

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИНА И ФАКТОРОВ ЭКСПОРТА мРНК В ЯДРАХ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ООЦИТОВ МЫШИ

© Г. Н. Почукалина, В. Н. Парфенов

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

Ядерный актин является частью комплекса ремоделирования хроматина, участвует в процессах транскрипции и связывается с синтезированными *de novo* РНП, обеспечивая их транспортировку из ядра. В настоящее время доказывается, что в кластерах интерхроматиновых гранул (КИГ) локализуются многочисленные факторы, вовлеченные как в процессы редактирования мРНК, так и в организацию экспортного комплекса мРНК. Данное исследование посвящено выявлению актина и белка А1 семейства А/В гетерогенной ядерной РНП (гяРНП) в ядрах ооцитов мыши, выделенных из преовуляторных фолликулов с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и электронного иммуномечения. Нами продемонстрировано, что ядерный актин выявляется в ассоциации с хроматином и в связи с КИГ. Совместно с актином в КИГ локализованы компоненты экспортного комплекса мРНК — белок А1 семейства А/В гяРНП и NXF1/TAP. В рамках разрабатываемой в настоящее время концепции об удержании РНК в ядре и участии в этом процессе КИГ, обсуждается роль КИГ в организации единого транскрипционно-экспортного комплекса мРНК, который наряду с мРНК и транскрипционными факторами содержит актин, белок А1 гяРНП и экспортный фактор NXF1/TAP.

Ключевые слова: ядро ооцита мыши, кластеры интерхроматиновых гранул, актин, экспорт мРНК, А1 А/В гяРНП, NXF1/TAP, конфокальная микроскопия, электронная микроскопия.

Принятые сокращения: гяРНП — гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины, КИГ — кластеры интерхроматиновых гранул.

Актин является основным компонентом цитоскелета и играет фундаментальную роль в таких ключевых процессах, как определение формы клеток, клеточная миграция и внутриклеточный транспорт (Moustakas, Heldin, 2008; Papakonstanti, Stournaras, 2008). В 1990-е годы неоднократно поднимался вопрос о присутствии актина в ядре клетки и его возможном участии в экспрессии генов (Egly et al., 1984; Scheer et al., 1984). Однако существование ядерного актина долгое время подвергалось сомнению (Pederson, Aebi, 2002) из-за трудностей биохимической очистки исключительно ядерной фракции актина за счет его высокой концентрации в цитоплазме. Кроме того, в ядре клетки не визуализируются тяжи актина, которые обычно наблюдаются в цитоплазме. Тем не менее исследования, проведенные в последние годы, представили убедительные доказательства существования ядерного актина и его функциональной роли.

Показано, что актин является частью комплекса ремоделирования хроматина, участвует в процессах транскрипции и связывается с синтезированными *de novo* РНП, обеспечивая их транспортировку из ядра. Как и в цитоплазме, ядерный актин ассоциирован с актинсвязывающими белками, которые регулируют его функции и осуществляют взаимодействие между ядерными компонентами. Высказано предположение о том, что ядерный актин существует как в мономерной (G), так и в олигомерной формах, в виде коротких полимерных цепей (Gie-

ni, Hendzel, 2009; Louvet, Percipalle, 2009). Вопрос о присутствии в ядре полимерной-(F) формы актина остается открытым, несмотря на то что в ядре обнаружены многие факторы, которые осуществляют контроль полимеризации и стабилизации цитоплазматического F-актина (Wu et al., 2006; Miki et al., 2008; Zuchero et al., 2009).

Имеются данные о том, что популяция G-актина мигрирует между ядром и цитоплазмой. Его ядерная концентрация зависит от цитоплазматического пула G-актина, от активности механизмов импорта и экспорта и наличия взаимодействий, которые секвестрируют его в ядре. Полимеризация актина в ядре довольно жестко регулируется, и возможно, поэтому фибриллярный ядерный актин имеет конформации, которые не распознаются фаллоидином. Предполагают, что одной из функций ядерного F-актина является его участие в экспорте новосинтезированных РНП.

Известно, что пре-мРНК в форме гетерогенных ядерных (гя) РНК ассоциируют с набором определенных белков, формируя частицы гяРНП. Белки семейства А/В — наиболее многочисленные белки гяРНП, которые принимают участие во многих ядерных функциях, включая и экспорт мРНК (Piñol-Roma, Dreyfuss, 1992; He, Smith, 2009). Так, некоторые коровые белки частиц гяРНП способны связываться с актином (Percipalle et al., 2002, 2003; Kukalev et al., 2005), формируя комплексы гяРНП + актин, которые могут курсировать между ядром и цито-

плазмой (Kisileva et al., 2004; Obrdlik et al., 2010). Механизмы экспорта мРНК и молекулярные факторы, обеспечивающие этот процесс, в настоящее время довольно хорошо охарактеризованы (Reed, Hurt, 2002; Erkmann, Kutay, 2004), в то время как связь этих факторов с конкретными ядерными доменами остается практически неизвестной.

Имеются лишь единичные работы, описывающие внутриядерное распределение отдельных факторов экспорта мРНК в связи с кластерами интерхроматиновых гранул (КИГ) (Schmidt et al., 2006; Bogolyubova et al., 2009). Известно, что экспорт мРНК опосредуется целым рядом белковых факторов, а большинство мРНК экспортируется из ядра по так называемому ТАР-зависимому пути. Белок NXF1/ТАР не относится к карิโอферинам, и для него не требуется энергии Ran-ГТФ, который обычно выступает посредником ядерного импорта (Grüter et al., 1998; Erkmann, Kutay, 2004). Данные по распределению белка NXF1/ТАР в трехмерном пространстве клеточного ядра практически отсутствуют. Однако для другого белка — Ref/Aly, который служит связующим звеном между сплайсингом пре-мРНК и экспортом мРНК (Zhou et al., 2000), продемонстрирована его тесная связь с КИГ.

Наряду с тельцами Кахала и ядрышками КИГ считаются одними из наиболее универсальных, эволюционно консервативных и функционально значимых ядерных доменов (Misteli, Spector, 1998; Dundr, Misteli, 2001; Spector, Lamond, 2011). Установлено, что КИГ принимают непосредственное участие в регуляции экспрессии генов, а не только выступают в качестве простых хранилищ инертных факторов сплайсинга (Hall et al., 2006). Эти домены считают функциональными локальными центрами, которые группируют многие активные гены (Shopland et al., 2003), включая те из них, которые расположены на разных хромосомах (Hu et al., 2008). Показано, что полимерный актин, непосредственно участвуя в транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразами I, II и III, способствует перемещению хроматина. С его помощью активированные гены из разных хромосомных территорий объединяются и располагаются в интерхроматиновом пространстве непосредственно около speckles, которым на ультраструктурном уровне соответствуют КИГ (Parada, Misteli, 2002; Spector, 2003; Chuang et al., 2006; Finlan, Bickmore, 2008). Однако актин, который выявляется в протеоме биохимически изолированных КИГ (Mintz et al., 1999; Saitoh et al., 2004), до сих пор визуализирован в связи или в составе этих доменов лишь в единичных работах (Kisileva et al., 2004; Gedge et al., 2005).

Целью данной работы явилось исследование распределения актина и белка A1 семейства A/B гяРНП в КИГ ядер ооцитов мыши из преовуляторных фолликулов. Ядра таких ооцитов, заканчивающих свой рост, характеризуются пониженной транскрипционной активностью (Зыбина, 1971; Moore et al., 1974; Kaplan et al., 1982), хотя и не полным ее прекращением, о чем свидетельствуют наши данные по включению в них бромовидинтрифосфата (Почукалина, Парфенов, 2008). В таких ядрах содержится значительное количество крупных КИГ, обогащенных фактором сплайсинга SC35. В нашей предыдущей работе было продемонстрировано, что в КИГ преовуляторных ооцитов мыши присутствуют поли (A)⁺-РНК, белки семейства A/B гяРНП и фактор экспорта мРНК NXF1/ТАР (Почукалина и др., 2010).

Материал и методика

Объектом исследования служили ядра ооцитов из антральных фолликулов половозрелых мышей линии Balb/C (21-е сут постнатального развития). Для непрямой иммунофлуоресцентной цитохимии готовили тотальные препараты ооцитов, выделенных из антральных фолликулов, по методике, подробно описанной ранее (Почукалина, Парфенов, 2008).

Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов проводили с помощью следующих первичных моноклональных антител: против фактора сплайсинга пре-мРНК SR-белка SC35 (Fu, Maniatis, 1990) в концентрации 1.25 или 2.5 мкг/мл (предоставлены д-ром Дж. Голлом), 53Н8 против белка NXF1/ТАР человека (Abscam, Великобритания) в разведении 1 : 20, MAV1501R против высококонсервативного N-концевого участка молекулы актина (аминокислоты 50—70) (Chemicon) в разведении 1 : 50. Кроме того, использовали следующие первичные поликлональные антитела: кроличьи антитела против С-концевого фрагмента актина, состоящего из 11 аминокислот (SGPSIVHRKF) (Sigma, США), в разведении 1 : 20, против N-концевого участка молекулы актина, распознающие один или более эпитопов, локализованных на первых девяти аминокислотных остатках (Sigma, США), в разведении 1 : 20. Показано, что последние антитела реагируют в кросс-реакции со всеми изоформами актина (Kumar et al., 1997). А также поликлональные кроличьи антитела H120 против аминокислот 1—120 белка NXF1/ТАР (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США) в разведении 1 : 20, против профилина в разведении 1 : 100 и козы антитела N—15 против эпитопа, расположенного на концевом участке белка A1 семейства A/B гяРНП (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США), в разведении 1 : 50.

При двойном окрашивании препаратов ооцитов использовали смесь соответствующих первичных антител (Сmarko et al., 1999). В качестве вторичных антител использовали козы или кроличьи иммуноглобулины, конъюгированные с флуоресцентными красителями FITC или Alexa (Molecular Probes, США). Препараты заключали в среду Vectashield® (Vector Laboratories, Inc., США), содержащую краситель DAPI в разведении 1 : 1000 для выявления ДНК. Образцы исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SL, оборудованного аргоновым (488нм) и геленеоновым (543 и 633 нм) лазерами. Использовали объектив 40 (АД 1.25).

Для электронно-микроскопического исследования применяли стандартный метод фиксации и заливки ооцитов (Parfenov et al., 1989). Для электронного иммуномечения использовали методику, описанную ранее (Почукалина, Парфенов, 2008). В качестве вторичных антител использовали козы или кроличьи иммуноглобулины, конъюгированные с частицами коллоидного золота диаметрами 10 и 15 нм (Electron Microscopy Sciences, США). Ультратонкие срезы контрастировали 1%-ным водным раствором уранил-ацетата и исследовали с помощью электронного микроскопа Libra 120 при ускоряющем напряжении 80 В.

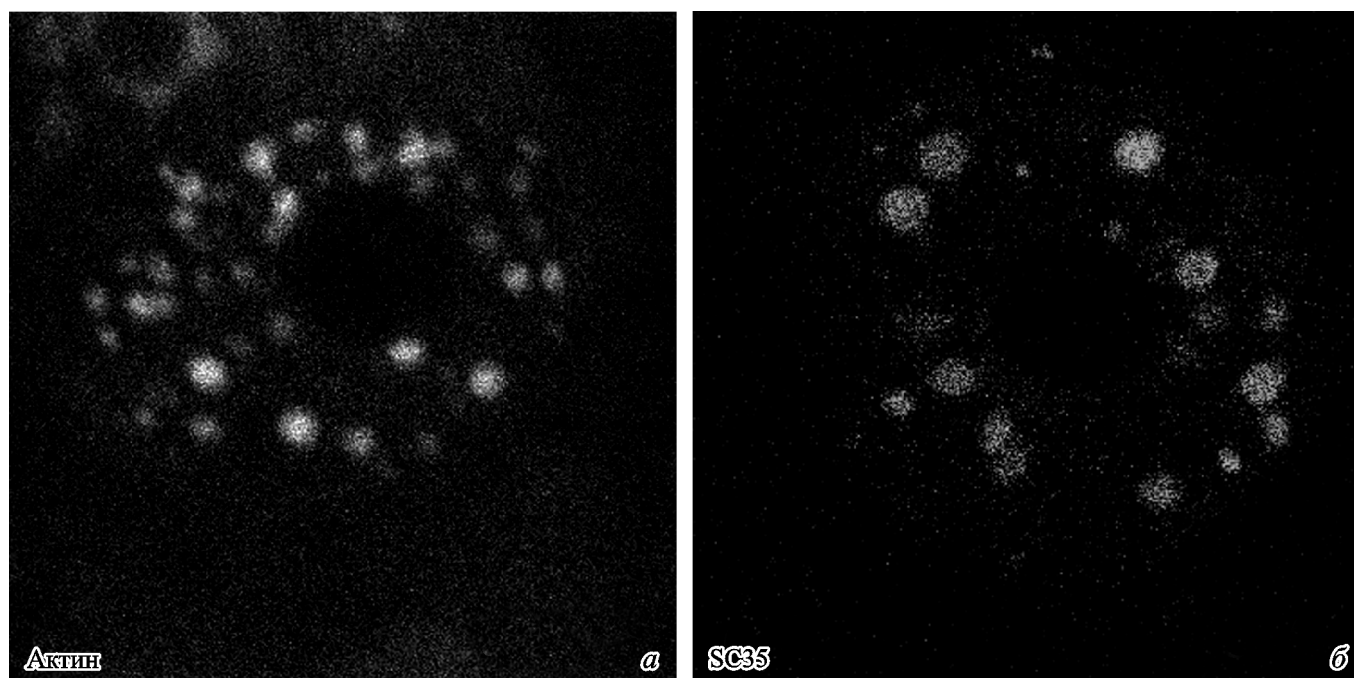


Рис. 1. Выявление актина в ядрах преовуляторных ооцитов мыши. Конфокальная микроскопия.

a — после обработки тотальных препаратов антителами MAB1501R против актина в ядре ооцитов обнаруживаются светящиеся округлые структуры, напоминающие КИГ. *б* — результаты мечення ядер ооцитов антителами против маркерного белка КИГ — SC35; в обоих случаях выявляются многочисленные ярко светящиеся крупные округлые КИГ, расположенные по всему объему ядра. Об. 40 $\times$.

Результаты

Данные непрямой иммуофлуоресценции. 1. Выявление актина в ядрах ооцитов мыши. После обработки препаратов антителами MAB1501R обнаружено распределение актина в ядре ооцитов (рис. 1, *a*). Актинсодержащие структуры имеют округлую форму, по их количеству и локализации они напоминают КИГ, описанные ранее в ядрах ооцитов мыши. Подобное распределение сигнала наблюдали и после использования антител против белка SC35 как маркера КИГ в ооцитах мыши (рис. 1, *б*). Двойная обработка препаратов антителами против актина и белка SC35 подтвердила эти данные. Выявлено полное совпадение двух сигналов в КИГ, что служит доказательством наших предварительных данных о наличии актина в этих структурах (рис. 2, *a*). Наряду с актином в КИГ ооцитов мыши мы локализовали актинсвязывающий белок профилин (рис. 3, *a*), который, как известно, предпочтительнее взаимодействует с фибриллярным актином (Carlsson et al., 1977).

В следующей серии экспериментов нами предпринято двойное окрашивание препаратов ооцитов мыши с помощью различных поликлональных антител против актина, выявляющих разные эпитопы его молекулы, и моноклональных антител против фактора сплайсинга SC35. После двойного окрашивания тотальных препаратов ооцитов мыши с помощью антител против N-концевого участка актина и антител к белку SC35 в ядре наблюдали яркоокрашенные КИГ, в которых были локализованы оба белка, что хорошо видно при совмещении конфокальных изображений (рис. 2, *б*). После обработки препаратов антителами против C-концевого фрагмента актина и антителами против фактора сплайсинга SC35 картина распределения сигнала резко отличалась. Актин выявляли исключительно в связи с хроматином, причем как с диф-

фузным, так и с конденсированными блоками или хромосомными центрами, что четко прослеживалось при совмещении изображений, полученных после окраски на актин и ДНК (рис. 2, *в*). При этом белок SC35 занимал свое обычное положение, маркируя КИГ. Помимо этих отличий антитела против C-концевого фрагмента актина демонстрировали исключительно ядерный сигнал в отличие от антител против N-концевого участка актина, выявляющих актин в цитоплазме и околоядерной области (рис. 2, *б*).

2. Актин и экспортные факторы мРНК локализуются в КИГ. После окраски тотальных препаратов ооцитов мыши с помощью антител против белка A1 семейства A/B гЯРНП выявлено характерное распределение сигнала в многочисленных КИГ (рисунки не представлены). В экспериментах по двойной окраске таких же препаратов с помощью антител против белка A1 и актина обнаружено, что оба белка содержатся в одних и тех же КИГ (рис. 3, *б*). После двойной окраски тотальных препаратов ооцитов мыши с помощью антител против актина и NXF1/TAP также выявлено совпадение двух сигналов в КИГ (рис. 3, *в*). Эти данные подтверждают полученные нами ранее результаты по обнаружению TAP в КИГ ооцитов мыши после двойного окрашивания препаратов с помощью антител против TAP и фактора сплайсинга SC35 (Почукалина и др., 2010).

Ультраструктурное иммуномечение ядер ооцитов мыши. На электронно-микроскопическом уровне КИГ исследуемых ооцитов мыши представляют собой однотипные образования: скопления интерхроматинных гранул диаметром 10—15 нм, имеющие правильную округлую форму и размеры от 1 до 2 мкм в диаметре. Характерной чертой КИГ ооцитов мыши является присутствие одной или нескольких (2—3) округлых фибриллярных зон диаметром 0.2—0.5 мкм, расположенных по краю кластера. Наши эксперименты по иммуномече-

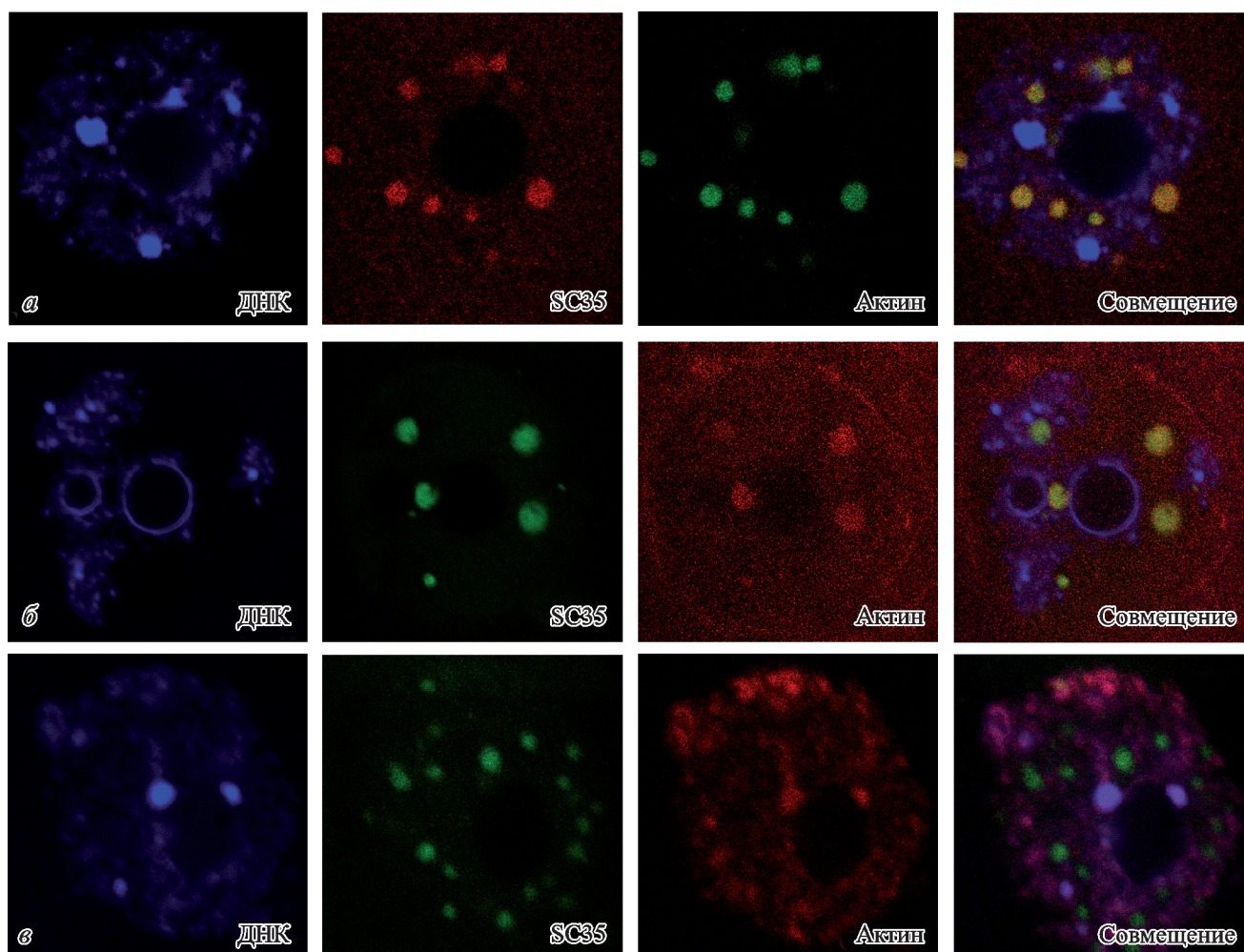


Рис. 2. Результаты экспериментов по выявлению актина в ядрах преовуляторных ооцитов мыши с помощью антител, полученных к разным эпитопам молекулы. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.

а — с помощью двойного мечения тотальных препаратов ооцитов мыши антителами против белка SC35 и актина обнаружена их солокализация в КИГ. *б, в* — результаты двойной иммунофлуоресценции по выявлению актина в ооцитах мыши: *б* — с помощью антитела против N-концевого фрагмента молекулы и белка SC35: на фоне диффузного свечения ядра и цитоплазмы выявляются светящиеся КИГ, которые также маркированы антителами против белка SC35; при совмещении изображений сигналы совпадают в КИГ; *в* — с помощью антител против C-концевого фрагмента молекулы и антител против белка SC35: при совмещении изображений видно, что актин локализуется исключительно в связи с хроматином, который выявляется с помощью окраски DAPI; при этом КИГ содержат только маркерный белок SC35. Об. 40×.

нию ядер ооцитов мыши подтвердили данные конфокальной микроскопии.

1. КИГ содержат актин и белок A1. После двойного иммуномечения срезов ооцитов антителами к белку A1 и актину мы обнаружили, что эти белки располагаются в гранулярной области КИГ, причем нередко наблюдали картины тесного контакта частиц золота 10 нм (маркирующих актин) с частицами золота 15 нм (маркирующими белок A1) (рис. 4, *а, б, врезки*). Расстояние между отдельными частицами золота разного размера в среднем составляет от 2—3 до 10 нм. В тонкофибриллярных участках КИГ мечения с помощью этих антител не обнаружено, следовательно, в них, по-видимому, отсутствуют как актин, так и белок A1.

2. В КИГ локализованы актин, белок A1 семейства A/B гЯРНП и NXF1/ТАР. Совместное распределение NXF1/ТАР и актина (рис. 4, *в*), а также белка A1 и NXF1/ТАР (рис. 4, *з*) выявляли в КИГ с помощью двойного иммуномечения ультратонких срезов. NXF1/ТАР маркируют частицы золота 15 нм, актин и A1 — 10 нм. Метка, соответствующая ТАР, обычно рас-

полагалась на периферии КИГ, а интенсивность мечения была заметно ниже по сравнению с антителами к актину и белку A1. В фибриллярных зонах КИГ ТАР не был обнаружен.

Обсуждение

Основные результаты нашего исследования следующие. 1. Ядерный актин выявляется в ассоциации с хроматином и в КИГ ооцитов мыши, находящихся на заключительных этапах созревания. 2. Актин и компоненты экспортного комплекса мРНП—белок A1 семейства A/B гЯРНП и NXF1/ТАР локализируются в КИГ ооцитов мыши.

В последнее время показано, что актин функционирует во всех областях клеточной физиологии, включая ядро (Haarer et al., 2007; Percipalle, 2009). Ядерный актин участвует не только в построении трехмерной архитектоники ядра, но является компонентом ведущих ядерных процессов — ремоделинга хроматина, транскрипции и ее регуляции (Miralles, Visa, 2006; Chen, Shen, 2007; Gieni,

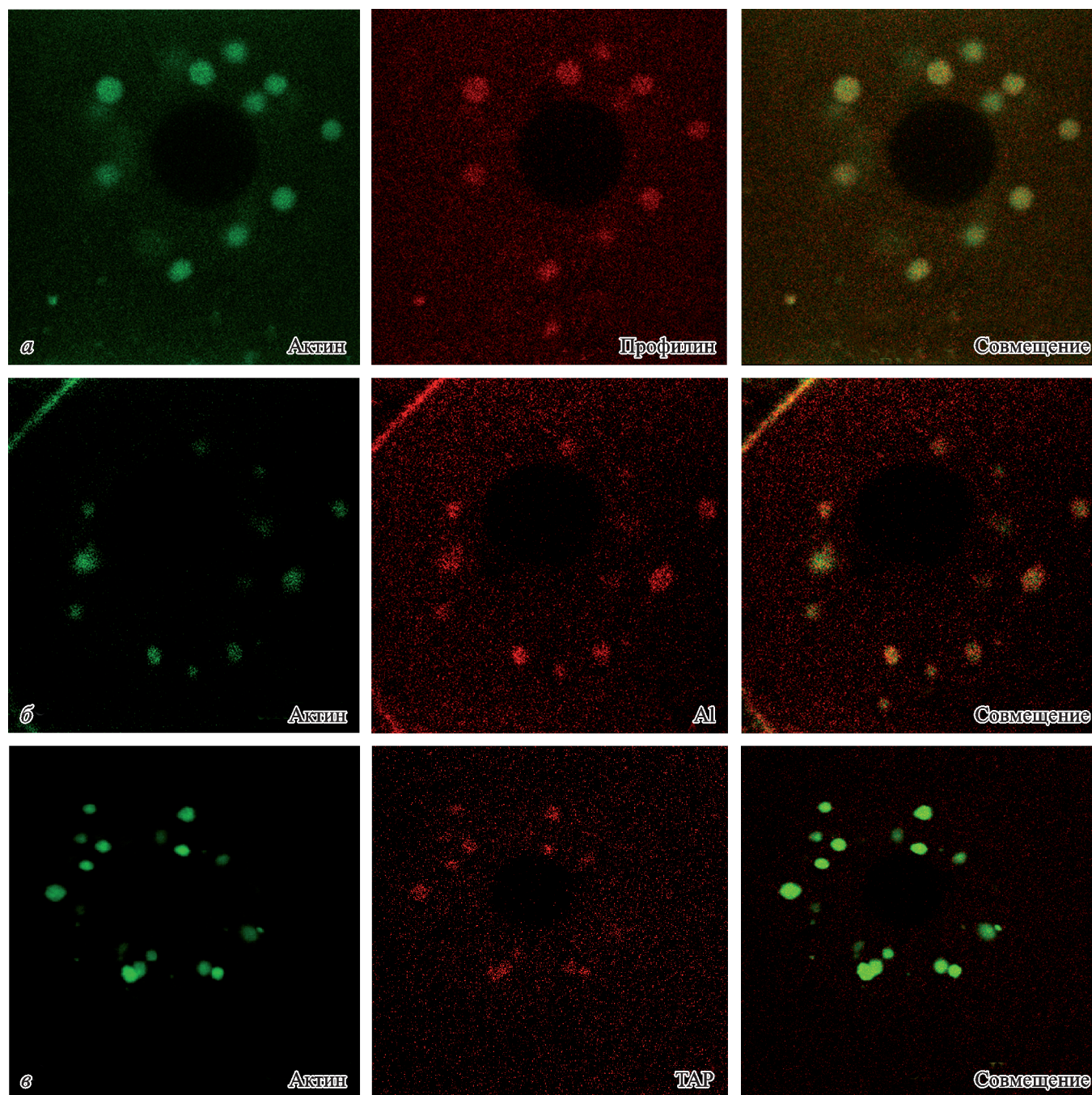


Рис. 3. Совместное выявление актина и белков — профилина, A1 семейства A/B гЯРП и NXF1/TAP в КИГ ооцитов мыши. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.

После двойного мечения тотальных препаратов ооцитов мыши антителами против актина и профилина (а), антителами против актина и белка A1 (б), антителами против актина и NXF1/TAP (в) при совмещении конфокальных изображений обнаружена их солокализация в КИГ. Об. 40×.

Hendzel, 2009). Появились данные о функционировании актина в процессе экспорта мРНК (Kimura et al., 2000; Hofmann et al., 2001; Percipalle et al., 2002; Gedge et al., 2005). В настоящий момент выяснено, что актин является ключевым компонентом механизма, ремоделирующего хроматин. Показано участие β -актина и целого ряда актинсвязывающих белков в организации различных комплексов ремоделирования хроматина, а также гистон-ацетилаз трансферазного комплекса у большого числа организмов от дрожжей до человека (Olave et al., 2002; Chen, Shen, 2007; Farrants, 2008).

Участие актина в транскрипции в составе голоэнзимного комплекса всех трех РНК-полимераз доказано в молекулярно-биохимических работах последних лет (Fomproix, Percipalle, 2004; Hofmann et al., 2004; Hu et al., 2004; Philimonenko et al., 2004; Kukalev et al., 2005). С помощью иммунопреципитации показано, что актин может взаимодействовать с большой субъединицей РНК-полимеразы I и с С-концевым доменом большой субъединицы РНК-полимеразы II (Fomproix, Percipalle, 2004; Kukalev et al., 2005). Антитела против актина ингибируют деятельность РНК-полимеразы I и РНК-полимеразы II *in vivo* и *in vitro*

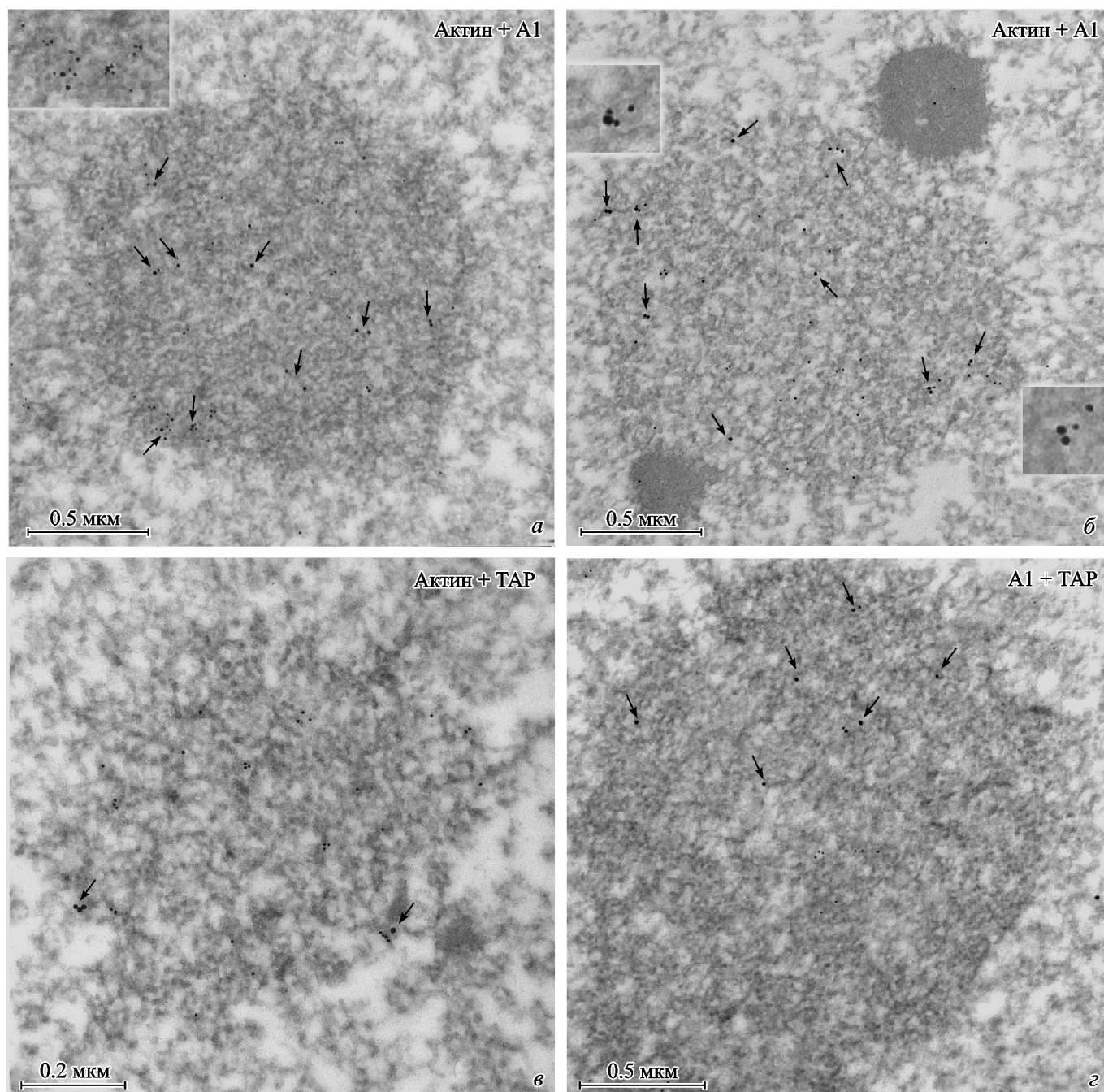


Рис. 4. Выявление актина, белка A1 семейства A/B гЯРНП и фактора экспорта мРНК NXF1/TAP в КИГ ооцитов мыши с помощью электронного иммуномечения.

а, б — двойное мечение тонких срезов ооцитов мыши смесью антител против актина и белка A1: актин (частицы коллоидного золота 10 нм) и белок A1 (частицы коллоидного золота 15 нм — *стрелка*) расположены в КИГ; расстояние между различными частицами золота не превышает 10 нм (см. *врезку*), что говорит о существовании солокализации между этими белками и подтверждает данные конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. *в* — двойное мечение тонких срезов ооцитов мыши смесью антител против актина и белка NXF1/TAP: локализация актина (частицы коллоидного золота 10 нм) и NXF1/TAP (частицы коллоидного золота 15 нм — *стрелки*) в КИГ; немногочисленная метка NXF1/TAP расположена преимущественно на периферии КИГ. *з* — двойное иммуномечение срезов ооцитов в смеси антител против белка A1 и NXF1/TAP: в КИГ обнаружены оба фактора; *стрелками* отмечены частицы золота 15 нм, связанные с местами локализации NXF1/TAP.

(Hofmann et al., 2004; Philimonenko et al., 2004). Эксперименты, проведенные на клетках *Chironomus tentans*, показали, что актин, связавшийся с пре-мРНК котранскрипционно, остается в связи как с новосинтезированной пре-мРНК, так и со зрелой гЯРНП и сопровождает мРНК вплоть до полисом (Percipalle et al., 2001). Однако почти все исследования по участию актина в процессах транскрипции проводились исключительно молекулярными

методами, и на структурном уровне эти связи не охарактеризованы.

При проведении наших экспериментов оказалось, что после окрашивания препаратов ооцитов мыши с помощью поликлональных антител против С-концевого домена молекулы актина белок выявлялся исключительно в связи с хроматином (рис. 2, *в*). С другой стороны, после двойной обработки препаратов антителами против

N-концевого домена актина и маркера КИГ фактора сплайсинга SC35 совпадение свечения отмечалось в КИГ, но наиболее яркий сигнал выявлялся в цитоплазме и в перинуклеарной области клетки (рис. 2, б). Актин, выявляемый с помощью поликлональных антител, полученных к разным эпитопам его молекулы, находится в различных пространственных и функциональных отношениях с хроматином (Боголюбова, Боголюбова, 2009). По-видимому, в транскрипционно активных ядрах двухклеточных эмбрионов мыши антитела против N-концевого домена актина прежде всего выявляли молекулы, тем или иным образом участвующие в процессе транскрипции, так как связывали актин, локализованный в области диспергированного хроматина. Антитела против С-концевого домена связывались с молекулами актина, обеспечивающего пространственную организацию хроматина, так как метили конденсированные хромосомы (Боголюбова, Боголюбова, 2009). Подобные картины распределения актина получены и в нашей работе на ооцитах мыши.

Исследованные ооциты отличались значительным падением синтетической активности (Зыбина, 1971; Moore et al., 1974; Kaplan et al., 1982; Почукалина, Парфенов, 2008) и нарастающей конденсацией хроматина. Этот гетерохроматин в ооцитах мыши четко маркируют поликлональные антитела против С-концевого домена молекулы актина (рис. 2, в), подтверждая его участие в глобальных процессах реконструкции хроматина в период, предшествующий метафазе I мейотического деления. В это время в ядрах ооцитов мыши присутствуют крупные округлые КИГ, подобные увеличенным в размерах КИГ различных клеток в условиях искусственного подавления транскрипционной активности их ядер (Misteli et al., 1997; Parfenov et al., 2003).

Одна из причин увеличения в этот период объемов КИГ может быть связана, очевидно, с возвращением в эти структуры факторов, выведенных из процессов транскрипции и котранскрипционного сплайсинга и других этапов процессинга пре-мРНК. Периодическое рекрутирование входящих в состав КИГ компонентов, обеспечивающих эти важнейшие этапы экспрессии генов, обосновывается в рамках гипотезы, согласно которой КИГ отводится роль своеобразного резервуара для хранения или рециклирования целого ряда ядерных факторов (Misteli, Spector, 1998; Lamond, Spector, 2003). Можно предположить, что актин, который принимает участие в процессах транскрипции, как это показано в молекулярно-биохимических работах (Visa, Percipalle, 2011), может переходить в КИГ, например в ассоциации с пре-мРНК. Известно, что через КИГ проходит почти 75 % ядерной поли(А)⁺-РНК, по крайней мере часть которой представляет собой мРНК или пре-мРНК (Shopland et al., 2002; Molenaar et al., 2004). В ядрах двухклеточных эмбрионов мыши с различными уровнями транскрипционной активности продемонстрирована связь поли(А)⁺-РНК с КИГ (Bogolyubova et al., 2009).

В нашей предыдущей работе (Почукалина и др., 2010) мы также продемонстрировали присутствие поли(А)⁺-РНК в КИГ ооцитов мыши с помощью микроинъекций в ооциты конструкции, комплементарной поли(А)⁺-«хвосту» РНК (2'-O-Me(U)₂₂). В настоящее время активно обсуждается гипотеза о том, что аккумуляция в КИГ является свойством, общим для всей мРНК. Предполагается, что в этих доменах определяются точность сплайсинга и готовность мРНК к ядерному экспорту (Ishihama et al., 2008). Есть мнение, что КИГ представ-

ляют собой функциональный компартмент, в котором осуществляется удержание мРНК, обеспечивающее как скорость экспорта мРНК, так и качественный контролируемый механизм этого экспорта (Misteli, 2007; Prasarth, Spector, 2007).

В соответствии с современными литературными данными (Gieni, Hendzel, 2009; Hofmann, 2009), актин в ядре существует в динамическом равновесии между мономерной и олигомерными формами. Отмечается, что в ядре находятся различные по длине молекулы актина, и этот факт говорит в пользу того, что ядерный актин очень подвижен и подвергается быстрой полимеризации и деполимеризации (Gieni, Hendzel, 2009). С помощью метода FRAP в интерфазных ядрах клеток HeLa продемонстрировано наличие двух популяций актина. Предполагают, что медленно восстанавливающий свечение белок имеет отношение к полимерной форме актина, но по некоторым признакам отличается от его цитоплазматической формы (McDonald et al., 2006). В дальнейшем было выяснено, что ядерный полимерный актин представлен олигомерами или короткими цепями (Hofmann, Lanerolle, 2006).

Многие факторы, которые регулируют динамику актина в цитоплазме, найдены и в ядре. Оказалось, что КИГ является местом концентрации многочисленных ферментов, вовлеченных в процесс полимеризации актина (Irvine, 2003; Bunce et al., 2006). Например, показано наличие профилина в зоне ядерных speckles (КИГ) (Skare et al., 2003), а также предполагается его участие в полимеризации актина в этих структурах (Gieni, Hendzel, 2009). В нашем исследовании мы продемонстрировали наличие профилина в КИГ с помощью двойной обработки препаратов ооцитов мыши антителами против актина и профилина (рис. 3, а). Профилин — небольшой актинсвязывающий белок, который наряду с другими функциями способствует формированию полимерной формы актина (Carlsson et al., 1977) и является коактиватором ядерного экспорта этого белка (Stuven et al., 2003). Таким образом, мы можем предположить, что актин, выявляемый в КИГ ооцитов мыши, по-видимому, является некой полимерной формой этого белка.

К настоящему моменту появляется все больше сведений об участии актина в экспорте мРНК из ядра в цитоплазму (Kimura et al., 2000; Hofmann et al., 2001; Percipalle et al., 2002; Gedge et al., 2005). Так, в нескольких исследованиях продемонстрировано, что гЯРНП имеет свойство связываться с актином, а некоторые из таких комплексов способны курсировать между ядром и цитоплазмой (Percipalle et al., 2002, 2003; Kukalev et al., 2005). Авторы предполагают, что этим передвижениям способствуют полимерный актин и актинсвязывающие белки, с помощью которых обеспечивается доставка РНП к ядерным порам, тем самым облегчая их экспорт в цитоплазму. С другой стороны, биохимические исследования показывают, что компетенция к экспорту пре-мРНК напрямую связана с процессом транскрипции (Kohler, Hurt, 2007; Hurt, Silver, 2008; Iglesias, Stutz, 2008; Carmody, Wentz, 2009; Moore, Proudfoot, 2009). Современные представления о функционировании в ядре транскрипционно-экспортного комплекса (TREX) опираются на данные о существовании тесных взаимосвязей между транскрипцией и экспортом мРНК.

Показано, что у дрожжей комплектование TREX совпадает с процессом транскрипции, а у многоклеточных — со сплайсингом (Masuda et al., 2005; Cheng et al., 2006). Вначале предполагалось, что TREX у многокле-

точных является частью комплекса связи экзонов (EJC) (Gatfield et al., 2001; Le Hir et al., 2001). Однако в настоящее время определено, что TREX рекрутируется самостоятельно на 5'-конец синтезирующегося транскрипта и что этот процесс зависит от сплайсинга и 5'-кэпирования (Masuda et al., 2005; Cheng et al., 2006). В рамках концепции удержания РНК в ядре и участия в этом процессе КИГ можно предположить, что в этих экстрахромосомных ядерных доменах происходит формирование такого комплекса, который состоит из РНК, факторов транскрипции, рецепторов ядерного экспорта и актина. Недавние исследования убедительно доказали, что КИГ могут обеспечивать эффективное сопряжение инициации транскрипции, элонгации первичного транскрипта мРНК и различных этапов процессинга пре-мРНК, что в свою очередь приводит к усилению скоординированной регуляции многоступенчатых процессов экспрессии генов (Sacco-Bubulya et al., 2002; Shopland et al., 2002; Hu et al., 2008).

Наши данные по выявлению актина в зонах конденсированного хроматина, а также в КИГ ооцитов мыши вполне укладываются в общую схему его функционирования. Наличие актина в связи с блоками гетерохроматина отражает его участие в глобальных процессах реконструкции хроматина, происходящих в период подготовки клетки к метафазе I мейотического деления. Возможно, переходу пре-мРНК в КИГ также способствует актин, который, как обсуждалось выше, выявляется в составе частиц гЯРНК. Здесь же при его участии, по-видимому, формируется единый транскрипционно-экспортный комплекс TREX, обеспечивающий не только окончательное созревание молекул пре-мРНК, но также их готовность на экспорт.

Оказалось, что актин принимает непосредственное участие в крупномасштабных перемещениях хромосомных областей (Lamond, Spector, 2003; Schneider, Grosschedl, 2007).

Известно, что различные типы хромосомных последовательностей занимают разные позиции в трехмерном пространстве ядра. Так, домены хромосом, богатые генами, обычно находятся в центральных районах ядра, а участки, бедные генами, — на их периферии. Транскрипционно неактивные гены преимущественно расположены в гетерохроматиновых регионах, в то время как активные гены, как правило, расположены вблизи КИГ (Spector, 2003). В работе (Chuang et al., 2006) была визуализирована динамика репозиционирования tandemного генного локуса. При активации экспрессии этот локус с периферии клетки перемещался в центр ядра. Однонаправленная траектория была зафиксирована длиной от 1 до 5 мкм, что позволило авторам предположить существование активного механизма перемещения хроматина на значительные расстояния. Экспрессия же мутантных форм актина или ядерного миозина I с дефектами в полимеризации и связывании актина тормозила такое передвижение хроматина (Chuang et al., 2006). Все вместе эти данные говорят о том, насколько велики функциональные возможности актина, который не только участвует в процессах экспрессии и реорганизации генома, но также способствует перемещению молекул, как в случае транспортировки РНК, и крупных хромосомных локусов. Наличие нескольких форм ядерного актина отражает существующее разнообразие функций, которые выполняет этот белок в ядре.

В нашей предыдущей работе в КИГ ооцитов мыши были локализованы фактор экспорта мРНК NXF1/TAP, а

также комплекс белков семейства A/B гЯРНК (Почукалина и др., 2010). Использование антител против всего семейства A/B гЯРНК не позволило нам заключить, какой белок из его состава присутствует в КИГ. В данном исследовании с помощью световой и электронной микроскопии мы показали, что с актином в КИГ солокализуется белок A1 (рис. 3, б). Участие белков семейства A/B гЯРНК в экспортном комплексе пре-мРНК является спорным вопросом; в большей степени им отводится роль в упаковке деградирующих интронов (Kataoka et al., 2000; Reed, Magni, 2001).

Однако ряд фактов дает основание рассматривать A1 гЯРНК в качестве потенциального фактора экспорта мРНК: A1 является члнчным белком, циркулирующим из ядра в цитоплазму и обратно (Nakielnny, Dreyfuss, 1999); в его составе присутствует сигнал ядерного экспорта (Piñol-Roma, Dreyfuss, 1992, 1993), ортолог A1 гЯРНК у *Diptera* связывается с мРНК в пуффах политенных хромосом *Chironomus tetans* и сопровождает ее до цитоплазмы (Visa et al., 1996; Daneholt, 1997). Кроме того, белок A1 обнаружен в составе ядерных комплексов мРНК в клетках млекопитающих совместно с адаптерным белком REF/Aly (Mili et al., 2001). В результате электронного иммуноночечения мы определили, что актин и A1 гЯРНК распределены в КИГ небольшими группами, причем частицы золота, маркирующие исследуемые белки, расположены на расстоянии не более 10 нм, что является вполне достаточным условием для определения их солокализации (врезки на рис. 4, а, б). Таким образом, возможно, что ассоциация белков A1 и актина в КИГ ооцитов мыши, которая документирована нами как на световом, так и на ультраструктурном уровнях, отражает наличие в составе КИГ элементов, необходимых для успешной сборки экспортного комплекса мРНК.

Известно, что перенос мРНК из ядра в цитоплазму обеспечивается группой консервативных белков — факторов ядерного экспорта. Наиболее подробно охарактеризован экспортный рецептор мРНК TAP, который непосредственно взаимодействует с ядерным поровым комплексом (Stutz, Izaurralde, 2003). Доказательство участия TAP в экспорте мРНК первоначально было получено при исследовании экспорта несплайсированных ретровирусных мРНК, которые содержат конститутивный транспортный элемент (СТЕ). Показано, что TAP способствует экспорту РНК, напрямую связываясь с СТЕ. Микроинъекции в ооциты *Xenopus laevis* избыточного количества РНК, содержащих СТЕ, блокировали экспорт клеточных мРНК, однако этот блок снимался с помощью введения в клетки рекомбинантного TAP. Инактивация или деплеция эндогенного TAP в культивируемых клетках *Drosophila melanogaster* приводила к быстрому накоплению поли(А)⁺-РНК в ядре, доказывая важную роль TAP в экспорте мРНК.

Данные о том, что в клетках дрожжей белок Mex 67p, являющийся ортологом TAP млекопитающих, также участвует в экспорте основной массы поли(А)⁺-РНК, свидетельствуют о том, что TAP является не только консервативным белком, но также основным фактором экспорта мРНК (Segref et al., 1997). Доминирующая роль TAP в ядерном экспорте клеточной поли(А)⁺-РНК подтверждена при широкомасштабном анализе мРНК различных клеток. Показано, что TAP вовлечен в экспорт по крайней мере 75 % из 6000 проанализированных мРНК (Herold et al., 2003). Однако для функционирования TAP в экспорте клеточных мРНК необходимо участие различных

адаптерных белков, которые непосредственно связывают TAP с переносимыми мРНК (Reed, Magni, 2001; Dreyfuss et al., 2002; Stutz, Izaurralde, 2003).

В нашей работе на светооптическом и ультраструктурном уровнях мы продемонстрировали, что КИГ ооцитов мыши содержат актин и NXF1/TAP (рис. 3, в). Следует отметить некоторые различия, которые выявляются при сравнении данных о наличии в составе КИГ белков A1 и TAP, полученных в ходе непрямой иммуофлуоресценции и электронного иммуномечения. Если между актином и A1 мы можем предполагать существование определенных структурных связей, то такие выводы применительно к TAP сделать нельзя. Присутствие NXF1/TAP в составе КИГ было документировано ранее (Почукалина и др., 2010), однако по нашим наблюдениям, TAP либо быстрее покидает КИГ, чем белок A1, либо он присутствует в КИГ в меньшей концентрации. На ультраструктурном уровне NXF1/TAP выявляется преимущественно на периферии КИГ. Солокализации между NXF1/TAP и актином или A1 в КИГ ооцитов мыши мы не выявили (рис. 4, в, г). Подобное распределение NXF1/TAP получено в ядрах двухклеточных эмбрионов мыши, характеризующихся разной степенью синтетической активности. В активных ядрах NXF1/TAP выявляется в нуклеоплазме и в связи с периферией КИГ. Интересно, что при искусственном подавлении транскрипции с помощью актиномицина D NXF1/TAP появляется в составе немногочисленных крупных КИГ (Bogolyubova et al., 2009).

Таким образом, обнаруженная нами совместная локализация актина и факторов экспорта мРНК NXF1/TAP и белка A1 гЯРНК в связи с КИГ ооцитов мыши может указывать не только на участие этих доменов в процессах экспрессии генов, но и на их роль в формировании экспортного комплекса мРНК. Дальнейшая работа предполагает выявление в ядрах ооцитов мыши других компонентов экспортного комплекса, включая адаптерный белок REF/Aly и фактор сплайсинга Y14, входящий в состав коровой части EJC.

Авторы выражают благодарность Д. С. Боголюбову за полезное обсуждение результатов исследования и Ю. И. Гукиной за техническую помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Боголюбова Н. А., Боголюбова И. О. 2009. Локализация актина в ядрах двух-клеточных зародышей мыши. Цитология. 51 (8) : 663—669.
- Зыбина Е. В. 1971. Синтез РНК и белка в растущем ооците и фолликуле мыши. Цитология. 13 (6) : 768—775.
- Почукалина Г. Н., Боголюбов Д. С., Парфенов В. Н. 2010. Кластеры интерхроматиновых гранул преовуляторных ооцитов мыши. Организация, состав, возможные функции. Цитология. 52 (1) : 30—40.
- Почукалина Г. Н., Парфенов В. Н. 2008. Трансформация ядрышек ооцитов антральных фолликулов мыши. Выявление коилина и компонентов комплекса РНК-полимеразы I. Цитология. 50 (8) : 671—680.
- Bogolyubova I., Bogolyubov D., Parfenov V. 2009. Localization of poly(A)(+) RNA and mRNA export factors in interchromatin granule clusters of two-cell mouse embryos. Cell Tissue Res. 338 : 271—281.
- Bunce M. W., Bergendahl K., Anderson R. A. 2006. Nuclear PI(4,5)P(2) : a new place for an old signal. Biochim. biophys. acta. 1761 : 560—569.
- Carlsson L., Nystrom L. E., Sundkvist I., Markey F., Lindberg U. 1977. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. J. Mol. Biol. 115 : 465—483.
- Carmody S. R., Wente S. R. 2009. mRNA nuclear export at a glance. J. Cell Sci. 122 : 1933—1937.
- Chen M., Shen X. 2007. Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics. Curr. Opin. Cell Biol. 19 : 326—330.
- Cheng H., Dufu K., Lee C. S., Hsu J. L., Dias A., Reed R. 2006. Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. Cell. 127 : 1389—1400.
- Chuang C. H., Carpenter A. E., Fuchsova B., Johnson T., de Lanerolle P., Belmont A. S. 2006. Long-range directional movement of an interphase chromosome site. Curr. Biol. 16 : 825—831.
- Cmarko D., Verschure P. J., Martin T. E., Dahmus M. E., Krause S., Fu X. D., van Driel R., Fakan S. 1999. Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. Mol. Biol. Cell. 10 : 211—223.
- Daneholt B. 1997. A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. Cell. 88 : 585—588.
- Dreyfuss G., Kim V. N., Kataoka N. 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3 : 195—205.
- Dundr M., Misteli T. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. Biochem. J. 356 : 297—310.
- Egley J. M., Miyamoto N. G., Moncollin V., Chambon P. 1984. Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B? EMBO J. 3 : 2363—2371.
- Erkmann J. A., Kutay U. 2004. Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. Exp. Cell Res. 296 : 12—20.
- Farrants A. K. 2008. Chromatin remodelling and actin organization. FEBS Lett. 582 : 2041—2050.
- Finlan L. E., Bickmore W. A. 2008. Porin new light onto chromatin and nuclear organization. Genome Biol. 9 : 222.
- Fomproix N., Percipalle P. 2004. An actin-myosin complex on actively transcribing genes. Exp. Cell Res. 294 : 140—148.
- Fu X.-D., Maniatis T. 1990. Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. Nature. 343 : 437—441.
- Gatfield D., Le Hir H., Schmitt C., Braun I. C., Köcher T., Wilm M., Izaurralde E. 2001. The DEXH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. Curr. Biol. 11 : 1716—1721.
- Gedge L. J., Morrison E. E., Blair G. E., Walker J. H. 2005. Nuclear actin is partially associated with Cajal bodies in human cells in culture and relocates to the nuclear periphery after infection of cells by adenovirus 5. Exp. Cell Res. 303 : 229—239.
- Gieni R. S., Hendzel M. J. 2009. Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. Biochem. Cell. Biol. 87 : 283—306.
- Grüter P., Tabernero C., von Kobbe C., Schmitt C., Saavedra C., Bachi A., Wilm M., Felber B. K., Izaurralde E. 1998. TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. Mol. Cell. 1 : 649—659.
- Haarer B., Viggiano S., Hibbs M. A., Troyanskaya O. G., Amburgey D. C. 2007. Modeling complex genetic interactions in a simple eukaryotic genome: actin displays a rich spectrum of complex haploinsufficiencies. Genes Develop. 21 : 148—159.
- Hall L. L., Smith K. P., Byron M., Lawrence J. B. 2006. Molecular anatomy of a speckle. Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol. 288 : 664—675.
- He Y., Smith R. 2009. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. Cell Mol. Life Sci. 66 : 1239—1256.
- Herold A., Teixeira L., Izaurralde E. 2003. Genome-wide analysis of nuclear mRNA export pathways in *Drosophila*. EMBO J. 22 : 2472—2483.
- Hofmann W. A. 2009. Cell and molecular biology of nuclear actin. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 273 : 219—263.

- Hofmann W. A., de Lanerolle P. 2006. Nuclear actin: to polymerize or not to polymerize. *J. Cell Biol.* 172 : 495—496.
- Hofmann W. A., Reichart O. B., Ewald A., Muller E., Schmitt I., Stauber R. H., Lottspeich F., Jockusch B. M., Scheer U., Hauber J. 2001. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J. Cell Biol.* 152 : 895—910.
- Hofmann W. A., Stojiljkovic L., Fuchsova B., Vargas G. M., Mavrommatis E., Philimonenko V., Kysela K., Goodrich J. A., Lessard J. L., Hope T. J. 2004. Actin is part of preinitiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* 6 : 1094—1101.
- Hu P., Wu S., Hernandez N. 2004. A role for b-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Develop.* 18 : 3010—3015.
- Hu Q., Kwon Y. S., Nunez E., Cardamone M. D., Hutt K. R., Ohgi K. A., Garcia-Bassets I., Rose D. W., Glass C. K., Rosenfeld M. G. 2008. Enhancing nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105 : 19 199—19 204.
- Hurt J. A., Silver P. A. 2008. mRNA nuclear export and human disease. *Dis. Model. Mech.* 1 : 103—108.
- Iglesias N., Stutz F. 2008. Regulation of mRNP dynamics along the export pathway. *FEBS Lett.* 582 : 1987—1996.
- Irvine R. F. 2003. Nuclear lipid signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 : 349—360.
- Ishihama Y., Tadakuma H., Tani T., Funatsu T. 2008. The dynamics of pre-mRNAs and poly(A)⁺ RNA at speckles in living cells revealed by iFRAP studies. *Exp. Cell Res.* 314 : 748—762.
- Kaplan G., Abren S. I., Bachvarova R. 1982. r-RNA accumulation and protein synthetic patterns in growing mouse oocytes. *J. Exp. Zool.* 220 : 361—370.
- Kataoka N., Yong J., Kim V. N., Velazquez F., Perkinson R. A., Wang F., Dreyfuss G. 2000. Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm. *Mol. Cell.* 6 : 673—682.
- Kimura T., Hashimoto I., Yamamoto A., Nishikawa M., Fujisawa J. I. 2000. Rev-dependent association of the intron-containing HIV-1 gag mRNA with the nuclear actin bundles and the inhibition of its nucleocytoplasmic transport by latrunculin-B. *Genes Cells.* 5 : 289—307.
- Kiseleva E., Drummond S. P., Goldberg M. W., Rutherford S. A., Allen T. D., Wilson K. L. 2004. Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *J. Cell Sci.* 117 : 2481—2490.
- Köhler A., Hurt E. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 : 761—773.
- Kuklev A., Nord Y., Palmberg C., Bergman T., Percipalle P. 2005. Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase. II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12 : 238—244.
- Kumar A., Crawford K., Close L., Madison M., Lorenz J., Detschman T., Pawlowski S., Duffy J., Neumann J., Robbins J., Boivin G. P., O'Toole B. A., Lessard J. L. 1997. Rescue of cardiac alpha-actin-deficient mice by enteric smooth muscle gamma-actin. *PNAS.* 94 : 4406—4411.
- Lamond A. I., Spector D. L. 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 : 605—612.
- Le Hir H., Gatfield D., Braun I. C., Forler D., Izaurralde E. 2001. The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO Rep.* 2 : 1119—1124.
- Louvet E., Percipalle P. 2009. Transcriptional control of gene expression by actin and myosin. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 272 : 107—147.
- Masuda S., Das R., Cheng H., Hurt E., Dorman N., Reed R. 2005. Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Develop.* 19 : 1512—1517.
- McDonald D., Carrero G., Andrin C., de Vries G., Hendzel M. J. 2006. Nucleoplasmic b-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J. Cell Biol.* 172 : 541—552.
- Miki T., Okawa K., Sekimoto T., Yoneda Y., Watanabe S., Ishizaki T., Narumiya S. 2008. mDia2 shuttles between the nucleus and the cytoplasm through the importin- α / β - and CRM1-mediated nuclear transport mechanism. *J. Biol. Chem.* 284 : 5753—5762.
- Mili S., Shu H. J., Zhao Y., Pinol-Roma S. 2001. Distinct RNP complexes of shuttling hnRNP proteins with pre-mRNA and mRNA: candidate intermediates in formation and export of mRNA. *Mol. Cell Biol.* 21 : 7307—7319.
- Mintz P. J., Patterson S. D., Neuwald A. F., Spahr C. S., Spector D. L. 1999. Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J.* 18 : 4308—4320.
- Miralles F., Visa N. 2006. Actin in transcription and transcription regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18 : 261—266.
- Misteli T. 2007. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell.* 128 : 787—800.
- Misteli T., Cáceres J. F., Spector D. L. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature.* 387 : 523—527.
- Misteli T., Spector D. L. 1998. The cellular organization of gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 : 323—331.
- Molenaar C., Abdulle A., Gena A., Tanke H. J., Dirks R. W. 2004. Poly(A)⁺ RNAs roam the cell nucleus and pass through speckle domains in transcriptionally active and inactive cells. *J. Cell Biol.* 165 : 191—202.
- Moore G. P. M., Linten-Moore S., Peters H., Faber M. 1974. RNA synthesis in the mouse oocyte. *J. Cell Biol.* 60 : 416—422.
- Moore M. J., Proudfoot N. J. 2009. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell.* 136 : 688—700.
- Moustakas A., Heldin C. H. 2008. Dynamic control of TGF- β signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett.* 582 : 2051—2065.
- Nakielny S., Dreyfuss G. 1999. Transport of protein and RNAs in and out of the nucleus. *Cell.* 99 : 677—690.
- Obrdlik A., Louvet E., Kuklev A., Nascchekin D., Kiseleva E., Fahrenkrog B., Percipalle P. 2010. Nuclear myosin 1 is in complex with mature rRNA transcripts and associates with the nuclear pore basket. *FASEB J.* 24 : 146—157.
- Olave I. A., Reck-Peterson S. L., Crabtree G. R. 2002. Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodelling. *Annu. Rev. Biochem.* 71 : 755—781.
- Papakonstanti E. A., Stournaras C. 2008. Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 582 : 2120—2127.
- Parada L., Misteli T. 2002. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol.* 12 : 425—432.
- Parfenov V. N., Pochukalina G. N., Davis D. S., Reinbold R., Scholer H. R., Murti K. G. 2003. Nuclear distribution of Oct-4 transcription factor in transcriptionally active and inactive mouse oocytes and its relation to RNA polymerase II and splicing factors. *J. Cell. Biochem.* 89 : 720—732.
- Parfenov V. N., Potchukalina G., Dudina L., Kostyuchek D., Gruzova M. 1989. Human antral follicles: oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data). *Gamete Res.* 22 : 219—231.
- Pederson T., Aebi U. 2002. Actin in the nucleus: what form and what for? *J. Struct. Biol.* 140 : 3—9.
- Percipalle P. 2009. The long journey of actin and actin-associated proteins from gene to polysomes. *Cell Mol. Life. Sci. USA.* 66 : 2151—2165.
- Percipalle P., Fomproix N., Kylberg K., Miralles F., Björkroth B., Daneholt B., Visa N. 2003. An actin-ribonucleoprotein interaction is involved in transcription by RNA polymerase II. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100 : 6475—6480.
- Percipalle P., Jonsson A., Nascchekin D., Karlsson C., Bergman T., Guialis A., Daneholt B. 2002. Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. *Nucl. Acids Res.* 30 : 1725—1734.
- Percipalle P., Zhao J., Pope B., Weeds A., Lindberg U., Daneholt B. 2001. Actin bound to the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hrp36 is associated with Balbiani ring mRNA from the gene to polysomes. *J. Cell Biol.* 153 : 229—236.

- Philimonenko V. V., Zhao J., Iben S., Dingova H., Kysela K., Kahle M., Zentgraf H., Hofmann W. A., de Lanerolle P., Hozak P. 2004. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* 6 : 1165—1171.
- Piñol-Roma S., Dreyfuss G. 1992. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature.* 355 : 730—732.
- Piñol-Roma S., Dreyfuss G. 1993. HnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* 3 : 151—155.
- Prasanth K. V., Spector D. L. 2007. Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the «genome complexity» conundrum. *Genes Develop.* 21 : 11—42.
- Reed R., Hurt E. 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell.* 108 : 523—531.
- Reed R., Magni K. 2001. A new view of mRNA export: separating the wheat from the chaff. *Nat. Cell Biol.* 3 : 201—204.
- Sacco-Bubulya P., Spector D. L. 2002. Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.* 156 : 425—436.
- Saitoh N., Spahr C. S., Patterson S. D., Bubulya P., Newwald A. F., Spector D. L. 2004. Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. *Mol. Biol. Cell.* 15 : 3876—3890.
- Scheer U., Hinssen H., Franke W. W., Jockusch B. M. 1984. Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell.* 39 : 111—122.
- Schmidt U., Richter K., Berger A. B., Lichter P. 2006. *In vivo* BiFC analysis of Y14 and NXF1 mRNA export complexes: preferential localization within and around SC35 domains. *J. Cell Biol.* 172 : 373—381.
- Schneider R., Grosschedl R. 2007. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Develop.* 21 : 3027—3043.
- Segref A., Sharma K., Doye V., Hellwig A., Huber J., Lührmann R., Hurt E. 1997. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *EMBO J.* 16 : 3256—3271.
- Shopland L. S., Johnson C. V., Byron M., McNeil J., Lawrence J. B. 2003. Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods. *J. Cell Biol.* 162 : 981—990.
- Shopland L. S., Johnson C. V., Lawrence J. B. 2002. Evidence that all SC-35 domains contain mRNAs and that transcripts can be structurally constrained within these domains. *J. Struct. Biol.* 140 : 131—139.
- Skare P., Kreivi J. P., Bergstrom A., Karlsson R. 2003. Profilin I colocalizes with speckles and Cajal bodies: a possible role in pre-mRNA splicing. *Exp. Cell Res.* 286 : 12—21.
- Spector D. L. 2003. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 72 : 573—608.
- Spector D. L., Lamond A. I. 2011. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1 : 1—13.
- Stutz F., Izaurralde E. 2003. The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol.* 13 : 319—327.
- Stuven T., Hartmann E., Gorlich D. 2003. Exportin 6 : a novel nuclear export receptor that is specific for profilin—actin complexes. *EMBO J.* 22 : 5928—5940.
- Visa N., Alzhanova-Ericsson A. T., Sun X., Kiseleva E., Björkroth B., Wurtz T., Daneholt B. 1996. A pre-mRNA-binding protein accompanies the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes. *Cell.* 84 : 253—264.
- Visa N., Percipalle P. 2011. Nuclear function of actin. In: *Nucleus*. New York: Cold Spring Harbor. 195—208.
- Wu X., Yoo Y., Okuhama N. N., Tucker P. W., Liu G., Guan J. L. 2006. Regulation of RNA-polymerase-II-dependent transcription by N-WASP and its nuclear-binding partners. *Nat. Cell Biol.* 8 : 756—763.
- Zhou Z., Luo M. J., Straesser K., Katahira J., Hurt E., Reed R. 2000. The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature.* 407 : 401—405.
- Zuchero J. B., Coutts A. S., Quinlan M. E., Thangue N. B., Mullins R. D. 2009. p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat. Cell Biol.* 11 : 451—459.

Поступила 20 II 2012

ACTIN AND mRNA EXPORT FACTORS DISTRIBUTION IN THE NUCLEUS OF PREOVULATORY MOUSE OOCYTES

G. N. Pochukalina, V. N. Parfenov

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

Nuclear actin is a part of the chromatin remodeling complex involved in transcriptional and associated with nascent mRNA, providing them an ability to export from the nucleus. It is currently proved that many factors involved in mRNA editing and mRNA export are localized in IGCs. Using confocal laser scanning microscopy and immunogold labeling technique, we identified actin and A1 hnRNP protein in the nuclei of oocytes from mouse preovulatory follicles. We have demonstrated that nuclear actin is detected in association with the chromatin and IGCs. Components of mRNA export complex including proteins A1 and NXF1/TAP are localized in IGCs together with actin. In accordance with the concept suggesting that IGCs participate in RNA retention in the nucleus we discuss that mRNA transcription-export complex including actin, A1 hnRNP protein and NXF1/TAP, along with mRNA and transcription factors is formed in IGCs.

Key words: oocytes mouse nucleus, interchromatin granule clusters, actin, mRNA export, A1 A/B hnRNP, NXF1/TAP, confocal microscopy, electron microscopy.