

ЛОКАЛИЗАЦИЯ САТЕЛЛИТНОЙ ДНК И АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙ БЕЛКОВ ОТНОСИТЕЛЬНО ПРОЯДРЫШЕК У ОДНО- И ДВУХКЛЕТОЧНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШИ

© *Е. В. Гаврилова*,^{1,*} *И. С. Кузнецова*,¹ *Н. И. Енукашвили*,¹
Е. М. Нониашвили,² *А. П. Дыбан*,² *О. И. Подгорная*¹

¹ *Институт цитологии РАН и ² Институт экспериментальной медицины РАМН,
Санкт-Петербург;*

** электронный адрес: shelbys@mail.ru*

Одной из особенностей организации зародышей на одно- и двухклеточной стадиях является наличие проядрышек (ПЯ). Известно, что хромосомы прилегают центромерными (CEN) и перичентромерными (пери-CEN) районами к слою хроматина, окружающему ПЯ. В настоящее время у *Mus musculus* известны 4 типа сателлитных ДНК (сатДНК): в CEN-районе — минорный сателлит (МиСат) и сателлит мыши 3 (MS3), в пери-CEN-районе — мажорный сателлит (МаСат) и сателлит мыши 4 (MS4). Мы исследовали локализацию относительно ПЯ 4 сатДНК CEN- и пери-CEN-районов и ассоциированных с ними белков: РНК-геликазу р68, субъединицы SMC3, Rad21 когезинового комплекса и субъединицы SYCP3 синаптономного комплекса. Работу проводили на препаратах интактных и обработанных оокадаевой кислотой (ОА) зародышах первого и второго клеточных циклов. Обнаружено, что сатДНК занимают разные районы ПЯ: практически на всей поверхности ПЯ выявляется МаСат пери-CEN-районов, а сатДНК CEN-районов и MS4 пери-CEN-районов располагаются преимущественно по периферии ПЯ. Суммарный сигнал 4 сатДНК не покрывает всю область ПЯ. Показано, что обязательным компонентом ПЯ являются субъединицы когезинового и синаптономного комплексов и РНК-геликаза р68. Полученные результаты подтверждают точку зрения, согласно которой ПЯ являются предшественниками хромоцентров.

Ключевые слова: центромерный район, перичентромерный район, сателлитная ДНК, проядрышки, РНК-геликаза р68, белки когезинового и синаптономного комплексов.

Принятые сокращения: ЖПН — женский пронуклеус, МаСат — мажорный сателлит мыши, МиСат — минорный сателлит мыши, МПН — мужской пронуклеус, ОА — оокадаевая кислота, пери-CEN — перичентромерный, ПКХ — преждевременно конденсированные хромосомы, п. н. — пары нуклеотидов, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ПЯ — проядрышки, сатДНК — сателлитная ДНК, ХГ — хорионический гонадотропный гормон человека, CEN — центромерный, MS3 — сателлит мыши 3, MS4 — сателлит мыши 4.

На ранних стадиях доимплантационного развития зародышей, при формировании мужского (МПН) и женского (ЖПН) пронуклеусов и их последующем слиянии, происходят динамические изменения пространственной и структурно-функциональной организации хроматина. Уникальность зародышей на одно- и двухклеточной стадиях проявляется как в функциональном отношении (транскрипционной инертности, репрограммировании хроматина и начале активации эмбрионального генома), так и в структурной организации ядер (отсутствии дефинитивных компартментов, характерных для ядер соматических клеток, в частности хромоцентров и ядрышек; McLay, Clarke, 2003; Santos et al., 2005). Вскоре после оплодотворения в пронуклеусах (ПН) формируются так называемые предшественники ядрышка, или «проядрышки» (ПЯ). ПЯ образуются в одноклеточном зародыше, когда зиготические гены не транскрибируются, и сохраняются до 4—8-клеточной стадии. При вступлении зародышей в митоз ПЯ разрушаются, а после деления они вновь формируются в ядрах зародышей (Dyban et al., 1990).

При микроскопическом исследовании зародышей ПЯ видны как сферические, хорошо очерченные оптически плотные структуры разного размера (от 2 до 6—8 мкм), интенсивно окрашиваемые 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). ПЯ образованы скоплением однородного фибриллярного материала, так называемой сердцевины, а по периферии окружены слоем конденсированного хроматина (Elechon, Korchun, 1998). Считается, что ПЯ являются структурной основой для формирования активного ядрышкового аппарата. Исследования зародышей с применением меченых предшественников нуклеиновых кислот показали, что сердцевина ПЯ мышинных зародышей не содержит ДНК ни до, ни во время начала транскрипции рДНК, а синтез рРНК (начальные этапы формирования ядрышек) происходит на периферии ПЯ (Bagan et al., 1993; Biggiogera et al., 1994; Flechon, Korchun, 1998). Во время начала транскрипции по периферии ПЯ появляются многочисленные белки зрелых ядрышек: РНК-полимераза I, фактор UBF, фибрилларин, B23 (нуклеофозмин) и некоторые другие (Zatsepina et al., 2003). Однако фибрил-

лярный материал ПЯ еще какое-то время выявляется в центральной части ПЯ на протяжении нескольких клеточных циклов (Geuskens, Alexandre, 1984; Biggiogera et al., 1994).

Высказано также предположение о том, что у одно-клеточных зародышей мыши ПЯ участвуют в пространственной организации хромосом в ядре (Dozortsev et al., 2000). В пронуклеусах хромосомы в фазе G₂ первого клеточного цикла, а также преждевременно конденсированные интерфазные хромосомы (ПКХ) прилегают центромерными (CEN) районами к слою хроматина, окружающему ПЯ, а теломерные районы хромосом, как правило, ориентируются по направлению к ядерной оболочке пронуклеуса.

В настоящее время в составе CEN- и перичентромерных (пери-CEN) районов хромосом домашней мыши *Mus musculus* открыты и охарактеризованы 4 типа сателлитных ДНК (сатДНК): АТ-богатые мажорный (MaCat) и минорный (MiCat) сателлиты и GC-богатые сателлиты мыши 3 (MS3) и 4 (MS4). Методом гибридизации *in situ* на одно- и двухклеточной стадиях была показана динамичная ассоциация с поверхностью ПЯ только для MaCat и MiCat (Probst, Almouzni, 2007). Из белков, ассоциированных с CEN- и пери-CEN-районами, наиболее детально изучено распределение белка гетерохроматинизации HP 1β (Santos et al., 2005; Martin et al., 2006; Probst et al., 2007).

В настоящей работе мы исследовали распределение относительно ПЯ 4 сатДНК мыши как пери-CEN- (MaCat и MS4), так и CEN- (MiCat и MS3) районов и ассоциированных с ними белков: РНК-геликазы p68, субъединиц MS3 и Rad21 когезинового комплекса и субъединицы SYCP3 синаптономемного комплекса.

Материал и методика

Зародыши. Опыты проводили на зародышах гибридных мышей F1 (C57BL × CBA), полученных из питомника лабораторных животных РАМН «Рапполово». Для точного датирования возраста зародышей применяли гормональную стимуляцию самок. Для этой цели самкам вводили 7 ед. гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (Folligon, Intervet, Голландия) и через 46—48 ч 10 ед. хорионического гонадотропина (ХГ) человека (Chorulon, Intervet, Голландия). Самок подсаживали на ночь в клетку к самцам. Через 18 ч отбирали самок с копуляционными пробками и умерщвляли дислокацией шейных позвонков. Возраст зародышей отсчитывали в часах от введения ХГ. Зародыши на 1- и 2-клеточной стадиях получали через 18—24 и 42—45 ч после введения ХГ соответственно. Зародыши, окруженные клетками кумулюса, вымывали из яйцеводов средой M2 и помещали в капли среды M2, содержащей 300 ед./мл гиалуронидазы II из семенников овец (Sigma, США). После освобождения от клеток кумулюса отбирали зародышей с хорошо заметным вторым полярным тельцем. Полученные зародыши использовали для приготовления суховоздушных препаратов. На 1-клеточной стадии было проанализировано 9 зародышей, на 2-клеточной — 23 зародыша.

Получение препаратов. Препараты зародышей получали по методу, описанному ранее (Dyban, 1983), с небольшими модификациями. Под контролем стереомикроскопа МБС10 при помощи микропипетки зародыши промывали в течение 1—2 мин в гипотоничном рас-

воре, содержащем 1.93%-ный раствор цитрата натрия и 0.56%-ный раствор хлорида калия (в соотношении 3 : 1) при комнатной температуре. Затем зародыши переносили в солонку с охлажденным до +4 °С стандартным фиксатором (смесь метанола с ледяной уксусной кислотой, 3 : 1). После этого зародыши вместе с каплей фиксатора помещали на предметное стекло и расправляли, капая на них смесь метанола и ледяной уксусной кислоты (1 : 1). После этого на стекло наносили несколько капель стандартного фиксатора и высушивали препараты при комнатной температуре.

Обработка оакаевой кислотой (ОА). Исходный раствор натриевой соли ОА (0.8 мг/мл) (Calbiochem, Германия), приготовленный на диметилсульфоксиде, хранили при —20 °С. Зародыши переносили в несколько капель среды M16, содержащей ОА в конечной концентрации 5 мкМ, и инкубировали под парафиновым маслом (в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С) в течение 45 мин. Зародыши отмывали средой M16, инкубировали в ней 45 мин и готовили препараты. При воздействии на зародыши ОА (специфическим ингибитором фосфопротеин фосфатаз 1 и 2А) в ядрах происходит фрагментация ядерной оболочки, преждевременная конденсация интерфазного хроматина и формирование преждевременно конденсированных хромосом (ПКХ) (Favre et al., 1997). Степень конденсации хромосом зависит от стадии клеточного цикла зародыша в момент обработки ОА (Dyban et al., 1993; Dozortsev et al., 2000).

Окраска серебром. Препараты зародышей инкубировали при комнатной температуре в течение 40 с в 0.125%-ном растворе трипсина на фосфатно-солевом буфере (рН 6.8), не содержащем Ca²⁺ и Mg²⁺. Препараты отмывали 50%-ным этанолом, приготовленным на фосфатно-солевом буфере, и окрашивали 5%-ным раствором Гимза. Серебрение хромосом производили 50%-ным раствором нитрата серебра при 60—70 °С в течение 6 мин, после чего препараты инкубировали в 3%-ном растворе азотнокислого серебра, нейтрализованного формалином (рН 5—6).

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). В качестве гибридизационных зондов использовали 4 последовательности. Клонированный в векторе pBluescript II KS+ фрагмент мажорного сателлита мыши (471 п. н.) (Radic et al., 1987). Плазида была любезно предоставлена д-ром В. А. Намало (Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of California, США). Клонированный в векторе pGEM7 фрагмент минорного сателлита мыши (362 п. н.) (Kipling et al., 1995). Плазида была любезно предоставлена д-ром А. Киплингом (HGU MRC, Western General Hospital, Эдинбург, Великобритания). Полученные в нашей лаборатории фрагменты MS3 (300 п. н.) и MS4 (1800 п. н.), клонированные в векторе pUC19 (Kuznetsova et al., 2005).

Для гибридизации *in situ* вставки MaCat, MiCat, MS3, MS4 метили с использованием прямого и обратного праймеров фага M13 методом ПЦР в присутствии биотин-16-dUTP, или дигоксигенин-11-dUTP (DIG), или флуоресцеинизотиоцианат-11-dUTP (FITC) (Roche, Германия). На препараты наносили гибридизационный буфер (2-кратный SSC, 70%-ный формамид, 1-кратный декстран), содержащий меченый фрагмент ДНК (2 мкг/мл). В случае двойной гибридизации в гибридизационную смесь одновременно добавляли биотинилированный фрагмент и фрагмент, меченный дигоксигенином или FITC. Денатурацию проб и препаратов проводили од-

новременно в течение 3 мин при 80 °С. Гибридизацию проводили во влажной камере при 37 °С в течение ночи. После гибридизации препараты отмывали по 5 мин при температуре гибридизации в 50%-ном формамиде, приготовленном на 4-кратном SSC, затем по 5 мин в сменах растворов 4-кратного SSC, 2-кратного SSC и 1-кратного SSC при температуре гибридизации и трех сменах буфера КСМ (135 мМ KCl, 20 мМ NaCl, 0.5 мМ EDTA, 0.1 % Тритона X-100, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.5) при комнатной температуре. Зонд выявляли с помощью антител против авидина, конъюгированных с Cy-5, и антител против диоксигенина, конъюгированных с FITC (Roche, Германия), соответственно. Препараты дополнительно окрашивали красителем DAPI (0.5 мкг/мл) или йодидом пропидия (0.5 мкг/мл) и заключали в среду VectaShield (Daco, США).

В работе использовали следующие антитела: поликлональные антитела козы против РНК-геликазы p68 (AbCam, 1 : 200); поликлональные антитела кролика против субъединиц когезинового комплекса — K987 против белка SMC3 когезинового комплекса человека, K853 против белка Rad21 когезинового комплекса человека, K1037 против белка SYCP3 синаптомемного комплекса крысы, которые были любезно предоставлены д-ром I. Pietro (Pietro et al., 2004). В качестве вторых антител использовали антитела цыпленка против иммуноглобулина G (IgG) козы, конъюгированные с alexa Fluor™-488 (Molecular Probes, 1 : 200) и антитела цыпленка против IgG кролика, конъюгированные с alexa Fluor™-546 (Molecular Probes, 1 : 200).

Иммуно-FISH. При сочетании метода иммунофлуоресцентного окрашивания и флуоресцентной гибридизации *in situ* (иммуно-FISH) препараты инкубировали в блокирующем 5%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) на буфере КСМ в течение 30 мин. Препараты инкубировали с первыми антителами во влажной камере в течение 1 ч при 37 °С. Затем препараты дополнительно фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида на буфере КСМ в течение 3 мин, отмывали в буфере КСМ (3 раза по 15 мин) и после флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), которую проводили, как указано выше, наносили вторые антитела и инкубировали еще 1 ч при 37 °С. Препараты отмывали в буфере КСМ (3 раза по 15 мин) и заключали в среду VectaShield (Daco, США).

Препараты анализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа DMRXA (Leica Wetzlar GmbH, Германия). Для получения изображения использовали программное обеспечение QFISH (Leica Cambridge Ltd., Анг-

лия). Для трехмерного анализа препаратов использовали лазерный конфокальный сканирующий инвертированный микроскоп Carl Zeiss LSM 5 Pascal (Германия). Получение и обработку изображений производили с помощью программного обеспечения Zeiss LSM Image Browser Version 3.0 и KS 100 (Carl Zeiss, Германия). Для последующей компьютерной обработки изображений использовали пакет программы Adobe Photoshop™ 6.0.

Результаты

Для локализации СатДНК и ассоциированных с ней белков были использованы препараты интактных и обработанных ооцитами (ОА) зародышей первого и второго клеточных циклов. На рис. 1 представлены характерные варианты распределения хроматина в ядрах мышшиных зародышей после их обработки ОА через 19 (а), 23 (б) и 25 (в) ч после введения ХГ, что соответствует фазам клеточного цикла G₁, S и G₂ (Самошкина и др., 1988). После окрашивания препаратов нитратом серебра и по Гимза видно, что преждевременно конденсированный интерфазный хроматин зародышей на стадии G₁ выявляется в виде однохроматидных нитей (рис. 1, а). Если зародыш находится в поздней S-фазе (рис. 1, б), то ПКХ будут выглядеть как тонкие нити, диффузно расположенные по всему ядру. ПКХ зародышей в фазе G₂ выявляются в виде фибрилл, состоящих из 2-х хроматид (рис. 1, в). Обработка ОА позволяет проследить взаимосвязь ПКХ с ПЯ на всех фазах клеточного цикла.

Специфичность зондов проверяли методом двойной FISH на ПКХ 2-клеточных зародышей, обработанных ОА через 45 ч после введения ХГ, когда зародыши находились в конце S-фазы клеточного цикла (рис. 2). Существенной особенностью дробящихся зародышей мыши является асинхронное завершение blastomерами одного и того же клеточного цикла, поэтому ПКХ обладают разной степенью конденсации хроматина (рис. 2, а, б): в правых ядрах хромосомы выглядят в виде диффузно переплетающихся нитей, тогда как в левых ядрах уже наблюдаются отдельные дискретные хромосомы. После обработки ядер ОА получившиеся хромосомы не до конца конденсированы и распределение гибридизационных сигналов сатДНК CEN- и пери-CEN-районов отличается от картины гибридизации на метафазных пластинках соматических клеток (Kuznetsova et al., 2005). На рис. 2 в правых ядрах гибридизационные сигналы MS3, МиСат (а) и МаСат (б) выявляются как частично перекрывающиеся компактные кластеры в CEN- (рис. 2, а) и пери-CEN-

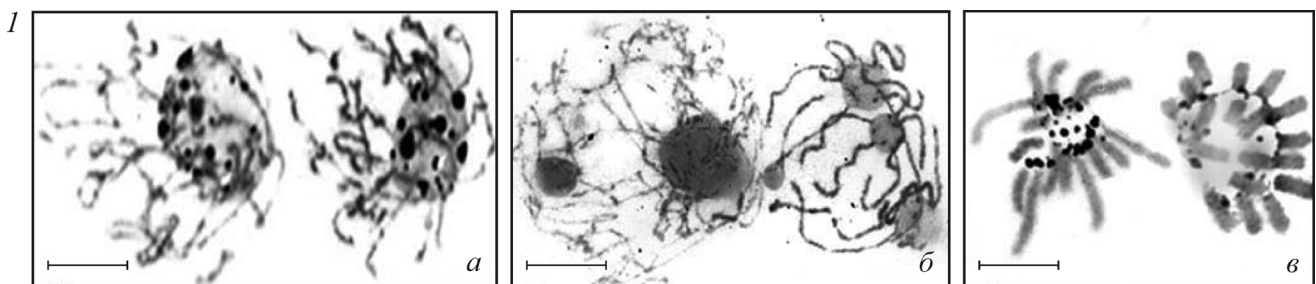


Рис. 1. Преждевременно конденсированные хромосомы (ПКХ) 1-клеточных зародышей на разных стадиях клеточного цикла, обработанные ооцитами (ОА) и окрашенные красителем Гимза и нитратом серебра.

Возраст зародышей отсчитывали от момента введения хорионического гонадотропина (ХГ). Обработка ОА: а — через 19 ч (фаза G₁); б — через 23 ч (поздняя S-фаза); в — через 25 ч (фаза G₂). Масштабные линейки — 5 мкм.

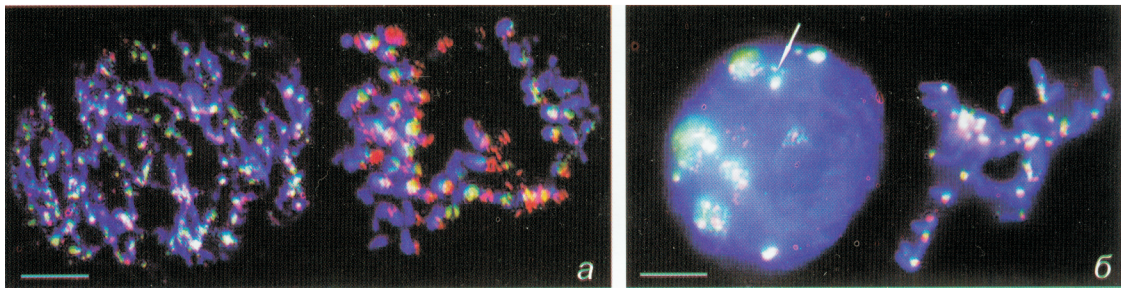


Рис. 2. Локализация сатДНК на ПКХ 2-клеточных зародышей, обработанных ОА через 45 (а) и 42 (б) ч после введения ХГ. а — распределение МиСат (красный) и MS3 (зеленый) на ПКХ зародыша, находившегося в середине S-фазы (левое ядро) и в конце S—начале G₂-фазы (правое ядро); б — распределение МиСат (красный) и МаСат (зеленый) на ПКХ зародыша, находившегося в начале (левое ядро) и в конце (правое ядро) S-фазы клеточного цикла. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Стрелкой обозначены гибридационные сигналы МаСат и МиСат на ПКХ, отходящих от проядрышек (ПЯ). Масштабные линейки — 5 мкм.

(б) районах всех хромосом. На менее конденсированных хромосомах частично перекрывающиеся гибридационные сигналы МиСат и MS3 (рис. 2, а, левое ядро) выявляются в SEN-районах небольшими чередующимися гранулами.

На стадии, когда ПКХ ассоциированы с ПЯ (рис. 2, б, левое ядро), характер распределения МаСат и МиСат иной: большая часть гибридационных сигналов обнаруживалась на поверхности ПЯ и в ярко окрашенных DAPI районах хромосом, прилегающих к ПЯ. Перекрывающиеся кластеры МиСат и МаСат располагались преимущественно по периферии ПЯ, тогда как большую площадь ПЯ занимали точечные сигналы и гранулы МаСат. Чередующиеся гибридационные сигналы МиСат и МаСат выявлялись также вдоль ПКХ, отходящих от ПЯ (рис. 2, б, обозначены стрелками). Таким образом, на ПКХ фрагменты сатДНК, как и на метафазных пластинках из соматических клеток, занимают разные районы: основная часть сигналов МиСат и MS3 соответствует SEN-району, ярко окрашенному DAPI, и только незначительная часть — плечам хромосом (рис. 2, а), тогда как МаСат (рис. 2, б) и MS4 (данные не представлены) локализуются в пери-SEN-районах хромосом. Компартиментализация SEN- и пери-SEN-районов ПКХ сохраняется по отноше-

нию к ПЯ: более компактизованный МиСат SEN-районов располагается преимущественно по периферии ПЯ, тогда как менее конденсированный МаСат пери-SEN-районов локализуется почти по всей поверхности ПЯ.

Распределение сатДНК SEN- и пери-SEN-районов определяли также в ядрах интактных зародышей (рис. 3). В 1-клеточных зародышах в начале (рис. 3, а) и середине (рис. 3, б) S-фазы сатДНК, MS4 и МиСат выявляются как по периферии, так и в центральной части ПЯ. Однако вклад МаСат в состав ПЯ различен: гибридационные сигналы MS4 (рис. 3, а) и МиСат (рис. 3, б) в S-фазе располагаются кластерами разного размера и многочисленными точечными сигналами по периферии и реже — в центральной части ПЯ, МаСат максимально перекрываются с ПЯ. Если в начале S-фазы большая часть сигналов МаСат ассоциирована с ПЯ (рис. 3, а), то к середине S-фазы количество гибридационных сигналов МаСат, выявляемых в пронуклеусах вне ПЯ, значительно увеличивается (рис. 3, б). Это свидетельствует о деконденсации пери-SEN-районов в S-фазе. Образуюсь в 1-клеточном зародыше, ПЯ разрушаются при вступлении зародышей в митоз, а после завершения первого деления они вновь формируются в ядрах 2-клеточных зародышей (рис. 3, в). Так же как и в ядрах 1-клеточных зародышей, сатДНК

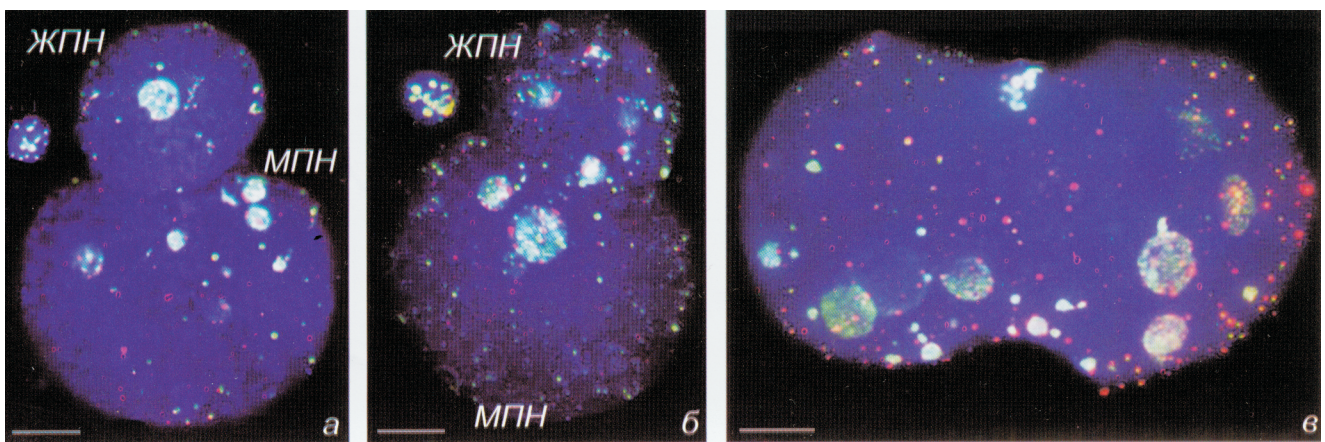


Рис. 3. Распределение сатДНК в ядрах 1- и 2-клеточных зародышей. Возраст зародышей отсчитывали от момента введения ХГ.

а — распределение МаСат (зеленый) и MS4 (красный) в ядрах 1-клеточного зародыша через 20 ч (фаза G₁); б — распределение МаСат (зеленый) и МиСат (красный) в ядрах 1-клеточного зародыша через 23 ч (середина S-фазы); в — распределение МаСат (зеленый) и MS3 (красный) в ядрах 2-клеточного зародыша через 43 ч (середина S-фазы). Ядра окрашены DAPI (синий). МПН и ЖПН — соответственно мужской и женский пронуклеусы. Масштабные линейки — 5 мкм.

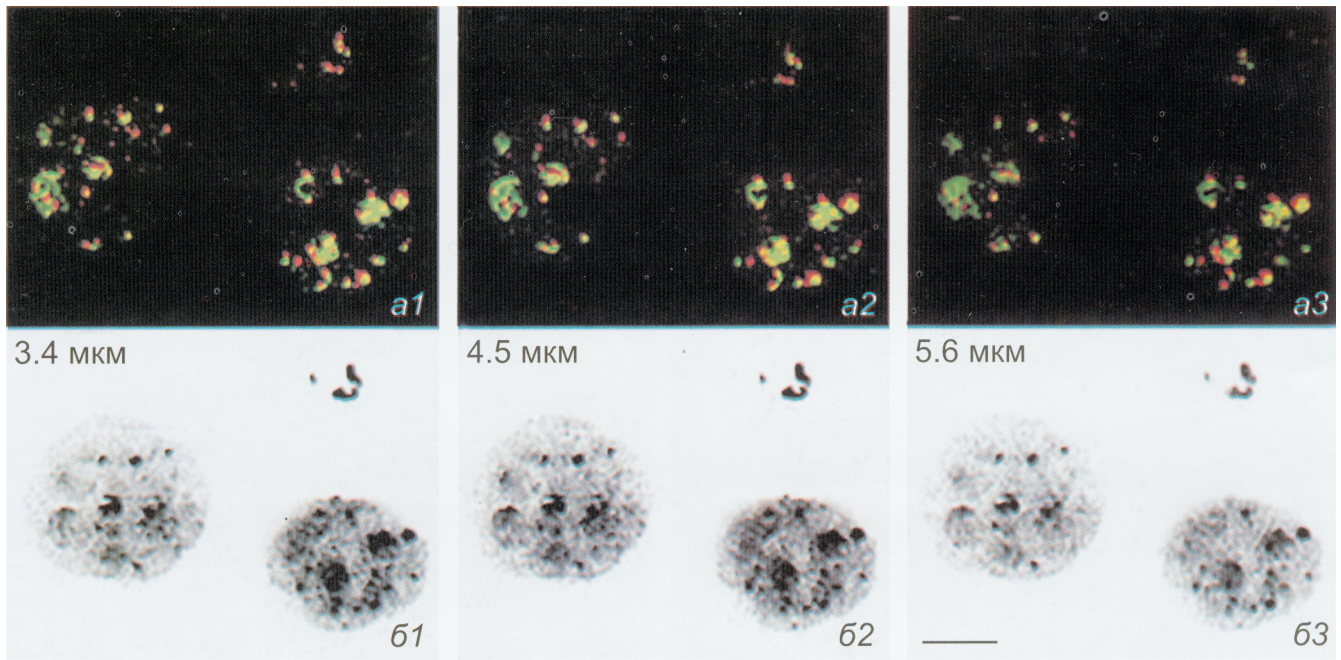


Рис. 4. Конфокальный анализ распределения МаСат (зеленый) и МиСат (красный) в ядрах зародышей на 2-клеточной стадии. Фокальные срезы ядер 2-клеточного зародыша через 43 ч (S-фаза) после введения ХГ. *a1—a3* — двойная FISH с зондами МаСат (зеленый) и МиСат (красный); *b1—b3* — окраска иодидом пропидия в черно-белом цвете. Конфокальная сканирующая микроскопия с шагом 1.1 мкм. Масштабная линейка — 5 мкм.

в составе ПЯ на 2-клеточной стадии компартиментализована: практически на всей поверхности ПЯ выявляется МаСат пери-CEN-районов, а MS3 CEN-районов отдельными глобулами и реже точно располагается преимущественно по периферии ПЯ. Отдельные немногочисленные точечные сигналы MS4 (рис. 3, *a*), МиСат (рис. 3, *б*) и MS3 (рис. 3, *в*), чередующиеся с МаСат, выявляются также вне ПЯ по периферии ядер 1- и 2-клеточных зародышей.

При анализе препаратов с помощью конфокальной микроскопии видно, что гибридизационные сигна-

лы МаСат и МиСат колокализуются с районами по периферии ПЯ, ярко окрашенными иодидом пропидия (рис. 4, *a2*, *б2*). МаСат выявляется серпообразно либо в виде ободка на одном из полюсов ПЯ (рис. 4, *a1*, *б1*). Сигнал МиСат выглядит более конденсированно и на разных срезах локализован глобулами, которые выявляются преимущественно по периферии ПЯ, частично перекрываясь с МаСат (рис. 4, *a1—a3*). Таким образом, сатДНК CEN- и пери-CEN-районов компартиментализованы, хотя оба района тяготеют к ПЯ. Суммарный сигнал 4 сатДНК районов CEN (МиСат, MS3) и пери-CEN (МаСат, MS4) не по-

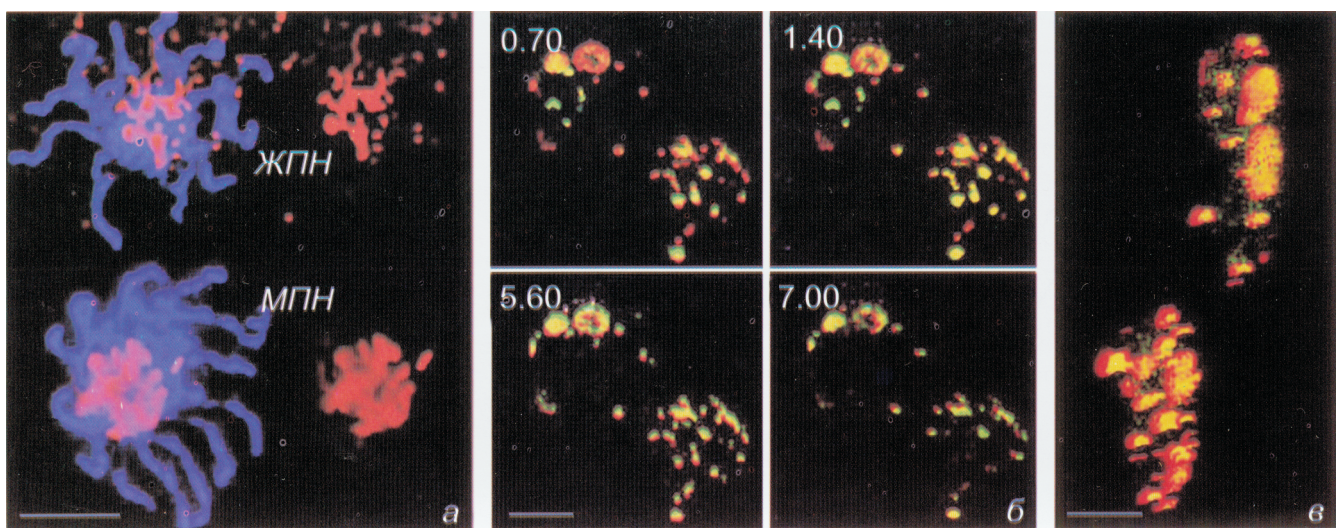


Рис. 5. Локализация РНК-геликазы r68.

a — иммуноцитохимическое окрашивание ПКХ 1-клеточного зародыша антителами против РНК-геликазы r68 (красный); ПКХ получены после обработки 1-клеточного зародыша ОА через 19 ч (фаза G₁) после введения ХГ; ПКХ окрашены ДАPI (синий). *б* — иммуно-FISH с зондом МаСат (зеленый) и антителами против r68 (красный) на фокальных срезах ядер 2-клеточного зародыша. *в* — реконструкция ядер 2-клеточного зародыша после конфокальной микроскопии, повернутая на 90°. Конфокальная сканирующая микроскопия с шагом 0.7 мкм. МПН и ЖПН — соответственно мужской и женский пронуклеусы. Масштабные линейки — 5 мкм.

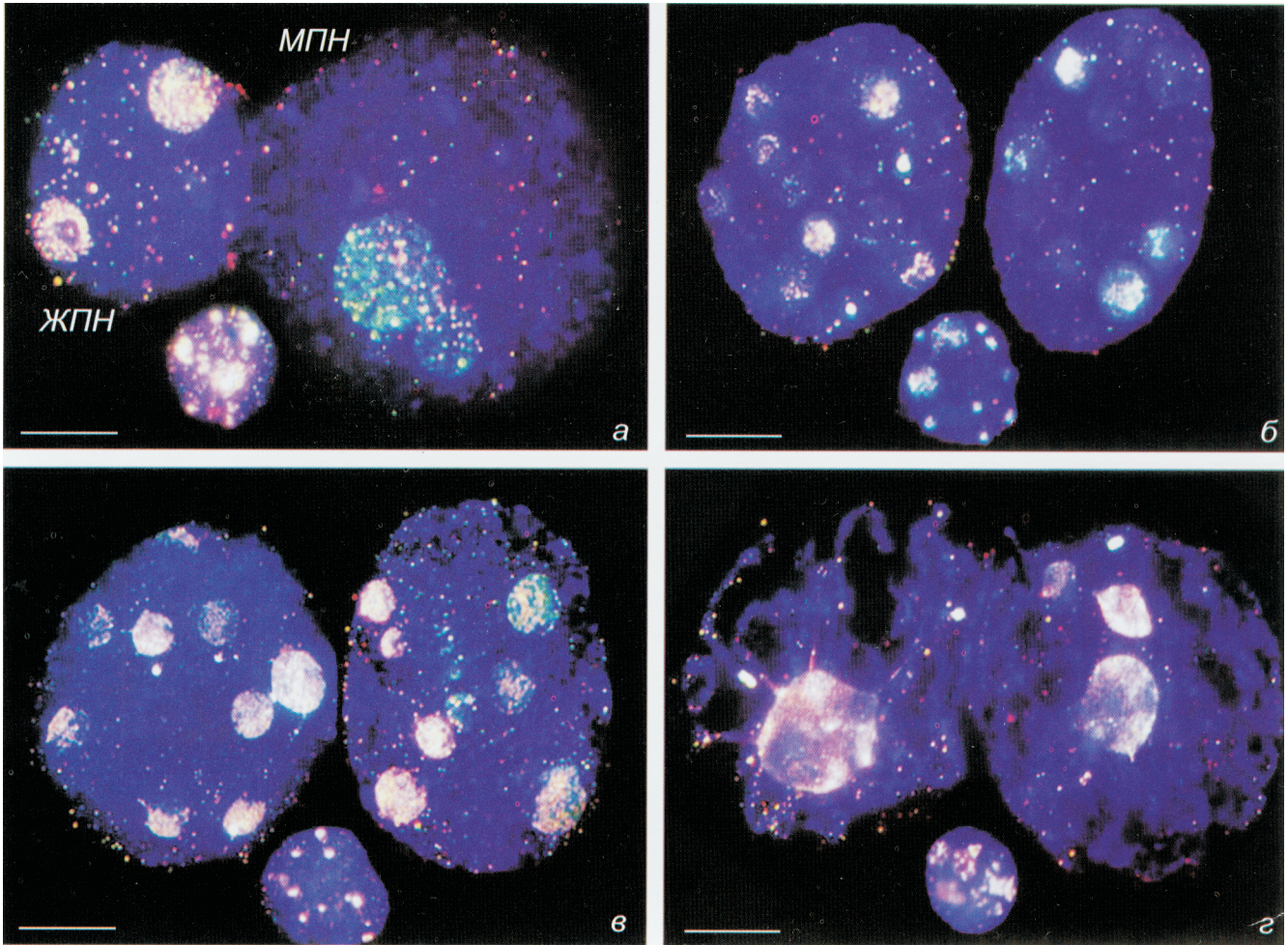


Рис. 6. Распределение MaCat (зеленый) и субъединиц когезинового и синаптонемного комплексов (красный) в ядрах 1- и 2-клеточных зародышей.

a, б — иммуно-FISH с зондом MaCat (зеленый) и антителами против белка SMC3 (красный) в ядрах 1-клеточного зародыша в фазе G₁ и в ядрах 2-клеточных зародышей в S-фазе соответственно; *в* — иммуно-FISH с зондом MaCat (зеленый) и АТ против белка SYCP3 (красный) в ядрах 2-клеточных зародышей в S-фазе; *г* — иммуно-FISH с зондом MaCat (зеленый) и АТ против белка Rad21 (красный) когезинового комплекса на ПКХ 2-клеточного зародыша, обработанного ОА в конце S-фазы. МПН и ЖПН — соответственно мужской и женский пронуклеусы. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабные линейки — 5 мкм.

крывает всю область ПЯ, так как остаются места, свободные от гибридизационного сигнала.

При окрашивании зародышей антителами в качестве маркера ПЯ использовали MaCat, поскольку наибольшее перекрытие с ПЯ обнаруживает MaCat (рис. 3, 4). Определяли распределение РНК-геликазы р68 на ПКХ 1-клеточного зародыша (рис. 5, *a*), обработанного ОА через 19 ч после введения ХГ (фаза G₁), и в интактных ядрах 2-клеточного зародыша (рис. 5, *б*), полученного через 43 ч после введения ХГ (S-фаза). Видно, что основной сигнал р68 выявляется в составе ПЯ (рис. 5, *a*), вокруг которых располагаются радиально отходящие ПКХ. В ядрах зародышей на 2-клеточной стадии р68, колокализуясь с MaCat, выявляется в составе всех ПЯ (рис. 5, *б*). На фокальных срезах 0.7—1.4 мкм по периферии ПЯ наблюдается частичная колокализация р68 и гибридизационных сигналов MaCat, тогда как в середине (фокальные срезы 5.6—7.0 мкм) и в верхнем объеме ядер (данные не представлены) РНК-геликазы р68 полностью колокализуется с гибридизационными сигналами MaCat. Для лучшей визуализации результатов представлена трехмерная реконструкция тех же ядер, повернутая на 90° (рис. 5, *в*).

Обязательными компонентами большинства ПЯ является также ряд белков когезинового (рис. 6, *a, б, г*) и синаптонемного (рис. 6, *в*) комплексов. Результаты иммуно-FISH с пробами MaCat и АТ против субъединиц SYCP3 (рис. 6, *в*) синаптонемного и SMC3 (рис. 6, *a, б*), Rad21 (рис. 6, *г*) и STAG2 (данные не представлены) когезинового комплексов свидетельствуют о гетерогенности распределения исследуемых проб относительно ПЯ. Если в 1-клеточном зародыше на стадии G₁ (рис. 6, *a*) в ЖПН наблюдается практически полная колокализация сигналов MaCat и SMC3 по всей площади ПЯ, то в МПН SMC3 обнаруживается в основном по периферии ПЯ, частично колокализуясь с MaCat. Гетерогенность в распределении SMC3, SYCP3 и MaCat сохраняется в ядрах 2-клеточного зародыша в S-фазе (рис. 6, *б, в*). Наряду с ПЯ, на которых гибридизационные сигналы MaCat полностью или частично колокализируются с субъединицами SMC3 (рис. 6, *б*) и SYCP3 (рис. 6, *в*), в ядрах зародышей присутствуют ПЯ, окрашенные DAPI, но свободные от MaCat и SMC3 (рис. 6, *б*). Субъединица Rad21 когезинового комплекса на препаратах ПКХ 2-клеточного зародыша, обработанного ОА в S-фазе, также колокализуется с

гибридизационными сигналами MaCat и выявляется на всех ПЯ точно или кластерами. Кластеры, наиболее интенсивно окрашенные DAPI, соответствуют местам прикрепления ПКХ к ПЯ (рис. 6, *з*). Вдоль ПКХ, отходящих от ПЯ, гибридные сигналы MaCat частично колокализуются с Rad21. Конфигурация хроматина в виде колеса («cartwheel»; Debey et al., 1989), наблюдаемая при воздействии ОА на 1-клеточные зародыши (рис. 1, *а, б; 5, а*), характерна и для ПКХ 2-клеточных зародышей (рис. 2, *б, левое ядро; 6, з*).

Таким образом, обязательными компонентами большинства ПЯ являются РНК-геликаза р68, субъединицы SMC3, Rad21, STAG2 когезинового и SYCP3 синаптонемного комплексов. Распределение белков и MaCat относительно ПЯ гетерогенно: в ядрах зародышей присутствуют ПЯ, на поверхности которых наблюдается полная или частичная колокализация исследуемых белков и MaCat; ПЯ, на которых выявляются либо MaCat, либо исследуемые белки, и ПЯ, окрашенные DAPI и свободные как от гибридных сигналов, так и от белков.

Обсуждение

Используя препараты зародышей точно датированных сроков развития и ПКХ на 1- и 2-клеточной стадиях развития, мы определяли взаимосвязь разных сатДНК CEN- и пери-CEN-районов относительно ПЯ. Результаты гибридной интактных и обработанных ОА зародышей с пробами сатДНК на 1- и 2-клеточной стадиях свидетельствуют о том, что CEN- и пери-CEN-районы хромосом ассоциированы с ПЯ на протяжении фаз G₁ (рис. 3, *а*), S (рис. 2, *а; 3, б*) и G₂ (рис. 2, *б; 6, з*) клеточного цикла. Наибольшее перекрытие с ПЯ обнаружил пери-CEN MaCat, деконденсированные гибридные сигналы которого занимают большую площадь ПЯ, тогда как CEN МиСат, MS3 и пери-CEN MS4 выявляются преимущественно по периферии ПЯ небольшими глобулами и кластерами. Наши результаты совпадают с литературными данными о локализации MaCat и МиСат относительно ПЯ в ядрах зародышей на 1- и 2-клеточной стадиях (Probst et al., 2007). Мы показали, что различные компартменты вокруг ПЯ занимают не только CEN МиСат и пери-CEN MaCat, но MaCat и MS4 пери-CEN-района (рис. 3, *а*). Распределение гибридных сигналов сатДНК вне ПЯ совпадает с данными электронно-микроскопических исследований и интенсивности включения меченых нуклеотидов в S-фазе, показавшими в ядрах зародышей присутствие позднореплицирующегося хроматина вне ПЯ (Ferreira, Carmo-Fonseca, 1997).

Распределение сатДНК по периферии ПЯ совпадает с районами, интенсивно окрашенными интеркалирующими красителями (рис. 3, *б; 4, а*), но имеющиеся пробы не покрывают полностью эти районы. Остается открытым вопрос о том, какие еще последовательности могут быть ассоциированы с поверхностью ПЯ. Методом гибридной *in situ* на растянутых хроматиновых фибриллах (fiber FISH) показан перемежающийся порядок фрагментов сатДНК в CEN и пери-CEN-областях: MS3 прерывает поле МиСат, а MS4 прерывает поле MaCat (Kuznetsova et al., 2006). Однако остались места хроматиновой фибриллы, не покрытые ни одним из 4 гибридных сигналов. Полагают, что блоки сатДНК перемежаются с блоками не сатДНК (Radic et al., 1987). Возможно также существование в области CEN- и пери-CEN-районов хромосом

мышь других, еще неизвестных последовательностей сатДНК.

Многочисленные данные о том, что рибосомные гены и молекулярные компоненты зрелых ядрышек выявляются на поверхности ПЯ, свидетельствуют об участии ПЯ в сборке активного ядрышкового аппарата (Baran et al., 1995; Ferreira, Carmo-Fonseca, 1995; Zatssepina et al., 2003). Однако методом FISH с мечеными пробами рибосомной ДНК (рДНК) показана гетерогенность популяции ПЯ в 2-клеточных зародышах мыши по наличию рДНК и, следовательно, по участию в образовании зрелых ядрышек (Коробова и др., 2003; Zatssepina et al., 2003). Показано, что не все ПЯ, расположенные в одном ядре, ассоциированы с белками, отвечающими за транскрипцию рДНК, синтез и процессинг новосинтезированной рРНК. С другой стороны, в составе ПЯ или на их поверхности выявляются белки, а также малые ядерные РНК, которые не имеют прямого отношения к синтезу рРНК (Biggiogera et al., 1994; Ferreira, Carmo-Fonseca, 1995; Baran et al., 2001; Martin et al., 2006). Эти факты указывают на то, что, несмотря на свое название, ПЯ могут выполнять функции, не связанные с организацией ядрышка.

Наши результаты свидетельствуют о том, что обязательным компонентом большинства ПЯ являются РНК-геликаза р68 и ряд белков когезинового и синаптонемного комплексов. Показано, что р68 принимает участие в регуляции многих клеточных процессов: сплайсинге и процессинге РНК; регуляции при инициации и репрессии транскрипции; процессе гетерохроматинизации, т. е. взаимодействии с белковыми комплексами, отвечающими за модификацию гистонов (Wilson et al., 2004; Fuller-Pace, 2006). У дрозофилы гомолог РНК-геликазы р68 входит в состав RISC-комплекса, играющего ключевую роль в РНК-интерференции. Роль коротких интерферирующих РНК (siRNA) оказалась важной для организации центрального конститутивного гетерохроматина у дрожжей (Verdel et al., 2004) и высших млекопитающих (Bernstein et al., 2003; Fukagawa et al., 2004). У всех изученных организмов в гетерохроматинизации принимают участие белки семейства РНК-геликаз DEAD. Однако механизмы, обеспечивающие рекрутирование компонентов siRNA в CEN-районы хромосом, пока еще плохо изучены. Известно, что вскоре после оплодотворения под воздействием цитоплазматических факторов яйцеклетки начинается динамичное репрограммирование генома яйцеклетки и сперматозоида. Одним из таких факторов является белок нуклеоплазмин, отвечающий за деконденсацию хроматина спермия, модификацию гистонов и формирование гетерохроматина (Mac Arthur, Shackleford, 1997; McLay, Clarke, 2003). Показано, что этот белок деконденсирует пери-CEN-гетерохроматин (Tamada et al., 2006). Предполагается, что в это время с CEN- и пери-CEN-районов идет активная транскрипция, которая необходима для запуска процессов гетерохроматинизации, опосредованной РНК-интерференцией (Schramke, Allshire, 2003).

Широкий спектр функций присущ также белкам когезинового комплекса (Павлова, Закиян, 2003). Когезиновый комплекс в значительной мере определяет сцепление сестринских хроматид в митозе и мейозе (Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997). Общая структура комплекса определяется гетеродимером SMC1—SMC3, который является по всей длине хромосом дрожжей, включая центромеры (Watanabe, 2005). При взаимодействии гетеродимера SMC с субъединицей Scc1/Mcd1/Rad21 происходит замыкание структуры в кольцо. В мейозе с белками

SMC1 α и SMC3 непосредственно взаимодействуют белки SYCP2/SCP2 и SYCP3/SCP3 осевых элементов синаптонемного комплекса (Eijpe et al., 2000). Результаты исследований молекулярных механизмов конденсации отцовских и материнских хромосом показали, что рекрутирование конденсинового комплекса в ЖПН и МПН происходит разными и независимыми путями (Bomar et al., 2002). Поскольку конденсин вытесняет когезиновый комплекс во время конденсации ДНК хромосом, регуляция ассоциации компонентов когезинового и синаптонемного комплексов с CEN- и пери-CEN-районами хромосом в ядрах зародышей, вероятно, также происходит за счет разных механизмов. Взаимодействие белков когезинового комплекса зависит от модификаций хроматина, поэтому гетерогенность в распределение SMC3 и Rad21 (рис. 6, а—в) относительно ПЯ, по-видимому, отражает различие в эпигенетических модификациях хроматина родительских геномов. В дальнейшем необходимо изучение участия компонентов синаптонемного комплекса в составе ПЯ, в частности SYCP3 (рис. 6, в), и его роли в процессах структурно-функциональной реорганизации и регуляции эмбрионального генома. Показано, что в профазе I мейоза мышинных ооцитов SYCP3 локализуется в ядрышке (Prieto et al., 2004), а в мышинных сперматоцитах SYCP3 и Rad21 на этой же стадии локализуются в CEN-районе (Parral et al., 2004). Структуры, содержащие белки когезинового и синаптонемного комплексов, обнаружены в белковых телах в ооцитах птиц (Krasikova et al., 2005). Предполагается, что одной из функций накопления этих белков в CEN-районе, с которыми ассоциированы белковые тела, является поддержание структуры хромосомы типа ламповых щеток (Krasikova et al., 2005).

О структурной роли ПЯ в ядрах 1- и 2-клеточных зародышей свидетельствуют также данные о том, что сатДНК CEN- и пери-CEN-районов ассоциированы с ПЯ в течение всего клеточного цикла. Возможно, что одной из функций ПЯ является удержание всех хромосом в определенной части ядра при прохождении зародышем клеточного цикла и участие в становлении упорядоченной организации хромосом.

Различия в репрограммировании и модификации хроматина CEN- и пери-CEN-районов в пронуклеусах (Santos et al., 2005; Martin et al., 2006; Van der Heijden et al., 2006) позволяют предполагать наличие разного эпигенетического статуса ПЯ в ЖПН и МПН. После объединения родительских геномов различия в структуре ПЯ сохраняются на дальнейших стадиях развития и, возможно, определяют участие ПЯ в структурно-функциональной реорганизации ядер зародышей, в частности при гетерохроматинизации и формировании хромоцентров и ядрышка. Перераспределение хроматина с поверхности ПЯ на протяжении 2-клеточной стадии и формирование в ядрах зародышей прохромоцентров, в состав которых входит преимущественно поздно реплицирующиеся CEN- и пери-CEN-районы хромосом (Martin et al., 2007), свидетельствуют о том, что ПЯ являются предшественниками не только ядрышек, но и хромоцентров. Примечательно, что начальные этапы транскрипции рибосомных генов и формирование прохромоцентров совпадают с началом тотальной активации эмбрионального генома и происходят с середины 2-клеточной стадии (Lathman, 1999; Коробова и др., 2003; Martin et al., 2006). Таким образом, в ядрах 1- и 2-клеточных зародышей ПЯ являются мультифункциональными доменами. Дальнейшие исследования компонентов ПЯ и механизмов формирования и динами-

ки ассоциации хромосом с ПЯ помогут расширить наши представления о значении и роли ПЯ в структурно-функциональной реорганизации ядер зародышей на доимплантационных стадиях.

Особую благодарность хотелось бы выразить д-ру I. Prieto за любезное предоставление нам антител против субъединиц SMC3 и Rad21 когезинового комплекса и антител против субъединицы SYCP3 синаптонемного комплекса. Эта работа не могла бы быть выполнена без поддержки и внимания Е. Р. Гагинской и А. В. Красиковой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 07-04-01216а и 08-04-01069а) и с использованием оборудования ЦКП «Хромас» при БиНИИ С.-Петербургского государственного университета.

Список литературы

- Коробова Ф. В., Нониашвили Е. М., Романова Л. Г., Ларионов О. А., Дыбан А. П., Зацепина О. В. 2003. Локализация рибосомных генов в двухклеточных зародышах мыши. Биол. мембр. 20 : 446—471.
- Павлова С. В., Закиян С. М. 2003. Структурные белки семейства SMC (Structural Maintenance of Chromosome) и их роль в реорганизации хроматина. Генетика. 39 : 1301—1316.
- Самошкина Н. А., Голинский Г. Ф., Дыбан А. П. 1988. Исследование первого цикла репликации ДНК в эмбриогенезе мышей при помощи микроинъекции ³H-тимидина в цитоплазму оплодотворенных яйцеклеток. Онтогенез. 19 : 583—589.
- Baran V., Vessel J., Koppel J. 1993. Immunolocalization of the DNA in preimplantation mouse embryo. Folia Biol. 39 : 100—105.
- Baran V., Vessel J., Rehk P., Koppek J., Flechon J.-E. 1995. Localization of fibrillarin and nucleolin in nucleoli of mouse preimplantation embryos. Mol. Reprod. Develop. 40 : 305—310.
- Bernstein E., Kim S. Y., Carmell M. A., Murchison A. P., Alcorn H., Li M. Z., Mills A. A., Elledge S. J., Anderson K. V., Hannon K. J. 2003. Dicer is essential for mouse development. Nat. Genet. 35 : 215—217.
- Biggiogera M., Martin T. E., Gordon J., Amalric F., Fakan S. 1994. Physiologically inactive nucleoli contain nucleoplasmic ribonucleoproteins: immunoelectron microscopy of mouse spermatids and early embryos. Exp. Cell Res. 213 : 55—63.
- Bomar J., Moreira P., Balise J. J., Philippe C. 2002. Differential regulation of maternal and paternal chromosome condensation in mitotic zygotes. J. Cell Sci. 115 : 2931—2940.
- Debey P., Ranard J.-P., Coppey-Moisan M., Monnot I., Geze M. 1989. Dynamics of chromatin changes in live one-cell mouse embryos: a continuous follow-up by fluorescence microscopy. Exp. Cell Res. 183 : 413—443.
- Dozortsev D., Coleman M. S., Nagy P., Diamond M., Ermilov A., Weier U., Liyanage M., Reid T. 2000. Nucleoli in a pronuclei stage mouse embryo are represented by major satellite DNA of interconnecting chromosomes. Fertil. Steril. 73 : 366—371.
- Dyban A. P. 1983. An improved method for chromosome preparation from preimplantation mammalian embryos, oocytes or isolated blastomeres. Stain Technol. 58 : 69—72.
- Dyban A. P., De Sutter P., Verlinsky Y. 1993. Okadaic acid induces premature chromosome condensation reflecting the cell cycle progression in one-cell stage mouse embryos. Mol. Reprod. Develop. 34 : 402—415.
- Eijpe M., Heyting C., Gross B., Jessberger R. 2000. Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. J. Cell Sci. 113 : 673—682.

- Favre B., Turowski P., Hemmings B. A. 1997. Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin. *J. Biol. Chem.* 271 : 13 856—13 863.
- Ferreira J., Carmo-Fonseca M. 1997. Genome replication in early mouse embryos follows a defined temporal and spatial order. *J. Cell Sci.* 110 : 889—897.
- Elechon J.-E., Kopečný V. 1998. The nature of «nucleolus precursor body» in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. *Zygote.* 6 : 183—191.
- Fukagawa T., Nogami M., Yoshikawa M., Ikeno M., Okazaki T., Takami Y., Nakayama T., Oshimura M. 2004. Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nat. Cell Biol.* 6 : 784—791.
- Fuller-Pace F. V. 2006. DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucl. Acid. Res.* 34 : 4206—4215.
- Geuskens M., Alexandre H. 1984. Ultrastructural and autoradiographic studies of nucleolar development and rRNA transcription in preimplantation mouse embryos. *Cell Differ.* 14 : 125—134.
- Guacci V., Koshland D., Strunnikov A. 1997. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell.* 91 : 47—57.
- Krasikova A., Barbero J. L., Gaginskaya E. 2005. Cohesion proteins are present in centromere protein bodies associated with avian lampbrush chromosomes. *Chromosome Res.* 13 : 675—685.
- Kuznetsova I. S., Prusov A. N., Erukashvily N. I., Podgornaya O. I. 2005. New type of the mouse centromeric satellite DNA. *Chromosome Res.* 13 : 9—25.
- Kuznetsova I. S., Podgornaya O. I., Ferguson-Smith M. A. 2006. High-resolution organization of mouse centromeric and pericentromeric DNA. *Cytogenet. Genome Res.* 112 : 248—255.
- Latham K. E. 1999. Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. *Int. Rev. Cytol.* 193 : 71—124.
- Martin C., Beaujean N., Brochard V., Audouard C., Zink D., Debey P. 2006. Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development. *Develop. Biol.* 292 : 317—332.
- MacArthur C. A., Shackelford G. M. 1997. Npm3: a novel, widely expressed gene encoding a protein related to the molecular chaperones nucleoplamin and nucleophosmin. *Genomics.* 42 : 137—140.
- McLay D. W., Clarke H. J. 2003. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction.* 125 : 625—633.
- Michaelis C., Ciosk R., Nasmyth K. 1997. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell.* 91 : 35—45.
- Parra M. T., Viera A., Gómez R., Page J., Benavente R., Santos J. L., Rufas J. S., Suja J. A. 2004. Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J. Cell Sci.* 117 : 1221—1234.
- Prieto I., Tease C., Pezzi N. 2004. Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Res.* 12 : 197—213.
- Probst A. V., Santos F., Reik W., Almouzni G., Dean W. 2007. Structural differences in centromeric heterochromatin are spatially reconciled on fertilisation in the mouse zygote. *Chromosoma.* 116 : 403—415.
- Radic M. Z., Lundgren K., Hamkalo B. A. 1987. Curvature of mouse satellite DNA and condensation of heterochromatin. *Cell.* 50 : 1101—1108.
- Santos F., Hendrich B., Reik W., Dean W. 2002. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Develop. Biol.* 241 : 172—182.
- Santos F., Peters A. H., Otte A. P., Reik W., Dean W. 2005. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell in mouse embryos. *Develop. Biol.* 280 : 225—236.
- Schramke V., Allshire R. 2003. Hairpin RNAs and retrotransposons LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. *Science.* 301 : 1069—1074.
- Tamada H., Van Thuan N., Reed P., Nelson D., Katoku-Kikyo N., Wudel J., Wakayama T., Kikyo N. 2006. Chromatin decondensation and nuclear reprogramming by nucleoplamin. *Mol. Cell Biol.* 26 : 1259—1271.
- Van der Heijden G. V., Derijck A. A. H. A., Ramos L., Giele M., van der Vlag L., de Boer P. 2006. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Develop. Biol.* 298 : 458—469.
- Verdel A., Jia S., Gerber G., Sugiyama T., Gygi S., Grewal S. I. S., Moazed D. 2004. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by RITS complex. *Science.* 303 : 672—676.
- Watanabe Y. 2005. Sister chromatid cohesion along arms and at centromeres. *Trends in Genet.* 21 : 405—412.
- Wilson B. J., Bates G. J., Nicol S. M., Gregory D. J., Perkins N. D., Fuller-Pace F. V. 2004. The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. *BMC Mol. Biol.* 5 : 11.
- Zatsepina O., Baly C., Chebrou M., Debey P. 2003. The step-wise assembly of a functional nucleolus in preimplantation mouse embryos involves the cajal (coiled) body. *Develop. Biol.* 253 : 66—83.

Поступила 17 XI 2008

LOCALIZATION OF SATELLITE DNA
AND ASSOCIATED PROTEIN IN RESPECT TO NUCLEOLAR PRECURSOR BODIES
IN ONE- AND TWO-CELL MOUSE EMBRYOS

E. V. Gavrilova,^{1,*} I. S. Kuznetsova,¹ N. I. Erukashvily,¹ E. M. Noniashvily,²
A. P. Dyban,² O. I. Podgornaya¹

¹ Institute of Cytology RAS, and ² Institute of Experimental Medicine RAMN, St. Petersburg;

* e-mail: shelbys@mail.ru

Nucleolar precursor bodies (NPB) are characteristic structures in the nuclei of one- and two cell mouse embryos. The alignment of centromeric (CEN) and pericentromeric (periCEN) chromosomal regions to the chromatin layer surrounding NPB is known. *Mus musculus* 4 satellite DNA (satDNA) types are known to be located in CEN region — mouse minor satellite (MiSat) and mouse satellite 3 (MS3); and periCEN region — mouse major satellite (MaSat) and mouse satellite (MS4). We determined the localization of 4 types of mouse satDNA CEN and periCEN regions and associated proteins: RNA-helicase p68, SMC3, Rad21 subunits of the cohesin comp-

lex and SYCP3 subunit of the synaptonemal complex (SC). Partially flattened nuclei of the one- and two-cell embryos and embryos treated with oocadaic acids (OA) were used. Different satDNA fragments revealed distinct domains at the surface of NPB: periCEN MaSat was always localized in NPB more internally covering almost entire surface of NPB while CEN MiSat, MS3 and periCEN MS4 showed more peripheral localization. All 4 satDNA did not cover the entire areas of the NPB, indicating the presence of other DNA sequence involved in its formation. RNA-helicase p68 and components of multiprotein cohesin and synaptonemal complexes are the necessary components of NPB. Our results support the opinion that NPB serve as a precursor of chromocenters.

Key words: centromere region, pericentromere region, satellite DNA, nucleolar precursor bodies, RNA-helicase p68, proteins of cohesin and synaptonemal complexes.
