

КАПСУЛА КАРИОСФЕРЫ В ООЦИТАХ *TRIBOLIUM CASTANEUM*© Ф. М. Баталова, Д. С. Боголюбов¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

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

С помощью электронной микроскопии и иммуноэлектронной цитохимии исследовали строение и состав капсулы кариосферы (кариосомы) ядер ооцитов лабораторного насекомого *Tribolium castaneum*. На основании изучения динамики ядерных структур выделено 8 стадий, характеризующих период роста ооцита. На стадии диплотены хромосомы ооцита *T. castaneum* довольно рано объединяются в компактную кариосферу, однако значительной конденсации хроматина при этом не происходит. Процесс формирования кариосферы сопровождается развитием вокруг хроматина обширной экстрахромосомной капсулы, которая состоит из фибриллярного материала разных морфологических типов. Существенным молекулярным компонентом капсулы кариосферы *T. castaneum* являются белки ядерного матрикса, в том числе фибриллярный актин и ламин В. Помимо структурных белков в капсуле кариосферы иммуноцитохимически выявляются Sm-белки малых ядерных (мя) РНП и «зрелые» мяРНК, 5'-конец молекул которых несет 2,2,7-триметилгуанозиновый (TMG) кэп. Полученные данные могут служить основой для дальнейшего расширения представлений о функциях капсулы кариосферы как специализированного экстрахромосомного ядерного домена ооцитов. Мы считаем, что капсула кариосферы *T. castaneum* играет не только структурную роль, но может быть напрямую вовлечена в процессы, связанные с экспрессией генов.

Ключевые слова: *Tribolium castaneum*, ядро ооцита, экстрахромосомные ядерные домены, кариосфера, капсула кариосферы, электронная микроскопия.

Принятые сокращения: КИГ — кластер(ы) интерхроматиновых гранул, мяРНП — малые ядерные РНП, SC35 — компонент сплайсосомы (spliceosome component) 35, TMG — 2,2,7-триметилгуанозин.

Формирование кариосферы, или кариосомы, является уникальной особенностью строения ядра ооцитов (реже сперматоцитов) многих животных по сравнению с соматическими клетками. В русско- и немецкоязычной литературе принято использовать оригинальный термин «кариосфера» (Karyosphäre), предложенный еще в начале XX в. (Blackmann, 1901, цит. по: Gruzova, Parfenov, 1993). Однако в современной англоязычной литературе обычно применяют термин «кариосома» (karyosome). По разъяснениям М. Н. Грузовой (личное сообщение), кариосфера — более широкое понятие, а кариосома — это кариосфера, лишённая экстрахромосомной капсулы. Каких-либо дополнительных сведений в литературе по данному вопросу нам обнаружить не удалось. В своих работах мы используем оригинальный термин «кариосфера», рассматривая термин «кариосома» в качестве синонима.

Кариосфера представляет собой результат концентрации всех хромосом половой клетки в ограниченном объеме ядра. В результате формируется сложная структура, в состав которой может включаться материал ядрышка и (или) разнообразных экстрахромосомных ядерных телец (Грузова и др., 1995). Кариосфера описана более чем у 120 видов, принадлежащих к 4 типам животного царства (Грузова, Parfenov, 1993; Грузова и др., 1995). Среди беспозвоночных животных она достигает наиболее яркого,

типичного своего выражения в растущих ооцитах насекомых с мероистическими яичниками (о строении женских гонад насекомых, их эволюции и особенностях оогенеза см. обзоры: Büning, 1994; Biliński, 1998). При наличии активно функционирующих питающих клеток (трофоцитов) кариосфера формируется в начале диплотены и существует вплоть до конца периода роста ооцита.

Молекулярные механизмы формирования кариосферы изучены недостаточно, однако существенную роль в них, по-видимому, играют процессы фосфорилирования. Так, в ооцитах *Drosophila* для формирования кариосферы необходимо специфическое фосфорилирование Thr-119 в молекулах гистона H2A (Ivanovska et al., 2005). Фосфорилирование фактора BAF (barrier to autointegrator factor) консервативной киназой NHK-1 (Vrk-1 у *Drosophila*) тоже оказывает существенное влияние на процесс формирования кариосферы (Lancaster et al., 2007). Сигнальный путь, блокирующий мейоз в определенной контрольной точке (meiotic checkpoint), подавляет активность NHK-1, препятствуя дальнейшей реорганизации ядра ооцита, включая формирование кариосферы (Lancaster et al., 2010). Другая эволюционно консервативная киназа SRPK тоже регулирует формирование кариосферы у *Drosophila*, поскольку нормальная сборка хромосом в кариосферу нарушается у стерильных самок, мутантных по гену *srpk* (Loh et al., 2012).

Общий характер морфогенеза кариосферы в ооцитах различных насекомых оказывается сходным и состоит в прогрессивной конденсации хроматина и продукции разного рода экстрахромосомного материала. Вместе с тем морфологические особенности кариосферы носят видоспецифичные черты, наиболее яркие из которых — степень конденсации хроматина и наличие в некоторых случаях особой экстрахромосомной капсулы, окружающей хроматин. При развитии капсулы кариосферу называли своеобразным «ядром в ядре» (Gruzova, Parfenov, 1993), подчеркивая значительную изолированность хромосом от остальной части нуклеоплазмы.

Среди насекомых с мероистическими политрофными яичниками развитая капсула кариосферы характеризует, например, ооциты сетчатокрылых насекомых (Neuroptera) (Gruzova et al., 1972; Rübсам, Büning, 2001). Напротив, она отсутствует у исследованных представителей отрядов Mecoptera (Batalova et al., 2005) и Phthiraptera (Żelazowska, Jaglarz, 2004). Сложно устроенная капсула кариосферы, в формировании которой принимают участие, в частности производные синаптонемных комплексов, развивается в ооцитах комаров (Fiil, Moens, 1973; Fiil, 1974). Однако кариосфера не имеет капсулы в ооцитах представителей высших Diptera, включая *Drosophila*, *Musca*, *Calliphora*, *Sarcophaga* и *Glossina* (Bier et al., 1967; Mahowald, Tiefert, 1970; Huebner et al., 1975; Cardoen et al., 1986).

Среди изученных насекомых с мероистическими телотрофными яичниками, к которым принадлежит исследуемый в настоящей работе вид жуков-чернотелок (Tenebrionidae) — *Tribolium castaneum*, капсула кариосферы развивается в ооцитах мертвеедов (Silphidae) (Matuszewska et al., 1977) и долгоносиков (Curculionidae) (Świątek, 1999; Nardon, 2006). У тенебрионид капсула кариосферы присутствует в ооцитах *Blaps lethifera*, *B. mortisaga*, *Gnaptor spinimanus* (Грузова, 1979; Грузова, Баталова, 1979; Gruzova, 1982), *Tenthryia nomas taurica* (Александрова, 1992) и *T. castaneum* (Bogolyubov et al., 2013), но отсутствует у *Tenebrio molitor* (Bogolyubov et al., 2000; Bogolyubov, Parfenov, 2001). Среди представителей других семейств всеядных жуков капсула кариосферы не развивается в ооцитах семиточечной божьей коровки *Coccinella septempunctata* (Кожанова, Пасичник, 1979), фасолевой зерновки *Bruchidius obtectus* (Büning, 1972), а за пределами Coleoptera-Polyphaga — у верблюдки *Raphidia flavipes* (Büning, 1980).

Функциональная роль капсулы кариосферы и ее молекулярный состав остаются до конца не выясненными (см. раздел «Обсуждение»).

В настоящей работе мы продолжаем начатые нами ранее (Боголюбов и др., 2012; Bogolyubov et al., 2013) исследования строения, молекулярного состава и морфодинамики ядерных структур, в том числе кариосферы и ее капсулы, в оогенезе жука-чернотелки *T. castaneum*. Булавоусый мучной хрущак *T. castaneum* в последние годы привлекает внимание исследователей как перспективный модельный объект благодаря тому, что геном данного вида полностью секвенирован, выровнен и является достоянием научной общестственности (*Tribolium* genome sequencing consortium, 2008). Эти жуки являются опасными сельскохозяйственными вредителями и могут вызывать аллергические реакции у человека, но не способны распространять заболевания и повреждать деревянные строения или мебель. По сравнению с дрозофилой — традиционным лабораторным насекомым — *Tribolium* как мо-

дельный объект имеет ряд несомненных преимуществ (Peel, 2009). Так, *Drosophila* характеризуется рядом эволюционно специализированных черт, нетипичных для Arthropoda в целом. К таким чертам относятся, в частности, малый размер генома дрозофилы и ряд специфических морфологических, физиологических, поведенческих и экологических признаков.

Очевидно, что новый модельный вид требует всесторонней характеристики. Однако данные в отношении оогенеза и строения ооцитов *T. castaneum* до настоящего времени остаются скудными. Детально описана лишь микроанатомия женских гонад этого вида и прослежена дифференцировка ооцитов и питающих клеток (Trauner, Büning, 2007). Другие исследования женской половой системы *T. castaneum* касались влияния теплового шока на развитие яичников и экспрессию гена *hsp83*, гомологичного гену *hsp90* человека (Xu et al., 2009, 2010a). Кроме того, выявлено несколько транскрипционных факторов, играющих существенную роль в репродукции и эмбриогенезе *T. castaneum* (Bitra, Palli, 2010; Xu et al., 2010b). Наконец, несколько исследований было посвящено изучению гормональной регуляции репродукции, развития яичников и синтеза вителлогенина у самок данного вида (Parthasarathy et al., 2010a, 2010b; Parthasarathy, Palli, 2011). Об особенностях строения ядер ооцитов *T. castaneum* до начала наших исследований (Боголюбов и др., 2012; Bogolyubov et al., 2013; настоящая работа) ничего известно не было.

Материал и методика

Культуры *T. castaneum* (Herbst.) (Coleoptera-Polyphaga, Tenebrionidae) содержали в темноте при 28 °С. Гонады взрослых самок препарировали в физиологическом растворе для насекомых (0.75 % NaCl, 0.035 % KCl и 0.021 % CaCl₂). Изолированные ядра ооцитов разных стадий развития наблюдали в нефиксированном состоянии с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM IRB, оснащенного оптикой Номарского (дифференциальный интерференционный контраст, DIC), при добавлении в раствор 1.0 мкг/мл 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI).

Для электронно-микроскопического исследования отдельные яйцевые трубки (овариолы) фиксировали в 2.5 %-ном глутаральдегиде (Polyscience, США), приготовленном на 0.1 М какодилатном буфере, дофиксировали 4 %-ным OsO₄ в течение 1.5 ч при комнатной температуре и заключали в смолу Спурр (Ted Pella, Inc., Redding, CA, США). Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали с помощью электронного микроскопа Libra 120 или JEM-7A при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Для иммуноэлектронного исследования овариолы фиксировали в растворе, который содержал 0.5 % глутаральдегида и свежеприготовленного из параформальдегида 4 %-ного формальдегида на PBS, в течение 2 ч при комнатной температуре, затем в 2 %-ном формальдегиде на PBS в течение ночи при 4 °С. После промывки в PBS, содержащем 0.05 M NH₄Cl, и последующего обезвоживания материал заключали в смолу LR White (Sigma, США).

В качестве первых антител использовали следующие моноклональные антитела: к белку SC35 (Fu, Maniatis, 1990) в концентрации 2.5 мкг/мл, K121 к TMG-кэпу мяРНК (Krainer, 1988) в концентрации 1 мкг/мл, Y12 к

симметричным диметиларгининам Sm-эпитопа мяРНП (Lerner et al., 1981; Brahms et al., 2000) без разведения, МАВ030 к двухцепочечной ДНК (Chemicon International, США) при разведении 1 : 300, 1501R к актину (Chemicon) при разведении 1 : 50, а также поликлональные козы антитела М-20 к ламину В (Santa Cruz Biotechnology) при разведении 1 : 50. В качестве вторых антител использовали антитела осла к иммуноглобулинам мыши или козы, конъюгированные с частицами коллоидного золота 10 или 15 нм (Abcam), при разведении в 10—20 раз. После обработки антителами ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом.

Результаты

Подобно другим видам тенебрионид, *T. castaneum* имеет женские гонады, устроенные типично для яичников мероистического телотрофного типа. Каждая яйцевая трубка, или овариола (анатомическая и функциональная единица яичников насекомых; см.: Büning, 1994), состоит из гермари (трофария), переходной зоны («шейки») и вителлярия (рис. 1, а). Гермари имого содержат дифференцированные питающие клетки (трофоциты) и наиболее молодые ооциты. Дифференцировка клеток на ооциты и трофоциты у *T. castaneum* происходит только на стадиях личинки и куколки (Trauner, Büning, 2007). В вителлярии в окружении фолликулярного эпителия расположены 2—3 ооцита на стадиях превителлогенеза и вителлогенеза (рис. 1, а).

При описании стадий развития ооцитов *T. castaneum* обычно используют номенклатуру, предложенную для *Tenebrio molitor* (Ullmann, 1973). Мы расширили прежние характеристики данных стадий с учетом динамики ядра и ядерных структур, в результате чего выделено 8 стадий, охватывающих период роста ооцита *T. castaneum* (см. таблицу; рис. 1, б—и). В гермари обнаруживаются ооциты I стадии развития, которые не вступили в период роста. Такие ооциты имеют округлую форму и не отличаются по размеру от трофоцитов. Цитоплазма занимает относительно небольшой объем клетки. Она слабо дифференцирована. В ядре выявляются отдельные гетерохроматиновые блоки (рис. 2, а).

Ооциты, расположенные в «шейке» овариолы, находятся на II и III стадиях развития. На стадии II несколько ооцитов расположено по соседству друг с другом и окружено префолликулярными клетками. На данной стадии начинается цитоплазматический рост ооцита. На давленных препаратах диаметр ядра ооцита составляет 2.5—2.7 мкм. Хромосомы в значительной степени деконденсированы, но в ядре обнаруживаются отдельные хромоцентры (рис. 2, б).

На стадии III начинается формирование фолликула. При этом ооцит заметно увеличивается в размерах, а префолликулярные клетки окружают ооцит, образуя столбчатый фолликулярный слой. Фолликулы выстраиваются друг за другом. Диаметр ядра составляет 6.0—6.5 мкм. Со стадии III начинается процесс формирования кариосферы. Первоначально хромосомы объединяются в несколько групп; при этом в нуклеоплазме обнаруживаются первые экстрахромосомные элементы капсулы в виде электронно-плотных фибриллярных блоков (см. таблицу; рис. 1, б; 2, в) и тяжей, которые состоят из поперечно исчерченных нитей толщиной 20 нм, уложенных в составе тяжа в несколько рядов (рис. 3, а). При исследовании се-

рийных срезов прослеживается связь тяжей с электронно-плотными блоками.

На стадии IV происходит дальнейшее увеличение размеров ооцита. Фолликулы полностью сформированы. Фолликулярные клетки организованы в столбчатый эпителий. В ядре ооцита присутствует кариосфера с развитой капсулой. На стадии V начинается интенсивный оплазматический рост. Ядро ооцита все еще расположено в центре клетки. Продолжается морфогенез кариосферы и ее капсулы, которая окружает рыхлый хроматин, собранный в кариосферу (рис. 2, з). К концу данной стадии капсула кариосферы достигает наибольшей морфологической сложности.

Запасание желтка (ранний вителлогенез) начинается со стадии VI. Ооцит быстро увеличивается в размере. Фолликулярные клетки становятся кубическими. Ядро ооцита расположено в центре клетки (рис. 1, з). Кариосфера (рис. 1, з—е) по своим морфологическим признакам незначительно отличается от таковой на предыдущей стадии, однако к уже имеющимся элементам капсулы добавляются новые — внутриядерные пористые пластинки (annulata lamellae) (рис. 3, б).

На стадии среднего вителлогенеза (стадия VII) ядро ооцита достигает 35 мкм в диаметре и перемещается в среднедорсальную часть ооцита. Элементы капсулы кариосферы разрыхляются, что, по-видимому, свидетельствует о начале ее разборки (рис. 1, ж, з). На стадии позднего вителлогенеза (стадия VIII) фолликулярные клетки становятся плоскими, формируя чешуйчатый эпителий, и начинается формирование хориона. Ядро ооцита достигает 100 мкм в диаметре. Кариосфера с капсулой все еще обнаруживается, однако элементы капсулы постепенно разбираются, а размеры капсулы уменьшаются (рис. 1, и; 3, в). Стадию IX согласно классификации Ульман (Ullmann, 1973), которая соответствует яйцам с полностью развитым хорионом в период резорбции ядерной оболочки, в данном исследовании мы не рассматривали.

Иммуноцитохимические исследования показали, что существенным молекулярным компонентом капсулы кариосферы *T. castaneum* являются белки ядерного матрикса, в том числе фибриллярный актин, и ламин В (рис. 4, а, б). Помимо структурных белков в составе капсулы кариосферы выявлены мяРНП (рис. 4, в, з) в качестве довольно неожиданного компонента; для их обнаружения мы использовали антитела, распознающие симметричные диметиларгинины «Sm-эпитопа» мяРНП (рис. 4, в), и антитела к ТМГ-кэпу 5'-конца молекул «зрелых» мяРНК (рис. 4, з). При этом маркерный компонент кластеров интерхроматиновых гранул SR-белок SC35 выявляется только в ядерных тельцах, но не в капсуле кариосферы (рис. 5).

Обсуждение

Мы установили, что на стадии диплотены мейоза хромосомы ооцита *T. castaneum* довольно рано объединяются в компактную кариосферу, или кариосому. Однако в отличие от *Tenebrio molitor* (Bogolyubov et al., 2000; Bogolyubov, Parfenov, 2001) — представителя того же семейства Tenebrionidae, к которому принадлежит *T. castaneum*, значительной конденсации хроматина в ооцитах *T. castaneum* не происходит (рис. 2, з).

Принято считать, что формирование кариосферы отражает существование в оогенезе периода естественной

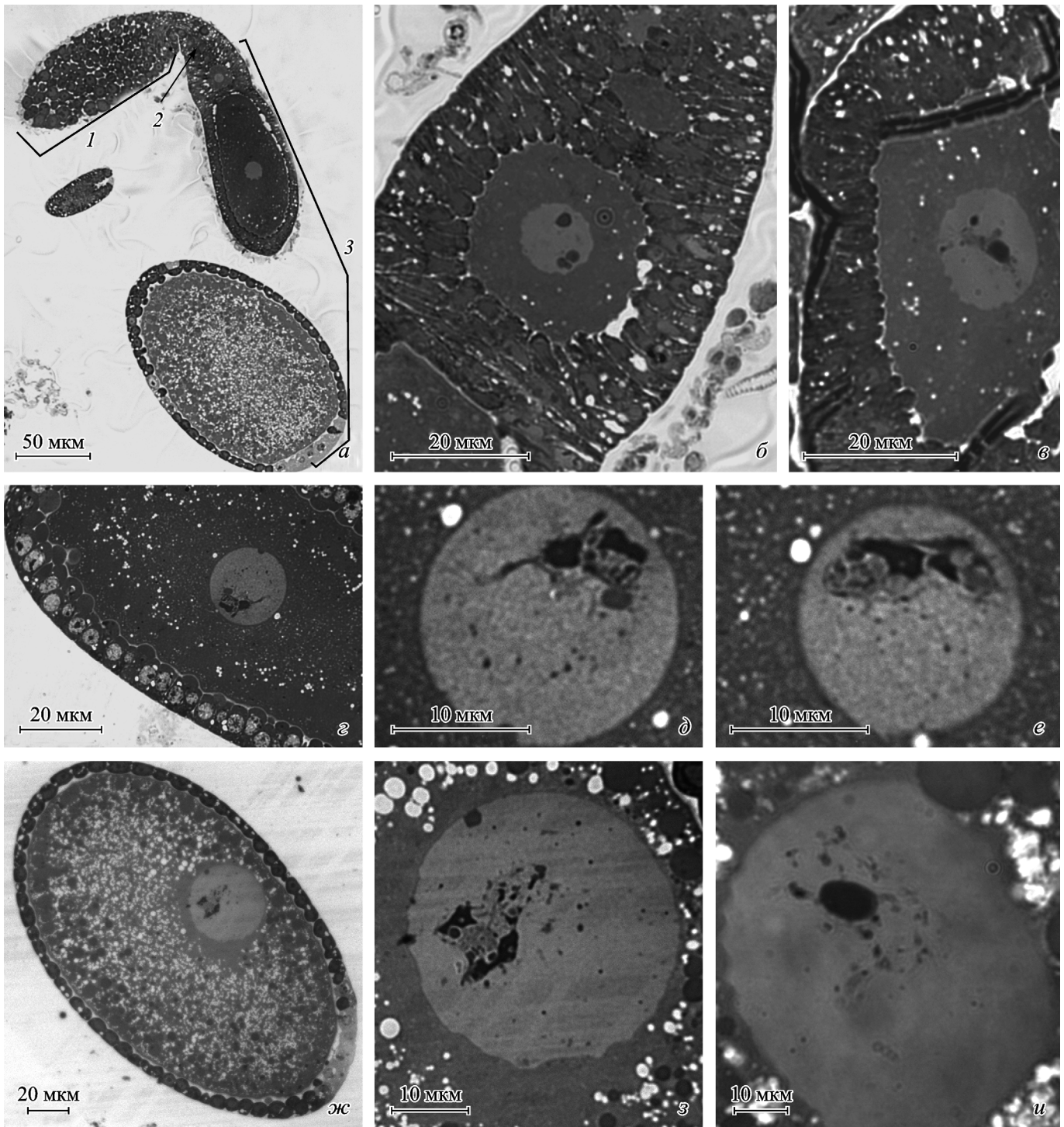






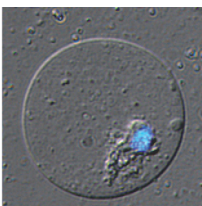



Рис. 1. Полутонкие срезы яйцевых трубок *Tribolium castaneum*.

а — общий вид среза яйцевой трубки; *1* — гермарий, *2* — «шейка» овариолы, *3* — вителлярый. *б, в* — срезы фолликулов с превителлогенными ооцитами на стадиях развития III (*б*) и IV (*в*). *г* — фрагмент фолликула с ранним вителлогенным ооцитом (стадия VI). *д, е* — серийные срезы ядра ооцита той же стадии развития; видны хорошо развитые элементы капсулы кариосферы. *ж, з* — фолликул с вителлогенным ооцитом стадии VII (*ж*) и ядро ооцита той же стадии (*з*); видна разрыхленная капсула кариосферы. *и* — ядро ооцита стадии VIII в период разборки капсулы кариосферы. Окраска метиленовым синим.

(физиологически детерминированной) инактивации РНК-синтетической активности хромосомного аппарата в период большого роста ооцита. Однако постулат о выключении хромосомного аппарата ооцита на стадии кариосферы из транскрипционных процессов (Gruzova, Pargfenov, 1993) требует постоянных сравнительных исследова-

ний. Ранее неоднократно отмечалось включение ³H-уридина как предшественника синтеза РНК в область кариосферы (например, в ооцитах некоторых насекомых) при проведении автордиографических экспериментов (Büning, 1972; Chaminade, Laverdure, 1976; Ray, Ramamurty, 1979). Кроме того, в ооцитах мясной мухи *Sarco-*

Характеристика стадий роста ооцитов *Tribolium castaneum* с учетом морфодинамики ядерных структур

Номер стадии и изображения ооцитов (стадии I—II) и изолированных ядер (стадии III—VIII), полученные с помощью микроскопии по Номарскому (DIC) и окраски DAPI	Стадия оогенеза	Номенклатура по Ullmann (1973)	Характеристика стадий на основе ядерной динамики
I 	Превителлогенез	Покоящиеся первичные префолликулярные ооциты, расположенные в гермариум. По размеру похожи на трофоциты	Ядро овальной формы. Хромосомы тонкие и практически не выявляются с помощью окраски DAPI
II 		Ооциты расположены в «шейке» овариолы, между гермариумом и вителлариумом. Начало периода роста. Несколько ооцитов расположено по соседству друг с другом и окружено префолликулярными клетками	Ядро ооцита становится сферическим ~2.5—2.7 мкм в диаметре. Хромосомы в значительной степени деконденсированы и занимают весь объем ядра
III 		Ооцит значительно увеличивается в размерах и находится в переходной зоне овариолы, где префолликулярные клетки начинают располагаться вокруг ооцита, формируя столбчатый фолликулярный слой. Фолликулы выстраиваются друг за другом	Ядро ооцита (~6—6.5 мкм в диаметре) расположено в центре клетки. Хромосомы объединяются в несколько групп. Первые экстрахромосомные элементы капсулы карисферы появляются в нуклеоплазме
IV 		Ооцит сферической формы еще больше увеличивается в размере. Фолликулы полностью сформированы	Хромосомы стягиваются, формируя карисферу с выраженной экстрахромосомной капсулой
V 		Интенсивный оплазматический рост. Фолликулярные клетки организованы в столбчатый эпителий	Ядро ооцита (~14—17 мкм в диаметре) все еще расположено в центре клетки. Продолжается морфогенез карисферы и ее капсулы. К концу стадии капсула карисферы достигает наибольшей морфологической сложности
VI 	Вителлогенез	Ранний вителлогенез. Начинается запасание желтка. Ооцит быстро увеличивается в размере. Фолликулярные клетки становятся кубическими, между фолликулярным эпителием появляются промежутки	Ядро ооцита (~22 мкм в диаметре) расположено в центре клетки. Карисфера по морфологическим признакам соответствует таковой на предыдущей стадии. Капсула карисферы — сплошная и наиболее сложно устроенная
VII 		Средний вителлогенез. Максимальное развитие фолликулярного эпителия и интенсивности формирования желточных включений	Ядро ооцита достигает 35 мкм в диаметре и перемещается в среднедорсальную часть ооцита. Элементы капсулы карисферы разрушаются
VIII 		Поздний вителлогенез. Фолликулярные клетки уплощаются, формируя чешуйчатый эпителий. Запасание желтка ослабевает. Фолликулярные клетки начинают продукцию хориона	Карисфера с капсулой все еще обнаруживается, однако элементы капсулы начинают разбираться, а размеры капсулы уменьшаться

20 мкм

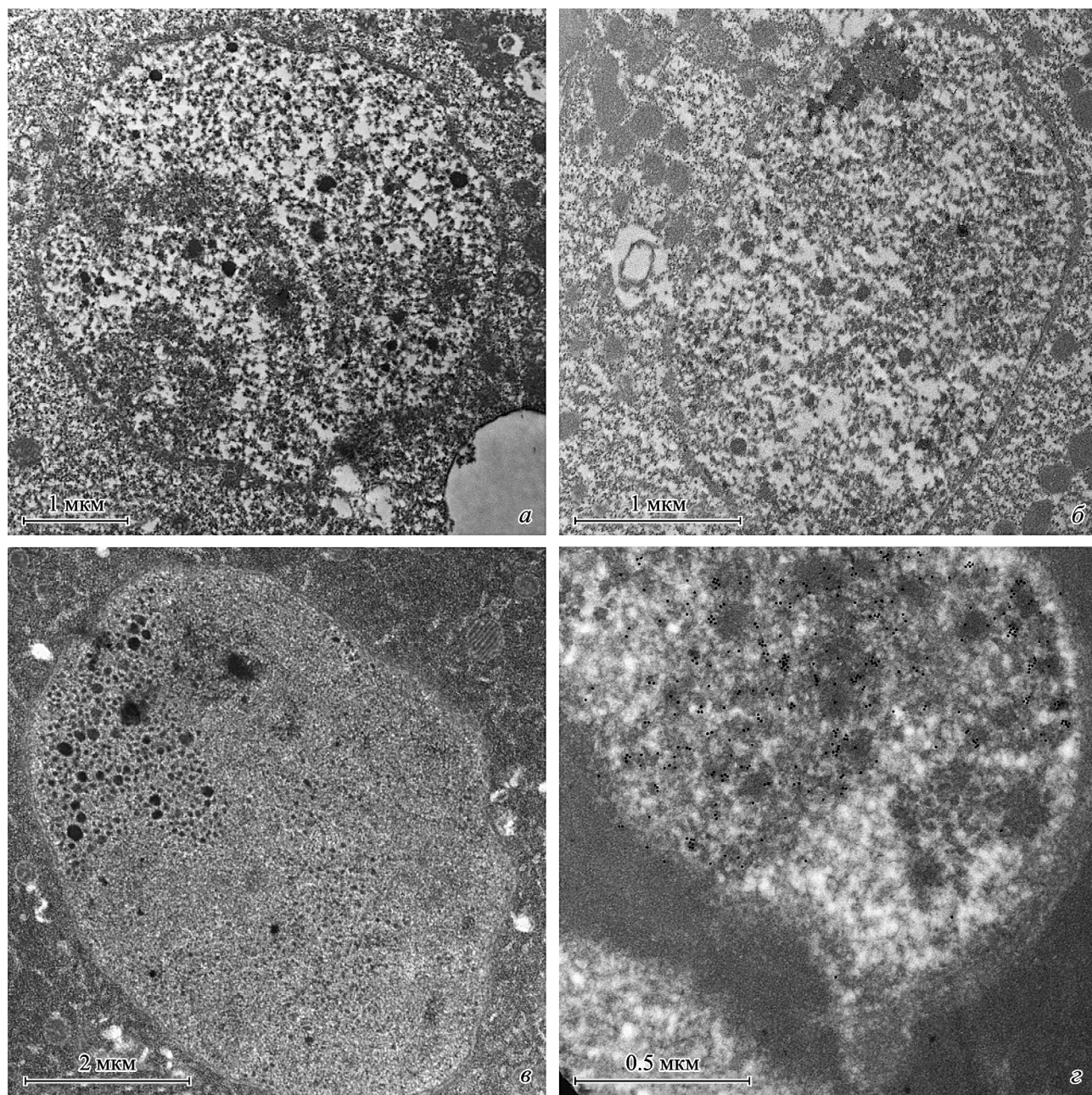


Рис. 2. Ультратонкие срезы ядер ооцитов *Tribolium castaneum* на ранних стадиях развития.

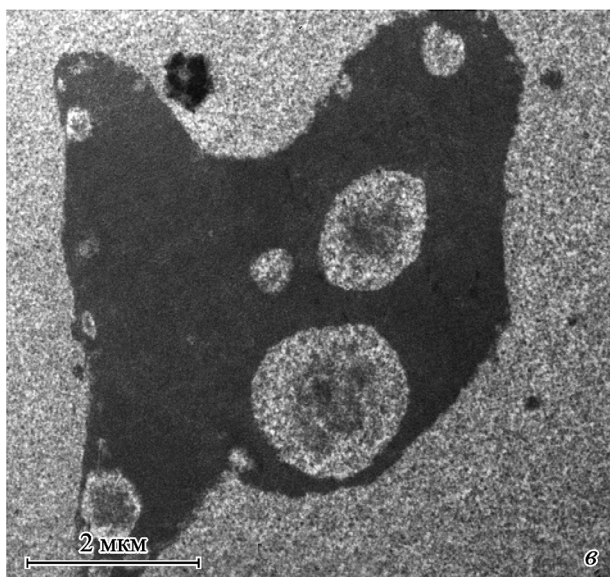
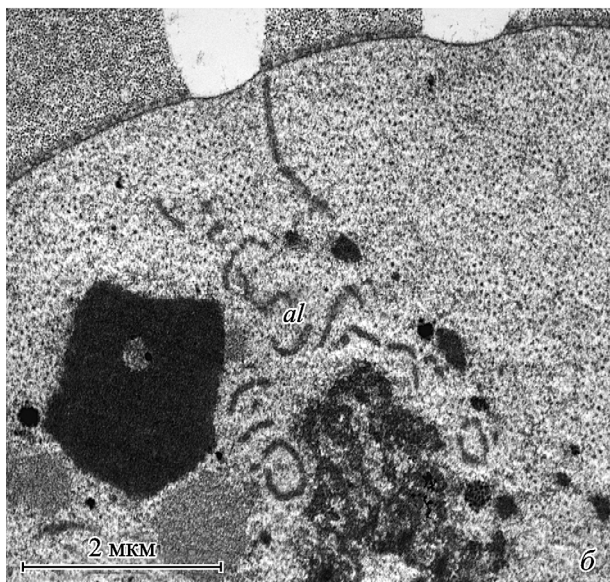
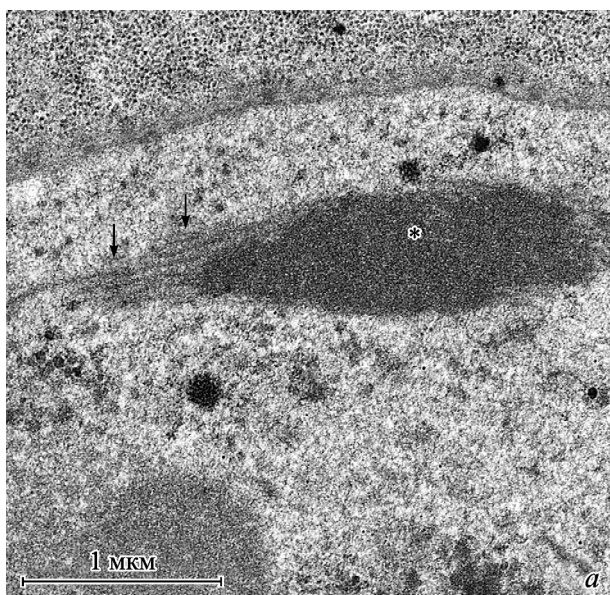
a, б — ядра ооцитов стадий I (*a*) и II (*б*), предшествующих формированию кариосферы, после обработки ультратонких срезов антителами к двухцепочечной ДНК; хроматин диффузно распределен по всему объему ядра. *в* — ядро ооцита стадии III; в нуклеоплазме обнаруживаются первые экстрахромосомные элементы капсулы кариосферы в виде электронно-плотных фибриллярных блоков. *г* — фрагмент кариосферы с капсулой в ядре ооцита стадии V после обработки ультратонкого среза антителами к ДНК; следует обратить внимание на слабо конденсированное состояние хроматина.

phaga bullata в области кариосферы были локализованы поли(A)⁺-РНК (Cardoen et al., 1986). Эти данные могут свидетельствовать о неполной инактивации генома ооцитов исследованных видов. В нашей предыдущей работе (Vogolyubov et al., 2013) с помощью микроинъекций в ооциты бромо-УТФ мы также выявили заметный уровень транскрипционной активности кариосферы в ооцитах *T. castaneum* — объекта настоящего исследования.

Наши работы показывают, что развитие кариосферы в ооцитах *T. castaneum* сопровождается формированием вокруг конденсированного хроматина обширной экстрахромосомной капсулы, которая состоит из фибриллярного материала разных морфологических типов. Обращает

на себя внимание тот факт, что капсула кариосферы не формируется у тех исследованных животных, у которых геном ооцита на поздних стадиях периода роста практически полностью выключается из транскрипционных процессов. Наоборот, при формировании кариосферы капсула развивается, если хромосомы ооцита транскрипционно инактивированы не полностью.

Опыты по микроинъекциям в ооциты насекомых бромо-УТФ в качестве предшественника синтеза РНК показали, что кариосфера, не имеющая капсулы, транскрипционно неактивна в поздних ооцитах *T. molitor* и скорпионницы *Panorpa communis* (Vogolyubov, 2007). Напротив, у *T. castaneum* при наличии развитой капсулы кариосфе-



ры транскрипция продолжается даже в ядрах поздних вителлогенных ооцитов; в этом случае перихроматиновые участки кариосферы содержат заметные количества РНК-полимеразы II в ее элонгирующей (гиперфосфорилированной) форме (Bogolyubov et al., 2013). Среди других насекомых (златоглазка *Chrysopa perla* (Gruzova et al., 1972) и жуки-teneбриониды родов *Blaps* и *Gnaptor* (Грузова, Баталова, 1979)) авторадиграфические исследования с использованием ^3H -уридина выявили 2—3-кратное снижение РНК-синтетической активности ядер поздних ооцитов. Сходные наблюдения сделаны и в отношении кариосферы ооцитов травяной лягушки *Rana temporaria* (Парфенов, Грузова, 1975). Во всех случаях капсула кариосферы была заметно развита.

Ранее считали, что капсула кариосферы — специализированный элемент ядерного матрикса, а ее основная функция состоит в изоляции хроматина от остальной части нуклеоплазмы гигантского ядра ооцита (Gruzova, Parfenov, 1993). В отношении некоторых насекомых (Świątek, 1999; Rübsam, Büning, 2001) и лягушек (Парфенов, Галактионов, 1987; Parfenov et al., 1995) показано, что структурным элементом капсулы кариосферы является F-актин; этот факт подтвержден и в наших исследованиях на ооцитах *T. castaneum* (Bogolyubov et al., 2013; настоящая работа). Вместе с тем новые данные по молекулярному составу капсулы кариосферы наводят на мысль о более прямом ее участии в процессах экспрессии генов в том случае, если хромосомы ооцита, собранные в кариосферу, транскрипционно не инактивированы, как в случае *T. castaneum*.

Необъяснимым в настоящее время является факт депонирования в капсуле кариосферы ооцитов насекомых мРНК, в том числе несущих TMG-кэп, который характерен для тех молекул мРНК, которые уже завершили цитоплазматическую фазу своего процессинга (Will, Lührmann, 2001), а также Sm-белков, детектируемых с помощью антител к симметричным диметиларгининам (Brahms et al., 2000).

С помощью антител к TMG-кэпу мРНК и «Sm-эпитопу» коровых белков мРНКП такие мРНКП были изначально выявлены на ультраструктурном уровне в капсуле кариосферы ооцитов долгоносика *Anthonomus pomorum* (Świątek, Jaglarz, 2004). Позднее эти же антигены были выявлены нами с помощью иммуофлуоресцентной и иммуоэлектронной микроскопии в составе капсулы кариосферы *T. castaneum* (Боголюбов и др., 2012; Bogolyubov et al., 2013; настоящая работа). У *A. pomorum* стенки капсулы кариосферы состоят из двух слоев. Первый, внутренний слой — тонкий, компактный. Он непосредственно соседствует с конденсированным хроматином. Второй, внешний губчатый слой, обращен к нуклеоплазме. Именно во внешнем слое авторы локализовали мРНКП, и этот слой, очевидно, соответствует электронно-плотному элементу капсулы кариосферы *T. castaneum*, где в наибольшей концентрации локализованы мРНКП.

Рис. 3. Ультраструктура составляющих элементов капсулы кариосферы ооцитов *Tribolium castaneum*.

а — связанные между собой электронно-плотный блок (звездочка) и тяж (стрелка), которые являются основными элементами капсулы кариосферы (на рисунке представлен фрагмент ядра ооцита стадии V). б — фрагмент капсулы кариосферы ядра ооцита стадии VI; хорошо заметны внутриядерные пористые пластинки (а1). в — элемент капсулы кариосферы ооцита стадии VIII.

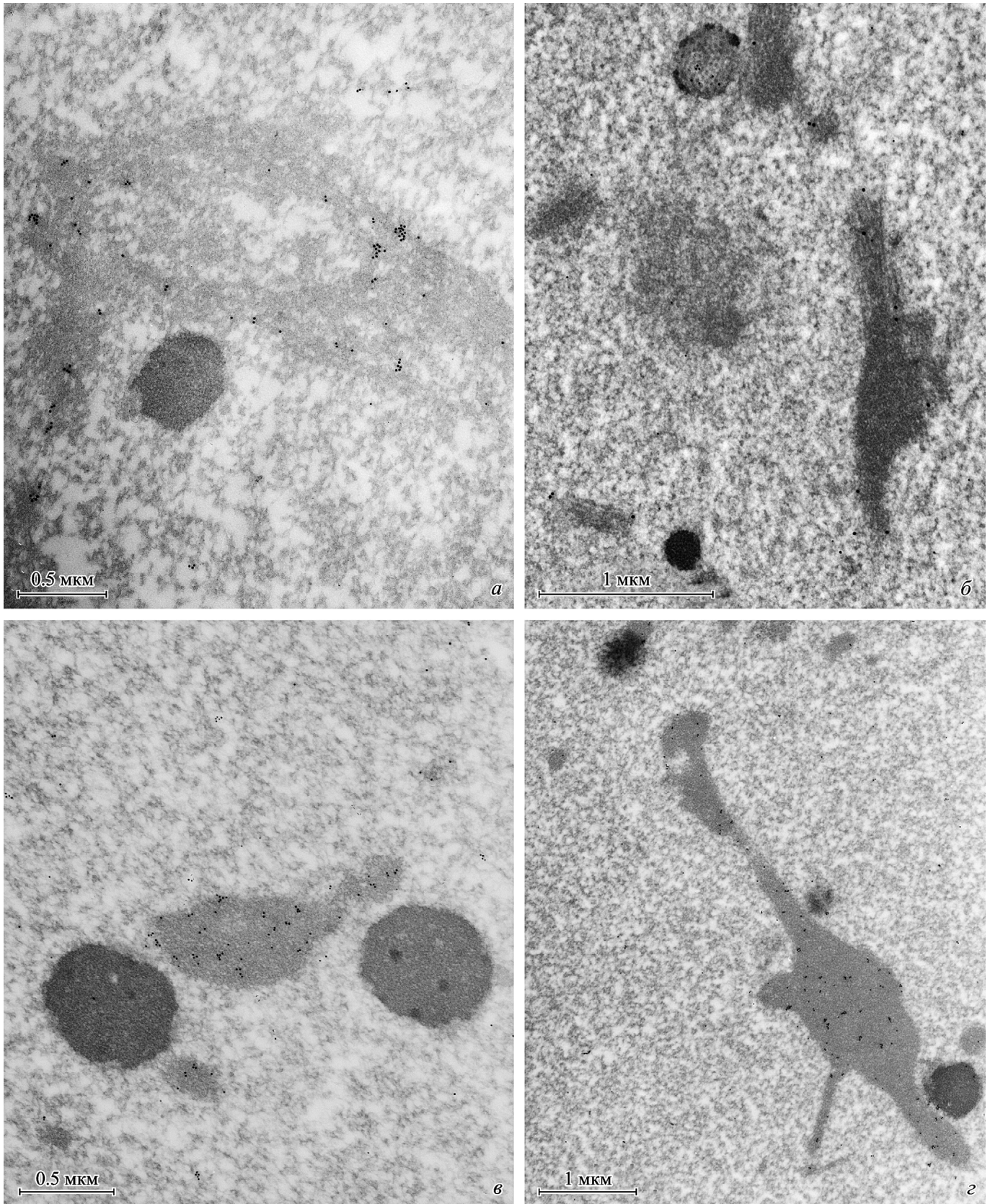


Рис. 4. Элементы капсулы кариосферы после обработки ультратонких срезов ооцитов *Tribolium castaneum* антителами к актину (а), двойного иммуномечения (б) с помощью антител к актину и ламину В, к триметилгуанозинному кэпу мРНК (в) и «5s-эпиглобулину» мРНК (г).

а, в, г — вторые антитела конъюгированы с частицами коллоидного золота диаметром 10 нм; б — вторые антитела конъюгированы с частицами коллоидного золота 15 нм для актина и 10 нм для ламина В.

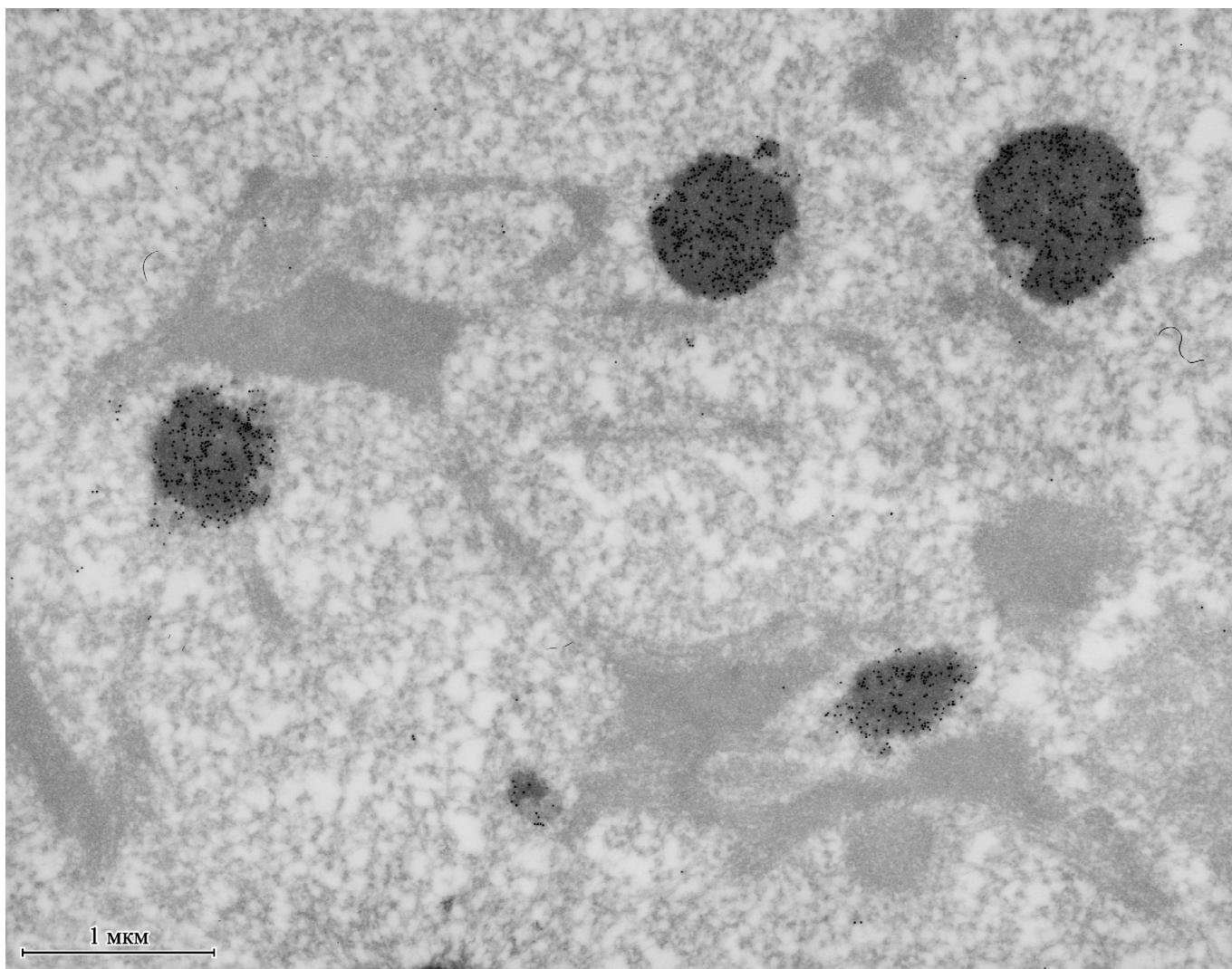


Рис. 5. Фрагмент ультратонкого среза ядра ооцита *Tribolium castaneum* после обработки моноклональными антителами к SR-белку SC35 — маркерному компоненту кластеров интерхроматиновых гранул (ядерных «speckles»).

Видно, что белок локализуется не в составе волокнистого материала капсулы кариосферы, а в нуклеоплазматических ядерных тельцах.

В составе капсулы кариосферы *T. castaneum* нами не выявлен белок SC35 — один из важнейших компонентов сплайсосом, который в этом случае локализуется в экстрахромосомных ядерных тельцах (рис. 5). Очевидно, что посттранскрипционный сплайсинг в области капсулы кариосферы осуществляться не может. Неизвестно также, может ли в капсуле происходить сборка пресплайсосомных мРНК-комплексов или капсула кариосферы служит лишь временным «депо» для мРНК. Требуется дальнейшего решения и вопрос о том, могут ли быть ассоциированы с капсулой кариосферы другие РНК, и к какому классу они относятся.

Авторы выражают благодарность Дж. Г. Голлу (J. G. Gall, Carnegie Institute of Washington, Baltimore, США) за любезно предоставленные антитела α -SC35, K121 и Y12, а также Ю. И. Гукиной за техническую помощь в приготовлении ультратонких срезов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01258) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Александрова О. А. 1992. Внутрядерные тельца и формирование капсулы кариосферы в ооцитах жука-чернотелки *Tenebrio molitor taurica*. Цитология. 34 (6) : 30—37.
- Боголюбов Д. С., Баталова Ф. М., Киселев А. М., Парфенов В. Н. 2012. Распределение 5'-триметилгуанозин-кэпированных малых ядерных РНК в экстрахромосомных ядерных структурах ооцитов лабораторного насекомого *Tribolium castaneum*. Докл. РАН. 444 (6) : 691—694.
- Грузова М. Н. 1979. Ядерные структуры в телотрофных овариолах жуков-чернотелок (Tenebrionidae, Polyphage). III. Ядро ооцитов. Электронно-микроскопические данные. Онтогенез. 10 (4) : 332—339.
- Грузова М. Н., Баталова Ф. М. 1979. Ядерные структуры в телотрофных овариолах жуков-чернотелок (Tenebrionidae, Polyphage). II. Ядро ооцитов *Blaps lethifera* и *Gnaptor spinimanus*. Светооптические данные. Онтогенез. 10 (4) : 323—331.
- Грузова М. Н., Цветков А. Г., Почукалина Г. Н., Парфенов В. Н. 1995. Формирование кариосферы в оогенезе некоторых насекомых и амфибий. Цитология. 37 (8) : 744—769.
- Кожанова Н. И., Пасичник М. И. 1979. Дифференцировка ооцитов и питающих клеток в телотрофных овариолах жука *Coccinella septempunctata*. Цитология. 21 (10) : 1145—1149.

- Парфенов В. Н., Галактионов К. И. 1987. Внутрядерные активные филаменты в ооцитах травяной лягушки. Цитология. 29 (2) : 142—149.
- Парфенов В. Н., Грузова М. Н. 1975. Ядерные структуры в позднем оогенезе травяной лягушки. II. Авторадиографические данные. Цитология. 17 (11) : 1263—1268.
- Batalova F. M., Stepanova I. S., Skovorodkin I. N., Bogolyubov D. S., Parfenov V. N. 2005. Identification and dynamics of Cajal bodies in relation to karyosphere formation in scorpionfly oocytes. Chromosoma. 113 : 428—439.
- Bier K., Kuntz W., Ribbert D. 1967. Struktur und Funktion der Oocytenchromosomen und Nukleolen sowie der Extra-DNS während der Oogenese panoistischer und meroistischer Insekten. Chromosoma. 23 : 214—254.
- Biliński S. M. 1998. Filogeneza owadów a struktura i ultrastruktura ich jajników. Przegląd Zool. 42 : 35—51.
- Bitra K., Palli S. R. 2010. The members of bHLH transcription factor superfamily are required for female reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. J. Insect Physiol. 56 : 1481—1489.
- Bogolyubov D. 2007. Localization of RNA transcription sites in insect oocytes using microinjections of 5-bromouridine 5'-triphosphate. Folia Histochem. Cytobiol. 45 : 129—134.
- Bogolyubov D., Alexandrova O., Tsvetkov A., Parfenov V. 2000. An immunoelectron study of karyosphere and nuclear bodies in oocytes of mealworm beetle, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Polyphaga). Chromosoma. 109 : 415—425.
- Bogolyubov D. S., Batalova F. M., Kiselyov A. M., Stepanova I. S. 2013. Nuclear structures in *Tribolium castaneum* oocytes. Cell Biol. Int. 37 : 1061—1079.
- Bogolyubov D., Parfenov V. 2001. Immunogold localization of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing factors in *Tenebrio molitor* oocyte nuclei with special emphasis on karyosphere development. Tissue Cell. 33 : 549—561.
- Brahms H., Raymackers J., Union A., de Keyser F., Meheus L., Lürmann R. 2000. The C-terminal RG dipeptide repeats of the spliceosomal Sm proteins D1 and D3 contain symmetrical dimethylarginines, which form a major B-cell epitope for anti-Sm autoantibodies. J. Biol. Chem. 275 : 17 122—17 129.
- Büning J. 1972. Untersuchungen am Ovar von *Bruchidius obtectus* Say. (Coleoptera-Polyphaga) zur Klärung des Oocytenwachstums in der Prävitellogenese. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 128 : 241—282.
- Büning J. 1980. The ovary of *Raphidia flavipes* is telotrophic and of the *Sialis* type (Insecta, Raphidioptera). Zoomorphologie. 95 : 127—131.
- Büning J. 1994. The insect ovary: ultrastructure, previtellogenic growth and evolution. London: Chapman & Hall. 400 p.
- Cardoen J., Schoofs L., Broekaert D., Van Mellaert H., Verachert B., De Loof A. 1986. Polyploidization and localization of poly(A)⁺ RNA in the different cell types of the vitellogenic meroistic ovary of the fleshfly, *Sacrophaga bullata*. Histochemistry. 85 : 305—312.
- Chaminade M. M., Laverdure, A.-M. 1976. Étude quantitative des synthèses d'ARN nucléaires dans l'ovaire de *Tenebrio molitor* adulte. C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D. 282 : 1297—1300.
- Fiil A. 1974. Structural and functional modifications of the nucleus during oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti*. J. Cell Sci. 14 : 51—67.
- Fiil A., Moens P. 1973. The development structure and function of modified synaptonemal complexes in mosquito oocytes. Chromosoma. 41 : 37—62.
- Fu X.-D., Manitis T. 1990. Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. Nature. 343 : 437—441.
- Gruzova M. N. 1982. Ultrastructure of the karyosphere in darkling beetles (Tenebrionidae, Coleoptera-Polyphaga). Monit. Zool. Ital. 16 : 231—246.
- Gruzova M. N., Parfenov V. N. 1993. Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis. Int. Rev. Cytol. 144 : 1—52.
- Gruzova M. N., Zaichikova Z. P., Sokolov I. I. 1972. Functional organization of the nucleus in the oogenesis of *Chrysopa perla* L. (Insecta, Neuroptera). Chromosoma. 37 : 353—385.
- Huebner E., Tobe S. S., Davey K. G. 1975. Structural and functional dynamics of oogenesis in *Glossina austeni*: general features, previtellogenesis and nurse cells. Tissue Cell. 7 : 297—317.
- Ivanovska I., Khandan T., Ito T., Orr-Weaver T. L. 2005. A histone code in meiosis: the histone kinase, NHK-1, is required for proper chromosomal architecture in *Drosophila* oocytes. Genes. Develop. 19 : 2571—2582.
- Krainer A. 1988. Pre-mRNK splicing by complementation with purified human U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs. Nucl. Acids Res. 16 : 9415—9429.
- Lancaster O. M., Breuer M., Cullen C. F., Ito T., Ohkura H. 2010. The meiotic recombination checkpoint suppresses NHK-1 kinase to prevent reorganisation of the oocyte nucleus in *Drosophila*. PLoS Genet. 6 : e1001179.
- Lancaster O. M., Cullen C. F., Ohkura H. 2007. NHK-1 phosphorylates BAF to allow karyosome formation in the *Drosophila* oocyte nucleus. J. Cell Biol. 179 : 817—824.
- Lerner E. A., Lerner M. R., Janeway C. A., Steitz J. 1981. Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune diseases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 78 : 2737—2741.
- Loh B. J., Cullen C. F., Vogt N., Ohkura H. 2012. The conserved kinase SRPK regulates karyosome formation and spindle microtubule assembly in *Drosophila* oocytes. J. Cell Sci. 125 : 4457—4462.
- Mahowald A. P., Tiefert M. 1970. Fine structural changes in the *Drosophila* oocytes nucleus during a short period of RNA synthesis. Wilhelm Roux' Arch. Entw. Mech. Org. 165 : 8—25.
- Matuszewski B., Hoser P., Hoser G., Michalak M. 1977. Organization of the oocyte nucleus in Silphid beetles (Silphidae, Coleoptera-Polyphaga). Experientia. 33 : 883—885.
- Nardon P. 2006. Ovogenèse et transmission des bactéries symbiotiques chez le charançon *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). Ann. Soc. Entomol. Fr. 42 : 129—164.
- Parfenov V. N., Davis D. S., Pochukalina G. N., Sample C. E., Bugaeva E. A., Murti K. G. 1995. Nuclear actin filaments and their topological changes in frog oocytes. Exp. Cell Res. 217 : 385—394.
- Parthasarathy R., Palli S. R. 2011. Molecular analysis of nutritional and hormonal regulation of female reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Insect Biochem. Mol. Biol. 41 : 294—305.
- Parthasarathy R., Sheng Z., Sun Z., Palli S. R. 2010a. Ecdysteroid regulation of ovarian growth and oocyte maturation in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Insect Biochem. Mol. Biol. 40 : 429—439.
- Parthasarathy R., Sun Z., Bai H., Palli S. R. 2010b. Juvenile hormone regulation of vitellogenin synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Insect Biochem. Mol. Biol. 40 : 405—414.
- Peel A. D. 2009. Forward genetics in *Tribolium castaneum*: opening new avenues of research in arthropod biology. J. Biol. 8 : 106.
- Ray A., Ramamurty P. S. 1979. Sources of RNA oocytes in *Crynodes peregrinus* Fuessly (Coleoptera, Chrysomelidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 8 : 113—122.
- Rübsam R., Büning J. 2001. F-actin is a component of the karyosome in neuropteran oocyte nuclei. Arthr. Struct. Develop. 30 : 125—133.
- Świątek P. 1999. Formation of the karyosome in developing oocytes of weevils (Coleoptera, Curculionidae). Tissue Cell. 31 : 587—593.
- Świątek P., Jaglarz M. K. 2004. SnRNPs are present in the karyosome capsule in the weevil germinal vesicle. Tissue Cell. 36 : 253—262.
- Trauner J., Büning J. 2007. Germ-cell cluster formation in the telotrophic meroistic ovary of *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Polyphaga, Tenebrionidae) and its implication on insect phylogeny. Develop. Genes Evol. 217 : 13—27.

Tribolium genome sequencing consortium. 2008. The genome of the model beetle, pest *Tribolium castaneum*. Nature. 452 : 949—955.

Ullmann S. L. 1973. Oogenesis in *Tenebrio molitor*: histological and autoradiographical observations on pupal and adult ovaries. J. Embryol. Exp. Morphol. 30 : 179—217.

Will C. L., Lührmann R. 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. Curr. Opin. Cell Biol. 13 : 290—301.

Xu J., Shu J., Qiu X., Wang Z., Zhao F., Zhang Z., Zhang Q. 2009. Effects of heat shock on ovary development and *hsp83* expression in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Arch. Insect Biochem. Physiol. 70 : 204—216.

Xu J., Shu J., Zhang Q. 2010a. Expression of the *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) *hsp83* gene and its relation to oogenesis during ovarian maturation. J. Genet. Genomics. 37 : 513—522.

Xu J., Tan A., Palli S. R. 2010b. The function of nuclear receptors in regulation of female reproduction and embryogenesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. J. Insect Physiol. 56 : 1471—1480.

Żelazowska M., Jaglarz M. K. 2004. Oogenesis in phthirapterans (Insecta: Phthiraptera). I. Morphological and histochemical characterization of the oocyte nucleus and its inclusions. Arthr. Struct. Develop. 33 : 161—172.

Поступила 26 VII 2013

KARYOSPHERE CAPSULE IN *TRIBOLIUM CASTANEUM* OOCYTES

F. M. Batalova, D. S. Bogolyubov¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: dmitr@mail.cytspb.rssi.ru

Structure and composition of the karyosphere (karyosome) capsule were studied in the oocytes of a laboratory insect, *Tribolium castaneum*, with the use of electron microscopy and immunoelectron cytochemistry. Basing on the study of nuclear structure dynamics, we distinguished 8 stages that characterize the period of oocyte growth. At the diplotene stage, *T. castaneum* oocyte chromosomes conjoin early into a compact karyosphere, but a significant chromatin condensation does not occur. The process of karyosphere formation is accompanied by the development of an extensive extrachromosome capsule surrounding chromatin. The capsule consists of a material of different morphological types. Significant molecular components of the *T. castaneum* karyosphere capsule are represented by the proteins of nuclear matrix including F-actin and lamin B. Besides the structural proteins, the Sm proteins of small nuclear (sn) RNPs and mature 2,2,7-trimethyl guanosine (TMG) 5'-capped snRNAs are revealed immunocytochemically in the karyosphere capsule. The obtained data can form a basis for further expansion of ideas on the functions of the karyosphere capsule as a specialized extrachromosomal nuclear domain of the oocytes. We believe that the *T. castaneum* karyosphere capsule plays not only a structural role, but may be involved directly in the processes related to gene expression.

Key words: *Tribolium castaneum*, oocyte nucleus, extrachromosomal nuclear domain, karyosphere, karyosphere capsule, electron microscopy.