

ЯДРЫШКО В ООЦИТАХ МНОГОСЛОЙНЫХ Фолликулов Мыши: ТОПОГРАФИЯ Фибрилларина, РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ I И КОИЛИНА

© Г. Н. Почукалина, В. Н. Парфенов

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

С помощью электронной микроскопии, непрямой иммунофлуоресценции и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии исследованы особенности организации и молекулярного состава ядрышек из ядер ооцитов, находящихся в растущих многослойных фолликулах мыши. Характерной особенностью таких ядрышек является отсутствие практически всех его классических компонентов — фибриллярных центров, плотного фибриллярного и гранулярного компонентов. Ядрышко состоит исключительно из гомогенного филаментного материала, пронизанного интерстициями. Получены данные об ассоциации с ядрышком коилина — маркерного белка тельца Кахала. Было обнаружено, что коилин в районе ядрышка накапливается в трех различных позициях: вокруг ядрышка, в периферических зонах или внутри ядрышка. Проанализирована взаимосвязь между коилином и двумя ключевыми ядрышковыми белками, принимающими участие в организации транскрипции и процессинга рибосомной РНК, — РНК-полимеразой I и фибрилларинном. Показано, что в отличие от фибрилларина РНК-полимераза I колокализуется с коилином. На основании данных о динамических взаимоотношениях коилина с ядрышком предполагается возможная роль коилина в осуществлении функциональной взаимосвязи между тельцем Кахала и ядрышком.

Ключевые слова: ооциты мыши, ядрышко, ядрышковые белки, коилин, непрямая иммунофлуоресценция.

Принятые сокращения: АТ — антитела, пол I — РНК-полимераза I, ТК — тельце Кахала, ЯПТ — ядрышкоподобное тело.

Известно, что при прохождении стадии I мейотического деления в ядрах ооцитов млекопитающих происходит постепенное затухание синтетических процессов. Морфологическим отражением падения транскрипционной активности рибосомной РНК (рРНК) является качественная реорганизация ядрышка. В своем развитии фолликулы млекопитающих проходят две фазы: первая фаза, или период малого роста, характеризуется значительным увеличением размеров ооцита и сопровождается нарастанием слоев фолликулярных клеток. В течение второй фазы, или периода большого роста, растет только фолликул за счет формирования обширной полости. До образования антрума ооцит активно растет, и этот процесс сопровождается интенсивным синтезом РНК. Уровень синтеза суммарной РНК (информационной РНК (иРНК) и рРНК) резко возрастает в одно-двухслойных фолликулах и поддерживается на высоком уровне в многослойных фолликулах (Зыбина, 1971; Moore et al., 1974; Kaplan et al., 1982). С началом формирования антральной полости прекращается рост ооцита, и ситуация в ядре резко меняется.

Падение уровня транскрипции впервые отмечается в ядрах ооцитов из многослойных фолликулов с самыми начальными признаками формирования антрума. Синтез иРНК практически затухает, сохраняясь на некотором фоновом уровне, необходимом для поддержания жизнедеятельности клетки (Moore et al., 1974). Постепенное уменьшение интенсивности транскрипции рРНК отража-

ется в серии трансформаций ядрышка — одной из наиболее реактивных органелл ядра. Ретикулярное, или нуклеолонемное, ядрышко теряет все свои классические компоненты и преобразуется в крупное округлое образование зрелых преовуляторных ооцитов (Chouinard, 1971; Mirre, Stahl, 1981; Зыбина, 1992). Эта структура, получившая название ядрышкоподобное тело (ЯПТ), состоит из плотно упакованных фибрилл диаметром 6—10 нм (Tesarik et al., 1984; Koresny et al., 1995). Показано, что на первых этапах трансформации внутри ядрышка обнаруживаются мелкие сферические зоны гомогенного тонкофибрилярного материала, получившие название сферул. В процессе формирования многослойного фолликула происходит увеличение площади сферул. К моменту образования антрума все типичные ядрышковые компоненты замещаются тонкофибрилярным материалом, который, конденсируясь, формирует плотное компактное ЯПТ (Crozet et al., 1981; Takeuchi, 1984; Antoine et al., 1987).

Подобные изменения организации ядрышка ооцитов характерны для многих млекопитающих, включая человека (Palombi et al., 1974; Crozet et al., 1981, 1986; Зыбина и др., 1984; Takeuchi, 1984; Antoine et al., 1987, 1988; Parfenov et al., 1989). Природа материала ЯПТ до сих пор не установлена, однако в его составе был обнаружен коилин — ключевой белок ТК (Koresny et al., 1996; Parfenov et al., 1998, 2003). Учитывая убедительно документиро-

ванную преемственность материала ЯПТ и сферул ядрышка ооцитов млекопитающих (Takeuchi, 1984; Antoine et al., 1987), весьма актуальными представляются исследования по выявлению коилина в составе ядрышек на различных этапах их эволюции в оогенезе.

В настоящей работе представлены данные по наличию коилина в ядрышке ооцита мыши, прекратившего свой рост. С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показана локализация коилина относительно ведущего компонента транскрипции рДНК — РНК-полимеразы I (пол I) и ключевого белка процессинга рРНК — фибрилларина.

Материал и методика

Объектом исследования служили ядра ооцитов из многослойных фолликулов половозрелых мышей линии Balb/C (в возрасте 21 сут постнатального развития).

Для непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии были приготовлены давленные препараты ооцитов (Hulsebos et al., 1984), а также тотальные препараты целых фолликулов по методике, описанной в работе Зацепиной с соавторами (Zatsepina et al., 2000). Фолликулы выделяли из яичника в растворе 4%-ного параформальдегида (Ted Pella, Inc., США), приготовленного на однократном (1×) фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Фиксированные в течение 20 мин—1 ч образцы отмывали в 1× PBS 3 раза по 5—10 мин. Затем фолликулы 5—10 мин обрабатывали в 0.1%-ном растворе Triton X-100 (Pharmacia Biotech, Швеция), отмывали в 1× PBS и переносили на покровные стекла. Окраску первыми антителами (АТ) проводили в каплях на покровных стеклах во влажной камере в течение ночи при 4° С. Для двойного окрашивания препараты инкубировали в смеси первых АТ. Используемые в работе первые АТ и выявляемые антигены представлены в таблице.

В качестве вторых АТ использовали козы или кроличьи иммуноглобулины, конъюгированные с флуоресцентным красителем FITC или Texas-red. Перед окрас-

Используемые в работе первые антитела и выявляемые антигены

Антитела	Выявляемые антигены	Литературный источник
17c12	Фибрилларин	Ochs et al., 1985
α -RNA pol I	РНК-полимераза I	Ochs et al., 1994
R288	Коилин	Andrade et al., 1993

кой вторыми АТ препараты отмывали в 1× PBS; окраску проводили в течение 1.5 ч при комнатной температуре во влажной камере. При двойном окрашивании обработку препаратов проводили в смеси вторых АТ. Затем препараты промывали в 1× PBS и окрашивали TO-Pro-3 в разведении 1 : 1000 (Molecular Probes, Inc.) в течение 1 мин для выявления ДНК, промывали 1× PBS и заключали в среду Vectashield® (Vector Laboratories, Inc.) либо заключали в 50%-ный глицерин, содержащий 1 мг/мл парафенилендиамина (Sigma, США) и 0.5 мкг/мл 4', 6-диамидиново-2-фенилиндол (DAPI; Sigma, США), для выявления ДНК.

Препараты просматривали с помощью люминесцентного микроскопа Axioskop (Karl Zeiss) и конфокального микроскопа Leica TCS SL.

Для ультраструктурного анализа ядер ооцитов фиксацию и заливку материала проводили по описанной ранее методике (Parfenov et al., 1989). Серийные срезы были получены с помощью ультрамикротомы Reichert. Срезы контрастировали 1%-ным раствором уранил-ацетата и 4%-ным раствором цитрата свинца. Ультратонкие срезы исследовали с помощью электронного микроскопа JEM 7A при 80 кВ.

Результаты

Ядра ооцитов мыши из многослойных фолликулов с формирующимся антрумом содержат одно, в редких случаях два крупных (диаметром до 4 мкм) вакуолизованные

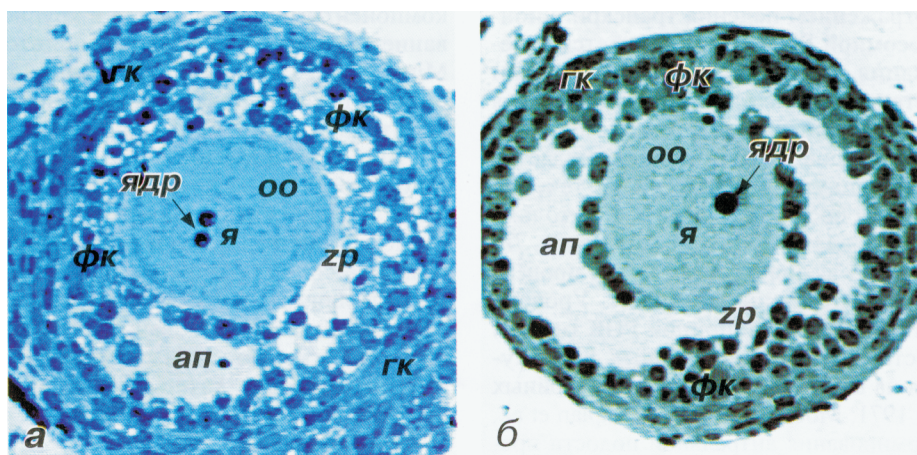


Рис. 1. Организация многослойного фолликула мыши.

a — многослойный фолликул с зачатками антральной полости; *б* — в многослойном фолликуле видны полости развивающегося антрума. В ядре ооцита выделяются одно или два крупных ядрышка. *гк* — клетки гранулезы, *фк* — фолликулярные клетки, *ап* — антральная полость, *zp* — zona pellucida, *оо* — ооцит, *я* — ядро ооцита, *ядр* — ядрышко. Полутоновые срезы, окраска толуидиновым синим. Об. 40×, ок. 10×.

Fig. 1. Organization of a plurilaminar mouse follicle.

a, б — follicles with a developing antrum, 1 (*a*) or 2 (*б*) nucleoli are available in oocyte nuclei. *ап* — antrum, *гк* — granulosa cells, *оо* — oocyte, *фк* — follicular cells, *zp* — zona pellucida, *я* — nucleus, *ядр* — nucleolus. Ob. 40×, oc. 10×.

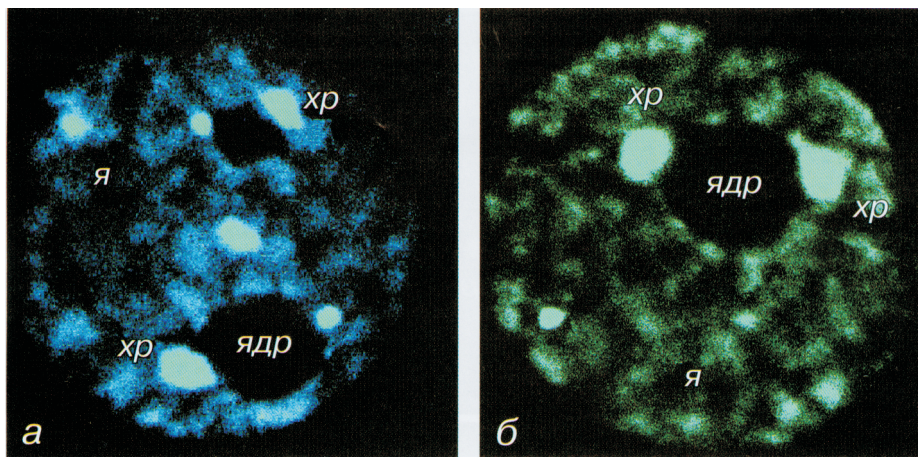


Рис. 2. Общий вид ядер ооцитов из многослойного фолликула мыши (а, б).

Хроматин организован в виде тонкой сети, с ядрышками связаны крупные блоки гетерохроматина. Окраска То-Про-3. я — ядро ооцита, ядр — ядрышко, хр — хромоцентры. Об. 40×, ок. 10×.

Fig. 2. General view of oocyte nuclei from plurilaminar follicles (a, б).

Chromatin is organized as a network; large chromatin blocks (chromocentres) are connected with nucleoli. DNA staining with To-Pro-3. я — chromatin blocks. Other designations are the same as in Fig. 1. Ob. 40×, oc. 10×.

ных ядрышка, которые имеют правильную сферическую форму (рис. 1, а, б). Хроматин после окраски на ДНК является в виде яркой светящейся сети с несколькими крупными хромоцентрами, часть которых контактирует с ядрышком (рис. 2, а, б). На ультратонком уровне видно, что ядрышко состоит из гомогенных фибрилл диаметром 6—10 нм и заполнено большим количеством вакуолей или так называемых ядрышковых интерстиций (Chouinard, 1971) разнообразного размера (рис. 3, а). Ха-

рактерной особенностью морфологии такого ядрышка является наличие в его составе нескольких округлых зон, состоящих также из тонких фибрилл, которые характеризуются меньшим диаметром (4—6 нм) и менее плотной упаковкой (рис. 3, б). В настоящей работе для обозначения этих структур мы используем термин «сферулы». Близлежащие вакуоли, примыкая к сферулам, позволяют абсолютно четко различить два материала, составляющих ядрышко. Размеры, количество и распо-

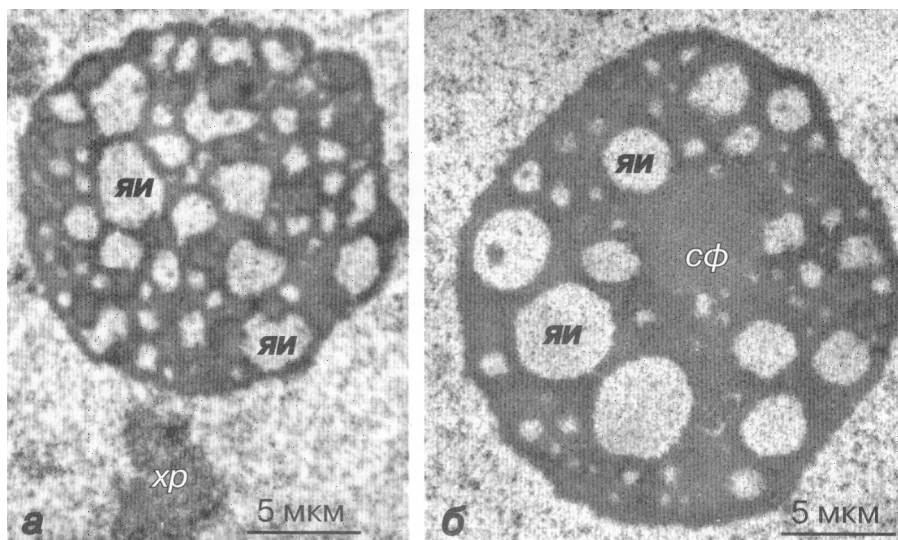


Рис. 3. Ультраструктурная организация ядрышка ооцита из многослойного фолликула мыши.

а — ядрышко мыши из многослойного фолликула без антрума пронизано многочисленными интерстициями; б — ядрышко ооцита мыши из многослойного фолликула с развивающимся антрумом. Интерстиции приобретают правильную округлую форму. В центре ядрышка видна одна крупная сферула. Основной материал ядрышка уплотняется вследствие конденсации составляющих его фибрилл. яи — ядрышковые интерстиции, сф — сферула, хр — хроматин.

Fig. 3. Ultrastructural organization of the oocyte nucleolus from a plurilaminar follicle.

а — nucleolus from a plurilaminar follicle without antrum. Note numerous irregularly shaped interstices; б — nucleolus from plurilaminar follicles with developing antrum. Note a regular round shape of interstices. One large spherule is seen in the centre of the nucleolus. сф — spherule, яи — nucleolus interstices. Other designations are the same as in Fig. 2.

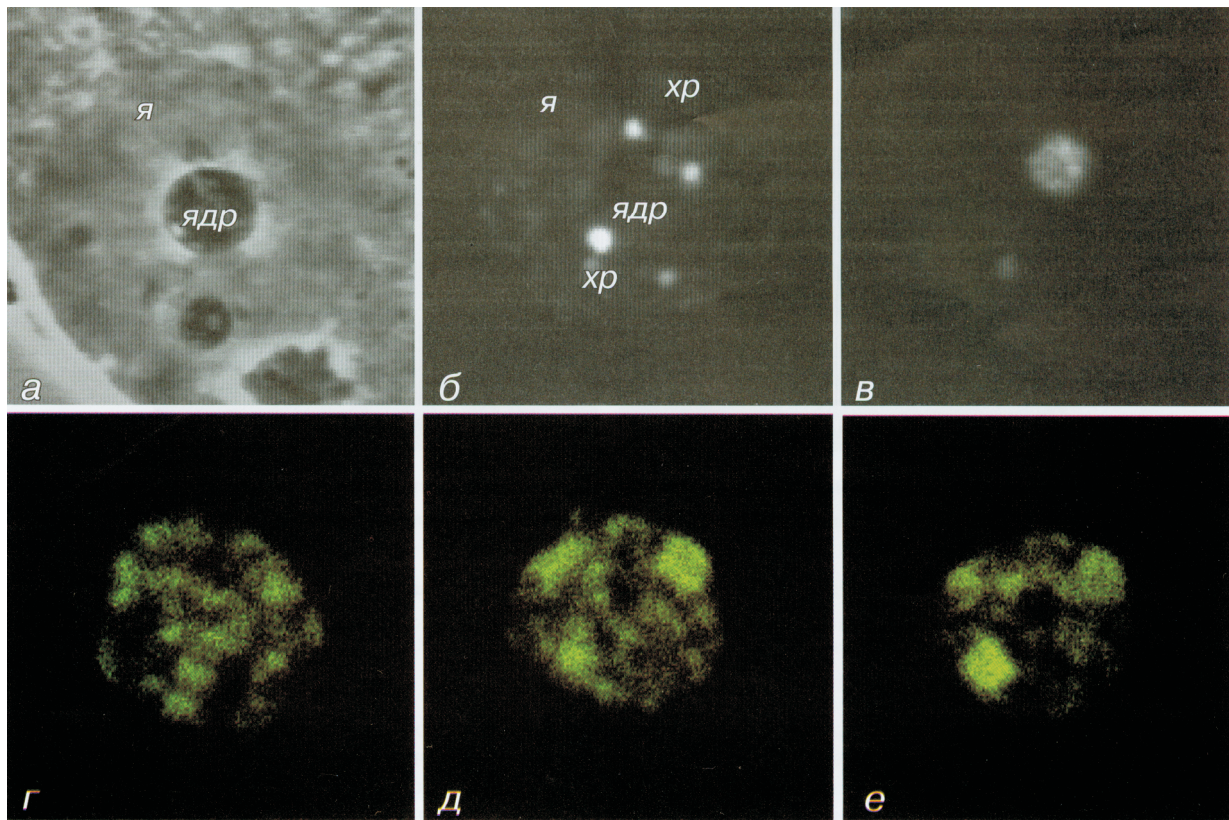


Рис. 4. Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов целых ооцитов из многослойных фолликулов мыши антителами против фибрилларина.

a–в — давленный препарат: *a* — фазовый контраст, *б* — окраска DAPI, *в* — фибрилларин выявляется в двух ядрышках. *г–е* — оптические срезы одного ядрышка, полученные с помощью конфокального микроскопа. Фибрилларин занимает практически весь объем ядрышка, несмотря на неравномерное распределение сигнала. *я* — ядро ооцита, *ядр* — ядрышко, *хр* — хромосомы. Об. 40х, ок. 10х.

Fig. 4. Indirect immunofluorescent staining of the whole oocytes of plurilaminar follicles with antibodies against fibrillarlin (conventional and confocal laser scanning microscopy).

a–в — squash preparation: *a* — phase contrast, *б* — DAPI staining, *в* — fibrillarlin revealed in two nucleoli. *г–е* — the whole mount preparation; confocal laser scanning micrographs of the same nucleolus. Fibrillarlin occupies the most part of nucleolar volume. All designations are the same as in Fig. 2. Ob. 40х, oc. 10х.

ложение сферул варьируют в ядрышках различных ооцитов. По мере роста фолликула и расширения антральной полости изменяется форма и количество вакуолей ядрышка. Они приобретают правильную округлую форму, при этом число их значительно сокращается (рис. 3, б).

С помощью непрямого иммунофлуоресценции и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии нами были получены следующие данные о составе ядрышка исследуемых ооцитов. АТ к фибрилларину окрашивают ядрышко по всему объему (рис. 4, в), однако отмечается неравномерная интенсивность окраски ядрышка. Выявляются зоны яркой окраски, не имеющие какого-либо предпочтительного положения в ядрышке; с ними соседствуют участки, дающие практически негативную реакцию на окрашивание данными антителами. Суммируя серийные конфокальные изображения картин распределения фибрилларина во всем объеме ядрышка (рис. 4, г–е), можно заключить, что этот белок продолжает занимать весомое положение в разных частях ядрышка ооцитов, находящихся на данной стадии оогенеза.

Окраска препаратов АТ против пол I показала некоторые различия в расположении этого антигена в ядрыш-

ках ооцитов, находящихся на разных фолликулах. В одной группе ооцитов пол I выявлялась в нескольких мелких округлых структурах, расположенных по внутреннему периметру ядрышка (рис. 5, а, б; рис. 9, II). В других ооцитах присутствовала одна ярко окрашенная крупная сфера, находящаяся либо на периферии, либо в непосредственной близости от ядрышка (рис. 5, в, г). При изучении конфокальных срезов ядер этих ооцитов оказалось, что наряду с одиночными сферами по внутреннему периметру ядрышка располагаются более мелкие гранулы, содержащие пол I. По нашему мнению, локализация пол I в одной крупной сфере характерна для ооцитов из многослойных фолликулов, имеющих антрум большого размера.

Поскольку в ЯПТ ооцитов из антральных фолликулов мыши и других млекопитающих были обнаружены значительные количества коилина (Korešny et al., 1996; Parfenov et al., 1998, 2003), можно было ожидать, что в ядрышках, непосредственно предшествующих ЯПТ по генезису, также будет выявляться этот белок. Имея в виду эту возможность, мы провели иммунофлуоресцентные исследования распределения коилина в ядрах ооцитов из многослойных фолликулов мыши. После окраски препаратов поликлональными АТ R288 против коилина

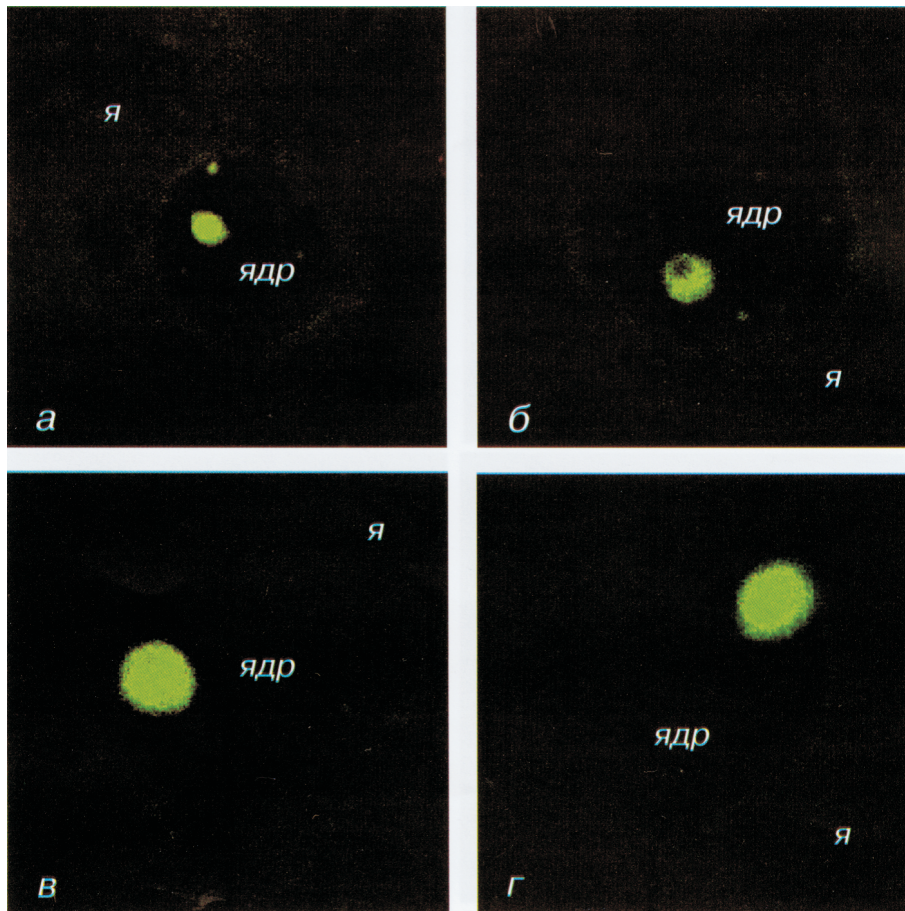


Рис. 5. Выявление РНК-полимеразы I (пол I) в ядрышках ооцитов из многослойных фолликулов мыши. Данные конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

a—z — разнообразные варианты распределения пол I внутри ядрышек ооцитов из фолликулов, находящихся на разных стадиях формирования антральной полости. *a, б* — ядрышко ооцита мыши из многослойного фолликула с зачатками антрума. Мелкие сферические гранулы рассеяны внутри ядрышка и частично распределены по внутреннему краю ядрышка. *в—z* — ядрышко ооцита мыши из многослойного фолликула с растущей антральной полостью. Внутри ядрышка обычно находится одна крупная сфера, расположенная эксцентрично или занимающая периферическое положение. *я* — ядро ооцита, *ядр* — ядрышко. Об. 40×, ок. 10×.

Fig. 5. RNA polymerase I in oocyte nucleoli from plurilaminar mouse follicles (confocal laser scanning microscopy).

a, б — oocyte nucleoli from a plurilaminar mouse follicle at early stages of antrum formation (with antrum rudiment). Note that small spherical RNA polymerase I containing granules are dispersed inside the nucleolus. *в, z* — oocyte nucleoli from a plurilaminar mouse follicle with a growing antrum. A single large fluorescent sphere is seen inside nucleoli. This sphere is located eccentrically (*в*) or at the nucleolus periphery (*z*). Designations are the same as in Fig. 4. Ob. 40×, oc. 10×.

на фоне диффузного свечения ядра были обнаружены один-два мелких светящихся фокуса, причем один из них находился в непосредственном контакте с ядрышком (рис. 6, б, в). Параллельная конфокальная микроскопия полностью подтвердила эти данные. Таким образом, в ядре ооцита мыши из многослойного фолликула с формирующимся антрумом нами впервые были идентифицированы коилинсодержащие структуры. Наряду с этими данными в некоторых ооцитах коилин либо выявлялся в виде оболочки, окружающей ядрышко по периферии (рис. 9, II), либо свечение наблюдалось внутри ядрышка (рис. 6, z). Анализ серийных конфокальных срезов показал, что в таких случаях коилинсодержащий материал проникает в глубокие нуклеолярные зоны (рис. 6, д—z).

Поскольку наряду с ядрышковыми белками внутри или в непосредственной близости от ядрышка был обнаружен коилин, мы провели эксперименты по двойному окрашиванию ооцитов АТ против коилина и фибрилла-

рина, а также против коилина и пол I. В первом случае наряду с ядрами, характеризующимися типичным распределением этих антигенов, когда фибрилларин выявлялся в ядрышке, а коилин — в одном-двух небольших тельцах (рис. 7, I), были обнаружены ядра, в ядрышках которых присутствовали коилинсодержащие участки. Конфокальный анализ показал, что коилин занимает зоны ядрышка, свободные от фибрилларина (рис. 7, II). При этом свободных коилинсодержащих структур в таких ядрах не было выявлено. Во втором случае была проведена окраска АТ против пол I и коилина фолликулов различного размера. В одно-двухслойных фолликулах пол I выявлялась в двух нуклеолонемных «активных» ядрышках (рис. 8, в). Единичное и небольшое тельце, окрашиваемое АТ к коилину, располагалось на периферии ядра ооцита (рис. 8, z). В ооците из многослойного фолликула, имеющего лишь зачатки антральной полости, АТ против пол I окрашивали мелкие округ-

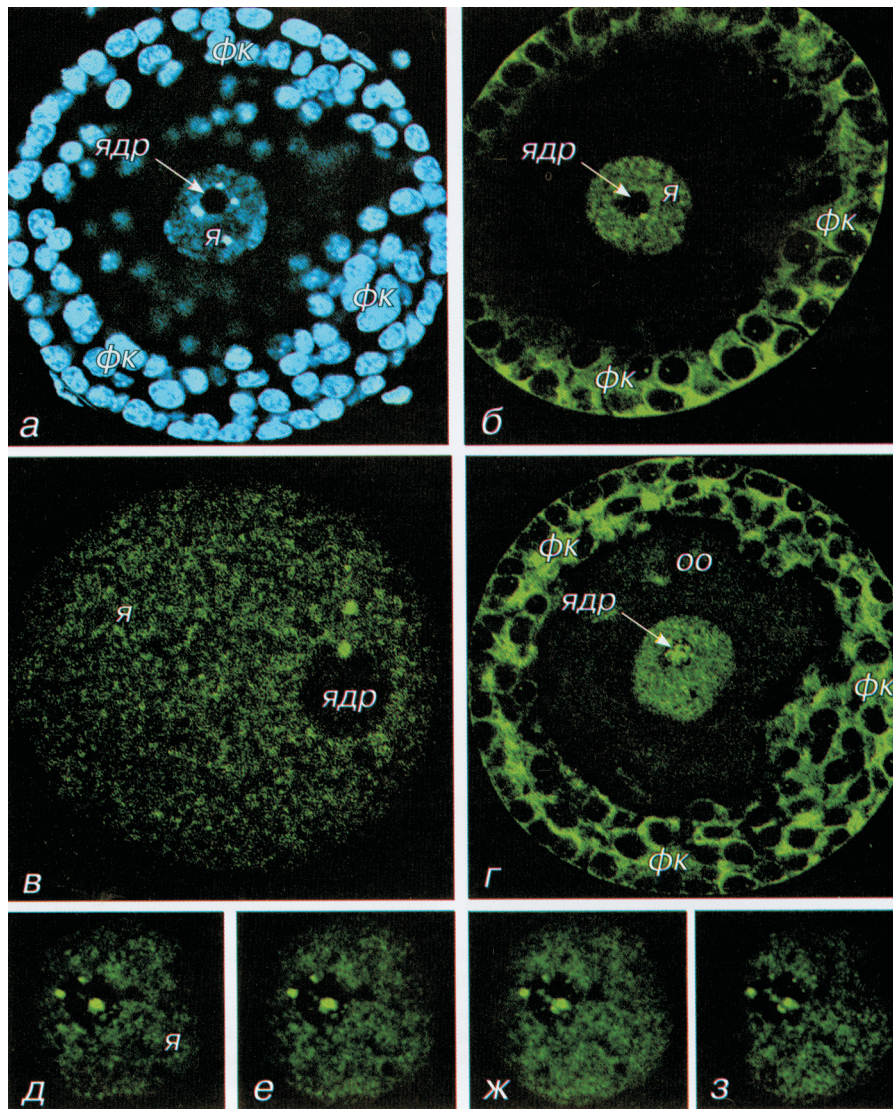


Рис. 6. Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов целых ооцитов мыши из многослойных фолликулов с помощью поликлональных антител R 288 против коилина. Данные конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

a — общий вид многослойного фолликула мыши; окраска To-Pro-3. *б-г* — различные варианты распределения коилина в ядрах ооцитов мыши: *б, в* — коилин выявляется в одной-двух мелких структурах, одна из которых связана с ядрышком, а другая находится в карิโอплазме; *г* — коилин заполняет практически весь объем ядрышка. *д-з* — оптические срезы одного ядрышка ооцита мыши; видно, что коилин занимает довольно обширные зоны внутри ядрышка. *фк* — фолликулярные клетки, *оо* — ооцит, *я* — ядро ооцита, *ядр* — ядрышко. Об. 40×, ок. 10×.

Fig. 6. Immunofluorescent staining of plurilaminar mouse follicles with polyclonal antibody (R 288) against coilin (confocal laser scanning microscopy).

a — general view of a follicle after staining with To-Pro-3; *б-г* — coilin distribution in the nucleus. Note the superficial localization of coilin containing granules on the nucleoli (*б, в*). *д-з* — confocal laser micrographs of the same oocyte nucleus (*г*), with coilin located inside the nucleolus. Designations are the same as in Fig. 1. Ob. 40×, oc. 10×.

лые зоны внутри ядрышка, что особенно хорошо видно при конфокальной микроскопии (рис. 9, *д*). Коилин выявлялся в виде оболочки вокруг всей поверхности ядрышка (рис. 9, *д*), и при совмещении оптических срезов оказалось, что зоны с пол I и коилином лишь частично перекрываются (рис. 9, *III*). В ядрышке ооцита из многослойного фолликула с развивающимся антрумом пол I выявляется в одной крупной сфере, находящейся либо внутри, либо в непосредственной близости от ядрышка (рис. 10, *б*). Коилин при этом абсолютно повторяет локализацию пол I, что прослеживается при совмещении конфокальных изображений (рис. 10, *з*).

Обсуждение

В настоящей работе нами изучены особенности организации и молекулярного состава ядрышек из ядер ооцитов, находящихся в растущих многослойных фолликулах мыши. Поиски, в том числе и на серийных срезах, фрагментов классических компонентов ядрышка — фибриллярного центра (ФЦ), плотного фибриллярного (ПФК) и гранулярного компонентов (ГК) — положительных результатов не дали. Их отсутствие ясно указывает на инактивацию ядрышка ооцита на данной стадии оогенеза. Установлено, что в период большого роста фолликулов

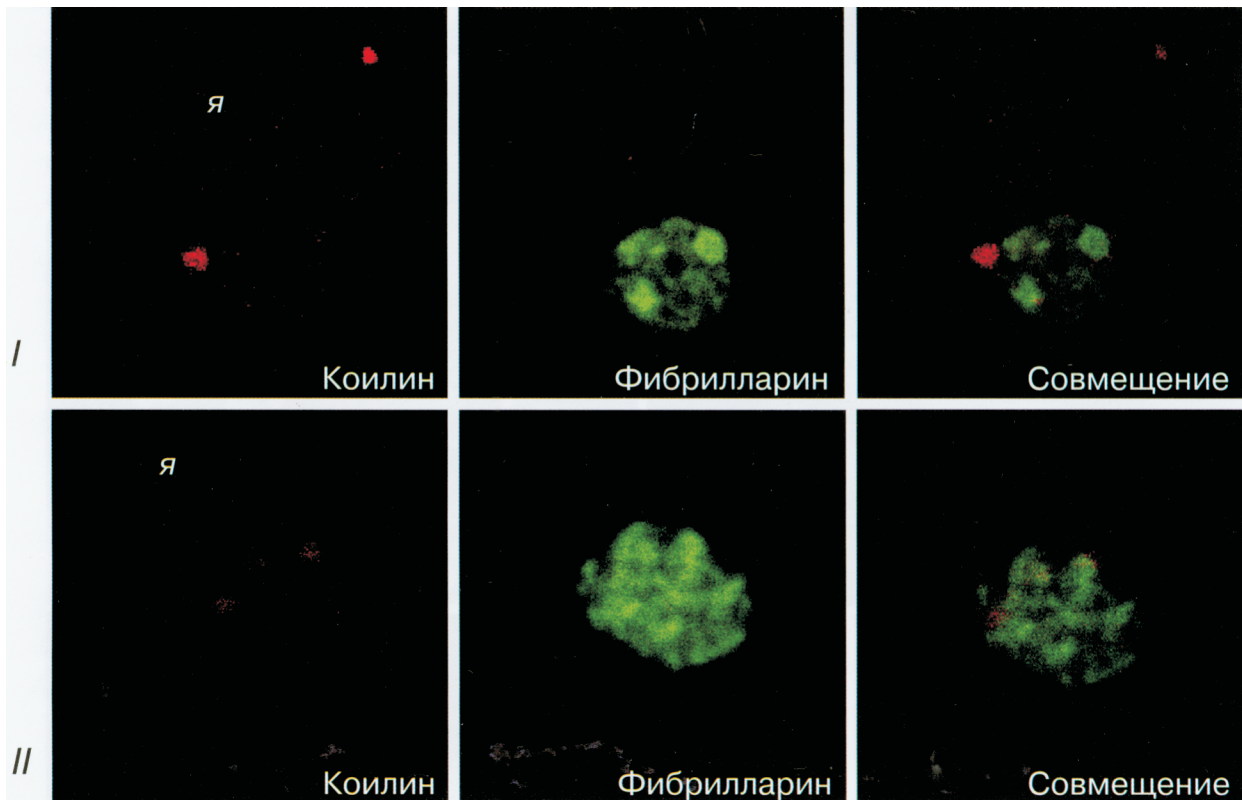


Рис. 7. Результаты двойного окрашивания препаратов целых ооцитов мыши из многослойных фолликулов поликлональными антителами против коилина и моноклональными антителами против фибрилларина. Данные конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

I, II — разные варианты двойной окраски ядер ооцитов мыши антителами против коилина и фибрилларина. При совмещении изображений (III) видно, что коилин занимает зоны ядрышка, не содержащие фибрилларин. я — ядро ооцита. Об. 40×, ок. 10×.

Fig. 7. Double-immunostaining of oocyte nuclei from a plurilaminar mouse follicle with anti-coilin antibody and anti-fibrillarin antibody (confocal laser scanning microscopy).

I and II — two patterns of the double staining of different nuclei. Coilin and fibrillarin do not colocalize in the nucleolus. Designations are the same as in Fig. 6. Ob. 40×, oc. 10×.

мышы в ядрах ооцитов происходит резкое падение уровня синтеза суммарной РНК (Зыбина, 1971; Moore et al., 1974; Kaplan et al., 1982). В результате прекращения транскрипции рРНК ядрышки теряют ФЦ, ПФК, ГК и трансформируются в сугубо фибриллярные образования. При этом они приобретают новый компонент, представленный в виде сферул из однородных тонких фибрилл (рис. 3, б). Образование сферул внутри ядрышка, а также постепенное замещение или смещение к периферии основных компонентов активного ядрышка — отличительная особенность структурной эволюции ядрышка ооцитов многих млекопитающих (Crozet et al., 1981; Takeuchi, 1984; Antoine et al., 1987, 1988; Зыбина, Зыбина, 1992). Следует отметить, что ряд авторов на основании детального морфологического изучения последовательного ряда трансформации ядрышковой организации делают вывод о преемственности материала сферул и ЯПТ (Chouinard, 1975; Takeuchi, 1984). По особенностям организации ядрышки исследуемых ооцитов, находящиеся на диплотенной стадии оогенеза, представляют собой переходную форму между типичными ретикулярными ядрышками ооцитов из одно-двухслойных фолликулов (рис. 8, б) и компактными фибриллярными ЯПТ ооцитов из антральных фолликулов. Мы полагаем, что появление в ядрышке ооцита сферул, состоящих из гомогенных

фибрилл, может служить надежным критерием для определения перехода ядра ооцита в инактивированное состояние и отражать первый этап трансформации ядрышка в ЯПТ преовуляторных ооцитов млекопитающих. В этой части наши исследования совпадают с другими данными, полученными на ооцитах из многослойных фолликулов мыши и других млекопитающих, включая человека (Chouinard, 1971, 1973, 1975; Crozet et al., 1981, 1986; Зыбина и др., 1984; Takeuchi, 1984; Antoine et al., 1987; Parfenov et al., 1989).

Одним из самых примечательных результатов наших наблюдений является обнаружение коилина на периферии или внутри инактивированных ядрышек ооцитов из многослойных фолликулов мыши. Коилин — маркерный белок ТК, которое является одним из наиболее значимых экстрахромосомных доменов ядра (Gall, 2000). Эти результаты выглядят тем более убедительными, если их сравнивать с данными параллельного окрашивания этими же антителами ооцитов из двухслойных фолликулов, где ядрышки демонстрируют полное отсутствие коилина (рис. 8, в—д). В течение последних нескольких лет активно разрабатывается концепция структурно-функциональной связи ТК и ядрышка (Sleeman et al., 1998; Ogg, Lamond, 2002). Предполагается, что в этом процессе наряду с другими факторами существенную роль может иг-

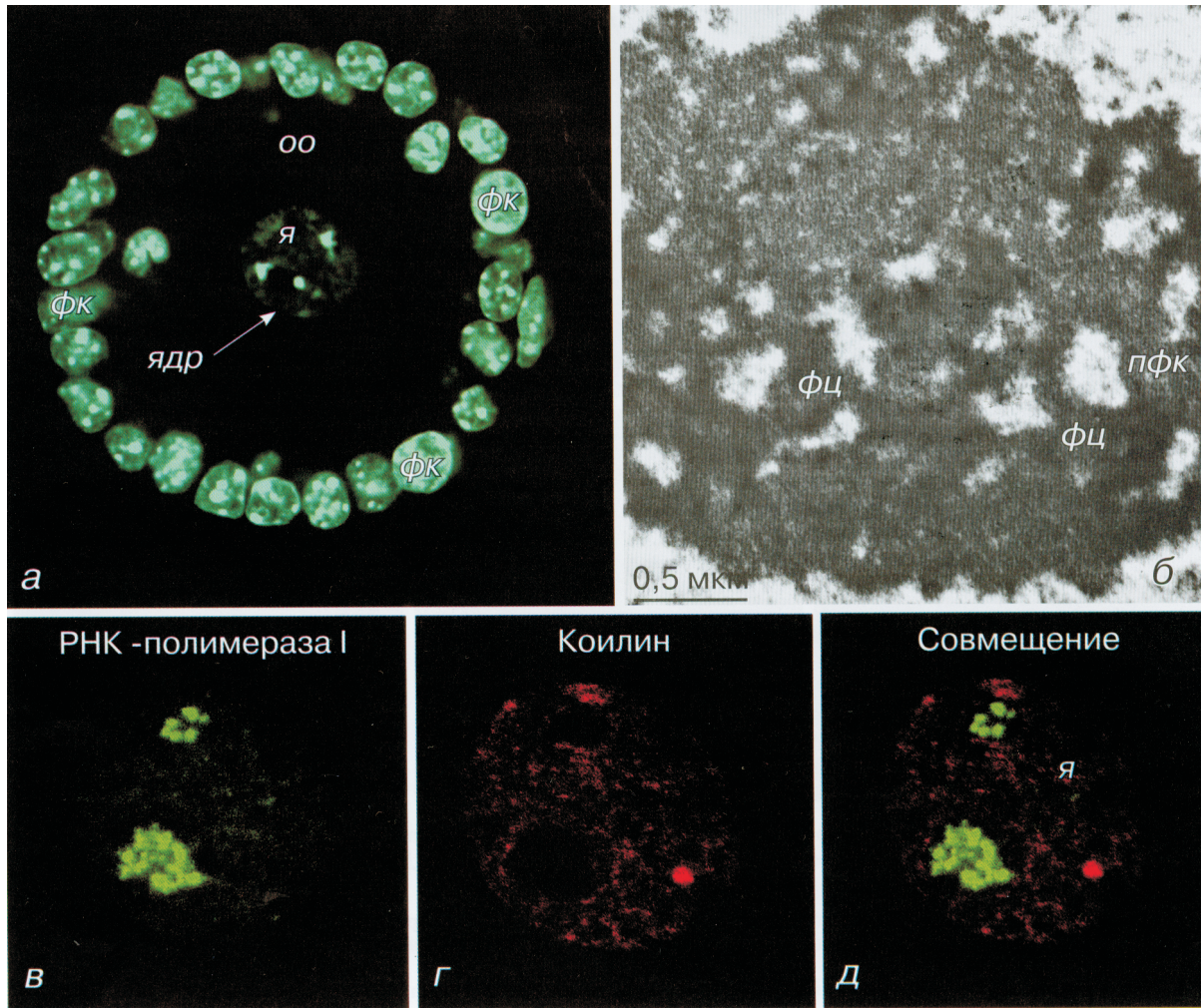


Рис. 8. Выявление совместного распределения пол I и коилина в ядрах ооцитов из одно-двухслойных фолликулов мыши с помощью двойного окрашивания.

a — общий вид однослойного фолликула мыши, окраска To-Pro-3; *b* — тонкая организация нуклеолономного ядрышка ооцита из однослойного фолликула мыши; *v* — нуклеолономные ядрышки содержат значительные количества пол I; *г* — коилин выявляется в единичной структуре, лежащей в нуклеоплазме; *д* — совмещение двух изображений. *фц* — фибриллярный центр, *пфк* — плотный фибриллярный компонент, *фк* — фолликулярные клетки, *oo* — ооцит, *я* — ядро ооцита, *ядр* — ядрышко. Об. 40×, ок. 10×.

Fig. 8. Double-immunostaining of oocyte nuclei from a unilaminar mouse follicle with anti-coilin and anti-RNA polymerase I antibodies (confocal laser scanning microscopy).

a — follicle after staining with To-Pro-3; *b* — ultrastructural organization of an oocyte nucleolus from a unilaminar mouse follicle; *v* — RNA polymerase I revealed in two nucleoli; *г* — anti-coilin antibodies stain only a small body; *д* — merge of two images. *пфк* — dense fibrillar component, *фц* — fibrillar centre. Other designations are the same as in Fig. 6. Ob. 40×, oc. 10×.

рать коилин, присутствующий в ядрышках (Bohmann et al., 1995; Bellini, 2000). Таким образом, факт наличия коилина в инактивированных ядрышках ооцитов мыши при всей его неожиданности не носит на сегодняшний день исключительного характера и стоит в ряду аргументов, поддерживающих концепцию «ядрышкового» коилина.

Следует подчеркнуть, что одни из первых наблюдений по внутринуклеолярной локализации коилина — маркерного белка ТК — были сделаны именно на инактивированных по разным причинам ядрышках в ядрах покоящихся клеток различного происхождения (Malatesta et al., 1994; Ochs et al., 1994). «Ядрышковый» коилин выявлялся в составе структурно оформленных ТК внутри ядрышек адипоцитов и гепатоцитов сонь, находящихся в зимней спячке (Malatesta et al., 1994), и в ядрышках клеток карциномы молочной железы (Ochs et al., 1994).

Появление эндогенного коилина в разных зонах ядрышка было показано также после ингибирования клеток актиномицином Д (Carmo-Fonseca et al., 1992b). Накопление коилина во внутренних частях ядрышка, по всей вероятности, отражает изменение определенных внутриклеточных условий, которые могут быть вызваны экспериментально: при сверхэкспрессии экзогенного коилина (Wu et al., 1994) или при действии на клетки оокадаевой кислоты, селективного ингибитора специфической Ser/Thr фосфатазы (Lyon et al., 1997; Sleeman et al., 1998). Результаты, подобные действию оокадаевой кислоты, были получены в опытах по экспрессии в клетках экзогенного коилина с точечной мутацией по 202-му остатку, где осуществлялась замена серина на аспарат, которая имитировала конститутивное фосфорилирование (Lyon et al., 1997). Таким образом, наши наблюдения о появле-

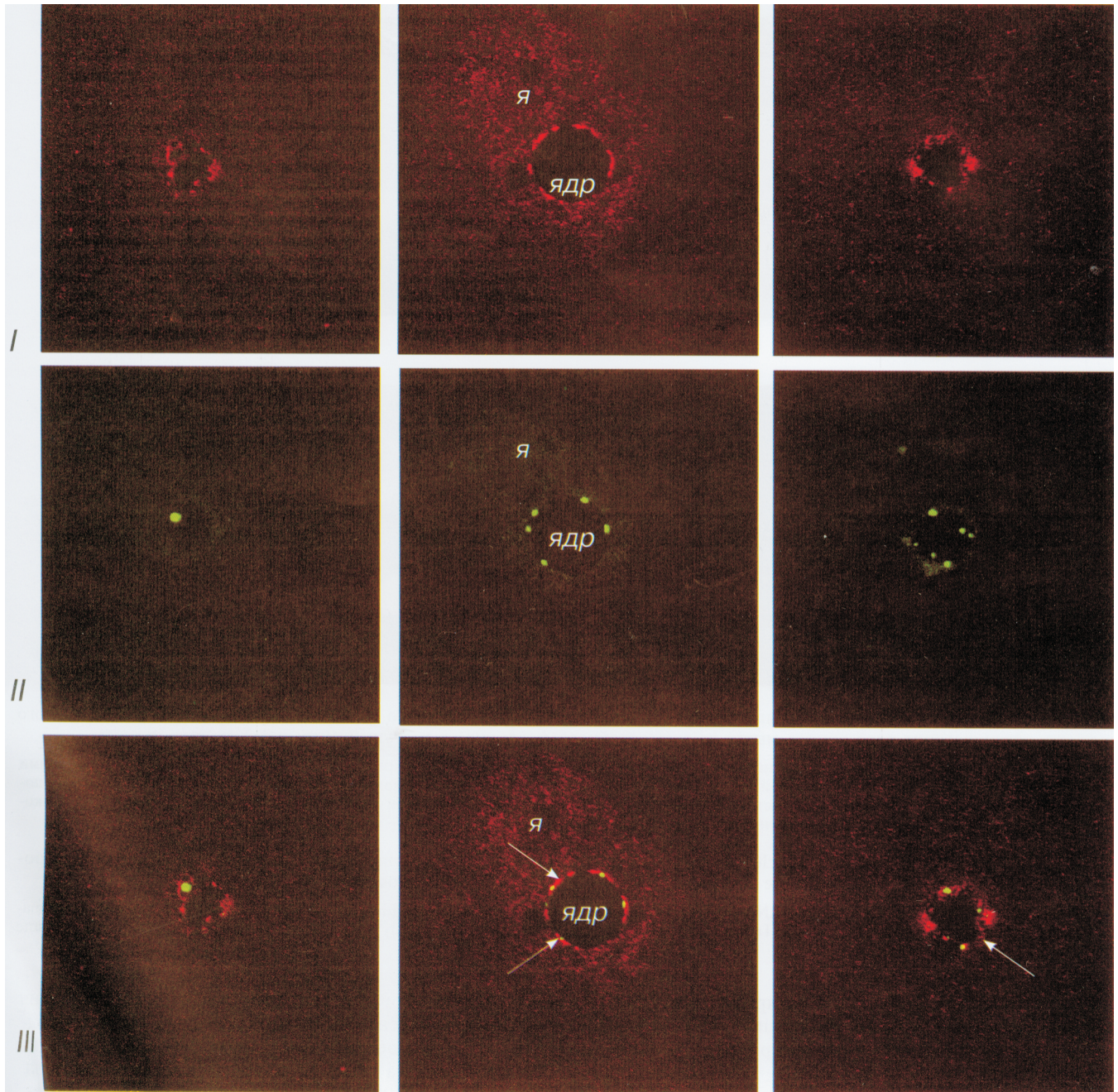


Рис. 9. Локализация пол I и коилина в ядрах ооцитов мыши из многослойных фолликулов. Двойная окраска антителами против пол I и коилина. Данные конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

I — коилин распределяется вокруг ядрышка в виде прерывистой оболочки; *II* — пол I выявляется внутри ядрышка в многочисленных мелких сферических образованиях; *III* — при совмещении изображений видно частичное перекрывание сигналов (стрелки). *я* — ядро ооцита, *ядр* — ядрышко. Об. 40×, ок. 10×.

Fig. 9. Double-immunostaining of an oocyte nucleus from a plurilaminar mouse follicle (early stages of antrum formation) with anti-coilin and anti-RNA polymerase I antibodies (confocal laser scanning microscopy).

I — staining with anti-coilin antibodies (red); *II* — staining with anti RNA polymerase I antibodies (green); *III* — merge of two images. *Arrows* — tight association between two proteins in close association with the nucleolus, and their occasional colocalization. Designations are the same as in Fig. 5. Ob. 40×, oc. 10×.

нии коилина в ядрышках ооцитов, теряющих синтетическую активность, соответствуют данным, полученным на инактивированных ядрышках. С другой стороны, на процессы накопления коилина в ядрышке или его транспорт через ядрышко, очевидно, существенное влияние оказывает статус фосфорилирования этого белка. В бу-

душем требуются эксперименты по анализу этого ключевого вопроса — уровня фосфорилирования коилина в ядрах ооцитов из антральных фолликулов на стадиях физиологически детерминированного ингибирования транскрипционных процессов. Ооциты мыши соответствующего периода оогенеза дают картины отчетливой

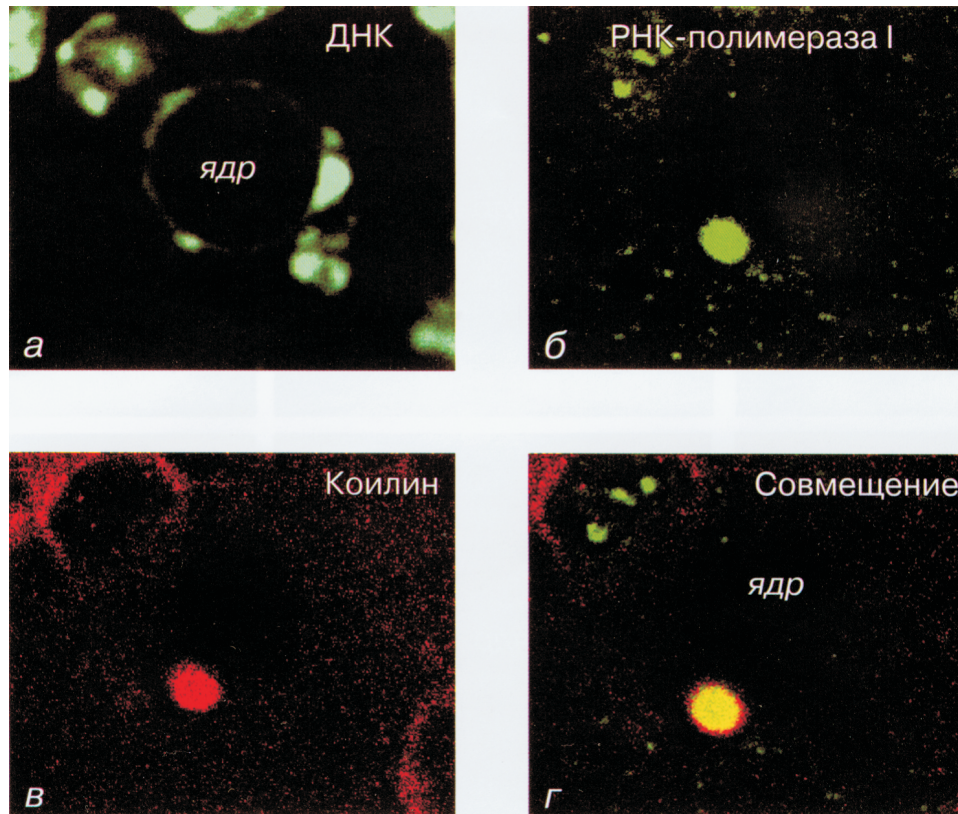


Рис. 10. Выявление пол I и коилина в ядрышках ооцитов мыши с помощью двойного окрашивания. Результаты конфокального сканирования ядра ооцита мыши из многослойного фолликула с растущей антральной полостью.

а — центральная часть ядра с ядрышком, окруженным кольцом конденсированного хроматина; окраска To-Pro-3. *б* — наряду с мелкими гранулами внутри ядрышка пол I содержится в одной крупной сфере, прилегающей к ядрышку. *в* — коилин выявляется в крупной сферической структуре, расположенной на поверхности ядрышка, небольшая часть сигнала сохраняется на его периферии. *г* — при совмещении двух изображений видна полная колокализация двух белков, преимущественно в районе единичной сферы. *ядр* — ядрышко. Об. 40×, ос. 10×.

Fig. 10. Double-immunostaining of oocyte nucleus from a plurilaminar mouse follicle (growing antrum) with anti-coilin and anti-RNA polymerase I antibodies (confocal laser scanning microscopy).

а — staining with To-Pro-3; *б* — staining with anti-RNA polymerase I antibodies (green); *в* — staining with anti-coilin antibodies (red); *г* — merge of two images. Note the total colocalization of RNA polymerase I and coilin, and their presence in a large spherical body adjacent to the nucleolus. Designations are the same as in Fig. 9. Ob. 40×, ос. 10×.

стадийности трансформации нуклеолярной структуры, вплоть до формирования вместо ядрышка сильно обогащенного коилином компактного фибриллярного ЯПТ (Parfenov et al., 2003).

Одним из существенных результатов представленной работы является документирование отчетливой колокализации коилина с пол I в ядрышках ооцитов на изучаемой стадии фолликулогенеза. На наш взгляд, это первая демонстрация на материале млекопитающих совместного распределения коилина и ведущего компонента транскрипции рДНК. В работах других исследователей нами не было найдено каких-либо сведений о подобной колокализации. Однако есть наблюдения, которые могут косвенно подтверждать наличие этой связи. Так, обнаружение пол I в ТК ооцитов *X. laevis* (Gall et al., 1999) может подразумевать колокализацию этого белка с коилином, присутствующим здесь же в большом количестве. Такие же выводы можно сделать и при рассмотрении данных по рекрутированию комплекса пол I с UBF — фактором транскрипции рДНК — в ТК в раннем эмбриогенезе мыши (Ferreira, Carmo-Fonseca, 1995). Поскольку зачастую пол I и UBF оперируют как единый комплекс, на возможность колокализации коилина с

пол I косвенно могут указывать и данные по ассоциации иммунофлуоресцентного сигнала коилина с UBF в ядрышковых предшественниках в определенных точках клеточного цикла у двухклеточных эмбрионов мыши (Zatsepina et al., 2003). С другой стороны, возможно, неактивный голоэнзим пол I, содержащийся в таких инактивированных ядрышках, провоцирует подобное перераспределение коилина в ядре. Картины расположения пол I в ядрышках ооцитов позволяют проследить некоторую последовательность событий, сопутствующих постепенному преобразованию ядрышка. Наличие мелких гранул или сфер, содержащих пол I, к которым с внешней стороны подходит коилин и окутывает ядрышко в виде оболочки, можно, на наш взгляд, считать одним из первых этапов взаимодействия этих белков (рис. 9). В ядре ооцита из фолликула с антрумом большого размера коилин и пол I колокализуются в одной довольно крупной сфере, находящейся либо на периферии ядрышка, либо в непосредственной близости от него (рис. 10). Какова динамика колокализации коилина с пол I в ядрышках ооцитов позднего оогенеза, каков ее функциональный смысл? Эти вопросы остаются открытыми и требуют дальнейших исследований.

Авторы признательны Е. В. Сабанеевой за предоставленные антитела против РНК-полимеразы I, полученные из лаборатории д-ра Р. Л. Очса (R. L. Ochs). Благодарим Ф. М. Баталову и Д. С. Боголюбова за полезное обсуждение и помощь в работе над рукописью и Ю. И. Гукину за техническую помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 03-04-49389) и грантом Президента РФ (НШ-1125.2006.4).

Список литературы

- Зыбина Е. В. 1971. Синтез РНК и белка в растущем ооците и фолликуле мыши. Цитология. 13 : 768—775.
- Зыбина Е. В., Грищенко Т. А., Семенов В. М. 1984. Ультраструктура фибриллярного центра в ядрышках ооцитов на стадии диплономы у золотистого хомячка. Цитология. 26 : 1246—1249.
- Зыбина Е. В., Зыбина Т. Г. 1992. Изменение взаимного расположения хромосом и ядрышка в развивающихся ооцитах млекопитающих в ходе профазы I мейоза в связи с изменением функционального состояния ооцитов. Цитология. 34 : 3—23.
- Andrade L. E. S., Chan E. K. L., Raška I., Publes C. L., Rosos G., Tan E. M. 1993. 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.
- Antoine N., Lepoint A., Baekeland E., Goessens G. 1987. Evolution of the rat oocytes nucleus during follicular growth. Biol. Cell. 59 : 107—112.
- Antoine N., Lepoint A., Baekeland E., Goessens G. 1987. Ultrastructural cytochemistry of the nucleolus in rat oocytes at the end of the folliculogenesis. Histochemistry. 89 : 221—226.
- Bellini M. 2000. Coilin more than a molecular marker of the Cajal (coiled) body. BioEssay. 22 : 861—867.
- Bohmann K., Ferreira J. A., Lamond A. 1995. Mutational analysis of p-80 coilin indicates a functional interaction between coiled bodies and the nucleolus. J. Cell Biol. 131 : 817—831.
- Carmo-Fonseca M., Ferreira J., Lamond A. J. 1992a. Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis — evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. J. Cell Biol. 120 : 841—852.
- Carmo-Fonseca M., Pepperkok R., Carvalho M. T., Lamond A. J. 1992b. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs in coiled bodies. J. Cell Biol. 117 : 1—14.
- Chouinard L. M. 1971. A light- and electron-microscopic study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. J. Cell Sci. 9 : 637—663.
- Chouinard L. M. 1973. An electron microscopic study of the extranucleolar bodies during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. J. Cell Sci. 12 : 55—69.
- Chouinard L. A. 1975. A light- and electron-microscopic study of the oocyte nucleus during development of the antral follicle in the prepubertal mouse. J. Cell Sci. 17 : 589—600.
- Crozet N., Kanka J., Motlik J., Fulka J. 1986. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. Gamete Res. 14 : 65—73.
- Crozet N., Motlik J., Szollosi D. 1981. Nucleolar fine structure and RNA synthesis of porcine oocytes during the early stages of antrum formation. Biol. Cell. 41 : 35—42.
- Ferreira J. M., Carmo-Fonseca M. 1995. The biogenesis of the coiled body during early mouse development. Development. 121 : 601—612.
- Gall J. G. 2000. Cajal bodies: the first 100 years. Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 16 : 273—300.
- Gall J., Bellini M., Wu Z. C. 1999. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. Mol. Biol. Cell. 10 : 4385—4402.
- Hulsebos T., Hackstein J., Henning W. 1984. Lampbrush loop-specific protein of *Drosophila hydei*. PNAS USA 16 : 9415—9429.
- Kaplan G., Abren S. I., Bachvarova R. 1982. r-RNA accumulation and protein synthetic patterns in growing mouse oocytes. J. Exp. Zool. 220 : 361—370.
- Kopečný V., Landa V., Malatesta M., Martin T. E., Fakan S. 1996. Immunoelectron microscope analysis of rat germinal vesicle-stage oocyte nucleolus-like bodies. Reprod. Nutr. Develop. 36 : 667—679.
- Kopečný V., Landa V., Pavlok A. 1995. Localization of nucleic acids in the nucleoli of oocytes and early embryos of mouse and hamster. An autoradiographic study. Mol. Reprod. Develop. 41 : 449—458.
- Lyon C., Bothmann K., Sleeman J., Lamond A. 1997. Inhibition of protein dephosphorylation results in the accumulation of splicing snRNPs and coiled bodies within the nucleolus. Exp. Cell Res. 230 : 84—93.
- Malatesta M., Zancanaro C., Martin T. E., Chan E. K. L., Amaric F., Lührmann B., Vogel P., Fakan S. 1994. Cytochemical and immunocytochemical characterization of nuclear bodies during hibernation. Eur. J. Cell Biol. 65 : 82—93.
- Mirre C., Stahl A. 1981. Ultrastructural organization, sites of transcription and distribution of fibrillar centers in nucleus in mouse oocyte. J. Cell Sci. 48 : 105—126.
- Moore G. P. M., Linten-Moore S., Peters H., Faber M. 1974. RNA synthesis in the mouse oocyte. J. Cell Biol. 60 : 416—422.
- Ochs R. L., Lischwe M. A., Spohn W. H., Busch Y. 1985. Fibrillar: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. Biol. Cell. 54 : 123—134.
- Ochs R. L., Stein T. W., Tan E. M. 1994. Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells. J. Cell Sci. 107 : 385—399.
- Oggs S. C., Lamond A. 2002. Cajal bodies and coilin — moving towards function. J. Cell Biol. 113 : 17—21.
- Palombi F., Stefanini M. 1974. Ultrastructural analysis of nucleolar evolution in the rat primary oocyte. J. Ultrastruct. Res. 47 : 61—73.
- Parfenov V., Davis D., Pochukalina G., Kostyuchek D., Murti K. 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 factoring transcriptionally active and inactive mouse oocytes and its relation to RNA polymerase II and splicing factors. J. Cell. Biochem. 89 : 720—732.
- Parfenov V., Pochukalina G., Dudina L., Kostyuchek D., Gruzova M. 1989. Human antral follicles: oocyte nucleus and karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data). Gamete Res. 22 : 219—231.
- Sleeman J., Lyon C., Platani M., Kreivi J.-P., Lamond A. 1998. Dynamics interactions between splicing snRNPs, coiled bodies and nucleoli revealed using snRNP protein fusion to the green fluorescent protein. Exp. Cell Res. 243 : 290—304.
- Takeuchi I. K. 1984. Electron-microscopic study of silver staining of nucleoli in growing oocytes of rat ovaries. Cell Tissue Res. 236 : 249—255.
- Tesarik J., Kopečný V., Kurilo L. F. 1984. Pre-ovulatory RNA synthesis in human oocytes of large antral follicles. Histochem. J. 16 : 438—440.
- Wu Z., Murphy C., Gall J. C. 1994. Human p-80 coilin is targeted to sphere organelles in the amphibian germinal vesicle. Mol. Biol. Cell. 5 : 1119—1127.
- Zatsepina O., Baly C., Chebrou M., Debey P. 2003. The stepwise assembly of a functional nucleolus in preimplantation mouse embryos involves the Cajal (coiled) body. Develop. Biol. 253 : 66—83.
- Zatsepina O. V., Bouniol-Baly C., Amirand C., Debey P. 2000. Functional and molecular reorganization of the nucleolar apparatus in maturing mouse oocytes. Develop. Biol. 223 : 354—370.

THE NUCLEOLUS IN OOCYTES OF MULTILAYER MOUSE FOLLICLES:
TOPOGRAPHY OF FIBRILLARIN, RNA POLYMERASE I AND COILIN*G. N. Pochukalina, V. N. Parfenov*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: galina@mail.cytspb.rssi.ru

By electron microscopy, conventional fluorescence and confocal microscopy, some features of structural and molecular organization of the nucleolus in oocyte nucleus from mouse multilayer follicles were examined. The examined nucleolus lacks almost all characteristic nucleolar components, such as fibrillar centers, dense fibrillar and granular components. This nucleolus consists exclusively of a homogenous filamentous material and is penetrated by numerous interstices. Besides, a striking association of the nucleolus with coilin, a marker of Cajal bodies, was observed. We could map the coilin accumulation in three different areas: around, in the periphery, or inside the nucleolus. Additionally, we examined a topological relationship between coilin and two key proteins of nucleolar transcription-processing machinery, RNA polymerase I and fibrillarin. RNA polymerase I rather than fibrillarin was found to be colocalized with coilin. Finally, we propose that data on dynamics of coilin relation with the nucleolus may elucidate a possible role of coilin in functional relationship between the nucleolus and Cajal bodies.
