

На правах рукописи

КИСЕЛЁВ
Артём Михайлович

Состав ядерных доменов и динамика
перемещения слитого белка в ооцитах
жука *Tribolium castaneum*

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии Российской академии наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
Подгорная Ольга Игоревна
ФГУБН «Институт цитологии РАН», г.
Санкт-Петербург

доктор биологических наук
Боголюбов Дмитрий Сергеевич
ФГУБН «Институт цитологии РАН», г.
Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

кандидат биологических наук,
доцент кафедры цитологии и гистологии
Сайфитдинова Алсу Фаритовна
ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский
государственный университет», г. Санкт-
Петербург

доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией биосистематики
и цитологии
Родионов Александр Викентьевич
ФГУБН «Ботанический институт
им. В.Л. Комарова РАН», г. Санкт-Петербург

Ведущая организация:

ФГУБН «Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН», г. Москва

Защита диссертации состоится «___» _____ 2015 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д.4.

e-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте Института.

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Существенный прогресс в развитии методов анализа и расшифровки нуклеотидных последовательностей генов, а также механизмов их экспрессии привёл к ответам на многие вопросы, касающиеся функционирования клеточного ядра. Остаётся нерешённым ряд задач, связанных с точной локализацией молекулярных компонентов транскрипции, процессинга и экспорта мРНК в трёхмерном пространстве ядра. Активно разрабатывается концепция о роли доменов нуклеоплазмы в регуляции и координации многоступенчатых событий экспрессии генов. Нуждается в уточнении молекулярный состав ядерных доменов, особенно в специализированных клетках. Транскрипция и ранние этапы процессинга мРНК связаны с перихроматиновыми фибриллами (Fakan, van Driel, 2007). Перихроматиновый компартмент, пограничная область между конденсированным хроматином и интерхроматиновым пространством нуклеоплазмы — место репликации и репарации ДНК (Markaki et al., 2010). Интерхроматиновое пространство ядра содержит около 10 типов различных ядерных доменов, или ядерных телец. Универсальными и эволюционно консервативными среди этих ядерных доменов являются «speckles» (кластеры интерхроматиновых гранул, КИГ, SC35 домены), тельца Кахала (ТК), родственные ТК тельца гистоновых локусов (ТГЛ) и другие (Mao et al., 2011). Считают, что основная функция КИГ состоит в депонировании факторов сплайсинга пре-мРНК (Hall et al., 2006; Spector, Lamond, 2011). Факторы сплайсинга составляют 54% протеома КИГ (Saitoh et al., 2004), серин/аргинин-богатые белки (SR-белки, в том числе SC35) рассматривают в качестве молекулярных маркеров этих доменов (Spector et al., 1991). В КИГ присутствуют факторы апоптоза, транскрипционные факторы, субъединицы РНК-полимеразы II, факторы полиаденилирования, экспорта мРНК и ряд других (Mintz et al., 1999; Saitoh et al., 2004). В ТК осуществляются поздние этапы процессинга (метилование и псевдоуридинилирование) малых ядерных РНК (мяРНК, или snRNA) при участии ТК-специфических малых РНК и сборка пресплайсосомных малых ядерных РНП-частиц (мяРНП, или snRNP) (Nizami et al., 2010). ТГЛ содержат факторы процессинга 3'-конца пре-мРНК гистонов, включая U7 мяРНК. Коилин — фосфопротеин, способный образовывать комплексы с мяРНП (Xu et al., 2005), является общим молекулярным маркером ТК и ТГЛ.

Большинство исследований ядерных доменов проведено на постоянных культурах малигнизированных соматических клеток млекопитающих, значительно отличающихся от нормальных клеток. Меньше известно о белковом и/или РНК-составе универсальных доменов нуклеоплазмы ооцитов. В ядрах ооцитов домены представлены гетерогенной популяцией телец, разнообразных по морфологии (Bogolyubov, Parfenov, 2008; Bogolyubov et al., 2009).

К характерным чертам организации ядра ооцита многих организмов относится образование кариосферы, или кариосомы, — компактного «клубка» хромосом, формирующегося на стадии диплотены профазы I мейоза. Считают, что образование кариосферы представляет собой один из механизмов инактивации хромосом и подготовки их к редукционному делению (Грузова и др., 1995). Хроматин в составе кариосферы ассоциирован с экстрахромосомным материалом, который у одних объектов формируется снаружи в виде «оболочек», так называемой капсулы кариосферы (КК), а у других — внутри кариосферы в форме «центрального тела» (Gruzova, Parfenov, 1977; Parfenov et al., 1989).

Объект настоящего исследования — жук-чернотелка, малый булавоусый хрущак *Tribolium castaneum*. В результате секвенирования и публикации собранного и аннотированного генома (Richards et al., 2008) этот вид начинают активно изучать биологи

развития, генетики и клеточные биологи в качестве нового лабораторного насекомого. *T. castaneum* имеет несомненные преимущества перед существующими модельными объектами класса Insecta. Это первый среди Coleoptera вид, чей геном полностью секвенирован. Жук лишён ряда специфических, нетипичных для Arthropoda и/или вторичных в эволюционном отношении признаков, которыми обладает *Drosophila melanogaster*, но имеет характерные для Coleoptera–Polyphaga особенности строения женской половой системы и оогенеза (Whiting, 2002; Trauner, Büning, 2007). Наличие полностью собранного и аннотированного генома *T. castaneum* позволяет проводить на ооцитах этого вида не только классические морфологические исследования, но использовать и молекулярно-биологический подход.

До начала наших работ в литературе практически отсутствовало описание морфологических особенностей ядра ооцита *T. castaneum*, в частности, оставались не охарактеризованными кариосфера и экстрахромосомные ядерные домены. В настоящей работе впервые проведено исследование молекулярного состава ядерных структур ооцитов *T. castaneum* и представлена их базовая характеристика не только с использованием классических методов иммуноцитохимии на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях, но и с привлечением методов генной инженерии.

Цель и задачи исследования. Основной целью настоящей работы являлась идентификация и характеристика структур ядра ооцитов *T. castaneum*. Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

- 1) Описать морфологию и динамику ядерных структур растущих ооцитов *T. castaneum* на разных стадиях;
- 2) Адаптировать методику для культивирования ооцитов *T. castaneum in vitro*;
- 3) Идентифицировать аналоги эволюционно консервативных ядерных доменов (КИГ и ТК) по присутствию маркерных белков;
- 4) Изучить строение и определить некоторые компоненты капсулы кариосферы (КК);
- 5) Создать и охарактеризовать 5'–кэпированную конструкцию мРНК, содержащую кодирующие последовательности фактора сплайсинга Y14 и Мус-эпитопа в качестве метки (tag);
- 6) Проследить возможную ассоциацию экзогенного слитого белка Y14-Мус с ядерными структурами ооцитов.

Научная новизна работы. Впервые представлена ультраструктурная и иммуноцитохимическая характеристика ядерных доменов ооцитов лабораторного насекомого *T. castaneum* — кариосферы, КК и экстрахромосомных ядерных телец. Обнаружено, что хромосомы развивающегося ооцита *T. castaneum* на стадии диплотены профазы I мейоза рано объединяются в компактную кариосферу, которая, в отличие от кариосферы близкого представителя того же семейства *Tenebrio molitor*, имеет развитую КК. Впервые достоверно установлено, что кариосфера, обладающая внешней КК, сохраняет остаточную транскрипцию на поздних стадиях роста ооцита. Впервые показано, что КК содержит не только белки ядерного матрикса, такие как актин и ламин В, но обогащена РНК, включая 5'-триметилгуанозин-кэпированные мРНК. Впервые продемонстрировано прямое участие КК в ядерной компартментализации фактора сплайсинга Y14.

Теоретическое и практическое значение работы. Работа имеет фундаментальную направленность и расширяет представления о структурно-функциональной компартментализации ядра ооцита, молекулярном составе и динамике его универсальных (ТК, КИГ) и специфических (кариосфера с экстрахромосомной КК) ядерных доменов. Результаты настоящей работы могут служить основой дальнейших исследований на

ооцитах *T. castaneum* как модельного вида насекомых и могут быть использованы в курсах лекций по биологии развития и клеточной биологии для студентов вузов.

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1) В ядре ооцитов *Tribolium castaneum* формируется кариосфера, окружённая внешней экстрахромосомной капсулой, присутствуют SC35- и коилинсодержащие экстрахромосомные домены, являющиеся аналогами универсальных ядерных доменов КИГ и ТК, соответственно.
- 2) Методика временного культивирования соматических клеток *T. castaneum* успешно адаптирована к яйцевым трубкам *T. castaneum*: в среде ExCell 420 (SAFC Bioscience, США) ооциты *T. castaneum* сохраняют транскрипционную активность в течение времени, достаточного для успешной трансляции мРНК конструкции (3 часа).
- 3) Капсула кариосферы *T. castaneum* содержит РНК, в том числе мРНК и поли(А)+РНК.
- 4) Антитела против фактора сплайсинга Y14 выявляют этот белок в составе SC35-содержащих ядерных телец и в капсуле кариосферы ооцитов на поздних стадиях оогенеза.
- 5) Конструкция мРНК Y14-Мус успешно экспрессируется как в клетках человека линии HEK293, так и при инъекции в ооплазму *T. castaneum*.
- 6) В пограничной области между кариосферой и её капсулой белок Y14-Мус колокализуется со слабо конденсированным хроматином, на котором происходит остаточная транскрипция. Капсула кариосферы является дефинитивным местом локализации белка Y14, а SC35-содержащие тела — транзитным.

Апробация работы. Основные положения представлены и обсуждены на I Всероссийской конференции «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» (Санкт-Петербург, 2011), III конференции молодых ученых Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2012), III съезде Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2012), XVIII Российском симпозиуме по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел (Черноголовка, 2013), XXV Российской конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, 2014), XVII Всероссийском симпозиуме «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 2014), VII международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине" (Санкт-Петербург, 2014).

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 11-04-01258) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых отечественных и международных журналах.

Вклад автора. Результаты, включённые в работу, получены лично автором. Материалы, вошедшие в диссертацию, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей методы и результаты исследования, обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего 229 публикаций. Работа изложена на 105 страницах и иллюстрирована 18 рисунками и 3 таблицами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект. Исследовали ядра ооцитов малого булавовусого хрущака *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera–Polyphaga: Tenebrionidae). Для расширения сравнительного подхода

привлечён материал по ядру ооцитов большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* L. (то же семейство). Культуру *T. castaneum* содержали при 28°C на субстрате, состоящем по весу из 60% пшеничной муки, 35% овсяных хлопьев и 5% высушенных пекарских дрожжей. Культуру *T. molitor* содержали при комнатной температуре на субстрате из овсяных хлопьев с добавлением свежей моркови.

Для выделения ооцитов отбирали внешне здоровых и активных самок. Яичники препарировали в физиологическом растворе для насекомых (0,75% NaCl, 0,035% KCl, 0,021% CaCl₂) или в среде ExCell 420 (SAFC Bioscience, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) (Hyclone, США) (Goodman et al., 2012), после чего яичник разделяли на отдельные овариолы (анатомические и функциональные единицы женской гонады насекомых).

Электрофорез ДНК и РНК. Для горизонтального электрофореза ДНК использовали 2% агарозный гель, приготовленный на буфере TAE. Для анализа РНК использовали электрофорез в денатурирующих условиях (Sambrook, Russel, 2001). Для выделения и очистки необходимых фрагментов ДНК использовали набор Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (ThermoScientific, США). Для определения качественных и количественных характеристик РНК, синтезированной *in vitro*, использовали капиллярный электрофорез (Agilent 2100 Bioanalyzer, США).

Экстракция мРНК. Тотальную мРНК получали из личинок. После извлечения из субстрата личинки выдерживали 2 суток в чашке Петри с подложкой из фильтровальной бумаги, затем замораживали в жидком азоте, механически мацерировали и проводили экстракцию РНК с использованием TRI-REAGENT (Sigma Aldrich, США) в соответствии со стандартным протоколом фенол-гуанидинтиоцианат хлороформной экстракции (Sambrook, Russel, 2001) и рекомендациями производителя.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для проведения ПЦР использовали полимеразы Taq (ThermoScientific, США) и Pfu (ThermoScientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полимеразу Taq использовали преимущественно для проведения промежуточных контрольных реакций. Все операции, связанные с клонированием, проводили с использованием полимеразы Pfu. кДНК синтезировали с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, США) с соблюдением всех условий, рекомендованных производителем. Для проведения ПЦР и ОТ-ПЦР использовали термоциклер Eppendorf Mastercycler personal.

Клонирование. Использовали следующие рестриктазы: BamHI, EcoRI, XhoI, KpnI, NheI, NotI (ThermoScientific, США). Все промежуточные конструкции подвергали контрольному секвенированию. После проведения ПЦР с необходимыми праймерами фрагмент вставляли в вектор PTZ57R/T (ThermoScientific, США) посредством реакции лигирования по выступающим на концах дезоксиаденозиновым остаткам амплифицированных фрагментов ДНК (ТА-клонирование) с использованием лигазы T4 по стандартному протоколу (Sambrook, Russel, 2001). Проводили рестрикцию фрагмента и вектора соответствующими рестриктазами, лигирование проводили также лигазой T4. Трансформацию клеток *E. coli* (штамм DH5a) проводили с помощью электропоратора ГВИ11 (Малое предприятие молодежного центра ЛГТУ, 1990). Эффективность трансформации составила 10⁹ трансформированных клеток на 1 мкг ДНК. Использовали следующие плазмидные вектора *E. coli*: PTZ57R/T (ThermoScientific, США) — ТА клонирование; pcDNA 3.1 Мус-His(A) (Invitrogen, США) — введение последовательности Мус-эпитопа, экспрессионный контроль на культуре HEK293; PTZ19R (ThermoScientific, США) — введение в последовательность промотора T7, транскрипция *in vitro*; pBMC

(Murashev et al., 2007) — экспрессия несплайсированного гена в культуре клеток человека HEK293.

Транскрипция *in vitro*. Для получения *in vitro* 5'-кэпированной мРНК использовали набор TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (ThermoScientific, США) с добавлением Ribo m₇G Cap Analog (Promega, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Как известно, добавление в конструкцию 5'-кэпа значительно увеличивает эффективность синтеза *in vitro* мРНК, модифицированной подобным образом (Drummond et al., 1985). Синтезированную *in vitro* мРНК очищали при помощи набора RNAqueous (Ambion, США) и хранили при —80°C.

Методики биоинформатики. Все генно-инженерные манипуляции предварительно моделировали *in silico*. Данные о последовательностях ДНК, кодирующих белки *T. castaneum*, получали из базы данных NCBI. Использовали программные пакеты Vector NTI (Invitrogen, США), BioEdit (Tom Hall, США) и Geneious (Biomatters, Новая Зеландия). Подбор праймеров и внесение необходимых для генно-инженерных манипуляций сайтов рестрикции (табл. 1, включённые сайты) проводили при помощи программы Primer3 (Rozen, Skaletsky, 2000).

Табл. 1.

Список праймеров

№	Название праймера	Последовательность (5'–3')	Включённые сайты
1	006-XhoI-RNA-For	TTCTCGAGATGGCAGATGTTTGGACA	XhoI
2	007-KpnI-RNA-Rev	TAGGTACCGTGTCTCCTTGCACGTTTC	KpnI
3	020-BamH1-RNA-Forv	GAGGATCCATGGCAGATGTTTGGACA	BamH1
4	011-EcoRI-Stop-Myc-Rev	TCGAATTCTCAATTCAGATCCTCTCTGAGATG	EcoRI, TGA(stop)
5	M13(-20) Forv	GTAAAACGACGGCCAGT	
6	M13(-26) Rev	GGAAACAGCTATGACCA	
7	001-DnaNheI-Forv	GTGCTAGCCACCATGGCAGATGTTTGGAC	NheI
8	002-DnaNot-Rev	ACGCGGCCGCTCAGTGTCTCCTTGCACG	NotI

Примечание: выделены стартовые кодоны, стоп-кодон подчеркнут.

Микроинъекции. Микроинъекции синтезированной *in vitro* 5'-кэпированной мРНК в ооциты *T. castaneum* проводили в среде ExCell 420 (SAFC Bioscience, США), содержащей 10% FBS (HyClone, США). Использовали микроинжектор Eppendorf 5242, инвертированный микроскоп Leica DM IRB, оснащённый микроманипулятором Narishige, и капилляры Femtotips II (Eppendorf). Инъектированный материал до фиксации инкубировали в среде ExCell 420 содержащей 10% FBS при 28°C течение времени, необходимого для экспрессии продукта (3—4 ч).

Флуоресцентная микроскопия. Для одновременного выявления ДНК и РНК в ядре ооцитов *T. castaneum* поздних стадий развития использовали метод прижизненного окрашивания акридином оранжевым (Kronvall, Myhre, 1977). Использовали 20 мМ цитрат-фосфатный буфер 1, pH 3,0 с добавлением 0,1 мМ EDTA, 0,2 М сахарозы и 10 мМ цитрат-фосфатный буфер 2, pH 3,8 с добавлением 0,1% Triton X-100, 0,1 М NaCl. В смесь буферов 1:1, с добавлением акридинового оранжевого, вносили изолированное ядро ооцита *T. castaneum*. Результат окрашивания наблюдали при помощи светооптического микроскопа Leica DM 6000 B (Heidelberg, Германия).

Иммуофлуоресцентное окрашивание проводили на давленных препаратах, приготовленных по описанной методике (Hulsebos et al., 1984). Изолированные овариолы помещали на покровное стекло, которое заранее покрывали силиконом Sigmacote (Sigma, США), в каплю среды (ExCell 420, 10% FBS) объёмом примерно 5 мкл, накрывали предметным стеклом Polysine® (Menzel, Германия), избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой. При этом в большинстве случаев ядро высвобождается из ооцита

и перемещается на препарате в свободное от остатков цитоплазмы место. Препараты замораживали в жидком азоте, лезвием удаляли покровное стекло и фиксировали в 2%-ном растворе формальдегида на 96%-ном этаноле в течение 30 мин, промывали в 70%-ном этаноле в течение 5 мин, затем трижды промывали PBS.

Перед обработкой в растворе первичных антител для предотвращения их неспецифического связывания (Bonifacino et al., 2003) препараты инкубировали в течение 10 мин в 10%-ном FBS, приготовленном на PBS. Затем препараты помещали в раствор первичных антител (АТ) (табл. 2) и инкубировали во влажных камерах при 4°C в течение ночи.

Табл. 2.

Антитела, использованные в работе

Название	Распознаваемый антиген	Тип	Применение, концентрация	Источник
9E10	Мус-эпитоп	ММон	ИЭМ*, раз. 1:50	Evan et al., 1985
Y12	Симметричные диметиларгинины (sDMA) - "Sm-эпитоп" мяРНК	ММон	ИФ, ИЭМ, без раз.	Lerner et al., 1981
030	Двучпочечная ДНК	ММон	ИФ, ИЭМ, раз. 1:300	Chemicon
1501R	Актин	ММон	ИЭМ, раз. 1:100	Chemicon
K121	2,2,7-триметилгуанозиновый (TMG) кэп мяРНК	ММон	ИФ, ИЭМ, 1 мкг/мл	Krainer, 1988
α SC35	SC35	ММон	ИФ, ИЭМ, 2,5 мкг/мл	Fu, Maniatis, 1990
11G5	Человеческий рекомбинантный слитый белок REF/Aly	ММон	ИФ, ИЭМ, раз. 1:50	Abcam
R3	С-концевой участок молекулы коилина дрозофилы	КРПол	ИФ, ИЭМ, раз. 1:1.000	Liu et al., 2009
N-15	N-концевой участок гЯРНП A1 человека	КОПол	ИФ, раз. 1:50	Santa Cruz Biotech, Inc.
H-120	участок с 1 по 120 аминокислоту NXF1/TAP человека	КРПол	ИЭМ, раз. 1:10	Santa Cruz Biotech, Inc.
C-20	С-концевой участок Y14 человека	КОПол	ИЭМ, раз. 1:50	Santa Cruz Biotech, Inc.
CTD	Гиперфосфорилированный CTD РНК-полимеразы II	КРПол	ИЭМ, раз. 1:1.000	Kim, Dahmus, 1986
SI-1	участок с 1 по 120 аминокислоту TBP	КОПол	ИЭМ, раз. 1:10	Santa Cruz Biotech, Inc.
N-15	ГРПН	КОПол	ИЭМ, раз. 1:10	Santa Cruz Biotech, Inc.
M-20	Ламин В	КОПол	ИФ, ИЭМ, раз. 1:50	Santa Cruz Biotech, Inc.

*Сокращения в таблице: ИФ — иммунофлуоресценция, ИЭМ — иммуноэлектронная микроскопия. ММон — мышиные, моноклональные, КРПол — кроличьи, поликлональные, КОПол — козы, поликлональные, раз. — разведение.

После обработки первичными антителами и отмывки в PBS от несвязавшихся антител препараты инкубировали 1,5 ч в растворе вторичных АТ (кроличьи, козы или ослиные антитела против иммуноглобулинов мыши, кролика или козы), конъюгированных с различными флуорохромами (FITC, Alexa-488, Alexa-568 или Alexa-594). После отмывки в PBS для выявления ДНК препараты либо окрашивали 2—3 мин в PBS, содержащем 1 мкг/мл ДНК-специфичного флуорохрома To-Pro-3 (Molecular Probes) и затем заключали в среду Vectashield (Vector Laboratories, США), либо непосредственно заключали в эту среду, содержащую 1 мкг/мл DAPI. Препараты просматривали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica SP5 (Heidelberg, Германия) с использованием полупроводникового Ar-UV (405 нм), Ar (488 нм) и HeNe (543 нм и 633 нм) лазеров и 63× объектива (цифровая апертура 1,32). Совмещённые изображения получали с помощью программы ImageJ 1.37a. Относительную яркость и контраст регулировали с помощью Adobe Photoshop.

Иммуноэлектронная микроскопия. Овариолы фиксировали в растворе, содержащем 4% формальдегида, приготовленного из параформальдегида, и 0,5% глутаральдегида на PBS в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем дофиксировали в 2%-ном формальдегиде на PBS в течение ночи при 4°C. После промывки в PBS, который содержал 0,05 М NH_4Cl , и последующего обезвоживания материал заключали в смолу LR White (medium grade, Sigma, США) (Trauner, Büning, 2007; Баталова, Боголюбов, 2013). С помощью ультрамикротомы Reichert-Jung готовили ультратонкие срезы, которые собирали на никелевые сетки.

Ультратонкие срезы обрабатывали в течение 10 мин в блокирующем буфере, содержащем 0,5% желатина (Sigma) и 0,02% Tween-20 на PBS, pH 7,4, затем инкубировали в растворе первичных АТ (табл. 2) во влажной камере при 4°C в течение ночи, и затем в растворе вторичных антител (Aurion, BBIInternational или Ted Pella, США), конъюгированных с коллоидным золотом (частицы 10 и 15 нм), разведённых в соотношении 1:10—1:20. В случае использования АТ 9E10 после отмычки в TBS-Tween (TBST) срезы инкубировали в растворе биотинилированных козьих антител против иммуноглобулинов мыши (Vector Laboratories, США), разведённых TBST в соотношении 1:50, в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмычки в TBST срезы обрабатывали раствором стрептавидина, конъюгированного с 15 нм частицами коллоидного золота (Aurion) и разведённого TBST в соотношении 1:20, в течение 1 ч при комнатной температуре. Материал контрастировали насыщенным спиртовым раствором уранилацетата в течение 10 мин и просматривали с помощью электронного микроскопа Libra 120 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика ядерных структур ооцитов *Tribolium castaneum*. Кариосфера и её капсула. Ооциты *T. castaneum* развиваются в мероистических яичниках телотрофного типа, дифференцировка на ооциты и питающие клетки происходит на стадиях личинки и куколки (Trauner, Büning, 2007). Стадии развития ооцитов имаго *T. castaneum* охарактеризовали на основе номенклатуры, предложенной для *Tenebrio molitor* (Ullmann, 1973) со сходным строением женской половой системы, сходными циклами размножения и развития. Ядра ооцитов этих двух видов на стадии диплотены профазы I мейоза различаются тем, что хромосомы *T. molitor* стягиваются в плотную кариосферу, хроматиновый «клубок», а в кариосфере *T. castaneum* хромосомы конденсируются, но различимы, присутствует развитая КК.

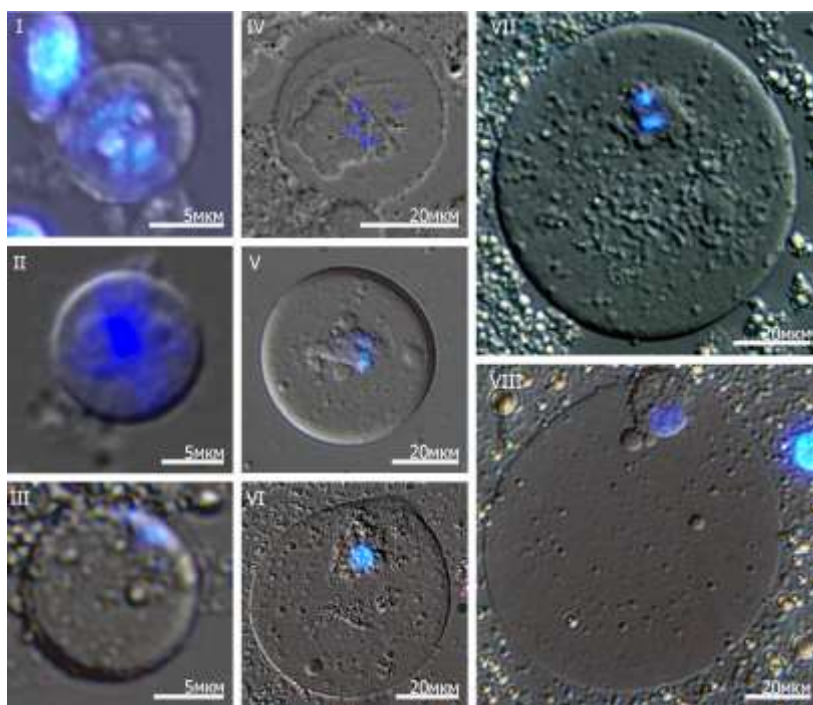


Рис 1. Стадии развития ооцита *T. castaneum*. Покоящийся ооцит стадии I и изолированные ядра ооцитов стадий II–VIII на давленных препаратах. Стадии I–V — превителлогенез, стадии VI–VIII — вителлогенез.

Выделено 8 стадий развития ооцитов *T. castaneum* (рис. 1, табл. 3), которые охватывают периоды превителлогенеза и вителлогенеза. Кариосфера и КК наблюдаются в ядре ооцита до конца его роста. Их полная разборка происходит только после оплодотворения и перехода к редукционному делению.

Стадии развития ооцита *T. castaneum* и динамика ядерных структур

Стадия		Стадия развития ооцита	Размер ядра, мкм	Признаки	Характеристики стадии на основе динамики ядра.
Диплота Прелогенез I мейоза	Прелогенез	I	~5-10	Первичные, превителлогенные ооциты в состоянии покоя располагаются в задней части гермария. Их размер не отличается от размера питающих клеток.	При окрашивании DAPI хромосомы плохо различимы.
		II	~10-15	Ооциты располагаются в транзитной области («шейке») между гермарием и вителлярием. Ооцит различим в массе префолликулярных клеток. Начинается рост цитоплазмы ооцита.	Хромосомы сильно деконденсированы и занимают весь объём ядра.
		III	~15	Ооцит круглой формы, продолжает расти. Префолликулярные клетки располагаются вокруг ооцита и формируют внешний фолликулярный слой. Фолликулы выравниваются.	Ядро располагается в центре клетки. Хромосомы собираются в несколько групп. Появляются первые экстрахромосомные элементы КК
		IV	~30	Ооцит значительно увеличивается в размере. Фолликулярный слой полностью сформирован.	Хромосомы собираются в ограниченном участке ядра и формируют кариосферу, включающую экстрахромосомную капсулу.
		V	~40	Происходит интенсивный рост цитоплазмы ооцита, фолликулярные клетки образуют цилиндрический эпителий.	Ядро по-прежнему располагается в центре клетки. Морфогенез кариосферы и её капсулы продолжается.
	Вителлогенез	VI	~60	Ранний вителлогенез. Начинается отложение желтка. Ооцит быстро увеличивается в размере. Фолликулярные клетки становятся кубическими. Образуются контакты щелевого типа.	Ядро располагается в центре клетки. КК хорошо выражена и имеет сложное строение.
		VII	~100	Средний вителлогенез. Активное накопление желтка.	Ядро перемещается в среднедорсальную часть ооцита.
		VIII	~100	Поздний вителлогенез. Фолликулярные клетки уплощаются, формируя плоский эпителий. Накопление желтка прекращено. Фолликулярные клетки начинают секретировать хорион.	Кариосфера и её капсула уменьшаются, структура капсулы упрощается.

Примечание: размеры ядер определяли на давленных препаратах.

Ядерные тельца. В ядре ооцита *T. castaneum* на стадии диплотены профазы I мейоза присутствуют многочисленные экстрахромосомные тельца. Некоторые из них связаны с КК с внешней её стороны, другие свободно рассредоточены в нуклеоплазме. Мы выделили три типа экстрахромосомных телец (Bogolyubov et al., 2013).

Тельца 1-го типа состоят из плотно упакованных фибрилл примерно 5 мкм толщиной, имеют среднюю электронную плотность и достигают 0,2—0,4 мкм в диаметре. Они содержат коилин и мяРНП. мяРНП выявлены с помощью АТ Y12 против симметричных диметиларгининов (sDMA), характерных для Sm-белков мяРНП (Brahms et al., 2000), и АТ K121 против 2,2,7-триметилгуанозинового (ТМГ) кэпа, характеризующего 5'-конец молекул ряда мяРНК (Will, Lührmann, 2001). По этим признакам тельца 1-го типа могут соответствовать тельцам Кахала (ТК) и/или тельцам гистоновых локусов (ТГЛ). Мы никогда не наблюдали тельца 1-го типа в ассоциации с хроматином, так как они всегда отделены от него КК, и считаем их аналогами ТК.

Тельца 2-го типа представляют собой морфологически сложные образования размером 0,4—0,7 мкм. Они содержат электронноплотные фибриллярные зоны (фибриллы толщиной около 10 нм), а также фибриллярные области средней электронной плотности. Последние

состоят из перекрученных нитей и обогащены ламином В, похожие структуры найдены в КК. Характерная особенность телец — положительная реакция с антителами к фактору сплайсинга SC35, который рассматривают как маркер ядерных “speckles” (КИГ) (Spector et al., 1991). Типичные КИГ соматических клеток млекопитающих, содержащие в своём составе SR-белки (в частности, SC35), состоят из гранул диаметром 20—25 нм, соединённых тонкими фибриллами, в результате чего образуется цепочка гранул, напоминающих «бусы на нитке» (Spector, Lamond, 2011). В отличие от КИГ млекопитающих SC35-содержащие тельца *T. castaneum* не имеют гранулярной составляющей. Ядерные тельца, отличные от «классических» КИГ по морфологическим признакам, но содержащие белок SC35, наблюдали в ооцитах и других видов насекомых (Bogolyubov, Parfenov, 2008).

Нехарактерной для типичных КИГ особенностью SC35-содержащих доменов *T. castaneum* является отсутствие в их составе ТМГ-кэпированных мРНК, что выявляется на ультраструктурном уровне. Ряд других молекулярных компонентов SC35-содержащих ядерных телец ооцитов *T. castaneum* оказался сходным с таковым типичных КИГ.

В тельцах 2-го типа на стадиях VI и VII выявлены поли(А)⁺-РНК и факторы, связанные с метаболизмом мРНК. Используя микроинъекции в ооплазму конъюгированной с флуорохромом TAMRA метилолигонуклеотидной пробы 2'-O-Me(U)₂₂, комплементарной поли(А)-«хвосту» РНК, обнаружено мечение практически всех SC35-содержащих телец. В качестве контроля препараты обрабатывали нуклеазой S7, расщепляющей поли(А)-«хвосты». Такая обработка не оказала влияния на паттерн распределения белка SC35.

Многие SC35-содержащие ядерные тельца ооцитов *T. castaneum* на стадии V содержат коровый белок A1 гетерогенных ядерных РНП (гяРНП, или hnRNP). Мы показали присутствие гяРНП A1 в SC35-доменах и в ооцитах *T. molitor* (Боголюбов, Киселёв и др., 2012). Белок A1 гяРНП вовлечён во многие ключевые процессы, происходящие в ядре, включая экспорт мРНК (He, Smith, 2009). Он тесно ассоциирован с несколькими другими коровыми белками гяРНП, которые вместе формируют гяРНП-комплекс, участвующий в посттранскрипционной модификации мРНК (Dreyfuss et al., 1993; He, Smith, 2009).

В SC35-доменах ооцитов *T. castaneum* на стадиях IV и V обнаружены белки комплекса соединения экзонов (exon junction complex, EJC): Y14, Aly и временно ассоциирующийся с EJC белок NXF1. EJC формируется выше точки соединения экзонов на вновь синтезированной мРНК и сопровождает транскрипт при созревании и во время экспорта в цитоплазму (Dostie, Dreyfuss, 2002). РНК-связывающий белок Y14 является коровым компонентом EJC. Белок-адаптер Aly выполняет роль связующего звена между сплайсингом и экспортом пре-мРНК и, в частности, локализуется в КИГ соматических клеток (Zhou et al., 2000). Вместе с NXF1, ведущим фактором экспорта, эти белки осуществляют ядерный экспорт мРНК (Stutz et al., 2000). Белки Y14 и NXF1 наблюдали в КИГ клеток линии MCF-7 (Schmidt et al., 2006).

Тельца 3-го типа отличаются от КИГ и ТК большими размерами (3—5 мкм в диаметре) и правильной округлой формой. Природу этих телец определить не удалось, они не реагировали ни с одним из имеющихся в распоряжении АТ.

Основные антигены, локализованные на светооптическом и/или ультраструктурном уровне в составе ядерных телец 1-го и 2-го типов ооцитов *T. castaneum* (аналогов, соответственно, ТК и КИГ) перечислены в табл. 2.

Транскрипционная активность хромосом, собранных в кариосферу. В период существования кариосферы в ядре ооцита *T. castaneum* не наблюдается полной конденсации хроматина в отличие от представителя того же семейства *T. molitor* (Боголюбов, Киселёв и

др., 2012), у которого показано отсутствие синтеза РНК в ооцитах в конце периода роста (Bogolyubov, 2007). Эти данные могут свидетельствовать о неполной инактивации генома ооцита *T. castaneum*. Для проверки данного предположения в ооцит на разных стадиях инъецировали бромουридинтрифосфат (BrUTP). На стадиях IV и V с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии регистрировали включение BrUTP в перихроматиновую область кариосферы. Параллельно проводилось иммуноцитохимическое окрашивание ядер ооцитов, в которые был инъецирован BrUTP. Было выявлено мечение перихроматиновой области кариосферы с помощью АТ против гиперфосфорилированной (элонгирующей) формы РНК-полимеразы II, ТВР (ТАТА-связывающей субъединицы базального фактора транскрипции TFIID) и транскрипционного фактора TFIIN. Эти данные подтверждают факт неполной инактивации генома *T. castaneum* в период существования кариосферы и сохранение в этот период остаточной транскрипции.

Компоненты капсулы кариосферы. Предполагают, что КК является своеобразно организованной частью ядерного матрикса (Gruzova, Parfenov, 1993; Грузова и др., 1995). Мы обнаружили, что при окрашивании ядер ооцитов *T. castaneum* родамин-фаллоидином в составе КК выявляется фибриллярный актин (F-актин). Иммунофлуоресцентные и иммуноэлектронные исследования с АТ против актина подтвердили его присутствие в материале КК. АТ связываются с электронноплотным компонентом КК и тяжами. Тяжи появляются на стадии III и состоят из поперечно исчерченных нитей толщиной 20 нм, уложенных в составе тяжа в несколько рядов. Позднее эти элементы образуют КК. Одним из компонентов КК оказался белок класса промежуточных филаментов — ламин В. Он выявлен в связи с «перекрученными филаментами» (entangled filamentous material) КК — материалом, присутствующим также в составе телец 2-го типа (SC35-содержащих доменах). Таким образом, в КК ооцитов *T. castaneum* найдены структурные белки ядра, что подтверждает предположение о том, что КК является модификацией ядерного матрикса.

Окрашивание препаратов акридиновым оранжевым продемонстрировало присутствие в КК значительных количеств РНК. Оказалось, что, по крайней мере, часть этих РНК представляет собой мяРНК в виде мяРНП. Предположение о том, что в КК могут присутствовать мяРНП, проверили, используя АТ Y12 к Sm-эпиту по мяРНП (sDMA) и K121 против ТМГ-кэпа мяРНК. Антигены выявлены в КК как на светооптическом, так и электронно-микроскопическом уровнях (Боголюбов, Баталова и др., 2012). Сходная локализация ТМГ-кэпированных мяРНК в КК ранее обнаружена в ооцитах другого вида насекомых — долгоносика *Anthonomus pomorum* (Świątek, Jaglarz, 2004).

Удивительно присутствие в КК белка Y14, компонента ЕЖС. Его обнаружили с помощью АТ методами иммунофлуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии (рис. 5, 6). Результаты, полученные при обработке АТ, не дают динамической картины распределения белков ЕЖС. Для изучения их в динамике и выявления мест накопления использовали микроинъекции в ооплазму мРНК слитого белка (Johnson, 1983). Этот метод ранее успешно использовали в нашей лаборатории для детекции белков ядерной локализации в ооцитах насекомых (Боголюбов, 2003) и амфибий (Цветков и др., 2002).

Конструкция Y14-Мус. Фактор сплайсинга Y14, который участвует в процессе лигирования экзонов и, по нашим данным, присутствует в КК, стал белком-мишенью для клонирования.

Последовательность мРНК Y14 *T. castaneum* получили из базы данных NC (nucleotide collection) Национального центра биотехнологии и информатики (NCBI, США; шифр доступа: XM_962684.2). В качестве вектора выбрали коммерчески доступную плазмиду, несущую последовательность Мус-эпитопа. Мус-онкоген не экспрессируется у насекомых, и его нуклеотидная последовательность использована в качестве метки (tag) в конструкции. Кроме того, Мус-эпитоп минимально влияет на конформацию конечного слитого белка (рис. 2).

Схема получения конструкции состояла из следующих этапов (рис. 2). мРНК выделяли из личинок (рис. 3, А, I), затем синтезировали кДНК. Проводили ПЦР с полимеразой Pfu и геноспецифичными праймерами, подобранными к кодирующей последовательности Y14 *T. castaneum* (рис. 2, В, I, табл. 1). В результате получили ампликон без стоп-кодона, содержащий последовательности для рестрикции. Методом ТА-клонирования фрагмент вставили в вектор PTZ57R/Т. После обработки соответствующими

рестриктазами последовательность встраивали в вектор, содержащий открытую рамку считывания Мус-эпитопа (рис. 2, А). Далее последовательность переносили в вектор с соответствующим промотором для транскрипции *in vitro*. С помощью ПЦР с праймерами, содержащими несколько изменённых по сравнению с канонической последовательностью нуклеотидов, в ПЦР продукт вносили стоп-кодон (рис. 2, В, табл. 1). На матрице очищенного фрагмента проводили ПЦР с полимеразой Pfu и праймерами M13. Получили ампликон, содержащий промотор T7, а на следующем этапе — кодирующую последовательность слитого белка Y14-Мус (рис. 2, С; 3, В, II). Далее проводили транскрипцию *in vitro* мРНК слитого белка Y14 (*T. castaneum*)–Мус с одновременным 5'-кэпированием (Рис 2, D; 3, А, II).

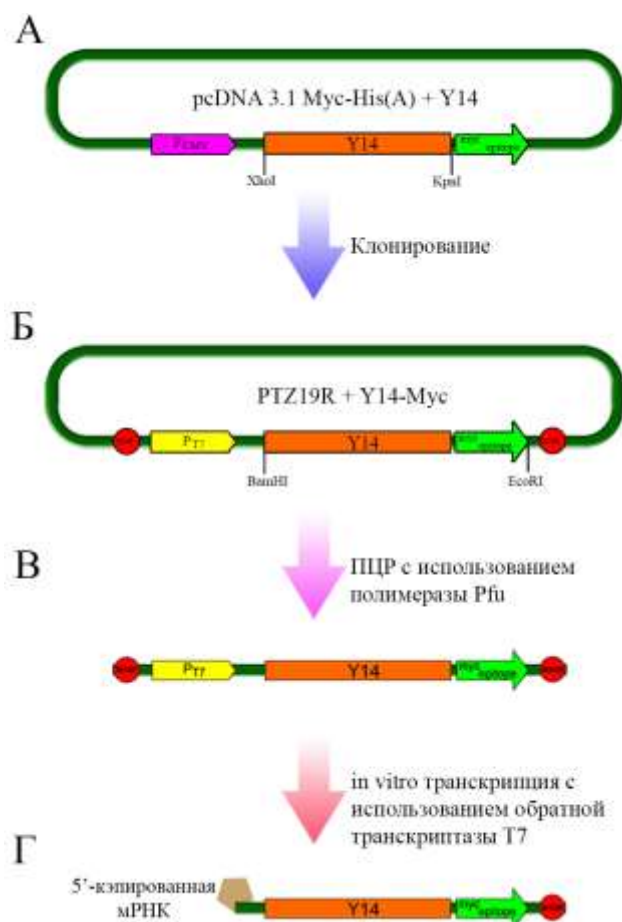


Рис 2. Схема конструирования плазмид с мРНК Y14-Мус. А — Кодирующая последовательность кДНК Y14 *T. castaneum* клонирована в вектор pcDNA3.1 Myc-His(A), Б — Кодирующая последовательность Y14 *T. castaneum* с присоединённым к ней Мус-эпитопом клонирована в вектор PTZ19R, В — ПЦР с полимеразой Pfu для создания матрицы для транскрипции *in vitro*. Г — синтезированный *in vitro* транскрипт Y14 *T. castaneum*, содержащий Мус-эпитоп.

Транскрипция плазмиды и сплайсинг гена Y14 в клетках человека линии НЕК293. Плазмида А (рис. 2) сконструирована не только для включения Мус-эпитопа в последовательность Y14, но и для проверки возможности экспрессии полученной конструкции в живых соматических клетках. Трансфекцию клеток НЕК293 плазмидой А (рис. 2, А) проводили при помощи кальциевого метода, который обеспечивает умеренную эффективность трансфекции. Тем не менее 10% клеток были успешно трансфицированы плазмидой А, и экспрессировали конструкцию Y14-Мус. Слитый белок выявляли в основном в цитоплазме. Выравнивание аминокислотных последовательностей Y14 *T. castaneum* и человека показало, что домены связывания РНК (RRM) весьма сходны, а сайты ядерной локализации (NLS) Y14 белков человека и жука имеют отличия, которые, вероятно, не позволяют Y14-Мус *T. castaneum* проникнуть в ядро клеток человека.

Кодирующие последовательности белка Y14 человека и жука отличаются не только NLS, но, вероятно, и сигналами сплайсинга. Нормальный сплайсинг пре-мРНК насекомых в клетках человека не происходит. Из геномной ДНК *T. castaneum* при помощи праймеров 001-DnaNheI-Forv и 002-DnaNot-Rev (табл. 1), подобранных к геномной последовательности Y14 *T. castaneum* (шифр доступа NCBI: NW_001093646.1), амплифицировали несплайсированную последовательность

Y14 (рис. 4, А). После обработки рестриктазами (табл. 1) фрагмент клонировали в вектор рВМС (Murashev et al., 2007), содержащий цитомегаловирусный промотор. Через 72 ч из культуры выделяли РНК, проводили обратную транскрипцию, амплифицировали фрагмент Y14 *T. castaneum* теми же праймерами (табл. 1), клонировали и секвенировали амплифицированный фрагмент так, как описано в разделе «Материал и методика». Анализ последовательностей из 10 клонов показал, что все последовательности идентичны и отличаются от нормально сплайсированной мРНК Y14 (рис. 4). Последовательность Y14 *T. castaneum*, процессирующаяся в клетках НЕК293, не теряет первый интрон (рис. 4, С), на 3'-конце этого интрона остаются два дополнительных нуклеотида GC. В ходе сплайсинга

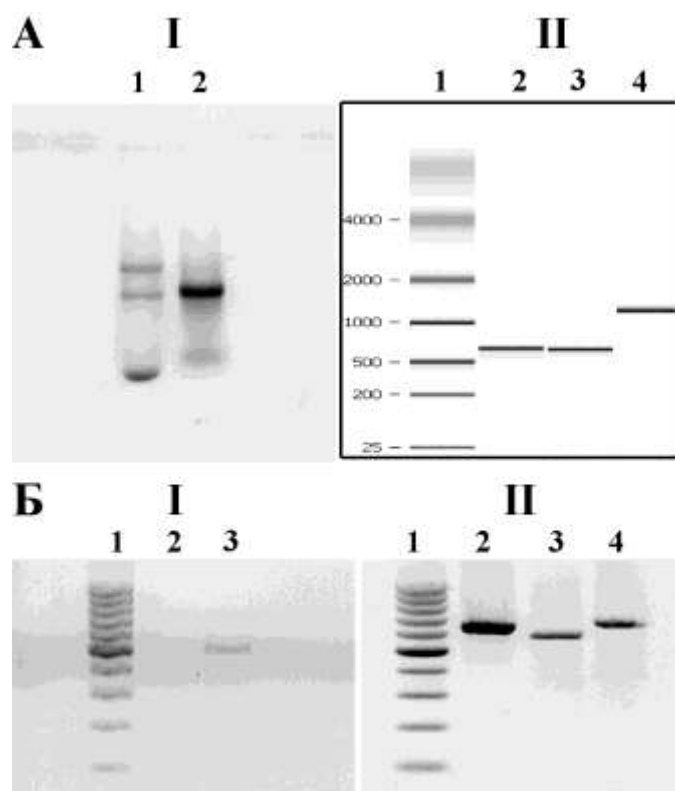


Рис. 3. Электрофоретический контроль этапов конструирования. А — Электрофорез РНК. I — Электрофорез РНК в денатурирующих условиях: (1) Тотальная РНК печени крысы (контроль); (2) Тотальная РНК личинок *T. castaneum*. II — Транскрибированная *in vitro* РНК (электрофореграмма получена с использованием прибора Agilent 2100 Bioanalyzer): (1) — Маркер (встроенная функция); (2, 3) — 5'-кэпированные *in vitro* РНК-транскрипты Y14-Мус (2 – 200 нг; 3 – 100 нг); (4) — мРНК GABDH, контроль (клетки человека линии НЕК293, 200 нг). Б — Электрофорез ДНК. I — Электрофорез после проведения реакции обратной транскрипции: (1) — Маркер (100 п.н.); (2) — Отрицательный контроль (ПЦР-смесь без добавления матрицы кДНК); (3) — ПЦР с тотальной кДНК *T. castaneum*, праймеры №1, №2 (номера праймеров в соответствии с Табл. 1) (506 п.н.). II — Электрофорез после проведения реакции ПЦР с полимеразой Pfu, матрица для получения ампликона, с которого будет производиться *in vitro* транскрипция PTZ19R+Y14-Мус: (1) — Маркер (100 п.н.); (2) — праймеры №5, №4; (3) — праймеры №3, №6; (4) — праймеры №5, №6 (для проведения реакции обратной транскрипции) (639 п.н.)

удаляются экзоны 2 и 3, хотя экзон 4 остается. Таким образом, плаزمида успешно транскрибируется, но не процессируется в гетерологичной системе. Причины этого требуют специальных исследований с использованием культуры клеток *T. castaneum*, но абортивный сплайсинг объясняет отсутствие нормальной (ядерной) локализации слитого белка. Для целей настоящей работы сконструировали плазмиду В (рис. 2) для получения 5'-экспонированной мРНК для последующей её микроинъекции в ооцит.

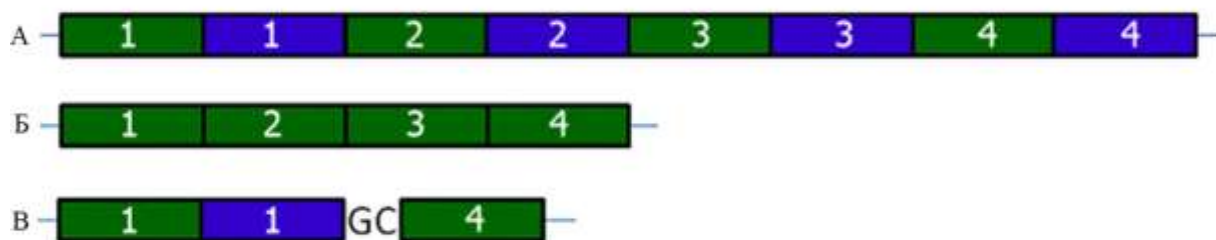


Рис. 4. Нормальный сплайсинг Y14 в клетках *T. castaneum* по сравнению с абортивным в клетках человека HEK293. А — Геномная последовательность Y14, Б — нормальный сплайсинг Y14 *T. castaneum*, В — Неправильный сплайсинг Y14 *T. castaneum* в клетках HEK293 (человек). Зеленый — экзоны, синий — интроны.

Инъекции мРНК Y14-Мус в ооцит.

Микроинъекции мРНК слитого белка в цитоплазму ооцита *T. castaneum* требуют длительного периода инкубации для трансляции и экспорта (3—7 ч), в этот период яйцевые трубки и ооциты должны оставаться живыми. Тестировали несколько видов сред, среди которых: RPMI-1640 (Moore et al., 1967), раствор Рингера (Hille, 1984), среда Grace (Grace, 1962) и среда ExCell 420 (SAFC Bioscience, США) (Goodman et al., 2012). Все среды использовали с добавлением 10% FBS (Maranga et al., 2002). Препарирование насекомого и разделение яичника на отдельные овариолы проводили непосредственно в тестируемой среде. После препарирования овариолы переносили в свежую среду, каждые полчаса состояние яйцевых трубок и ооцитов контролировали под микроскопом. Лучший результат показала среда ExCell 420 (SAFC Bioscience, США) с добавлением 10% FBS. В этой среде разделённые овариолы сохраняли морфологические характеристики и подвижность в течение 24 ч после препарирования, среда сохраняла исходные прозрачность и pH.

Кэпированную мРНК Y14-Мус инъецировали в ооплазму. Через 3—4 ч готовили давленные препараты ядер, на которых иммуоцитохимически выявляли Мус-эпитоп (tag). За время эксперимента мРНК транслировалась и транспортировалась в ядро, следовательно, отслеживали не весь Y14 ядра, а только недавно полученный экзогенный продукт. На стадии V метка выявлена в SC35-доменах и КК, начиная со стадии VI — только в КК (рис. 5). В перихроматиновой зоне кариосферы Y14-Мус колокализовался с рыхлыми петлями ДНК, окружающими плотный клубок хромосом. КИГ-подобные тельца (SC35-содержащие домены) на стадии вителлогенеза, то есть начиная со стадии VI, не содержали вновь синтезированный Y14, который отслеживали по Мус-эпитопу (рис. 5, В). Скопления метки anti-Мус наблюдали в доменах, отличных от SC35-содержащих телец (рис. 5, В стрелки), и на внутренней стороне ядерной мембраны. Такая локализация слитого белка, вероятно, отражает транспорт вновь синтезированного белка в ядро. Электронно-микроскопические наблюдения с использованием АТ к Мус-эпитопу подтвердили присутствие слитого белка Y14-Мус в SC35-содержащих тельцах ооцитов стадии V. На более поздних стадиях концентрация Y14-Мус в этих тельцах значительно уменьшается. По данным электронной микроскопии, в полностью сформированной КК метка Y14-Мус находится в фибриллярной зоне КК (рис. 6, В).

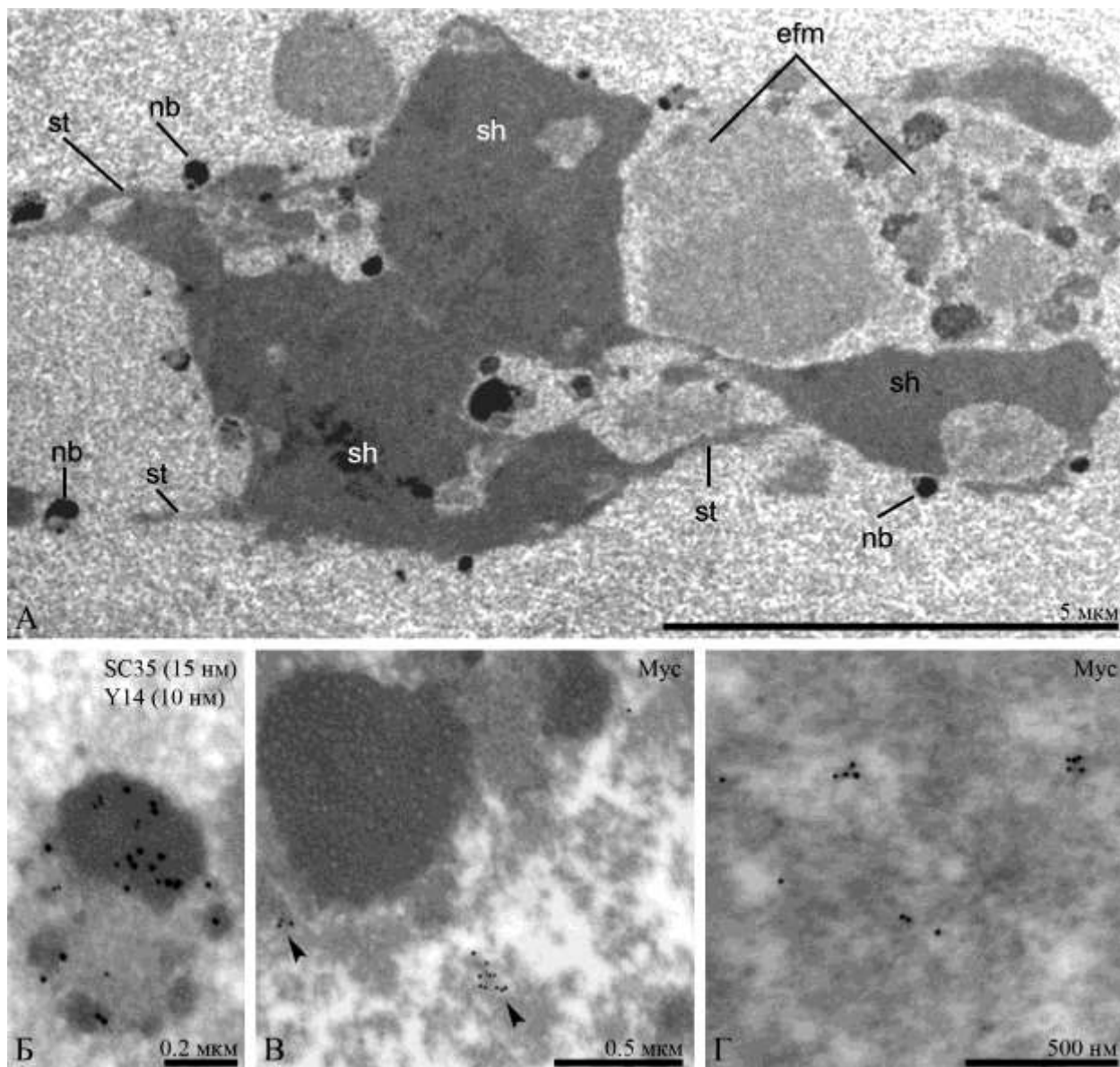


Рис. 6. Морфология капсулы карисоферы (А) *T. castaneum* и фрагмент кариосферы после обработки АТ к Y14 и SC35 (Б, частицы золота 10 и 15 нм, соответственно) и Мус-эпиту (Г, Д). А — фрагмент капсулы кариосферы *T. castaneum*: sh — материал капсулы; st — тяжи (strands), efm — перекрученные филаменты (entangled filamentous material), nb (nuclear bodies) — ядерные тела. На рис. 6, В стрелками отмечены кластеры в нуклеоплазме, содержащие Y14-Мус, на рис. 6, Г представлен фрагмент капсулы кариосферы.

Таким образом, позиция вновь синтезированного Y14-Мус совпадает с местом остаточной транскрипции (см. выше) в пограничной (перихроматиновой) зоне кариосферы, расположенной между конденсированным хроматином и КК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предположение о том, что КК является разновидностью ядерного матрикса, исходно выдвинуто на основании морфологических данных, полученных при помощи электронной микроскопии (Gruzova, Parfenov, 1993; Грузова и др., 1995). По методу выделения ядерный матрикс (ЯМ) определяют как сеть филаментов, устойчивую по отношению к детергентам и растворителям с высокой ионной силой (Berezney, Coffey, 1974; Malyavantham et al., 2008; Збарский и Дебов, 1948). Многолетняя дискуссия и большое количество исследований, выполненных в рамках концепции ЯМ, не прояснили до конца, существует ли в ядре эукариотической клетки сеть гетерогенных или гомогенных филаментов *in situ* (Hancock, 2000; Pederson, 2000). Появившаяся позднее концепция хромосомных территорий (ХТ)

предполагает существование компонентов ЯМ как в интерхроматиновом пространстве в составе ядерных доменов (телец), так и внутри ХТ в качестве белков скаффолда хромосом (Zorn et al., 1976).

Существование *in situ* и *in vivo* одного из компонентов ЯМ — ламины, состоящей из белков класса промежуточных филаментов, не вызывает сомнений (Stuurman et al., 1998; Broers et al., 1999). В составе ЯМ находят белки, участвующие в транскрипции, сплайсинге РНК и репликации ДНК. Полагают, что ЯМ играет фундаментальную роль в организации этих процессов (Malyavantham et al., 2008). Но даже если ЯМ как сеть опорных филаментов не является необходимой структурой для ядра соматической клетки, то в ядре ооцита такая сеть филаментов присутствует.

Кроме ламин структурным компонентом филаментов ядра ооцита является актин. С помощью мечения тяжёлым меромеозином удалось проследить периодичность по длине ядерного актинового филамента (Дроздов и Парфёнов, 1983; Парфёнов и Галактионов, 1987). С помощью электронной микроскопии с полевой эмиссией (feSEM) и методики максимально щадящей подготовки проб в ооцитах *Xenopus* показано наличие внутриядерной сети филаментов, соединённых с поровыми комплексами (Kiseleva et al., 2004). «Нити, связанные с порами» (PLFs), внедряются в экстрахромосомные ядерные домены — сферические структуры размером от 100 нм до 5 мкм в диаметре, некоторые из которых определены как тельца Кахала (ТК). Полимеризация актина необходима для стабилизации специфической пространственной организации ядерных структур растущих ооцитов птиц и амфибий. В экспериментах с агентами, деполимеризующими актин (цитохалазин Д и латрункулин А), показано, что разборка полимерного ядерного актина ведёт к конденсации хромосом и их перемещению в ограниченное пространство внутри ядра ооцита (Maslova, Krasikova, 2012).

В настоящей работе мы показали, что актин и ламин В входят в состав элементов КК ооцитов насекомого *T. castaneum*. Небольшие локальные сети филаментов (gene expression matrices) могут присутствовать в местах активной транскрипции в соматических клетках (Pederson, 2000). Можно ожидать их присутствие и в ядре ооцитов. В этой связи ядро ооцита *T. castaneum* оказалось удобным объектом: на стадиях V—VI морфологически чётко определяется участок остаточной транскрипции — перихроматиновая зона кариосферы, представляющая собой пограничную область между конденсированным хроматином и КК.

В соматических клетках экстрахромосомные ядерные домены — динамичные структуры с изменяющимся составом. Они являются транзитными доменами для ряда факторов экспрессии генов. Например, несмотря на локальную концентрацию в КИГ факторов сплайсинга, которая в 5—10 раз превышает таковую в окружающей нуклеоплазме (Wei et al., 1999), большинство белков КИГ характеризуется высокой динамикой, задерживаясь в КИГ не дольше, чем в других участках ядра (Phair, Misteli, 2000).

Генно-инженерный подход с микроинъекциями синтезированных *in vitro* мРНК-конструкций даёт возможность проследить за динамикой перемещения в клетке вновь синтезированного белка. В качестве мишени слежения мы выбрали белок, активно участвующий в процессинге пре-мРНК и опосредованно в транспорте мРНК. В соматических клетках экспорт мРНК направляется эволюционно-консервативным белковым комплексом TREX, который располагается ближе к 5'-концу пре-мРНК (Cheng et al., 2006). Ещё одним важным комплексом, участвующим в экспорте мРНК, является комплекс соединения экзонов EJC, который имеет несколько общих белков с TREX (Aly/REF и UAP56). EJC связывается пре-мРНК во время сплайсинга и локализуется на 20—24 нуклеотидов выше точки соединения экзонов. EJC необходим для рекрутирования на

зрелую мРНК факторов экспорта. EJC экспортируется в цитоплазму вместе с мРНК (Le Hir et al., 2001). Этот комплекс участвует в деградации мРНК (nonsense-mediated decay), если хотя бы один EJC располагается ниже стоп-кодона (Schoenberg, Maquat, 2012). EJC состоит из двух групп белков. Первая группа составляет ядро (core) этого комплекса, а вторая — его оболочку (shell). Одним из хорошо описанных коровых компонентов EJC является гетеродимер Y14–Magoh, который связывается с пре-мРНК на этапе лигирования экзонов (Reichert et al., 2002; Jurica and Moore, 2003).

Опыты по трансфекции клеточной культуры HEK293 плазмидой, которая включала кодирующие последовательности Y14 (*T. castaneum*) и Мус (tag), показали, что конструкция успешно транскрибируется в клетках человека, но её сплайсинг в гетерологичной системе проходит некорректно. Причины abortивного сплайсинга могут быть предметом отдельного исследования. Инъекцированная в ооплазму *T. castaneum* мРНК слитого белка Y14–Мус за 3 ч успешно транслировалась, продукт трансляции импортировался в ядро ооцита. Это свидетельствует о корректном прохождении сплайсинга. Высокий уровень флуоресцентного сигнала наблюдался в перихроматиновых участках кариосферы, в области расположения слабо конденсированных петель ДНК (рис. 5). Электронная микроскопия показывает, что метка принадлежит фибриллярному компоненту КК (Рис. 6).

Опыты со слитым белком показали, что белок Y14 по-разному локализован на разных стадиях развития ооцита (Киселёв, 2014). Если на стадиях IV—V, в начале формирования КК, Y14 выявляется в SC35-содержащих доменах (рис. 6, А), то на поздних стадиях Y14 перемещается в сформированную КК (рис. 6, В). Можно предположить, что так же, как и в соматических клетках (Spector, Lamond, 2011), SC35-содержащие тельца ядра ооцитов *T. castaneum* представляют собой транзитные домены для некоторых белков, которые связаны с транспортом и экспортом мРНК. Возможно, в составе ядерных телец есть и другие белки, которые входят в состав КК на терминальных стадиях развития ооцита. При выявлении различных ядерных белков методом иммунофлуоресценции (табл. 2) обнаружили, что некоторые из них, так же, как и Y14, могут менять места локализации в зависимости от стадии развития ооцита. Так, например, белки гЯРП A1, Aly, NXF1 на превителлогенной стадии находятся в КИГ, а на вителлогенной меняют свою локализацию и обнаруживаются преимущественно в КК.

Для биологии развития принципиально важен вопрос о том, какая РНК последней транскрибируется в ооците с инактивированным геномом при подготовке к оплодотворению. Организмы с развитой КК могут быть удобным объектом для решения этого вопроса. Окрашивание ядер ооцитов для выявления тотальной РНК показало, что в них на поздних стадиях вителлогенеза присутствует значительное количество РНК. Основная масса этой РНК сконцентрирована в области КК.

Транскрипция в ооците очень активна, транскрибируются «молчащие» в соматических клетках участки генома (Hourcade et al., 1973; Gilbert, 2000). Закрепление в ооплазме мРНК, кодирующих белки материнского эффекта, хорошо документировано и имеет существенное значение для развития. Например, мРНК белка материнского эффекта Оскар детерминирует первичные оси в неоплодотворённом яйце, а мРНК Y14 и Magoh отвечают за закрепление мРНК Оскар на полюсе ооцита (Mohr et al., 2001). Однако данные о распределении различных мРНК в ядре ооцита в литературе практически не встречаются (Edström, 1960). Можно предположить, что мРНК, накапливающиеся в КК, и особенно те РНК, которые синтезируются в оогенезе последними, принципиально важны для будущей организации развивающегося эмбриона. Присутствие РНК в КК служит ещё одним подтверждением того, что КК является модификацией ЯМ, поскольку в ЯМ соматических

клеток *in vivo* присутствуют РНП — набор белков в комплексе с РНК (Podgornaya et al., 2003).

В последнее время появляется всё больше работ о ключевой роли РНК в эмбриональном развитии (Probst et al., 2010; Fadloun et al., 2013). Морфологические и гистохимические методы не дают информации о природе этой РНК. Уже появились современные способы определить природу РНК ядра ооцита, а, возможно, и РНК в составе КК. Так, состав РНК сперматозоидов мыши оказался принципиально отличным от такового ооцитов и выявлены специфичные для спермиев РНК (spR), участвующие в раннем эмбриогенезе (Kawano et al., 2012). Основным условием идентификации РНК является наличие прочитанного генома организма. *T. castaneum* удовлетворяет этому условию. Остаточная транскрипция, прослеженная в настоящей работе на поздних стадиях оогенеза *T. castaneum*, позволяет надеяться на определение в дальнейшем природы РНК, синтезирующейся последней в оогенезе.

ВЫВОДЫ

- 1) В ядре ооцитов *T. castaneum* формируется кариосфера, окружённая развитой экстрахромосомной капсулой. В перихроматиновых участках кариосферы сохраняется остаточная транскрипция вплоть до конца периода роста ооцита.
- 2) В нуклеоплазме присутствует 3 типа ядерных телец: коилинсодержащие (аналоги телец Кахала), SC35-содержащие (аналоги кластеров интерхроматиновых гранул) и крупные фибриллярные тельца неизвестной природы. SC35-содержащие домены содержат поли(A)⁺-РНК, белок A1 hnРНП, компоненты комплекса соединения экзонов (EJC), но не содержат ТМГ-кэпированные малые ядерные РНК (snРНК), характерные для типичных КИГ.
- 3) Фибриллярный компонент капсулы кариосферы содержит F-актин и ламин В.
- 4) Капсула кариосферы содержит основную массу РНК ядра, среди этих РНК есть мяРНП и поли-А⁺-РНК.
- 5) Синтезированная *in vitro* мРНК слитого белка Y14-Мус успешно экспрессируется как в клетках человека модельной линии НЕК293, так и в инъектированных ооцитах *T. castaneum*.
- 6) Капсула кариосферы содержит фактор сплайсинга Y14 — коровый белок EJC. SC35-содержащие тельца являются транзитными экстрахромосомными доменами для белка Y14, а капсула кариосферы — его дефинитивным компартментом.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Bogolyubov D.S., Batalova F.M., **Kiselyov A.M.**, Stepanova I.S. 2013. Nuclear structures in *Tribolium castaneum* oocytes. Cell Biol. Int. 37: 1061—1079.
2. Боголюбов Д.С., Баталова Ф.М., **Киселёв А.М.**, Парфенов В.Н. 2012. Распределение 5'-триметилгуанозин-кэпированных малых ядерных РНК в экстрахромосомных ядерных структурах ооцитов лабораторного насекомого *Tribolium castaneum*. Докл. АН. 444 (6): 691—694.
3. Боголюбов Д.С., **Киселёв А.М.**, Шабельников С.В., Парфенов В.Н. 2012. Полиаденилированные РНК и факторы экспорта мРНК в связи с экстрахромосомными ядерными доменами вителлогенных ооцитов насекомого *Tenebrio molitor*. Цитология. 54 (6): 497—507.

Тезисы:

4. **Киселёв А.М.** 2014. Использование искусственных слитых белков для исследования ядерных структур ооцитов жука *Tribolium castaneum*. VII международная научно-практическая конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». Санкт-Петербург.
5. Боголюбов Д.С., **Киселёв А.М.**, Баталова Ф.М., Степанова И.С. 2014. Капсула кариосферы — особый экстрахромосомный домен ядер ооцитов. Материалы XXV Российской конференции по электронной микроскопии. Черногловка. С. 550—551.
6. Боголюбов Д.С., **Киселёв А.М.**, Баталова Ф.М., Степанова И.С., Подгорная О.И. 2014. Кариосфера и ее капсула — уникальные структуры ядер растущих ооцитов. Цитология. 56 (9): 644.
7. Боголюбова И.О., Баталова Ф.М., Почукалина Г.Н., **Киселёв А.М.**, Степанова И.С., Боголюбов Д.С. 2013. Применение электронной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в исследованиях распределения ядерных белков в ооцитах и эмбрионах. Материалы XVIII Российского симпозиума по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел. Черногловка. С. 448—449.
8. **Киселёв А.М.**, Баталова Ф.М., Боголюбов Д.С. 2012. Ядерные структуры ооцитов лабораторного насекомого *Tribolium castaneum*. Цитология. 54 (4): 342.
9. Боголюбов Д.С., Баталова Ф.М., **Киселёв А.М.**, Степанова И.С., Парфенов В.Н. 2012. Динамика транскрипционной активности кариосферы двух видов жуков-чернотелок. Цитология. 54 (9): 668—669.
10. Баталова Ф.М., **Киселёв А.М.**, Степанова И.С., Боголюбов Д.С. 2011. Капсула кариосферы лабораторного насекомого *Tribolium castaneum* как компонент ядерного матрикса ооцитов. Цитология. 53 (9): 692—693.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Баталова Ф.М., Боголюбов Д.С. 2013. Цитология 55: 796—806. Боголюбов Д.С. 2003. Цитология. 45: 1083—1093. Дроздов А.Л., Парфёнов В.Н. 1983. Докл. АН СССР. 273: 1237—1240. Збарский И.Б., Дебов С.С. 1948. Докл. АН СССР. 62: 795—798. Грузова М.Н., Цветков А.Г., Почукалина Г.Н., Парфенов В.Н. 1995. Цитология. 37: 744—769. Парфёнов В.Н., Галактионов К.И. 1987. Цитология. 29: 142—149. Цветков А.Г., Сковородкин И.А., Боголюбов Д.С., Квасов И.Д., Парфенов В.Н. 2002. Цитология. 44: 1037—1045. Berezney R., Coffey D.S. 1974. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60: 1410—1417. Bogolyubov D. 2007. Folia Histochem. Cytobiol. 45: 129—128. Bogolyubov D., Parfenov V. 2008. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 269: 59—110. Bogolyubov D., Stepanova I., Parfenov V. 2009. BioEssays. 31: 400—409. Short Protocols in Cell Biology. 2003. ed. by Bonifacino J., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J., Yamada K.M. Current Protocols in Cell Biology Online. John Wiley & Sons. 826 pp. Brahms H., Raymackers J., Union A., de Keyser F., Meheus L., Lührmann R. 2000. J. Biol. Chem. 275: 17122—17129. Broers J.L., Machiels B.M., van Eys G.J., Kuijpers H.J., Manders E.M., van Driel R., Ramaekers F.C. 1999. J. Cell Sci. 112: 3463—3475. Cheng H., Dufu K., Lee C.-S., Hsu J.L., Dias A., Reed R. 2006. Cell. 127: 1389—1400. Dostie J., Dreyfuss G. 2002. Curr. Biol. 12: 1060—1067. Dreyfuss G., Matunis M.J., Piñol-Roma S., Burd C.G. 1993. Annu. Rev. Biochem. 62: 289—321. Drummond D.R., Armstrong J., Colman A. 1985. Nucleic Acids Res. 13: 7375—7394. Edström J.-E. 1960. J. Biophys. Biochem. Cytol. 8: 47—51. Evan G.I., Lewis G.K., Ramsay G., Bishop, J.M. 1985. Mol. Cell. Biol. 5: 3610—3616. Fadloun A., Le Gras S., Jost B., Ziegler-Birling C., Takahashi H., Gorab E., Carninci P., Torres-Padilla M.-E. 2013. Nat. Struct. Mol. Biol. 20: 332—338. Fakan S., van Driel R. 2007. Semin. Cell Dev. Biol. 18: 676—681. Fu X., Maniatis T. 1990. Nature. 343: 437—441. Gilbert S.F. 2000. Developmental biology. Sunderland: Sinauer Associates. 695 pp. Goodman C.L., Stanley D., Ringbauer J.A., Beeman R.W., Silver K., Park Y. 2012. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 48: 426—433. Grace T.D.C. 1962. Nature. 195: 788—789. Gruzova M.N., Parfenov V.N. 1977. J. Cell Sci. 28: 1—13. Gruzova M.N., Parfenov V.N. 1993. Int. Rev. Cytol. 144: 1—52. Hall L.L., Smith K.P., Byron M., Lawrence J.B. 2006. Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol. 288: 664—675. Hancock R. 2000. Chromosoma. 109: 219—225. He Y., Smith R. 2009. Cell. Mol. Life Sci. 66: 1239—1256. Hille B. 1984. Ionic channels of excitable membranes. Sunderland: Sinauer Associates. 426 p. Hourcade D., Dressler D., Wolfson J. 1973. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70: 2926—2930. Hulsebos T.J., Hackstein J.H., Hennig W. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81: 3404—3408. Johnson I.S. 1983. Science. 219: 632—637. Jurica M.S., Moore M.J. 2003. Mol. Cell. 12: 5—14. Kawano M., Kawaji H., Grandjean V., Kiani J., Rassoulzadegan M. 2012. PloS One. 7: e44542. Kim W.Y., Dahmus M.E. 1986. J. Biol. Chem. 261: 14219—14225. Kiseleva E., Drummond S.P., Goldberg M.W., Rutherford S.A., Allen T.D., Wilson K.L. 2004. J. Cell Sci. 117: 2481—2490. Krainer A.R. 1988. Nucleic Acids Res. 16: 9415—9429. Kronvall G., Myhre E. 1977. Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B] 85: 249—254. Le Hir H., Gatfield D., Izaurralde E., Moore M.J. 2001. EMBO J. 20: 4987—4997. Lerner E., Lerner M., Janeway C., Steitz J. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78: 2737—2741. Liu J.-L., Wu Z., Nizami Z.,

Deryusheva S., Rajendra T.K., Beumer K.J., Gao H., Matera A.G., Carroll D., Gall J.G. 2009. *Mol. Biol. Cell.* 20: 1661—1670. Malyavantham K.S., Bhattacharya S., Alonso W.D., Acharya R., Berezney R. 2008. *Chromosoma*. 117: 553—567. Mao Y.S., Zhang B., Spector D.L. 2011. *Trends Genet.* 27: 295—306. Maranga L., Coroadinha A.S., Carrondo M.J.T. 2002. *Biotechnol. Prog.* 18: 855—861. Markaki Y., Gunkel M., Schermelleh L., Beichmanis S., Neumann J., Heidemann M., Leonhardt H., Eick D., Cremer C., Cremer T. 2010. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75: 475—492. Maslova A., Krasikova A. 2012. *Nucleus*. 3: 300—311. Mintz P.J., Patterson S.D., Neuwald A.F., Spahr C.S., Spector D.L. 1999. *EMBO J.* 18: 4308—4320. Mohr S.E., Dillon S.T., Boswell R.E. 2001. *Genes Dev.* 15: 2886—2899. Moore G.E., Gerner R.E., Franklin H.A. 1967. *JAMA*. 199: 519—524. Murashev B., Kazennova E., Kozlov A., Murasheva I., Dukhovlinova E., Galachyants Y., Dorofeeva E., Dukhovlinov I., Smirnova G., Masharsky A., et al. 2007. *Biotechnol. J.* 2: 871—878. Nizami Z., Deryusheva S., Gall J.G. 2010. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: a000653. Parfenov V., Potchukalina G., Dudina L., Kostyuchek D., Gruzova M. 1989. *Gamete Res.* 22: 219—231. Pederson T. 2000. *Mol. Biol. Cell.* 11: 799—805. Phair R.D., Misteli T. 2000. *Nature*. 404: 604—609. Podgornaya O.I., Voronin A.P., Erukashvily N.I., Matveev I.V., Lobov I.B. 2003. *Int. Rev. Cytol.* 224: 227—296. Probst A.V., Okamoto I., Casanova M., El Marjou F., Le Baccon P., Almouzni G. 2010. *Dev. Cell.* 19: 625—638. Reichert V.L., Le Hir H., Jurica M.S., Moore M.J. 2002. *Genes Dev.* 16: 2778—2791. Richards S., Gibbs R.A., Weinstock G.M., Brown S.J., Denell R., Beeman R.W., Gibbs R., Beeman R.W., Brown S.J., Bucher G. 2008. *Nature*. 452: 949—955. Rozen S., Skaletsky H. 2000. *Methods Mol. Biol.* 132: 365—386. Saitoh N., Spahr C.S., Patterson S.D., Bubulya P., Neuwald A.F., Spector D.L. 2004. *Mol. Biol. Cell.* 15: 3876—3890. Sambrook J., Russel D.W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. NY.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2100 p. Schmidt U., Richter K., Berger A.B., Lichter P. 2006. *J. Cell Biol.* 172: 373—381. Schoenberg D.R., Maquat L.E. 2012. *Nat. Rev. Genet.* 13: 246—259. Spector D.L., Lamond A.I. 2011. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: a000646. Spector D.L., Fu X.D., Maniatis T. 1991. *EMBO J.* 10: 3467—3481. Stutz F., Bachi A., Doerks T., Braun I.C., Seraphin B., Wilm M., Bork P., Izaurralde E. 2000. *RNA*. 6: 638—650. Stuurman N., Heins S., Aebi U. 1998. *J. Struct. Biol.* 122: 42—66. Świątek P., Jaglarz M.K. 2004. *Tissue Cell.* 36: 253—262. Trauner J., Büning J. 2007. *Dev. Genes Evol.* 217: 13—27. Ullmann S.L. 1973. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30: 179—217. Wei X., Somanathan S., Samarabandu J., Berezney R. 1999. *J. Cell Biol.* 146: 543—558. Whiting M.F. 2002. *Zool. Scr.* 31: 3—15. Will C.L., Lührmann R. 2001. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 290—301. Xu H., Pillai R.S., Azzouz T.N., Shpargel K.B., Kambach C., Hebert M.D., Schümperli D., Matera A.G. 2005. *Chromosoma*. 114: 155—166. Zhou Z.L., Luo M., Straesser K., Katahira J., Hurt E., Reed R. 2000. *Nature*. 407: 401—405. Zorn C., Cremer T., Cremer C., Zimmer J. 1976. *Hum. Genet.* 35: 83—89.