

РОЛЬ ХРОМАТОИДНЫХ ТЕЛЕЦ И ЦИТОСКЕЛЕТА В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ КРЫСЫ

© Е. С. Снигиревская,¹ М. И. Мосевичкий,² Я. Ю. Комиссарчик¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

и ² С.-Петербургский институт ядерной физики РАН, Гатчина, Ленинградская область;

¹ электронный адрес: snigir@incras.ru

Проведено ультраструктурное и иммуноцитохимическое исследование мужских половых клеток крысы на разных стадиях их дифференцировки. Анализ структурных изменений сперматогенных клеток продемонстрировал наличие тесных топографических связей между хроматидными тельцами (ХТ) и другими внутриклеточными органеллами — ядром и аппаратом Гольджи, а также выявил связь нецентросомных микротрубочек (МТ) манжетки с плазматической мембраной (ПМ) перинуклеарного кольца сперматиды в области адгезивного промежуточного межклеточного контакта (ПК). Сравнение полученных результатов с данными литературы позволило проанализировать возможные пути нуклеации нецентросомных МТ в поздних сперматидах. Высказывается предположение о том, что МТ собираются на сайтах ПК перинуклеарного кольца. Иммуноцитохимический анализ выявил в исследованных клетках два новых белка — BASP1 и MARCKS. Показано, что на ранних стадиях сперматид эти белки присутствуют в ХТ, тогда как при формировании сперматозоидов они обнаруживаются в наружных плотных фибриллах (НПФ) хвоста сперматозоида. Предполагается, что в изучаемых клетках белки BASP1 и MARCKS участвуют в процессах аккумуляции ионов кальция в ХТ и НПФ, играющего существенную роль в процессинге РНК и протеиновом синтезе, а также в мобильности сперматозоидов, определяемой в большей степени НПФ.

Ключевые слова: сперматогенез крысы, хроматидное тельце, наружные плотные фибриллы, микротрубочки, манжетка, BASP1, MARCKS.

Принятые сокращения: АГ — аппарат Гольджи, МТ — микротрубочки, НПФ — наружные плотные фибриллы, ПК — промежуточный контакт, ПМ — плазматическая мембрана, ХТ — хроматидное тельце.

Сперматозоид — одна из сложно устроенных и в достаточной степени загадочных клеток, обладающих такими специфическими органеллами, как акросома и хвост, необходимыми для выполнения основной функции сперматозоидов — оплодотворения. Несмотря на то что сейчас для изучения процессов формирования спермиев используются самые современные методические подходы, существует еще много непонятого в том, как из слабо дифференцированных первичных половых клеток возникают эти высокоспециализированные полярные подвижные клетки.

Сперматогенез млекопитающих происходит в специализированном органе мужской особи — семеннике, содержащем семенные каналцы, выстланные многослойным эпителием, содержащим клетки — предшественники мужских половых клеток, сперматозоидов. Показано, что у базальной мембраны семенного каналца располагаются два типа клеток: клетки Сертоли и стволовые клетки, которые дифференцируются в первичные половые клетки — сперматогонии (Хэм, Кормак, 1983; Дроздов, Иванов, 2000; Gilbert et al., 2000; Vogl et al., 2000; Wang et al., 2008). В совокупности с базальной мембраной и со стволовыми клетками клетки Сертоли создают надежный гематотестикулярный барьер за счет присутствия между

ними ряда специализированных межклеточных контактов (Redenbach et al., 1992; Vogl et al., 2000; Wang et al., 2008). Важно отметить большую лабильность межклеточных связей в ходе формирования зрелых половых клеток, в связи с чем семенник представляет собой прекрасную модель для изучения динамики как межклеточных контактов, так и элементов цитоскелета *in situ* (Wang et al., 2008). Хорошо известна роль цитоскелета в сохранении межклеточных взаимоотношений, формы клетки, в поддержании и регуляции многих клеточных функций, в том числе клеточной подвижности, внутриклеточного транспорта и др.

Существенное значение в дифференцировке сперматид и их подготовке к оплодотворению придают организации их цитоскелета, представленного микрофиламентами, промежуточными филаментами и микротрубочками (МТ). Имеется много данных, указывающих на то, что в процессе развития сперматогенных клеток цитоскелет претерпевает весьма серьезные изменения (см. обзоры: Kierszenbaum, Tres, 2004; Xiao, Yang, 2007). Наряду с перечисленными элементами цитоскелета, присутствующими в большинстве соматических клеток, сперматозоиды обладают совершенно уникальными цитоскелетными структурами. Это наружные плотные фибриллы (НПФ),

входящие в состав хвоста спермия, а также сложно организованная сеть МТ, так называемая манжетка, окутывающая удлиняющееся ядро сперматозоида и существующая только в поздний период спермиогенеза; ей придают важную роль в формообразовании вытянутой головки спермия. Кроме того, манжетка, которая возникает одновременно с вытягиванием сперматиды и конденсацией ядра, возможно, обеспечивает пути транспорта молекул в акросому и в хвост сперматиды и облегчает нуклеоцитоплазматический обмен через ядерные поры (Kierszenbaum, 2002).

Характерной особенностью сперматогенеза является то, что транскрипционная активность ядер практически прекращается на поздних стадиях формирования спермиев, в которых происходит сильная компактизация хроматина в результате замещения гистонов протаминами (Kotaja, Sassone-Corsi, 2007). В связи с этим большое значение придать процессам запасаения мРНК и активации процессов трансляции ряда белков, необходимых для инициации дальнейшего развития зародышевых клеток (Fawcett et al., 1970; Shibata et al., 2004; Parvinen, 2005; Perquetti et al., 2009). Эту функцию исследователи приписывают внутриклеточной структуре развивающихся сперматид — хроматидному тельцу (ХТ). В последние годы в составе ХТ выявлено большое количество белков, участвующих в регуляции процесса сперматогенеза, хотя функции многих из них пока до конца не поняты (Vasileva et al., 2009).

Вопрос о наличии и локализации тех или иных сигнальных белков в различных тканях и клетках многоклеточных животных является одним из важнейших вопросов клеточной биологии. Применение иммуноцитохимических методов позволяет выявить ряд белков, ранее в данных клетках неизвестных. В частности, белки BASP1 и MARCKS, впервые описанные в мозге млекопитающих, где им придавалось большое значение в контроле структурных изменений цитоскелета в конусах роста аксонов, до недавнего времени считались белками, специфическими именно для нервной ткани (Mosevitsky et al., 1994; Mosevitsky, 2005; Zakharov, Mosevitsky, 2010). Однако в последние годы выяснилось, что эти белки имеют гораздо более широкое распространение. Показано, что ген BASP1 экспрессируется также в почке, селезенке (Novitskaya et al., 1994; Mosevitsky et al., 1997; Carpenter et al., 2004; Sanchez-Nino et al., 2010), хрусталике глаза (Bagchi et al., 2008) и культивируемых клетках (HeLa и фибробластах) (Zakharov et al., 2003; Hartl et al., 2009). С помощью методов светооптической иммуногистохимии эти белки были обнаружены также в семенниках крыс (Mosevitsky, Silicheva, 2011), однако использованные в этой работе методы не позволили определить внутриклеточную локализацию белков. В дальнейшем для этой цели нами был применен метод электронно-микроскопической иммуноцитохимии.

Несмотря на то что специфические для сперматид млекопитающих внутриклеточные органеллы — ХТ, манжетка и НПФ — достаточно хорошо изучены морфологическими, биохимическими и молекулярно-биологическими методами, в понимании их организации есть еще некоторые пробелы, требующие дополнительных исследований. Полностью не решены такие вопросы, как дифференцировка округлых сперматид в сперматозоиды и механизмы построения новых клеточных структур в клетке, обладающей неактивным ядром, особенности сигнальных путей внутриклеточного транспорта в развивающейся сперматиде, приобретение клеткой полярности, воз-

никновение подвижности у спермия и др. (Fawcett, 1970; Fawcett et al., 1970; Russell, Frank, 1978; Söderström, 1981; Paniagua et al., 1985; Shibata et al., 2004; Parvinen, 2005; Kotaja et al., 2006; Kotaja, Sassone-Corsi, 2007; Perquetti et al., 2009; Vasileva et al., 2009; Kierszenbaum et al., 2011).

В настоящей работе рассматриваются некоторые вопросы, связанные с дифференцировкой сперматозоидов млекопитающих. В частности, анализируются структурные изменения цитоскелета в ходе дифференцировки сперматид, а также распределение белков BASP1 и MARCKS в эпителии семенных канальцев крыс на разных стадиях спермиогенеза, изученные с помощью электронно-микроскопической иммуноцитохимии.

Материал и методика

Работу проводили на сперматогенной ткани взрослых крыс линии Вистар. Для проведения ультраструктурного анализа фрагменты ткани семенника крысы фиксировали 2.5%-ным раствором глутаральдегида в 0.05 М фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 1.5 ч при комнатной температуре с последующей постфиксацией в 1%-ном растворе OsO₄ в том же буфере. Материал дегидратировали с помощью этилового спирта восходящей концентрации (до 96 %) и абсолютного ацетона и заливали в Эпон—Аралдит (Миронов и др., 1994). Ультратонкие срезы контрастировали раствором уранил-ацетата на 40%-ном этиловом спирте и цитратом свинца. Объекты просматривали в электронном микроскопе JEM-100U.

Иммуноцитохимический анализ проводили на срезах тканей семенника, залитых в акриловую смолу LR-White. Объекты фиксировали в течение 1—1.5 ч при комнатной температуре в растворе, содержащем 4 % формальдегида и 0.1 % глутаральдегида в 0.05 М фосфатном буфере (pH 7.4). Дегидратацию и пропитку материала проводили также при комнатной температуре, а полимеризацию смолы — при 52—54 °С. Ультратонкие срезы монтировали на никелевые сеточки, которые помещали на каплю соответствующего реагента в ходе иммуноцитохимической обработки материала. Для исключения неспецифического связывания антител сначала срезы инкубировали в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатном солевом растворе (PBS), pH 7.4 (Sigma, США), в течение 20 мин. Затем срезы в течение 1 ч выдерживали на капле поликлональных антител к белку BASP1 или к белку MARCKS, разведенных в 100 раз PBS, содержащим 0.1 % бычьего сывороточного альбумина; после этого многократно промывали 0.05%-ным раствором Твин-20 в PBS. Затем срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре в растворе протеина А, конъюгированного с коллоидным золотом (10 или 15 нм; Polyscience, США), заменяющего вторые антитела, промывали 0.05%-ным раствором Твин-20 в PBS. Контролем служили срезы, не обработанные антителами к изучаемым белкам (Миронов и др., 1994). Срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM 100U.

Результаты

Ультраструктура эпителиальных клеток семенного канальца. Проведенный морфологический анализ эпителия семенных канальцев взрослой кры-

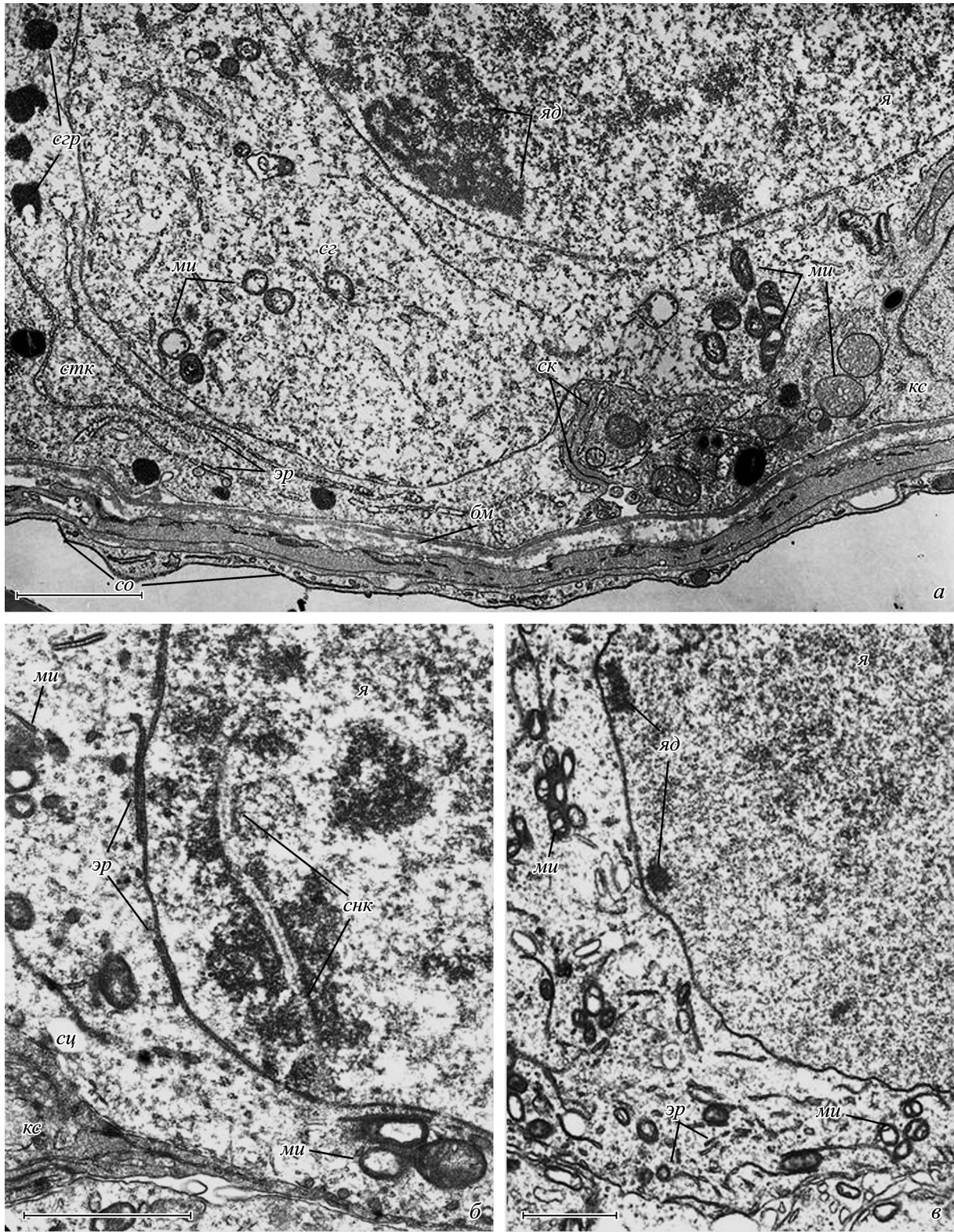


Рис. 1. Клетки сперматогенного эпителия семенника крысы на разных стадиях дифференцировки.

а — клетки разных типов эпителия, подстилаемые базальной мембраной (бм): сг — сперматогонии; стволовые клетки (стк) соединяются с клетками Сертоли (кц) соединительными комплексами (ск). б — сперматоцит I порядка (сц) в состоянии мейотического деления может быть идентифицирован по наличию в его ядре синаптонемального комплекса (снк); в цитоплазме сперматоцита видны группы митохондрий (ми), содержащие осmioфильное вещество между ними, а также уплощенные мембранные цистерны, располагающиеся вдоль ядерной мембраны. в — ранняя сперматид имеет ядро с неровными очертаниями и примембранным расположением ядрышек, митохондрии, расположенные группами, короткие цистерны эндоплазматического ретикулума (эр). Остальные обозначения: я — ядро, яд — ядрышко, сгр — секреторные гранулы, со — серозная оболочка. Масштабные отрезки — 0,5 мкм.

сы продемонстрировал наличие в нем нескольких типов клеток, характеризующихся разными особенностями их ультраструктуры и относящихся к разным стадиям сперматогенеза.

Клетки, прилегающие к базальной мембране, окружающей семенной каналец, рассматриваются в литературе как стволовые клетки. Для них характерно наличие длинных и узких цистерн эндоплазматического ретикулума, довольно большого количества рибосом и отдельных секреторных гранул (рис. 1, *a*). К стволовым клеткам примыкают соматические клетки с типичными признаками высокой секреторной активности. Это клетки Сертоли, питающие и защищающие развивающиеся половые клетки. Их цитоплазма заполнена большим количеством рибосом и каналов эндоплазматического ретикулума, а также секреторными гранулами (рис. 1, *a*). Митохондрии этих клеток существенно отличаются по своей ультраструктуре от митохондрий сперматогенных клеток. Они содержат электронно-плотный матрикс и трубчатые, плотно упакованные кристы.

Сперматогонии, развившиеся из стволовых клеток, дают начало двум генерациям сперматоцитов. Отличить по ультраструктуре друг от друга сперматоциты 1-го и 2-го порядков довольно трудно. Однако наличие в ядрах некоторых из них синаптомембранных комплексов свидетельствует о том, что это сперматоциты 1-го порядка. Цитоплазма сперматоцитов содержит мелкие митохондрии, располагающиеся группами по 3—5 сечений в группе (рис. 1, *b*). Обращает на себя внимание наличие бесструктурного осмиофильного материала, который подобно цементу связывает между собой митохондрии и в ряде старых работ рассматривается как предшественник ХТ (рис. 1, *b*).

Основной акцент в работе делается на изучение ультраструктуры сперматид, с развития которых начинается процесс собственно спермиогенеза.

Ранние сперматиды — это округлые небольшие клетки с неровными контурами ядерной оболочки, мелкими митохондриями, часто собранными в группы, с короткими каналами эндоплазматического ретикулума (рис. 1, *b*). В ядрах ранних сперматид встречаются небольшие ядрышки, располагающиеся вблизи ядерной оболочки (рис. 1, *b*). Сперматиды формируются путем деления сперматоцитов 2-го порядка. При этом деление происходит не до конца, и между отдельными сперматидами остаются цитоплазматические мостики (рис. 2, *a*). В процессе дифференцировки ядра сперматид приобретают более ровные контуры и овальную форму, митохондрии распределяются по периферии клетки (рис. 2, *a, б*). Не выделяя в нашем материале все этапы дифференцировки сперматид, эти клетки можно отнести к разряду средних сперматид. Ядрышки на этой стадии часто располагаются по периферии ядра.

К ядру обычно примыкает сильно развитый аппарат Гольджи (АГ), представленный стопкой плотно упакованных узких цистерн, вогнутой транс-поверхностью направленных в сторону ядра (рис. 2, *b*). К цисповерхности АГ примыкает цистерна эндоплазматического ретикулума. Стопка состоит из 4—10 цистерн и множества отпочковывающихся от них мелких гладких и окаймленных пузырьков размером 60—90 нм. На этих стадиях дифференцировки в сперматиде выявлены признаки формирующейся акросомы. Последняя представляет собой цистерну, которая располагается между ядром и АГ, прилекая к обеим структурам и окружая примерно половину ядра в виде шапочки. В верхней части акросомы присут-

ствует акросомный пузырек, или гранула. Между ядерной оболочкой и акросомой выявляется еще один слой — акроплакса, или цитоскелетная пластина (рис. 2, *a—в*; 4, *в, e*). При большом увеличении видно, что это пространство между акросомой и ядерной оболочкой структурировано (рис. 4, *e*). В акроплаксе выявлены строго упорядоченные пучки актиновых и промежуточных филаментов, которые связывают между собой акросому и ядерную оболочку. Промежуточные филаменты регулярно распределены по краевой области акроплаксы (рис. 4, *e*).

Наличие большого количества везикул между АГ и ядром может говорить о том, что в формировании акросомы участвуют пузырьки АГ (рис. 2, *a, б*). Это так называемые проакросомные пузырьки. Полностью сформированная акросома наблюдается в поздней удлиненной сперматиде, имеющей компактное ядро (рис. 3, *в*). Характерной особенностью как ранних, так и средних и поздних сперматид является наличие в их цитоплазме ХТ, представленного гомогенным фибриллярно-гранулярным материалом, не ограниченным мембраной. В ранних округлых сперматиде ХТ, как правило, имеют размер не больше 0.5 мкм и почти не содержат в своем составе везикул. На рис. 3, *a* такой материал имеет форму рыхло свернутого жгута толщиной около 15—20 нм с просветами, лежащего свободно в цитоплазме. В более поздних сперматиде ХТ становятся крупнее (до 1—1.5 мкм в диаметре) и более плотными, но содержат полости в строении фибриллярно-гранулярного материала (рис. 2, *a—в*; 3, *б, в*).

Характерной особенностью ХТ является тесная связь этого рыхлого материала с везикулами и тубулами, которые окружают строму ХТ и частично включены в ее полости. Диаметр этих везикул и поперечных сечений тубул 60—90 нм такой же, как и в составе АГ. Интересно, что как в ранних, так и в поздних сперматиде наблюдается разнообразная локализация ХТ: по периферии клетки около плазматической мембраны, в пределах мостика, соединяющего разные сперматиды, свободно в цитоплазме без связи с другими органеллами, вблизи АГ или клеточного ядра (рис. 2, *a, в*; 3, *a—в*). Причем в последнем случае иногда можно проследить связь осмиофильного содержимого ХТ и ядра через ядерные поры (рис. 3, *б*). В ХТ, располагающихся вблизи АГ, можно проследить непрерывность в распределении везикулярных компонентов этих двух органелл (рис. 2, *в*).

Уплотнение содержимого ядра и вытягивание его в виде веретена, а также появление жгутика свидетельствуют о формировании из сперматид сперматозоида (рис. 3, *в*; 4, *a, б, г*). На темном осмиофильном фоне в ядре выявляются отдельные менее плотные участки, не ограниченные мембранами; ядерная оболочка плотно прилегает к содержимому ядра и не имеет ядерных пор (рис. 3, *в*; 4, *б*). Со стадией уплотнения ядра совпадает появление в цитоплазме сперматид элементов хвоста сперматозоида. В зависимости от уровня поперечного сечения через хвост можно наблюдать разные картины его структуры. На границе шейки со средним отделом, в области аннелюса, выявляются типичные ХТ, окружающие базальное тельце, сформированное дистальной центриолью (рис. 3, *в*; 4, *a*).

От дистальной центриоли отходит аксонема, состоящая из дублетов МТ (9+2) и простирающаяся через весь хвост сперматозоида (рис. 4, *a, б*). Хвост состоит из нескольких частей, различающихся толщиной и характером оболочки: так, средняя часть хвоста окружена митохондриальной оболочкой и ПМ, основная — фиброзной обо-

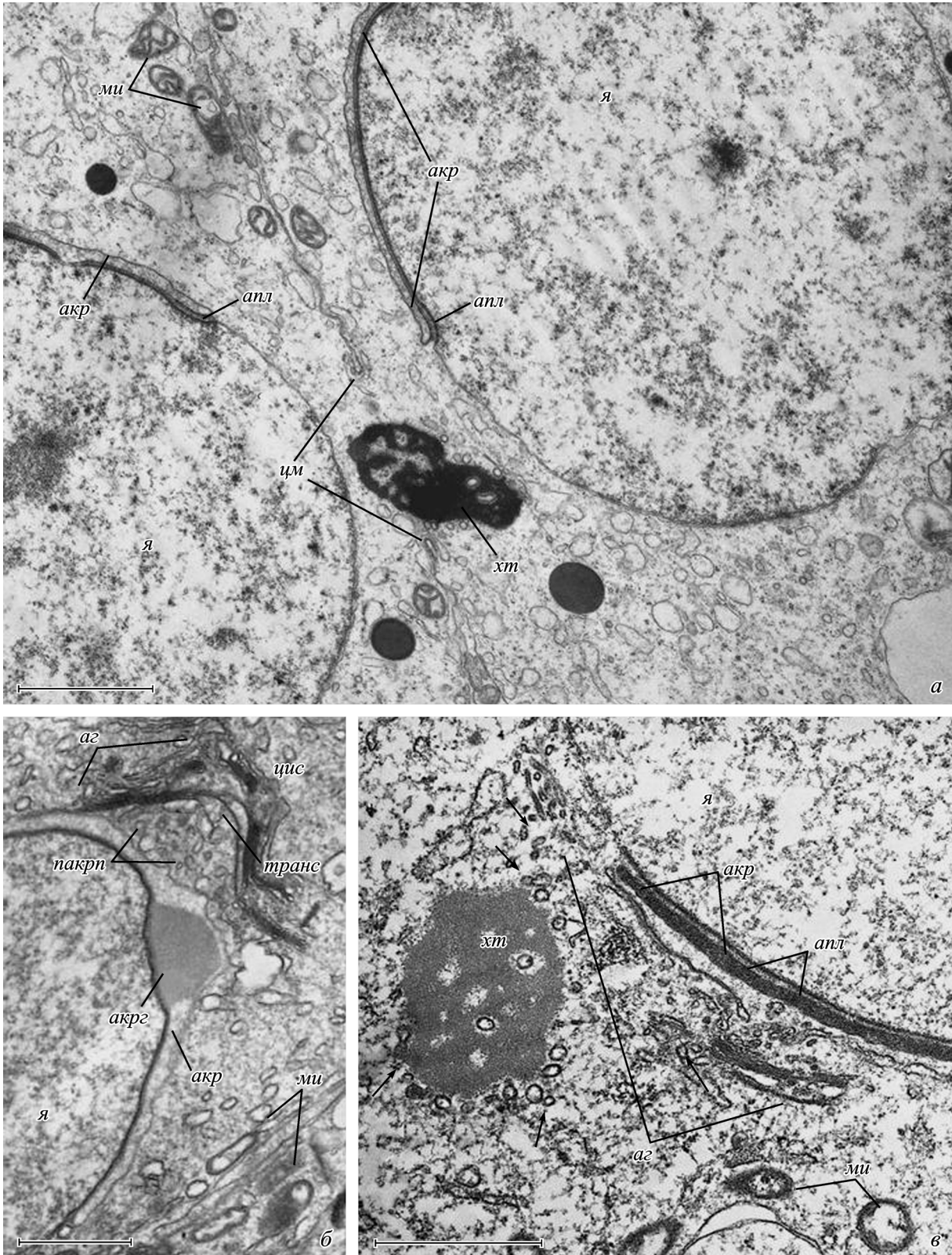


Рис. 2. Участки средней округлой сперматиды.

а — две сперматиды, соединенные цитоплазматическим мостиком (*цм*), в котором видно хроматоидное тельце (*хт*); мелкие митохондрии распределяются вдоль плазматической мембраны, в цитоплазме встречается большое количество мембранных тубул и везикул. *б* — сперматиды на стадии формирования акросомы (*акр*); трансперхность (*транс*) аппарата Гольджи (*аг*) направлена в сторону ядра (*я*); между ядром и АГ располагаются многочисленные проакросомные пузырьки (*пакрп*); *цис* — цисповерхность АГ; в акросоме видна акросомная гранула (*акрг*). *в* — расположение ХТ вблизи АГ и ядра; около всех органелл выявляются сходные по размерам мембранные пузырьки (*стрелки*). *апл* — акроплакса. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабные отрезки — 0,5 мкм.

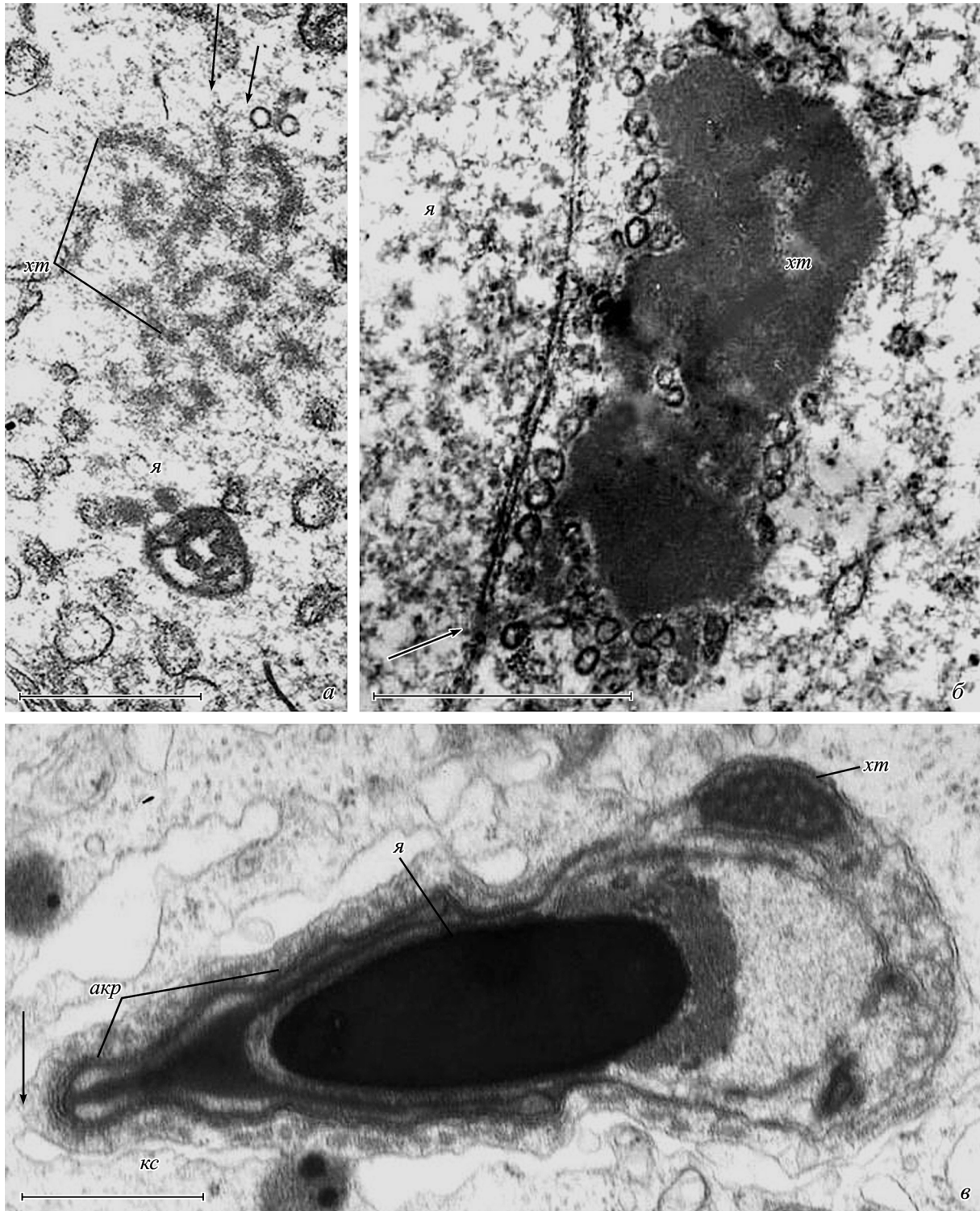


Рис. 3. Хроматидные тельца (*хт*) сперматид, находящихся на разных стадиях дифференцировки.

а — не полностью сформированное хроматидное тельце, состоящее из рыхло свернутого жгута фибриллярно-гранулярного материала и лишь двух сечений везикул (*стрелки*). *б* — контакт ХТ с ядром сперматиды; видна связь осмиофильного материала ядра и ХТ через пору ядерной оболочки. *в* — почти полностью сформированный сперматозоид (поздняя удлиненная сперматид), в основании головки которого располагается ХТ; сперматозоид еще связан с клеткой Сертоли (*стрелка*). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабные отрезки — 0,5 мкм.

лочкой и ПМ, конечный участок хвоста покрыт только ПМ. В сформировавшемся сперматозоиде в средней части хвоста вокруг аксонемы видны дополнительные цитоскелетные структуры — НПФ. Последние, относительно толстые фибриллы (до 1 мкм в диаметре), состоят из го-

могенного осмиофильного материала. В поперечном сечении средний сегмент хвоста похож на цветок, в котором вокруг располагающейся по центру аксонемы находится 9 сечений плотных фибрилл, напоминающих лепестки, так как каждая фибрилла своим суженным

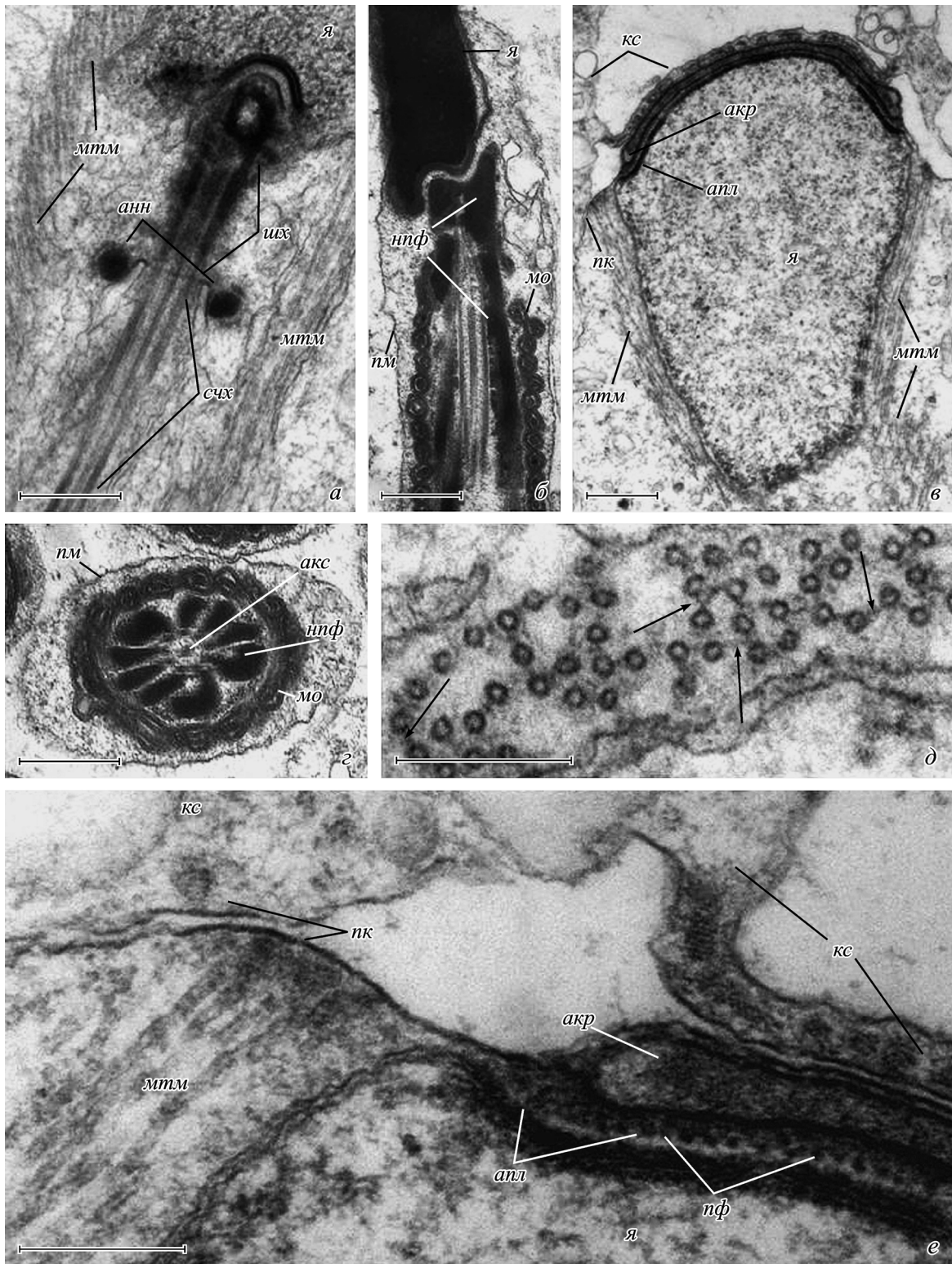


Рис. 4. Детали ультраструктуры удлиненной сперматиды.

а — в формирующемся сперматозоиде видна структура — аннулюс (*анн*), разделяющая шейку (*их*) и среднюю часть хвоста (*счх*); каудальная часть ядра и хвост окружены микротрубочками манжетки (*мтм*). *б* — на более поздних этапах дифференцировки выявляется более компактное ядро, в средней части хвоста видны наружные плотные фибриллы (*нпф*) и митохондриальная оболочка (*мо*). *в* — удлиненная сперматида связана с клеткой Сертоли в областях акросомы и перинуклеарного кольца; между акросомой и ядром располагается цитоскелетная пластина — акропласма (*апл*); в области перинуклеарного кольца между клеткой Сертоли и развивающимся сперматозоидом наблюдается межклеточный промежуточный контакт (*пк*), от которого простираются микротрубочки манжетки, окружающей ядро сперматиды. *г* — поперечный срез хвоста в области его среднего участка; аксонема (*акс*), состоящая из 9 пар дублетов микротрубочек и окружающих ее 9 НПФ, покрыта митохондриальной оболочкой и плазматической мембраной (*пм*). *д* — поперечный срез через слой микротрубочек манжетки, окружающей ядро в его каудальной части; *стрелками* указаны поперечные связи между микротрубочками. *е* — зона контакта сперматиды и клетки Сертоли; в области перинуклеарного кольца выявляется промежуточный контакт, в котором закорены микротрубочки манжетки (*мтм*); в краевой зоне акропласмы (*апл*) видны упорядоченные пучки промежуточных филаментов (*пф*). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабные отрезки — 0,2 мкм.

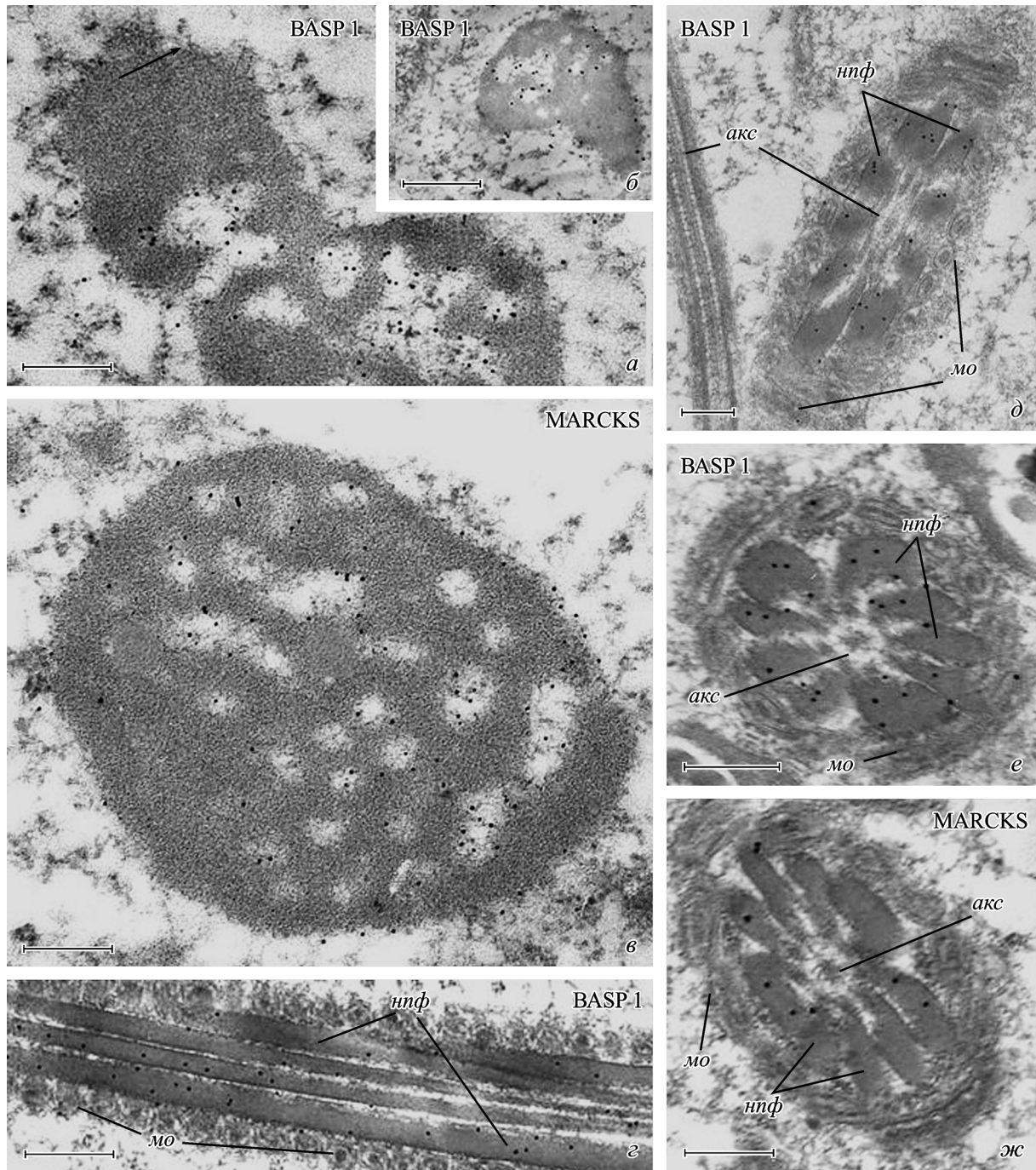


Рис. 5. Мечение белков BASP1 и MARCKS на ультратонких срезах сперматогенного эпителия крысы с помощью поликлональных антител и протеина А, конъюгированного с коллоидным золотом.

a — золотая метка (10 нм), связанная с белком BASP1, распределяется в основном в полостях ХТ. *б* — то же с размером частиц золота 15 нм. *в* — распределение метки (10 нм) к белку MARCKS в ХТ ранней сперматиды. *г* — метка к белку BASP1 (10 нм) выявляется на продольных срезах НПФ хвоста сперматозоида. *д* — на срезах, косо проходящих через хвост спермия; в области аксономы метка отсутствует. *е* — на поперечном срезе через хвост видно распределение метки к BASP1 в НПФ. *ж* — метка к белку MARCKS также видна в области НПФ. Обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабные отрезки — 0.2 мкм.

краем направлена к центру (рис. 4, *г*; 5, *г*—*ж*). Все эти элементы видны также и на продольных срезах, прошедших через хвост спермия (рис. 4, *б*; 5, *е*, *ж*).

По мере дифференцировки сперматид они транспортируются в сторону протока семенного канальца, будучи закрепленными на поверхности клеток Сертоли апикальными специализированными контактами (эктоплазматическая специализация) типа *zonula adhaerens*, или проме-

жуточного контакта (ПК) (рис. 4, *е*). В сперматиде эта зона контакта располагается на перинуклеарном кольце, которое в виде выростов цитоплазмы окружает среднюю часть ядра сперматиды. На срезах эта область выглядит как бульбообразные выросты цитоплазмы сперматиды по бокам от ядра и называется в литературе тубуло-бульбарным комплексом. Считается, что клетки Сертоли через этот контакт участвуют в регуляции процессов диф-

ференцировки сперматиды в сперматозоид (Vogl et al., 2000; Lie et al., 2010). Последний этап дифференцировки сперматид — это процесс спермации и переход сперматозоидов в придаток семенника, где и завершается их созревание.

Параллельно с изменениями ядра и ХТ существенные изменения происходят и в тубулиновом цитоскелете сперматиды. Именно на стадии удлинения ядра в сперматиде появляются многочисленные МТ, окружающие ядро сперматиды. Пучок параллельных МТ окружает ядро, располагаясь параллельно его поверхности и образуя вокруг него так называемую манжетку. Манжетка состоит из типичных нецентросомных МТ, выполняющих в клетках, как известно, транспортную и формообразующую функции (Снизиревская, Комиссарчик, 2003). МТ манжетки закориваются в ПМ перинуклеарного кольца, которое удерживает сперматиду в связи с клеткой Сертоли (рис. 4, е). На поперечных срезах пучка манжетки между отдельными МТ выявляются тонкие филаменты, которые вместе с МТ образуют вокруг ядра спермия подобие кружевной сети (рис. 4, д). Возможно, это МТ-ассоциированные белки.

Иммунная локализация белков BASP1 и MARCKS в сперматиде и сперматозоиде. Использование поликлональных антител к указанным белкам позволило локализовать их на разных стадиях формирования сперматозоидов. На исследуемом материале эти белки впервые наблюдаются в ранних сперматиде в области ХТ. Протеин А, конъюгированный с коллоидным золотом и взаимодействующий с первыми АТ, распределяется в основном по внутренним поверхностям полостей внутри фибриллярно-гранулярного материала. Полученные данные указывают на то, что BASP1 (рис. 5, а, б) и MARCKS (рис. 5, в) распределены в ХТ практически одинаково. При дифференцировке сперматид в сперматозоиды обе метки выявляются в наружных плотных фибриллах (рис. 5, г—е). Очень слабая метка к обоим белкам встречается в ядре и в остаточных телах. К сожалению, нам не удалось с определенной степенью достоверности выявить метку к этим белкам в ХТ сперматозоидов.

Обсуждение

Полученные в настоящей работе результаты по ультраструктурной организации клеток эпителия семенных канальцев крысы в ходе сперматогенеза в большой степени совпадают с данными литературы (Fawcett, 1970; Fawcett et al., 1970, 1971; Gunawardana, Scott, 1977; Russell, Frank, 1978; Baltz et al., 1990; Swan, Alboghobeish, 1997; Lloyd et al., 2002).

Многочисленные исследования последних лет с очевидностью указывают на то, что дифференцировка половых клеток млекопитающих в значительной степени определяется процессингом РНК, запасаемой клеткой на стадии ранней сперматиды в ХТ — высокоспециализированных органеллах. Считается, что ХТ со связанными структурами осуществляют посттранскрипционный процессинг и участвуют в запасании нескольких видов мРНК, которые распределяются между соседними клетками и используются для трансляции, когда геном сперматид становится неактивным (Paniagua et al., 1985; Ventela et al., 2003; Shibata et al., 2004; Parvinen, 2005; Kotaja, Sassone-Corsi, 2007; Peruquetti et al., 2009).

Целый ряд иммуногистохимических и биохимических исследований указывает на то, что ХТ состоят главным образом из РНК и РНК-связанных белков — snRNP и hnRNP, а также ферментов, осуществляющих модификацию мРНК (Vasileva et al., 2009). Это такие резидентные белки хроматоидных телец, как MVH, Aubergine, Tudor domain protein, RNAase Dicer. Их сиквенс свидетельствует об участии в посттранскрипционной модификации РНК (Noce et al., 2001; Parvinen, 2005). Основная функция этих белков — сохранить аккумулярованную в ХТ мРНК и затем в нужное время активировать определенные виды мРНК для трансляции. Этот процесс может происходить на связанных с ХТ полисомах, которые были обнаружены при их изоляции, наряду со структурными белками актином и тубулином (Figuroa, Burzio, 1998; Parvinen, 2005). При этом демонстрируется полное отсутствие в них ДНК (Paniagua et al., 1985; Biggiogera et al., 1990).

ХТ описаны в мужских зародышевых клетках всех видов млекопитающих. В разное время их происхождение связывали с ядром, ядрышком или интермитохондриальным материалом. В последние годы наиболее широко распространено мнение о том, что происхождение ХТ связано с мигрировавшим в цитоплазму материалом ядрышка, фрагментированного в раннем сперматогенезе (Parvinen, 2005). В настоящей работе на ультратонких срезах сперматид четко выявляются топографические связи ХТ с ядром и АГ. На основании этих данных мы предположили, что АГ может являться источником некоторых компонентов, необходимых для регуляции процессов дифференцировки. Такая точка зрения находит свое подтверждение в литературе (Anton, 1983; Thorne-Tjomsland et al., 1988). Цитируемые авторы показали, что некоторые везикулы, являющиеся компонентами ХТ, выявляют кисло-фосфатазную активность и NADPase и (или) СМРase, свойственную компартаментам АГ.

Очень интересны данные работы, проведенной с помощью цейтраферной киносъемки на живом материале (Parvinen et al., 1997). Авторы наблюдали быстрые движения ХТ по цитоплазме сперматид с некоторыми остановками около ядра и АГ. Исследователи, повторившие эти опыты, отмечают, что подвижность ХТ напоминает транспорт нейрональных гранул, содержащих РНК и РНП, из тела клетки в дендриты (Chuma et al., 2009).

По-видимому, в миграции ХТ по цитоплазме участвуют как актиновые филаменты, так и цитоплазматические МТ. Имеются данные о непосредственной связи этих элементов цитоскелета с ХТ (Andonov, 1990; Ventela et al., 1993; Parvinen, 2005). Деполимеризация МТ антитубулиновыми агентами приводит к ингибированию движения и разборке ХТ (Parvinen, Jokelainen, 1974). В последние годы в ХТ выявлен ряд белков, функции которых до сих пор неясны. В частности, неизвестны функции таких белков, как Mili, Miwi, и Tudor-домениных белков, которые описаны в их составе (Kotaja, Sassone-Corsi, 2007; Vasileva et al., 2009; Meikar et al., 2010). Роль новых для этих клеток белков BASP1 и MARCKS, обнаруженных нами в ХТ, также остается неясной. Оказалось, что на стадиях ранних и средних сперматид BASP1 и MARCKS присутствуют в ХТ, тогда как при формировании сперматозоидов эти белки появляются в НПФ хвоста сперматозоида.

НПФ, локализующиеся в средней части хвоста сперматозоида, — уникальные цитоскелетные структуры, роль которых до конца не расшифрована (Shao et al., 1997, 1999; Petersen et al., 1999; Henkel et al., 2009). Показано, что НПФ состоят из 7 мажорных белков и ряда ме-

нее обильных белков, некоторые из которых охарактеризованы (Shao et al., 1997, 1999; Kim et al., 1999; Petersen et al., 1999; Ricci, Breed, 2001; Tarnasky et al., 2010). Оказалось, что необходимый для развития нормальной мобильности сперматозоидов белок ODF2 имеет центросомное происхождение (Nakagawa et al., 2001; Tarnasky et al., 2010).

Обнаружение нами белков BASP1 и MARCKS в ХТ и НПФ свидетельствует об их определенной роли в организации этих структур. По аналогии с их ролью в нервных окончаниях, где они описаны наиболее полно, можно предполагать, что белки BASP1 и MARCKS в мужских зародышевых клетках участвуют в регуляции процессов, связанных с кальциевым обменом (Mosevitsky et al., 1997, 2011). Известно, что в мозге эти белки, связываясь с кальмодулином кальцийзависимым образом, регулируют связи между актином и плазматической мембраной. Поэтому можно предполагать, что наличие BASP1 и MARCKS в ХТ может объяснить факт аккумуляции в этой органелле ионов Ca^{2+} , описанный в литературе (Andonov, 1990; Andonov, Chaldakov, 1991; Rouelle-Rossier et al., 1993; Chakravarthy et al., 1999). Как один из мессенджеров внутриклеточного метаболизма Ca^{2+} и связанный с ним кальмодулин могут активировать процессы, происходящие в ХТ, в частности процессинг РНК и протеиновый синтез (Brosstrom, Brostrom, 2003), а также движения ХТ к ядру и АГ (Parvinen, 2005).

Наличие белков BASP1 и MARCKS в НПФ может свидетельствовать об их участии в кальцийзависимых энергетических процессах, обеспечивающих биение хвоста сперматозоида при его направленном движении к яйцеклетке. Предполагается, что НПФ поддерживают эластичную структуру жгутика во время его биения и помогают сохранить целостность хвоста во время транспорта сперматозоидов в эпидидимис и при эякуляции (Haidl et al., 1991; Petersen et al., 1999; Henkel et al., 2009). О важной роли BASP1 и НПФ в процессах спермиогенеза свидетельствуют косвенные данные, полученные в экспериментах на мышах с химерным геном BASP1 (Frey et al., 2000). В этом гене регуляторные области были сохранены, а кодирующая область была заменена кодирующей областью белка GAP-43, который в мозге осуществляет функции, подобные таковым BASP1. В результате эти мыши вместо BASP1 экспрессировали GAP-43. При этом животные оказались жизнеспособными, но стерильными, что свидетельствует о важной роли BASP1 в процессах, ответственных за фертильность.

В ходе изменений формы и размеров развивающихся клеток, а также появляющейся способности зародышевых клеток к движению серьезным структурным перестройкам подвергаются и другие элементы цитоскелета сперматид. Изменения сопровождаются реструктурированием межклеточных соединений между половыми клетками и клетками Сертоли и между самими клетками Сертоли, достаточно полно рассмотренным в ряде обзоров (Xiao, Yang, 2007; Vogl et al., 2008; Lie et al., 2010).

Многочисленными исследованиями последних лет продемонстрировано, что цитоскелет обуславливает ряд важнейших клеточных функций: движение, внутриклеточный транспорт веществ и органелл, проницаемость межклеточных контактов и др. (Vogl et al., 2000; Lie et al., 2010).

В настоящей работе показано, что ранние и средние сперматиды содержат в своей цитоплазме все известные элементы цитоскелета — МТ, актиновые и промежуточ-

ные филаменты. В поздних, удлиняющихся сперматиде элементы цитоскелета организуют сложные комплексы, частично временные, которые функционируют в кооперации друг с другом в процессе созревания сперматозоида. Это такие структуры, как аксонема, окруженная НПФ в средней части хвоста, манжетка, состоящая из нецентросомных МТ, упорядоченные пучки актиновых и промежуточных филаментов в области акроплаксома. Кроме того, названные фибриллы и МТ сопровождаются ассоциированными с ними моторными и более мелкими белками.

В литературе имеются данные о том, что в сперматиде млекопитающих, дифференцирующихся в сперматозоиды, обнаружены три типа МТ: цитоплазматические, аксонемные, растущие от дистальной центриоли (Xu et al., 2008), и нецентросомные МТ манжетки (Tres, Kierszenbaum, 1996; Fouquet et al., 1998; Mochida et al., 1998; Kierszenbaum, 2002; Kierszenbaum, Tres, 2004; Kierszenbaum et al., 2011).

В представленной работе показано, что многочисленные нецентросомные МТ появляются в сперматиде на стадии удлинения и компактизации ядра. Они располагаются параллельно поверхности ядра, окружая его со всех сторон и образуя вокруг него манжетку. МТ манжетки закориваются в ПМ перинуклеарного кольца.

Такие структуры, как акросома, акроплакса и манжетка, продемонстрированные в настоящем исследовании, чрезвычайно важны для нормального развития сперматозоида. Дефектное развитие акросомы или разрушение манжетки антитубулиновыми агентами приводит к мужской infertility (Kierszenbaum, 2002; Yao et al., 2002; Kierszenbaum et al., 2004; Kierszenbaum, Tres, 2004; Moreno et al., 2006).

Следует отметить, что литература, посвященная анализу этой в большой степени загадочной структуры, обширна и неоднозначна. Имеются данные о том, что МТ манжетки состоят в основном из модифицированных тубулинов, а именно ацетилированных и детирозинированных изоформ α - и β -тубулинов (Mochida et al., 1998; Kierszenbaum, 2002). МТ простираются от плазматической мембраны перинуклеарного кольца, которая содержит специализированный контакт между сперматидой и клеткой Сертоли типа ПК — zonula adhaerens (Redenbach et al., 1992; Beach, Vogl, 1999; Lee, Cheng, 2004). Таким образом, МТ манжетки плотно связаны с зоной адгезивного межклеточного контакта. При изоляции манжетки МТ всегда выделяются вместе с зоной перинуклеарного кольца (Mochida et al., 1998).

Вопрос о нуклеации нецентросомных МТ, составляющих манжетку, является одним из наиболее интригующих вопросов, связанных с рассмотрением структуры и функции манжетки. В ряде работ на эпителиальных и нервных клетках показано, что МТ могут собираться не только на ЦОМТ или каких-либо внутриклеточных структурах, но и на определенных участках плазматической апикальной мембраны, ядерной мембраны, межклеточных контактах или мембранах АГ (Chabin-Brion et al., 2001; Снигиревская, Комиссарчик, 2003; Rios et al., 2004). В частности, на клетках культуры Сасо 2 (эпителиальные клетки кишечника млекопитающих) показано, что ПК служат местами закоривания минус-концов нецентросомных МТ и, возможно, их сборки (Meng et al., 2008). Эти авторы обнаружили белки, регулирующие функции ПК через катенины «p120», которые связаны с кадгеринами. Эти белки были названы ими PLEKHA7 и Nezha (Meng et al., 2008). Оказалось, что один из этих белков, Nezha, связан с ми-

нус-концами нецентросомных МТ и служит сайтом их закоривания или сборки. Обработка материала нокодазолом нарушает связи в этом комплексе и вызывает фрагментацию ПК. Авторы этой работы рассматривают полярные МТ как пути направленного мембранного транспорта с участием моторных белков. Согласно данным, полученным в этой работе, во внутриклеточном мембранном транспорте участвует один из членов семейства кинезинов — KIFC3, осуществляющий транспорт в направлении минус-конца МТ. Обнаружение близкого представителя семейства кинезинов, KIFC1, в области манжетки может свидетельствовать о его участии в транспорте проакросомных везикул вдоль МТ манжетки (Kierszenbaum et al., 2011).

Нуклеацию МТ манжетки в сперматиде в области ПК можно было бы подтвердить обнаружением в этих участках γ -тубулина. Однако в зоне перинуклеарного кольца обнаружен лишь единственный центриольный белок — δ -тубулин (Fouquet et al., 1998; Kierszenbaum, 2002). В связи с этим авторы высказали предположение о том, что в сборке МТ манжетки участвует адьюнкт проксимальной центриоли, в котором был выявлен γ -тубулин (Fouquet et al., 1998), а на перинуклеарном кольце закрываются не минус-, а плюс-концы МТ, собирающихся на проксимальной центриоли. Однако это предположение не представляется нам достаточно убедительным. Требуются дополнительные иммуноцитохимические и биохимические исследования для более строгого решения вопроса о нуклеации МТ манжетки.

Не исключено, что сайтами нуклеации МТ манжетки могут служить и мембраны АГ, который, как нами было показано в настоящей работе, тесно примыкает к ядру сперматиды. В последние годы АГ описан как еще один центр организации МТ (ЦОМТ) в клетке (Chabin-Brion et al., 2001; Kodani, Sutterlin, 2009). Показано, что нуклеация МТ на АГ требует наличия γ -тубулина и белков АКАР450 и GMAP210. Именно GMAP210 описан в составе манжетки. Однако экспериментально это пока не исследовалось. МТ, собранные на мембранах АГ, быстро ацетируются и становятся более стабильными к обработке нокодазолом. Их плюс-концы стабилизируются в цитоплазме белком CLASP2 (Efimov et al., 2007).

Одной из функций, приписываемых манжетке развивающейся сперматиды, является участие ее МТ во внутриклеточном транспорте везикул АГ, включающихся в формирующуюся акросому. При этом в ряде работ подчеркивается, что транспорт проакросомных пузырьков осуществляется моторными белками, ассоциированными с тубулином (кинезином или динеином) и актином (миозином) (Kierszenbaum, 2001; Kierszenbaum, Tres, 2004; Kierszenbaum et al., 2011).

Как предполагают многие исследователи, комплекс акросома-акроплакса вместе с манжеткой выполняет в сперматиде еще одну функцию кроме транспортной, а именно принимает участие в формировании головки спермия и в развитии полярности спермия во время спермиогенеза (Fawcett et al., 1971; Cole et al., 1988; Meistrich, 1993; Mochida et al., 1998; Kierszenbaum, 2002; Kierszenbaum et al., 2003; Kierszenbaum, Tres, 2004; Göb et al., 2010).

В настоящем исследовании продемонстрировано, что на этапе позднего спермиогенеза обнаруживается удлинение сперматид. Однако механизмы этого процесса до сих пор до конца не выяснены. Одно из объяснений вытягивания сперматиды предложено авторами, которые обнаружили два белковых соединительных комплекса между

ядерной оболочкой и цитоскелетом развивающихся сперматид (Göb et al., 2010). Такая конструкция, по их мнению, позволяет осуществить удлинение сперматиды. Иммуноцитохимическими и биохимическими методами они показали, что эти соединительные белки Sun1 η /Nesprin3 и Sun3/Nesprin1 являются тестис-специфическими.

Другое объяснение механизмов удлинения сперматиды заключается в том, что основная роль в этом процессе принадлежит АГ, а именно двум белкам, которые выявляются в зонах акросомы, манжетки и хвоста: гольджин GMAP210, резидентный белок цисцистерн, и внутрифлагеллярный белок IFT88, характерный для трансцистерн (Kierszenbaum et al., 2003, 2004, 2011). Как считают авторы, оба эти белка участвуют в биогенезе головки и хвоста спермия, способствуя таким образом полярному распределению внутриклеточных органелл и приобретению сперматозоидом удлиненной формы (Kierszenbaum et al., 2004, 2011). Упрощая их объяснение, можно заключить, что удлинение сперматид осуществляется за счет везикулярного транспорта этих белков.

Заключая обсуждение, хотелось бы отметить, что выявленные в зародышевых клетках белки BASP1 и MARCKS играют, по-видимому, существенную роль в функционировании этих клеток. Однако попытки выяснения этих функций не дали положительного результата. Вероятно, потребуются значительные усилия электронных микроскопистов, биохимиков и генетиков с обязательным использованием молекулярно-генетических подходов для решения этого важного вопроса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00018).

Список литературы

- Дроздов А. Л., Иванков В. Н. 2000. Морфология гамет животных. М.: Изд. Дом «Круглый год». 460 с.
- Миронов А. А., Комиссарчик Я. Ю., Миронов В. А. 1994. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука. 495 с.
- Снигиревская Е. С., Комиссарчик Я. Ю. 2003. Нецентросомные микротрубочки в эпителиоцитах при изменении водной проницаемости. Биол. мембраны. 20 : 41—45.
- Хэм А., Кормак Д. 1983. Гистология. М.: Мир. 5 : 295 с.
- Andonov M. 1990. Further study of the chromatoid body in rat spermatocytes and spermatids. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 104 : 46—54.
- Andonov M. D., Chaldakov G. N. 1991. Role of Ca²⁺ and cAMP in rat spermatogenesis — ultrastructural evidences. Acta Histochem. Suppl. 41 : 55—63.
- Anton E. 1983. Association of Golgi vesicles containing acid phosphatase with the chromatoid body of rat spermatids. Experientia. 39 : 393—394.
- Bagchi M., Kousis S., Maisel H. 2008. BASP1 in the lens. J. Cell. Biochem. 105 : 699—702.
- Baltz J. M., Williams P. O., Cone R. A. 1990. Dense fibers protect mammalian sperm against damage. Biol. Reprod. 43 : 485—491.
- Beach S. F., Vogl A. W. 1999. Spermatid translocation in the rat seminiferous epithelium: coupling membrane trafficking machinery to a junction plaque. Biol. Reprod. 60 : 1036—1046.
- Biggiogera M., Fakan S., Leser G., Martin T. E., Gordon J. 1990. Immunoelectron microscopical visualization of ribonucleoproteins in the chromatoid body of mouse spermatids. Mol. Reprod. Develop. 26 : 150—158.
- Brostrom M. A., Brostrom V. O. 2003. Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthe-

sis: implications for cell growth and adaptability. *Cell Calcium*. 34 : 345—363.

Carpenter K. J., Hill K. J., Charalambous M., Wagner K. J., Lahiri D., James D. I. 2004. BASP1 is a transcriptional cosuppressor for the Wilms' tumor suppressor protein WT1. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 537—549.

Chabin-Brion K., Marceiller J., Perez F., Drechou A., Durand G., Pous V. 2001. The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol. Biol. Cell.* 12 : 2047—2060.

Chakravarthy B., Morley P., Whitfield J. 1999. Ca²⁺-calmodulin and protein kinase Cs: a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains. *Trends Neurosci.* 22 : 12—16.

Chuma S., Hosokawa M., Tanaka T., Nakatsuji N. 2009. Ultrastructural characterization of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline: germinal granules in mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306 : 17—23.

Cole A., Meistrich M. L., Cherry L. M., Trestle-Weigle P. K. 1988. Nuclear and manchette development in spermatids of normal and *azh/azh* mutant mice. *Biol. Reprod.* 38 : 385—401.

Efimov A., Kharitonov A., Efimova N., Loncarek J., Miller P. M., Andreyeva N., Gleeson P., Galjart N., Maia A. R., McLeod I. X., Yates J. R., III, Maiato H., Khodjakov A., Akhmanova A., Kaverina I. 2007. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Develop. Cell.* 12 : 917—930.

Fawcett D. W. 1970. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Reprod.* 2 : 90—127.

Fawcett D. W., Anderson W. A., Phillips D. M. 1971. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Develop. Biol.* 26 : 220—251.

Fawcett D. W., Eddy E. M., Phillips D. M. 1970. Observations of the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 2:129—153.

Figueroa J., Burzio L. O. 1998. Polysome-like structures in the chromatoid body of rat spermatids. *Cell Tissue Res.* 291 : 575—579.

Fouquet J. -P., Kann M. L., Combeau V., Melki R. 1998. γ -Tubulin during the differentiation of spermatozoa in various mammals and man. *Mol. Human Reprod.* 4 : 1122—1129.

Frey D., Laux T., Xu L., Schneider V., Caroni P. 2000. Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *J. Cell Biol.* 149 : 1443—1454.

Gilbert S. F. 2000. *Developmental biology*. 6th Ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 749 p.

Gob E., Schmitt J., Benavente R., Alsheimer M. 2010. Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PloSone*. 5 : e12072.

Gunawardana V. K., Scott M. G. A. D. 1977. Ultrastructural studies on the differentiation of spermatids in the domestic fowl. *J. Anat.* 124 : 741—755.

Haidl G., Becker A., Henkel R. 1991. Poor development of outer dense fibers as a major cause of tail abnormalities on the spermatozoa of asthenoteratozoospermic men. *Hum. Reprod.* 6 : 1431—1438.

Hartl M., Nist A., Khan M. I., Valovka T., Bister K. 2009. Inhibition of Myc-induced cell transformation by brain acid-soluble protein 1 (BASP1). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 106 : 5604—5609.

Henkel R., Stalf T., Meriens N., Miska W., Schill W.-B. 2009. Outer dense fibres of human spermatozoa: partial characterization and possible physiological functions. *Intern. J. Androl.* 17 : 68—73.

Kierszenbaum A. L. 2001. Spermatid manchette: plugging proteins to zero into the sperm tail. *Mol. Reprod. Develop.* 59 : 347—349.

Kierszenbaum A. L. 2002. Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Mol. Reprod. Develop.* 63 : 1—4.

Kierszenbaum A. L., Rivkin E., Tres L. L. 2003. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol. Biol. Cell.* 14 : 4628—4640.

Kierszenbaum A., Rivkin E., Tres L. L., Yoder B. K., Haycraft C. J., Bornens M., Rios R. M. 2011. GMAP210 and IFT88 are present in the spermatid Golgi apparatus and participate in the development of the acrosome—acroplaxome complex, head-tail coupling apparatus and tail. *Develop. Dynamics*. 240 : 723—736.

Kierszenbaum A. L., Tres L. L. 2004. The acrosome—acroplaxome—manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol. Cytol.* 67 : 271—284.

Kierszenbaum A. L., Tres L. L. 2010. The acrosome—acroplaxome—manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol. Cytol.* 67 : 271—284.

Kierszenbaum A. L., Tres L. L., Rivkin E., Haycraft V. J., Yoder B. K. 2004. Disrupted intramanchette and intraflagellar cargo transport in spermatids of the *orpk* mutant mouse. *Mol. Biol. Cell.* 15 : 132a.

Kim Y. H., McFarlane J. R., O'Bryan M. K., Almahbobi G., Temple-Smith P. D., de Kretser D. M. 1999. Isolation and characterization of rat sperm tail outer dense fibres and comparison with rabbit and human spermatozoa using a polyclonal antiserum. *J. Reprod. Fertil.* 116 : 345—353.

Kodani A., Sutterlin V. 2009. A new function for an old organelle: microtubule nucleation at the Golgi apparatus. *EMBO J.* 28 : 995—996.

Korshunova I., Caroni P., Kolkova K., Berezin V., Bock E., Walmod P. S. 2008. Characterization of BASP1-mediated neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* 86 : 2201—2213.

Kotaja N., Lin H., Parvinen M., Sassone-Corsi P. 2006. Interplay of PIWI/Argonaute protein MIWI and kinesin KIF17b in chromatoid bodies of male germ cells. *J. Cell Sci.* 119 : 2819—2825.

Kotaja N., Sassone-Corsi P. 2007. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 : 85—90.

Lee N. P. Y., Cheng V. Y. 2004. Ectoplasmic specialization, a testis-specific cell-cell actin-based adherens junction type: is this a potential target for male contraceptive development? *Human Reprod.* 10 : 349—369.

Lie P. P. Y., Mruk D. D., Lee W. M., Cheng V. Y. 2010. Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 346 : 1581—1592.

Lloyd S., Carrick F., Hall L. 2002. Ultrastructure of the mature spermatozoon of the musky rat-kangaroo, *Hypsiprymmodon (Potoroidae: Marsupilia)*. *Acta Zoologica (Stockholm)*. 83 : 167—174.

Meikar O., Da Ros M., Liljenback H., Toppari J., Kotaja N. 2010. Accumulation of piRNAs in the chromatoid bodies purified by a novel isolation protocol. *Exp. Cell Res.* 316 : 1567—1575.

Meistrich M. L. 1993. Nuclear morphogenesis during spermiogenesis. In: *Mol. Biol. of the male reprod. system*. New York: Acad. Press. 67—97.

Meng W., Mushika Y., Ichi T., Takeichi M. 2008. Anchorage of microtubule minus ends to Adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell.* 135 : 948—959.

Mochida K., Tres L. L., Kierszenbaum A. L. 1998. Isolation of the rat spermatid manchette and its perinuclear ring. *Develop. Biol.* 200 : 46—56.

Moreno R. D., Palomino J., Schatten G. 2006. Assembly of spermatid acrosome depends on microtubule organization during mammalian spermiogenesis. *Develop. Biol.* 293 : 218—227.

Mosevitsky M. I. 2005. Nerve ending «signal» proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1. *Int. Rev. Cytol.* 245 : 245—325.

Mosevitsky M. I., Capony J. P., Skladchikova G. Y., Novitskaya V. A., Plekhanov A. Y., Zakharov V. V. 1997. The BASP1 family of myristoylated proteins abundant in axonal termini. Primary structure analysis and physico-chemical properties. *Biochimie*. 79 : 373—384.

Mosevitsky M. I., Novitskaya V. A., Plekhanov A. Yu., Skladchikova G. Yu. 1994. Neuronal protein GAP—43 is a member of novel group of brain acid-soluble proteins (BASPs). *Neurosci. Res.* 19 : 223—228.

Mosevitsky M. I., Silicheva I. A. 2011. Subcellular and regional location of «brain» proteins BASP1 and MARCKS in kidney and testis. *Acta Histochem.* 113 : 13—18.

- Mosevitsky M. I., Snigirevskaya E. S., Komissarchik Ya.Yu. 2011. Immune electron microscopic study of location of proteins BASP1 and MARCKS in the early and late rat spermatids. *Acta Histochem. Epub. Jul.*: 15.
- Nakagawa Y., Yamane Y., Okanou T., Tsukita S., Tsukita S. 2001. Outer dense fiber 2 is a widespread centrosome scaffold component preferentially associated with mother centrioles: its identification from isolated centrosomes. *Mol. Biol. Cell.* 12 : 1687—1697.
- Noce T., Okamoto-Ito S., Tsuekawa N. 2001. VASA homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Struct. Funct.* 26 : 131—136.
- Novitskaya V. A., Skladchikova G.Iu., Plekhanov A. Iu., Mosevitskii M. I. 1994. Detection of BASP1 brain protein in rat reproductive tissue. *Dokl. Akad. Nauk USSR.* 335 : 101—102.
- Paniagua R., Nistal M., Amat P., Rodriguez M. V. 1985. Presence of ribonucleoproteins and basic proteins in the nuage and intermitochondrial bars of human spermatogonia. *J. Anat.* 143 : 201—206.
- Parvinen M. 2005. The chromatoid body in spermatogenesis. *Intern. J. Androl.* 28 : 189—201.
- Parvinen M., Jokelainen P. T. 1974. Rapid movements of the chromatoid body in living early spermatids of the rat. *Biol. Reprod.* 11 : 85—92.
- Parvinen M., Salo J., Tivonen M., Nevalainen O., Soini E., Pelliniemi L. J. 1997. Computer analysis of living cells: movements of the chromatoid body in early spermatids compares with its ultrastructure in snap-frozen preparations. *Histochem. Cell Biol.* 108 : 77—81.
- Peruquetti R. L., Assis I. M., Taboga S. R., de Azeredo-Oliveira M. T. V. 2009. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. *Micron.* 39 : 419—425.
- Petersen V., Fuzesi L., Hoyer-Fender S. 1999. Outer dense fibre proteins from human sperm tail: molecular cloning and expression analyses of two cDNA transcripts encoding proteins of ~70 kDa. *Mol. Hum. Reprod.* 5 : 627—635.
- Redenbach D. M., Boekelheide K., Vogl A. W. 1992. Binding between mammalian spermatid-ectoplasmic specialization complexes and microtubules. *Eur. J. Cell Biol.* 59 : 433—448.
- Ricci M., Breed W. G. 2001. Isolation and partial characterization of the outer dense fibres and fibrous sheath from the sperm tail of a marsupial: the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Reproduction.* 121 : 373—388.
- Rios R. M., Sanchis A., Tasin A. M., Feedriani V., Bornens M. 2004. GMAP-210 recruits gamma-tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation. *Cell.* 118 : 323—335.
- Rouelle-Rossier V. B., Biggiogera M., Fakan S. J. 1993. Ultrastructural detection of calcium and magnesium in the chromatoid body of mouse spermatids by electron spectroscopic imaging and electron energy loss spectroscopy. *Histochem. Cytochem.* 41 : 1155—1162.
- Russell L., Frank B. 1978. Ultrastructural characterization of nuage in spermatocytes of the rat testis. *Anat. Rec.* 190 : 79—97.
- Sanchez-Niño M. D., Sanz A. B., Lorz C., Gnirke A., Rastaldi M. P., Nair V., Egido J., Ruiz-Ortega M., Kretzler M., Ortiz A. 2010. BASP1 promotes apoptosis in diabetic nephropathy. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 21 : 610—621.
- Shao X., Tarnasky H. A., Lee J. P., Oko R., van der Hoorn F. A. 1999. Spag4, a novel sperm protein, binds outer dense-fiber protein Odf1 and localizes to microtubules of manchette and axoneme. *Develop. Biol.* 211 : 109—123.
- Shao X., Tarnasky H. A., Schalles U., Oko R., van der Hoorn F. A. 1997. Interactions cloning of the 84-kDa major outer dense fiber protein Odf84. *J. Biol. Chem.* 272 : 6105—6113.
- Shibata N., Tsunekawa N., Okamoto-Ito S., Akasu R., Tokumasa A., Noce T. 2004. Mouse RanBPM is a partner gene to a germline specific RNA helicase, mouse VASA homolog protein. *Mol. Reprod. Develop.* 67 : 1—7.
- Söderström K. O. 1981. The relationship between the nuage and the chromatoid body during spermatogenesis in the rat. *Cell Tissue Res.* 15 : 425—430.
- Swan M. A., Alboghobeish N. 1997. Improved preservation of the ram spermatozoan plasma membrane using betaine in the primary fixative. *J. Microsc.* 187 : 167—169.
- Tarnasky H., Cheng M., Ou Y., Thundathil J. C., Oko R., van der Hoorn F. A. 2010. Gene trap mutation of murine outer dense fiber protein-2 gene can result in sperm tail abnormalities in mice with high percentage chimaerism. *B. M. V. Develop. Biol.* 10 : 67.
- Thorne-Tjomsland G., Clermont Y., Hermo L. 1988. Contribution of the Golgi apparatus components to the formation of the acrosomic system and chromatoid body in rat spermatids. *Anat. Rec.* 222 : 590—598.
- Tres L. L., Kierzenbaum A. L. 1996. Sak57, an acidic keratin initially present in the spermatid manchette before becoming a component of paraaxonemal structures of the developing tail. *Mol. Reprod. Develop.* 44 : 395—407.
- Vasileva A., Tiedau D., Firooznia A., Müller-Reichert T., Jesberger R. 2009. Tdrd6 is required for spermiogenesis, chromatoid body architecture, and regulation of miRNA expression. *Curr. Biol.* 19 : 630—639.
- Ventela S., Toppari J., Parvinen M. 2003. Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing. *Mol. Biol. Cell.* 14 : 2768—2780.
- Vogl A. W., Pfeiffer D. V., Mulholland D., Kimel G., Guttman J. 2000. Unique and multifunctional adhesion in the testis: ectoplasmic specializations. *Arch. Histol. Cytol.* 63 (1) : 1—15.
- Vogl A. W., Vaid K. S., Guttman J. 2008. The Sertoli cell cytoskeleton. In: *Molecular mechanisms in spermatogenesis.* (Eds. C. Y. Cheng, T. X. Austin). Landes Bioscience/Springer Science+Business Media LLC. 186—211.
- Wang F., Zhang Q., Cao J., Huang Q., Zhu X. 2008. The microtubule plus end-binding protein EB1 is involved in Sertoli cell plasticity in testicular seminiferous Exp. *Cell Res.* 314 : 213—226.
- Xiao X., Yang W. 2007. Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 8 : 498—506.
- Xu B., Hao Z., Jha K. N., Zhang Z., Urekar Z., Digilio L., Pulido S., Strauss J. F., III, Flickinger V., Herr J. V. 2008. TSKS concentrates in spermatid centrioles during flagellogenesis. *Develop. Biol.* 319 : 201—210.
- Yao R., Ito V., Natsume Y., Sugitni Y., Yamanaka H., Kuretake S., Yangida K., Sato A., Toshimori K., Noda T. 2002. Lack of acrosome formation in mice lacking Golgi protein, GOPC. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 11 211—11 216.
- Zakharov V. V., Capony J. P., Derancourt J., Kropolova E. S., Novitskaya V. A., Bogdanova M. N., Mosevitsky M. I. 2003. Natural N-terminal fragments of brain abundant myristoylated protein BASP1. *Biochim. biophys. acta.* 1622 : 14—19.
- Zakharov V. V., Mosevitsky M. I. 2010. Oligomeric structure of brain abundant proteins GAP-43 and BASP1. *J. Struct. Biol.* 170 : 470—483.

THE ROLE OF CHROMATOID BODIES AND CYTOSKELETON
FOR DIFFERENTIATION OF RAT SPERMATOZOIDS

E. S. Snigirevskaya,¹ M. I. Mosevitsky,² Ya. Yu. Komissarchik¹

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg,
and ² St. Petersburg Institute of Nuclear Physics RAS, Gatchina, Leningrad district;
¹ e-mail: snigir@mail.cytspb.rssi.ru

The ultrastructural and immunocytochemical study of rat male germ cells on different developing stages has been made. The investigation of morphological changes of spermatogenic cells has demonstrated the presence of tight connections between chromatoid bodies (CBs) and other cell organelles, particularly with the nucleus and Golgi apparatus; has revealed the association of manchette noncentrosomal microtubules (MT) with spermatid perinuclear ring plasma membrane (PM) in the zone of the adhesion intercellular contact — zonula adhaerens (ZA). The comparison of the results obtained in this work with available literary data has given possibility to analyze expected pathways of noncentrosomal MT nucleation in the late spermatids. This paper puts the supposition that noncentrosomal MTs are nucleated on the sites of perinuclear ring ZA. The immunocytochemical analysis discovered two novel proteins for these cells — BASP1 and MARCKS. It has been shown that these proteins present in the CBs in the early spermatids. During the spermatozoid differentiation these proteins are revealed along the outer dense fibers (ODFs) of the sperm tail. BASP1 and MARCKS are supposed to involve in the processes of calcium accumulation in the CBs and ODFs. Calcium ions seem to play the significant role in RNA processing and protein synthesis in spermatids. Calcium is also necessary for the mobility of sperms which is mainly determined by ODFs.

Key words: rat spermatogenesis. chromatoid body, outer dense fibers, microtubules, manchette, BASP1, MARCKS.
