГ), морула (72 ч, дефинитивный уровень транскрипционной активности).

Непрямое иммунофлуоресцентное мечение проводили на давленных и на тотальных препаратах эмбрионов. Инкубацию эмбрионов с первичными антителами проводили во влажной камере при 4 °С не менее 12 ч. В качестве вторичных использовали козы анти тела к иммуноглобулинам мыши или кролика, конъюгированные с флуорохромами FITC, Alexa-568 и Alexa-633.

FRET-анализ проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Leica TSC SP5 (Leica Microsystems, Германия), используя гелий-неоновые лазеры с длиной волны 543 и 633 нм и алгоритм FRET AB (Acceptor Photobleaching) (Zal, Gascoigne, 2004). В качестве негативного контроля использовали участки образцов, которые не подвергались фотовыбеливанию (Staněk, Neugebauer, 2004). Эффективность FRET рассчитывали по формуле $E = (D_{\text{post}} - D_{\text{pre}})/D_{\text{post}}$; где D_{post} – интенсивность флуоресценции донора после фотовыбеливания акцептора, D_{pre} – интенсивность флуоресценции донора до фотовыбеливания акцептора.

Прямое иммунофлуоресцентное выявление актина. Для локализации неполимеризованного актина использовали конъюгат Alexa-488 с ДНКазой I (Molecular Probes, США). Для локализации фибриллярного актина использовали TRITC-фаллоидин (Sigma, США). В случае использования флуоресцентных маркеров полимеризованного и неполимеризованного актина совместно с антителами обработку ДНКазой I или TRITC-фаллоидином проводили после полного завершения обработки препаратов антителами.

Электронная микроскопия. Для общеморфологических целей эмбрионы фиксировали в 1%-ном глутаральдегиде (Polyscience, США), приготовленном на 0.05 М какодилатном буфере, pH 7.4, дофиксировали 1%-ным OsO_4 и заключали в смолу Spurr (Electron Microscopy Sciences, США).

Для иммуноэлектронного мечения ультратонких срезов эмбрионы фиксировали в смеси 4%-ного формальдегида и 0.5%-ного глутаральдегида на

PBS, после чего дофиксировали в 2%-ном формальдегиде. После отмывки в PBS, содержащем 0.5 М NH_4Cl , и дегидратации в этаноле материал заключали в смолу LR White (Polyscience или Sigma, США).

Ультратонкие срезы обрабатывали в течение 10 мин в блокирующем буфере, содержащем 0.5 % желатина, полученного из кожи холонокровных рыб (Sigma, США), и 0.02 % Tween-20 на PBS, pH 7.4, после чего инкубировали в растворе первичных антител во влажных камерах при 4 °C в течение ночи. Сетки отмывали в PBS, содержащем 0.1 % желатина и 0.05 % Tween-20, после чего инкубировали в растворе вторичных антител, конъюгированных с коллоидным золотом (размер частиц 10 или 15 нм) в течение 1.5 ч при комнатной температуре.

Микроинъекции в цитоплазму эмбрионов Br-УТФ и 2'-O-Me(U)₂₂, меченного TAMRA, проводили стеклянными капиллярами Femtotip® II (Eppendorf) при помощи микроинъектора Eppendorf 5242, совмещенного с микроманипулятором Narishige под контролем микроскопа Leica DM IRB, оборудованного цифровой фотокамерой Leica DFC 320 (Bogolyubov, 2007; Bogolyubova et al., 2009).

Статистическая обработка данных и фотометрический анализ. Все эксперименты повторяли не менее 3 раз, анализировали не менее 20 эмбрионов для каждой экспериментальной группы. Для целей фотометрического и морфометрического анализа оценивали не менее 7—10 ядер для каждой экспериментальной группы, при этом для каждого ядра проводили не менее 5 независимых измерений на 5 оптических срезах. Относительную интенсивность флуоресцентного мечения нуклеоплазмы на конфокальных изображениях определяли с помощью программы ImageJ. Определение средних значений и ошибок среднего проводили с помощью стандартного программного обеспечения Microsoft Excel. Для подтверждения достоверности различий средних значений между выборками использовали критерий Манна-Уитни или *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Структурная организация ядер эмбрионов мыши в период АЭГ

1.1. Общая морфологическая характеристика ядер доимплантационных эмбрионов

В ядрах эмбрионов мыши на 1—2-клеточной стадии развития наиболее крупными структурами являются так называемые проядрышки (nucleolus precursor bodies) (рис. 1).

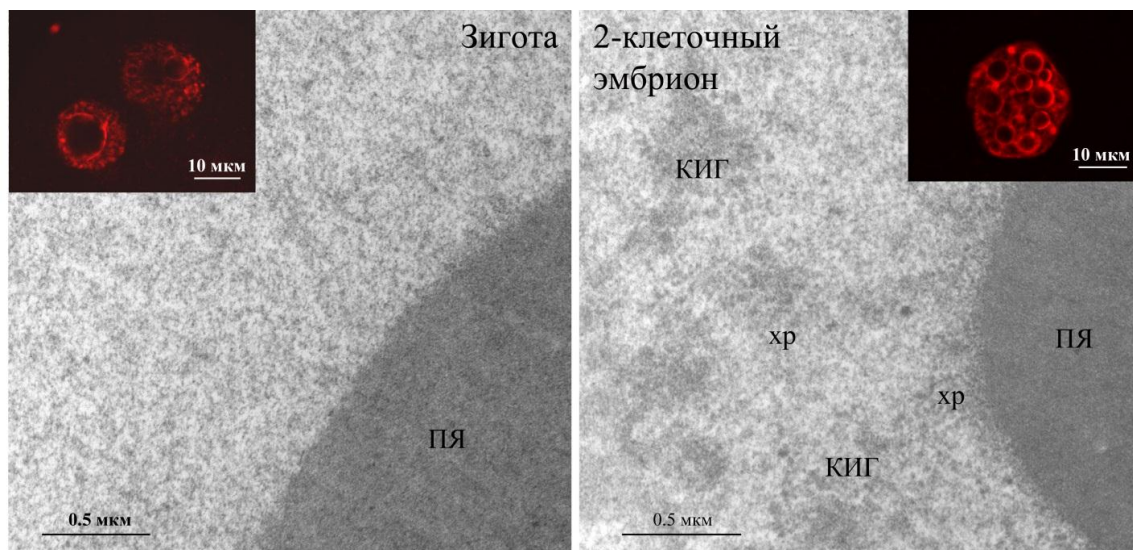


Рис. 1. Морфология ядер эмбрионов мыши на начальных стадиях доимплантационного развития. Электронная микроскопия; врезки – конфокальная микроскопия, окраска DAPI, искусственный цвет; ПЯ – проядрышко, хр – хроматин, КИГ – кластеры интерхроматиновых гранул.

Диаметр проядрышек достигает 2—3 мкм, что позволяет наблюдать их и на светооптическом уровне. Эти структуры имеют практически идеально правильную сферическую форму и состоят из плотно упакованного тонкофибриллярного материала, толщина фибрилл которого составляет около 30—50 нм (рис. 1).

По мере развития эмбрионов число проядрышек изменяется, при этом наблюдаются значительные различия между отдельными зародышами по этому показателю. Максимальное число проядрышек (12) характерно для ранней двухклеточной стадии (G_1 -фаза второго клеточного цикла), после чего их количество начинает постепенно уменьшаться. Помимо проядрышек в нуклеоплазме эмбрионов начиная с двухклеточной стадии дробления присутствуют разнообразные гранулярные структуры, соответствующие КИГ, тельцам Кахала (ТК) и перихроматиновым гранулам.

1.2. Морфогенез КИГ в раннем эмбриогенезе мыши

В ходе проведенного исследования нами была проанализирована динамика размеров и молекулярного состава КИГ (ядерных спеклов) в эмбрионах, различающихся по уровню транскрипционной активности хромосом (Боголюбова, Парфенов, 2000; Bogolyubova et al., 2009; Боголюбова, 2013; Bogoyubova, Bogolyubov, 2013). Для визуализации КИГ во всех экспериментах использовали антитела к SR-белку SC35, который рассматривают как молекулярный маркер КИГ, поскольку именно в этих доменах он присутствует в ядре в наибольшей концентрации (Mintz, Spector, 2000; Hall et al., 2006).

На всех изученных стадиях картина распределения SC35 складывалась из диффузного мечения нуклеоплазмы и более ярко светящихся дискретных структур (спеклов). Однако спеклы, выявляемые в ядрах эмбрионов мыши (особенно на начальных стадиях АЭГ), имеют значительно меньшие размеры по сравнению с типичными спеклами соматических клеток, размер которых составляет ≥ 1 мкм (Spector, Lamond, 2011). Сопоставимые по размерам структуры наблюдали только на поздней двухклеточной, а также на четырехклеточной, то есть на транскрипционно активных стадиях. Отсутствие типичных КИГ (спеклов) в ядрах одноклеточных эмбрионов мыши на стадии зиготы подтверждается и на ультраструктурном уровне. Динамика ядерных спеклов ранних эмбрионов мыши на фоне АЭГ показана на рис. 2.

Проведенный морфометрический анализ показывает, что средний диаметр спеклов в ранних эмбрионах мыши достоверно увеличивается в ходе раннего развития, то есть по мере реализации АЭГ (рис. 3). На начальных этапах дробления также происходит изменение количества КИГ в ядрах эмбрионов, которое, однако, не полностью коррелирует с увеличением их диаметра. С нашей точки зрения, наблюдаемая в ядрах 1—4-клеточных эмбрионов мыши динамика размеров и количества КИГ определяется в первую очередь их образованием *de novo*. Необходимо отметить, что для транскрипционно активных эмбрионов характерны большие размеры КИГ, нежели для транскрипционно неактивных или менее активных, что находится в полном соответствии с возможностью нуклеации новых спеклов при АЭГ.

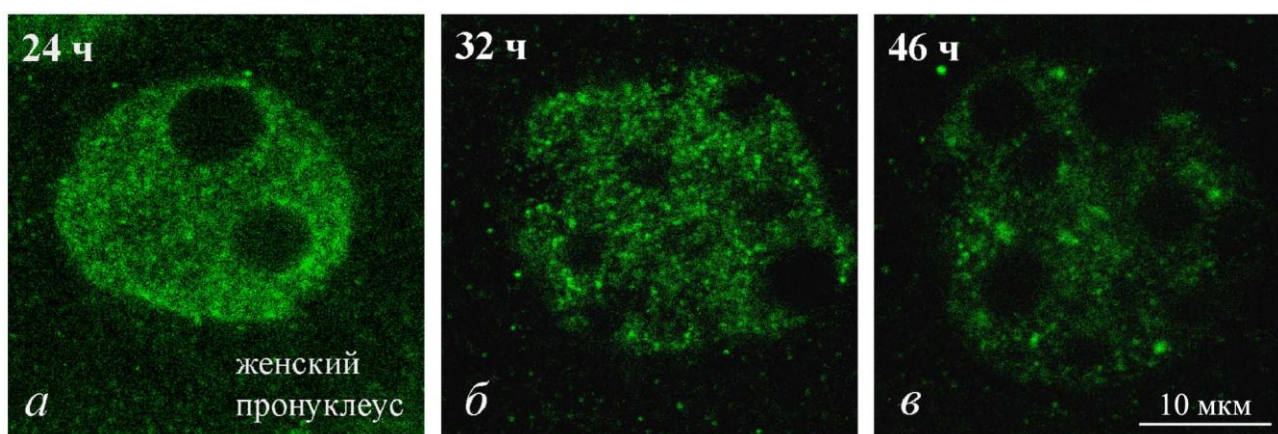


Рис. 2. Выявление ядерных спеклов (КИГ) с помощью антител к белку SC35 на стадии ранней зиготы (а), ранней двухклеточной (б) и поздней двухклеточной (в) стадиях дробления эмбрионов мыши.

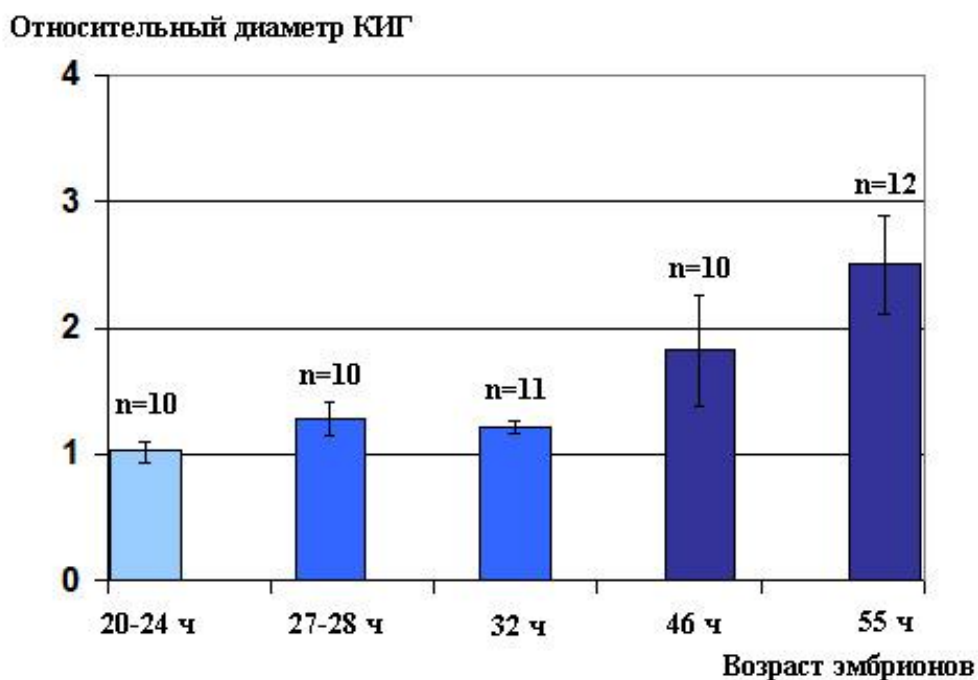


Рис. 3. Динамика размеров КИГ в ранних эмбрионах мыши в период АЭГ.

При определении относительного диаметра КИГ за единицу принимали средний диаметр КИГ на стадии ранней зиготы. Интенсивность цвета условно отражает транскрипционную активность эмбрионов. Вертикальные отрезки – среднее квадратичное отклонение.

Нами была изучена возможная ассоциация с КИГ ряда ключевых компонентов ядерного метаболизма – РНК-полимеразы II, базального фактора транскрипции TFIID, белков A/B гетерогенных ядерных РНП (hnРНП) и фактора экспорта мРНК NXF1/TAP в раннем эмбриогенезе мыши. Базальный фактор транскрипции TFIID выявляется в ядрах эмбрионов начиная уже с первой исследованной стадии – 20—24 ч после ХГГ, при этом даже до начала АЭГ наблюдается его ассоциация со спеклами, которая становится более выраженной по мере нарастания транскрипционной активности хромосом. Гиперфосфорилированная форма РНК-полимеразы II, напротив, не обнаруживается в пронуклеусах заготы и начинает выявляться в ядрах эмбрионов мыши только с ранней двухклеточной стадии, при этом уже с начала второго клеточного цикла выявляется ее ассоциация с КИГ. После завершения АЭГ данная ассоциация приобретает еще более выраженный характер. Присутствие в составе КИГ ранних эмбрионов мыши ключевых компонентов процесса транскрипции свидетельствует в пользу концепции, предполагающей возможность сборки в КИГ комплекса голоэнзима РНК-полимеразы II, а также взаимодействия КИГ с транскрипционно активными генами (Shopland et al., 2003).

В ходе экспериментов с использованием микроинъекций зондов, комплементарных поли(А)-хвосту РНК, в составе КИГ ранних эмбрионов нами выявлены полиаденилированные РНК (рис. 4).

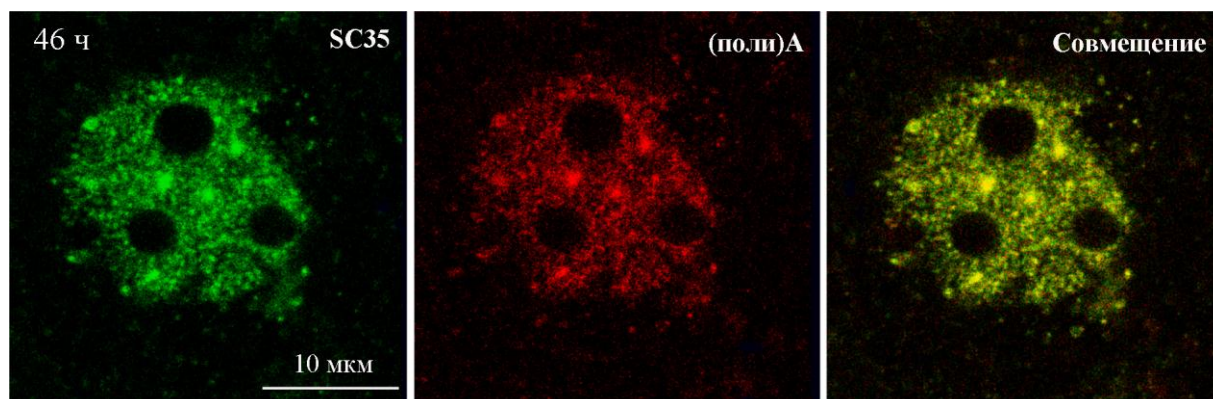


Рис. 4. Выявление поли(А)⁺-РНК в ядрах поздних двухклеточных эмбрионов мыши.

Ассоциация поли(А)⁺-РНК с КИГ характеризуется высокой степенью динамичности, однако она сохраняется в ядрах эмбрионов, обработанных ингибиторами транскрипции. Исходя из данных литературы, нельзя исключить возможность того, что по крайней мере часть поли(А)⁺-РНК, выявляемой в КИГ, является мРНК или пре-мРНК (Johnson et al., 2000; Molenaar et al., 2004; Smith et al., 2007; Schmidt et al., 2009). Активно разрабатывается модель, согласно которой КИГ участвуют в удержании мРНК перед ее экспортом из ядра в цитоплазму. Транскрипты генов, которые расположены на периферии КИГ, способны перемещаться через эти домены, временно задерживаясь в них. В это время они могут претерпевать дополнительные модификации перед экспортом мРНК из ядра.

В связи с потенциальным вовлечением КИГ в процессы транспорта мРНК мы изучили возможное присутствие в КИГ ядер эмбрионов с различным транскрипционным статусом некоторых белков, задействованных в процессах экспорта мРНК. Белки hnРNP семейства А/В начинают выявляться в пронуклеусах еще до начала процессов АЭГ, однако интенсивность мечения в данном случае очень низка, а ассоциация hnРNP с КИГ выражена крайне слабо, можно видеть только единичные спеклы, которые метятся и теми, и другими антителами. На ранней двухклеточной стадии (32 ч после ХГТ), то есть после завершения первого этапа АЭГ, hnРNP уже выявляются в ассоциации с КИГ. После завершения АЭГ на поздней двухклеточной стадии колокализация флуоресцентных сигналов, соответствующих белкам А/В hnРNP и белку SC35, становится еще более выраженной (рис. 5).

В отличие от hnРNP, фактор экспорта мРНК NXF1/TAP, принимающий участие в экспорте по меньшей мере 75 % всех проанализированных РНК

(Grüter et al., 1998; Erkmann, Kutay 2004), не был выявлен в составе КИГ ни на одной из изученных стадий, в том числе и в транскрипционно активных ядрах поздних двухклеточных эмбрионов. Следует, однако, отметить, что, хотя мы и не обнаружили NXF1/TAP в составе КИГ, иммунофлуоресцентное мечение, связанное с антителами к этому белку, выявлялось в непосредственной близости от их периферии. Данные результаты были подтверждены и на ультраструктурном уровне. В то же время при ингибировании транскрипции наблюдается выраженное накопление этого белка в КИГ, что может косвенно указывать на возможное участие этих структур в регуляции процессов транспорта мРНК посредством удержания некоторых молекул мРНК, структура которых нарушена, например, в результате нарушения процесса сплайсинга.

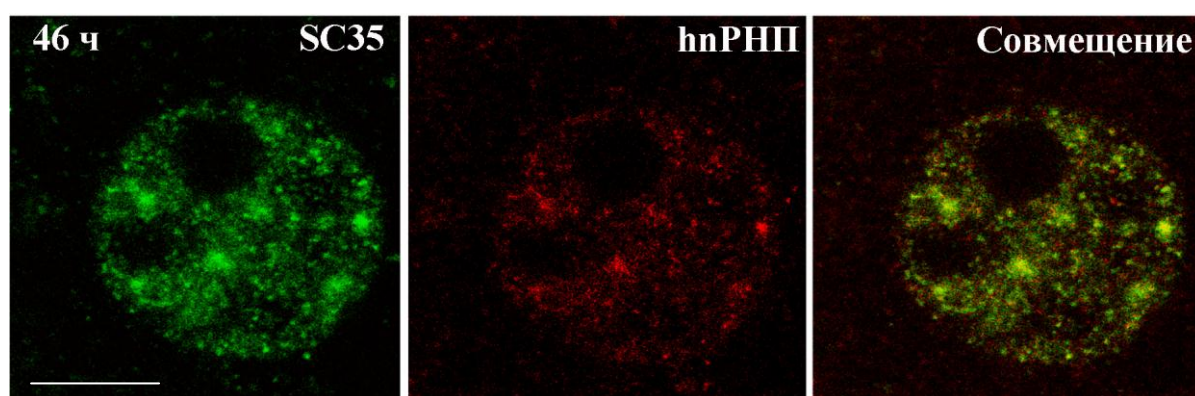


Рис. 5. Выявление гетерогенных ядерных РНП А/В (hnРНП) в ядрах поздних двухклеточных эмбрионов мыши. Масштабный отрезок 10 мкм.

В целом полученные нами данные позволяют заключить, что КИГ в ядрах ранних эмбрионов мыши после завершения АЭГ, как и в ядрах соматических клеток, представляют полифункциональные ядерные органеллы, задействованные в различных регуляторных механизмах экспрессии генов. При этом важнейшие компоненты метаболизма мРНК начинают выявляться в КИГ эмбрионов еще до осуществления основных событий АЭГ, то есть до начала возобновления транскрипции. Таким образом, в ядрах ранних эмбрионов мыши в ходе начальных этапов дробления происходит постепенное формирование КИГ, процесс которого включает как приобретение этими ядерными доменами дефинитивных морфологических признаков, так и поэтапное изменение молекулярного состава. В тоже время, несмотря на общие закономерности структурно-функциональной организации КИГ соматических клеток и дробящихся эмбрионов, КИГ в ядрах бластомеров характеризуются рядом функциональных особенностей, связанных с их формированием *de novo*. Прежде всего, это увеличение их размеров по мере возрастания транскрипционной активности ядер, тогда как для соматических клеток, как правило, характерна обратная зависимость.

1.3. Коилинсодержащие структуры в ядрах ранних эмбрионов мыши и их гетерогенность

Нами было проведено изучение морфологических особенностей, а также некоторых аспектов молекулярного состава коилинсодержащих телец в ранних эмбрионах мыши (Bogolyubova et al., 2014; Боголюбова, 2017). При выявлении коилина в ядрах поздних двухклеточных эмбрионов мыши (46 ч после введения ХГГ) наблюдали тельца двух типов: 1—3 крупные округлые структуры, размеры которых достигают 1 мкм, и мелкие точечные структуры, число которых колеблется в разных бластомерах. На стадии морулы (72 ч после введения ХГГ) в ядрах бластомеров крупные коилинсодержащие структуры не выявляются, а число мелких точечных коилин-позитивных зон уменьшается. Таким образом, популяция коилинсодержащих телец на поздней двухклеточной стадии дробления по своим морфологическим особенностям и молекулярному составу значительно отличается от коилинсодержащих телец, выявляемых в ядрах бластомеров морулы.

С нашей точки зрения, особый интерес представляют присутствующие в ядрах поздних двухклеточных эмбрионов крупные коилин-позитивные тельца, которые, согласно результатам двойного иммуномечения, содержат РНК-полимеразу I, шаперон нуклеиновых кислот YB-1 (рис. 6), а также актин.

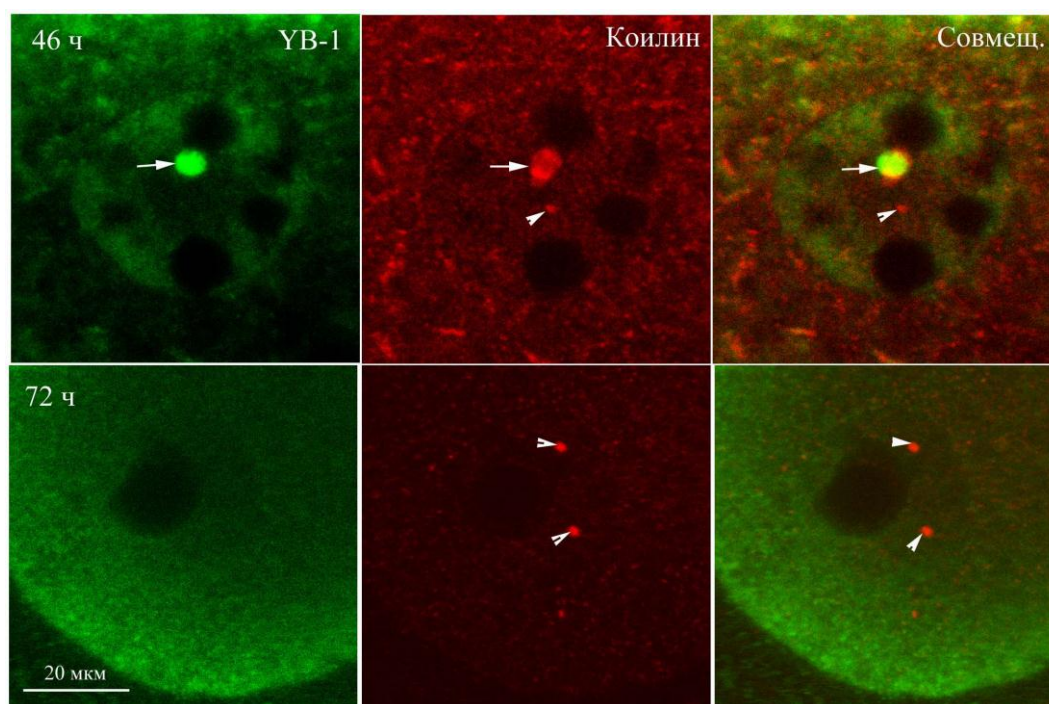


Рис. 6. Одновременное выявление коилина и фактора транскрипции YB-1 в ядрах двухклеточных эмбрионов мыши (46 ч) и эмбрионов на стадии морулы (72 ч). YB-1 выявляется в крупных (*стрелки*), но не в мелких (*головки стрелок*) коилин-позитивных структурах.

Перечисленные антигены на поздней двухклеточной стадии локализуются только в крупных коилин-позитивных тельцах, тогда как в мелких структурах, окрашиваемых с помощью антител к коилину, эти белки не выявляются. Коилин-позитивные тельца в ядрах эмбрионов на более поздней стадии развития также не содержат РНК-полимеразы I, УВ-1 и актина.

Тесные функциональные взаимосвязи телец Кахаля (ТК), маркерным белком которых является коилин, с ядрышками, как и присутствие в ТК некоторых ключевых ядрышковых белков являются общепризнанными фактами (Ходюченко, Красикова, 2014). Актин не является конститутивным компонентом ТК или других типов коилинсодержащих внутриядерных телец, однако в литературе имеются данные о выявлении актина не только в ТК культивируемых клеток человека (Gedge et al., 2005), но и в ТК клеток растений (Cruz, Moreno Díaz de la Espina, 2009). Обнаружение нами РНК-полимеразы I, УВ-1 и актина только в крупных коилин-позитивных тельцах указывает на гетерогенность коилин-позитивных структур в ядрах двухклеточных эмбрионов мыши не только по их размерам, но и по молекулярному составу.

На основе изложенных выше данных о гетерогенности коилинсодержащих телец на поздней двухклеточной стадии эмбриогенеза мыши нами было сделано предположение о том, что часть из них может представлять классические ТК, а часть – тельца гистоновых локусов (ТГЛ). В настоящее время ТК и ТГЛ рассматривают как разные типы внутриядерных телец. В состав ТГЛ входят факторы, необходимые для процессинга 3'-конца молекул пре-мРНК гистонов, а в состав ТК – компоненты постранскрипционной модификации сплайсосомных РНК (Ходюченко, Красикова, 2014). Для выявления ТГЛ в ядрах эмбрионов мы провели одновременное выявление коилина и симплекина, который является одним из молекулярных компонентов ТГЛ (Mandel et al., 2008). Согласно полученным результатам, ни крупные, ни мелкие коилин-позитивные домены не содержат симплекина, который в ядрах поздних двухклеточных эмбрионов мыши локализуется в 1—2 округлых хорошо сформированных тельцах, которые наблюдали как вблизи коилин-позитивных структур (рис. 7), так и на значительном удалении от них.

Можно полагать, что крупные коилинсодержащие тельца являются провизорными ядерными доменами, образующимися в связи с выраженными изменениями ядерного метаболизма на завершающих этапах АЭГ и начальных стадиях реактивации ядрышковой транскрипции. При этом морфофункциональную гетерогенность коилинсодержащих телец нельзя объяснить наличием в их популяции ТГЛ, поскольку выявляемые в ядрах эмбрионов мыши симплекин-позитивные структуры не содержали коилина.

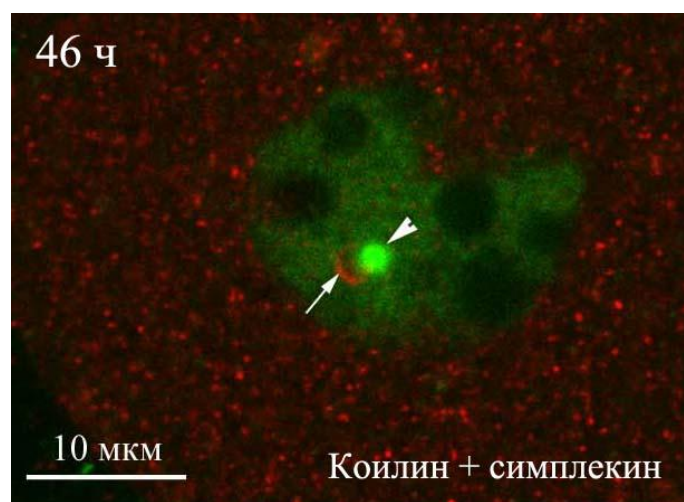


Рис. 7. Одновременное выявление симплекина (зеленый сигнал) и коилина (красный сигнал) в ядрах двухклеточных эмбрионов мыши.

1.4. Гетерохроматин, ассоциированный с проядрышками

Подавляющее большинство проядрышек окружены кольцеобразной зоной гетерохроматина, которую можно отчетливо наблюдать после окрашивания DAPI (рис. 1). Данные, полученные нами с помощью непрямого иммунофлуоресцентного мечения (табл. 1), позволяют заключить, что молекулярный состав ассоциированного с проядрышками гетерохроматина изменяется в ходе реализации АЭГ, а также при искусственном подавлении транскрипционной активности (Боголюбова и др., 2015; Bogolyubova, Bogolyubov, 2015; Sailau,... Bogolyubova, 2017).

Интересно, что на ранних (транскрипционно неактивных) стадиях в составе хроматина, ассоциированного с проядрышками, выявляются некоторые факторы метаболизма мРНК (фактор сплайсинга SC35 и фактор транскрипции TFIIID). Напротив, на более поздних стадиях развития в изучаемой области начинают выявляться другие ядерные белки, например коровый компонент EJC – Y14, хроматинремоделирующий белок ATRX, белок Daхх, являющийся шапероном H3me3K9 (табл. 1).

Интересным наблюдением, с нашей точки зрения, является обнаружение в составе гетерохроматина, окружающего проядрышки, ядерного актина, иммуноцитохимическое мечение которого является наиболее выраженным на транскрипционно активной двухклеточной стадии дробления. При подавлении транскрипционной активности актин продолжает выявляться вокруг проядрышек, более того, появляются дополнительные зоны его локализации. После обработки препаратов ДНКазой интенсивность мечения актина вокруг проядрышек резко снижается, что позволяет предположить его непосредственное взаимодействие с ДНК.

Таблица 1

**Иммуноцитохимическая локализация некоторых ядерных антигенов
в составе гетерохроматина, ассоциированного с проядрышками**

Выявляемый антиген	Ранняя зигота (20—24 ч)		Поздняя зигота (27—28 ч)		Поздняя 2-клеточная стадия (46—48 ч)	Искусственное ингибирование транскрипции
	f	m	f	m		
H3me3K9	++	–/+	++	–/+	+/++	н/д
H4acK5	–	+	–	+	+/++	н/д
Актин	–	+	–	+	++	↑
Фактор сплайсинга SC35	+	+	–	–	–	–
Базальный фактор транскрипции TFIID	+	+	–	–	–	–
Хроматин-ремоделирующий белок ATRX	–	–	+	+	++	+
Шаперон гистона H3me3K9 белок Daхх	+	+	++	++	++	н/д
Компонент EJC Y14	–	–	–	–	+	↑

Примечание: «–» – отсутствие мечения; «+» – слабое мечение, «++» – сильное мечение, «↑» – появление дополнительных зон мечения; аналогичная система обозначений используется для характеристики транскрипционной активности изученных стадий; f – женский пронуклеус, m – мужской пронуклеус, н/д – нет данных.

Важно отметить, что молекулярный состав гетерохроматина, ассоциированного с разными проядрышками, может быть различен. Это наблюдение хорошо иллюстрируют особенности распределения белка ATRX, который выявляется по периферии только некоторых проядрышек эмбриона. Не исключено, что особенности молекулярного состава гетерохроматина, окружающего проядрышки, отражают функциональную гетерогенность морфологически сходных проядрышек по их компетентности к процессу нуклеологенеза.

В целом наши наблюдения показывают, что ассоциированный с проядрышками гетерохроматин в 1—2-клеточных эмбрионах мыши имеет своеобразный молекулярный состав, отличный от такового периферического гетерохроматина. Так как ядра бластомеров млекопитающих на ранних стадиях

дробления представляют уникальную динамичную систему (Bogolyubova, Bogolyubov, 2014), можно предположить, что ряд функциональных доменов в ядрах ранних эмбрионов и, в частности, окружающий проядрышки гетерохроматин имеют более широкий спектр функций, нежели в соматических клетках. На основе имеющихся данных представляется вероятным, что в начале эмбриогенеза гетерохроматин, ассоциированный с проядрышками, представляет не просто область локализации репрессированного хроматина, но некий структурный скаффолд для формирования дефинитивной 3D-архитектоники клеточного ядра.

Таким образом, комплекс проядрышка с окружающим его гетерохроматином, с нашей точки зрения, можно рассматривать как мультифункциональный провизорный домен ранних эмбрионов на стадии активации эмбрионального генома, оба компонента которого во многом функционируют как единое целое.

1.5. Структурные перестройки ядер эмбрионов после искусственного подавления транскрипционной активности

Искусственное подавление транскрипции в ядрах поздних двухклеточных эмбрионов проводили с помощью двух ингибиторов, имеющих разный механизм действия – DRB и актиномицина D.

После культивирования эмбрионов в среде с добавлением DRB в течение 3 ч не наблюдали выраженных изменений распределения хроматина по сравнению с контрольными эмбрионами, культивировавшимися в тех же условиях, тогда как после использования актиномицина D общая картина ядерной морфологии, выявляемая с помощью DAPI, значительно изменяется. Если в норме проядрышки имеют сферическую форму, то при ингибировании транскрипции эмбрионов с помощью актиномицина D проядрышки приобретают удлинённую или неправильную форму. Сферические зоны гетерохроматина, локализованные в нуклеоплазме и характерные для других эмбрионов того же возраста, после использования актиномицина D не обнаруживаются.

Для интерхроматинового пространства ядра эмбрионов после искусственного подавления транскрипционной активности как с помощью DRB, так и с помощью актиномицина D характерно выраженное изменение морфологии КИГ, которые становятся более крупными и приобретают округлую форму, а составляющие их отдельные гранулы на ультраструктурном уровне выглядят более контрастными и приобретают вид «бусин на нитке».

После инкубации эмбрионов с ингибиторами транскрипционной активности также происходит изменение молекулярного состава КИГ, которые

начинают накапливать целый ряд ключевых компонентов метаболизма мРНК, в том числе гиперфосфорилированную форму РНК-полимеразы II, hnРНК, а также некоторые белки, задействованные в экспорте мРНК, например NXF1/TAP (рис. 8). Искусственное подавление транскрипционной активности приводит к накоплению в КИГ полиаденилированных РНК.

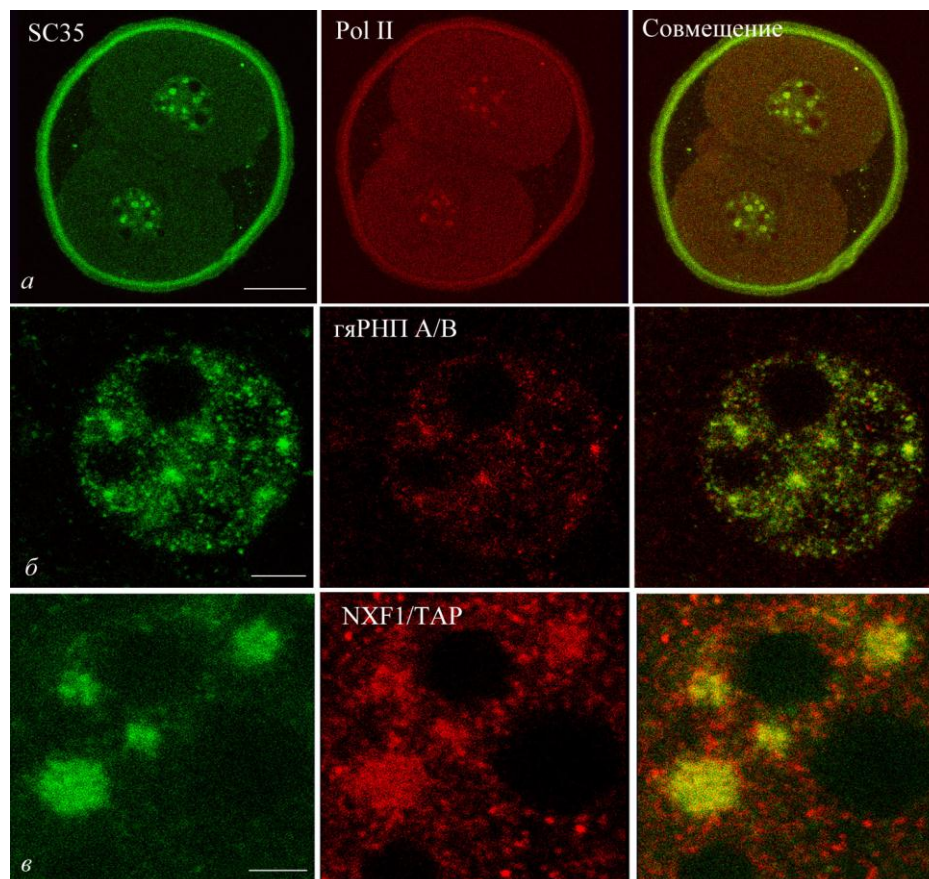


Рис. 8. Накопление в КИГ гиперфосфорилированной формы РНК-полимеразы II, hnРНК семейства А/В (гяРНК А/В) и фактора экспорта мРНК NXF1/TAP после искусственного подавления транскрипции с помощью DRB (а, в) и актиномицина D (б).

Масштабные отрезки: а – 20 мкм, б – 10 мкм, в – 5 мкм.

Что касается коилинсодержащих телец, то искусственное подавление транскрипционной активности (как с помощью DRB, так и актиномицина D) приводило к исчезновению крупных коилин-позитивных телец, при этом происходила концентрация коилина по периферии проядрышек. Параллельно с этим происходило перераспределение симплекина, которое заключалось в исчезновении округлых симплекин-позитивных структур и появлении в нуклеоплазме большого числа крупных симплекин-позитивных областей с нечетко выраженными границами. Колокализации коилина и симплекина после ингибирования транскрипции, как и в контроле, выявлено не было.

Таким образом, искусственное подавление транскрипционной активности приводит к выраженным перестройкам ключевых структур

интерхроматинового пространства эмбрионов независимо от механизма действия ингибитора. Перестройки хроматинового компартмента и проядрышек выражены только при использовании актиномицина D, что, по-видимому, связано с его интеркалирующим действием на ДНК. При этом общая картина структурной организации ядер эмбрионов после искусственного ингибирования транскрипции существенно отличается от таковой у эмбрионов до начала АЭГ.

2. Структурно-функциональная организация ядер эмбрионов мыши в состоянии «двухклеточного блока in vitro»

Дробление эмбрионов многих инбредных линий млекопитающих при их культивировании в классических эмбриональных средах начиная с одноклеточной стадии прекращается на видоспецифичной стадии. У мышей данный феномен получил название «двухклеточный блок in vitro» (Goddard, Pratt, 1983). Активные исследования в области разработки вспомогательных репродуктивных технологий привели к разработке новых комплексных сред для культивирования, которые позволяют получать полное доимплантационное развитие эмбрионов (Chatot et al., 1989; Lawitts, Biggers, 1991; Gardner, Lane, 1996). После этого остановку развития in vitro стали рассматривать как артефакт, обусловленный культивированием эмбрионов в субоптимальных условиях. Мы не склонны разделять данную точку зрения и полагаем, что подобная остановка развития с сохранением жизнеспособности эмбрионов и частичной реализацией их программы развития представляет собой интересную модель, изучение которой позволяет получить новые данные как относительно закономерностей раннего эмбрионального развития, так и относительно общих механизмов функционирования клеточного ядра.

В связи с этим нами было проведено исследование структурно-функциональной организации ядер эмбрионов блокирующейся линии мышей BALB/c в состоянии двухклеточного блока in vitro. Для исследования нами были выбраны три временные точки: эмбрионы в возрасте 46 ч после ХГГ (так называемый «предблок»), эмбрионы в возрасте 72 ч после ХГГ (находящиеся в состоянии блока 1 сут) и эмбрионы в возрасте 96 ч после ХГГ (находящиеся в состоянии блока 2 сут) (Боголюбова, Боголюбова, 2006; Bogolyubova et al., 2006; Bogolyubova, 2011).

Согласно нашим результатам, эмбрионы блокирующейся линии BALB/c, культивируемые в среде МЗ с одноклеточной стадии, с момента вступления в блок и в течение первых 24 ч в состоянии блока сохраняют свою жизнеспособность. Ультраструктурный анализ демонстрирует, что у заблокированных эмбрионов сохраняется не только структурная целостность

цитоплазмы, но и в ядре не наблюдается каких-либо морфологических отличий от нормально развивающихся эмбрионов и, тем более, морфологических признаков дегенерации (рис. 9). Как и в ядрах контрольных эмбрионов, наиболее заметными структурами ядер являются проядрышки, однако их количество у длительно блокированных эмбрионов уменьшается до 1—2. В большинстве проядрышек наблюдаются небольшие округлые зоны меньшей электронной плотности (рис. 9, *а*). Подобные особенности проядрышек у контрольных двухклеточных эмбрионов наблюдаются только в единичных случаях, однако практически всегда выявляются в проядрышках эмбрионов начиная с четырехклеточной стадии.

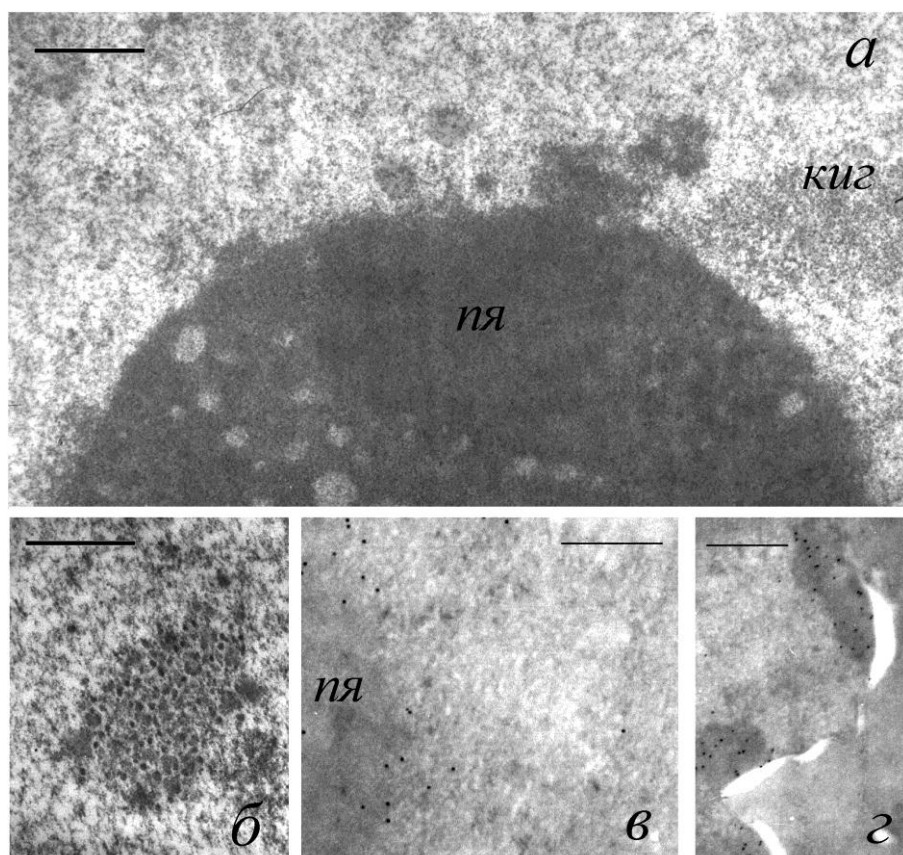


Рис. 9. Фрагменты ядер эмбрионов BALB/с в состоянии двухклеточного блока *in vitro*. *а—б* – рутинная электронная микроскопия, масштабные отрезки – 1 мкм; *в—г* – иммуноэлектронное выявление ДНК, масштабные отрезки – 0.5 мкм; *киг* – кластер интерхроматиновых гранул, *ня* – проядрышко.

Типичные для двухклеточных эмбрионов гранулярные ядерные структуры, такие как КИГ (рис. 9, *а*) и скопления крупных гранул (до 80 нм в диаметре), также выявляются в ядрах блокированных эмбрионов. Единственной особенностью, которую можно интерпретировать как морфологическое отражение процессов снижения жизнеспособности блокированных эмбрионов, является появление выраженных зон высококонденсированного хроматина по периферии ядер. Эти наблюдения,

сделанные на светооптическом уровне, подтверждаются данными иммуноэлектронной микроскопии (рис. 9, *г*); при этом сохраняется ассоциация хроматина с периферией проядрышек (рис. 9, *в*).

В то же время эксперименты с использованием микроинъекций Br-УТФ показали, что, несмотря на отсутствие выраженных морфологических изменений, блокированные эмбрионы характеризуются снижением транскрипционной активности. Уже у эмбрионов, развивавшихся *in vitro* в течение 1 сут (предблок), интенсивность флуоресценции визуально была ниже, чем у эмбрионов, развивавшихся *in vivo*. Еще через 1 сут культивирования *in vitro* в ядрах выявляются только единичные сайты транскрипционной активности, а через следующие 24 ч культивирования включение Br-УТФ полностью прекращается примерно в 50 % эмбрионов.

Данные о постепенном затухании транскрипционной активности по мере нахождения эмбрионов в блоке согласуются с результатами проведенного нами иммуноцитохимического исследования, которое выявило значительное перераспределение ряда компонентов метаболизма мРНК по сравнению с контрольными двухклеточными эмбрионами. В первую очередь следует отметить накопление в увеличенных КИГ гиперфосфорилированной формы РНК-полимеразы II, которое обнаруживается уже через 1 сут нахождения эмбрионов в заблокированном состоянии (рис. 10).

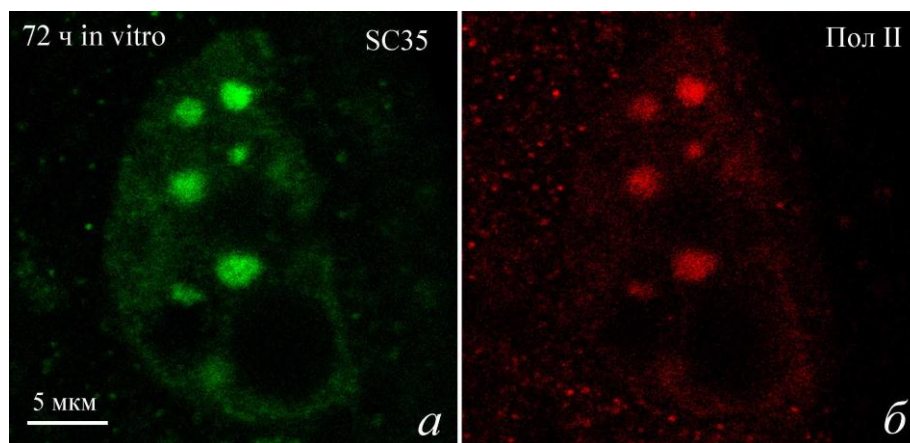


Рис. 10. Иммунофлуоресцентное выявление фактора сплайсинга SC35 (*а*) и гиперфосфорилированной формы РНК-полимеразы II (*б*) в эмбрионах BALB/с, находящихся в состоянии блока *in vitro* в течение 24 ч.

С нашей точки зрения, блок представляет собой особое функциональное состояние, которое, возможно, имеет адаптивный характер, приостанавливая реализацию процессов АЭГ при отклонении параметров среды от нормы. Однако ряд структурно-функциональных особенностей организации ядер блокированных эмбрионов, таких как уменьшение числа проядрышек, локальное уменьшение их электронной плотности, включение Br-УТФ по

периферии некоторых проядрышек, позволяют предположить, что процессы нуклеологенеза могут частично реализовываться в отсутствие основных событий АЭГ. Следует отметить, что при сохранении своей ультраструктурной организации ядра блокированных эмбрионов характеризуются значительным перераспределением ряда ключевых факторов транскрипции и сплайсинга пре-мРНК. Данное наблюдение не вызывает удивления, так как в большом количестве работ показана динамичность доменной организации клеточного ядра и чрезвычайно быстрое изменение локализации факторов метаболизма мРНК в зависимости от изменения транскрипционной активности (Misteli, 2000).

3. Актин в ядрах ранних эмбрионов мыши

В настоящее время продемонстрировано вовлечение ядерного актина в механизмы поддержания функциональной компартментализации клеточного ядра и регуляции процессов генной экспрессии. В связи с этим нами было проведено иммуноцитохимическое исследование внутриядерного распределения актина в ранних эмбрионах мыши в период АЭГ. Основной целью данной части работы являлась попытка с помощью иммуноморфологических подходов ответить на вопрос о преимущественной форме актина в ядрах эмбрионов мыши, а также выявление возможной ассоциации актина с теми или иными ядерными компартментами (Боголюбова, Боголюбова, 2009; Bogolyubova, 2009; Боголюбова, 2012; Боголюбова, Парфенов, 2012; Bogolyubova et al., 2013).

3.1. Особенности локализации различных форм актина в ядрах эмбрионов

Нами была предпринята попытка локализовать в ядрах ранних эмбрионов различные функциональные формы актина: мономерный актин, выявляемый с помощью ДНКазы I (Lacks, 1981; Pinder, Gratzer, 1982), фибриллярный актин, выявляемый с помощью фаллоидина, а также актин, выявляемый иммуноцитохимически с помощью антител, выработанных к разным фрагментам его молекулы.

При использовании ДНКазы I, конъюгированной с флуорохромом, наблюдали два варианта мечения ядер. Для большинства зародышей было характерно заметное флуоресцентное мечение всего объема ядер (за исключением мест локализации проядрышек), на фоне которого можно наблюдать отдельные зоны более яркой флуоресценции (рис. 11, а). При этом в случае одновременной визуализации мономерного актина и хроматина колокализация была выражена крайне слабо (рис. 11, а'). В то же время у некоторых зародышей ядра оставались полностью немечеными (рис. 11, б).

Можно предположить, что данные различия в окрашивании ядер эмбрионов ДНКазой I отражают различия их жизнеспособности.

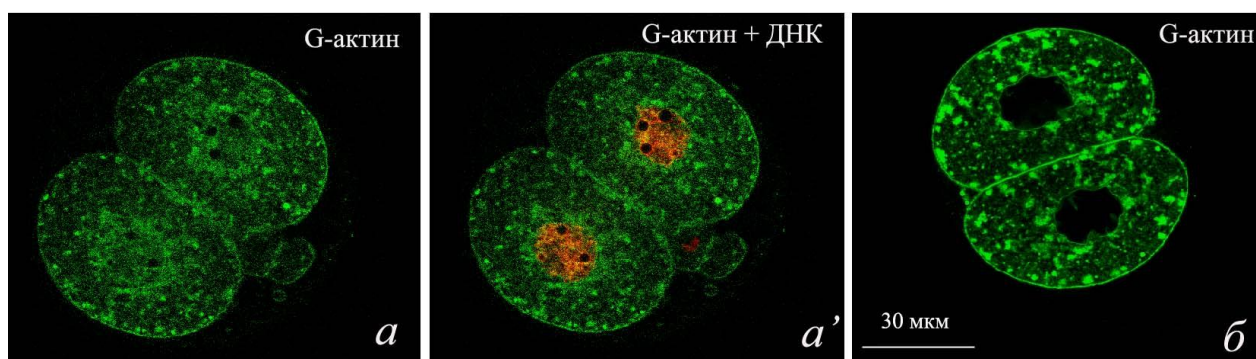


Рис. 11. Локализация мономерного актина в поздних двухклеточных эмбрионах мыши. Обработка ДНКазой I, конъюгированной с Alexa-488 (зеленый сигнал), и TO-PRO-3 (красный сигнал).

При использовании TRITC-фаллоидина наибольшая интенсивность свечения была характерна для кортикальной зоны цитоплазмы и области межбластомерного контакта. В местах расположения ядер в контрольных двухклеточных эмбрионах наблюдали чрезвычайно слабое равномерное свечение, не позволяющее визуализировать какие-либо внутриядерные структуры (рис. 12).

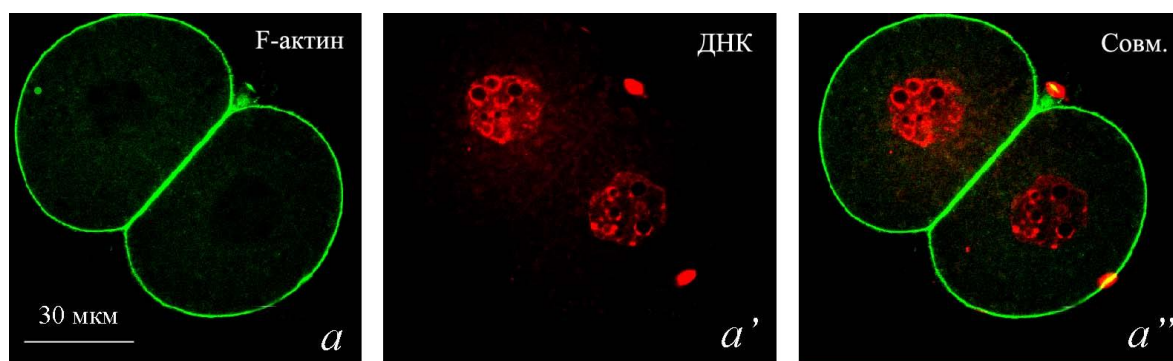


Рис. 12. Локализация фибриллярного актина в поздних двухклеточных эмбрионах мыши. Обработка TRITC-фаллоидином (зеленый сигнал, цвет изменен искусственно) и TO-PRO-3 (красный сигнал).

Также нами были использованы коммерческие антитела к актину двух типов: выработанные к С-концевому домену молекулы актина (С-антитела) и к N-концевому домену молекулы актина (N-антитела). В экспериментах по иммунофлуоресцентной локализации актина в ядрах двухклеточных эмбрионов мыши паттерны окрашивания при использовании С- и N-антител существенно различались. Интенсивность мечения ядра по сравнению с цитоплазмой была гораздо выше при использовании С-антител (рис. 13, а). Одновременное использование TO-PRO-3 для флуоресцентного выявления ДНК (рис. 13, а') позволяет отметить, что С-антитела связываются прежде всего с областями

конденсированного хроматина (рис. 13, a''). Колокализация особенно выражена по периферии проядрышек, при этом сами они остаются практически неокрашенными.

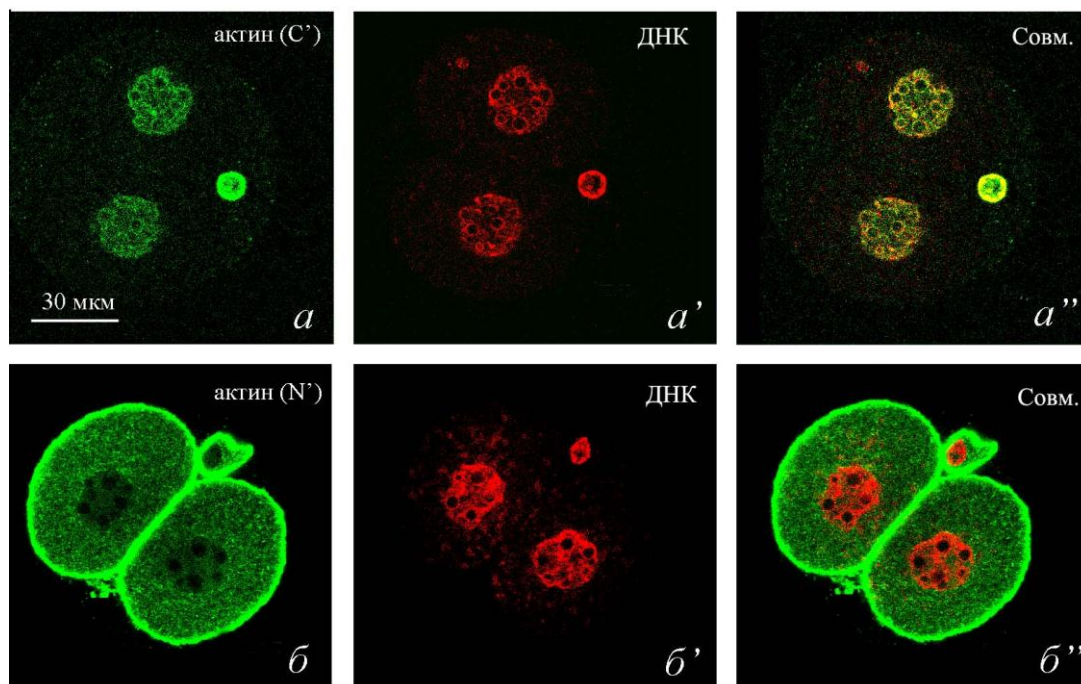


Рис. 13. Выявление актина в эмбрионах мыши на поздней двухклеточной стадии при использовании антител к С-концевому домену (C') и к N-концевому домену молекулы актина (N').

Совершенно другой паттерн флуоресценции регистрируется при использовании N-антител (рис. 13, b). Прежде всего, обращает на себя внимание интенсивное мечение кортикального слоя цитоплазмы, что никогда не наблюдается при использовании С-антител. Интенсивность мечения цитоплазмы при использовании N-антител значительно выше, чем интенсивность мечения нуклеоплазмы. Проядрышки и ассоциированный с их периферией конденсированный хроматин остаются неокрашенными. Одновременное использование N-антител и TO-PRO-3 (рис. 13, b') также позволяет наблюдать колокализацию между областями флуоресценции, прежде всего в зонах менее конденсированного хроматина (рис. 13, b'').

Колокализация флуоресцентных сигналов, наблюдаемых при одновременном использовании С- или N-антител и маркера G-актина – ДНКазы I, выражена слабо, носит диффузный характер и визуализируется только с помощью специального программного обеспечения.

Таким образом, на основании полученных нами данных можно заключить, что актин в ядрах ранних эмбрионов мыши находится преимущественно в олигомерной форме, а также в форме мономерного актина (G-актина). При этом можно с уверенностью говорить об отсутствии в ядрах

бластомеров зародышей мыши фибриллярного актина (F-актина), выявляемого с помощью флуоресцентно меченого фаллоидина. Эти результаты полностью соответствуют сложившимся представлениям об основных формах внутриядерного актина (Bettinger et al., 2004; Pedersen, 2008). Наряду с этим параллельные исследования с использованием TRITC-фаллоидина и антител к С- и N-концевым фрагментам молекулы актина позволяют заключить, что антитела к С-концевому фрагменту, использованные в данной работе, в отличие от антител к N-концевому фрагменту, не в состоянии взаимодействовать с классическими актиновыми филаментами, в которых С-концевой фрагмент, по-видимому, недоступен для непосредственного взаимодействия с иммуноглобулинами.

Первоначально нами было выдвинуто предположение о том, что используемые нами поликлональные антитела к С- и к N-концевым фрагментам молекулы актина избирательно выявляют в ядрах эмбрионов мыши две функционально различные формы олигомерного актина: антитела к N-концевому фрагменту (N-антитела) – преимущественно молекулы актина, тем или иным образом участвующие в процессе транскрипции, тогда как антитела к С-концевому фрагменту (С-антитела) – молекулы актина, прежде всего обеспечивающие пространственную организацию хроматина (Боголюбова, Боголюбова, 2009). Для проверки данной рабочей гипотезы был проведен анализ колокализации выявляемых форм ядерного актина с сайтами транскрипции, осуществляемой с участием РНК-полимеразы I и РНК полимеразы II, а также паттерна иммунофлуоресцентного окрашивания ядерного актина в двухклеточных эмбрионах мыши при искусственном ингибировании транскрипции и после ферментативного расщепления ДНК.

Для локализации новосинтезированных транскриптов мРНК были использованы микроинъекции Br-УТФ. При одновременном иммунофлуоресцентном выявлении актина и Br-УТФ колокализация сигнала наблюдалась как при использовании С-антител, так и при использовании N-антител. При одновременном выявлении РНК-полимеразы I и актина колокализация флуоресцентных сигналов также выявлялась при использовании как С-, так и N-антител на поздней двухклеточной стадии, но не на стадии морулы. Достаточно высокая интенсивность и характер распределения колокализации ядерного актина и Br-УТФ, а также отсутствие колокализации при выявлении актина и РНК-полимеразы I на стадии морулы позволяет предположить, что в данном случае мы выявляем, скорее всего, не молекулы актина, функционирующие непосредственно в области сайтов транскрипции, а молекулы, находящиеся в ассоциации с новообразованными мРНК (Visa, Percipalle, 2010). По всей видимости, чувствительность метода

иммунофлуоресцентного анализа недостаточна для выявления молекул актина, непосредственно ассоциированных с сайтами транскрипции.

Как уже отмечалось, при использовании антител к С-концевому домену молекулы актина интенсивность окрашивания ядер эмбрионов мыши выше, чем интенсивность окрашивания цитоплазмы, при этом обращает на себя внимание ассоциация актина с периферией проядрышек (рис. 13, *a*). При обработке эмбрионов ДНКазой окрашивание ядер с помощью С-антител сохраняется, однако характер его несколько видоизменяется. Прежде всего, значительно снижается интенсивность мечения на периферии проядрышек. В нуклеоплазме в ряде случаев можно наблюдать появление отдельных областей более интенсивного мечения.

При использовании антител к С-концевому домену актина после ингибирования транскрипции, как с помощью DRB, так и с помощью актиномицина D, обращает на себя внимание усиление флуоресценции на периферии проядрышек, где начинают выявляться многочисленные области более интенсивной флуоресценции. После обработки ДНКазой количество подобных структур и интенсивность их флуоресценции уменьшаются.

При использовании антител к N-концевому домену молекулы актина после обработки эмбрионов ДНКазой какого-либо изменения паттерна окрашивания нами не выявлено, как и после искусственного подавления транскрипционной активности независимо от использованного ингибитора. Таким образом, мы наблюдали изменение внутриядерного паттерна распределения актина при искусственном подавлении транскрипции в случае использования антител к С-концевому, но не к N-концевому домену молекулы актина.

В заключение следует отметить, что все изменения распределения актина в ядрах эмбрионов после экспериментальных обработок отмечались только при использовании С-антител. Таким образом, нам не удалось подтвердить первоначальную гипотезу о выявлении антителами к С- и N-концевому доменам молекулы актина разных функциональных форм актина, находящихся в функциональных взаимосвязях с хроматином и с аппаратом транскрипции, соответственно. По всей видимости, наблюдаемая разница в паттернах иммунофлуоресцентного выявления актина при использовании антител к С- и N-концевому домену его молекулы связана с разной интенсивностью мечения ядер эмбрионов. Можно предположить, что, несмотря на сходную интенсивность связывания данных антител с актином на иммуноблотах, антитела к N-концевому домену в силу своих физико-химических особенностей обладают меньшей способностью связываться с ядерным актином при мечении тотальных препаратов эмбрионов мыши.

3.2. Топологическое взаимодействие внутриядерного актина и факторов экспорта мРНК

Не подлежит сомнению, что ядерный актин вовлечен в большое число функций, включая не только реализацию транскрипции и ее регуляцию, но также процессинг и экспорт мРНК (Visa, Percipalle, 2010), однако все экспериментальные доказательства участия актина в процессах метаболизма мРНК получены на соматических клетках. Нами была предпринята попытка продемонстрировать пространственные взаимодействия актина и некоторых белков комплекса связи экзона (EJC) в ядрах ранних эмбрионов мыши с помощью методики FRET. Были изучены возможные пространственные взаимодействия актина с белками, представляющими различные структурные уровни организации EJC: коровым белком Y14, белком «оболочки» Aly/REF и белком NXF1/TAP, временно взаимодействующим с EJC. В качестве негативного контроля использовали участки препарата, не подвергавшиеся фотообесцвечиванию, а также ядра направительных телец, которые представляют собой остаточный продукт оогенеза и деградируют на ранних стадиях эмбрионального развития. FRET-положительный сигнал не выявлялся в ядрах направительных телец ни для одной из пар изученных антигенов.

В случае FRET-анализа пары актин—Aly (рис. 14) в мужских пронуклеусах FRET-сигнал был более выражен в проядрышках, нежели в нуклеоплазме (~20 и 1 %, соответственно) (рис. 14, *ряд б*). В ядрах поздних двухклеточных эмбрионов FRET-сигнал имел сходную эффективность как в проядрышках, так и в нуклеоплазме (~11 %) (рис. 14, *ряд в*; табл. 2). После искусственного подавления транскрипционной активности FRET-эффективность (~14 %) была сходна с таковой в контрольной группе эмбрионов (рис. 14, *ряд г*; табл. 2).

В транскрипционно активных ядрах поздних двухклеточных эмбрионах для пары NXF1/TAP—актин также выявляли два типа FRET-позитивных зон: ассоциированные с проядрышками (FRET-эффективность около 11.5 %) и случайным образом распределенные в нуклеоплазме (FRET-эффективность около 13.4 %). В некоторых участках ядра FRET-эффективность достигала 25—30 %. Следует отметить, что если FRET-сигнал в нуклеоплазме пронуклеусов зиготы носил диффузный характер, то на поздней двухклеточной стадии можно было наблюдать выраженные FRET-позитивные области. После искусственного подавления транскрипционной активности средние значения FRET-эффективности в проядрышках и нуклеоплазме снижались до 9.7 и 8.0 %, соответственно, однако эти отличия от контрольных эмбрионов не являлись статистически достоверными (табл. 2).

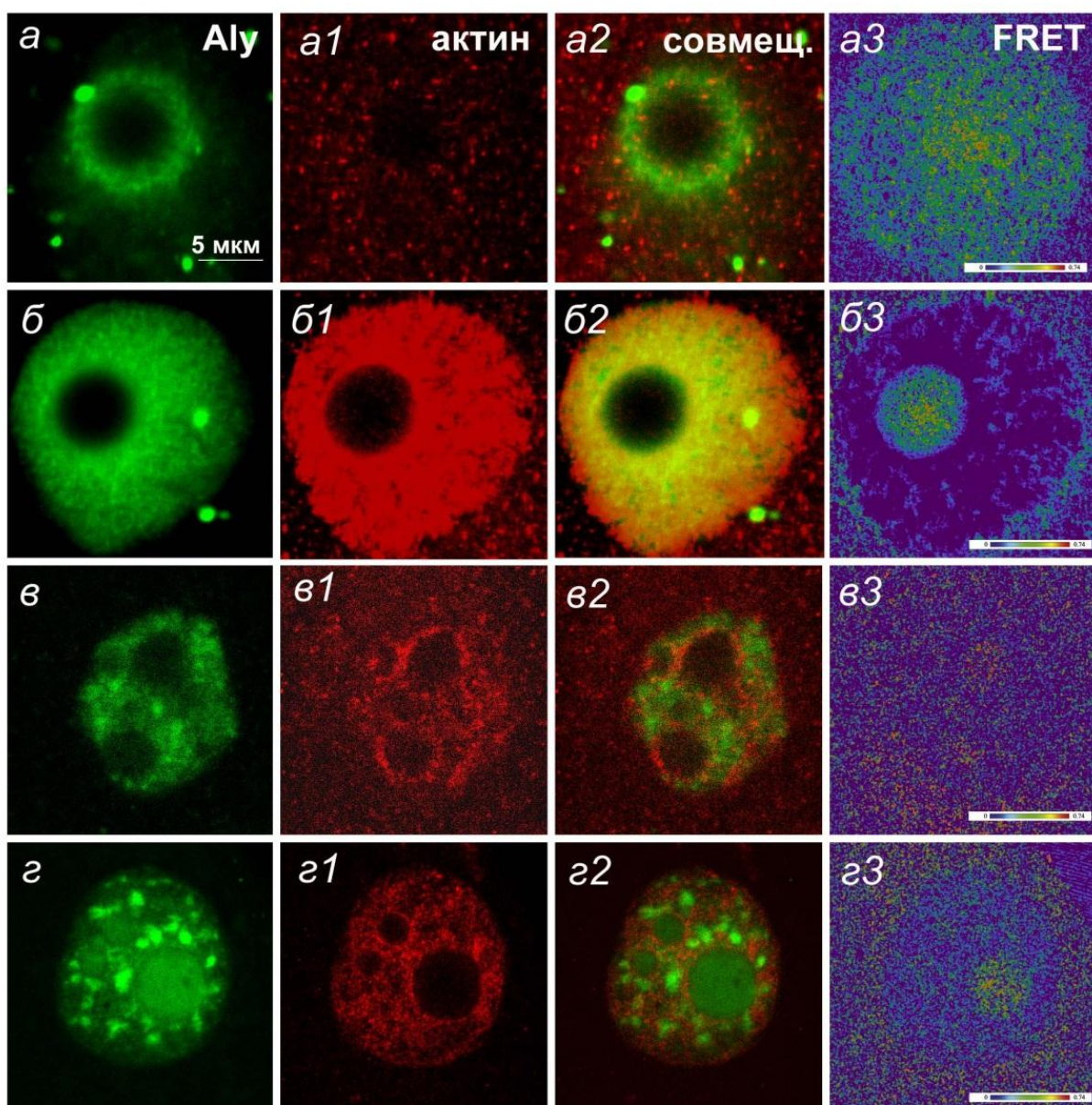


Рис. 14. FRET-анализ для пары Aly—актин. Ряд *а* и *б* – зигота (24 ч после ХГГ), женский и мужской пронуклеус соответственно; ряд *в*, *г* – ядра поздних двухклеточных эмбрионов (46 ч после ХГГ), контроль и обработка DRB, соответственно.

Сходный паттерн распределения FRET-сигнала наблюдали и в случае пары актин—Y14. В этом случае FRET-позитивные зоны также обнаруживали в проядрышках и в нуклеоплазме. В то же время FRET-эффективность в нуклеоплазме женских пронуклеусов (~19 %), была выше, чем в мужских (~7 %), а также в транскрипционно активных ядрах поздних двухклеточных эмбрионов (~15 %). FRET-эффективность и в проядрышках, и в нуклеоплазме снижалась после обработки эмбрионов РНКазой (рис. 15). После обработки DRB двухклеточных эмбрионов FRET-сигнал сохранялся в нуклеоплазме и в проядрышках (табл. 2).

Количественный анализ эффективности FRET в транскрипционно активных и обработанных DRB двухклеточных эмбрионах

		Y14—актин	Aly—актин	NXF1—актин
Контрольные двухклеточные эмбрионы	проядрышки	13.8 ± 7.1 n = 18	11.8 ± 7.2 n = 13	11.5 ± 6.0 n = 11
	нуклеоплазма	15.0 ± 5.4 n = 18	11.3 ± 5.9 n = 13	13.4 ± 5.1 n = 11
Двухклеточные эмбрионы после обработки DRB	проядрышки	15.1 ± 5.9 n = 8	14.1 ± 6.6 n = 10	9.7 ± 2.8 n = 7
	нуклеоплазма	15.9 ± 3.9 n = 8	13.9 ± 5.5 n = 10	8.0 ± 3.5 n = 7
Фон (негативный контроль)		0.1 ± 0.3	0.1 ± 1.1	2.5 ± 1.3

Примечание. В качестве негативного контроля использовали участки препаратов, не подвергавшиеся фотоотбеливанию. Данные представлены в форме «среднее значение $\pm \sigma$ ». Статистически достоверные различия между контрольными и обработанными DRB эмбрионами отсутствуют ($p \leq 0.5$). n – число проанализированных эмбрионов.

В целом полученные нами результаты можно рассматривать как косвенные доказательства участия ядерного актина в процессах экспорта мРНК в ранних эмбрионах мыши. Использование техники FRET позволило нам выявить тесные пространственные взаимосвязи между актином и всеми изученными компонентами EJC – Y14, Aly, NXF1/TAP. Как известно, FRET регистрируется, если расстояние между молекулами белков не превышает 10 нм. Имеющиеся в литературе данные (König et al., 2006) позволяют предположить, что в случае непрямого иммунофлуоресцентного мечения интенсивность FRET также зависит от расстояния между выявляемыми антигенами. Мы использовали флуорохромы Alexa-568 и Alexa-633. Данная пара флуорохромов рекомендуется для применения в технике FRET (Vámosi et al., 2009), а значение расстояния Фёстера для нее составляет около 7 нм, что сравнимо с размерами EJC (Andersen et al., 2006). Таким образом, в обнаруженных нами FRET-позитивных зонах ядер эмбрионов актин и изученные нами компоненты EJC локализованы на чрезвычайно малом удалении друг от друга, что дает возможность предположить существование функциональных взаимодействий между этими молекулами.

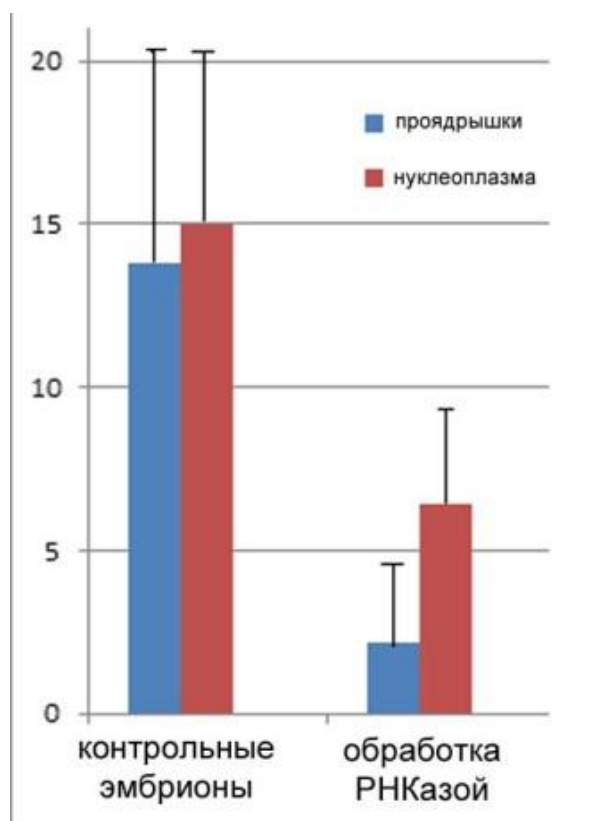


Рис. 15. Количественный анализ FRET-эффективности для пары Y14—актин в контрольных двухклеточных эмбрионах и двухклеточных эмбрионах, обработанных РНКазой. Различия между экспериментальными группами статистически достоверны для $p \leq 0.01$.

В ядрах эмбрионов мыши мы наблюдали два типа FRET-позитивных зон для актина и изученных нами факторов экспорта мРНК (NXF1/TAP, Y14 и Aly): небольшие зоны неправильной формы, диффузно распределенные в нуклеоплазме и выраженные зоны локализации FRET-сигнала в проядрышках. Учитывая наши данные об особенностях распределения NXF1/TAP (Bogolyubova et al., 2009), а также о характерном паттерне локализации сайтов транскрипции в ядрах эмбрионов (Bogolyubova, 2011), можно предположить, что нуклеоплазматические FRET-позитивные области соответствуют периферическим зонам транскрипционно активного хроматина, где процессы синтеза и биогенеза мРНК идут наиболее интенсивно (Moore, Proudfoot, 2009). Этому предположению соответствуют и особенности выявления FRET-сигнала в нуклеоплазме зиготы и двухклеточных эмбрионов: FRET-позитивные зоны в нуклеоплазме выявляли только в транскрипционно активных поздних двухклеточных эмбрионах, тогда как в ядрах транскрипционно инертных зигот наблюдали диффузное распределение FRET-сигнала. Существенно, что пространственное взаимодействие актина и белка Y14 имеет РНК-опосредованный характер, так как FRET-сигнал в значительной степени ослабевает после обработки препаратов РНКазой. Как уже отмечалось, Y14

является одним из белков, формирующих коровую часть ЕКС, то есть непосредственно взаимодействующих с мРНК в процессе ее экспорта (Tange et al., 2005). Таким образом, наши данные позволяют предположить, что актин в ядрах ранних эмбрионов мыши может быть непосредственно вовлечен в процессы экспорта мРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный нами анализ структурно-функциональной организации ядер эмбрионов мыши на разных стадиях АЭГ продемонстрировал выраженные изменения ядерной морфологии, происходящие на 1—2-клеточных стадиях дробления и затрагивающие все основные функциональные ядерные компартменты. Иммуноморфологический анализ распределения важнейших участников ядерного метаболизма (РНК-полимеразы I и II, факторов сплайсинга, ядерного актина и др.), как и иммуноцитохимическая визуализация ключевых доменов интерхроматинового пространства (КИГ и ТК) на разных этапах АЭГ, позволяет заключить, что описанные нами изменения функциональной морфологии ядер эмбрионов составляют обязательный морфофункциональный компонент АЭГ. Изменение транскрипционной активности ядра сопровождается быстрым перераспределением основных молекулярных компонентов транскрипции и посттранскрипционного метаболизма РНК, что в свою очередь приводит к изменению видимой для наблюдателя доменной организации ядра.

Необходимо отметить, что ряд ключевых компонентов метаболизма мРНК, например факторы сплайсинга SC35 и Y14, базальный фактор транскрипции TFIID, факторы экспорта мРНК Aly/REF и NXF1/TAP, в небольшом количестве выявляются уже в пронуклеусах ранних зигот мыши, то есть еще до начала первого этапа АЭГ (minor ZGA). По мере реализации основных событий АЭГ интенсивность иммуномечения, ассоциированного с антигенами, вовлеченными в транскрипцию, сплайсинг пре-мРНК и экспорт мРНК, существенно возрастает по сравнению с более ранними стадиями развития эмбрионов, что отражает увеличение их содержания в нуклеоплазме, в том числе в ассоциации с перихроматиновыми фибриллами.

При культивировании эмбрионов с ингибиторами транскрипции отмечается уменьшение концентрации факторов транскрипции, сплайсинга и экспорта мРНК в перихроматиновом компартменте с одновременным их накоплением в увеличенных КИГ. Таким образом, при искусственном подавлении транскрипционной активности эмбрионов после завершения АЭГ характерны те же основные тенденции структурно-функциональной перестройки ядер, что и для соматических клеток при искусственном и

естественном подавлении транскрипции, а также для ооцитов в процессе угасания транскрипционной активности на последних этапах оогенеза. Основные направления подобных перестроек заключаются в увеличении количества внутриядерных тел различных типов и их размеров, а также в уменьшении содержания компонентов метаболизма мРНК в нуклеоплазме (Почукалина и др., 1998; Parfenov et al., 1989, 1998; Malatesta et al., 1994, 1999).

В тоже время динамика преобразования ядер эмбрионов на начальных этапах дробления не может быть объяснена только на основе типичных для соматических клеток преобразований ядерных доменов при активации (или подавлении) транскрипционной активности. С нашей точки зрения, сложно провести непосредственные параллели между организацией ядер бластомеров до полного завершения АЭГ и транскрипционно неактивных (или малоактивных) соматических клеток на разных этапах клеточной дифференцировки, что подчеркивает уникальный функциональный статус пронуклеусов зиготы и ядер бластомеров двухклеточных эмбрионов мыши. В частности, структурно-функциональная организация ядра эмбрионов мыши до начала АЭГ заметно отличается от структуры ядер транскрипционно активных клеток (включая ядра эмбрионов после завершения АЭГ) после искусственного подавления транскрипции (рис. 16).

Основной тенденцией в структурной перестройке ядра в рамках программы нормального развития является постепенное уменьшение числа и увеличение размеров структур интерхроматинового пространства – КИГ и ТК. Параллельно с этим увеличивается содержание факторов метаболизма мРНК в нуклеоплазме, в том числе в ассоциации с перихроматиновыми фибриллами. Следует отметить, что формирование дефинитивной организации интерхроматинового пространства не прекращается после завершения основных событий АЭГ (к концу второго клеточного цикла), а продолжается в течение еще 1—2 клеточных циклов, что связано с реактивацией РНК-полимеразы I-зависимой транскрипции.

При искусственном подавлении транскрипции в ядрах эмбрионов после завершения АЭГ наиболее выраженные изменения наблюдаются в интерхроматиновом компартменте ядер. Среди них в первую очередь следует отметить резкое увеличение размеров КИГ, а также исчезновение крупных коилинсодержащих телец и появление множества мелких (точечных) коилин-позитивных зон, ассоциированных с периферией проядрышек. Одновременно с этим происходит выраженное перераспределение основных компонентов транскрипции, сплайсинга и экспорта мРНК, которые аккумулируются в увеличенных КИГ, тогда как их содержание в нуклеоплазме заметно снижается. Напротив, для эмбрионов до начала АЭГ характерно большое число мелких

КИГ, в которых выявляются только отдельные компоненты метаболизма мРНК и только в незначительном количестве. Тем не менее, несмотря на транскрипционно инертный статус, в нуклеоплазме пронуклеусов зиготы до начала АЭГ уже присутствуют некоторые факторы транскрипции, сплайсинга и экспорта мРНК, имеющие, по-видимому, материнское происхождение.

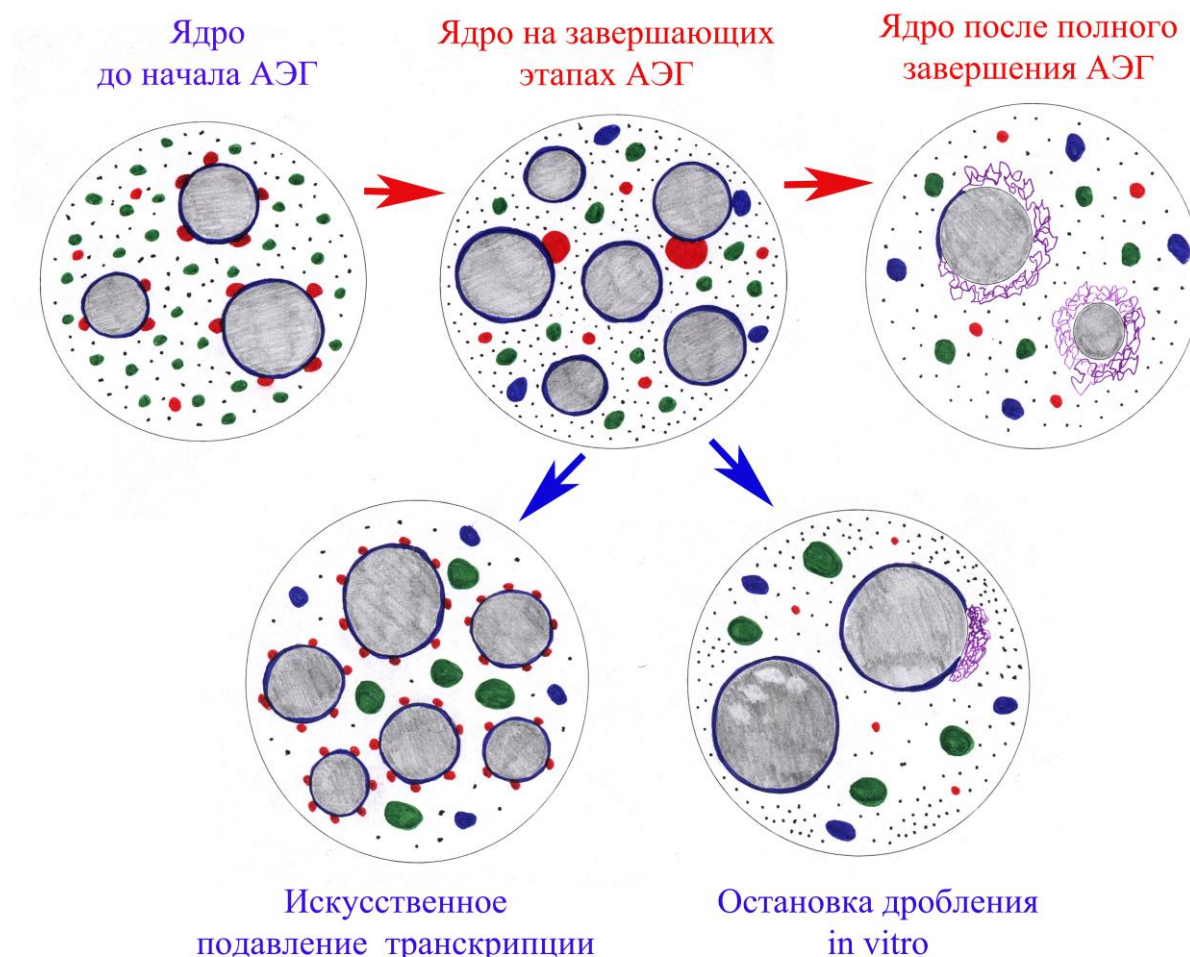


Рис. 16. Основные тенденции структурно-функциональных перестроек ядер ранних эмбрионов мыши. Зеленый цвет – спеклы, красный цвет – коилинсодержащие структуры, серый цвет – проядрышки, синий цвет – гетерохроматин, сиреневый цвет – зоны формирования нуклеолонемного ядрышка. Черные точки – основные компоненты метаболизма мРНК.

Таким образом, исходя из структурных различий в организации ядер эмбрионов до начала АЭГ и после искусственного подавления транскрипции, можно заключить, что транскрипционно «молчащие» ядра эмбрионов мыши до начала АЭГ уже являются транскрипционно компетентными, при этом транскрипция блокируется с помощью неких биохимических механизмов, которые остаются не до конца расшифрованными.

Говоря об уникальности структурной организации ядер эмбрионов на ранних этапах дробления, необходимо также подчеркнуть присутствие в них таких уникальных ядерных доменов, как проядрышки (в комплексе с окружающими их гетерохроматином) и коилин-позитивные структуры, отличные от ТК и ТГЛ. Описанные нами детали топологии и молекулярного состава ключевых ядерных доменов ранних эмбрионов позволяют предполагать наличие чрезвычайно тесных функциональных связей между интерхроматиновым и хроматиновым компартментом, а также высокую степень мультифункциональности их структурных компонентов.

Морфофункциональные особенности ядер ранних эмбрионов, с нашей точки зрения, могут быть обусловлены несколькими факторами. В первую очередь особенности морфологии ядер зиготы, в частности относительно меньшие (по сравнению с дифференцированными соматическими клетками) размеры КИГ, могут быть связаны с формированием основных ядерных структур *de novo* после разрушения ядра (зародышевого пузырька) ооцита и декомпактизации хроматина спермия в цитоплазме яйцеклетки.

Другим фактором, который может определять своеобразие доменной организации ядер эмбрионов и «нетипичного» молекулярного состава некоторых ядерных структур эмбрионов, выступает высокая концентрация молекул материнского происхождения, а также быстрые темпы их рециклинга, связанные с заменой регуляторных молекул материнского происхождения на молекулы, синтезированные под контролем генома эмбриона. Не исключено, что присутствие базального фактора транскрипции TFIID и фактора сплайсинга SC35 в окружающем проядрышки гетерохроматине пронуклеусов зиготы обусловлено, прежде всего, именно физико-химическими закономерностями взаимодействия между макромолекулами в условиях их быстрого пространственного перераспределения.

Сходными механизмами можно объяснить и формирование в ядрах поздних двухклеточных эмбрионов мыши крупных коилин-позитивных структур, которые, с нашей точки зрения, являются своеобразными, специфическими для определенной стадии развития «провизорными» доменами интерхроматинового пространства. Можно полагать, что формирование этих специфических доменов может быть в первую очередь связано с локальными повышениями концентрации компонентов РНК-полимераза I-зависимой транскрипции, так как данные внутриядерные структуры наблюдаются непосредственно перед началом нуклеологенеза. Таким образом, можно утверждать, что уникальный характер функциональной компартментализации ядер в начале эмбриогенеза связан не только с поэтапной реализацией АЭГ (то есть реактивацией РНК-полимераза II-зависимой

транскрипции), но и с процессами нуклеологенеза (то есть реактивацией РНК-полимеразы I-зависимой транскрипции), несмотря на то что эти процессы реализуются в разные сроки.

Можно полагать, что комплексный характер изменений, происходящих в ядрах эмбрионов мыши в период АЭГ, определяет и мультифункциональность, характерную для ряда их функциональных компартментов, а также тесные функциональные связи между доменами интерхроматинового пространства и хроматином, ассоциированным с проядрышками.

Таким образом, ядра эмбрионов млекопитающих в период АЭГ как модель для исследования структурно-функциональной компартментализации клеточного ядра характеризуются рядом специфических особенностей, которые необходимо учитывать при обобщении данных, полученных на разных модельных объектах, и построении универсальных концепций трехмерной организации работы эукариотического генома.

ВЫВОДЫ

1. Реализация активации эмбрионального генома (АЭГ) в ранних эмбрионах мыши сопровождается выраженными структурными изменениями, которые затрагивают все основные функциональные компартменты ядра и коррелируют с основными событиями АЭГ.

2. В период реализации АЭГ происходит поэтапное формирование дефинитивной морфологии и молекулярного состава кластеров интерхроматиновых гранул (КИГ), при этом некоторые важнейшие компоненты метаболизма мРНК (TFIID, РНК-полимераза II) начинают выявляться в КИГ еще до завершения основных событий АЭГ.

3. Для коилинсодержащих телец в ядрах поздних двухклеточных эмбрионов мыши на заключительных стадиях АЭГ характерна гетерогенность как по морфологическим характеристикам, так и по молекулярному составу. Крупные (диаметром до 1 мкм) коилин-позитивные структуры, наблюдаемые только в конце второго клеточного цикла, содержат РНК-полимеразу I, шаперон нуклеиновых кислот YB-1, а также актин, что отличает их от мелких, более многочисленных коилин-позитивных структур.

4. Проядрышки, являющиеся уникальной ядерной структурой ранних эмбрионов, содержат не только молекулярные компоненты ядрышек, но и компоненты метаболизма мРНК (гиперфосфорилированную форму РНК-полимеразы II, факторы экспорта мРНК), а также актин, что указывает на мультифункциональность этих ядерных доменов.

5. Области локализации ассоциированного с проядрышками гетерохроматина в эмбрионах мыши в период АЭГ имеют своеобразный

молекулярный состав, отличный от такового периферического гетерохроматина ядра, и содержат ряд ключевых компонентов метаболизма мРНК (фактор сплайсинга SR-белок SC35, базальный фактор транскрипции TFIID), а также хроматинре моделирующий белок ATRX и актин. Являясь транскрипционно инертным, гетерохроматин, ассоциированный с проядрышками, содержит эпигенетические метки как репрессированного, так и транскрипционно активного хроматина.

6. В ядрах эмбрионов мыши в состоянии «2-клеточного блока *in vitro*» происходит нарушение реализации основных событий АЭГ, которое сопровождается перераспределением компонентов транскрипции и посттранскрипционного метаболизма мРНК, но не препятствует началу реактивации ядрышковой транскрипции.

7. Актин в ядрах ранних эмбрионов мыши присутствует преимущественно в олигомерной форме и локализуется как в сайтах РНК-полимеразы II-зависимой транскрипции, так и в зонах гетерохроматина, а также непосредственно вовлечен в процессы экспорта мРНК.

8. Экспериментальное подавление транскрипции вызывает выраженные структурные перестройки интерхроматинового компартмента ядер эмбрионов, сходные с описанными для соматических клеток. При этом ядра эмбрионов после воздействия ингибиторов транскрипции по организации интерхроматинового компартмента и распределению ключевых факторов метаболизма мРНК принципиально отличаются от ядер транскрипционно инертных эмбрионов до начала АЭГ.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Глава в коллективной монографии

1. **Bogolyubova I.O., Bogolyubov D.S.** 2013. Oocyte nuclear structure during mammalian oogenesis. In: Recent advances in germ cells research. New York, Nova Biomedical, 105—133.

Статьи в журналах, входящих в список ВАК или в международные базы данных Web of Science и Scopus

2. **Боголюбова И.О., Парфенов В.Н.** 2000. Факторы сплайсинга пре-мРНК в ядрах двухклеточных зародышей мышей. Цитология. 42 (3) : 884—890.
3. **Боголюбова И.О., Парфенов В.Н.** 2002. Распределение РНК-полимеразы II в ядрах ранних мышинных эмбрионов. Цитология. 44 (2) : 175—180.
4. **Боголюбова Н.А., Боголюбова И.О.** 2006. Динамика морфофункциональной организации и жизнеспособность эмбрионов

мышь, находящихся в состоянии «двухклеточного блока *in vitro*». Цитология. 48 (5) : 398—409.

5. **Bogolyubova I., Bogolyubova N., Bogolyubov D., Parfenov V.** 2006. Nuclear structure in early mouse embryos: a comparative ultrastructural and immunocytochemical study with special emphasis on the “2-cell block *in vitro*”. *Tissue and Cell*. 38 : 389—398.
6. **Боголюбова Н.А., Боголюбова И.О.** 2009. Локализация актина в ядрах двухклеточных зародышей мыши. *Цитология*. 51 (8) : 663—669. (**Bogolyubova N.A., Bogolyubova I.O.** 2009. Actin localization in nuclei of two-cell mouse embryos. *Cell Tissue Biol*. 3 : 417—422.)
7. **Bogolyubova I., Bogolyubov D., Parfenov V.** 2009. Localization of poly(A)⁺ RNA and mRNA export factors in interchromatin granule clusters of 2-cell mouse embryos. *Cell and Tissue Research*. 338 : 271—281.
8. **Bogolyubova I.** 2009. F-actin distribution pattern in the nuclei of early mouse embryos. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 43 : 461—463.
9. **Bogolyubova I.O.** 2011. Transcriptional activity of nuclei in 2-cell blocked mouse embryos. *Tissue and Cell*. 43 : 262—265.
10. **Боголюбова И.О., Парфенов В.Н.** 2012. Особенности иммунофлуоресцентного выявления ядерного актина в ранних эмбрионах мыши. *Цитология*. 54 (7) : 541—548. (**Bogolyubova I.O., Parfenov V.N.** 2012. Immunofluorescence detection of nuclear actin in early mouse embryos. *Cell Tissue Biol*. 6 : 458—464.)
11. **Боголюбова И.О.** 2012. Сравнительный анализ флуоресцентного мечения ядер ранних эмбрионов мыши при использовании антител к различным участкам молекулы актина. *Цитология*. 54 (11) : 831—836. (**Bogolyubova I.O.** 2013. Comparative analysis of the fluorescent labeling pattern of nuclei of early mouse embryos by using antibodies to various actin molecule domains. *Cell Tissue Biol*. 7 : 37—42.)
12. **Bogolyubova I., Stein G., Bogolyubov D.** 2013. FRET analysis of interactions between actin and exon-exon-junction complex proteins in early mouse embryos. *Cell and Tissue Research*. 352 : 277—285.
13. **Bogolyubova I.O., Bogolyubov D.S.** 2013. An immunocytochemical study of interchromatin granule clusters in early mouse embryos. *BioMed Research International*. 2013 : 931564.
14. **Bogolyubova I.O., Bogolyubov D.S.** 2014. Nuclear distribution of RNA polymerase II and mRNA processing machinery in early mammalian embryos. *BioMed Research International*. 2014 : 681596.

15. **Bogolyubova I.O., Lyabin D.N., Bogolyubov D.S., Ovchinnikov L.P.** 2014. Immunocytochemical study of YB-1 nuclear distribution in different cell types. *Tissue and Cell*. 46 :457—461.
16. **Sailau Zh., Bogolyubov D.S., Bogolyubova I.O.** 2017. Nuclear distribution of the chromatin-remodeling protein ATRX in mouse early embryogenesis. *Acta Histochemica*. 119 : 18—25.
17. **Боголюбова И.О.** 2017. Гетерогенность коилинсодержащих доменов в ядрах ранних эмбрионов мыши. *Цитология*. 59 (4) : 290—297. (**Bogolyubova I.O.** 2017. Heterogeneity of coilin-containing nuclear domains in early mouse embryos. *Cell Tissue Biol*. 11 : 293—299.)
18. **Bogolyubova I.O., Bogolyubov D.S.** 2017. Detection of RNA polymerase II in mouse embryos during zygotic genome activation using immunocytochemistry. *Methods in Molecular Biology*. 1605 : 147—159.
19. **Боголюбова И.О., Боголюбов Д.С.** 2018. Параллельное выявление новосинтезированной РНК и ядерных белков на ультраструктурном уровне: модификация протокола для иммуноэлектронной микроскопии. *Цитология*. Т. 60 (6) : 463—468. (**Bogolyubova I.O., Bogolyubov D.S.** 2018. Combined detection of newly synthesized RNA and nuclear proteins at the ultrastructural level: a modification of the protocol for immunoelectron microscopy. *Cell Tissue Biol*. 2018.12 (6) : 517—522.)
20. **Сайлау Ж.К., Боголюбов Д.С., Боголюбова И.О.** 2018. Особенности распределения хроматинремоделирующего белка ATRX в ядрах доимплантационных эмбрионов мыши. *Цитология*. 60 (11) : 83—86.

Статьи в сборниках

21. **Боголюбова И.О.** 2013. Кластеры интерхроматиновых гранул в ранних эмбрионах мыши при естественном и искусственном подавлении транскрипционной активности. В сб.: *Физиология, медицина. Высокие технологии, теория, практика*. СПб, Изд-во Политехнического университета, 1 : 112—114.
22. **Боголюбова И.О., Чеблоков А.А., Боголюбов Д.С.** 2015. Иммуноцитохимическое выявление хроматин-ремоделирующего белка ATRX в кариосфере и ее дериватах. В сб.: *Проблемы развития высоких технологий*. СПб, Изд-во Политехнического университета, 2 : 128—131.
23. **Bogolyubova I., Bogolyubov D.** 2015. An immunocytochemical study of the perinucleolar heterochromatin in early mouse embryos. In: *The fifth European conference on biology and medical sciences*. Vienna, «East-West» Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH, 42—45.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АЭГ – активация эмбрионального генома

КИГ – кластеры интерхроматиновых гранул

ТГЛ – тельца гистоновых локусов

ТК – тельца Кахаля

ХГГ – хорионический гонадотропный гормон

ATRX – хроматинремоделирующий белок, мутации в гене которого ассоциированы с α -талассемией (alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked)

Br-УТФ – 5-бromoуридин-5'-трифосфат

FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции (fluorescence resonance energy transfer)

hnРНП – гетерогенные ядерные РНП

УВ-1 – У-бокс-связывающий белок 1

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Почукалина и др. 1998. Цитология. 40 (4) : 237—249; Ходюченко, Красикова. 2014. Онтогенез. 45 (6) : 363—379; Andersen et al. 2006. Science. 313 : 1968—1972; Bettinger et al. 2004. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5 : 410—415; Bjerregaard, Maddox-Hyttel. 2004. Anim. Reprod. Sci. 82—83 : 605—616; Bogolyubov, 2007. Folia Histochem. Cytobiol. 45 : 129—134; Bogolyubova et al., 2009. Cell Tissue Res. 338 : 271—281; Carmo-Fonseca. 2002. Cell. 108 : 513—521; Chatot et al. 1989. J. Reprod. Fertil. 86 : 679—688; Cruz, Moreno Díaz de la Espina S. 2009. Chromosoma. 118 : 193—207; Dundr, Misteli. 2001. Biochem. J. 356 : 297—310; Dundr, Misteli. 2010. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2 : a000711; Erkmann, Kutay. 2004. Exp. Cell Res. 296 : 12—20; Ferreira, Carmo-Fonseca. 1995. Development. 121 : 601—612; Fléchon, Kopečný. 1998. Zygote. 6 : 183—191; Gardner, Lane. 1996. Hum. Reprod. 11 : 2703—2712; Gedge et al. 2005. Exp. Cell Res. 303 : 229—239; Goddard., Pratt. 1983. J. Embryol. Exp. Morphol. 73 : 111—133; Grüter et al. 1998. Mol. Cell. 1 : 649—659; Hall et al. 2006. Anat. Rec. A. 288 : 664—675; Hyttel. 2001. J. Anat. Embryol. 106 : 109—117; Johnson et al. 2000. J. Cell Biol. 150 : 417—432; König et al. 2006. Lab. Invest. 86 : 853—864; Lacks. 1981. J. Biol. Chem. 256 : 2644—2648; Lawitts, Biggers. 1991. J. Reprod. Fertil. 91 : 543—556; Malatesta et al. 1994. Exp. Cell Res. 211 : 415—419; Malatesta et al. 1999. Anat. Rec. 254 : 389—395; Mandel et al. 2008. Cell Mol. Life Sci. 65 : 1099—1122; Mao et al. 2011. Trends Genet. 27 : 295—306; Minami et al. 2007. J. Reprod. Dev. 53 : 707—715; Mintz, Spector. 2000. J. Struct. Biol. 129 : 241—251; Misteli. 2000. J. Cell Sci. 113 : 1841—1849; Misteli. 2005. BioEssays. 27 : 477—487; Molenaar et al. 2004. J. Cell Biol. 165 : 191—202; Moore, Proudfoot. 2009. Cell. 136 : 688—700; Nothias et al. 1995. J. Biol. Chem. 270 : 22077—22080; Nunes, Moretti. 2017. Cell Biol. Int. 41 : 2—7; Parfenov et al. 1989. Gamete Res. 22 : 219—231; Parfenov et al. 1998. J. Cell. Biochem. 69 : 72—80; Pedersen. 2008. J. Cell Biol. 180 : 1061—1064; Pinder, Gratzer. 1982. Biochemistry. 21 : 4886—4890; Raška et al. 1992. Cell Biol. Int. Rep. 16 : 771—789; Sahin et al. 2014. J. Pathol. 234 : 289—291; Schmidt U. et al. 2009. RNA. 15 : 862—876; Schultz. 1993. Bioessays. 15 : 531—538; Shopland et al. 2003. J. Cell Biol. 162 : 981—990; Smith et al. 2007. J. Cell Biol. 178 : 951—964; Spector, Lamond, 2011. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3 : a000646; Staněk, Neugebauer. 2004. J. Cell Biol. 166 : 1015—1025; Tange et al. 2005. RNA. 11 : 1869—1883; Vámosi et al. 2009. Cellular diagnostics. Karger publishers. P. 141—159; Visa, Percipalle. 2010. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2 : a000620; Wiekowski et al. 1997. J. Cell Sci. 110 : 1147—1158; Zal, Gascoigne 2004. Curr. Opin. Immunol. 16 : 674—683; Zatzepina et al. 2003. Dev. Biol. 253 : 66—83.