

## ИЗМЕНЕНИЕ pH КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ ИНДУЦИРУЕТ РЕОРГАНИЗАЦИЮ АКТИНОВОГО КОМПОНЕНТА ЯДЕР ДВУХКЛЕТОЧНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШИ

© Н. А. Боголюбова,<sup>1,\*</sup> Е. О. Мироненко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

<sup>2</sup> Кафедра эмбриологии биологического факультета С.-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034;

\* электронный адрес: nataly\_bogoly@mail.ru

Актин является постоянным компонентом клеточного ядра и участвует в осуществлении разнообразных ядерных процессов, однако некоторые из функций, выполняемых этим белком в ядре, пока изучены недостаточно подробно. В настоящее время продолжаются исследования механизмов, с помощью которых внеклеточные сигналы могут оказывать влияние на реализацию актином его ядерных функций. Для развивающихся *in vitro* ранних зародышей млекопитающих изменения базовых параметров культуральной среды являются важными внеклеточными сигналами. Отклонение кислотности среды от значения, оптимального для поддержания гомеостаза зародышей, принадлежит к числу таких сигналов. Целью настоящей работы являлось изучение внутриядерной локализации актина у двухклеточных зародышей мыши, находящихся в состоянии стресса, вызванного изменением кислотности внеклеточной среды. Характер распределения актина исследовали в ядрах зародышей после их кратковременного культивирования в средах с оптимальной (pH 7.2), повышенной (pH 7.8) и пониженной (pH 6.5) кислотностью. Анализ проводили на светооптическом уровне с помощью конфокальной микроскопии, используя методы прямого флуоресцентного и непрямого иммунофлуоресцентного выявления актина. Показано, что отклонение кислотности среды от оптимального значения является сигналом, индуцирующим изменение организации актинового компонента ядер бластомеров. Воздействие на эмбрионы сред, имевших кислотность pH 7.8 и pH 6.5, вызывало внутриядерное перераспределение актина, которое, в частности, выражалось в накоплении ядрами мономерного актина и появлении там фибриллярного актина, распознаваемого TRITC-фаллоидином. Данные изменения, по нашему мнению, имеют некоторые черты сходства с теми индуцированными стрессом изменениями внутриядерного распределения актина, которые, согласно ранее опубликованным рядом исследователей результатам, наблюдали в ядрах соматических клеток.

Ключевые слова: доимплантационные зародыши мыши, ядерный актин, клеточное ядро, pH, стресс, лазерная конфокальная сканирующая микроскопия.

Актин является постоянным компонентом клеточного ядра и участвует в осуществлении разнообразных ядерных процессов (Kristó et al., 2016; Viita, Vartiainen, 2017). Список ядерных функций актина постоянно пополняется.

Результаты опубликованных в разные годы исследований свидетельствуют о том, что внеклеточные стимулы, в частности изменения условий внешней среды, могут вызывать изменение количества актина в ядре и формирование там новых актиновых структур. Известно, что в ядрах интактных соматических клеток фибриллярный актин (F-актин), распознаваемый фаллоидином, отсутствует, однако в ответ на изменение внешних условий или экспериментальные воздействия в ядрах увеличивается количество мономерного актина и одновременно формируются структуры, образованные каноническим F-актином. Их наличие было подтверждено с помощью нескольких методов визуализации актина, в том числе с использованием TRITC-фаллоидина и новых методов прижизненного наблюдения (Sanger et al., 1980; Baarlink et al., 2013; Belin et al., 2013; Plessner et al., 2015). В этих

работах было показано, что в зависимости от природы фактора, индуцировавшего их появление, ядерные структуры, образованные фибриллярным актином, могут иметь различную морфологию, быть стабильными или короткоживущими, изолированными или собранными в сеть.

Воздействие на клетки таких стрессоров, как тепловой шок (Iida et al., 1992), обработка DMSO (Fukui, Katsunaga, 1980), дефицит АТФ в среде (Pendleton et al., 2003), окислительный стресс (Kim et al., 2009) и изменения ионного состава среды (Iida, Yahara, 1986), индуцирует в клетках кофилино-зависимый импорт мономерного актина в ядро. Здесь актин полимеризуется, образуя толстые тяжи, состоящие из F-актина и кофилина. По-видимому, существуют и другие, пока неидентифицированные молекулярные механизмы, которые участвуют в индуцированной действием внешних стрессоров ядерной транслокации актина. Полагают, что они основаны на взаимодействии актина с актинрегулирующими факторами (Plessner, Grosse, 2015).

Биологическая роль перемещения актина в ядро и его внутриядерной полимеризации как элемента реакции

клетки на внешнее воздействие остается неизвестной. Пока без ответа остаются вопросы о том, каким образом увеличение количества актина в ядре может быть связано с реакцией клетки на действие стресса (Viita, Vartiainen, 2017) и является ли такое изменение ядерной организации универсальным для клеток разных типов и происхождения. Внимание также уделяется поиску и изучению структурных и функциональных изменений в ядрах соматических клеток, сопровождающих аккумуляцию и полимеризацию актина, индуцированную действием внеклеточных сигналов (Hendzel, 2014; Plessner, Grosse, 2015).

В контексте данного направления исследований интересно проследить, оказывает ли воздействие внеклеточного стимула влияние на организацию актинового компонента ядра у эмбриональных клеток. В отличие от дифференцированных соматических клеток бластомеры двухклеточных зародышей мыши представляют собой недифференцированные тотипотентные клетки, крупные ядра зародышей находятся в процессе структурного и функционального становления, они обогащены актином (Боголюбова, Боголюбова, 2009). Данных о функциях актина в ядрах эмбрионов мыши немного. Частично изучено участие актина в эмбриональной транскрипции (Боголюбова, Парфенов, 2011; Bogolyubova et al., 2013). Влияние внешних воздействий на состояние актинового компонента ядер зародышей ранее исследовано не было.

В течение доимплантационного периода развития зародыш может оказаться под воздействием разнообразных стрессогенных факторов как при внутриутробном развитии, так и в том случае, если он развивается в искусственной культуральной среде (Feuer, Rinaudo 2012). До определенных пределов зародыши способны компенсировать повреждающее воздействие факторов окружающей среды, однако на начальных этапах дробления не все защитные механизмы функционально активны. Так, наиболее ранняя индукция тепловым шоком синтеза белка Hsp70 обнаружена лишь у восьмиклеточных эмбрионов (Edwards et al., 1995).

Для индукции стресса у зародышей субоптимальные условия культивирования можно создавать, изменяя один из базовых параметров культуральной среды. Мы применили этот методический прием, используя в качестве внеклеточного стрессогенного фактора повышение или понижение кислотности культуральной среды относительно значения, оптимального для поддержания гомеостаза у двухклеточных эмбрионов мыши.

Цель настоящей работы заключалась в изучении состояния актинового компонента ядер двухклеточных зародышей мыши, находящихся в состоянии стресса, вызванного изменением кислотности культуральной среды. Картины внутриядерной локализации актина анализировали на светооптическом уровне с использованием методов прямого флуоресцентного и непрямого иммунофлуоресцентного выявления актина.

## Материал и методика

Приготовление культуральных сред. Для манипуляций с зародышами и культивирования контрольных эмбрионов использовали среду M2 со значением pH 7.2, приготовленную из сухих солей по прописи Виттена (Whitten, 1971) на воде для пересадки эмбрионов. Среда M2 содержит NEPEs и способна длительно сохранять оптимальную кислотность, поэтому ее широко ис-

пользуют для кратковременного культивирования зародышей без использования CO<sub>2</sub>-инкубатора. Необходимое значение pH модифицированных сред, приготовленных на основе M2, получали, добавляя в них в процессе приготовления соответствующее количество 0.5 N раствора NaOH. Модифицированные среды были использованы для индукции у зародышей состояния кислотного (pH среды 6.5) или щелочного (pH среды 7.8) стресса.

Получение и культивирование эмбрионов. В работе использовали самок мыши линии BALB/c, полученных из питомника Рапполово (Санкт-Петербург). Гормональную синхронизацию овуляции проводили по ранее описанной схеме (Боголюбова, Боголюбова, 2009). Извлеченные из яйцеводов двухклеточные эмбрионы промывали в PBS и быстро переносили в капли теплой среды M2 объемом не менее 200 мкл. Далее эмбрионы культивировали или немедленно фиксировали. Культивировали зародыши в планшете (Nunc) в термостате во влажной среде при 37 °C, но без использования CO<sub>2</sub>-инкубатора. Длительность культивирования в зависимости от условий эксперимента составляла 1—3 ч.

Оценка влияния условий культивирования на жизнеспособность зародышей. Анализ жизнеспособности эмбрионов проводили с помощью МТТ-теста, ранее адаптированного нами для оценки качественного состояния зародышей (Боголюбова, Боголюбова, 2006). Тест основан на реакции биовосстановления малоокрашенной соли тетразолия МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) до интенсивно окрашенного формазана жизнеспособными клетками с активным метаболизмом (Hissan et al., 1993). Жизнеспособность эмбрионов коррелирует с количеством кристаллов формазана в цитоплазме бластомеров.

Состояние зародышей оценивали после их культивирования в стандартной или модифицированной среде M2. В стандартную среду M2 эмбрионы помещали на 1—3 ч. После окончания выбранного периода культивирования в лунку с зародышами добавляли раствор МТТ на M2 до конечной концентрации в среде 50 мкг/мл и далее инкубировали зародыши в течение 1 ч в термостате во влажной среде при 37 °C. Результат анализировали, наблюдая зародыши в проходящем свете и визуально оценивая наличие и количество окрашенного продукта реакции в цитоплазме.

Для оценки влияния краткосрочного пребывания зародышей в субоптимальных условиях зародыши помещали в среду, имеющую pH 6.5 или 7.8, и культивировали в течение 1 ч в термостате. По окончании этого срока зародыши помещали в среду M2 с pH 7.2 и оставляли на 1 ч в термостате для рекондиционирования. Последний этап позволял выявить снижение функциональной активности ферментов-восстановителей, поскольку в неблагоприятных условиях оно происходит постепенно. Далее в среду добавляли МТТ и проводили тест так, как это было описано ранее.

Фиксация и пермеабиллизация эмбрионов. Зародыши фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида на PBS в течение 60 мин при комнатной температуре. Фиксированные эмбрионы трижды промывали в PBS, затем проводили их пермеабиллизацию в 0.5%-ном растворе Тритона X-100 в течение 15 мин при комнатной температуре.

Прямое флуоресцентное мечение актина. Для визуализации в клетках мономерного актина использовали флуоресцентный конъюгат Alexa Fluor 488-ДНКазы I.

Фиксированные и пермеабиллизированные зародыши промывали в PBS и помещали в раствор Alexa Fluor 488-ДНКазы I при концентрации 9 мкг/мл на 60—90 мин при комнатной температуре. Далее эмбрионы промывали в PBS и монтировали на предметные стекла, используя среду для заключения препаратов Vectashield, в которую предварительно был добавлен ядерный краситель DAPI в концентрации 0.25 мг/мл.

Для прямого выявления фибриллярного актина зародыши после фиксации и пермеабиллизации переносили в PBS, затем помещали в раствор TRITC-фаллоидина в концентрации 10 мкг/мл на 60 мин при комнатной температуре. Далее зародыши отмывали в буфере и заключали в среду Vectashield. Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TS5 (Германия).

Непрямое иммунофлуоресцентное мечение актина. Для визуализации актина непрямой методом в качестве первых антител были использованы кроличьи поликлональные антитела, выработанные против фрагмента N-концевого участка молекулы актина, в разведении 1 : 100 или кроличьи поликлональные антитела к фрагменту C-концевого участка молекулы актина в разведении 1 : 100. В качестве вторых антител использовали конъюгированные с FITC козы анти тела к иммуноглобулину кролика в разведении 1 : 200. Фиксированные зародыши отмывали в PBS и помещали на 10 мин в каплю 10%-ного раствора фетальной сыворотки для предотвращения неспецифического связывания антител. Далее зародыши инкубировали в растворе первых антител в течение 12—14 ч при 4 °С. По окончании этого срока зародыши переносили в PBS, затем — в каплю 10%-ной фетальной сыворотки и далее инкубировали в растворе вторых антител не более 1.5 ч при комнатной температуре. После инкубации с антителами зародыши отмывали в PBS, заключали в среду Vectashield, содержащую ядерный краситель DAPI в концентрации 0.25 мг/мл, и анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TS5 (Германия).

Графический анализ данных проводили с помощью программы ImageJ. На конфокальных изображениях косвенно оценивали интенсивность свечения флуоресцентно меченного мономерного актина в ядрах зародышей. Значение относительной интегральной интенсивности флуоресценции определяли для зародышей контрольной группы и зародышей, находившихся в средах с рН 6.5 или 7.8. Для каждого изображения проводили по 3 измерения в границах каждого из ядер и 3 измерения фона за пределами изображения. Полученные численные данные использовали для расчета относительной интенсивности флуоресценции нуклеоплазмы для каждого из ядер. Далее вычисляли среднее значение и ошибку среднего значения для контрольной и обеих опытных групп зародышей. Достоверность различий между выборками определяли, используя критерий Манна—Уитни.

Анализ солокализации флуоресцентных сигналов при двойном мечении зародышей маркерами к актину и хроматину проводили с помощью инструментов анализа солокализации программы ImageJ.

Использованные реактивы: гормональные препараты Фоллигон и Хорулон (Intervet, Голландия); поликлональные антитела против фрагмента N-концевого участка молекулы актина (A2103, Sigma, США); поликлональные антитела к фрагменту C-концевого участка молекулы актина (A2066, Sigma, США); Alexa Fluor

488-ДНКазы I (Molecular Probes, США); TRITC-фаллоидин и МТТ (Sigma, США); среда для заключения препаратов Vectashield (Vector Laboratories, США).

## Результаты

Жизнеспособность эмбрионов после кратковременного культивирования при оптимальном значении рН среды (7.2). До проведения МТТ-теста бластомеры эмбрионов имели полупрозрачную неокрашенную цитоплазму (рис. 1, а). Зародыши, помещенные в среду, содержащую МТТ, активно восстанавливали соль тетразолия. За 1 ч в цитоплазме всех эмбрионов сформировались многочисленные темно-синие кристаллы формазана, равномерно распределенные по всему объему бластомеров (рис. 1, б). Появление большого количества окрашенного продукта восстановления МТТ свидетельствовало о высокой метаболической активности зародышей и являлось подтверждением их жизнеспособного состояния.

Жизнеспособность эмбрионов после кратковременного культивирования в средах с неоптимальным значением рН. Зародыши анализировали после 60-минутного выдерживания в среде с рН 6.5 или 7.8 и последующего их рекондиционирования в течение 60 мин в среде М2 при рН 7.2. Проведенный МТТ-тест продемонстрировал высокий уровень метаболической активности эмбрионов, что свидетельствовало о сохранении ими жизнеспособности после пребывания как в среде с рН 6.5 (рис. 1, в), так и в среде с рН 7.8 (рис. 1, г). В цитоплазме бластомеров можно было видеть многочисленные темно-синие кристаллы формазана, распределенные по всему объему клеток.

Внутриядерная локализация актина у зародышей после кратковременного культивирования при оптимальном значении рН среды. Для того чтобы учесть влияние условий

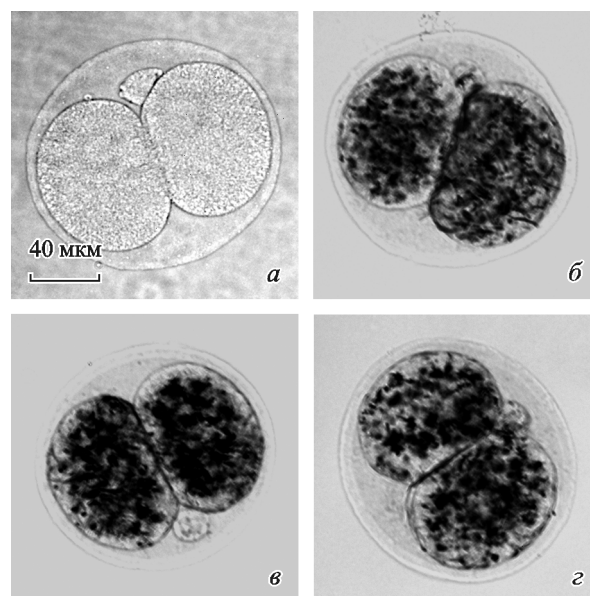


Рис. 1. Жизнеспособность контрольного зародыша (б), зародыша после 60-минутного пребывания в среде с рН 6.5 (в) и 7.8 (г). МТТ-тест.

а — зародыш до реакции с МТТ.

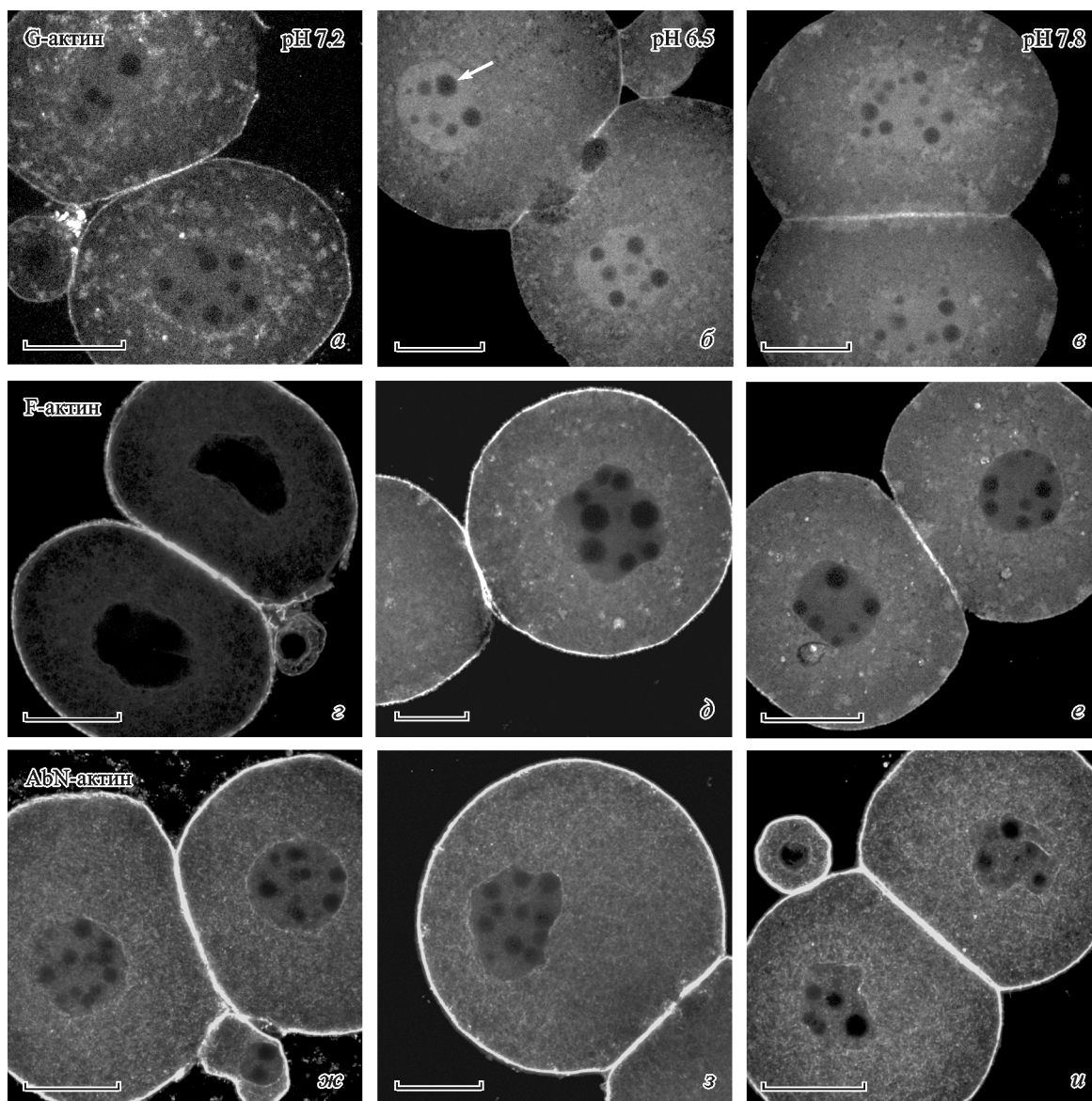


Рис. 2. Прямое флуоресцентное и иммунофлуоресцентное выявление актина у зародышей после пребывания в средах с оптимальной (pH 7.2) и субоптимальной (pH 6.5 и 7.8) кислотностью.

*а–в* — мечение мономерного актина с помощью конъюгата Alexa Fluor 488-ДНКазы I; *стрелкой* отмечено проядрышко (*б*). *з–е* — мечение фибриллярного актина TRITC-фаллоидином. *ж–и* — мечение актина антителами к фрагменту N-концевого участка молекулы актина. *а, з, ж* — контрольные зародыши, pH среды 7.2; *б, д, з* — pH среды 6.5; *в, е, и* — pH среды 7.8. Масштабные отрезки — 25 мкм.

культивирования на организацию актинового компонента ядра, мы проанализировали две контрольные группы эмбрионов. Первая была представлена зародышами, культивированными при pH 7.2, в HEPES-содержащей среде M2, при 37 °C во влажной среде, но без использования CO<sub>2</sub>-инкубатора. Вторую группу составляли зародыши, зафиксированные сразу после эксплантации. Мы не обнаружили различий во внутриядерной локализации актина между этими двумя группами зародышей, не отличался характер распределения актина в ядрах и от описанного у зародышей, культивированных *in vitro* в соответствии со стандартным протоколом (Bogolyubova, 2009; Боголюбова, 2012). Такой результат свидетельствует об адекватности условий, которые мы использовали для манипуляций с эмбрионами и их культивирования.

У изученных нами зародышей сайтом локализации мономерного актина в ядрах эмбрионов являлась нуклео-

плазма. В местах локализации проядрышек (специфического варианта транскрипционно неактивных ядрышек эмбрионов начальных стадий развития) свечение актина, меченного флуоресцентной ДНКазой I, отсутствовало. Мечение нуклеоплазмы представляло собой совокупность многочисленных точечных сигналов, которые были равномерно распределены по всей площади оптического среза ядра (рис. 2, *а*).

Специфического флуоресцентного сигнала от меченного TRITC-фаллоидином фибриллярного актина в зоне локализации ядер у большинства зародышей обнаружено не было (рис. 2, *з*), и лишь в единичных случаях отмечали слабое свечение нуклеоплазмы.

После мечения зародышей антителами к фрагменту C-концевого участка молекулы актина в ядрах можно было наблюдать яркое, неравномерное свечение нуклеоплазмы и темные проядрышки, оставшиеся неокрашен-

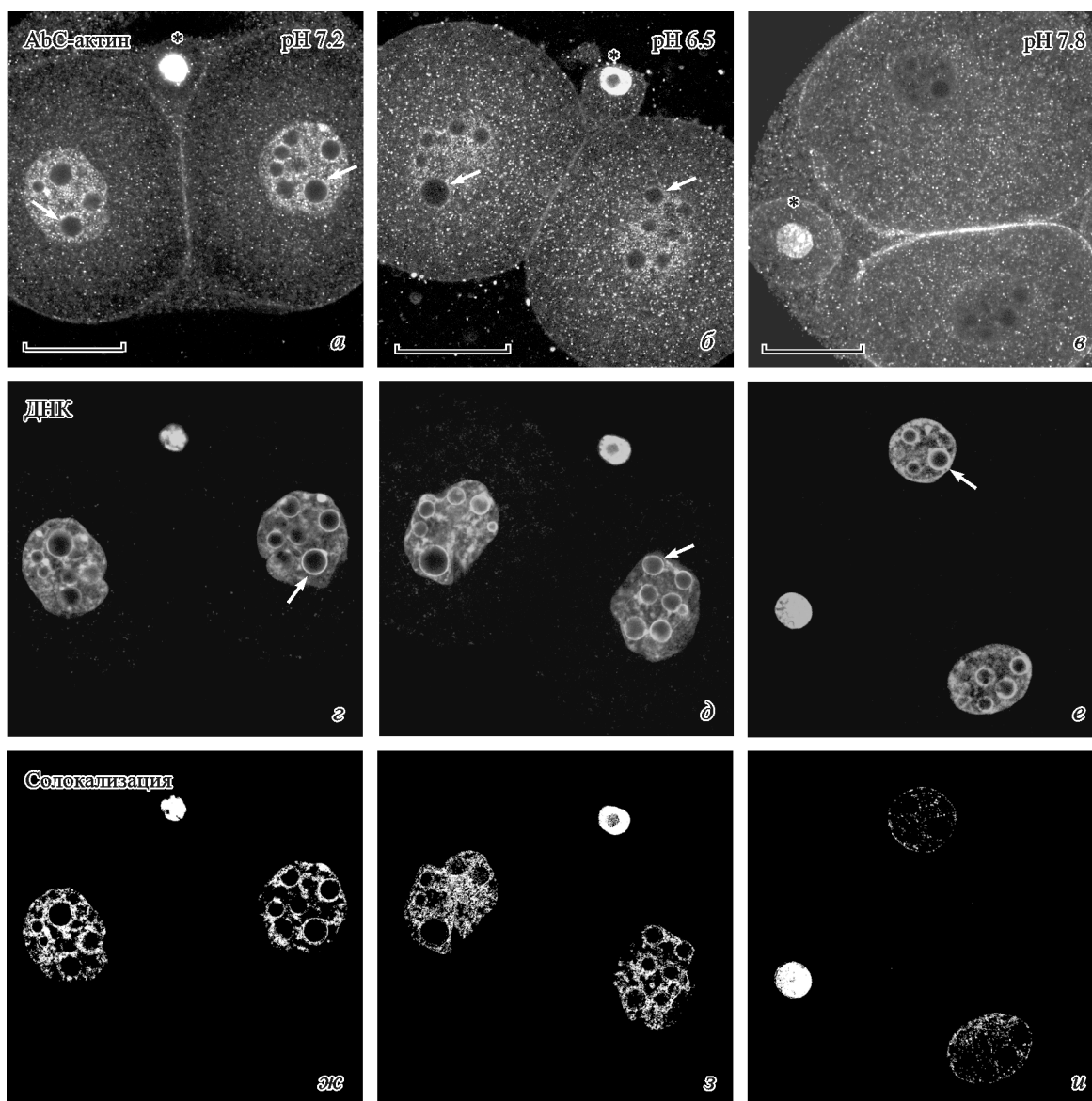


Рис. 3. Локализация актина, меченного антителами к фрагменту С-концевого участка молекулы актина, в ядрах зародышей после пребывания в средах с оптимальной (рН 7.2) и субоптимальной (рН 6.5 и 7.8) кислотностью.

*а—в* — мечение актина антителами к фрагменту С-концевого участка молекулы актина; *стрелками* отмечена концентрация актина на периферии проядрышек, *звездочками* отмечены ядра вторых полярных телц. *г—е* — мечение ДНК ядерным красителем DAPI; *стрелками* отмечен гетерохроматин, ассоциированный с периферией проядрышек. *ж—и* — солокализация флуоресцентных сигналов от меченого актина и ДНК. *а, г, ж* — контрольный зародыш, рН 7.2; *б, д, з* — среда с рН 6.5; *в, е, и* — среда с рН 7.8. Масштабные отрезки — 25 мкм.

ными. Общая картина флуоресценции нуклеоплазмы формировалась за счет флуоресценции многочисленных агрегатов меченного антителами актина, имевших разнообразные форму и размер. Часть агрегатов была сконцентрирована в нуклеоплазме, примыкающей к периферии проядрышек, и свечение меченного антителами актина отчетливо обозначало контур каждой из этих ядерных органелл (рис. 3, *а*). Двойное окрашивание зародышей антителами к актину и ДНК-маркером DAPI с последующим анализом солокализации флуоресцентных сигналов показало, что в нуклеоплазме актин, доступный для связывания с антителами, солокализован преимущественно с конденсированным хроматином. Типичным для ядер зародышей является солокализация меченого актина с гетерохроматином, ассоциированным с периферией проядрышек (рис. 3, *ж*).

Антитела к фрагменту N-концевого участка молекулы актина связывались с данным белком в нуклеоплазме, оставляя проядрышки немечеными. Свечение ядер было значительно слабее, чем после мечения антителами к фрагменту С-терминального участка актина. Рисунок флуоресценции нуклеоплазмы был образован свечением многочисленных точечных фокусов флуоресценции, равномерно распределенных по всей площади оптического среза ядра. Концентрация актина на периферии проядрышек отсутствовала (рис. 2, *ж*).

Внутриядерная локализация актина в ядрах зародышей после кратковременного культивирования в средах, рН которых отличался от оптимального значения. Характер внутриядерного распределения мономерного актина был сходен у зародышей после воздействия сред с рН 6.5

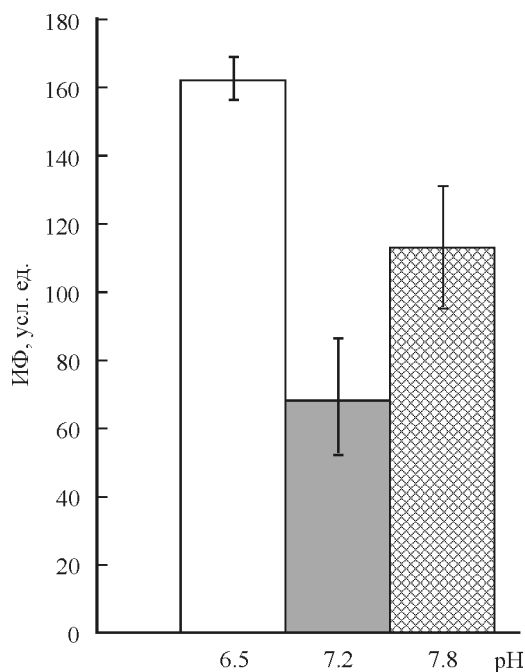


Рис. 4. Сравнение интенсивности флуоресценции (ИФ) мономерного актина в ядрах двухклеточных зародышей, культивированных в средах с оптимальной (pH 7.2) и субоптимальной (pH 6.5 и 7.8) кислотностью.

Вертикальные отрезки соответствуют величине ошибки среднего значения.

и 7.8. Меченый актин был локализован в нуклеоплазме, проядрышки оставались неокрашенными. В отличие от контрольных зародышей, где был отчетливо виден точечный рисунок мечения нуклеоплазмы, в зародышах после пребывания в среде с субоптимальным значением pH мы наблюдали ее бесструктурное, равномерное свечение (рис. 2, б, в). По визуальной оценке яркость свечения ядер зародышей после воздействия субоптимальных условий была намного выше, чем у контрольных эмбрионов, при этом свечение нуклеоплазмы у зародышей после пребывания в среде с pH 6.5 было наиболее ярким.

Чтобы подтвердить результаты визуальных наблюдений, на конфокальных изображениях, полученных при идентичных настройках микроскопа, мы провели косвенную оценку интенсивности свечения мономерного актина, меченного флуоресцентным конъюгатом Alexa Fluor 488-ДНКазы I, в ядрах контрольных зародышей и в ядрах эмбрионов после инкубации при субоптимальных значениях pH (рис. 4). Средние значения интенсивности флуоресценции нуклеоплазмы составили для контрольных зародышей  $69 \pm 17.2$  (при  $n = 18$ , где  $n$  — количество проанализированных ядер), для эмбрионов после воздействия среды с pH 6.5 —  $162 \pm 5.4$  ( $n = 20$ ) и после воздействия среды с pH 7.8 —  $113 \pm 18.5$  усл. ед. ( $n = 18$ ). Таким образом, яркость свечения нуклеоплазмы у эмбрионов, культивированных в среде с pH 6.5, превышает яркость свечения нуклеоплазмы у контрольных зародышей примерно в 2.5 раза, а свечение ядер зародышей, культивированных при pH 7.8, ярче, чем у контрольных, в 2 раза.

Характер флуоресценции ядер зародышей, окрашенных TRITC-фаллоидином, был одинаков после воздействия среды с pH 6.5 и 7.8. Равномерное свечение меченого актина было отчетливо видно в нуклеоплазме, а на его фоне были хорошо различимы оставшиеся немечеными

проядрышки (рис. 2, д, е). Данная картина флуоресцентного мечения принципиально отличалась от типичной для контрольных зародышей, где флуоресцентный сигнал от меченого фибриллярного актина в зонах расположения ядер отсутствовал.

После воздействия сред с pH 6.5 и 7.8 ядра зародышей, меченных антителами к фрагменту N-концевого участка молекулы актина, демонстрировали рисунок внутриядерной локализации актина, повторяющий тот, что наблюдали в ядрах контрольных эмбрионов. Точечные флуоресцентные сигналы были равномерно распределены по всей нуклеоплазме, на фоне свечения которой можно было наблюдать неокрашенные проядрышки (рис. 2, з, и).

После инкубации зародышей в среде с pH 6.5 и их последующего мечения антителами к фрагменту C-концевого участка актина характер флуоресценции ядер был сходен с тем, что демонстрировали контрольные эмбрионы. Антитела оставляли проядрышки немечеными, но нуклеоплазма светилась ярко и неравномерно за счет расположенных в ней агрегатов актина и концентрации актина на периферии проядрышек (рис. 3, б). Двойное окрашивание эмбрионов антителами и ДНК-маркером DAPI с последующим анализом солокализации сигналов продемонстрировало наличие солокализации части внутриядерного актина с гетерохроматином периферии проядрышек (рис. 3, з).

В ядрах зародышей, меченных антителами к фрагменту C-концевого участка после инкубации в среде с pH 7.8, было обнаружено два варианта локализации актина. Яркость флуоресценции большинства проанализированных ядер была значительно ниже, чем у ядер контрольных зародышей, по визуальной оценке она либо равнялась яркости свечения цитоплазмы, либо была слабее. На фоне слабого свечения нуклеоплазмы проядрышки, оставшиеся немечеными, были плохо различимы. Яркого свечения актина на периферии проядрышек, ранее наблюдавшегося у контрольных зародышей, обнаружено не было (рис. 3, в). Двойное мечение эмбрионов антителами и ДНК-маркером DAPI подтвердило отсутствие солокализации актина с гетерохроматином периферии проядрышек. В других зонах нуклеоплазмы солокализация актина с хроматином сохранялась, но была выражена менее отчетливо, чем у контрольных зародышей (рис. 3, и). Ядра нескольких зародышей светились ярче цитоплазмы, однако ассоциированную с периферией проядрышек флуоресценцию актина и солокализацию актина с гетерохроматином периферии проядрышек можно было наблюдать лишь около единичных ядерных органелл (не показано).

## Обсуждение

Изменение внутриклеточного уровня pH является важным регулятором метаболической активности клеток. У ооцитов и ранних зародышей многие внутриклеточные процессы чрезвычайно чувствительны даже к небольшим модуляциям кислотности (Lane, Gardner, 2000). Колебания pH внешней по отношению к зародышу среды влекут за собой изменение внутриклеточного pH, что вызывает у эмбрионов состояние стресса, причину возникновения которого связывают с необходимостью мобилизации дополнительных метаболических ресурсов для поддержания гомеостаза (Swain, 2010).

Сравнение локализации актина в ядрах контрольных зародышей и эмбрионов, находившихся под воздействием субоптимальных условий культивирования, показало, что инкубация в средах с повышенной и пониженной кислотностью индуцирует изменение организации актинового компонента ядер бластомеров. В нуклеоплазме накапливается мономерный актин и появляется актин, распознаваемый фаллоидином, который в ядрах контрольных зародышей отсутствует.

Причиной накопления в ядрах мономерного актина может быть перемещение мономеров актина из цитоплазмы в ядро. Такая ядерно-цитоплазматическая транслокация была обнаружена у соматических клеток при изучении формирования F-актиновых структур, образующихся в ядре в ответ на стрессогенные воздействия (Sanger et al., 1980). Возможной причиной перераспределения актина между клеточными компартаментами считают увеличение количества свободного мономерного актина в цитоплазме, вызванное разборкой микрофиламентов, и его последующую транслокацию в ядро. Аналогичный процесс перемещения актина в ядро возможен и в бластомерах зародышей. В том случае, если культивирование при субоптимальных значениях рН вызывало бы такую реорганизацию системы микрофиламентов, которая сопровождалась высвобождением заметного количества мономеров актина в цитоплазме, они могли бы аккумулироваться в ядре.

То, что отклонение внутриклеточного рН от оптимального значения приводит к нарушению организации микрофиламентов в цитоплазме, было продемонстрировано в экспериментах, проведенных на двухклеточных зародышах золотистого хомячка (Squirrell et al., 2001). В этой же работе было показано, что изменения структуры и внутриклеточной локализации микрофиламентов, возникающие в условиях индуцированного ацидоза и алкалоза, значительно различаются. Последний феномен мог бы послужить возможным объяснением различия в количестве мономерного актина в ядрах зародышей мыши после инкубации в средах с рН 6.5 и 7.8, которое было обнаружено нами при сравнении интенсивности флуоресцентного сигнала от меченого мономерного актина. Если вызванная воздействием среды с рН 6.5 реорганизация микрофиламентов сопровождалась высвобождением большего количества свободных мономеров актина, то, мигрировав в ядро, они могли обеспечить более высокую концентрацию мономерного актина в нуклеоплазме.

Одновременно с накоплением мономерного актина в ядрах зародышей, находящихся в состоянии стресса, там появляется актин, распознаваемый TRITC-фаллоидином. Как и ядра соматических клеток, ядра бластомеров интактных двухклеточных зародышей не содержат актиновых структур, которые можно было бы наблюдать после окрашивания зародышей флуоресцентным фаллоидином (Боголюбова, Боголюбова, 2009; Bogolyubova, 2009). После воздействия обоих стрессоров (понижение и повышение кислотности среды) мы отметили появление в ядрах специфического мечения нуклеоплазмы TRITC-фаллоидином, однако использованные методы исследования не позволили определить, каким образом организован связанный с маркером актин. Наблюдавшаяся нами картина внутриядерной локализации актина могла бы соответствовать плотной, состоящей из коротких филаментов актиновой сети, в составе которой индивидуальные филаменты не идентифицируются. У соматических клеток подобные сети формируются в цитоплазме при нуклеации с

помощью ARP2/3 (Campellone, Welch, 2010). ARP2/3 был обнаружен и в ядрах соматических клеток, где пока идентифицирована одна его функция — участие в регуляции транскрипции (Yoo et al., 2007), но сведениями о присутствии ARP2/3 или его компонентов в ядрах зародышей мы не располагаем.

В клеточном ядре актин может существовать в таких неканонических формах, как димеры, олигомеры и нелинейные агрегаты (Hofmann, 2009), поэтому анализа локализации традиционных форм актина было недостаточно, для того чтобы получить полное представление о состоянии актинового компонента ядер зародышей. С учетом этого обстоятельства данные о локализации мономерного и фибриллярного актина были дополнены анализом внутриядерного распределения субпопуляций актина, связывающихся с антителами к фрагменту C-концевого и к фрагменту N-концевого участка молекулы актина. Ранее было показано, что в ядрах интактных двухклеточных зародышей данные антитела связываются в первую очередь с олигомерными формами актина (Боголюбова, Парфенов, 2012).

В ядрах эмбрионов, находящихся в состоянии стресса, присутствуют обе распознаваемые антителами субпопуляции актина, но индуцированное субоптимальным значением рН изменение внутриядерной локализации мы отметили только у той из них, которая включает в себя ядерный актин, связывающийся с антителами к фрагменту C-концевого участка актина.

Пока не представляется возможным установить, имеет ли какую-либо функциональную роль реорганизация части ядерного актина, вызванная повышением рН среды, однако то, что данное изменение является особенностью зародышей, инкубированных в среде с рН 7.8, позволяет высказать следующее предположение. Поскольку для развивающихся *in vivo* двухклеточных зародышей естественным микроокружением является жидкость яйцеводов, рН которой колеблется в диапазоне 7.5—7.8 у разных видов млекопитающих, уже на двухклеточной стадии развития эмбрионы способны адаптироваться к условиям повышенной кислотности внешней среды. Высокая функциональная активность ионного переносчика  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  (Baltz et al., 1991) позволяет зародышам мыши в таких условиях сохранять рН цитоплазмы равным 7.2—7.3, а при экспериментально индуцированном алкалозе быстро восстанавливать оптимальную внутриклеточную кислотность (Dagilgan et al., 2015). Принимая во внимание данную особенность метаболизма зародышей, можно предположить, что индуцированное повышением рН среды изменение локализации распознаваемого антителами актина не является проявлением нарушения структурной организации ядра, а прямо или косвенно связано с процессом адаптации эмбрионов к внезапному изменению внешних условий — повышению кислотности культуральной среды.

Таким образом, результаты, представленные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что действие внеклеточного стрессового стимула способно вызвать изменение организации актинового компонента ядер бластомеров двухклеточных зародышей мыши. Кратковременное культивирование в условиях повышенной или пониженной кислотности индуцирует изменение характера внутриядерной локализации одной из субпопуляций олигомерного актина, накопление ядрами мономерного актина и появление там фибриллярного актина, распознаваемого TRITC-фаллоидином. Последние два изменения, по

нашему мнению, имеют некоторые черты сходства с индуцированными стрессом изменениями в ядрах соматических клеток.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института цитологии РАН (гос. регистрация № 01201351105).

### Список литературы

- Боголюбова И. О. 2012. Сравнительный анализ характера флуоресцентного мечения ядер ранних эмбрионов мыши при использовании антител к различным участкам молекулы актина. Цитология. 54 (11): 831—836. (Bogolyubova I. O. 2013. Comparative analysis of the fluorescent labeling of nuclei of early mouse embryos by using antibodies to various actin molecule domains. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 7 (1): 37—42.)
- Боголюбова И. О., Парфенов В. Н. 2011. Ассоциация актина и факторов экспорта мРНК в ядрах ранних эмбрионов мыши. Цитология. 53 (9): 693. (Bogolyubova I. O., Parfenov V. N. 2011. Actin association with mRNA export factors in the nuclei of early mouse embryos. Tsitologiya. 53 (9): 693.)
- Боголюбова И. О., Парфенов В. Н. 2012. Особенности иммунофлуоресцентного выявления ядерного актина в ранних эмбрионах мыши. Цитология. 54 (7): 541—548. (Bogolyubova I. O., Parfenov V. N. 2012. Immunofluorescent detection of nuclear actin in early mouse embryos. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 6 (5—6): 458—464.)
- Боголюбова Н. А., Боголюбова И. О. 2006. Динамика морфофункциональной организации и жизнеспособность эмбрионов мыши, находящихся в состоянии «двухклеточного блока *in vitro*». Цитология 48 (5): 398—409. (Bogolyubova N. A., Bogolyubova I. O. 2006. Dynamics of morphofunctional organization and developmental potential of mouse embryos in the state of «two-cell block *in vitro*». Tsitologiya. 48 (5): 398—409.)
- Боголюбова Н. А., Боголюбова И. О. 2009. Локализация актина в ядрах двухклеточных зародышей мыши. Цитология. 51 (8): 663—669. (Bogolyubova N. A., Bogolyubova I. O. 2009. Actin localization in nuclei of two-cell mouse embryos. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 3 (5): 417—422.)
- Baarlink C., Wang H., Grosse R. 2013. Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. Science. 340: 864—867.
- Baltz J. M., Biggers J. D., Lechene C. 1991. Relief from alkaline load in two-cell stage mouse embryos by bicarbonate/chloride exchange. J. Biol. Chem. 266: 17 212—17 217.
- Belin B. J., Cimini B. A., Blackburn E. H., Mullins R. D. 2013. Visualisation of actin filaments and monomers in somatic cell nuclei. Mol. Biol. Cell 24 (7): 982—994.
- Bogolyubova I. O. 2009. F-actin distribution pattern in the nuclei of early mouse embryos. Folia Histochem. Cytobiol. 47: 461—463.
- Bogolyubova I., Stein G., Bogolyubov D. 2013. FRET analysis of interactions between actin and exon-exon-junction complex proteins in early mouse embryos. Cell Tissue Res. 352: 277—285.
- Campellone K. G., Welch M. D. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11: 237—251.
- Dagligan S., Dundar-Yenilmez E., Tuli A., Urunsak I. F., Erdogan S. 2015. Evaluation of intracellular pH regulation and alkalosis defense mechanisms in preimplantation embryos. Theriogenol. 83: 1075—1084.
- Edwards J. L., Ealy A. D., Hansen P. J. 1995. Regulation of heat shock protein 70 synthesis by heat shock in the preimplantation murine embryo and its relationship to induced thermotolerance. Theriogenol. 44: 329—337.
- Feuer S., Rinaudo P. 2012. Preimplantation stress and development. Birth Def. Res. C. Embr. Today. 96: 299—314.
- Fukui Y., Katsumaru H. 1980. Dynamic of nuclear actin bundle induction by dimethyl sulfoxide and factors affecting its development. J. Cell Biol. 84: 131—140.
- Hendzel M. 2014. The F-act's of nuclear actin. Curr. Opin. Cell Biol. 28: 84—89.
- Hissan R. F., Noiri A. M., Oliver R. T. 1993. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. J. Immunol. Meth. 15: 89—96.
- Hofmann W. A. 2009. Cell and molecular biology of nuclear actin. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 273: 219—263.
- Iida K., Matsumoto S., Yahara I. 1992. The KKRKK sequence is involved in heat shock-induced nuclear translocation of the 18-kDa actin-binding protein cofilin. Cell Struct. Funct. 17: 39—46.
- Iida K., Yahara I. 1986. Reversible induction of actin rods in mouse C3H-2K cells by incubation in salt buffers and by treatment with non-ionic detergents. Exp. Cell Res. 164: 492—506.
- Kim J. S., Huang T. Y., Bokoch G. M. 2009. Reactive oxygen species regulate a slingshot-cofilin activation pathway. Mol. Biol. Cell. 20: 2650—2660.
- Kristó I., Bajusz I., Bajusz C., Borkúti P., Vilmos P. 2016. Actin, actin-binding proteins and actin-related proteins in the nucleus. Histochem. Cell Biol. 145: 373—388.
- Lane M., Gardner D. K. 2000. Regulation of ionic homeostasis by mammalian embryos. Semin. Reprod. Med. 18: 195—204.
- Pendleton A., Pope B., Weeds A., Koffer A. 2003. Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. J. Biol. Chem. 278: 14 394—14 400.
- Plessner M., Grosse R. 2015. Extracellular signaling cues for nuclear actin polymerization. Eur. J. Cell Biol. 94: 359—362.
- Plessner M., Melak M., Chinchilla P., Baarlink C., Grosse R. 2015. Nuclear F-actin formation and reorganization upon cell spreading. J. Biol. Chem. 290: 11 209—11 216.
- Sanger J. W., Sanger J. M., Kreis T. E., Jockusch B. M. 1980. Reversible translocation of cytoplasmic actin into the nucleus caused by dimethyl sulfoxide. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77: 5268—5272.
- Squirrel J. M., Lane M., Bavister B. D. 2001. Altering intracellular pH disrupts development and cellular organization in preimplantation hamster embryos. Biol. Reprod. 64: 1845—1854.
- Swain J. E. 2010. Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. Reprod. BioMed. Online. 21: 6—16.
- Viita T., Vartiainen M. K. 2017. From cytoskeleton to gene expression: actin in the nucleus. Handb. Exp. Pharmacol. 235: 311—329.
- Whitten W. K. 1971. Nutritional requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*. Adv. Biosci. 6: 129—139.
- Yoo Y., Wu X., Guan J. L. 2007. A novel role of the actin-nucleating Arp2/3 complex in the regulation of RNA-polymerase II-dependent transcription. J. Biol. Chem. 282: 7616—7623.



## ALTERATION OF CULTURE MEDIUM pH INDUCES REORGANIZATION OF INTRANUCLEAR ACTIN IN THE NUCLEI OF TWO-CELL MOUSE EMBRYOS

N. A. Bogolyubova,<sup>1,\*</sup> E. O. Mironenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

<sup>2</sup> Department of Embryology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034;

\* e-mail: nataly\_bogoly@mail.ru

Actin is constantly present in the cell nucleus where this protein participate in many nuclear processes. For today some nuclear functions of actin remain insufficiently explored. A role played by various extracellular stimuli in regulation of nuclear actin remains still enigmatic. Deviation of base parameters of culture medium from optimal values belongs to the group of extracellular stimuli that are very important for the mammalian embryos cultured *in vitro*. Deviation of culture medium pH from the level optimal for embryo's homeostasis is one of such signals. The purpose of the study was to investigate intranuclear actin distribution and level in the nuclei of two-cell mouse embryos which are in stress condition induced by the alteration of extracellular pH. Patterns of actin localization have been tracked after short-term culture of the embryos in the optimal pH conditions (pH 7.2) and when pH of the medium was above (pH 7.8) or below (pH 6.5) optimum value, the analysis was carried out by means of confocal microscopy, with the use of methods of direct fluorescent and indirect immunofluorescent identification of actin. It has been shown that the deviation of culture medium pH from optimum value is the signal that induces changes of intranuclear actin distribution in the nuclei of the embryos. Culture of two-cell mouse embryos in suboptimal pH conditions (pH 6.5 and 7.8) induced alterations in the intranuclear actin localization, which, in particular, were expressed in accumulation of monomeric actin and appearance of phalloidin-stainable actin in the nuclei. These changes, in our opinion, show some signs of similarity with the stress-induced changes in nuclear actin distribution which, as it has been reported earlier by a number of researchers, were observed in the nuclei of somatic cells.

**Key words:** preimplantation mouse embryos, nuclear actin, cell nucleus, pH, stress, laser scanning confocal microscopy.

---