

КАРИОСФЕРА И ЭКСТРАХРОМОСОМНЫЕ ЯДЕРНЫЕ ТЕЛЬЦА ООЦИТОВ СКОРПИОННИЦЫ *PANORPA COMMUNIS*

© Ф. М. Баталова, Д. С. Боголюбов, В. Н. Парфенов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; электронный адрес: florina@mail.cytspb.rssi.ru

Исследовали ядерные структуры ооцитов скорпионницы *Panorpa communis* от пахитены до первого мейотического деления. Методами флуоресцентной микроскопии и ультраструктурной иммуноцитохимии исследовано внутриядерное распределение РНК-полимеразы II, факторов сплайсинга и коилина — маркерного белка тельца Кахала (ТК). Показана их ассоциация с перихроматиновыми фибриллами, компонентами кариосферы и экстрахромосомными внутриядерными тельцами (ВТ). Обнаружено, что большинство ВТ ооцитов *P. communis* вне зависимости от их морфологической организации представляют собой ТК и содержат коилин, РНК-полимеразу II и в некоторых случаях — необходимый для сплайсинга пре-мРНК белок SC35. Присутствие последнего нехарактерно для ТК соматических клеток. Морфодинамика ТК детально прослежена в период инактивации ядра ооцита на фоне поэтапной конденсации хромосом, собранных в кариосферу. Показано, что коилин, РНК-полимераза II и белок SC35 являются общими компонентами как ТК, так и особого гранулярного материала, являющегося составной частью кариосферы. Обнаружено, что материал ТК сохраняется в ооплазме после разрушения ядерной оболочки перед началом редукционного деления. Наличие ряда важных ядерных белков в ТК инактивированных ядер, по-видимому, свидетельствует о том, что ТК ооцитов могут служить запасными компартментами для хранения неактивных компонентов генной экспрессии.

Ключевые слова: *Panorpa communis*, ядро ооцита, внутриядерные тельца, тельца Кахала, флуоресцентная микроскопия и ультраструктурная иммуноцитохимия.

Принятые сокращения: ВТ — внутриядерные тельца, ГМ — гранулярный материал, КИГ — кластер интерхроматиновых гранул, мяРНК — малые ядерные РНК, Пол II — РНК-полимераза II, ПФ — перихроматиновые фибриллы, ТК — тельца Кахала, ФМ — фибриллярный материал, STD — С-концевой домен большой субъединицы РНК-полимеразы II.

Ядро эукариотической клетки — структурированное образование, содержащее различные функциональные компартменты, или домены (Spector, 1993, 1996, 2001; Strouboulis, Wolffe, 1996; Lamond, Earnshaw, 1998; Misteli, Spector, 1998; Dundr, Misteli, 2001). Для решения ряда вопросов, связанных с исследованиями ядерных функций, в качестве модельных систем особенно привлекательными оказываются ооциты, ввиду того что это метаболически активные клетки, демонстрирующие несоизмеримо более крупные размеры ядерных структур по сравнению с «классическими» объектами клеточной биологии — соматическими клетками (Gall et al., 2004). Вместе с тем в отличие от соматических клеток ооциты — это высокоспециализированные клетки, находящиеся в профазе мейоза. Одна из их функций состоит в обеспечении зиготы различными макромолекулами и органеллами с целью их дальнейшего использования в раннем эмбриогенезе (Davidson, 1986).

На структуру и функции ядра ооцита существенное влияние оказывают особенности строения гонады, т. е. присутствие или отсутствие питающих клеток, которые в основном обеспечивают растущий ооцит РНК (Гагинская, 1975; Айзенштадт, 1984; Gruzova, Parfenov, 1993; Грузова и др., 1995). В ядрах ооцитов всех изученных к

настоящему времени видов насекомых, у которых в женских гонадах присутствуют питающие клетки, на определенной стадии оогенеза происходят конденсация хромосом и ассоциации их в ограниченном участке ядра, что приводит к формированию кариосферы, или кариосомы (см. обзоры: Gruzova, Parfenov, 1993; Грузова и др., 1995). При этом в ядре присутствуют разнообразные экстрахромосомные структуры — внутриядерные тельца (ВТ).

В последние годы стало очевидным, что по крайней мере часть ВТ ооцитов насекомых представляет собой тельца Кахала (ТК) и содержит маркерный белок коилин, РНК-полимеразу II (Пол II) и факторы сплайсинга пре-мРНК (Цветков и др., 1996; Tsvetkov et al., 1997; Баталова и др., 2000; Bogolyubov, Parfenov, 2001; Jaglarz, 2001; Biliński, Kloc, 2002; Боголюбов, 2003; Batalova et al., 2005).

Выяснению функций ТК в настоящее время придается серьезное значение. Более чем 100-летняя история их изучения (см. обзоры: Gall, 2000, 2001, 2003) и использование в последние годы для этого новейших цитологических и молекулярно-биологических подходов (см. обзоры: Dundr, Misteli, 2001; Ogg, Lamond, 2002) приводят к пониманию их важной роли в ключевых событиях эксп-

рессии генов. В активно транскрибирующих соматических клетках млекопитающих и ооцитах амфибий ТК отводят ведущую роль в биогенезе малых ядерных и малых ядрышковых РНК — мяРНК (Matera, 1999; Dundr, Misteli, 2001), а также в сборке, модификации и внутриядерной сортировке молекулярного оборудования транскрипции и процессинга РНК (Gall et al., 1999, 2004; Gall, 2000, 2001).

Функции ТК в ооцитах насекомых, особенно в период формирования кариосферы, когда происходит инактивация хромосомного аппарата (Gruzova, Parfenov, 1993; Грузова и др., 1995), остаются невыясненными.

Представитель отряда Mesoptera — скорпионница *Panorpa communis* — является типичным представителем насекомых, имеющих яичники мероистического типа, в которых присутствуют трофоциты, а в ядрах ооцитов формируется кариосфера (Грузова, 1962; Ramamurthy, 1963; Simiszyjew, 1996). Ранее было обнаружено (Баталова, Цветков, 1998; Batalova et al., 2005), что при формировании кариосферы в ооцитах данного вида в ядре присутствуют многочисленные ВТ неядрышкового происхождения, которые, соответственно, не имеют отношения к синтезу рРНК (Баталова и др., 2000). При этом характерные крупные ВТ, достигающие 30 мкм в диаметре, содержат ряд ведущих компонентов ТК (Баталова и др., 2000; Batalova et al., 2005).

В настоящей работе мы исследовали морфодинамику ВТ ооцитов *P. communis* в ходе всего периода роста ооцита — начиная от стадий, предшествующих формированию кариосферы (пахитена), до разрушения ядерной оболочки и начала редукционного деления. Подробно были исследованы последовательные этапы развития кариосферы. С помощью флуоресцентной микроскопии и ультраструктурной иммуноцитохимии мы исследовали гранулы, входящие в состав кариосферы и отдельных ВТ. Оказалось, что материал этих гранул вне зависимости от его расположения в ядре содержит ряд молекулярных компонентов ТК. Обнаружено также, что материал ТК присутствует в ооцитах и после разрушения ядерной оболочки перед редукционным делением.

Полученные в настоящей работе данные, по-видимому, служат еще одним доводом в пользу высказанного ранее предположения (Bogolyubov et al., 2000; Bogolyubov, Parfenov, 2001; Jaglarz, 2001; Biliński, Kloc, 2002; Боголюбов, 2003) о том, что в ооцитах насекомых с мероистическим типом яичников ТК могут выполнять функ-

цию «депо» инактивированных компонентов экспрессии генов.

Материал и методика

Объектом исследования служили яйцевые трубки взрослых самок скорпионницы *Panorpa communis* L. (Mesoptera: Panorpidae), собранных в пос. Токсово Ленинградской обл. и в Старом Петергофе.

Яичники изолировали в физиологической среде OR2 (Wallace et al., 1973) и разделяли на отдельные овариолы. Давленные препараты овариол готовили по методу Хулсебоса с соавторами (Hulsebos et al., 1984). Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов яичников с помощью антител проводили по методике, подробно описанной Ву с соавторами (Wu et al., 1991). Используемые антитела представлены в таблице. Препараты заключали в среду, представляющую собой 50 %-ный раствор глицерина на PBS с добавлением 1 мг/мл парафенилендиамина, которая содержала 0.2 мкг/мл флуорохрома DAPI (Sigma, США), для выявления ДНК параллельно с иммуноцитохимическим окрашиванием.

Препараты анализировали с помощью люминесцентного микроскопа Axioskop (Karl Zeiss); для записи изображений использовали совмещенную с микроскопом видеокамеру и компьютерную программу KS100.

Для электронно-микроскопического исследования применяли методику, подробно описанную ранее (Баталова и др., 2000).

Для иммуноэлектронного мечения ультратонких срезов овариолы фиксировали в растворе, содержащем 4 % параформальдегида и 0.5 % глутаральдегида на 1 × PBS, в течение 2 ч при комнатной температуре, затем в 2 %-ном параформальдегиде на том же буферном растворе в течение ночи при 4 °C. После отмывки в 1 × PBS, содержащем 0.5 M NH₄Cl, и дегидратации в этаноле возрастающей концентрации материал заключали в смолу LR White (Polyscience, США). Ультратонкие срезы инкубировали в растворе моноклональных мышиных антител (первые антитела) и затем обрабатывали козьими антителами против мышиных иммуноглобулинов, конъюгированными с коллоидным золотом (диаметр частиц 10 нм) (Amersham, США), при разведении 1 : 10. Контрольные срезы инкубировали только в растворе вторых антител. В случае использования кроличьей по-

Использованные в работе антитела и выявляемые антигены

Типы и названия антител		Выявляемый антиген	Литературный источник
Моноклональные антитела	αDNA (030)	Двухцепочечная ДНК	Chemicon International, USA
	Y12	Sm-эпитоп мяРНК	Lerner et al., 1981
	αSC35	SR-белок SC35	Fu, Maniatis, 1990
	V22	Фосфорилированный С-концевой домен (CTD) большой субъединицы РНК-полимеразы II	Любезно предоставлены U. Scheer (Theodor-Boveri-Institute, University of Würzburg, Germany)
Поликлональная сыворотка	Сыворотка к гиперфосфорилированной форме РНК-полимеразы II	Фосфорилированный CTD РНК-полимеразы II	Kim, Dahmus, 1986
	R288	С-концевой (14 кДа) фрагмент молекулы белка р80-коилина	Andrade et al., 1991

ликлональной сыворотки R288 в качестве вторых антител использовали конъюгированные с коллоидным золотом козы антитела против кроличьих иммуноглобулинов при разведении 1 : 20. Обработку контрольных сеток в этом случае проводили с использованием преиммунной сыворотки.

При двойном мечении антителами сетки помещали в смесь первых антител. В качестве вторых антител использовали антитела, конъюгированные с коллоидным золотом с различным диаметром частиц (10 и 15 нм).

Результаты

Парные женские гонады скорпионницы *Panorpa communis* состоят из мероистических политрофных овариол. Каждая овариола состоит из гермария, в котором ооциты находятся на начальных стадиях профазы I мейоза, включая пахитену, и вителлярия, где располагаются растущие ооциты на стадии длительной диплотены.

В ооците, находящемся на стадии пахитены, крупное ядро занимает почти весь объем клетки. Кариоплазма содержит диспергированный хроматин и отдельные небольшие участки конденсированного хроматина, расположенного преимущественно по периферии ядра (рис. 1). Внутри хроматиновых блоков четко видны элементы синаптонемного комплекса (рис. 1). Внутрьядерных телец

(ВТ) на этой стадии не обнаружено. Были отмечены лишь отдельные мелкие кольцевидные структуры (рис. 1, головки стрелок) и мелкие гранулы неизвестной природы (рис. 1, стрелки).

В апикальной зоне вителлярия располагаются ранние превителлогенные ооциты. Фолликул к этому времени уже сформирован и состоит из ооцита и питающей камеры. Последняя включает в себя три гигантские питающие клетки с крупными лопастными ядрами (рис. 2, а). В ядре ооцита хромосомы начинают конденсироваться и объединяются в 3—4 группы, что особенно отчетливо заметно на серийных полутонких срезах (рис. 2, б—г). В это время в тесном контакте с хромосомами впервые обнаруживаются экстрахромосомные ВТ (рис. 2, б—г, стрелки).

Следует отметить, что у *P. communis* ВТ значительно варьируют по форме и размерам даже на одной стадии развития ооцита. Эта особенность сохраняется на всех этапах его роста. ВТ преимущественно состоят из фибриллярного (ФМ) и гранулярного (ГМ) материала. Подробно о морфологических особенностях и молекулярном составе ВТ речь пойдет ниже.

На рис. 3—5 представлены результаты, полученные в ходе иммуноцитохимической обработки препаратов ядер пахитенных и ранних диплотенных ооцитов. При двойной обработке ультратонких срезов моноклональными антителами к двухцепочечной ДНК и поликлональной сыво-

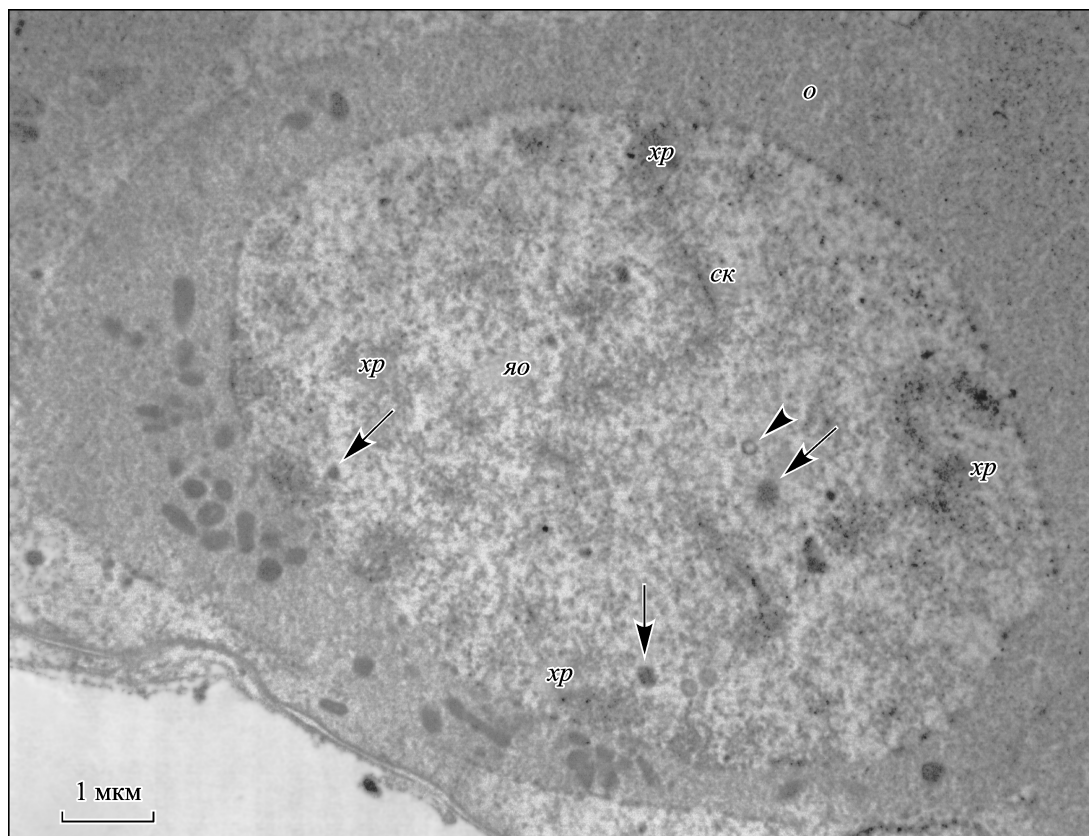


Рис. 1. Ядро ооцита *Panorpa communis* на стадии пахитены.

В ядре ооцита (яо) видны диспергированный хроматин (хр), элементы синаптонемного комплекса (ск), мелкие плотные гранулы (стрелки) и кольцевидная структура (голова стрелки); о — ооплазма.

Fig. 1. *Panorpa communis* oocyte nucleus at pachytene stage.

яо — nucleus, хр — dispersed chromatin, ск — synaptonemal complex, arrows — small electron dense granules, arrowheads — a ring-shaped structure; о — ooplasm.

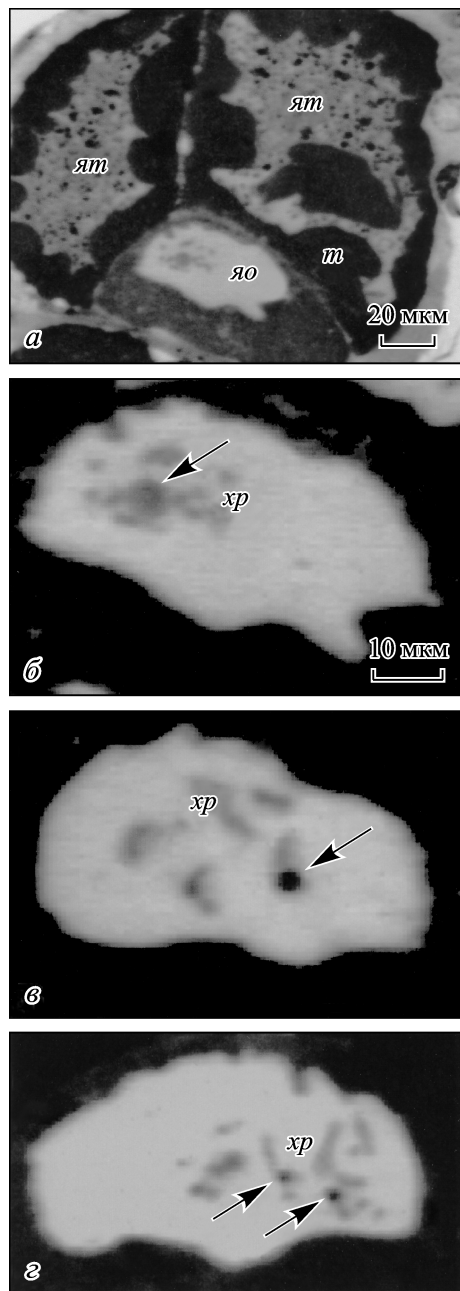


Рис. 2. Ядра ооцитов *Panorpa communis* на стадии раннего превителлогенеза.

a — полутонкий срез фолликула; *б–г* — серийные срезы ядра ооцита; в ядре хромосомы (*хр*) начинают конденсироваться и сближаться, заметны одно крупное тельце и несколько мелких телец (*стрелки*). *о* — ооцит, *яо* — ядро ооцита, *т* — трофобласт, *ят* — ядро трофобласта.

Fig. 2. *Panorpa communis* oocyte nuclei at early previtellogenesis.

a — semithin section of a follicle; *б–г* — serial semithin sections of the oocyte nucleus; chromosomes (*хр*) begin to condense lying close to each other; arrows — a single large body and several smaller ones.

роткой к фосфорилированной форме РНК-полимеразы II (Пол II) обнаружено, что Пол II преимущественно ассоциирована с фибриллярным материалом, расположенным на периферии конденсированных хроматиновых блоков и представляющим собой, очевидно, перихроматиновые фибриллы (ПФ) (рис. 2, *a, б, стрелки*).

При непрямой иммунофлуоресцентной обработке ядер пахитенных ооцитов с помощью моноклональных антител к фактору сплайсинга SC35 наблюдается флуоресценция многочисленных мелких доменов в кариоплазме (рис. 4). Анализ ультратонких срезов, обработанных этими же антителами, показал, что белок SC35 преимущественно ассоциирован с ПФ (рис. 5, *а, стрелки*).

При обработке антителами к белку SC35 ультратонких срезов ядер ранних превителлогенных ооцитов наблюдается интенсивное мечение гранулярного материала (ГМ), который появляется в ядре на данной стадии и расположен в близком контакте с хроматином (рис. 5, *б, головки стрелок*). Мечаются также мелкие фибриллярные образования (рис. 5, *б, стрелки*), в то время как более крупные ВТ не содержат метки (рис. 5, *б*).

На стадии среднего превителлогенеза в ядрах ооцитов *P. communis* начинается процесс формирования кариосферы. Отдельные группы хромосом сближаются и занимают центральную часть ядра. Сближение хромосом продолжается до тех пор, пока не образуется более или менее плотный клубок, который располагается эксцентрично в ядре. Капсула кариосферы в ооцитах *P. communis* не формируется. На ультраструктурном уровне среди рыхлых блоков хроматина четко видны большие скопления ГМ (рис. 6, *а*) и кольцевидные структуры, морфологически напоминающие таковые в ядрах пахитенных ооцитов (рис. 6, *а, стрелки*). По мере роста ооцита в кариосфере продолжается конденсация хромосом и увеличивается количество ГМ (рис. 6, *б*). В вителлогенных ооцитах кариосфера расположена в ядрах эксцентрично и достигает своей максимальной компактизации. Конденсированные хроматиновые блоки окружены ГМ, который заметно уплотнен (рис. 6, *в*).

В ходе формирования кариосферы в ооцитах *P. communis* отмечается появление значительного количества ВТ, представленных разнообразными морфологическими формами. Они различаются по размеру, имея диаметр от 0.5 до 30 мкм. Самые крупные ВТ ооцитов *P. communis* формируются на стадии позднего превителлогенеза. Исследованию ультраструктурной организации и молекулярного состава этих ВТ были посвящены две предыдущие работы (Баталова и др., 2000; Batalova et al., 2005), в которых ВТ данного типа были идентифицированы как тельца Кахала (ТК). Значительно меньше известно о природе мелких ВТ, часть которых содержит фактор сплайсинга SC35 (Баталова, Цветков, 1998) и количество которых в ядре достигает максимума также на стадии позднего превителлогенеза (Batalova et al., 2005). В настоящей работе мы провели подробное ультраструктурное и иммуноцитохимическое исследование этой группы ВТ ооцитов *P. communis*.

По ультраструктурной организации мелкие и средние по размеру ВТ (до 3 мкм в диаметре) весьма неоднородны и в основном состоят из ФМ и ГМ. ГМ образован преимущественно крупными гранулами около 30–50 нм в диаметре (рис. 7, *а*). Как уже отмечалось, сходный ГМ может не только являться компонентом сложных ВТ (рис. 7, *а, е*), но и входить в состав кариосферы (рис. 6, *а–в*) или существовать в кариоплазме в виде отдельных скоплений (рис. 7, *в*). ФМ состоит из тонких фибрилл и характеризуется различной плотностью их упаковки (рис. 7, *а, б*). В одном сложном ВТ можно наблюдать как плотное упакованный ФМ (в сферических частях ВТ; рис. 7, *б*), так и ФМ высокой электронной плотности, организованный в параллельные тяжи, заключенные в тон-

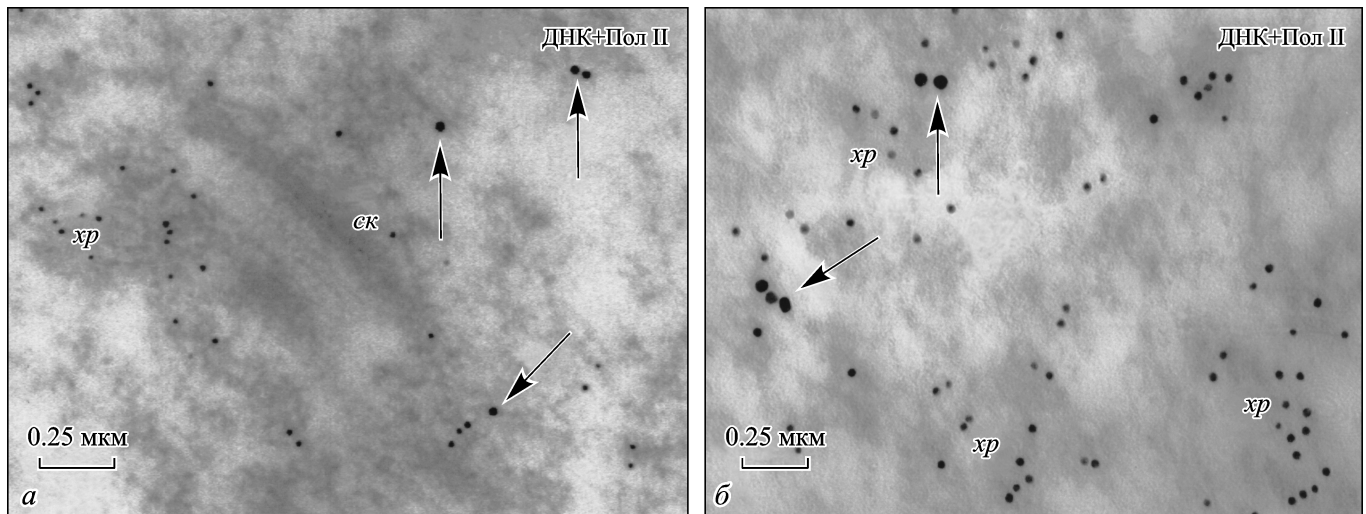


Рис. 3. Ядра пахитенных (а) и ранних диплотенных (б) ооцитов *Panorpa communis* после двойной обработки ультратонких срезов моноклональными антителами к двухцепочечной ДНК (мелкие частицы золота) и поликлональной сывороткой к фосфорилированной форме РНК-полимеразы II (Пол II) (крупные частицы золота).

РНК-полимераза II выявляется в ассоциации с перихроматиновыми фибриллами (стрелки), расположенными на периферии конденсированных хроматиновых блоков (хр); ск — синаптонемный комплекс.

Fig. 3. Nuclei of pachytene (a) and diplotene (b) oocytes in *Panorpa communis* after double immunogold labeling with monoclonal antibody against double-stranded DNA (small particles), and with polyclonal serum against phosphorylated RNA polymerase II (large particles).

RNA polymerase II is revealed in association with perichromatin fibrils (arrows) located at the periphery of condensed chromatin clumps (хр); ск — synaptonemal complex.

кофибриллярный матрикс (рис. 7, б). Также ФМ может иметь вид аморфного, рыхло упакованного материала (рис. 7, а). ФМ, как и ГМ, может входить в состав сложных ВТ (рис. 7, а, б, е) или существовать в виде простых мелких телец (рис. 7, з, д).

При проведении ультраструктурного иммуноцитохимического анализа мы обнаружили, что мелкие фибриллярные ВТ имеют в своем составе малые ядерные (мя) РНП (рис. 7, д) и SR-белок SC35 (рис. 7, з). Однако ГМ в составе сложных ВТ не связывает антитела к Sm-эпиту мяРНП, но в нем выявляется белок SC35 (рис. 7, в), а также фосфорилированная Пол II (рис. 7, е).

Обработка ультратонких срезов поликлональной сывороткой к коилину привела к неожиданным результатам. Оказалось, что вне зависимости от морфологического типа входящего в их состав материала многие ВТ метятся с помощью данных антител. При этом метится не

только ФМ, входящий в состав как сложных (рис. 8, а), так и «простых» ВТ (рис. 8, в), но также и ГМ, который связывает антитела к коилину (рис. 8, б, в).

В некоторых последних исследованиях наличие коилина в ВТ считают одним из основных критериев, по которому такие ВТ определяются как ТК (Andrade et al., 1991; Raška et al., 1991). Основываясь на этом положении, мы рассматриваем все коилинодержущие ВТ в ооцитах *P. communis* как ТК, несмотря на их различные ультраструктуру и размеры.

В следующий период роста ооцита, на стадии раннего вителлогенеза, ВТ, включая ТК, все еще многочисленны, значительно уменьшаясь в количестве лишь к концу роста ооцита. Завершение периода роста ооцита характеризуется исчезновением ядерной оболочки. На срезах, прошедших через анимальный полюс ооцита, который определяется как область, лишенная желтка, можно ви-

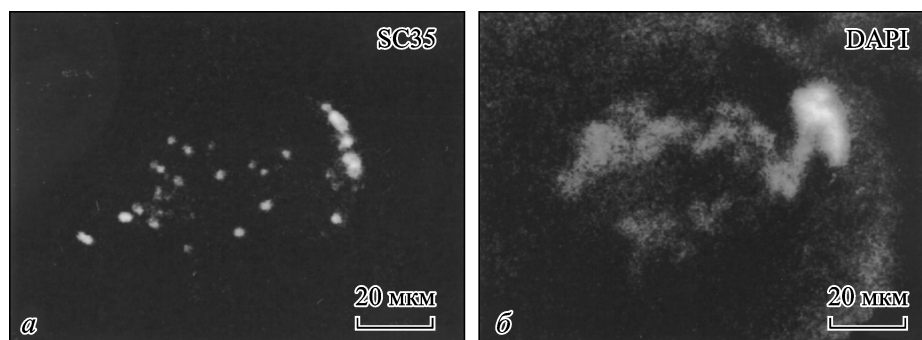


Рис. 4. Ядро ооцита *Panorpa communis* после непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью моноклональных антител αSC35 (а); флуоресцируют мелкие многочисленные домены в кариоплазме; б — окраска DAPI.

Fig. 4. The oocyte nucleus after indirect immunofluorescent staining with monoclonal antibody against non-snRNP splicing factor, SC35 (a); fluorescence of small numerous domains in karyoplasm is observed; б — DAPI staining.

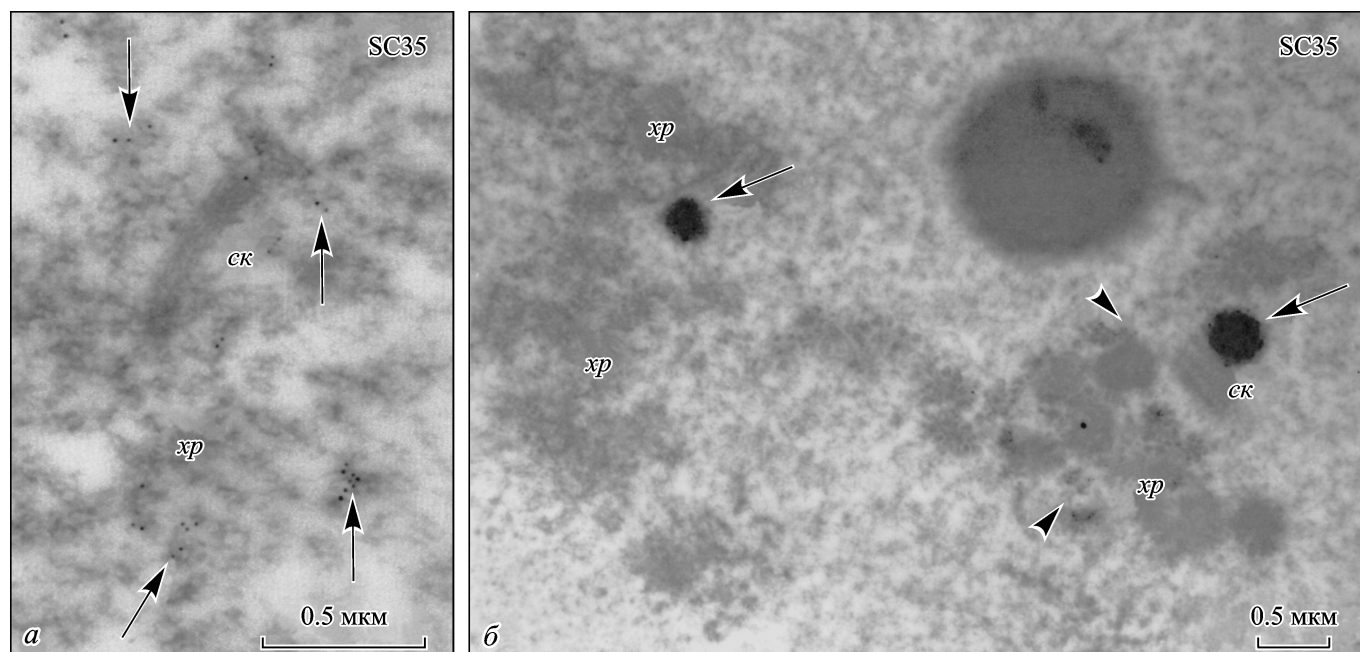


Рис. 5. Ультратонкие срезы ядра пахитенного (а) и раннего диплотенного (б) ооцитов *Panorpa communis* после обработки моноклональными антителами к фактору сплайсинга SC35.

В ядре на стадии пахитены (а) частицы золота ассоциируют с перихроматиновыми фибриллами (стрелки). В ядрах ранних превителлогенных ооцитов (б) можно видеть интенсивное мечение гранулярного материала (головки стрелок), который расположен в близком контакте с хроматином (хр). Мечатся также мелкие фибриллярные тельца (стрелки). Крупное тельце не метится; (ск) — синаптонемный комплекс.

Fig. 5. Immunogold labeling of *Panorpa communis* oocyte nuclei at pachytene (а) and early diplotene (б) with α SC35 antibody.

Gold particles decorating perichromatin fibrils (arrow) at pachytene stage. An intensive labeling of chromatin (хр) contacting granular material (arrowheads) in early previtellogenic oocytes (б). Small fibrillar bodies (arrows) are labeled. A large body is not labeled. ск — synaptonemal complex.

деть перерезанные хромосомы, лежащие на значительном расстоянии друг от друга (рис. 9, а, б). По-видимому, эту стадию следует рассматривать как начало редукционного деления. Крайне важным, на наш взгляд, является присутствие в ооплазме на этой стадии остатков материала ВТ (рис. 9, в), в составе которых с помощью ультраструктурной иммуоцитохимии выявляется коилин (рис. 9, з), что свидетельствует о том, что данный материал представляет собой остатки ТК.

Обсуждение

В настоящей работе проведено исследование морфодинамики экстрахромосомных ядерных структур ооцитов скорпионницы *Panorpa communis* в период поэтапной конденсации хромосом и снижения их активности в ходе формирования и развития кариосферы. Показано, что в ядрах ооцитов на стадии пахитены и ранней диплотены, до формирования кариосферы, гиперфосфорилированная РНК-полимераза II (Пол II) и факторы сплайсинга связаны с фибриллярным материалом, расположенным на периферии конденсированных хроматиновых блоков. В ядрах превителлогенных и вителлогенных ооцитов во время образования кариосферы эти факторы аккумулируются во внутриядерных тельцах (ВТ).

Известно, что фосфорилированная Пол II принимает участие в элонгации транскрипта в ходе транскрипционного цикла (Cadena, Dahmus, 1987). Учитывая, что сплайсинг осуществляется в тесной ассоциации с перихроматиновыми фибриллами (ПФ) (Spector, 1993; Fa-

kan, 1994; Van Driel et al., 1995; Puvion, Puvion-Dutilleul, 1996), мы рассматриваем фибриллярный материал, расположенный на периферии хроматина и содержащий Пол II и факторы сплайсинга, как ПФ. Ранее аналогичный материал, связывающий антитела к Пол II и факторам сплайсинга и представляющий собой ПФ, был описан в «докариосферных» ооцитах жука-чернотелки *Tenebrio molitor* (Bogolyubov, Parfenov, 2001). Многочисленные скопления ПФ в ооцитах насекомых на данных стадиях по-видимому, отражают активное транскрипционное состояние хромосомного аппарата (у *P. communis* — на стадиях пахитены и ранней диплотены).

Кариосфера. Начиная со стадии среднего превителлогенеза (средняя диплотена) в ядре ооцитов скорпионницы формируется кариосфера (кариосома), которая представляет собой сложное образование, включающее в себя весь хромосомный набор половой клетки (Gruzova, Parfenov, 1993). Формирование кариосферы характерно для всех изученных к настоящему времени видов насекомых, имеющих яичники мероистического типа (Gruzova, Parfenov, 1993), при этом относительная транскрипционная инактивация хромосом, собранных в кариосферу, сопровождается активным белковым метаболизмом (Грузова и др., 1995).

Не много известно о возможных способах объединения хромосом в кариосферу. Очевидно, они различаются у разных видов животных. Например, у *Drosophila* кариосфера формируется за счет объединения центромерных районов хромосом в общий хромоцентр на стадии средней пахитены (Nokkala, Puro, 1976). У *P. communis* вна-

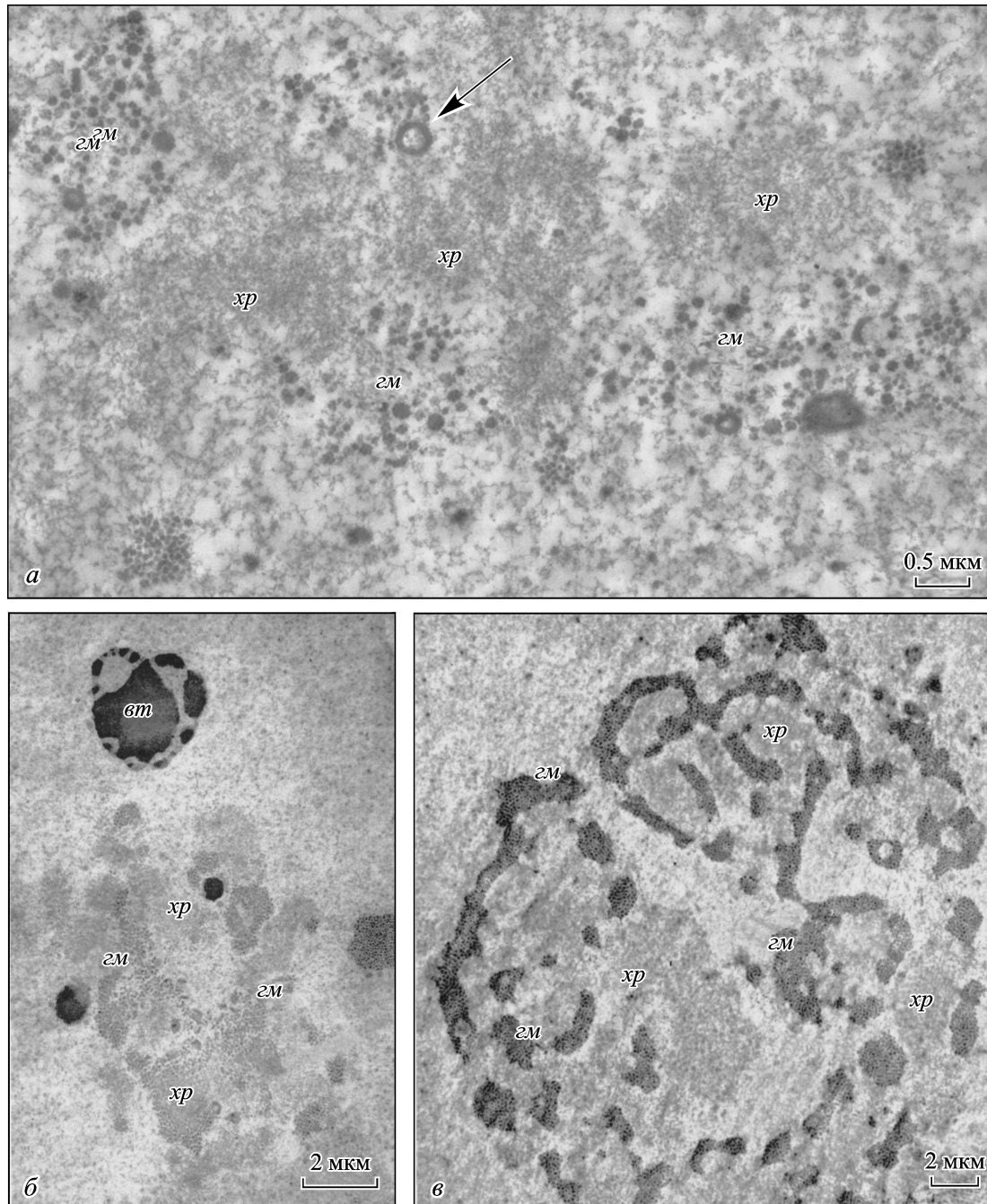


Рис. 6. Кариосфера в ядре ооцита *Panorpa communis* на разных стадиях развития.

a — ультратонкий срез кариосферы на стадии раннего превителлогенеза; видно, что среди рыхлых блоков хроматина (*xp*) присутствуют большие скопления гранулярного материала (*zm*), а также кольцевидные структуры (стрелки). *б* — кариосфера на стадии позднего превителлогенеза, продолжается конденсация хромосом и увеличивается количество гранулярного материала (*zm*). *в* — кариосфера в ядре вителлогенного ооцита, конденсированные хроматиновые блоки окружены гранулярные материалы (*zm*).

Fig. 6. Karyosphere in *Panorpa communis* oocyte nucleus at different stages of its development.

a — an ultrathin section of the karyosphere at early previtellogenesis; *zm* — large aggregates of a granular material, arrows — ring-shaped structures scattered among loose chromatin clumps (*xp*). *б* — karyosphere in the late previtellogenic oocyte; chromosome condensation goes on, and the amount of granular material (*zm*) increases. *в* — karyosphere in the vitellogenic oocyte; condensed chromatin blocks are surrounded by the granular material.

чале формируются 3 или 4 группы хромосом, объединенных за счет общего хромоцентра. Затем эти группы объединяются в единый «клубок» — кариосферу.

У *P. communis* структура кариосферы проходит несколько стадий развития: от рыхлой ретикулярной (средний превителлогенез; рис. 6, *a*) до плотной компактной

(поздний вителлогенез; рис. 6, *в*). В отличие от жука *T. molitor*, в вителлогенных ооцитах которого на поздних стадиях формируется кольцевидная кариосфера, состоящая практически полностью из конденсированного хроматина (Bogolyubov et al., 2000; Bogolyubov, Parfenov, 2001), у скорпионницы хромосомы в кариосфере вплоть

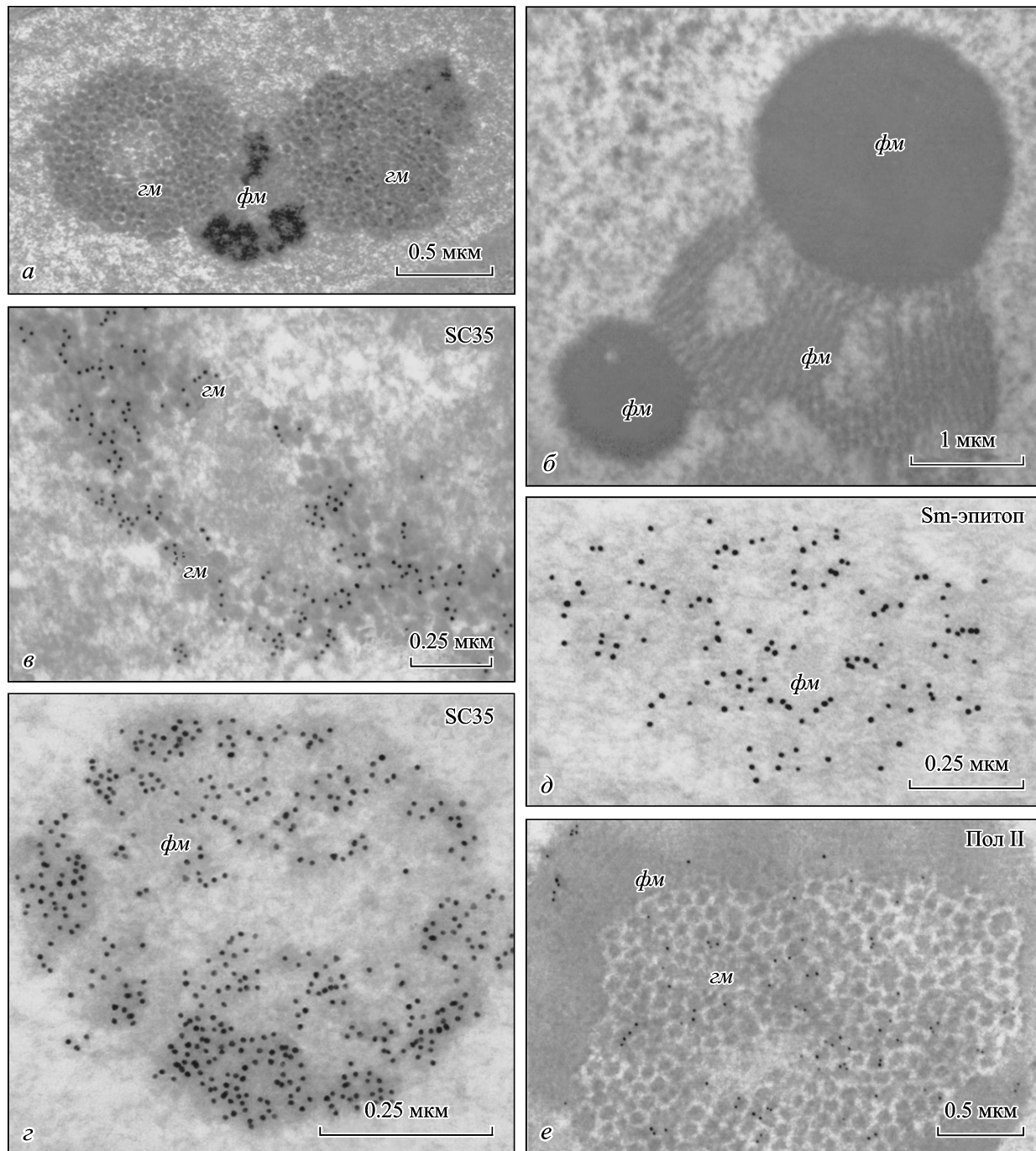


Рис. 7. Тельца Кахала различной морфологии (а, б) в ядрах ооцитов *Panorpa communis* после обработки ультратонких срезов моноклональными антителами к белку SC35 (а, г), Sm-эпитуому мРНК (д) и моноклональными антителами V22 к фосфорилированному CTD РНК-полимеразы II (е).

гм — гранулярный материал, фм — фибриллярный материал.

Fig. 7. Cajal bodies of different morphology in *Panorpa communis* oocyte as viewed by routine electron microscopy (а, б) and after immunogold labeling with monoclonal antibodies against SC35 protein (в, г), Sm-epitope of snRNPs (д) and phosphorylated CTD of RNA polymerase II (е).

гм — granular material, фм — fibrillar material.

до стадии позднего вителлогенеза объединены с гранулярным материалом (ГМ), состав и природа которого будут обсуждаться ниже.

Как и у *T. molitor*, кариосфера *P. communis* не имеет волокнистой капсулы, присутствие которой характерно для многих видов насекомых (Gruzova et al., 1972; Грузо-

ва, 1979; Грузова, Баталова, 1979; Александрова, 1992; Świątek, 1999; Rübsam, Büning, 2001). Функциональное значение наличия или отсутствия капсулы кариосферы у разных видов не выявлено.

Внутриядерные тельца. В диплонтных ооцитах *P. communis* присутствуют многочисленные ВТ, зна-

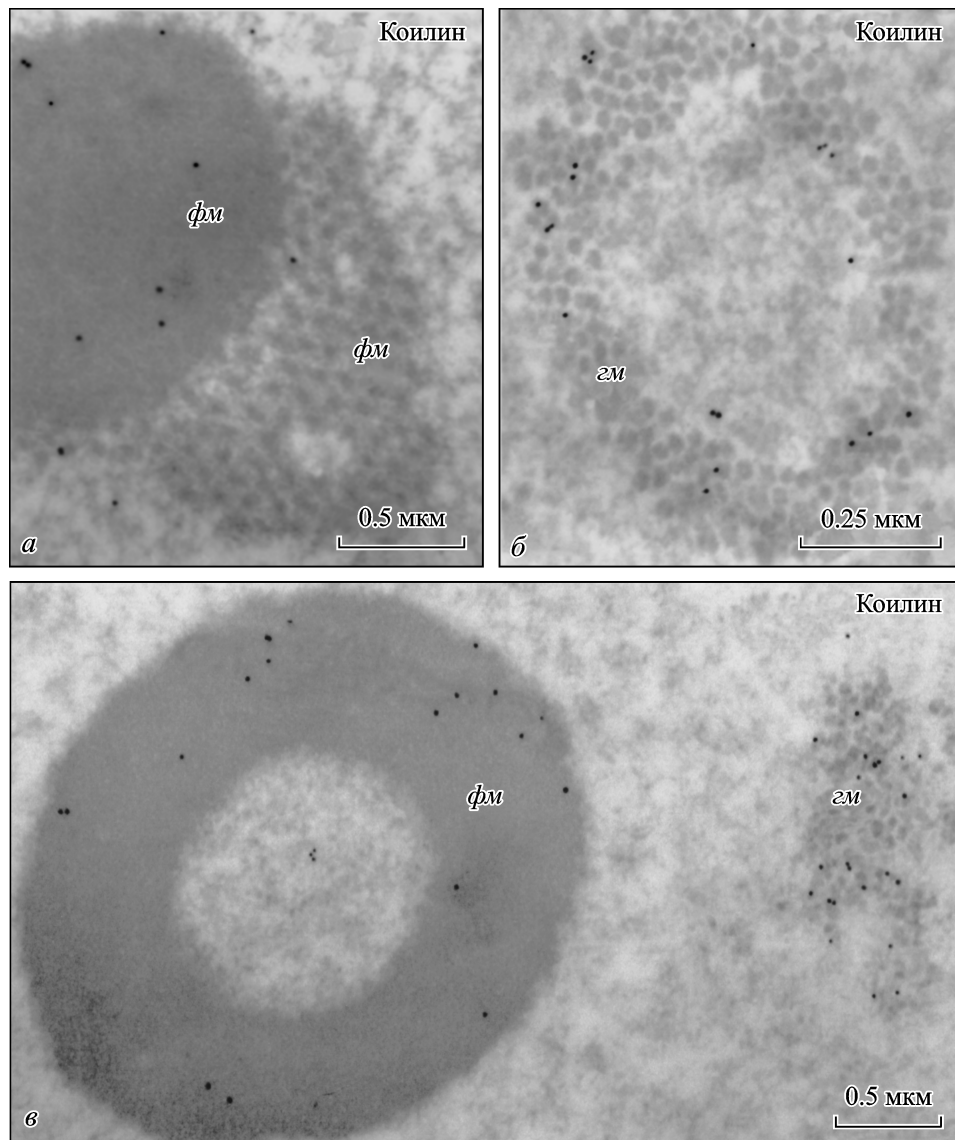


Рис. 8. Тельца Кахала после обработки ультратонких срезов поликлональной сывороткой R288 к коилину.

Метятся как фибриллярный материал (фм) в составе сложных телец (а) и в виде отдельного тельца (в), так и гранулярный материал (зм) (б, в).

Fig. 8. Immunogold labeling of Cajal bodies with anti-coilin polyclonal serum.

Labeled are both a fibrillar material (фм), either making complex bodies (а) or representing a single body (в), and some granular material (зм) (б, в).

чительная часть которых, как оказалось, имеет общие черты с тельцами Кахала (ТК). Главной особенностью этих структур является наличие в их составе белка коилина, который рассматривают в качестве маркера ТК (Andrade et al., 1991; Raška et al., 1991). Однако несколько неожиданным оказался тот факт, что антитела к коилину в ядрах ооцитов *P. communis* способны связывать различные по своим морфологическим признакам структуры. Среди них: 1) мелкие гранулярные тельца, состоящие из гранул 30—50 нм в диаметре; 2) мелкие фибриллярные тельца; 3) сложные тельца, содержащие как гранулярный, так и фибриллярный материал; 4) крупные (до 30 мкм в диаметре) фибриллярные тельца, описанные нами ранее (Баталова и др., 2000; Batalova et al., 2005). ТК последнего типа, очевидно присутствуют в ооцитах и других представителей отряда Mecoptera (Simszyjew, 2003) и, по-видимому, соответствуют извест-

ному типу гигантских ТК ооцитов некоторых насекомых (Jaglarz, 2001; Filek et al., 2002), которые до недавнего времени были известны под названием «внутренние тельца», или Binnenkörper (Jørgensen, 1913; Bier et al., 1967).

В ооцитах многих исследованных к настоящему времени видов насекомых ТК хотя и имеют видоспецифичные черты их организации, обычно легко распознаются (Jabłońska, Biliński, 2001; Jaglarz, 2001; Biliński, Kloc, 2002; Filek et al., 2002). Недавно морфологически гетерогенная популяция ТК была обнаружена в ооцитах жука *T. molitor* (Боголюбов, 2003). Однако в том случае, когда ТК в ооцитах данного вида имеют сложную фиброгранулярную организацию, антитела к коилину тем не менее связываются преимущественно с фибриллярными областями в их составе (Bogolyubov, Parfenov, 2001).

Специфичность использованных нами антител применительно к белкам ооцитов *P. communis* была провере-

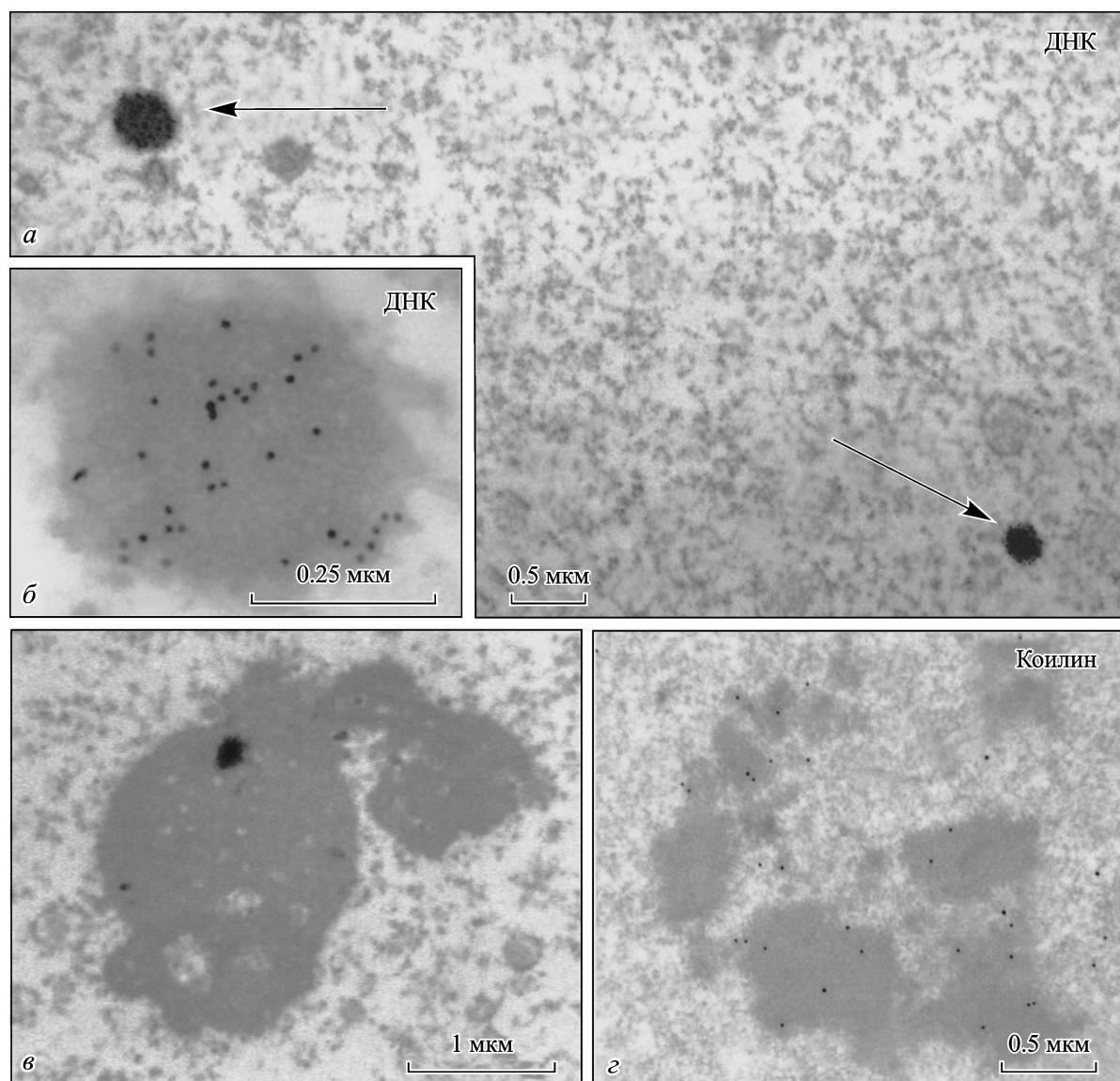


Рис. 9. Ультратонкие срезы ооцита после разрушения ядерной оболочки.

a — обработка ультратонких срезов моноклональными антителами к ДНК; *стрелками* указаны хромосомы. *б* — срез хромосомы, меченной антителами к ДНК, при большем увеличении. *в* — остатки тельца Кахала в ооплазме. *з* — коилинсодержащий материал остатков тельца Кахала.

Fig. 9. Ultrathin section of an oocyte after the nuclear envelope breakdown.

a — immunogold labeling with anti-DNA antibody; *arrows* — chromosomes. *б* — a cross section of a chromosome labeled with anti-DNA antibody, at higher magnification. *в* — a remnant of Cajal body in the ooplasm. *з* — coilin-containing material in Cajal body remnants.

на с помощью иммуноблотинга (Batalova et al., 2005). В той же работе мы обнаружили, что если инъектировать в ооплазму *P. communis* флуоресцентно меченную U7 мРНК, то она связывается с многочисленными гетероморфными ядерными доменами, соответствующими ТК (Batalova et al., 2005). Последнее наблюдение представляется существенным для идентификации ТК, поскольку U7 мРНК, участвующая, как известно, в триминге 3'-конца гистоновых мРН (Dominski, Marzluff, 1999), в высокой концентрации содержится в ТК как соматических клеток, так и ооцитов (Wu, Gall, 1993; Frey, Matera, 1995; Wu et al., 1996; Gall, 2000).

Заслуживает специального обсуждения природа гранулярного материала (ГМ), образованного гранулами 30–50 нм, который появляется в связи с хроматином

одним из первых. В ходе роста ооцита количество ГМ значительно увеличивается. Он присутствует как в составе кариосферы, так и в других областях ядра. Морфологически подобный материал был описан в кариосфере долгоносиков (Świątek, 1999), однако у этих жуков в отличие от ооцитов *P. communis* в составе ГМ не выявляется ни факторов сплайсинга, ни коилина (Świątek, Jaglarz, 2004). Мы обнаружили, что в ооцитах *P. communis* ГМ содержит коилин, SR-белок SC35, фосфорилированную форму Пол II, но в нем не было выявлено мРНП.

Присутствие в составе ГМ ооцитов *P. communis* коилина оказалось особенно неожиданным, в связи с чем крайне сложно проводить его гомологию с известными ядерными доменами соматических и половых клеток

других видов животных. Определенные черты сходства этого материала (интенсивное мечение с помощью антител к белку SC35) можно найти, сравнивая его с кластерами интерхроматиновых гранул (КИГ), характерных для соматических клеток и ооцитов млекопитающих (Koresny et al., 1996; Parfenov et al., 1998), и с В-сперматосомами ооцитов амфибий (Gall et al., 1999; Gall, 2000). Однако от этих структур ГМ ооцитов скорпионницы отличается более крупными размерами составляющих его гранул и отсутствием мечения после обработки препаратов антителами к Sm-эпистоу мяРНП. Вместе с тем сходный по размеру гранул материал, содержащий белок SC35, был описан в ядрах ооцитов моллюска *Achatina fulica* (Степанова, Боголюбов, 2003). Кроме того, в ядрах двухклеточных зародышей мыши наблюдали гранулы диаметром 30–60 нм, которые были обогащены белком SC35 и не содержали мяРНП (Боголюбова, Парфенов, 2000). В ооцитах и эмбрионах свиней скопления крупных (до 70 нм в диаметре) гранул также были описаны наряду с типичными КИГ (Koresny et al., 1996), причем некоторые гранулы напоминали, по мнению этих авторов, перихроматиновые гранулы, описанные Уотсоном (Watson, 1962; см. обзор: Daskal, 1981). В ооцитах мыши на активной стадии (в одно- и двухслойных фолликулах) было показано, что перихроматиновые фибриллы ассоциируют с крупными (40–60 нм в диаметре) гранулами, которые становятся еще более многочисленными на неактивной стадии, в антральном фолликуле (Parfenov et al., 2003). Авторы этой работы также полагают, что эти гранулы, по-видимому, соответствуют перихроматиновым. Обнаружено, что в ооцитах мыши такие гранулы содержат фактор сплайсинга SC35 и транскрипционный фактор Oct-4 (Parfenov et al., 2003).

Как видно из приведенных данных, можно отметить лишь частичную гомологию ГМ ооцитов скорпионницы с описанными выше структурами. Главным отличием ГМ исследуемого нами вида является присутствие в его составе Пол II и коилина.

Обнаружение коилина в составе ГМ позволяет рассматривать его как аналог ТК. В этой связи наши данные о присутствии Пол II в составе ГМ не являются неожиданностью, так как Пол II была обнаружена в ТК и соматических клетках (Schul et al., 1998), и ооцитах амфибий (Gall et al., 1999; Morgan et al., 2000; Doyle et al., 2002) и насекомых (Bogolyubov, Parfenov, 2001, 2004; Боголюбов, 2003). Необычный на первый взгляд факт присутствия в ТК ооцитов SR-белка SC35, не выявляющегося в ТК соматических клеток и в матриксе ТК ооцитов амфибий (см. обзоры: Matera, 1999; Gall, 2000), не является исключительным для ооцитов *P. communis*, поскольку этот фактор сплайсинга был обнаружен в составе сложных фиброгранулярных ТК ооцитов других насекомых (Bogolyubov, Parfenov, 2001; Боголюбов, 2003).

При исследовании динамики ТК на последовательных стадиях роста ооцита *P. communis* было обнаружено, что биогенез ТК коррелирует со степенью конденсации хромосом и стадией развития кариосферы. Впервые немногочисленные ТК могут быть обнаружены на стадии ранней диплотены, когда хромосомы только начинают конденсироваться. Позднее, когда все хромосомы объединяются в кариосферу, ТК заметно увеличиваются в числе. В поздних ооцитах, перед началом 1-го мейотического деления, количество ТК снова значительно сокращается, но вместе с тем самое крупное ТК достигает своих максимальных размеров.

Данные по морфодинамике ТК в ооцитах *P. communis* отчасти согласуются с наблюдениями о редукции или даже исчезновении ТК в ооцитах млекопитающих из преовуляторных фолликулов (Chouinard, 1975; Parfenov et al., 2003). Уменьшение количества ТК к концу профазы I мейоза, во время прекращения транскрипции, согласуется с редукцией ТК в течение профазы митоза в соматических клетках (Andrade et al., 1993; Ferreira et al., 1994) и дезинтеграцией ТК после применения ингибиторов транскрипции (Carmo-Fonseca et al., 1992).

Напомним, что в настоящей работе мы в основном имели дело с ооцитами *P. communis* в условиях определенной инактивации ядер, свидетельством чему служит высокая конденсация хроматина в составе кариосферы. Развитие гигантского ТК (Binnenkörper) в этот период можно, по-видимому, объяснить тем, что ТК ооцитов могут выполнять функции запасающего компартмента, накапливая инактивированные факторы экспрессии генов (Пол II, факторы сплайсинга и, возможно, другие компоненты) для последующего их использования при возобновлении транскрипции в раннем эмбриогенезе (Bogolyubov et al., 2000; Bogolyubov, Parfenov, 2001; Jaglarz, 2001). Это предположение отчасти подтверждает обнаружение нами остатков ТК в ооплазме после дезинтеграции оболочки ядра перед началом редукционного деления.

Авторы выражают глубокую благодарность за любезно предоставленные антитела Дж. Голлу (J. G. Gall) (моноклональные антитела Y12, α SC35), д-ру К. Г. Мурти (K. G. Murti) (моноклональные антитела α DNA), д-ру Е. К. Л. Чану (E. K. L. Chan) (поликлональная сыворотка R288), д-ру М. Е. Дамусу (M. E. Dahmus) (поликлональная сыворотка к гиперфосфорилированному CTD РНК-полимеразы II), д-ру У. Шееру (U. Scheer) (моноклональные антитела V22). Особую благодарность авторы выражают Ю. И. Гукиной за техническую помощь.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 03-04-49389 и 04-04-48080).

Список литературы

- Айзенштадт Т. Б. 1984. Цитология оогенеза. М.: Наука. 247 с.
- Александрова О. А. 1992. Внутрядерные тельца и формирование капсулы кариосферы в ооцитах жука-чернотелки *Tenytia notata taurica*. Цитология. 34 (6) : 30–37.
- Баталова Ф. М., Степанова И. С., Боголюбов Д. С. 2000. Тельца Кахала в ядрах ооцитов скорпионовой мухи *Panorpa communis*. Цитология. 42 (11) : 1037–1047.
- Баталова Ф. М., Цветков А. Г. 1998. Ядерные структуры ооцитов скорпионовой мухи *Panorpa communis*. Цитология. 40 (10) : 826–834.
- Боголюбов Д. С. 2003. Тельца Кахала в ооцитах насекомых. I. Идентификация и иммуноцитохимическая характеристика телец Кахала в вителлогенных ооцитах жука-чернотелки. Цитология. 45 (11) : 1083–1093.
- Боголюбова И. О., Парфенов В. Н. 2000. Факторы сплайсинга пре-мРНК в ядрах двухклеточных зародышей мышей. Цитология. 42 (9) : 884–890.
- Гагинская Е. Р. 1975. О классификации типов оогенеза. Оогенез. 6 (6) : 539–545.
- Грузова М. Н. 1962. Образование кариосферы в оогенезе *Panorpa*. Цитология. 4 (2) : 150–159.

Грузова М. Н. 1979. Функциональная морфология ядерных структур в оогенезе в связи с образованием кариосферы: Автореф. докт. дис. Л. 40 с.

Грузова М. Н., Баталова Ф. М. 1979. Ядерные структуры в телотрофных овариолах жуков-чернотелок. II. Ядро ооцитов *Blaps lethifera* и *Gnaptor spinimanus*. Светооптические данные. Онтогенез. 10 (4) : 323—331.

Грузова М. Н., Цветков А. Г., Почукалина Г. Н., Парфенов В. Н. 1995. Формирование кариосферы в оогенезе некоторых насекомых и амфибий. Цитология. 37 (8) : 744—769.

Степанова И. С., Боголюбов Д. С. 2003. РНК-полимераза II и факторы сплайсинга пре-мРНК в ядрах диплоидных ооцитов гигантской африканской улитки *Achatina fulica*. Цитология. 45 (2) : 166—178.

Цветков А. Г., Грузова М. Н., Голл И. 1996. Сферы из ядер ооцитов домового сверчка и стрекозы-красотки содержат факторы сплайсинга пре-мРНК и процессинга пре-рРНК. Цитология. 39 (3) : 311—318.

Andrade L. E. C., Chan E. K. L., Raška I., Peebles C. I., Ros G., Tan E. M., 1991. Human antibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. J. Exp. Med. 173 : 1407—1419.

Andrade L. E. C., Tan E. M., Chan E. K. L. 1993. Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90 : 1947—1951.

Batalova F. M., Stepanova I. S., Skovorodkin I. N., Bogolyubov D. S., Parfenov V. N. 2005. Identification and dynamics of Cajal bodies in relation to karyosphere formation in scorpionfly oocytes. Chromosoma. 113 : 428—439.

Bier K., Kunz W., Ribbert D. 1967. Struktur und Funktion der Oocytenchromosomen und Nukleolen sowie der extra-DNS während der Oogenese panoistischer und meroistischer Insekten. Chromosoma. 23 : 214—254.

Biliński S. M., Kloc M. 2002. Accessory nuclei revisited: the translocation of snRNPs from the germinal vesicle to the periphery of the future embryo. Chromosoma. 111 : 62—68.

Bogolyubov D. S., Alexandrova O. A., Tsvetkov A. G., Parfenov V. N. 2000. An immunoelectron study of karyosphere and nuclear bodies in oocytes of mealworm beetle, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Polyphaga). Chromosoma. 109 : 415—425.

Bogolyubov D. S., Parfenov V. N. 2001. Immunogold localization of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing factors in *Tenebrio molitor* oocyte nuclei with special emphasis on karyosphere development. Tissue and Cell. 33 : 549—561.

Bogolyubov D. S., Parfenov V. N. 2004. Do nuclear bodies in oocytes of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Polyphaga, Tenebrionidae) contain two forms of RNA polymerase II? Tissue and Cell. 36 : 13—17.

Cadena D., Dahmus M. E. 1987. Messenger RNA synthesis in mammalian cells is catalyzed by the phosphorylated form of RNA polymerase II. J. Biol. Chem. 262 : 12 468—12 474.

Carmo-Fonseca M., Pepperkok R., Carvalho M. T., Lamond A. I. 1992. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. J. Cell Biol. 117 : 1—14.

Chouinard L. A. 1975. A light- and electron-microscope study of the oocyte nucleus during development of the antral follicle in the prepubertal mouse. J. Cell Sci. 17 : 589—615.

Daskal Y. 1981. Perichromatin granules. In: The cell nucleus, 8. New York: Acad. Press. 117—140.

Davidson E. H. 1986. Gene activity in early development. London: Acad. Press.

Dominski Z., Marzluff W. F. 1999. Formation of the 3' end of histone mRNA. Gene. 239 : 1—14.

Doyle O., Corden J. L., Murphy C., Gall J. C. 2002. On the formation of amplified nucleoli during early *Xenopus* oogenesis. J. Struct. Biol. 140 : 154—166.

Dundr M., Misteli T. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. Biochem. J. 356 : 297—310.

Fakan S. 1994. Perichromatin fibrils are *in situ* forms of nascent transcripts. Trends Cell Biol. 4 : 86—90.

Ferreira J. A., Carmo-Fonseca M., Lamond A. I. 1994. Differential interaction of splicing snRNPs with coiled bodies and interchromatin granules during mitosis and assembly of daughter cell nuclei. J. Cell Biol. 126 : 11—23.

Filek K., Jarek E., Biliński S. M. 2002. Cajal bodies (coiled bodies) in the nuclei of the house cricket (*Acheta domestica*) oocytes. Folia Histochem. Cytobiol. 40 : 221—222.

Frey M. R., Matera A. G. 1995. Coiled bodies contain U7 small nuclear RNA and associate with specific DNA sequences in interphase human cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 5915—5919.

Fu X.-D., Maniatis T. 1990. Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. Nature. 343 : 437—441.

Gall J. G. 2000. Cajal bodies: the first 100 years. Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 16 : 273—300.

Gall J. G. 2001. A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. FEBS Lett. 498 : 164—167.

Gall J. G. 2003. The centennial of the Cajal body. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 : 975—980.

Gall J. G., Bellini M., Wu Z., Murphy C. 1999. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. Mol. Biol. Cell. 10 : 4385—4402.

Gall J. G., Tsvetkov A. G., Wu Z., Murphy C. 1995. Is the sphere organelle / coiled body a universal nuclear component? Develop. Genet. 16 : 25—35.

Gall J. G., Wu Z., Murphy C., Gao H. 2004. Structure in the amphibian germinal vesicle. Exp. Cell Res. 296 : 28—34.

Gruzova M. N., Parfenov V. N. 1993. Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis. Int. Rev. Cytol. 144 : 1—52.

Gruzova M. N., Zaichikova Z. P., Sokolov I. I. 1972. Functional organization of the nucleus of *Chrysopa perla* L. (Insecta, Neuroptera). Chromosoma. 37 : 353—386.

Huang S., Spector D. L. 1991. Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors. Genes Develop. 5 : 2288—2302.

Jabłońska A., Biliński S. M. 2001. Structure of ovarioles in adult queens and workers of the common wasp, *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae). Folia Biol. 49 : 191—198.

Jaglarz M. K. 2001. Nuclear bodies in the oocyte nucleus of ground beetles are enriched in snRNPs. Tissue and Cell. 33 : 395—401.

Jørgensen M. 1913. Zellenstudien I. Morphologische Beiträge zum Problem des Eiwachstums. Arch. Zellforsch. 10 : 1—126.

Kim W.-Y., Dahmus M. E. 1986. Immunocytochemical analysis of mammalian RNA polymerase II subspecies. Stability and relative *in vivo* concentration. J. Biol. Chem. 262 : 14 219—14 225.

Kopečný V., Biggiogera M., Laurincik J., Pivko J., Grafenaw P., Martin T. E., Fu X. D., Fakan S. 1996. Fine structural cytochemical and immunocytochemical analysis of nucleic acids and ribonucleoprotein distribution in nuclei of pig oocytes and early preimplantation embryos. Chromosoma. 104 : 561—574.

Lamond A. I., Earnshaw W. C. 1998. Structure and function in the nucleus. Science. 280 : 547—553.

Lerner E. A., Lerner M. R., Janeway C. A., Steitz J. 1981. Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune diseases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 78 : 2737—2741.

Matera A. G. 1999. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. Trends Cell Biol. 9 : 302—309.

Misteli T., Spector D. L. 1998. The cellular organization of gene expression. Curr. Opin. Cell Biol. 10 : 323—331.

Morgan G. T., Doyle O., Murphy C., Gall J. G. 2000. RNA polymerase II in Cajal bodies of amphibian oocytes. J. Struct. Biol. 129 : 258—268.

Nokkala S., Puro J. 1976. Cytological evidence for a chromocenter in *Drosophila melanogaster* oocytes. Hereditas. 83 : 265—268.

Ogg S. C., Lamond A. I. 2002. Cajal bodies and coilin — moving towards function. J. Cell Biol. 159 : 17—21.

- Parfenov V. N., Davis D. S., Pochukalina G. N., Kostyuchenek D., Murti K. G. 1998. Dynamics of distribution of splicing components relative to the transcriptional state of human oocytes from antral follicles. *J. Cell. Biochem.* 69 : 72—80.
- Parfenov V. N., Pochukalina G. N., Davis D. S., Reinbold R., Schöler H. R., Murti K. G. 2003. Nuclear distribution of Oct-4 transcription factor in transcriptionally active and inactive mouse oocytes and its relation to RNA polymerase II and splicing factors. *J. Cell. Biochem.* 89 : 720—732.
- Puvion E., Puvion-Dutilleul F. 1996. Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Exp. Cell Res.* 229 : 217—225.
- Ramamurty P. S. 1963. Über die Herkunft der Ribonukleinsäure in den wachsenden Eizellen der Skorpionsfliege *Panorpa communis* (Insecta: Mecoptera). *Naturwissenschaften.* 50 : 383—384.
- Raška I., Andrade L. E. C., Ochs R. L., Chan E. K. L., Chang C. M., Roos G., Tan E. M., 1991. Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp. Cell Res.* 195 : 27—37.
- Rübsam R., Büning J. 2001. F-actin is a component of the karyosome in neuropteran oocyte nuclei. *Arthr. Struct. Develop.* 30 : 125—133.
- Schul W., van Driel R., de Jong L. 1998. Coiled bodies and U2 snRNA genes adjacent to coiled bodies are enriched in factors required for snRNA transcription. *Mol. Biol. Cell.* 9 : 1025—1036.
- Simiczjew B. 1996. Cyto- and histochemical studies of the ovariole of *Panorpa communis* (Insecta: Mecoptera). *Folia Histochem. Cytobiol.* 34 : 151—154.
- Simiczjew B. 2003. Germ cell cluster differentiation in polytrophic ovarioles of hanging-flies (Mecoptera: Bittacidae). *Zool. Polon.* 48 : 71—79.
- Spector D. L. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9 : 265—315.
- Spector D. L. 1996. Nuclear organization and gene expression. *Exp. Cell Res.* 229 : 189—197.
- Spector D. L. 2001. Nuclear domains. *J. Cell Sci.* 114 : 2891—2893.
- Strouboulis J., Wolffe A. P. 1996. Functional compartmentalization of the nucleus. *J. Cell Sci.* 109 : 1991—2000.
- Świątek P. 1999. Formation of the karyosome in developing oocytes of weevils (Coleoptera, Curculionidae). *Tissue and Cell.* 31 : 587—593.
- Świątek P., Jaglarz M. K. 2004. SnRNPs are present in the karyosome capsule in the weevil germinal vesicle. *Tissue and Cell.* 36 : 253—262.
- Tsvetkov A., Alexandrova O., Bogolyubov D., Gruzova M. 1997. Nuclear bodies from cricket and mealworm oocytes contain splicing factors of pre-mRNA. *Eur. J. Entomol.* 94 : 393—407.
- Van Driel R., Wansink D. G., van Steensel B., Grande M. A., Schul W., de Jong L. 1995. Nuclear domains and the nuclear matrix. *Int. Rev. Cytol.* 162A: 151—189.
- Wallace R. A., Jared D. W., Dumont J. N., Segal M. W. 1973. Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. III. Optimum incubation conditions. *J. Exp. Zool.* 184 : 321—333.
- Watson M. 1962. Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell Biol.* 13 : 162—167.
- Wu C.-H., Gall J. G. 1993. U7 small nuclear RNA in C snurposomes of the *Xenopus* germinal vesicle. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90 : 6257—6259.
- Wu C.-H., Murphy C., Gall J. G. 1996. The Sm binding site targets U7 snRNA to coiled bodies (spheres) of amphibian oocytes. *RNA.* 2 : 811—823.
- Wu Z., Murphy C., Callan H. G., Gall J. G. 1991. Small nuclear ribonucleoproteins and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in the amphibian germinal vesicle: loops, spheres and snurposomes. *J. Cell Biol.* 113 : 465—483.

Поступила 12 IV 2005

KARYOSPHERE AND EXTRACHROMOSOMAL NUCLEAR BODIES IN OOCYTES OF THE SCORPIONFLY, *PANORPA COMMUNIS*

F. M. Batalova, D. S. Bogolyubov, V. N. Parfenov

Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg;
e-mail: florina@mail.cytspb.rssi.ru

Oocyte nuclear structures were studied for the scorpionfly *Panorpa communis* at different stages of oocyte growth, from pachytene to the first meiotic division. Using immunofluorescent and immunogold microscopy, we analyzed the nuclear distribution of RNA polymerase II, splicing factors and coilin. These factors were revealed in close association with perichromatin fibrils and, later, with some elements of the karyosphere and extrachromosomal nuclear bodies (NBs). Besides, it was shown that large amounts of *P. communis* oocyte NBs represent Cajal bodies (CBs) and contain CB marker protein, coilin, as well as RNA polymerase II, and in some cases an essential splicing factor, SC35. The presence of SC35 is commonly not characteristic of CBs in somatic cells. CB dynamics was traced in inactivated oocyte nuclei, during a gradual condensation of chromosomes and their final assembling into the karyosphere. It has been shown that coilin, RNA polymerase II and SC35 protein are common compounds shared by CBs and some granular material associated with these condensed chromosomes. CB remnants were demonstrated in the ooplasm after the breakdown of nuclear envelope before the first meiotic division. In inactivated oocyte nuclei, CBs serve presumably as storage compartments for some inactive components essential for gene expression.