

**ТЕЛЬЦА КАХАЛА В ООЦИТАХ НАСЕКОМЫХ.
II. НОВЫЕ ДАННЫЕ ПО МОЛЕКУЛЯРНОМУ СОСТАВУ
ТЕЛЕЦ КАХАЛА ООЦИТОВ ДОМОВОГО СВЕРЧКА.
К ВОПРОСУ О ВЗАИМОСВЯЗИ ТЕЛЕЦ КАХАЛА И КЛАСТЕРОВ
ИНТЕРХРОМАТИНОВЫХ ГРАНУЛ**

© *И. С. Степанова, Д. С. Боголюбов,¹ В. Н. Парфенов*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ *электронный адрес: dmitr@cytspb.rssi.ru*

Тельца Кахала (ТК) ооцитов домового сверчка *Acheta domesticus* — крупные ядерные органеллы правильной сферической формы, имеющие сложную внутреннюю организацию. Они состоят из фибриллярного коилинсодержащего матрикса и центральной полости, содержащей заметную фиброгранулярную структуру, идентифицированную нами как «внутренний» кластер интерхроматинных гранул (КИГ). В матриксе ТК были локализованы белки-коактиваторы транскрипции СВР/p300 и ТАТА-связывающий белок (ТВР). РНК-полимераза II в составе ТК не была выявлена как в норме, так и после обработки ооцитов актиномицином D. Кроме ТК в нуклеоплазме ооцитов *A. domesticus* присутствуют немногочисленные свободные КИГ. Обнаружено, что обработка актиномицином D приводит к значительному увеличению количества «свободных» КИГ в нуклеоплазме и сегрегации фибриллярного и гранулярного материала в составе КИГ. В составе фибриллярных зон КИГ ооцитов, обработанных актиномицином D, были выявлены РНК-полимераза II и белки СВР/p300.

Ключевые слова. насекомое, ядро ооцита, тельца Кахала, кластеры интерхроматинных гранул, конфокальная и иммуноэлектронная микроскопия, актиномицин D.

Принятые сокращения: КИГ — кластер интерхроматинных гранул, мяРNP — малые ядерные РNP, Пол II — РНК-полимераза II, ТК — тельца Кахала, СВР — CREB-связывающий белок (CREB-binding protein), СТD — С-концевой домен большой субъединицы РНК-полимеразы II, DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндол, DRB — 5,6-дихлор-1-β-D-рибофуранозилбензимидазол, mAb — моноклональные антитела, ТВР — ТАТА-связывающий белок (ТАТА-box binding protein).

Ядро эукариотической клетки в морфологическом плане включает в себя три области: хроматин (хромосомные территории), ядрышки и интерхроматинное пространство (Raška et al., 1992). Современные представления об интерхроматинном пространстве как о сложноструктурированной области клеточного ядра, содержащей различные структурно-функциональные компартменты, или домены (см. обзоры: Spector, 1993, 2001; Lamond, Earnshaw, 1998; Matera, 1999; Dundr, Misteli, 2001), были заложены работами Моннерона и Бернара (Bernhard, 1969; Monneron, Bernhard, 1969), разработавшими метод селективного выявления РNP-содержащих структур на ультратонких срезах и описавшими ряд экстрахромосомных доменов интерхроматинной области ядра на ультраструктурном уровне. К настоящему времени известно около десятка различных экстрахромосомных доменов, в совокупности называемых «ядерные тельца» (nuclear bodies) (Brasch, Ochs, 1992).

На роль универсальных доменов, обнаруживаемых в интерхроматинном пространстве ядер большинства клеточных типов, претендуют кластеры интерхроматинных гранул (КИГ) и тельца Кахала (ТК) (Gall, 2003). Данные многочисленных исследований свидетельствуют

о том, что различные ядерные домены (например, КИГ и ТК, ТК и ядрышки и т. д.) находятся между собой в тесном функциональном, а нередко и структурном единстве (Malatesta et al., 1994; Gall et al., 1995, 1999; Dundr, Misteli, 2001; Leung et al., 2003).

В последние годы благодаря развитию новых методов молекулярной и клеточной биологии, в особенности иммуноморфологии и методов, связанных с возможностью изучения динамики макромолекул в реальном времени на живых клетках, достигнут определенный прогресс в понимании функций ТК и КИГ (Misteli, 2001; Carmo-Fonseca, 2002; Ogg, Lamond, 2002; Lamond, Spector, 2003; Handwerker, Gall, 2006). Вообще говоря, можно считать установленным, что ТК и КИГ играют ключевую роль в ядерном биоогенезе различных типов РНК.

Основная функция КИГ, очевидно, состоит в сборке, модификации, временном хранении и рециклировании прежде всего факторов сплайсинга пре-мРНК — сплайсосомных малых ядерных (мя) РNP и SR-белков, например белка SC35 (Spector et al., 1991; Spector, 1993; Misteli, Spector, 1998; Misteli, 2000). При этом регуляция рекрутирования факторов сплайсинга из КИГ к местам транскрипции и обратно обеспечивается циклами фос-

форилирования и дефосфорилирования входящих в КИГ белков (Misteli, 2000). Само же накопление факторов сплайсинга в участках транскрипции напрямую зависит от С-концевого домена (CTD) большой субъединицы РНК-полимеразы II (Пол II) (Du, Warren, 1997; Kim et al., 1997; Misteli, Spector, 1999).

Недавно стали накапливаться сведения о том, что КИГ представляют собой не только пассивные резервуары факторов сплайсинга, но играют активную роль, непосредственно связанную с регуляцией экспрессии генов. По мнению некоторых авторов (Sacco-Bubulya, Spector, 2002), именно КИГ обеспечивают сопряжение транскрипции и сплайсинга. Кроме того, были сделаны неожиданные выводы, указывающие на возможность прямого участия КИГ в процессинге и транспорте мРНК (Miralles et al., 2000; Melčák et al., 2001; Shopland et al., 2002; Molenaar et al., 2004), что возвращает исследователей к высказанному ранее предположению (Johnson et al., 2000) о прямой роли КИГ в контроле корректного сплайсинга и приобретения мРНК компетентности к экспорту.

Вопрос о возможных функциях других универсальных ядерных доменов — телец Кахала (ТК), как и о функциях КИГ, в настоящее время широко дискутируется в литературе (см. обзоры: Gall, 2000, 2001; Carmo-Fonseca, 2002; Ogg, Lamond, 2002; Ciocce, Lamond, 2005). Существуют три взаимодополняющие точки зрения относительно этих функций (Dundr, Misteli, 2001).

В известных случаях ТК, по-видимому, могут непосредственно участвовать в регуляции экспрессии генов, располагаясь в тесной связи с определенными генными локусами. Это может проявляться в связи ТК с tandemными повторами гистоновых генов на ламповых щетках ооцитов амфибий (Callan et al., 1991) или генов, кодирующих ряд малых ядерных (включая ядрышковые) РНК в соматических клетках млекопитающих (Freu, Matera, 1995; Gao et al., 1997; Schul et al., 1998; Jacobs et al., 1999).

Согласно другой модели, основная функция ТК — участие в различных этапах биогенеза мРНК (Matera, 1999). В ТК происходят псевдоуридинилирование и специфическое 2'-О-метилирование участвующих в сплайсинге U1, U2, U4 и U5 мРНК (Darzacq et al., 2002; Jády et al., 2003), без чего невозможны правильная сборка сплайсосом и протекание реакций сплайсинга (Yu et al., 1998). Эти этапы процессинга сплайсосомных мРНК осуществляются при участии недавно открытого особого класса так называемых ТК-специфичных малых РНК (Darzacq et al., 2002). Показано, что основные этапы посттранскрипционного процессинга малых ядрышковых РНК (в том числе U3 мРНК) также осуществляются в ТК (Verheggen et al., 2002).

Наконец, существуют представления о ТК как о месте сборки макромолекулярных комплексов, обеспечивающих процессы транскрипции и процессинга РНК (Gall, 2001; Ogg, Lamond, 2002). Для ооцитов *Xenopus laevis* была предложена модель функционирования ТК, согласно которой в них происходит первичная ассоциация РНК-полимераз и специфических факторов транскрипции и процессинга, которые затем перераспределяются к соответствующим генам в зоны активного хроматина (Gall et al., 1999; Gall, 2000, 2001).

Главным аргументом в пользу данной гипотезы является обнаружение в составе ТК ооцитов *Xenopus* всех трех РНК-полимераз и многих факторов транскрипции и процессинга соответствующих РНК (Gall et al., 1999;

Morgan et al., 2000; Doyle et al., 2002; Murphy et al., 2002). Возникает вопрос о том, насколько данная модель применима к ТК других типов клеток, в том числе ооцитам других животных. Следует подчеркнуть, что решение вопроса о функциях ТК в ооцитах вызывает определенные трудности, связанные с большой гетерогенностью этих структур и слабой изученностью их организации и молекулярного состава. Сказанное полностью относится и к ооцитам насекомых (подробнее см. раздел «Обсуждение»).

Имеющиеся в литературе сравнительно немногочисленные данные по ультраструктурной иммулолокализации компонентов ТК в ядрах ооцитов насекомых (Bogolyubov et al., 2000; Bogolyubov, Parfenov, 2001; Jaglarz, 2001; Biliński, Kloc, 2002; Боголюбов, 2003; Баталова и др., 2005; Batalova et al., 2005; Jaglarz et al., 2005; Stepanova et al., 2006) свидетельствуют о том, что ТК в ооцитах разных видов насекомых представляют собой чрезвычайно гетерогенную популяцию ядерных телец, заметно различающихся по размерам, количеству в ядре, ультраструктурной организации, соотношению различных структурных компонентов на разных стадиях оогенеза, а в ряде случаев — и по молекулярному составу.

В ооцитах домового сверчка *Acheta domesticus* ТК представляют собой крупные (до 30 мкм в диаметре) тонкофибриллярные образования правильной сферической формы, приобретающие в ходе роста ооцита сложную внутреннюю организацию. В предыдущей работе (Stepanova et al., 2006), проведя анализ связывания с ядерными структурами ооцитов меченной флуоресцеином U7 мРНК после ее инъекции в ооплазму, мы окончательно подтвердили природу этих образований как ТК (см. раздел «Обсуждение»).

В этой же работе мы впервые идентифицировали КИГ в ядрах ооцитов *A. domesticus* и исследовали ультраструктурную организацию и молекулярный состав КИГ и ТК. В ходе этих исследований мы столкнулись с фактом отсутствия в составе ТК ооцитов сверчка заметных количеств Пол II, которую можно было бы выявить с помощью иммуноцитохимических методов. Такая же ситуация наблюдалась и в ооцитах, предварительно обработанных DRB в качестве ингибитора транскрипции; при этом Пол II выявлялась не в ТК, а в фибриллярных зонах, ассоциированных с КИГ (Stepanova et al., 2006).

В настоящей работе для проверки полученных ранее результатов мы использовали другой ингибитор транскрипции — актиномицин D, обладающий по сравнению с DRB иным механизмом действия, и получили сходные результаты. Кроме того, мы решили проверить, присутствуют ли в составе ТК другие компоненты Пол II-транскрипции. В настоящей работе мы использовали антитела к белкам-коактиваторам транскрипции СВР/p300 и ТАТА-связывающему белку (ТВР), являющемуся компонентом базального фактора транскрипции TFIID. С помощью иммуноэлектронной микроскопии мы обнаружили, что, несмотря на отсутствие заметных количеств Пол II в ТК ооцитов сверчка, они обогащены белками СВР/p300 и ТВР.

Материал и методика

Объектом исследования служили ядра диплотенных ооцитов домового сверчка *Acheta domesticus* (L.) (Orthoptera: Gryllidae). Животных содержали в лаборатор-

ных условиях при 27—30 °С. В работе были использованы нимфы последних возрастов и молодые имаго. Яичники препарировали в физиологическом растворе Рингера для насекомых, содержащем 0.75 % NaCl, 0.035 % KCl и 0.021 % CaCl₂.

Для светооптической микроскопии готовили давленные препараты изолированных яйцевых трубок (овариол) по известной методике (Hulsebos et al., 1984). Часть нефиксированных препаратов просматривали с помощью микроскопа Leica DM IRB, оснащенного оптикой по Номарскому. Для исследования состояния хромосомного аппарата в нефиксированных ядрах в раствор Рингера при приготовлении препаратов добавляли 4',6-диамино-2-фенилиндола (DAPI) в концентрации 1 мкг/мл и полученные препараты просматривали с помощью люминесцентного микроскопа Axioskop (Kar Zeiss).

Для непрямого иммунофлуоресцентного исследования давленные препараты овариол фиксировали и обрабатывали антителами, как описано ранее (Боголюбов, 2003).

В качестве первых антител использовали мышинные моноклональные антитела (mAb) K121 к триметилгуанозинному кэпу мРНК (Krainer, 1988) в концентрации 1 мкг/мл, любезно предоставленные Дж. Г. Голлом (J. G. Gall, Carnegie Institute of Washington, Baltimore, USA), mAb αSC35 к белку SC35 — фактору сплайсинга отличной от мРНКП природы (Fu, Maniatis, 1990) в концентрации 5 мкг/мл (любезно предоставлены Дж. Г. Голлом), mAb 72B9 к фибрилларину (Reimer et al., 1987) — любезно предоставлены Дж. Г. Голлом, mAb 8WG16 к нефосфорилированному CTD Пол II (Thompson et al., 1989) при разведении 1 : 400 — любезно предоставлены К. Г. Мурти (K. Murti, St. Jude Research Hospital, Memphis, USA), а также следующие кроличьи поликлональные сыворотки: R288 к С-концевому домену (14 кДа) коиллина р80 человека (Andrade et al., 1991) при разведении 1 : 800 — любезно предоставлены Е. К. Л. Чаном (E. K. L. Chan, Scripps Research Institute, La Jolla, UDA), антитела N-15 к N-концевому домену белка р300 человека (Santa Cruz Biotechnology, Inc) при разведении 1 : 50 и антителами SI-1 к полноразмерному белку TBP человека (Santa Cruz Biotechnology, Inc) при разведении 1 : 50.

В качестве вторых антител использовали козы анти-тела против иммуноглобулинов мыши или кролика, конъюгированные с флуорохромом FITC (Sigma) или Alexa 594 (Molecular Probes), при разведении 1 : 200. Для контроля специфичности связывания антител использовали препараты, обработанные только вторыми антителами или преиммунной кроличьей сывороткой.

После обработки антителами и отмывки в однократном (1×) фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) препараты для выявления ДНК дополнительно инкубировали в течение 2—3 мин в 1× PBS, содержащем 1 мкг/мл флуорохрома To-Pro-3 (Molecular Probes), затем отмывали в 1× PBS и заключали в среду Vectashield® (Vector Laboratories, США).

Полученные препараты использовали для анализа с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии в соответствии с имеющимися рекомендациями (Штейн, 2004). Для просмотра препаратов использовали конфокальный микроскоп Leica TCS SL, оборудованный аргонным (488 нм) и гелий-неоновыми (543 и 633 нм) лазерами. Поскольку были использованы флуорохромы FITC (зеленая флуоресценция, максимум спектра испускания 518 нм), Alexa 594 (красная флуоресценция, мак-

симум спектра испускания 616 нм) и To-Pro-3 (темнокрасная флуоресценция, максимум спектра испускания 661 нм), для предотвращения возможного перекрытия спектров флуоресценции красителей использовали последовательное сканирование по каждому каналу, предварительно осуществляя корректировку спектральных каналов, а затем совмещали полученные изображения с помощью специальной компьютерной программы (Leica Confocal Software). Для флуорохрома To-Pro-3, кроме того, применяли искусственный синий или бирюзовый цвет, чтобы отличить сигнал этого флуорохрома от флуоресценции Alexa 594, спектр испускания которого также находится в красном диапазоне.

Подготовку материала для иммуноэлектронной микроскопии и ее проведение осуществляли в соответствии с протоколом, представленным ранее (Боголюбов, 2003).

В экспериментах по искусственному подавлению транскрипции использовали актиномицин D (Fluka). Изолированные в физиологическом растворе яйцевые трубки помещали в среду Грейса для насекомых (Sigma), содержащую 100 мкг/мл актиномицина D, и инкубировали в течение ночи во влажной камере при комнатной температуре. Концентрация ингибитора была выбрана в соответствии с имеющимися данными (Perry, Kelley, 1970) так, чтобы заблокировать транскрипцию, осуществляемую всеми тремя РНК-полимеразами. В качестве контрольных использовали препараты овариол, проинкубированных в тех же условиях, но без добавления ингибиторов в среду.

Результаты

Парные женские гонады домового сверчка *Acheta domestica* представлены яйцевыми трубками (овариолами) паноистического типа, в которых ооциты, находящиеся на последовательных стадиях роста, окружены только фолликулярным эпителием (рис. 1). Опираясь на собственные наблюдения, а также на имеющиеся работы других авторов (Kunz, 1967; Jaworska, Lima-de-Faria, 1973), мы разделили период роста ооцитов (длительную диплотену профазы I мейоза), в котором находится большинство ооцитов овариолы, на три последовательные стадии (рис. 1). Критериями для выделения каждой стадии служили состояние хромосомно-ядрышкового аппарата, а также количество и внутренняя организация телец Кахала (ТК).

В ооцитах I стадии (рис. 1; 2, а) относительно крупные ядра сферической формы занимают центральное положение. Хромосомы равномерно распределены по ядру. Ядрышки собраны в виде одной или двух крупных, довольно компактных масс. В ядре присутствует несколько (до 6 на ядро) относительно мелких (около 2—4 мкм в диаметре) ТК. Отметим, что, кроме ТК, никакие другие экстрахромосомные структуры невозможно отличить от ядрышек на светооптическом уровне на всех исследованных стадиях.

На препаратах ядер, окрашенных флуоресцентным красителем To-Pro-3, хромосомы имеют вид длинных тонких нитей, образующих в ядре интенсивно флуоресцирующую сеть. На данной стадии хорошо выражен так называемый большой хромомер, представляющий собой результат амплификации рДНК 6-й хромосомы (Jaworska, Lima-de-Faria, 1973) (рис. 5, в, III). Вокруг него наблюдается агрегация большей части ядрышек, в непо-

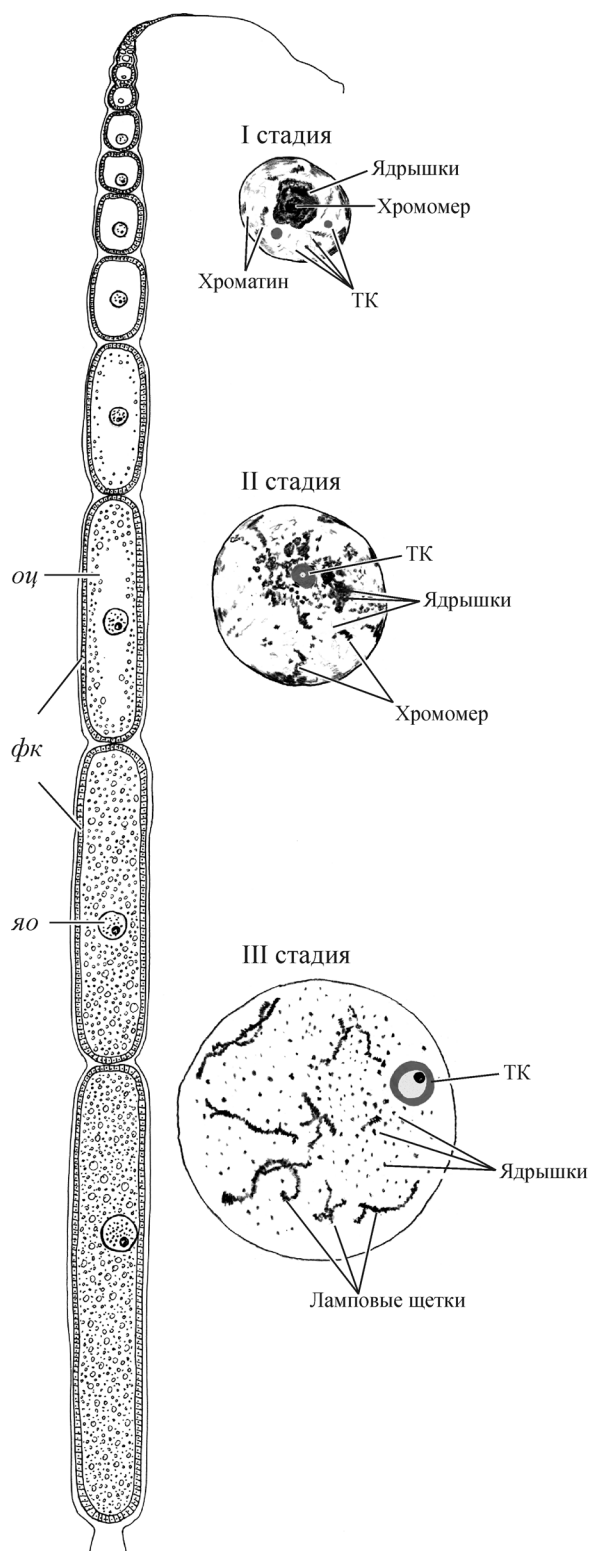


Рис. 1. Организация яйцевой трубки *Acheta domestica* и морфодинамика ядерных структур ооцитов.

ТК — тельце Кахала, оц — ооцит, фк — фолликулярные клетки, яо — ядро ооцита. Объяснения см. в тексте.

средственной близости от которых, как правило, располагаются ТК (рис. 1; 2, а).

В ядрах ооцитов II стадии (рис. 1; 2, б) хромосомы по-прежнему распределены по всему объему ядра. При

окраске препаратов То-Pro-3 в ядрах все еще различим хромомер, который на этой стадии значительно уменьшается в размерах (рис. 7, а II). Нуклеолярные массы фрагментируются, а ядрышки неравномерно распределяются по нуклеоплазме (рис. 1; 2, б). Количество ТК в ядре уменьшается, и к концу II стадии обнаруживается, как правило, единственное ТК. На данной стадии ТК могут иметь как однородную организацию, подобно таковой на I стадии, так и усложненную внутреннюю структуру (см. ниже).

На III стадии ядро ооцита расположено эксцентрично. Хромосомы, имеющие на данной стадии вид ламповых щеток, по-прежнему распределены по всему ядру, при этом отдельные биваленты очень хорошо различимы по сравнению с предыдущей стадией (рис. 1; 2, в, г). Хромомер на данной стадии более не обнаруживается. На III стадии в ядрах ооцитов всегда присутствует лишь одиночное крупное (до 30 мкм в диаметре) ТК, которое имеет сложную внутреннюю организацию (рис. 1; 2, в).

Ультраструктурные особенности ТК ооцитов *A. domestica* уже охарактеризованы (Bier et al., 1967; Filek et al., 2002; Stepanova et al., 2006). На I и в начале II стадии ТК представляют собой тонкофибриллярные образования. Анализ серийных ультратонких срезов показал, что в конце II и на III стадии ТК включает в себя три основные области: 1) тонкофибриллярный матрикс (толщина фибрилл около 5 нм); 2) обширную центральную полость, содержимое которой по ультраструктуре заметно отличается от остальной нуклеоплазмы; 3) заметное фиброгранулярное образование (размер гранул около 35—45 нм), расположенное в центральной полости эксцентрично и обычно примыкающее к матриксу. Последняя структура представляет собой «внутренний» КИГ (см. раздел «Обсуждение»). Схематически организация и морфодинамика ТК представлены на рис. 3.

Помимо КИГ, находящегося внутри ТК, в нуклеоплазме ооцитов *A. domestica* присутствуют немногочисленные (от 0 до 5 на ядро) «свободные» КИГ размером от 0.5 до 3.0 мкм. Кроме гранул диаметром 35—45 нм в составе КИГ выявляются области, образованные тонкофибриллярным материалом.

Иммунморфологическая характеристика ТК ооцитов *A. domestica* с помощью конфокальной и иммуноэлектронной микроскопии с использованием серии антител к мяРНКП, белку SC35, коилину и Пол II была проведена нами ранее (Stepanova et al., 2006). В настоящей работе мы дополнительно сосредоточились на иммуноэлектронной характеристике ТК с помощью антител к белкам-коактиваторам транскрипции СВР/p300 и белку ТВР — компоненту базального фактора транскрипции TFIID.

Анализ ультратонких срезов ТК после обработки их с помощью соответствующих антител выявил равномерное и весьма интенсивное мечение матрикса ТК (рис. 4, а—г). Материал, расположенный в центральной полости, включая «внутренний» КИГ, практически не метился с помощью этих антител (рис. 4, в). Слабое по интенсивности мечение характеризовало фибриллярные зоны в составе «свободных» КИГ в нуклеоплазме (фотографии не представлены).

В настоящей работе мы исследовали также характер иммуноцитохимического мечения ТК и КИГ в условиях действия актиномицина D как ингибитора транскрипции. Отметим, что обработка ооцитов актиномицином D не влияла на распределение в ядре коилина: как и в нор-

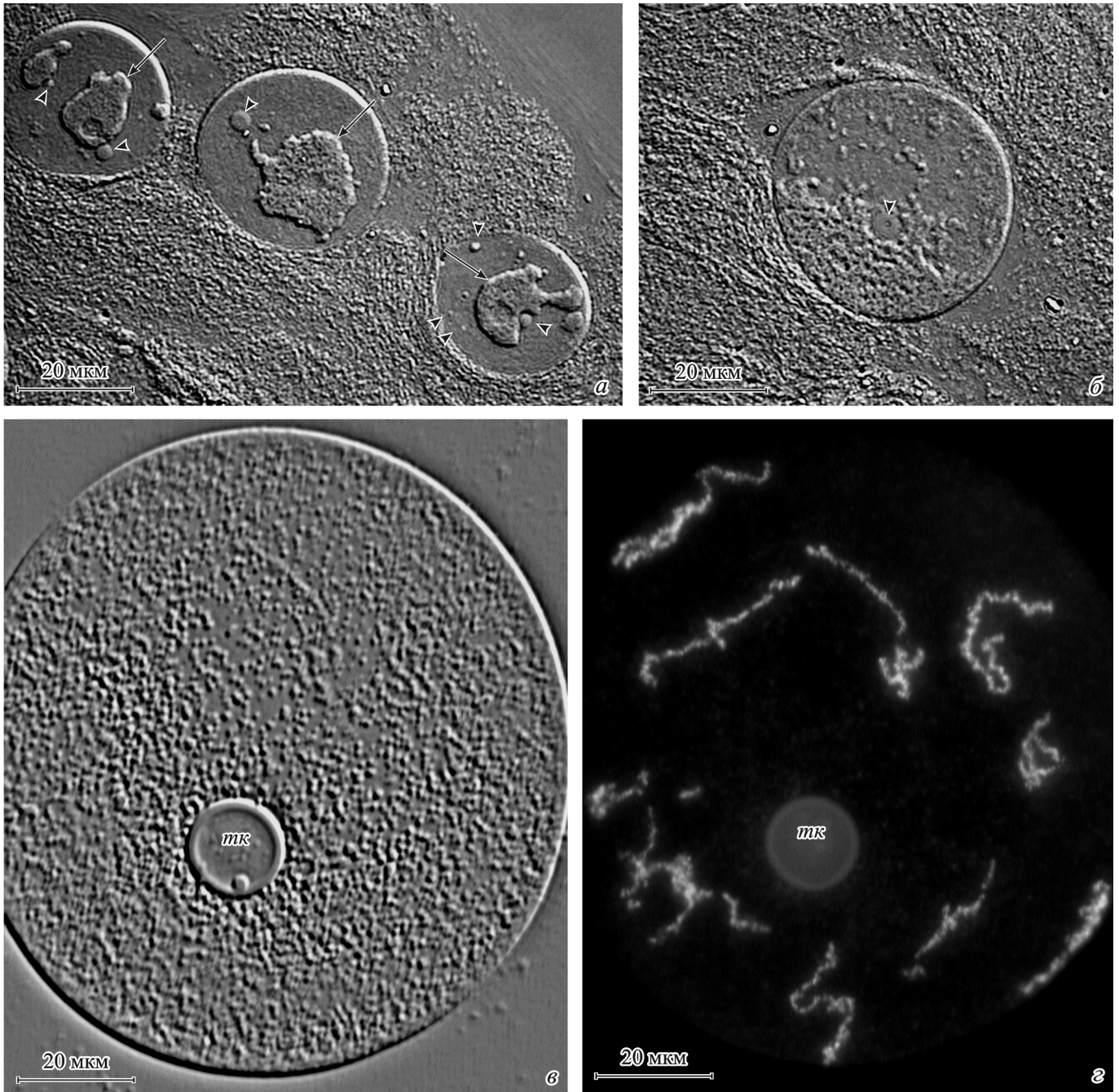


Рис. 2. Изолированные ядра диплотиновых ооцитов I (а), II (б) и III (в, з) стадий.

а–в — оптика по Номарскому; з — то же ядро, что и на в, окрашенное DAPI. В ядрах ооцитов III стадии хорошо видны хромосомы типа ламповых щеток. тк и головки стрелок — тельца Кахала, стрелки — нуклеолярные массы.

ме, антитела к коилину всегда метили только матрикс ТК (рис. 5, II). Поэтому оказалось удобным использовать антитела к коилину совместно с другими антителами для четкой идентификации ТК.

При использовании антител к триметилгуанозинному кэпу мРНК (mAb K121) и белку SC35 в ядрах ооцитов, обработанных актиномицином D, обнаружено появление в нуклеоплазме многочисленных светящихся доменов (конфокальная микроскопия), которые иногда были расположены в непосредственном контакте с ТК (рис. 5, б, з, д). Сравнение данных иммуноэлектронной микроскопии показало, что эти домены, по-видимому,

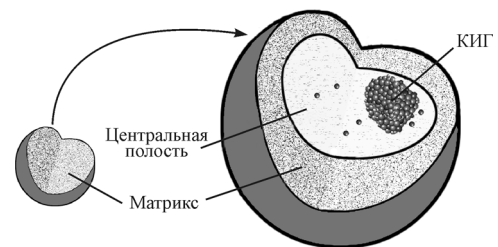


Рис. 3. Схема организации и морфодинамики телец Кахала в ядрах ооцитов *Acheta domesticus*.

КИГ — «внутренний» кластер интерхроматиновых гранул.

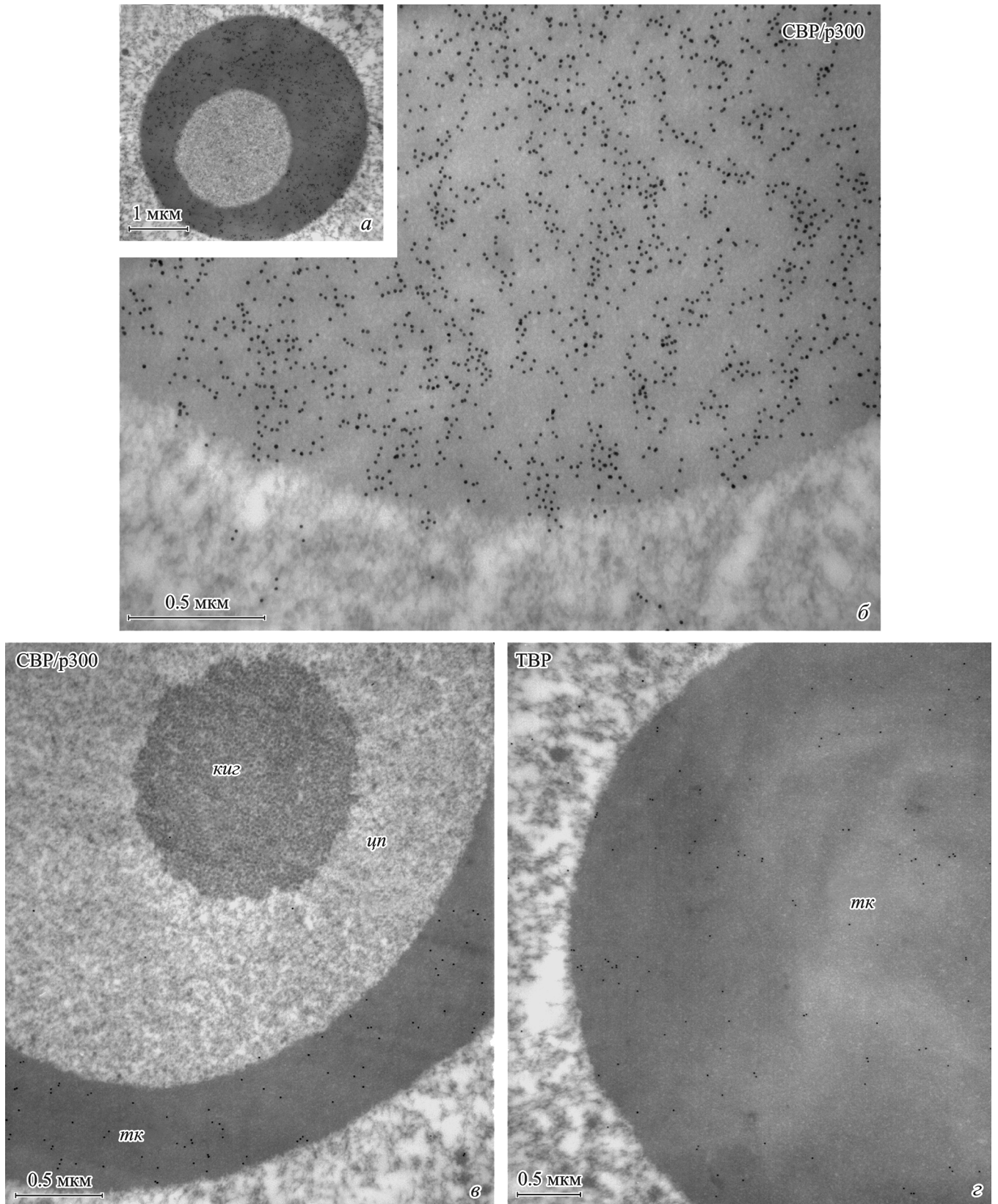


Рис. 4. Тельца Кахала ооцитов *Acheta domestica* после обработки ультратонких срезов антителами к белкам CBP/p300 (а–в) и TBP (д).

а — общий вид тельца Кахала с полостью; б, в — фрагменты гомогенных телец Кахала; в — фрагмент тельца Кахала (mk) с центральной полостью (cn), содержащей кластер интерхроматиновых гранул (kig). Интенсивно метится матрикс телец Кахала; «внутренний» кластер интерхроматиновых гранул остается немеченым.

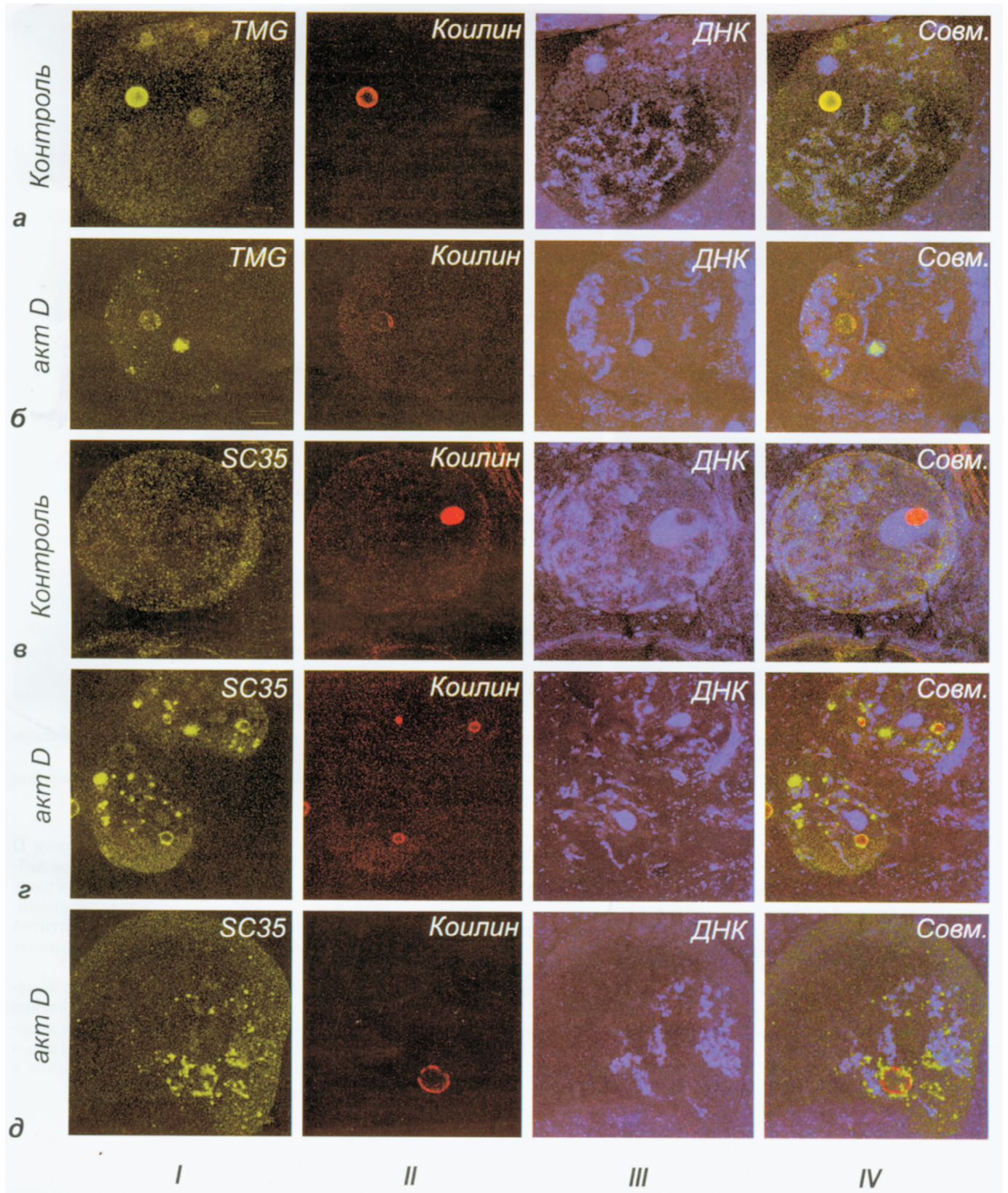


Рис. 5. Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов ядер контрольных ооцитов (*а, в*) и препаратов ядер ооцитов, обработанных актиномицином D (*б, г, д*) с помощью антител к триметилгуанозиновому кэпу мРНК (*а, б*), белку SC35 (*в—д*) и коилину (*II*).

Каждая панель представляет собой конфокальные изображения одного и того же ядра после обработки соответствующими антителами, окраски ДНК с помощью красителя То-Pro-3 (*III*) и совмещение всех изображений (*IV*). *а, б* — ядра ооцитов II стадии; *в, г* — ядра ооцитов I стадии; *д* — ядро ооцита III стадии. Масштабные линейки — 8 мкм.

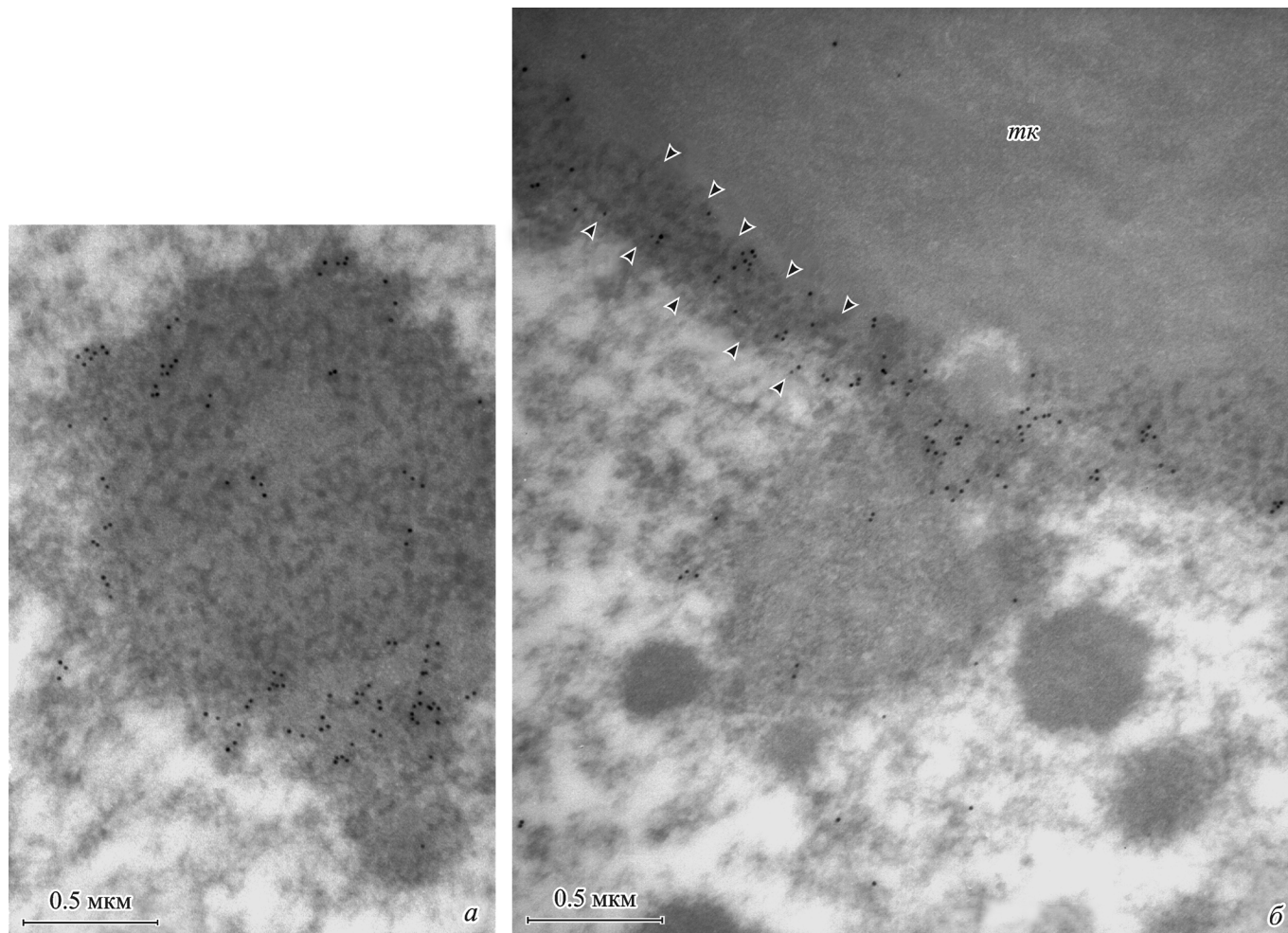


Рис. 6. Кластер интерхроматиновых гранул (а) и фрагмент тельца Кахала (б) ооцитов *Acheta domestica* после обработки актиномицином D и мечения ультратонких срезов антителами к белку SC35.

С помощью данных антител мечаются кластер интерхроматиновых гранул и гранулярный материал (головки стрелок) на периферии тельца Кахала (тк); матрикс тельца Кахала не мечен.

представляют собой КИГ, поскольку многочисленные фиброгранулярные структуры, появляющиеся в нуклеоплазме при действии актиномицина D, четко мечаются с помощью антител к белку SC35 (рис. 6, а).

Обработка ооцитов актиномицином D приводит к заметной сегрегации фибриллярного и гранулярного материала в составе КИГ и ТК; при этом на периферии ТК появляется слой SC35-содержащих гранул (рис. 6, б), являющихся, по-видимому, интерхроматиновыми гранулами. Сам же матрикс ТК ооцитов, обработанных актиномицином D, не мечится с помощью антител к белку SC35 (рис. 6, б).

Обработка ооцитов актиномицином D заметно не влияла на характер окрашивания ядерных структур с помощью антител к фибрилларину (mAb 72B9). Как и в норме, с помощью этих антител интенсивно метились ТК и многочисленные ядрышки (рис. 7, а, б). Однако в ядрах ооцитов, обработанных актиномицином D, ядерные домены, соответствующие ядрышкам, выглядели крупнее и приобретали более округлую форму (рис. 7, б).

С помощью антител к Пол II (mAb 8WG16) не удалось выявить сколько-нибудь заметные количества Пол II в ТК как на контрольных препаратах, так и на пре-

паратах ядер ооцитов, обработанных актиномицином D (рис. 8, а, б), подобно тому как это имеет место при действии DRB (Stepanova et al., 2006). Точно так же на ультратонких срезах ядер ооцитов, обработанных актиномицином D, обнаружено мечение с помощью антител 8WG16 фибриллярных зон в составе сегрегированных КИГ (рис. 9).

Иммуноэлектронная микроскопия не выявила изменений по сравнению с контролем в характере мечения ТК обработанных актиномицином D ооцитов при использовании антител к белкам СВР/p300 (ср. рис. 4, а, б и 10, а). При этом отмечалось накопление этих белков в КИГ (рис. 10, б, в).

Обсуждение

В ходе оогенеза растущий ооцит вступает в различные структурно-функциональные взаимоотношения со вспомогательными клетками различного происхождения (Равен, 1964; Айзенштадт, 1984). Четкие примеры таких взаимоотношений мы находим у представителей различных систематических групп насекомых. На протяжении 30 лет общепризнанным является представление о том,

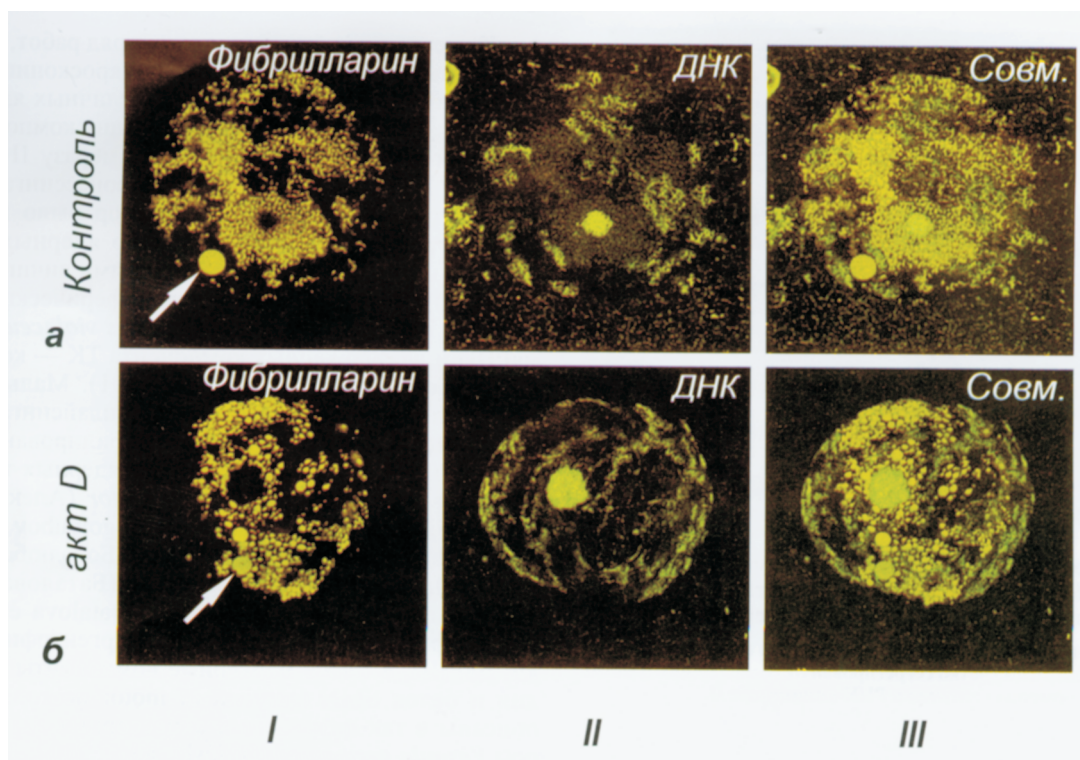


Рис. 7. Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание ядер ооцитов *Acheta domestica* с помощью антител к фибрилларину. *a* — контроль; *б* — ядро ооцита, обработанного актиномицином D. Каждая панель представляет собой конфокальные изображения одного и того же ядра после обработки антителами к фибрилларину (I), окраски ДНК с помощью То-Pro-3 (II) и их совмещение (III). Масштабные линейки — 8 мкм.

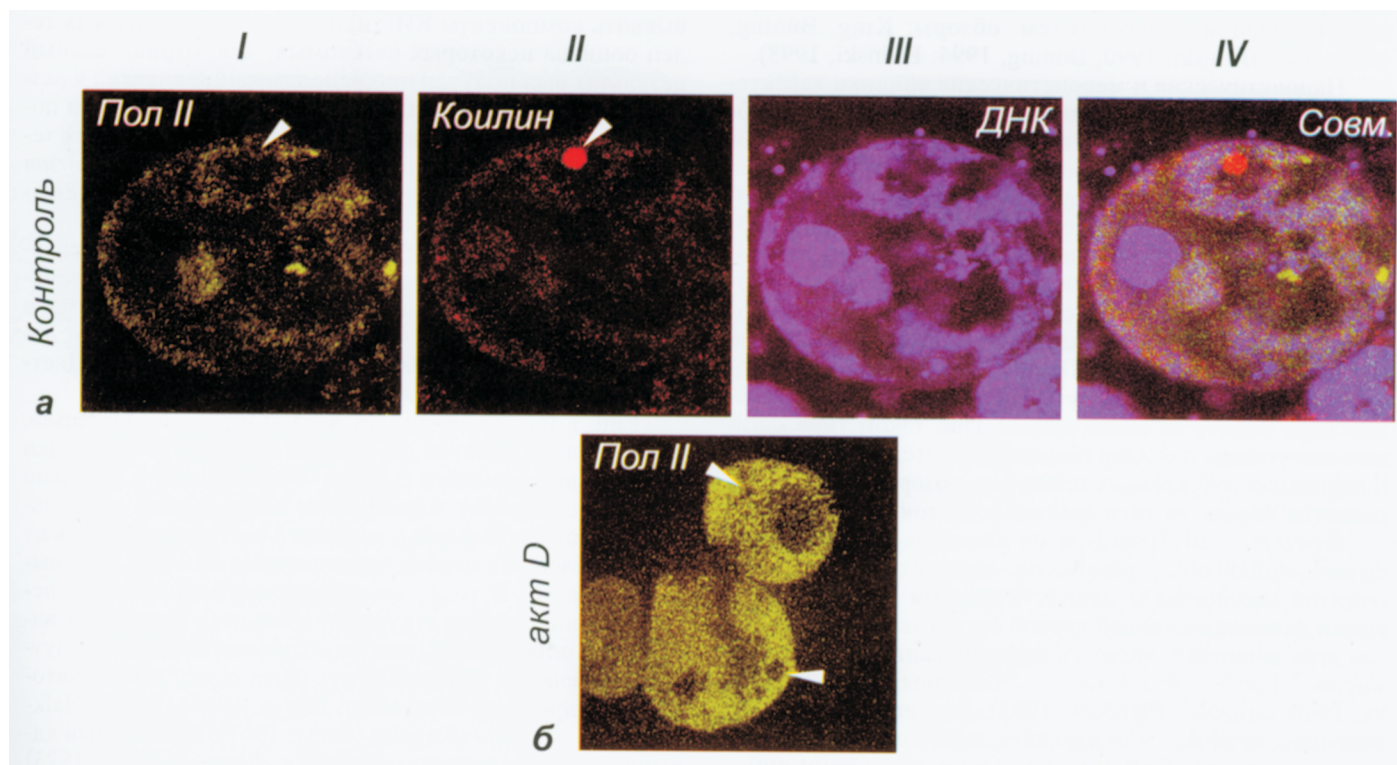


Рис. 8. Выявление РНК-полимеразы II в ядрах контрольных ооцитов *Acheta domestica* (*a*) и ооцитов, обработанных актиномицином D (*б*).

В тельце Кахала (головики стрелок) РНК-полимераза II не выявляется. На верхней панели (*a*) представлены конфокальные изображения одного и того же ядра после обработки антителами к нефосфорилированной РНК-полимеразе II (I), коилину (II), окраски ДНК с помощью То-Pro-3 (III) и их совмещение (IV). Масштабные линейки — *a* — 8, *б* — 16 мкм.

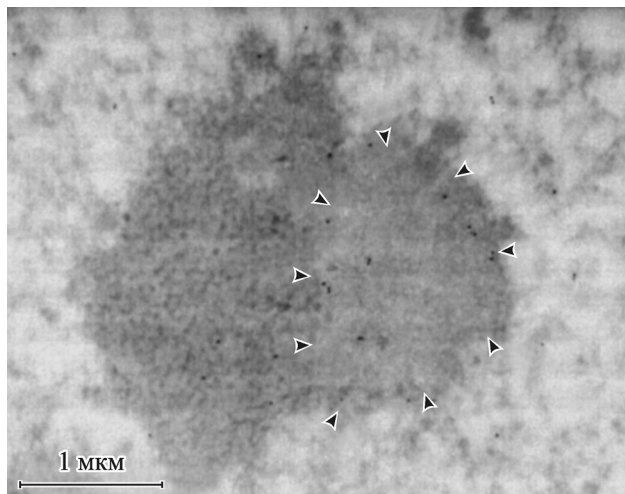


Рис. 9. Ультратонкий срез кластера интерхроматиновых гранул ооцита *Acheta domestica* после обработки актиномицином D и мечения антителами к РНК-полимеразе II.

После обработки актиномицином D фибриллярный материал в составе кластера (голови стрелок) четко сегрегирован от гранулярного и митотического с помощью антител к РНК-полимеразе II.

что организация яичников насекомых во многом определяет особенности морфологической и функциональной организации ядер ооцитов (Грузова, 1971; Гагинская, 1975).

По своей организации яичники насекомых подразделяют на паноистические, мероистические политрофные, мероистические телотрофные и вторичные паноистические (неопаноистические) (см. обзоры: King, Büning, 1985; Štys, Biliński, 1990; Büning, 1994; Biliński, 1998).

Паноистические и мероистические яичники характеризуются разными источниками РНК в оогенезе (см. обзор: Berry, 1985). В мероистических яичниках основным источником РНК служат трофоциты, полиплоидные ядра которых в значительной степени характеризуются высоким уровнем синтетической активности (Telfer, 1975; Berry, 1985; Büning, 1994), в противоположность инактивированным ядрам ооцитов, в которых хромосомы довольно рано конденсируются, формируя кариосферу, что происходит в самом начале большого роста ооцитов (Gruzova, Parfenov, 1993; Грузова и др., 1995). В паноистических яичниках в отсутствие трофоцитов инактивации ядра ооцита не наблюдается. При таком типе организации гонады для ядер ооцитов является правилом амплификация рибосомных генов (см. обзор: Cave, 1982) и развитие хромосом типа ламповых щеток (Kunz, 1967).

Вместе с тем, несмотря на различия в структуре и функционировании хромосомно-ядрышкового аппарата ооцитов насекомых с паноистическими и мероистическими яичниками, общей чертой организации ядер ооцитов этих животных является формирование в экстрахромосомной области разнообразных ядерных телец (Gruzova, 1988; Gruzova, Parfenov, 1993). Большинство из них, очевидно, отличается от ядрышек, поскольку они не принимают непосредственного участия в продукции рибосомных частиц, что допускалось ранее (Jaworska, Lima-de-Faria, 1973). Остается нерешенным важный вопрос о том, в какой степени организация и молекулярный состав ядерных телец зависят от типа строения яичников.

К настоящему времени имеется ряд работ, в которых с помощью иммуноэлектронной микроскопии было обнаружено присутствие в составе различных ядерных телец насекомых коилина и ряда ведущих компонентов экспрессии генов, включая РНК-полимеразу II (Пол II) и факторы посттранскрипционного процессинга РНК. Однако большинство работ до сих пор было посвящено ультраструктурному исследованию ядерных структур ооцитов насекомых с мероистическими яичниками.

Было показано, что крупные сферические ядерные тельца в ооцитах жука-жужелицы *Carabus violaceus* содержат мяРНК и два маркерных компонента ТК — коилин и белок *rigpen* (TLS/FUS) (Jaglarz, 2001). Малые ядерные РНК, отличный от мяРНК фактор сплайсинга SC35, нефосфорилированная и гиперфосфорилированная Пол II и коилин были выявлены в составе ядерных телец ооцитов жука-чернотелки *Tenebrio molitor* (Александрова и др., 1995; Боголюбов и др., 1997; Bogolyubov et al., 2000; Bogolyubov, Parfenov, 2001, 2004; Боголюбов, 2003) и скорпионницы *Panorpa communis* (Баталова, Цветков, 1998; Баталова и др., 2000, 2005; Batalova et al., 2005). Характерные тельца, содержащие аргентофильные белки, мяРНК, а также маркерные компоненты ТК — коилин и белок SMN (survival of motor neurons), — были описаны в так называемых аксессуарных ядрах ооцитов осы *Vespula germanica* (Biliński, Kloc, 2002; Jaglarz et al., 2005).

Данные электронной микроскопии и ультраструктурной иммуноцитохимии позволили авторам цитированных работ заключить, что структуры, содержащие мяРНК и коилин, в целом можно рассматривать в качестве ТК, а содержащие мяРНК и белок SC35 — как КИГ. Вместе с тем не всегда иммуноцитохимически удается выявить компоненты КИГ или ТК в составе ядерных телец ооцитов некоторых насекомых. Так, отрицательный результат был получен при использовании антител к различным эпитомам мяРНК, белку SC35 и коилину при попытке локализовать эти антигены в составе ядерных телец ооцитов жука-долгоносика *Anthonomus pomorum* (Świątek, Jaglarz, 2004) и некоторых видов вшей (*Zelazowska, Jaglarz, 2004*).

Сведения о составе ядерных телец ооцитов насекомых с паноистическими яичниками до недавнего времени ограничивались лишь светооптическими данными и касались стрекозы-красотки (Цветков и др., 1996) и домового сверчка (Gall, Callan, 1989; Gall et al., 1995; Цветков и др., 1996; Tsvetkov et al., 1997).

Еще в начале прошлого века Йоргенсен (Jørgensen, 1913) в ядрах ооцитов двух видов сверчков — медведки *Gryllotalpa* и домового сверчка — обнаружил и детально проиллюстрировал характерные образования правильной сферической формы, которые заметно отличались от многочисленных мелких ядрышек своими очень крупными размерами. В ходе дальнейших морфологических исследований сходные структуры в ооцитах различных насекомых описывались под разными названиями: «внутренние тельца» (Binnenkörper) (Bier et al., 1967), «вторичные ядрышки» (Seshachar, Bagga, 1963; Halkka, Halkka, 1968), «шары» (Kugeln) (Kunz, 1967), «вторичный ядрышкоподобный компонент» (Jaworska, Lima-de-Faria, 1973) или «сферы» (Gall, Callan, 1989; Цветков и др., 1996; Tsvetkov et al., 1997).

С помощью непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии Голл и соавторы (Gall, Callan, 1989; Gall et al., 1995) обнаружили, что в ооцитах домового сверчка *Ache-*

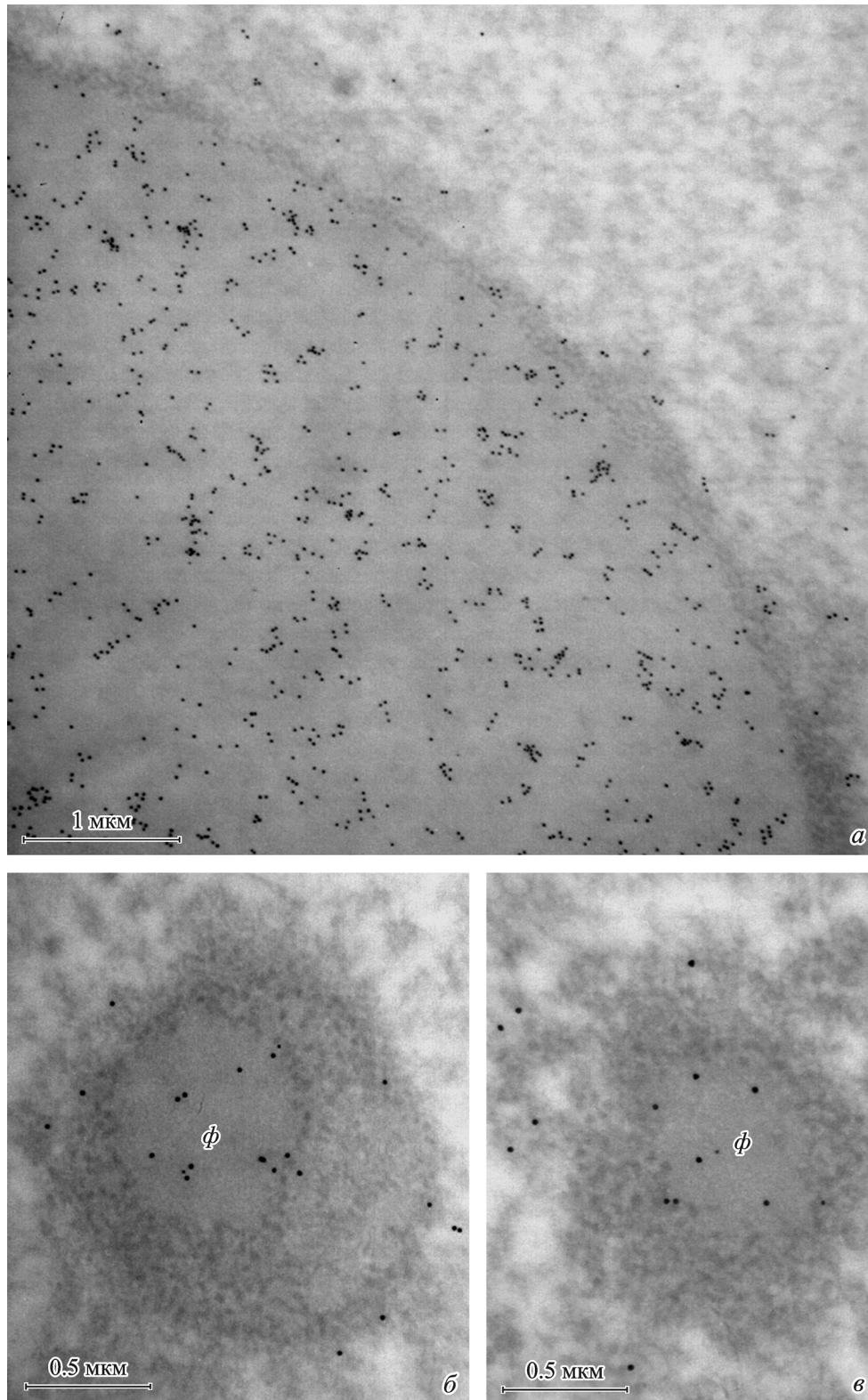


Рис. 10. Ультратонкие срезы тельца Кахала (б) и кластеров интерхроматиновых гранул (б, в) ооцитов *Acheta domestica* после обработки актиномицином D и мечения антителами к СВР/p300.

Тельце Кахала равномерно и интенсивно мечено; в составе кластеров интерхроматиновых гранул преимущественно мечаются фибриллярные зоны (φ).

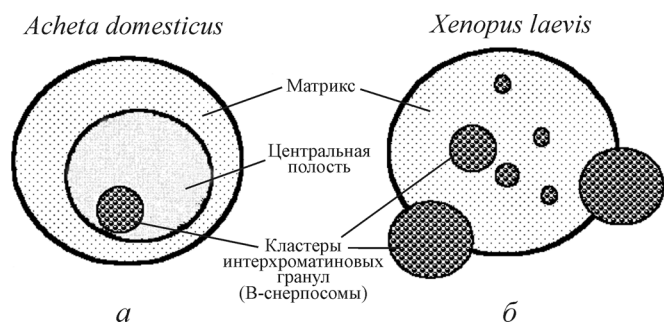


Рис. 11. Схема организации телец Кахала ооцитов *Acheta domestica* (а) и *Xenopus laevis* (б).

A. domestica эти структуры интенсивно реагируют с антителами к Sm-эпитопу мРНК, триметилгуанозинового кэпу мРНК, фибрилларину и коилину, но обычно не реагируют с антителами к SR-белку SC35. Эти данные позволили сделать вывод о том, что Binnekörper ооцитов *A. domestica* представляют собой ТК (Gall et al., 1995).

В нашем предыдущем исследовании (Stepanova et al., 2006) мы окончательно подтвердили этот вывод с помощью микроинъекций в ооплазму *A. domestica* меченой флуоресцеином U7 мРНК. Ранее подобные эксперименты позволили идентифицировать ТК среди чрезвычайно гетерогенной популяции экстрахромосомных ядерных телец ооцитов скорпионницы *P. communis* (Batalova et al., 2005). Хорошо известно, что в ядрах ооцитов *Xenopus laevis* основная часть эндогенной ядерной U7 мРНК, функция которой состоит в специфическом тримминге 3'-конца гистоновых мРНК в ходе их посттранскрипционного процессинга (Dominski, Marzluff, 1999), локализуется именно в ТК (Wu, Gall, 1993; Wu et al., 1996). Проведенные недавно специальные эксперименты убедительно доказали, что при инъекции в ооплазму ооцитов флуоресцентно меченой U7 мРНК она нормальным образом ассоциирует с Sm-белками, образуя стабильные U7 мРНК-комплексы, которые затем импортируются в ядро и концентрируются в ТК точно так же, как и эндогенные U7 мРНК (Handwerger et al., 2003). Установлено также что U7 мРНК и коилин могут формировать довольно слабые, но специфичные комплексы (Bellini, Gall, 1998), а коилин в свою очередь представляет собой членочный белок (Bellini, Gall, 1999), способный доставлять в ТК различные молекулярные комплексы, в том числе U7 мРНК (Bellini, Gall, 1998, 1999).

Исследуя ультраструктуру сложных ТК ооцитов *A. domestica*, Филек и соавторы (Filek et al., 2002) первыми предположили, что характерное фиброгранулярное тельце, расположенное внутри ТК, гомологично так называемым В-снёрпосомам ооцитов амфибий, которые, по современным представлениям, являются КИГ (Gall et al., 2004). Данное предположение получило подтверждение в нашем исследовании (Stepanova et al., 2006), в ходе которого было установлено, что гранулы в составе данной структуры интенсивно метятся с помощью антител не только к мРНК, но и к SR-белку SC35 — ведущему компоненту КИГ (Mintz et al., 1990; Lamond, Spector, 2003).

В этом же исследовании (Stepanova et al., 2006) мы впервые идентифицировали КИГ, лежащие свободно в нуклеоплазме ооцитов сверчка, за пределами ТК. Эти образования, в которых отчетливо выявляются гранулярные (диаметр гранул 35—45 нм) и фибриллярные (тол-

щина фибрилл примерно 5 нм) области, были описаны ранее (Jaworska, Lima-de-Faria, 1973), однако эти авторы считали их особым типом ядрышек и предполагали наличие в них ДНК, что не подтвердилось в ходе наших опытов по мечению ультратонких срезов с помощью антител к двухцепочечной ДНК.

Возможность присутствия в ядре ооцитов как свободных КИГ, так и ассоциированных с ТК хорошо известна на примере ооцитов амфибий (Wu et al., 1991; Gall et al., 1995, 1999, 2004). Обращает на себя внимание внешнее подобие по ультраструктурной организации ТК ооцитов *X. laevis* и *A. domestica* — с той разницей, что у *X. laevis* КИГ (В-снёрпосомы) в составе ТК многочисленны, заметно различаются по размерам, а в матриксе ТК, т. е. в его коилинсодержащей части (Gall et al., 1999), отсутствует центральная полость (рис. 11).

Следует, однако, подчеркнуть важное различие по составу ТК ооцитов *X. laevis* и *A. domestica*. У *Xenopus* помимо коилина основной компонент матрикса ТК — U7 мРНК, в то время как сплайсосомные мРНК и SR-белок SC35 расположены преимущественно в КИГ, ассоциированных с ТК (Wu et al., 1991; Wu, Gall, 1993). В ооцитах *A. domestica* с помощью гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* в составе матрикса ТК были выявлены U1, U2 и U6 сплайсосомные мРНК; при этом U2 мРНК была представлена в наибольшей концентрации (Tsvetkov et al., 1997). Кроме того, мы обнаружили, что белок SC35 в ооцитах *A. domestica* присутствует не только в КИГ: в малых, но тем не менее поддающихся обнаружению с помощью конфокальной или иммуноэлектронной микроскопии количествах он выявляется и в матриксе ТК (Stepanova et al., 2006).

Белок SC35, как известно, не является компонентом ТК активно транскрибирующих соматических клеток млекопитающих (Raška et al., 1991; Spector et al., 1991; см. также обзоры: Mateva, 1999; Gall, 2000), однако возможность его присутствия в ТК ооцитов различных насекомых уже неоднократно обсуждалась нами ранее (Боголюбов, 2003; Batalova и др., 2005; Batalova et al., 2005).

Известно, что компонентами ТК соматических клеток млекопитающих обычно являются РНК-полимераза II (Пол II) и многие транскрипционные факторы (Grande et al., 1997; Jordan et al., 1997; Schul et al., 1998; см. также обзоры: Gall, 2000; Ciocce, Lamond, 2005). В матриксе ТК ооцитов амфибий обнаружены нефосфорилированная и фосфорилированная по серину-5 Пол II, а также факторы дробления и полиаденилирования CstF77 и CPSF100 (Gall et al., 1999; Morgan et al., 2000). В КИГ ооцитов *Xenopus* Пол II отсутствует (Doyle et al., 2002).

Что касается ооцитов свечка, то нам не удалось выявить сколько-нибудь заметных количества Пол II в матриксе ТК с помощью конфокальной и иммуноэлектронной микроскопии при использовании антител к трем различным эпитопам Пол II (Stepanova et al., 2006; настоящая статья). Поскольку нельзя исключить, что в активно транскрибирующих ядрах ооцитов *A. domestica* Пол II быстро проходит через ТК и в конкретный момент времени присутствует в нем в количествах, которые иммуноцитохимически невозможно обнаружить, мы блокировали транскрипцию с помощью ингибиторов — DRB (Stepanova et al., 2006) и актиномицина D (настоящая статья), ожидая при этом выявить заметное накопление Пол II в ТК. Однако этого не наблюдалось: Пол II выявлялась не в ТК, а в фибриллярных зонах, ассоциирован-

ных с КИГ. Перераспределение Пол II и факторов, вовлеченных в биогенез пре-мРНК, при подавлении транскрипции в КИГ отмечалось ранее для соматических клеток млекопитающих (Spector, 1993; Bregman et al., 1995).

Следует отметить, что искусственное подавление транскрипции в ядрах ооцитов *A. domesticus* приводит к морфологическим перестройкам экстрахромосомных ядерных структур, а именно: 1) уменьшению центральной полости ТК; 2) появлению сплошного слоя SC35-содержащих гранул на периферии ТК, что сопровождается исчезновением сигнала в матриксе ТК при обработке препаратов антителами к этому белку; 3) значительному увеличению количества КИГ в нуклеоплазме, подобно тому как это происходит в ядрах ооцитов *Xenopus* при обработке DRB (Morgan et al., 2000); 4) существенной сегрегации фибриллярного и гранулярного материала в составе КИГ.

Интересно, что присутствие большого количества ядерных структур, подобных КИГ, в которых фибриллярный и гранулярный материал сегрегирован, характеризует ядра ооцитов некоторых насекомых с мероистическими яичниками (Александрова, 1992; Александрова и др., 1995; Bogolyubov et al., 2000; Bogolyubov, Parfenov, 2001; Боголюбов, 2003; Баталова и др., 2005; Batalova et al., 2005), а также ядра ооцитов мыши (Parfenov et al., 2003) и человека (Parfenov et al., 1998) на стадиях, когда инактивация ядер ооцитов этих животных и человека обусловлена естественными (физиологически детерминированными) причинами, связанными с формированием и развитием кариосферы (Gruzova, Parfenov, 1993; Грузова и др., 1995).

Для подтверждения наших прежних выводов (Stepanova et al., 2006), полученных при действии ингибитора транскрипции DRB — аналога аденозина, который блокирует транскрипцию на стадии элонгации за счет инактивации протеинкиназ, участвующих в фосфорилировании CTD Пол II (Sehgal et al., 1976; Zandomeni et al., 1986; Bregman et al., 1995), в настоящей работе мы использовали другой ингибитор — актиномицин D, обладающий иным механизмом подавления транскрипции. Как известно, актиномицин D выступает в роли интеркалирующего агента, который встраивается в GC-богатые районы на границе двух- и одноцепочечной ДНК в транскрипционном комплексе и препятствует движению РНК-полимераз вдоль цепи ДНК (Cerami et al., 1967; Sobell, 1985). Поскольку концентрация актиномицина D, позволяющая избирательно подавлять работу Пол I и Пол II, варьирует в широких пределах для разных типов клеток и видов животных (Методы биологии развития, 1974) и точно не определена для ооцитов насекомых, мы использовали актиномицин D в высокой концентрации, заведомо достаточной для полного подавления транскрипции (Perry, Kelley, 1970).

Мы обнаружили, что морфологические эффекты действия этих ингибиторов довольно сходны, за исключением того, что актиномицин D по сравнению с DRB более заметно влияет на организацию ядрышек.

Несмотря на отсутствие в ТК ооцитов сверчка Пол II — центрального компонента голоэнзима, в настоящем исследовании мы показали, что в них тем не менее обнаруживаются факторы, непосредственно входящие в его состав или функционально связанные с ним. Так, в ТК ооцитов *A. domesticus* накапливается белок ТВР, являющийся ТАТА-связывающей субъединицей базального фактора транскрипции TFIID (Thompson et al., 1993) и, по-видимому, связывающийся с промотором как компо-

нент голоэнзима Пол II (Greenblatt, 1997). Мы также обнаружили, что в ТК выявляются белки-коактиваторы транскрипции СВР/p300, функция которых состоит в облегчении связывания голоэнзима Пол II и регуляторных белков с ДНК при инициации транскрипции (Shikama et al., 1997; von Mickecz et al., 2000).

Следует отметить, что обработка ингибиторами заметно не влияла на содержание этих факторов в ТК; вместе с тем отмечалось накопление белков СВР/p300 в КИГ, подобно тому как это происходит при подавлении транскрипции в соматических клетках млекопитающих (von Mickecz et al., 2000).

Мы предполагаем, что в ооцитах домового сверчка *A. domesticus* — насекомого с транскрипционно активными ядрами ооцитов — ТК, по-видимому, участвуют во внутриядерном распределении части важных компонентов транскрипции и процессинга пре-мРНК (коактиваторов транскрипции СВР/p300, базального фактора транскрипции TFIID, мяРНП и белкового фактора сплайсинга SC35), но их роль в распределении Пол II, вероятно, менее существенна. Эту функцию, по-видимому, принимает на себя другой ядерный компартмент — КИГ, а конкретно — фибриллярные области в составе КИГ.

Данное предположение, безусловно, требует детальной проверки в будущем. Вместе с тем в настоящее время можно думать, что представленные в настоящей работе данные о значительной общности молекулярного состава ТК и КИГ ооцитов *A. domesticus*, возможности их тесной ассоциации, о сопряженном характере ответа на действие ингибиторов транскрипции и, наконец, указание на возможность принятия одним ядерным доменом (КИГ) функций по распределению ведущего компонента экспрессии генов — Пол II, общепринятых для другого домена — ТК (см. обзор: Gall, 2000), могут, вероятно, получить объяснение с позиций концепции о функциональном единстве этих двух различных экстрахромосомных ядерных доменов.

Авторы выражают глубокую благодарность Дж. Г. Голлу (J. G. Gall, Carnegie Institute of Washington, Baltimore, USA) за любезно предоставленные антитела K121, 72B9 и α SC35, К. Г. Мурти (K. G. Murti, St. Jude Research Hospital, Memphis, USA) за любезно предоставленные антитела 8WG16 и Е. К. Л. Чану (E. K. L. Chan, Scripps Research Institute, La Jolla, USA) за любезно предоставленные антитела R288. Авторы также благодарят Ю. И. Гукину за техническую помощь и Н. А. Шубина за содействие в обеспечении жидким азотом, необходимым при приготовлении давленных препаратов овариол насекомых.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-48080 и 06-04-48904) и гранта президента (РФ) по поддержке ведущих научных школ РФ (НШ-1125.2006.4). Исследования с помощью конфокальной микроскопии были выполнены с использованием оборудования ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

Список литературы

- Айзенштадт Т. Б. 1984. Цитология оогенеза. М.: Наука. 247 с.
Александрова О. А. 1992. Внутриядерные тельца и формирование капсулы кариосферы в ооцитах жука-чернотелки *Tenytoria nomas taurica*. Цитология. 34 (6) : 30—37.

- Alexandrova O. A., Bogolyubov D. S., Gruzova M. N. 1995. Кариосфера и внутриядерные тельца в ядрах ооцитов жука-чернотелки *Tenebrio molitor*. Цитология. 37 (12): 1142—1150.
- Баталова Ф. М., Боголюбов Д. С., Парфенов В. Н. 2005. Кариосфера и экстрахромосомные ядерные тельца ооцитов скорпионницы *Ranorra comminis*. Цитология. 47 (10): 847—859.
- Баталова Ф. М., Степанова И. С., Боголюбов Д. С. 2000. Тельца Кахала в ядрах ооцитов скорпионницы *Ranorra comminis*. Цитология. 42 (11): 1037—1047.
- Баталова Ф. М., Цветков А. Г. 1998. Ядерные структуры ооцитов скорпионовой мухи *Ranorra comminis*. Цитология. 40 (10): 826—834.
- Боголюбов Д. С. 2003. Тельца Кахала в ооцитах насекомых. I. Идентификация и иммуноцитохимическая характеристика тельца Кахала в вителлогенных ооцитах жука-чернотелки. Цитология. 45 (11): 1083—1093.
- Боголюбов Д. С., Александрова О. А., Цветков А. Г. 1997. Ядро ооцитов жука-чернотелки *Tenebrio molitor* (электронно-микроскопическое, цитохимическое и автордиографическое исследование). Цитология. 39 (8): 643—650.
- Гагинская Е. Р. 1975. О классификации типов овогенеза. Онтогенез. 6 (6): 539—545.
- Грузова М. Н. 1971. Функциональная морфология ядерных структур в связи с разными типами овогенеза. Успехи соврем. генет. 3: 206—212.
- Грузова М. Н., Цветков А. Г., Почукалина Г. Н., Парфенов В. Н. 1995. Формирование кариосферы в овогенезе некоторых насекомых и амфибий. Цитология. 37 (8): 744—769.
- Методы биологии развития. 1974. М.: Наука. 619 с.
- Равен Х. 1964. Овогенез. Накопление морфогенетической информации. М.: Мир. 306 с.
- 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. 38 (3): 311—318.
- Штейн Г. И. 2004. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. СПб.: ИИЦ РАН. 32 с.
- Andrade L. E. C., Chan E. K. L., Raška I., Peebles C. L., 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.
- 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.
- Bellini M., Gall J. G. 1998. Coilin can form a complex with the U7 small nuclear ribonucleoprotein. Mol. Biol. Cell. 9: 2987—3001.
- Bellini M., Gall J. G. 1999. Coilin shuttles between the nucleus and cytoplasm in *Xenopus* oocytes. Mol. Biol. Cell. 10: 3425—3434.
- Bernhard W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res. 27: 250—265.
- Berry S. J. 1985. RNA synthesis and storage during insect oogenesis. In: Developmental biology. A comprehensive synthesis. New York; London: Plenum Press. 351—384.
- Bier K., Kuntz 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. 1998. Filogeneza owadów a struktura i ultrastruktura ich jajników. Przegląd Zool. 42: 35—51.
- 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., Tsvetkov A., Parfenov V. 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. 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. 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.
- Brasch K., Ochs R. L. 1992. Nuclear bodies (NBs): a newly «rediscovered» organelle. Exp. Cell Res. 202: 211—223.
- Bregman D. B., Du L., van der Zee S., Warren S. L. 1995. Ttanscription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains. J. Cell. Biol. 129: 287—298.
- Büning J. 1994. The ovary of Ectognatha, the insects s. str. In: The Insect ovary: ultrastructure, previtellogenic growth and evolution. London: Chapman and Hall. 31—400.
- Callan H. G., Gall J. G., Murphy C. 1991. Histone genes are located at the sphere loci of *Xenopus* lampbrush chromosomes. Chromosoma. 101: 245—251.
- Carmo-Fonseca M. 2002. New clues to the function of the Cajal body. EMBO Reports. 3: 726—727.
- Cave M. D. 1982. Morphological manifestation of ribosomal DNA amplification during insect oogenesis. In: Insect ultrastructure. New York; London: Plenum Press. 1: 86—117.
- Cerami B. A., Reich E., Ward D. C., Goldberg I. H. 1967. The interaction of actinomycin with DNA: requirement for the 2-amino group of purines. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 57: 1036—1042.
- Cioce M., Lamond A. I. 2005. Cajal bodies: a long history of discovery. Annu. Rev. Cell. Develop. Biol. 21: 105—131.
- Darzacq X., Jady B. E., Verheggen C., Kiss A. M., Bertrand E., Kiss T. 2002. Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. EMBO J. 21: 2746—2756.
- 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. G. 2002. The distribution of RNA polymerase II largest subunit (RPB1) in the *Xenopus* germinal vesicle. J. Struct. Biol. 140: 154—166.
- Du L., Warren S. L. 1997. A functional interaction between the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing. J. Cell Biol. 136: 5—18.
- Dundr M., Misteli T. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. Biochem. J. 356: 297—310.
- 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 of 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., Callan H. G. 1989. The sphere organelle contains small nuclear ribonucleoproteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 86: 6635—6639.
- Gall J. G., Tsvetkov A., 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.
- Gao L., Frey M. R., Matera A. G. 1997. Human genes encoding U3 snRNA associate with coiled bodies in interphase cells and

- are clustered on chromosome 17p11.2 in a complex inverted repeat structure. *Nucl. Acids Res.* 25 : 4740—4747.
- Grande M. A., van der Kraan I., de Jong L., van Driel R. 1997. Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *J. Cell Sci.* 110 : 1781—1791.
- Greenblatt J. 1997. RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 : 310—319.
- Gruzova M. N. 1988. The nucleus during oogenesis with special reference to extrachromosomal structures. In: *Oocyte growth and maturation*. New York: Plenum Press. 77—163.
- Gruzova M. N., Parfenov V. N. 1993. Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 144 : 1—52.
- Halkka L., Halkka O. 1968. RNA and protein in nucleolar structures of dragonfly oocytes. *Science.* 162 : 803—805.
- Handwerger K. E., Gall J. G. 2006. Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol.* 16 : 19—26.
- Handwerger K. E., Murphy C., Gall J. G. 2003. Steady-state dynamics of Cajal body components in the *Xenopus* germinal vesicle. *J. Cell Biol.* 160 : 495—504.
- Hulsebos T., Hackstein J., Henning W. 1984. Lampbrush loop-specific protein of *Drosophila hydei*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 16 : 9415—9429.
- Jacobs E. Y., Frey M. R., Wu W., Ingledue T. C., Gebuhr T. C., Gao L., Marzluff W. F., Matera A. G. 1999. Coiled bodies preferentially associate with U4, U11, and U12 small nuclear RNA genes in interphase HeLa cells but not with U6 and U7 genes. *Mol. Biol. Cell.* 10 : 1653—1663.
- Jády B. E., Darzacq X., Tucker K. E., Matera A. G., Bertrand E., Kiss T. 2003. Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. *EMBO J.* 22 : 1878 : 1888.
- Jaglarz M. K. 2001. Nuclear bodies in the oocyte nucleus of ground beetles are enriched in snRNPs. *Tissue and Cell.* 33 : 395—401.
- Jaglarz M. K., Biliński S. M., Kloc M. 2005. Assembly and breakdown of Cajal bodies in accessory nuclei of Hymenoptera. *Differentiation.* 73 : 99—108.
- Jaworska H., Lima-de-Faria A. 1973. Amplification of ribosomal DNA in *Acheta*. VI. Ultrastructure of two types of nuclear components associated with ribosomal DNA. *Hereditas.* 74 : 309—327.
- Johnson C., Primorac D., McKinstry M., McNeil J., Rowe D., Lawrence J. B. 2000. Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta: splice-defective transcripts initiate transport from the gene are retained within the SC35 domain. *J. Cell Biol.* 150 : 417—432.
- Jordan P., Cunha C., Carmo-Fonseca M. 1997. The cdk7-cyclin H-MAT1 complex associated with TFIIH is localized in coiled bodies. *Mol. Biol. Cell.* 8 : 1207—1217.
- Jörgensen M. 1913. Zellenstudien. I. Morphologische Beiträge zum Problem des Eiwachstums. *Arch. Zellforsch.* 10 : 1—126.
- Kim E., Du L., Bregman D. B., Warren S. L. 1997. Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. *J. Cell Biol.* 136 : 19—28.
- King R. C., Büning J. 1985. The origin and functioning of insect oocytes and nurse cells. In: *Comprehensive Insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Oxford: Pergamon Press. 1 : 37—82.
- Krainer A. 1988. Pre-mRNA splicing by complementation with purified human U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs. *Nucl. Acids Res.* 16 : 9415—9429.
- Kunz W. 1967. Lampenbürstenchromosomen und multiple Nukleolen bei Orthopteren. *Chromosoma.* 21 : 446—462.
- Lamond A. I., Earnshaw W. C. 1998. Structure and function in the nucleus. *Science.* 280 : 547—553.
- Lamond A. I., Spector D. L. 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 : 605—612.
- Leung A. K. L., Andersen J. S., Mann M., Lamond A. I. 2003. Bioinformatic analysis of the nucleolus. *Biochem. J.* 376 : 553—569.
- Malatesta M., Zancanaro C., Martin T. E., Chan E. K., Amalric F., Lührmann R., Vogel P., Fakan S. 1994. Is the coiled body involved in nucleolar functions? *Exp. Cell Res.* 211 : 415—419.
- Matera A. G. 1999. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.* 9 : 302—309.
- Melčák I., Melčáková Š., Kopský V., Večeřová J., Raška I. 2001. Prespliceosomal assembly on microinjected precursor mRNA takes place in nuclear speckles. *Mol. Biol. Cell.* 12 : 393—406.
- Mikecz A., von, Zhang S., Montminy M., Tan E. M., Hemmerich P. 2000. CREB-binding protein (CBP)/p300 and RNA polymerase II colocalize in transcriptionally active domains in the nucleus. *J. Cell Biol.* 150 : 265—274.
- Mintz P. J., Patterson S. D., Neuwald A. F., Spahr C. S., Spector D. L. 1999. Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J.* 18 : 4308—4320.
- Miralles F., Öfverstedt L.-G., Sabri N., Aissouni Y., Hellman U., Skoglund U., Visa N. 2000. Electron tomography reveals posttranscriptional binding of pre-mRNAs to specific fibers in the nucleoplasm. *J. Cell Biol.* 148 : 271—282.
- Misteli T. 2000. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J. Cell Sci.* 113 : 1841—1849.
- Misteli T. 2001. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science.* 291 : 843—847.
- Misteli T., Spector D. L. 1998. The cellular organization of gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 : 323—331.
- Misteli T., Spector D. L. 1999. RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites *in vivo*. *Mol. Cell.* 3 : 697—705.
- Molenaar C., Abdulle A., Gena A., Tanke H. J., Dirks R. W. 2004. Poly(A)⁺ RNAs roam the cell nucleus and pass through speckle somains in transcriptionally active and inactive cells. *J. Cell Biol.* 165 : 191—202.
- Monneron A., Bernhard W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27 : 266—288.
- 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.
- Murphy C., Wang Z., Roeger R. G., Gall J. G. 2002. RNA polymerase III in Cajal bodies and lampbrush chromosomes of the *Xenopus* oocyte nucleus. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 3466—3476.
- 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., Kostyuchek 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.
- Perry R. P., Kelley D. E. 1970. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic doze — response of different RNA species. *J. Cell. Physiol.* 76 : 127—139.
- 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.
- Raška I., Dunder M., Koberna K. 1992. Structure-function sub-compartments of the mammalian cell nucleus as revealed by the electron microscopic affinity cytochemistry. *Cell Biol. Int. Rep.* 16 : 771—89.
- Reimer G., Pollard K., Pennig C., Ochs R., Lischwe M., Busch Y., Tan E. 1987. Monoclonal autoantibody from a (New Zealand black × New Zealand white) F1 mouse and some human scleroderma sera target an Mr 34,000 nucleolar protein of the U3 RNP particle. *Arthritis Rheum.* 30 : 793—800.
- Sacco-Bubulya P., Spector D. L. 2002. Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.* 156 : 425—436.
- 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.

- Sehgal P. B., Darnell J. E., Jr., Tamm I. 1976. The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells. *Cell*. 9 : 473—480.
- Seshachar B. R., Bagga S. 1963. A cytochemical study of oogenesis in dragonfly *Pantala flavescens* (Fabricius). *Growth*. 27 : 225—246.
- Shikama N., Lyon J., La Thangue N. 1997. The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell Biol.* 7 : 230—236.
- Shopland L. S., Johnson C. V., Lawrence J. B. 2002. Evidence that all SC-35 domains contain mRNAs and that transcripts can be structurally constrained within these domains. *J. Struct. Biol.* 140 : 131—139.
- Sobell H. M. 1985. Actinomycin and DNA transcription. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 82 : 5328—5331.
- Spector D. L. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol. USA*. 9 : 265—315.
- Spector D. L. 2001. Nuclear domains. *J. Cell Sci.* 114 : 2891—2893.
- Spector D. L., Fu X.-D., Maniatis T. 1991. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.* 10 : 3467—3481.
- Stepanova I. S., Bogolyubov D. S., Skovorodkin I. N., Parfenov V. N. 2006. Cajal bodies and interchromatin granule clusters in cricket oocytes: composition, dynamics and interactions. *Cell Biol. Int.* (In press).
- Štys P., Biliński S. 1990. Ovariole types and the phylogeny of hexapods. *Biol. Rev.* 65 : 401—429.
- Świątek P., Jaglarz M. K. 2004. SnRNPs are present in the karyosome capsule in the weevil germinal vesicle. *Tissue and Cell*. 36 : 253—262.
- Telfer W. H. 1975. Development and physiology of the oocyte-nurse syncytium. *Adv. Insect Physiol.* 2 : 223—320.
- Thompson C. M., Koleske A. J., Chao D. M., Young R. A. 1993. A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell*. 73 : 1361—1375.
- Thompson N. E., Steinberg T. H., Aronson D. B., Burgess R. R. 1989. Inhibition of *in vivo* and *in vitro* transcription by monoclonal antibodies prepared against wheat germ RNA polymerase II that react with the heptapeptide repeat of eukaryotic RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 264 : 11 511—11 520.
- 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.
- Verheggen C., Lafontaine D. L. J., Samarsky D., Mouaikel J., Blanchard J.-M., Bordonné R., Bertrand E. 2002. Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *EMBO J.* 21 : 2736—2745.
- 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.
- Yu Y. T., Shu M. D., Steitz J. A. 1998. Modifications of U2 snRNA are required for snRNP assembly and pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 17 : 5783—5795.
- Zandomeni R., Zandomeni M. C., Shugar D., Weinmann R. 1986. Casein kinase type II is involved in the inhibition by 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polymerase II transcription. *J. Biol. Chem.* 261 : 3414—3419.
- Żelazowska M., Jaglarz M. K. 2004. Oogenesis in phthirapterans (Insecta: Phthiraptera). I. Morphological and histochemical characterization of the oocyte nucleus and its inclusions. *Arthr. Struct. Develop.* 33 : 161—172.

Поступила 4 V 2006

CAJAL BODIES IN INSECT OOCYTES. II. NEW DATA ON THE MOLECULAR COMPOSITION OF CAJAL BODIES IN OOCYTES OF THE HOUSE CRICKET *ACHETA DOMESTICUS* WITH SPECIAL REFERENCE TO INTERACTIONS BETWEEN CAJAL BODIES AND INTERCHROMATIN GRANULE CLUSTERS

I. S. Stepanova, D. S. Bogolyubov,¹ V. N. Parfenov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: dmitr@mail.cytspb.rssi.ru

Cajal bodies (CBs) in oocytes of the house cricket *Acheta domesticus* are large, perfectly spherical nuclear organelles with a complex internal structure. These consist of a fibrillar coilin-containing matrix and a central cavity with a prominent fibrogranular body inside; the latter has been referred to as an «internal» interchromatin granule cluster (IGC). Within the matrix of CBs we detected transcriptional co-activators CBP/p300 and TATA-box binding protein (TBP). No RNA polymerase II was revealed in CBs of both normal and actinomycin D treated oocytes. In the nucleoplasm of *A. domesticus* oocytes, besides CBs, free IGCs were observed. In oocytes treated with actinomycin D, the amount of «free» IGCs in the nucleoplasm increase significantly, granular and fibrillar components of IGCs were seen segregated, and RNA polymerase II and CBP/p300 were found to be accumulated in fibrillar zones of IGCs.

Key words: insects, oocyte nucleus, Cajal bodies, interchromatin granule clusters, laser confocal and immunogold electron microscopy, actinomycin D.