

## СУЩЕСТВУЕТ ЛИ КАПСУЛА КАРИОСФЕРЫ В ООЦИТАХ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ? КРИТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОБЛЕМЫ

© 2022 г. Д. С. Боголюбов<sup>1</sup>, \*, А. О. Травина<sup>1</sup>, И. О. Боголюбова<sup>1</sup>

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

\*E-mail: dbogol@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2022 г.

После доработки 25.05.2022 г.

Принята к публикации 29.05.2022 г.

Кариосфера (кариосома) – мейоз-специфическая эволюционно консервативная структура, представляющая собой конденсированные биваленты, которые на стадии диплотены профазы мейоза собраны вместе в ограниченном пространстве крупного ядра. У некоторых организмов кариосфера дополнительно отделена от окружающей нуклеоплазмы надструктурным экстрахромосомным компартментом, называемым капсулой кариосферы (КК). Традиционно считают, что КК – специализированный элемент ядра ооцита (зародышевого пузырька, ЗП), который поддерживает кариосферу за счет присутствия структурных белков, прежде всего F-актина. Мы представляем новый взгляд на КК, которая, как считали прежде, формируется в ЗП травяной лягушки *Rana temporaria*. Кариосфера *R. temporaria* представляет собой простой “клубок” хромосом, или кариосому. ЗП *R. temporaria* в высокой степени обогащен филаментами F-актина, которые формируют обширную сеть в ядре, но не концентрируются в особой зоне (капсуле) вокруг конденсированных хромосом. В этом смысле структура ЗП *R. temporaria* существенно не отличается от таковой *Xenopus laevis*, у которого кариосфера и, соответственно, ее капсула не выражены. Легко идентифицируются типичные для ЗП *R. temporaria* немембранные тяжи (прежде называемые “псевдомембранами”), а также “колечки” (*annuli*), которые, как считали ранее, представляют собой автономные поровые комплексы. Однако *annuli* не содержат нуклеопорина 35 (Nup35) и, следовательно, не могут рассматриваться в качестве аналогов ядерных поровых комплексов. Электронно-плотные тяжи, которые связывают *annuli*, не содержат ни F-актина, ни ламина В и не образуют покрова вокруг кариосферы. Структурные белки, такие как ламины, присутствуют в нуклеоплазме и концентрируются в локальных электронно-плотных сгустках – специфических биомакромолекулярных конденсатах полимерных молекул – белков и, возможно, РНК. Таким образом, кариосфера *R. temporaria* не имеет фиброзного скаффолда. Для сравнения использован материал КК жука *Tribolium castaneum*, в ЗП которого действительно формируется стабильный и обширный слой (оболочка, или shell), состоящий из F-актина. Мы полагаем, что структурная роль КК в ЗП *R. temporaria* несколько преувеличена. Однако кариосфера *R. temporaria* заключена в большое скопление сотен свободных амплифицированных ядрышек, напоминающее КК. Это скопление ядрышек весьма стабильно и легко может быть изолировано под обычным бинокулярным стереомикроскопом. Поскольку ядрышки представляют собой отдельные жидкие капли, их нельзя рассматривать в качестве структур, формирующих типичную КК, которая по определению имеет фиброзную структуру. Сходная ситуация характеризует ЗП жука *Tenebrio molitor*, в котором отсутствуют ядрышки, но кариосома может располагаться внутри фиброгранулярного материала, который не содержит F-актина.

**Ключевые слова:** ядерные компартменты, кариосфера, капсула кариосферы, кариосома, ядерный F-актин, электронная микроскопия, ядро ооцита, зародышевый пузырек, *Rana temporaria*

DOI: 10.31857/S0041377122050029

В самом начале XX в. американский энтомолог Молсби Уилетт Блэкман, изучая сперматогенез некоторых многоножек, описал своеобразную ядер-

ную структуру, которую назвал кариосферой (Blackman, 1903, 1905). Согласно современному определению, кариосфера – мейоз-специфическая и эволюционно консервативная структура, образованная конденсированными хромосомами, объединенными вместе в ограниченном пространстве крупного ядра на стадии диплотены профазы мейоза (Bogolyubov, 2018). Блэкман (Blackman, 1903) предложил различать кариосферу и кариосому; последняя представляет собой простой “клубок” хромо-

**Принятые сокращения:** ЗП – зародышевый пузырек (germinal vesicle, ядро ооцита); ИЭМ – иммуноэлектронная микроскопия; КК – капсула кариосферы; ЛЦ – хромосомы типа ламповых щеток; СК – синаптонемный комплекс; ЭМ – электронная микроскопия; ЯО – ядерная оболочка; ЯПК – ядерный поровый комплекс; BAF – barrier-to-autointegration factor; LEM-D – lamina-associated polypeptide 2–Emerin–MAN1 domain.

сом, в то время как кариосфера организована более сложно, фактически представляя собой “миниатюрное ядро”.

У многих организмов хромосомы ооцита, собранные в кариосферу, дополнительно ограничены сложной многокомпонентной структурой, называемой капсулой кариосферы (КК), что создает еще большее впечатление о существовании “ядра в ядре” (Gruzova, 1988), или *Innenkern* по-немецки (Vejdovsky, 1911–1912; цит. по: Gruzova, Parfenov, 1993). Термин “капсула” (*Kapsel*) был введен Вагнером (Wagner, 1923), чтобы различать волокнистую субстанцию, которая, как он считал, отделяет хромосомы от периферической области, занимаемой ядрышками в ядре ооцитов (зародышевом пузырьке, ЗП) лягушек. В настоящее время считают, что ключевым компонентом КК служат филаменты полимеризованного ядерного актина (F-актина), который играет главную структурную роль и может рассматриваться в качестве маркерного белка КК (Bogolyubov, 2018).

В течение многих лет после открытия Блэкмена кариосферу описывали у многих организмов, от гидры до человека, особенно в ЗП и менее часто – в ядре сперматоцитов (Gruzova, Parfenov, 1993). Если в мужском мейозе хромосомы и формируют кариосферу (кариосому), она никогда не имеет КК.

Несмотря на большое морфологическое разнообразие кариосфер, наблюдаемых в ооцитах беспозвоночных и позвоночных животных, можно выделить 3 основных их типа (Bogolyubov, 2018): 1) кариосферу с внешней КК; 2) кариосому, т. е. кариосферу без КК, и 3) “инвертированную” кариосферу. Последнее из перечисленных понятий является весьма формальным, охватывая морфологически различные типы кариосфер, когда хромосомы присоединены к наружной стороне “центрального тела” (Gruzova, 1988), такого как центрoмерное белковое тело птиц (Гагинская, 1972; Krasikova et al., 2004) или атипичное ядрышко (ядрышкоподобное тело) мыши и человека (Parfenov et al., 1989; De La Fuente et al., 2004).

Если у какого-либо организма в течение определенного периода продолжительной диплотены существует стадия ламповых щеток (ЛЩ), кариосфера формируется после этой стадии, когда хромосомы-ЛЩ теряют латеральные петли, сокращаются и имеют тенденцию к локализации в ограниченном пространстве ЗП (Bogolyubov, 2018). Формирование кариосферы обычно сопровождается затуханием транскрипционной активности хромосом. У травяной лягушки *R. temporaria* полностью сформированная кариосфера, представляющая собой рыхлый клубок хромосом, сохраняет заметный уровень остаточной транскрипционной активности, в то время как позже, в более компактной кариосфере, транскрипция прекращается полностью (Ilicheva et al., 2018).

У многих амфибий, включая *R. temporaria*, конденсированные хромосомы, собранные в кариосферу, заключены в компактный агломерат размером примерно 150 мкм, сформированный многочисленными амплифицированными ядрышками и занимающий примерно 1/1000 объема ЗП (Duryee, 1950). На протяжении многих десятилетий считали, что кариосфера *R. temporaria* имеет типичную КК (Gruzova, Parfyonov, 1973; Gruzova, Parfenov, 1977, 1993; Почукалина, Парфенов, 1994; Bogolyubov, 2018) – сложную многослойную структуру, состоящую из фиброзного эластичного материала и амплифицированных ядрышек (Парфенов, 1995). Считают, что в вителлогенных ооцитах *R. temporaria* КК появляется вокруг ЛЩ в осеннее-зимний период и достигает максимального развития весной, перед овуляцией (Gruzova, Parfyonov, 1973), при этом хромосомы прикреплены к КК теломерами (Парфенов, 1995).

Постоянно сообщалось, что КК весьма стабильная структура и может быть легко изолирована из ЗП *R. temporaria* GVs, сохраняя целостность после обработок концентрированными растворами солей (1.5 М NaCl), неионными детергентами и нуклеазами (Engelhardt et al., 1982). Это позволило считать КК специализированным компонентом ядерного матрикса (Gruzova, Parfenov, 1993). Однако противоречивая теория ядерного матрикса, популярная в конце XX в., в настоящее время признана несостоятельной (Razin et al., 2014). Относительная устойчивость кариосферного комплекса, по-видимому, обеспечивается огромным количеством амплифицированных ядрышек, окутывающих кариосферу лягушки наподобие массивного облака, которое, по-видимому, стабилизируется сетью актиновых филаментов (Parfenov et al., 1995). Однако такие скопления, изолированные в физиологических растворах, довольно быстро рассыпаются на отдельные ядрышки.

В этом году мы начали работу над исследовательским проектом, посвященным дальнейшему исследованию кариосферы *R. temporaria*, надеясь в первую очередь проверить, может ли КК участвовать в мейоз-специфической пространственной организации диплотенных хромосом. В частности, мы собирались исследовать, могут ли некоторые ключевые белки, обеспечивающие динамические взаимодействия хромосом с ядерной оболочкой (ЯО) в митотическом цикле соматических клеток (Foisner, 2003; Segurra-Totten, Wilson, 2004), участвовать в формировании и поддержании КК.

Начиная работу над проектом, мы сначала приняли ультраструктурное исследование, в том числе с помощью иммуноэлектронной микроскопии (ИЭМ), чтобы ответить на вопросы: 1) формируют ли актиновые филаменты КК? 2) являются ли другие структурные белки, такие как ядерные ламины, компонентами КК? 3) действительно ли характерные *annuli* в КК *R. temporaria*, демонстрирующие

морфологическое сходство с ядерными поровыми комплексами (ЯПК), являются “автономными” поровыми комплексами, принимая во внимание возможность неканонического механизма их образования в ооплазме *Drosophila* (Hampoelz et al., 2019)?

Мы ожидали, что ответы на эти вопросы могут служить морфологической основой дальнейших исследований. Однако в ЗП весенних лягушек мы к своему удивлению обнаружили отсутствие заметной капсулы Вагнера (Wagner, 1923). Вместо этого ядро заполнено сетью актиновых филаментов, которые заметным образом не концентрируются в области, содержащей хромосомы, как и в ЗП *Xenopus* (Kiseleva et al., 2004; Maslova, Krasikova, 2012). Эта сеть, очевидно, придает структурную стабильность скоплениям ядрышек с находящейся внутри кариосомой (Plicheva et al., 2019), однако F-актин не концентрируется в структуре, напоминающей КК. Сходное поведение демонстрируют филаменты, содержащие ламин В, которые тоже там не концентрируются. Кроме того, мы не подтвердили, что *annuli* – это аналоги ЯПК, поскольку они не содержат, по крайней мере, нуклеопорина Nup35.

Эти и другие морфологические особенности, заставляющие пересмотреть классические представления о КК в ооцитах травяной лягушки, обсуждаются в свете представлений о кариосфере амфибий, накопленных с середины XIX в. (Schultze, 1887) до наших дней. С целью дополнительного обсуждения мы также представили данные по структуре кариосферы двух видов жуков-чернотелок (Tenebrionidae): *Tribolium castaneum*, у которого кариосфера имеет типичную КК, и *Tenebrio molitor*, у которого кариосфера (кариосома) не имеет типичной КК, содержащей F-актин.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Самок травяной лягушки *Rana temporaria* L. в возрасте 2–3 г отбирали из естественной среды обитания в окрестностях Санкт-Петербурга в апреле месяце. Лягушек декапитировали и немедленно разрушали спинной мозг. Яичники и ооциты изолировали в среде OR2 (Wallace et al., 1973), содержащей 82.5 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 1.0 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1.0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1.0 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.0 мМ HEPES, pH ~7.8. ЗП изолировали в растворе “5 : 1 + PO<sub>4</sub>” (Gall et al., 1981), содержащем 83.0 мМ KCl, 17.0 мМ NaCl, 6.5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1.0 мМ DTT, pH 7.2. Яичники насекомого *Tribolium castaneum* (Herbst) изолировали в растворе для *Drosophila* (128.3 мМ NaCl, 4.7 мМ KCl, 1.9 мМ CaCl<sub>2</sub>).

Для выявления F-актина образцы, фиксированные в 2%-ном формальдегиде на PBS, окрашивали фаллоидин-родамином (2 мкг/мл) в течение 1 ч во влажной камере при комнатной температуре, отмывали в PBS и заключали в среду Vectashield (Vector

Laboratories), содержащую 1 мкг/мл DAPI для выявления ДНК. Препараты просматривали в конфокальном микроскопе Leica TCS SP5.

Для стандартной трансмиссионной ЭМ образцы фиксировали 2.5%-ным глутаральдегидом, затем 1.0%-ным OsO<sub>4</sub> и заключали в Epon–Araldite. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Для ИЭМ образцы префиксировали в течение 2 ч в 4%-ном формальдегиде, свежеприготовленном из параформальдегида, и 0.5%-ном глутаральдегиде на PBS, затем фиксировали в 2%-ном формальдегиде при 4°C в течение ночи. После промывки в PBS, содержащем 0.05 М NH<sub>4</sub>Cl, и дегидратации в серии спиртов возрастающей концентрации образцы заключали в смолу LR White. Ультратонкие срезы инкубировали в течение 10 мин в блокирующем буферном растворе (PBS с добавлением 0.5% желатина из кожи холодноводных рыб (Sigma) и 0.02% Tween-20, pH 7.4). После этого срезы инкубировали в растворе первичных антител во влажной камере в течение ночи при 4°C. Использованные первичные антитела: мышинные моноклональные антитела к двухцепочечной ДНК (Hemicon, MAB 030, разведение от 1 : 200 до 1 : 300), козы поликлональные антитела к Nup35 (Santa Cruz, sc-74762, разведение от 1 : 20 до 1 : 50), мышинные моноклональные антитела к Nup93 (Santa Cruz sc-374399, разведение 1 : 20)<sup>1</sup>, козы поликлональные антитела к ламину В (Santa Cruz, sc-6217, разведение от 1 : 20 до 1 : 50) и кроличьи поликлональные антитела к N-концу молекулы актина (Sigma, A2103, разведение 1 : 20–1 : 50). После отмывки в PBS, содержащем 0.1% желатина и 0.02% Tween-20, срезы инкубировали в растворе вторичных антител (козых к иммуноглобулинам кролика, ослиных к иммуноглобулинам кролика или козых к иммуноглобулинам кролика), конъюгированных с частицами коллоидного золота размером 10 нм, во влажной камере в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Срезы контрастировали уранилацетатом и исследовали с помощью электронного микроскопа Leica 120 при 80 кВ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование посвящено ультраструктурному анализу кариосферы в ЗП травяной лягушки *Rana temporaria* с особым вниманием к КК, которая, по идее, должна формироваться в поздних вителлогенных ооцитах. Несмотря на целый век, прошедший с первого подробного описания КС этого вида (Wagner, 1923), после чего последовали электронно-микроскопические (Gruzova, Parfenov, 1977; Почукалина, Парфенов, 1994), биохимические (Engelhardt et al., 1982; Podgornaya et al., 2000) и иммунофлуорес-

<sup>1</sup> При использовании этих антител интенсивность ИЭМ-мечения была недостаточной.

центные исследования (Ильичева и др., 2016; Illicheva et al., 2018, 2019), мы представляем новые данные, полученные с помощью электронной и иммуноэлектронной микроскопии, которые заставляют усомниться в существовании КК как специализированного ядерного компартмента ЗП *R. temporaria* (Gruzova, Parfenov, 1993). В то же время обширная КК, в высокой степени обогащенная F-актином, формируется в ЗП других организмов, например модельного насекомого *Tribolium castaneum*.

**Кариосфера в зародышевом пузырьке травяной лягушки.** В своей работе мы не обнаружили каких-то значимых структурных особенностей ЗП *R. temporaria* по сравнению с теми, которые были ранее описаны у зимовых и пробуждающихся лягушек этого вида (Gruzova, Parfyonov, 1973; Gruzova, Parfenov, 1977). ЗП лягушек, собранных в естественных местообитаниях в апреле месяце, содержит развитую кариосферу в виде более или менее компактного клубка хромосом, собранных вместе в ограниченном объеме ядра, что соответствует стадии, завершающей стадию ЛЩ. Кариосфера расположена внутри большого (более 150 мкм) компактного скопления сотен амплифицированных ядрышек и занимает в нем центральное положение (рис. 1а). Область, содержащая хромосомы, выглядит на срезах прозрачной, поскольку в значительной степени лишена ядрышек. О формировании подобного рода скопления ядрышек в центре ЗП амфибий постоянно сообщали, начиная с конца XIX в.<sup>2</sup> (Schultze, 1887; Born, 1894; Carnoy, Lebrun, 1898; Wagner, 1923; Duryee, 1950), и уже ранние цитологии наблюдали в центре этого скопления почти лишённое ядрышек пространство с расположенными в нем хромосомами (рис. 1б–д, ж).

В середине XX в. американский цитолог Уильям Дюрью предложил периодизацию стадий роста ЗП *R. temporaria*, уделяя особое внимание структуре диплотенных хромосом (Duryee, 1950). Наиболее поздняя стадия, представленная в этой работе (стадия 6) соответствует полностью развитой кариосфере (кариосоме), представляющей собой поздние ЛЩ, собранные в центре скопления ядрышек (рис. 1д–е) – “хромосомном каркасе” (chromosomal frame). В этой важной работе Дюрью не проиллюстрировал более поздние стадии развития кариосферы, следующие за стадией 6, на которых хромосомы, утратившие структуру ЛЩ, представляли бы собой более или менее компактный клубок, описанный ранее Вагнером

<sup>2</sup> Центральное скопление ядрышек изначально называли “центральным телом” (нем. *Centralkörper* или *Binnenkörper*, фр. *corps central*), однако, по современной терминологии, “внутреннее тело” (*Binnenkörper*) – особый тип телец Кахаля в ЗП некоторых насекомых (Gall et al., 1995), а центральное тело – белковый скаффолд хромосом в случае различных “инвертированных” кариосфер (Gruzova, 1988; Bogolyubov, 2018), такой как атипичное ядрышко мыши и человека (Parfenov et al., 1989; Pochukalina et al., 2016; Fulka et al., 2019) или центрмерное белковое тело птиц (Gaginskaya et al., 2009).

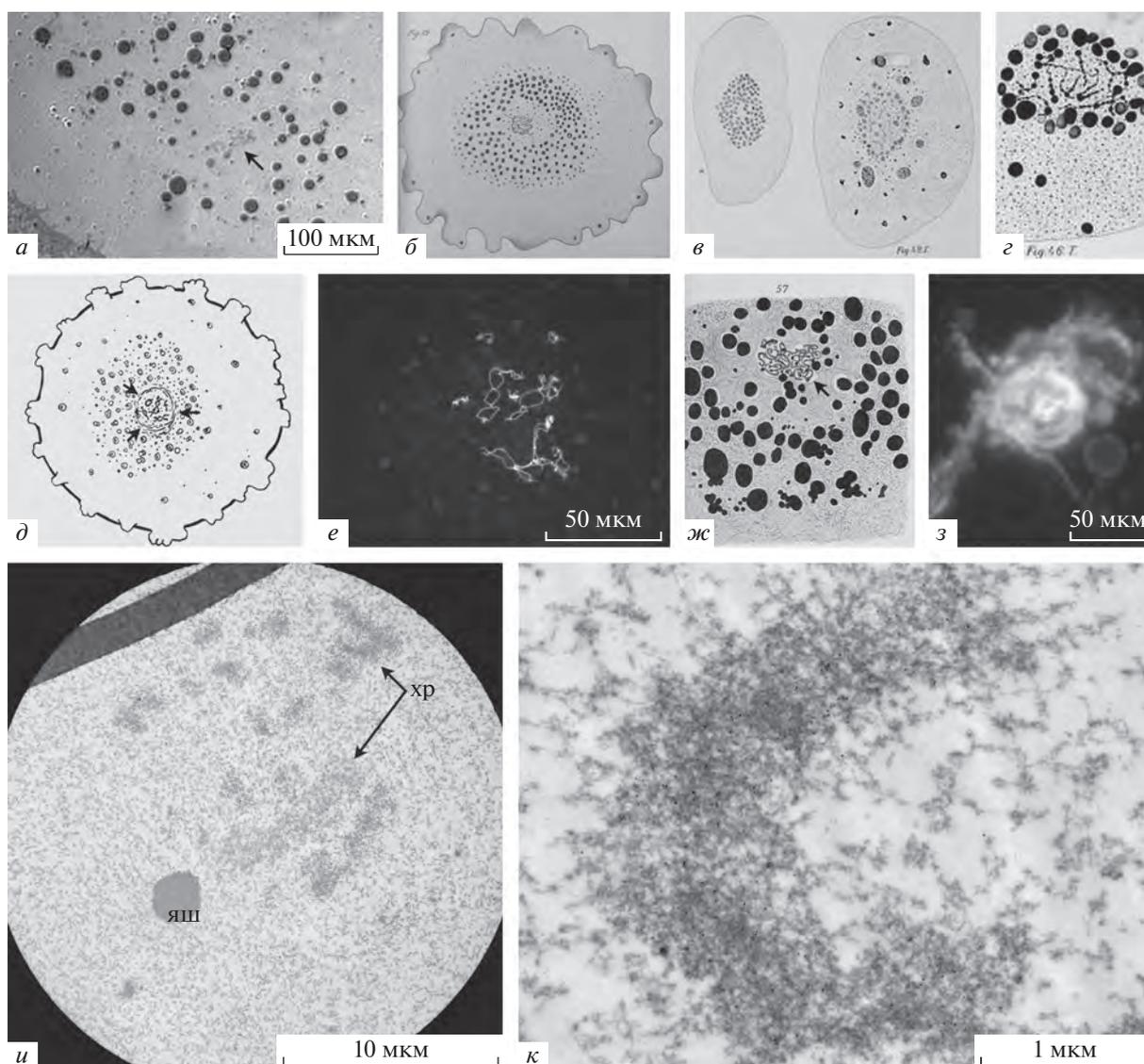
(Wagner, 1923) (рис. 1ж–з)<sup>3</sup>. В нашем материале присутствовали ЗП с обеими конфигурациями кариосферы (рис. 1е, з).

Немецкий зоолог Карл Вагнер был первым, кто предложил термин “капсула” (*Kapsel*) в работе, посвященной развитию ооцитов лягушек, включая *R. temporaria*, в которой акцент был сделан на особенностях сезона и возрастных особенностях размножения лягушек (Wagner, 1923). Он отметил, что ранней весной, во время формирования хромосомного клубка (*Chromosomenknäuel*), известного теперь как кариосфера, вокруг поздних ЛЩ обнаруживается фиброзная субстанция (*faserigen Substanz*), окрашивающаяся кислыми красителями (рис. 1ж). Согласно Вагнеру (Wagner, 1923), “фибриллы” (*Fasern*) этой субстанции (капсулы) наиболее хорошо заметны после фиксации по Жильсону с последующим окрашиванием железным гематоксилином Хайденгайна (Heidenhain’s iron hematoxylin), но не детектируются после окрашивания гематоксилином Делафильда.

Капсула Вагнера (капсула кариосферы, КК), окружающая поздние ЛЩ, собранные в кариосферу, была также изображена в работе Дюрью (Duryee, 1950) (рис. 1д, стрелки). Он отмечал, что кариосфера “окружена более плотной субстанцией”, так что хромосомы, расположенные в “центральном облаке ядрышек”, встроены в “гель”, физически изолирующий их “внутри хромосомного каркаса”. Однако фотографии нефиксированных ЗП, представленные в работе, включая “изолированные центральные ядрышки и хромосомный каркас”, не позволяют различить какие-либо детали структуры КК.

Хромосомы ооцитов травяной лягушки, собранные в кариосферу, демонстрируют довольно рыхлую ультраструктуру даже на финальных этапах диплотены, в поздних вителлогенных ооцитах (рис. 1и–к). Использование антител к ДНК (рис. 1к) позволяет отличить хромосомы от, например, структур, возникающих в результате слияния ядрышек (не показано). Кроме того, на ультраструктурном уровне вокруг хромосом мы не наблюдали заметного “каркаса” или фиброзной структуры, которую можно было бы трактовать как капсулу Вагнера. Особенно убедительно это видно при малом увеличении электронного микроскопа (рис. 1и). Эти данные противоре-

<sup>3</sup> В отношении стадий ЗП *R. temporaria* в литературе имеются некоторые разногласия. Например, стадии 5 и 6, проиллюстрированные в нескольких работах, посвященных кариосфере *R. temporaria* (например, Illicheva et al., 2018, 2019), на самом деле относятся к более позднему периоду развития кариосферы, чем стадия 6 по номенклатуре Дюрью (Duryee, 1950). Использование же номенклатуры Дюмона (Dumont, 1972), предложенной в отношении стадий развития ооцитов *Xenopus*, в отношении ооцитов *Rana* (Почукалина, Парфенов, 1994; Ильичева и др., 2016) представляется неоправданной, поскольку структура ЗП *X. laevis* и *R. temporaria* несколько различается, а кариосфера слабо выражена в ЗП *Xenopus*.



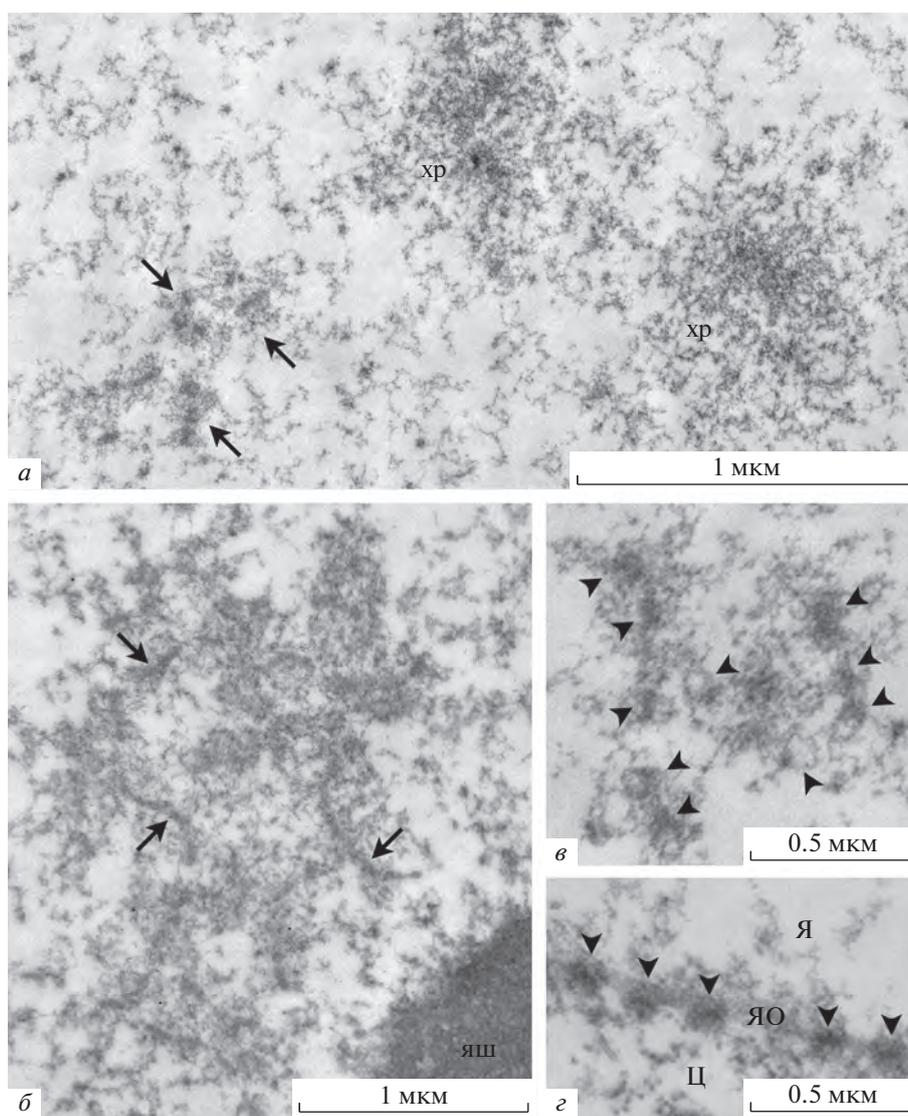
**Рис. 1.** Морфологические особенности кариосферы амфибий. *a* – Полутонкий срез ядра ооцита *Rana temporaria* на стадии компактной кариосферы (стрелка), которая локализована в центре скопления амплифицированных ядрышек; окраска метиленовым синим. *б–д, ж* – Исторические рисунки скоплений ядрышек с расположенными внутри хромосомами (кариосферой) в ооцитах различных амфибий по данным Шульце (Schultze, 1887 – *б*), Карнуа и Леблона (Carnoy, Leblond, 1898 – *в–г*), Дюрьи (Duryee, 1950 – *д*) и Вагнера (Wagner, 1923 – *ж*); стрелки на фрагменте *д* указывают капсулу Вагнера; Biodiversity Heritage Library (<https://www.biodiversitylibrary.org/>), в свободном доступе согласно лицензии CC0 1.0 Public Domain Dedication. *е, з* – Ранняя (*е*) и поздняя (*з*) кариосфера *R. temporaria*, соответствующие стадии 6 по Дюрьи (Duryee, 1950 – *д*) и хромосомному узлу (Chromosomenknäuel) по Вагнеру (Wagner, 1923 – *ж*); окраска DAPI. *и* – Кариосфера *R. temporaria* при малом увеличении электронного микроскопа, заметно отсутствие капсулы; хр – хромосомы, яш – ядрышко. *к* – Хромосома ооцита *R. temporaria* на стадии кариосферы после иммуноэлектронного мечения антителами к двухцепочечной ДНК (частицы размером 10 нм).

чат более ранним наблюдениям Почукалиной и Парфенова (1994), которые на полутонких срезах показывали присутствие грубых тяжей, интерпретированных как филаментозная КК *R. temporaria*.

**О так называемых “псевдомембранах”.** Согласно ранним ЭМ-наблюдениям (Gruzova, Parfenov, 1977), собранные в кариосферу хромосомы ооцитов *R. temporaria* ассоциированы с филаментозным материа-

лом, главные морфологические элементы которого названы псевдомембранами<sup>4</sup>. Эти характерные образования представляют ряды структур (*annuli*), морфологически напоминающие “автономные” по-

<sup>4</sup> Этот термин представляется неудачным, и мы предлагаем больше его не использовать. Вместо этого данные структуры могут быть названы “пучками”, “тяжами” и т.п. Здесь мы будем использовать слово “тяжи” (strands).

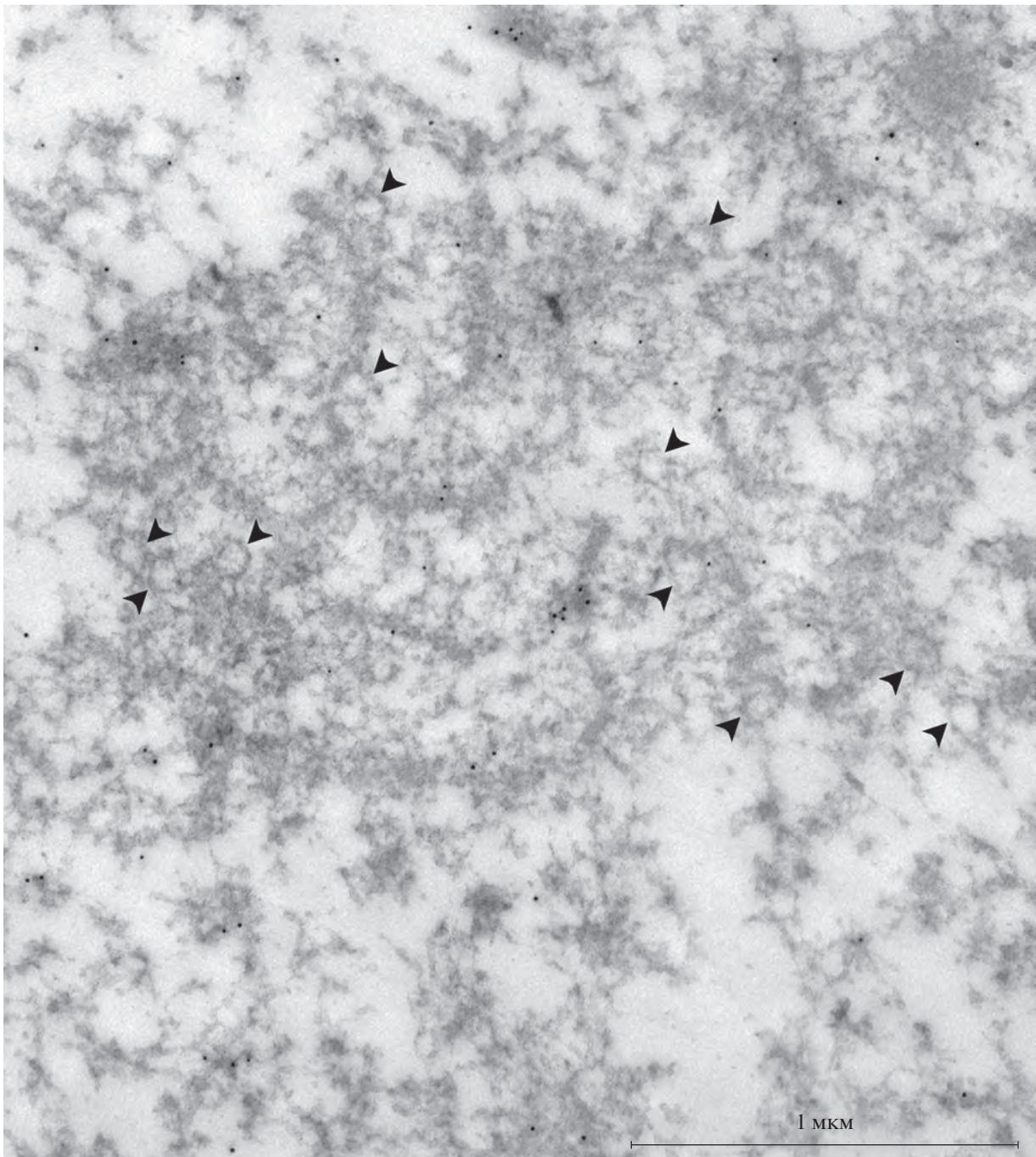


**Рис. 2.** Ультраструктурные особенности кариосферы *Rana temporaria*. *а* – Грубофибриллярный материал (*стрелки*), локализованный в области, содержащей хромосомы (хр). *б* – Электронно-плотные тяжи (*стрелки*), ассоциированные с тонкофибриллярным материалом; яш – фрагмент ядрышка. *в* – Срез, проходящий через тяжи, на котором видны “колечки” (*annuli*) (*головки стрелок*). *г* – Продольный срез через ядерную оболочку (ЯО), демонстрирующий морфологическое сходство между ядерными поровыми комплексами (*головки стрелок*) и “колечками”, показанными на (*в*); Я и Ц – соответственно ядерная и цитоплазматическая стороны.

ровые комплексы (ЯПК), связанные фибриллярным материалом; в результате формируются электронно-плотные тяжи<sup>5</sup>. Авторы считали, что они наблюдают на ультраструктурном уровне капсулу Вагнера. Подобные тяжи были также описаны в составе КК комаров (Fiil, Moens 1973; Fiil, 1974, 1976).

<sup>5</sup> Мы пока будем использовать историческое слово “*annuli*”, поскольку природа этих структур остается непонятной и, по крайней мере, большинство из них, не является “автономными поровыми комплексами”. В дальнейшем необходимо подобрать более подходящий термин.

В нашем материале мы наблюдали все эти экстра-хромосомные образования ЗП *R. temporaria* (тяжи и *annuli*), описанные ранее (Gruzova, Parfenov, 1977), включая расположенные в непосредственной близости от хромосом и ядрышек (рис. 2*а–б*). Кроме того, мы наблюдали внутриядерные мембранные структуры, такие как внутриядерные пузырьки, трубчатые конструкции и внутриядерные пористые пластинки (*intranuclear annulata lamellae*) (Парфенов, 1995), в том числе на периферии участков ЗП *R. temporaria*, содержащих кариосферу (не показано). Обнаружено, что вышеупомянутые электронно-плотные искривленные тяжи занимают весьма ограниченные



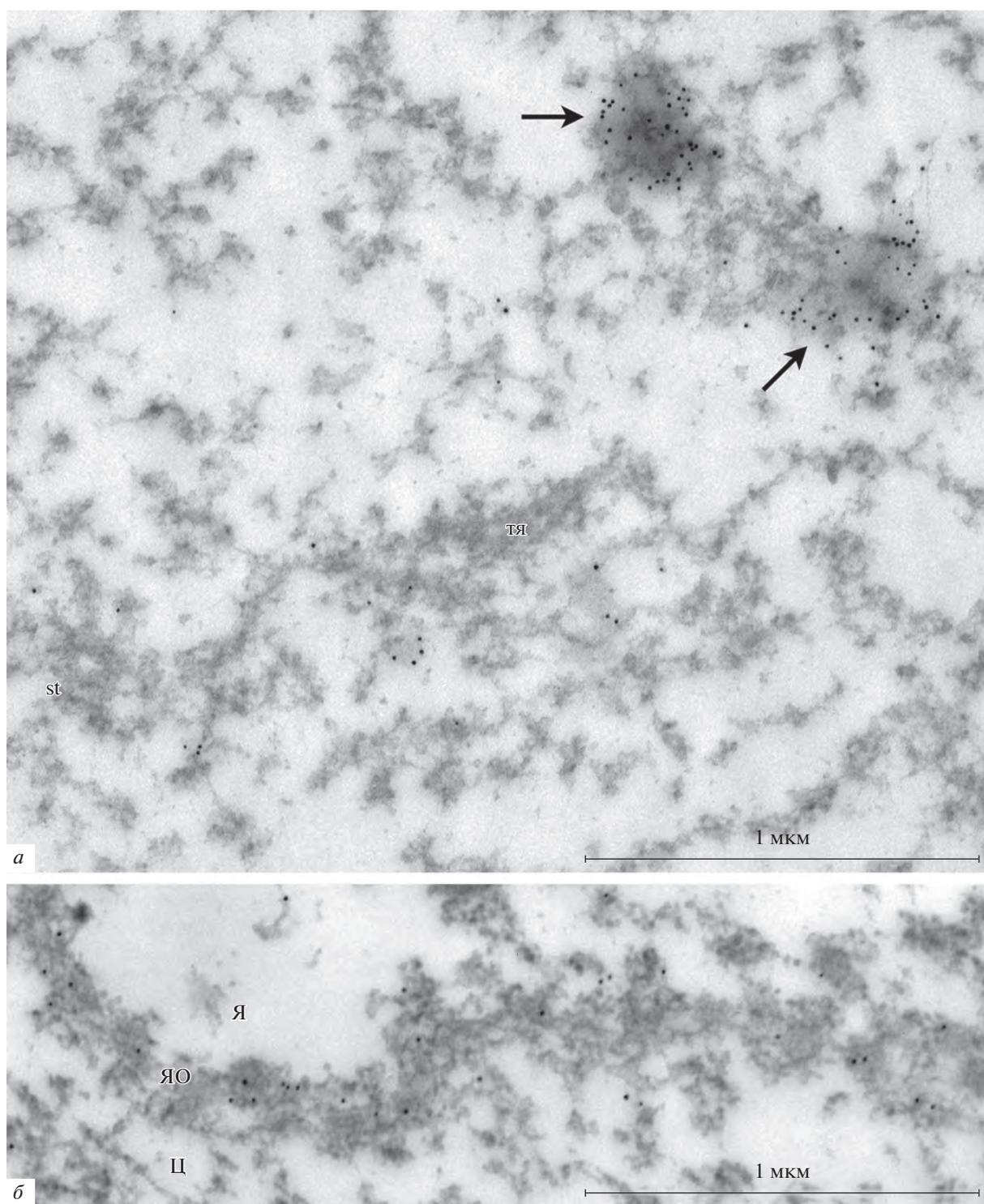
**Рис. 3.** Фибриллярные тяжи кариосферы *Rana temporaria* после ультраструктурного иммуномечения антителами к нуклеопорину Nup35. Подавляющее большинство *annuli* (головки стрелок) не мечены и, следовательно, не могут рассматриваться в качестве “автономных поровых комплексов”.

участки в ЗП. Как показал анализ серийных срезов, этот материал никогда не формирует что-либо напоминающее капсулу<sup>6</sup>.

Характерные *annuli* в этом материале (рис. 2в), по нашему мнению, хотя они морфологически напоми-

<sup>6</sup> Лат. *capsula* означает “коробочка” или “футляр”.

нают ЯПК (Gruzova, Parfenov, 1977) (рис. 2г), нельзя считать аналогами ЯПК, поскольку большинство их них не содержит нуклеопорина Nup35 – ключевого белка ЯПК, что отчетливо видно при помощи ИЭМ (рис. 3, головки стрелок; рис. 4а). ИЭМ-мечение ядерной оболочки (ЯО) служило в качестве позитивного контроля (рис. 4б).



**Рис. 4.** Особенности распределения Nup35 в ядре ооцита *Rana temporaria* по данным иммуноэлектронной микроскопии. (а) Нуклеопорин Nup35 накапливается в заметных биомолекулярных конденсатах (стрелки), но не в тяжах (тя). (б) Срез через ядерную оболочку (ЯО), использованный в качестве контроля меченя антителами к Nup35; Я и Ц – соответственно ядерная и цитоплазматическая стороны.

В то же самое время довольно много метки обнаруживается над материалом экстрахромосомных тяжей, расположенных в центральной, кариосферосо-

державшей области ЗП. Кроме того, посреди этого материала обнаруживаются заметные биомолекулярные конденсаты, интенсивно меченные антите-

лами к Nup35 (рис. 4а, стрелки). Известно, что внутренне неупорядоченные (intrinsically disordered) нуклеопорины, богатые остатками фенилаланина и глицина (FG-Nups), способны к фазовому разделению (Nag et al., 2022), что является фундаментальным процессом, лежащим в основе формирования биомолекулярных конденсатов (Banani et al., 2017). Nup35 не является FG-нуклеопорином, но некоторые такие нуклеопорины (non-FG-Nups), включая Nup35, взаимодействуют с определенным набором FG-Nups и усиливают взаимодействия с другими FG-Nups в ходе самосборки нуклеопориновых частиц (Konishi, Yoshimura, 2020). Это может приводить к формированию крупных биомолекулярных конденсатов, принимая во внимание возможный избыток нуклеопоринов в ЗП.

Наши наблюдения показывают, что Nup35 и, возможно, другие нуклеопорины, несомненно, присутствуют в кариосферосодержащем участке ЗП *R. temporaria*, что ранее было показано с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии (Ilicheva et al., 2018). Однако пока остается неясным вопрос, имеют ли *annuli* и ЯПК какие-либо общие признаки, кроме морфологических.

В соматических клетках Nup35 необходим для сборки ЯО, но напрямую не участвует в ее ассоциации с хромосомами. Однако он взаимодействует с другими нуклеопоринами, включая хроматинсвязывающий Nup93, с которым образует стабильные комплексы (Ródenas et al., 2009). В свою очередь Nup93, участвуя в связывании хроматина с ЯО, вовлечен в эпигенетическое подавление некоторых генов (Labade et al., 2016). В частности, взаимодействия Nup93 с хроматином влияют на экспрессию генов, связанных с ремоделированием актинового цитоскелета (Bersini et al., 2020). К сожалению, пока мы не можем установить, является ли Nup93 компонентом тяжей и (или) *annuli*, поскольку антитела к нему продемонстрировали низкую эффективность на ультраструктурном уровне, несмотря на то, что Nup93 был выявлен в центральной части ЗП *R. temporaria* с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии (Ilicheva et al., 2018).

Принимая во внимание, что Nup35 взаимодействует с ламинами типа В (Ródenas et al., 2009), что ламин III (ламин В3 амфибий) в большом количестве присутствует в кариосферосодержащей части ЗП *R. temporaria* (Парфенов, 1995) и что антитела к ламинам А/С и В на иммунофлуоресцентном уровне метят участки ЗП в области кариосферы (Ильичева и др., 2016; Ilicheva et al., 2018), мы проверили, являются ли ламинны компонентами тяжей, связанных с *annuli*.

К сожалению, имевшиеся в нашем распоряжении антитела к ламинам А/С млекопитающих не метили ЯО на ЭМ-уровне (не показано) и в дальнейшем не использовались. Однако антитела к ламину В, ранее

успешно протестированные на материале эволюционно далеких друг от друга организмов, например насекомых (Bogolyubov et al., 2013), метили фибриллярный материал в ЗП лягушки (Fig. 5), но не тяжи, связывающие *annuli* (рис. 6а). В ЗП, в том числе вблизи тяжей, часто наблюдали заметные биомолекулярные конденсаты, интенсивно меченные антителами к ламину В (рис. 6б).

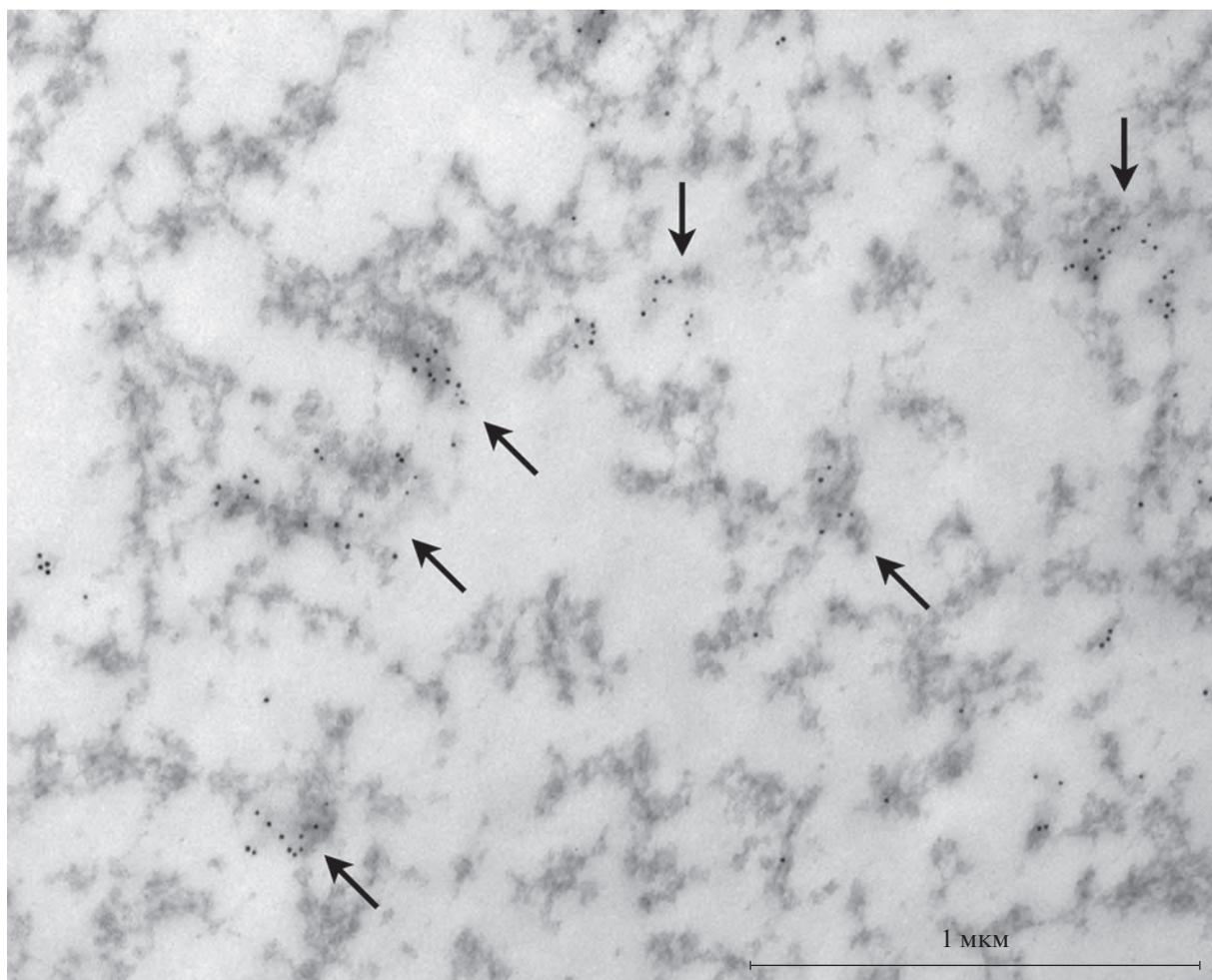
**F-актин – ключевой структурный белок зародышевого пузырька.** Наконец мы проверили, связан ли ядерный актин с филаментозным материалом ЗП *R. temporaria* и можно ли считать F-актин главным компонентом КК. Давно известно, что актин – наиболее распространенный белок ЗП амфибий, количество которого составляет примерно 6% от общего количества белков в ЗП *Xenopus* в концентрации более чем 2 мг/мл (Clark, Merriam, 1977; Clark, Rosenbaum, 1979). Такое высокое значение превышает критическую концентрацию, необходимую для полимеризации актина, что приводит к быстрому гелеобразованию при нарушениях целостности ЗП (Gall, 2006).

В ЗП *Xenopus* полимерный актин составляет примерно 37% или даже больше от общего количества ядерного актина (Clark, Merriam, 1979); таким образом, F-актин – преобладающая форма актина в ЗП (Bohnsack et al., 2006). Установлено (Bohnsack et al., 2006), что столь значительное накопление F-актина в ЗП *X. laevis* достигается за счет отсутствия экспортина-6 – специфического фактора экспорта ядерного актина (Stüven et al., 2003). В ЗП амфибий и птиц F-актин легко выявляется с помощью обычного окрашивания флуоресцентно меченым фаллоидином (Морозова, Киселева, 2008; Maslova, Krasikova, 2012; Ilicheva et al., 2019).

В ЗП *X. laevis* на ультраструктурном уровне ядерный F-актин формирует сеть, состоящую из пучков и разветвленных филаментов толщиной примерно 12–100 нм (в среднем примерно 40 нм), которая простирается от ЯПК через все ядро. Это отчетливо показано с помощью сканирующей ЭМ с использованием эмиссии под действием электрического поля (полевой эмиссии) – field emission scanning EM (Kiseleva et al., 2004). Считают, что сеть F-актина играет архитектурную роль и закрепляет органеллы, такие как тельца гистоновых локусов<sup>7</sup>, спеклы (кластеры интерхроматиновых гранул) и ядрышки, а также, возможно, участвует в координации ядерно-цитоплазматических взаимоотношений и транспорте ядерных компонентов (Kiseleva et al., 2004).

Советско-российский клеточный биолог и эмбриолог Владимир Николаевич Парфенов и его коллеги были одними из первых, кто подтвердил наличие микрофиламентов и пучков полимерного актина в ЗП

<sup>7</sup> В течение десятилетий эти ядерные органеллы в ЗП амфибий рассматривали как тельца Кахаля (Nizami et al., 2010).



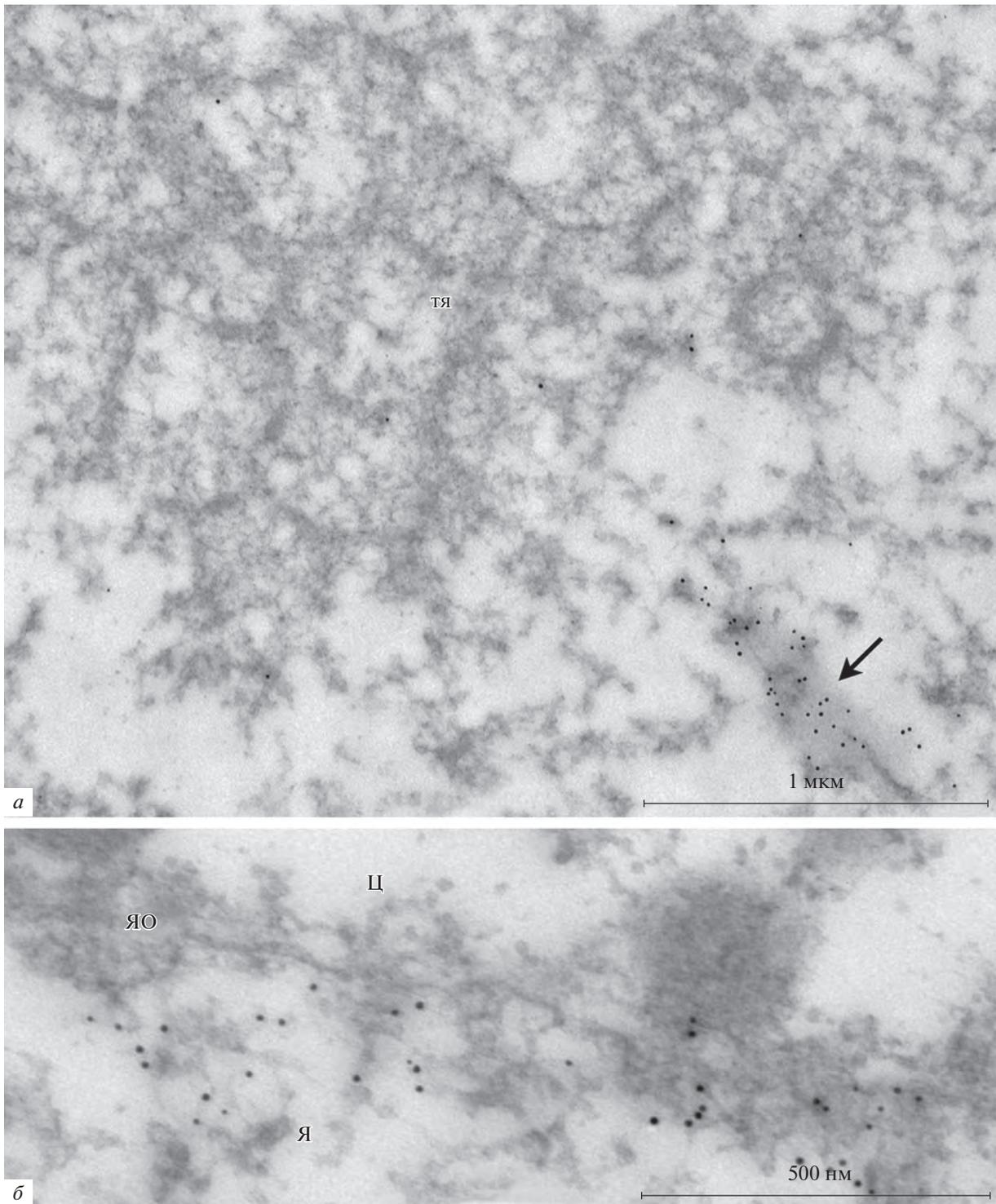
**Рис. 5.** Ультраструктурное иммуномечение антителами к ламину В, демонстрирующее присутствие ламинсодержащего фибриллярного материала (стрелки) в ядре ооцита *Rana temporaria*.

*R. temporaria*, в том числе на ультраструктурном уровне (Parfenov et al., 1995). Ими показано, что в поздних ооцитах короткие фрагменты пучков F-актина обнаруживаются в центральной части ЗП, в основном в ассоциации с ядрышками. Хотя в этой работе не упоминаются ни кариосфера, ни КК, с этого времени утвердилась точка зрения о том, что F-актин является одним из главных компонентов КК *R. temporaria* (Ильичева и др., 2016; Bogolyubov, 2018; Illicheva et al., 2018, 2019).

С помощью стандартной ЭМ мы подтвердили, что ЗП *R. temporaria* заполнен обширной сетью филаментов, некоторые из которых тесно ассоциированы с хромосомами (рис. 7а) и ядрышками (рис. 7б). ЗП *R. temporaria* интенсивно окрашивается фаллоидин-родамином, однако это окрашивание довольно равномерное, в том числе в перинуклеолярных областях и участке, содержащем кариосферу (рис. 8). Мы пока не можем объяснить грубое окрашивание фалло-

идин-родамином области, содержащей кариосферу, и выявление заметных F-актиновых “колец” вокруг ядрышек, о чем сообщалось ранее в результате иммунофлуоресцентных исследований (Illicheva et al., 2018, 2019) и что было интерпретировано как выявление КК *R. temporaria*. В нашем материале мы никогда не наблюдали подобных картин. После окрашивания фаллоидин-родамином и обработки антителами к актину заметные тяжи F-актина не выявляются на световом уровне, что напоминает характер окрашивания ЗП *X. laevis* (Морозова, Киселева, 2008; Maslova, Krasikova, 2012). По нашему мнению, распределение F-актина в ЗП *R. temporaria* существенно не отличается от такового в ЗП шпорцевой лягушки, у которой слабо выражена кариосфера.

Ультраструктурное (ИЭМ) исследование показало, что антитела к актину действительно выявляют филаментозную сеть в ЗП *R. temporaria*, подтверждая присутствие в нем филаментов актина (рис. 9а). Эти



**Рис. 6.** Особенности распределения ламина В в ядре ооцита *Rana temporaria*. *a* – Характерные тяжи (тя) в кариосферосодержащей части ядра полностью лишены меток, в то время как белок, выявляемый антителами к ламину В, выявляется в аморфных локальных областях (стрелка). *б* – Срез через ядерную оболочку (ЯО), использованный в качестве контроля мечения антителами к ламину В; Я и Ц – соответственно ядерная и цитоплазматическая стороны.

филаменты заполняют нуклеоплазму, но не концентрируются ни в кариосферосодержащей области, ни вокруг ядрышек. Во всяком случае, вышеупомяну-

тые тяжи, “претендующие” на роль элементов КК, не содержат актина, а антитела к актину маркируют ассоциированный фибриллярный материал, но не сами

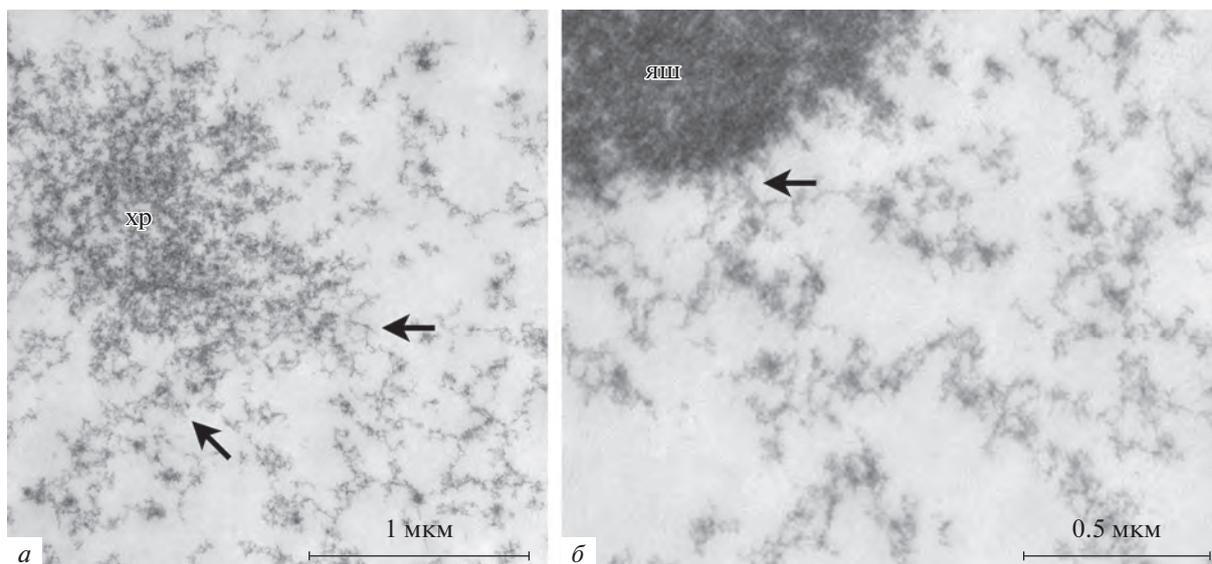


Рис. 7. Ядерные филаменты (стрелки) в ассоциации с хромосомой (а) и ядрышком (б), выявляемые с помощью стандартной трансмиссионной электронной микроскопии. хр – хроматин, яш – ядрышко.

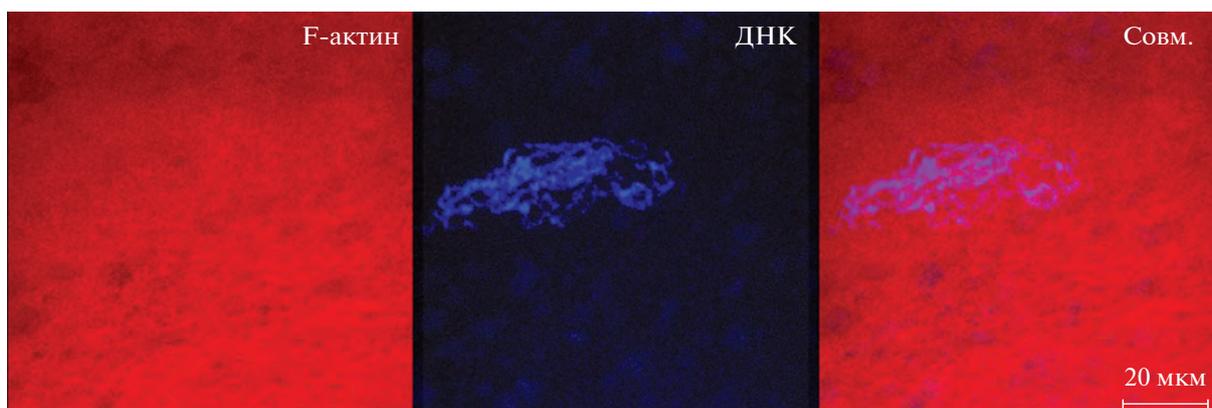


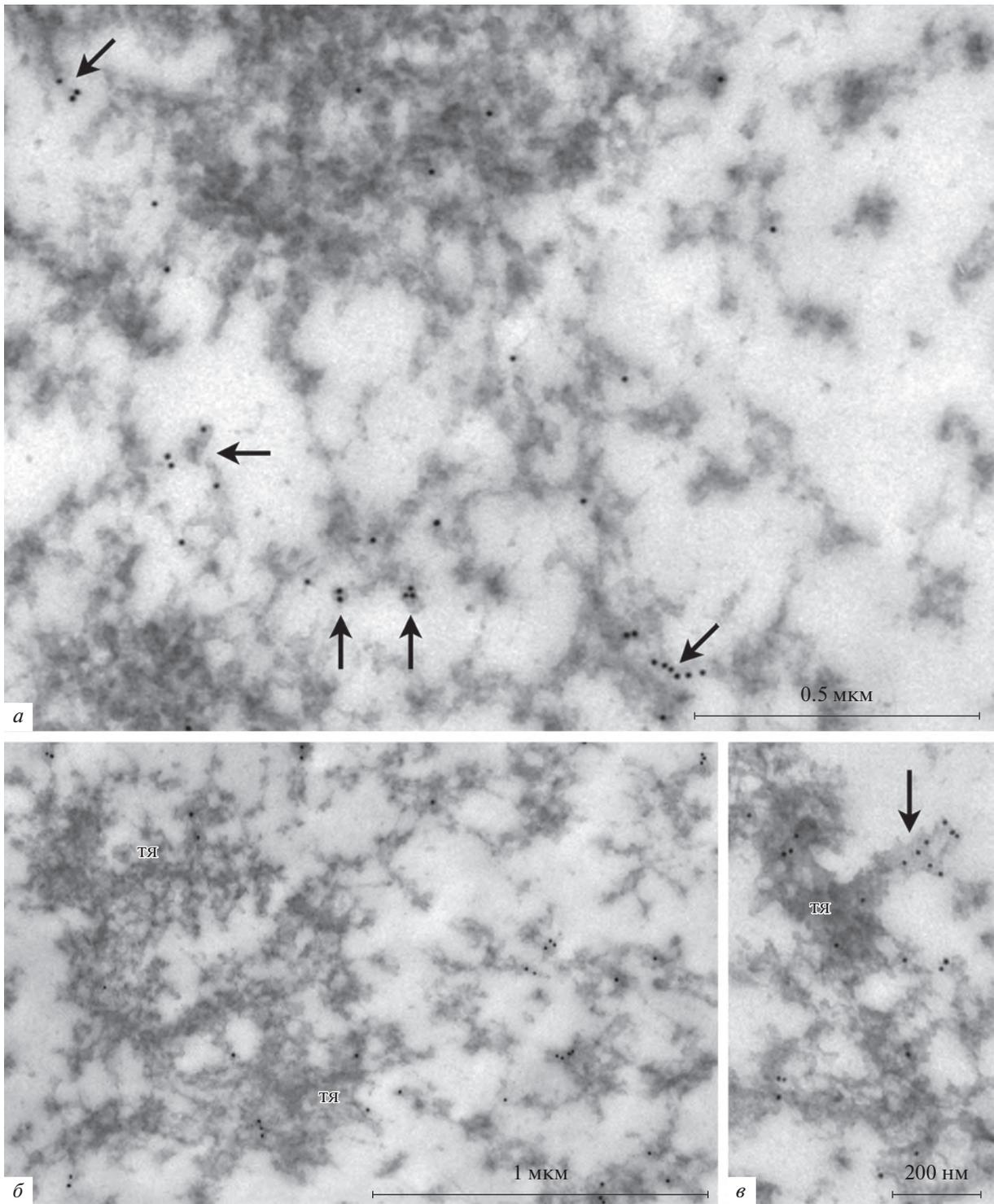
Рис. 8. Окрашивание ядра ооцита *Rana temporaria* родамиин-фаллоидином для выявления F-актина (красный цвет) и DAPI (синий цвет); конфокальная микроскопия, максимальная проекция.

тяжи (рис. 9б). В то же время некоторое количество актинсодержащего материала находится в физической ассоциации с этими тяжами (рис. 9в).

Следует подчеркнуть, что за пределами амфибий, а именно у насекомых, ядерный F-актин действительно может рассматриваться в качестве маркерного белка КК (Bogolyubov, 2018) – конечно, у тех видов, у которых развивается надструктурный комплекс “кариосфера–КК”. Наиболее впечатляющим примером служит ЗП некоторых сетчатокрылых (Rübsam, Büning, 2001) и некоторых жуков (Świątek, 1999; Bogolyubov, 2018), у которых КК интенсивно и избирательно окрашивается с помощью флуоресцентно меченого фаллоидина. В ЗП булавоусого

мучного хрущака *Tribolium castaneum* F-актин формирует обширный “кожух” (рис. 10а), который также хорошо виден на ультраструктурном уровне как электронно-плотная оболочка (shell) кариосферы (рис. 10б). У *T. castaneum* эта “оболочка” часто ассоциирована с тяжами, которые, в отличие от тяжей в кариосферосодержащей области ЗП *R. temporaria*, содержат ламин В (Bogolyubov et al., 2013).

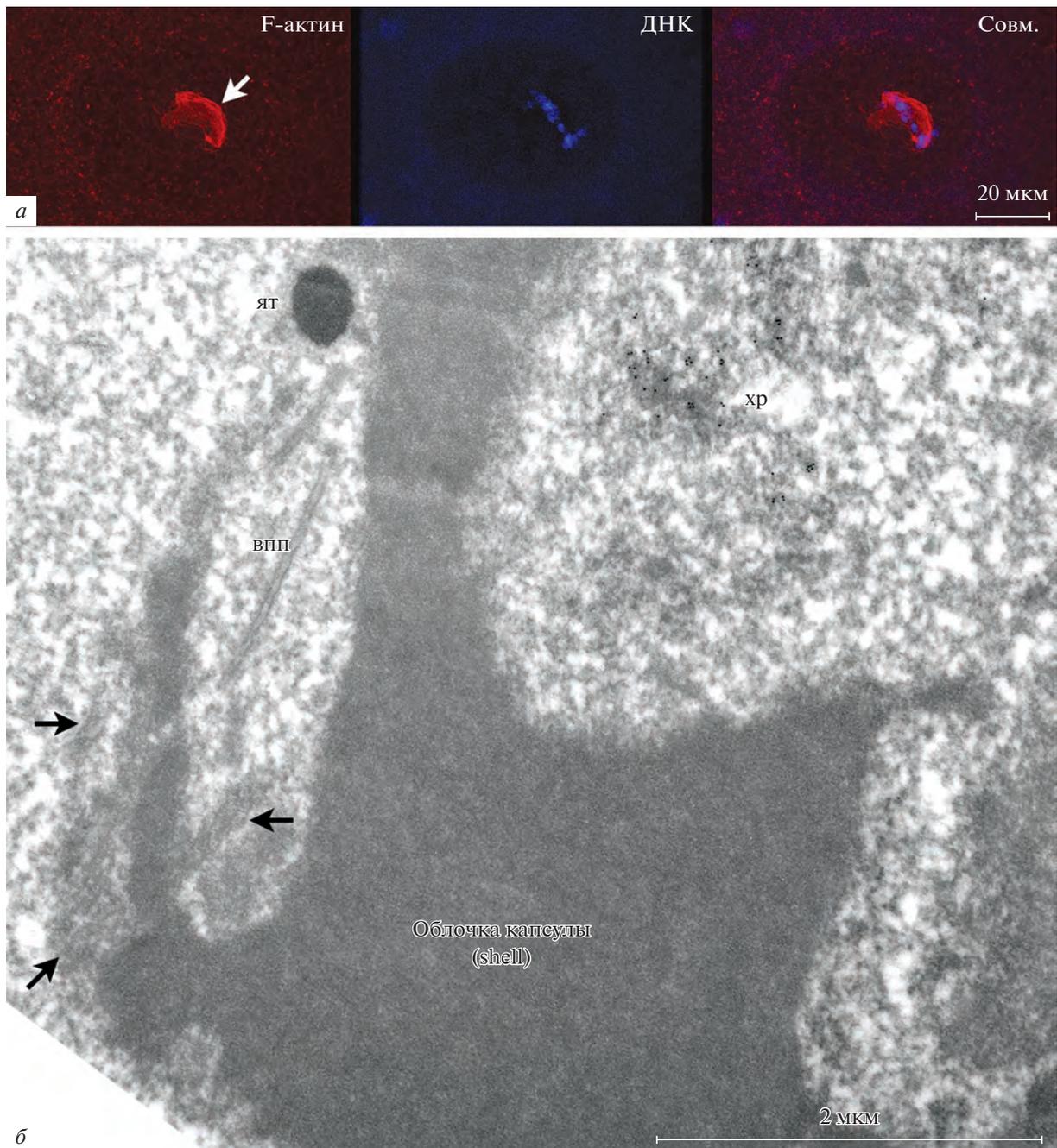
**Что актин, особенно F-актин, делает в ядре?** Времена, когда само существование актина в ядре вызывало изрядную долю скептицизма, закончились более чем 20 лет тому назад, породив бурно развивающуюся область исследований (Pederson, Aebi, 2002, 2005; Pederson, 2008). Теперь нет уже никаких со-



**Рис. 9.** Иммуноэлектронное мечение ядра ооцита *Rana temporaria* антителами к N-концу молекулы актина. *а* – Актиновые филаменты (*стрелки*) в участке ядра, содержащем кариосферу. *б* – Тяжи (тя) не содержат актина. *в* – Фрагмент актинового пучка (*стрелка*), находящегося в физической ассоциации с тяжом (тя).

мнений, что актин в ядре выполняет множество функций и, помимо всего прочего, широко вовлечен в регуляцию экспрессии генов и поддержание це-

лостности генома (Visa, Percipalle, 2010; Kyheröinen, Vartiainen, 2020), что напрямую связано с оогенезом и формированием кариосферы. Ядерный актин так-



**Рис. 10.** Кариосфера в ядре ооцита булавоусого мучного хрущака *Tribolium castaneum*, представленная здесь для демонстрации существенных различий в ее строении по сравнению с кариосферой лягушки. *а* – Окраска родамин-фalloидином (красный цвет), демонстрирующая присутствие типичной капсулы кариосферы, богатой F-актином (стрелка), ДНК (собственно кариосфера) окрашена DAPI (синий цвет); конфокальная микроскопия, максимальная проекция. *б* – Ультраструктура капсулы кариосферы *T. castaneum*; стрелки указывают актиновые филаменты (Bogolyubov et al., 2013), ассоциированные с мощно развитой стенкой (shell) капсулы, окружающей хроматин (хр), иммуноэлектронное мечение антителами к ДНК; ят – ядерное тельце (кластер интерхроматиновых гранул), впп – внутриядерные пористые пластинки (intranuclear annulated lamella).

же важен в процессах определения судьбы клеток в ходе дифференцировки тканей, а также эмбрионального развития (Kloc et al., 2021).

Актин в ядре входит в состав хроматинреmodellрующих комплексов и связан со всеми тремя РНК-

полимеразами, а также РНК-комплексами процессинга и экспорта мРНК; при этом ядерный F-актин также обладает специфическими функциями (Gieni, Hendzel, 2009), участвуя, например, в репарации разрывов двухцепочечной ДНК и в ответе на репли-

кационный стресс (Lamm et al., 2020). Нарушения функций ядерного актина, в том числе в результате нарушений его полимеризации/деполимеризации, имеют отношение к этиологии многих заболеваний человека, включая рак (Hyrskyluoto, Vartiainen, 2020) и ламинопатии (Bera, Sengupta, 2020). В последнем случае нарушения взаимодействия ядерного актина (и миозина) с ламиновой сетью, поврежденной в результате мутаций *LMNA*, но в норме обеспечивающей механическую жесткость хромосом, нарушают хромосомный ландшафт и экспрессию генов.

Специфические ядерные функции полимеров актина особенно важны для ооцитов, в которых полимеризация актина играет ключевую роль в сегрегации хромосом (Dunkley et al., 2022). Однако фундаментальные механизмы функционирования мономерного актина и актиновых филаментов в ядре все еще недостаточно изучены и служат предметом дискуссий (Ulferfs et al., 2021).

Механизмы, посредством которых F-актин вовлечен в формирование кариосферы и ее капсулы, также еще предстоит расшифровать. Не вызывает, однако, сомнений тот факт, что актинсодержащие филаменты являются важнейшими компонентами ЗП (Морозова, Киселева, 2008). Эксперименты с агентами, деполимеризующими актин, такими как латрункулин и цитохалазин D, убедительно доказывают ключевую роль F-актина в поддержании структурной целостности надмолекулярных комплексов ЗП. У шпорцевой лягушки *X. laevis*, у которой хромосомы не формируют выраженную кариосферу, разрушение актиновых филаментов приводит к коллапсу хромосом и их “слипанию” в компактную кариосомоподобную массу (Maslova, Krasikova, 2012).

В качестве необходимого уточнения стоит отметить, что в конце диплотены хромосомы ооцита *X. laevis* “короткие и ретрагированные” (short and retracted) и вместе с амплифицированными ядрышками “формируют массу в центре ядра” (Dumont, 1972). С формальной точки зрения это описание соответствует описанию кариосферы, однако, как показано на рис. 16 в статье Дюмона (Dumont, 1972), на этой стадии хромосомы ооцита *Xenopus* не образуют компактного клубка. Вокруг хромосом не наблюдается филаментозного материала, который мог бы рассматриваться в качестве КК. Довольно странно, что заключительные стадии роста ооцита у такого распространенного модельного организма, которым является *X. laevis*, до сих пор исследованы недостаточно, а подавляющее большинство исследований касается предшествующих стадий хромосом-ЛШ.

В ЗП *R. temporaria*, в котором уже сформирована более или менее компактная кариосфера, воздействие цитохалазином D существенно не влияет на хромосомы и транскрипцию, приводя лишь к некоторому сжатию кариосферы (Plicheva et al., 2019). При этом цитохалазин D полностью разрушает

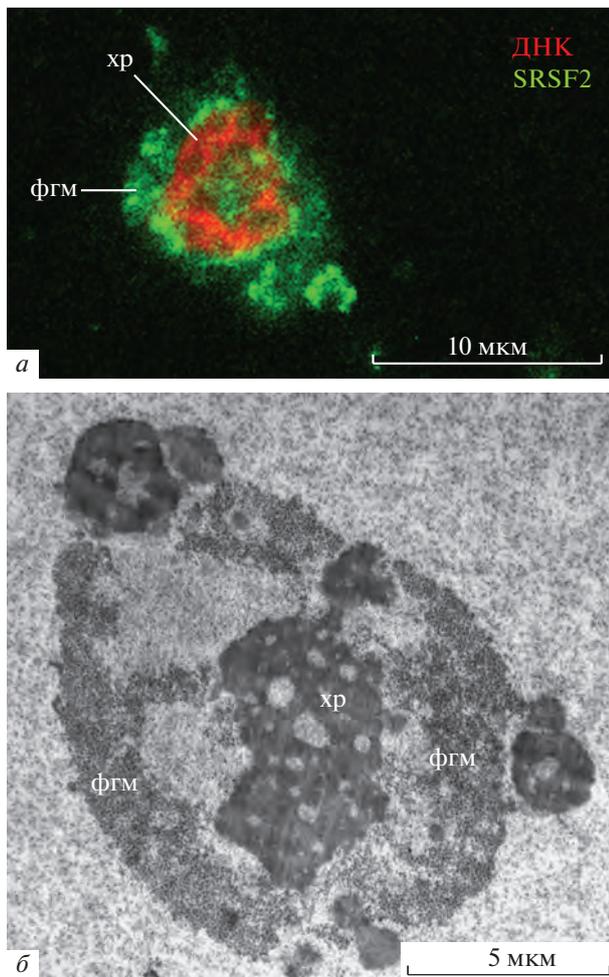
окружающее скопление ядрышек, что приводит к их слиянию в единую гигантскую каплю. Авторы полагают, что в этом случае цитохалазин D разрушает КК. Однако на самом деле мы имеем дело с разрушением всей сети актиновых филаментов в ЗП.

**Заключающие уточнения.** Считают, что кариосфера и ее капсула – специализированные ядерные структуры ооцитов, участвующие в создании специфической структурно-функциональной компартиментализации ЗП (Gruzova, Parfenov, 1993; Bogolyubov, 2018). Наши наблюдения над ЗП *R. temporaria* показали, что кариосфера (хромосомный аппарат вителлогенных ооцитов) травяной лягушки представляет собой простой клубок хромосом, что полностью соответствует оригинальному определению кариосомы (Blackman, 1903). В то же время мы не подтвердили присутствия вокруг этого “хромосомного клубка” заметной фиброзной капсулы Вагнера (Wagner, 1923), в то время как в ЗП других организмов, особенно насекомых, подобного рода КК действительно существует. Центральные скопления ядрышек, характерные для ЗП различных амфибий, по нашему мнению, не могут считаться настоящими КК, поскольку они образованы отдельными жидкими каплями (ядрышками), которые отделены друг от друга и в нормальных условиях не сливаются в единую массу, хотя картины слияния отдельных ядрышек в ЗП *R. temporaria* наблюдаются довольно часто.

Присутствие экстрахромосомного материала, который иногда охватывает хромосомы, собранные в кариосому, продемонстрировано, например, в ЗП большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*. Этот фиброгранулярный материал, в частности, содержит избыток РНК-полимеразы II, факторов сплайсинга пре-мРНК и другие молекулярные компоненты, не участвующие в синтезе/процессинге РНК в транскрипционно инертных поздних ооцитах (Bogolyubov, Parfenov, 2008) (рис. 11). Однако этот материал, по-видимому, лишен структурных белков, таких как F-актин, и потому не может считаться КК.

КК насекомых не является полностью замкнутым барьером, изолирующим кариосферу, и отдельные фрагменты конденсированного хроматина могут находиться за ее пределами, по крайней мере, на некоторых стадиях роста ооцита сетчатокрылого насекомого – златоглазки *Chrysopa carnea* (Rübsam, Büning, 2001). КК насекомых аккумулирует значительные количества F-актина, который можно считать маркерным (signature) компонентом КК (Bogolyubov, 2018).

ЗП лягушек также содержит невероятные количества распределенного по нуклеоплазме F-актина независимо от того, формируется ли компактная кариосфера или нет. У травяной лягушки структурную стабильность комплексу “кариосфера–ядрышки” также в первую очередь придает обширная сеть F-актиновых филаментов и их пучков, которая заполняет ЗП. Ключевая структурная роль F-актина в под-



**Рис. 11.** Кариосфера в ядре ооцита большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*. *а* – Иммунофлуоресцентное окрашивание с помощью антител к фактору сплайсинга пре-мРНК SRSF2 (зеленый цвет), которые локализован в фиброгранулярном материале (фгм), окружающем хроматин (хр), ДНК (красный цвет) окрашена ТО-PRO-3. *б* – Фиброгранулярный материал окружает хроматин, но оболочка (shell) или филаментозные тяжи, напоминающие капсулу кариосферы у другого жука-тенебриониды *Tribolium castaneum* (рис. 10), отсутствуют (Боголюбов и др., 2012, с изменениями).

держании стабильности структур ЗП неоспоримо доказана в экспериментах с соединениями, деполитаризующими актин (Maslova, Krasikova, 2012), в том числе на ЗП травяной лягушки (Plicheva et al., 2019). Однако в этом случае мы говорим о ядерной сети F-актина в целом, а не о специализированной ее части, которая могла бы представлять КК. В этом отношении структура ЗП *R. temporaria* принципиально не отличается от структуры ЗП *X. laevis*.

В то время как фундаментальные принципы формирования кариосферы (кариосомы) в основном расшифрованы, по крайней мере в отношении *Drosophila melanogaster* (Cullen et al., 2005; Ivanovska et al.,

2005; Lancaster et al., 2007, 2010; Singh et al., 2018; Kenny et al., 2021), меньше известно о биологическом значении КК.

Формирование кариосомы в ЗП дрозофилы, по-видимому, не зависит от белков синаптонемных комплексов (СК), а мутанты с нарушениями формирования СК не имеют дефектов формирования кариосомы (Takeo et al., 2011). С другой стороны, мутации различных генов, которые необходимы для правильного завершения мейоза и оогенеза, приводят к аномалиям кариосомы, включая такие, когда хромосомы неправильно конденсируются и остаются связанными с ЯО (Morris et al., 2003).

Главными “участниками” формирования кариосомы *Drosophila* являются ферменты, модифицирующие гистоны (Flora et al., 2017), такие как консервативная нуклеосомная киназа гистонов I (nucleosomal histone kinase-1, НК-1, она же Vrk-1 дрозофилы) (Cullen et al., 2005; Ivanovska et al., 2005; Lancaster et al., 2007, 2010). Согласно предложенной схеме, фосфорилирование ВАФ киназой НК-1 позволяет хромосомам отсоединиться от ЯО, что приводит к формированию нормальной кариосомы. Однако при нарушении фосфорилирования ВАФ – хорошо известного связующего звена между хроматином и ЯО благодаря его взаимодействиям с ДНК и LEM-D-белками ядерной оболочки (Jamin, Wiebe, 2015) – хромосомы остаются связанными с ЯО (Lancaster et al., 2007). Весьма вероятно, что это эволюционно консервативный механизм, принимая во внимание консерватизм ВАФ и НК-1.

“Стустки” электронно-плотных тяжей – единственные структуры, которые потенциально могли бы претендовать на роль элементов КК. Эти тяжи связывают “колечки” (*annuli*), демонстрирующие большое морфологическое сходство с “автономными” поровыми комплексами (Gruzova, Parfenov, 1977), и ассоциированы с тонкофибрилярным актинсодержащим материалом. По-видимому, *annuli* в действительности не являются аналогами ЯПК, поскольку они не содержат по крайней мере одного необходимого нуклеопорина – Nup35. Более того, тяжи не содержат ни актина, ни ламина В и потому не могут считаться КК-подобными структурами, в особенности потому, что они формируют только “стустки”, но не протяженные образования. Интересно, что у озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (ранее *R. ridibunda*) хромосомы в составе кариосферы присоединены к наружной стороне центрального тела, которое состоит из материала, морфологически сходного с тяжами и *annuli* ЗП *R. temporaria* (Parfenov, 1979).

Резонно предполагалось, что тяжи являются производными СК, прежде всего их центральных элементов (Gruzova, Parfenov, 1993). В ЗП некоторых двукрылых насекомых, таких как малярийный комар *Aedes aegypti*, формируется сложная КК, которая, как считают, образована несколькими слоями

множественных аномальных СК, называемых поли-комплексными. Кроме того, на ультраструктурном уровне в КК комаров подробно охарактеризованы внутриядерные пористые пластинки (*intranuclear annulata lamellae*), которые содержат *annuli*, напоминающие по своей структуре автономные ЯПК (Fiil, Moens, 1973; Fiil, 1974, 1976). Природу всех типов этого специфического экстрахромосомного материала еще предстоит установить.

В заключение, наши знания о клеточном ядре, особенно ЗП, несомненно, еще далеко не полные даже на уровне морфологии клетки. Приведенные здесь данные следует обязательно учитывать как основу для дальнейших исследований ЗП амфибий, широко используемого в качестве экспериментальной модели.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Мы весьма признательны Г.Н. Почукалиной, предоставившей нам материал ооцитов *R. temporaria*, подготовленный для электронной и иммуноэлектронной микроскопии. Считаю необходимым посвятить данную работу памяти М.Н. Грузовой и В.Н. Парфенова, которые внесли неоценимый вклад в исследования кариосферы в России.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00380).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с отечественными и международными правилами, включая Европейскую конвенцию о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Исследование одобрено Комитетом по этике при работе с животными Института цитологии РАН (лицензия F18-00380). В исследовании не использовали исчезающие или охраняемые виды; все образцы были собраны за пределами охраняемых территорий в пределах России.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, имеющего отношение к содержанию этой статьи. Авторы не имеют финансовых или имущественных интересов в отношении какого-либо материала, обсуждаемого в этой статье.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования, ультрамикротомия, иммуномечение и просвечивающая электронная микроскопия, а также подготовка изображений и написание первого варианта рукописи — Д.С. Боголюбов; переработка рукописи — И.О. Боголюбова, А.О. Травина;

конфокальная микроскопия, анализ и интерпретация данных — И.О. Боголюбова, Д.С. Боголюбов; сбор материала и содержание животных — А.О. Травина; изоляция ооцитов и ядер — А.О. Травина, И.О. Боголюбова. Все авторы прочитали и одобрили окончательную версию рукописи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боголюбов Д.С., Киселев А.М., Шабельников С.В., Парфенов В.Н. 2012. Полиаденилированные РНК и факторы экспорта мРНК в связи с экстрахромосомными ядерными доменами вителлогенных ооцитов насекомого *Tenebrio molitor*. Цитология. Т. 54. № 6. С. 497. (*Bogolyubov D.S., Kiselyov A.M., Shabelnikov S.V., Parfenov V.N.* 2012. Polyadenylated RNA and mRNA export factors in extrachromosomal nuclear domains of vitellogenic oocytes of the insect, *Tenebrio molitor*. Cell Tissue Biol. V. 6. P. 412.) <https://doi.org/10.1134/S1990519X12050045>
- Гагинская Е.Р. 1972. Ядерные структуры в ооцитах половозрелых птиц. II. Белковые тела и кариосфера. Цитология. Т. 14. № 5. С. 568. (*Gaginskaya E.R.* 1972. The nuclear structures in oocytes of adult birds. II. Protein bodies and the karyosphere. Tsitologiya. V. 14. P. 568.)
- Ильичева Н.В., Кирюшина Д.Ю., Баскаков А.В., Подгорная О.И., Почукалина Г.Н. 2016. Капсула кариосферы ооцитов зимующих лягушек *Rana temporaria* содержит актин, ламины и белки малых ядерных РНП. Цитология. Т. 58. № 6. С. 451. (*Ilicheva N.V., Kiryushina D.Y., Baskakov A.V., Podgornaya O.I., Pochukalina G.N.* 2016. The karyosphere capsule in oocytes of hibernating frogs *Rana temporaria* contains actin, lamins, and SnRNP. Cell Tissue Biol. V. 10. P. 422.) <https://doi.org/10.1134/S1990519X16050059>
- Морозова К.Н., Киселева Е.В. 2008. Изменение организации ядра и цитоплазмы ооцитов ксенопуса после разрушения актиновых филаментов латрункулином. Цитология. Т. 50. № 5. С. 394. (*Morozova K.N., Kiseleva E.V.* 2008. Nuclear and cytoplasmic organization in *Xenopus* oocytes after disruption of actin filaments by latrunculin. Cell Tissue Biol. V. 2. P. 300.) <https://doi.org/10.1134/S1990519X08030115>
- Парфенов В.Н. 1995. Преобразования ядерных структур в оогенезе некоторых позвоночных (к вопросу о морфогенезе капсулы кариосферы). Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Санкт-Петербург. 51 с. (*Parfenov V.N.* 1995. Transformations of nuclear structures during oogenesis of some vertebrates (on the morphogenesis of the karyosphere capsule). D. Sci. Thesis, St. Petersburg, 51 pp.)
- Почукалина Г.Н., Парфенов В.Н. 1994. Организация кариосферы с капсулой перед созреванием ооцитов травяной лягушки. Цитология. Т. 36. № 11. С. 1027. (*Pochukalina G.N., Parfenov V.N.* 1994. Organization of karyosphere with the capsule in oocytes of *Rana temporaria* before maturation. Tsitologiya. V. 36. P. 1027.)
- Banani S.F., Lee H.O., Hyman A.A., Rosen M.K. 2017. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 18. P. 285. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>

- Bera M., Sengupta K.* 2020. Nuclear filaments: role in chromosomal positioning and gene expression. *Nucleus*. V. 11. P. 99. <https://doi.org/10.1080/19491034.2020.1769445>
- Bersini S., Lytle N.K., Schulte R., Huang L., Wahl G.M., Hetzer M.W.* 2020. Nup93 regulates breast tumor growth by modulating cell proliferation and actin cytoskeleton remodeling. *Life Sci. Alliance*. V. 3. e201900623. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900623>
- Blackman M.W.* 1903. The spermatogenesis of the myriapods. II. On the chromatin in the spermatocytes of *Scolopendra heros*. *Biol. Bull.* V. 5. P. 187. <https://doi.org/10.2307/1535736>
- Blackman M.W.* 1905. The spermatogenesis of the myriapods. IV. On the karyosphere and nucleolus in the spermatocytes of *Scolopendra subspinipes*. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* V. 41. P. 331. <https://doi.org/10.2307/20022075>
- Bogolyubov D.S.* 2018. Karyosphere (karyosome): a peculiar structure of the oocyte nucleus. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* V. 337. P. 1. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.12.001>
- Bogolyubov D., Parfenov V.* 2008. Structure of the insect oocyte nucleus with special reference to interchromatin granule clusters and Cajal bodies. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* V. 269. P. 59. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01002-2](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01002-2)
- Bogolyubov D.S., Batalova F.M., Kiselyov A.M., Stepanova I.S.* 2013. Nuclear structures in *Tribolium castaneum* oocytes. *Cell Biol. Int.* V. 37. P. 1061. <https://doi.org/10.1002/cbin.10135>
- Bohnsack M.T., Stüven T., Kuhn C., Cordes V.C., Görlich D.* 2006. A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. *Nat. Cell Biol.* V. 8. P. 257. <https://doi.org/10.1038/ncb1357>
- Born G.* 1894. Die Struktur des Keimbläschens im Ovarialei von *Triton taeniatus*. *Arch. Mikrosk. Anat.* Bd. 43. S. 1. <https://doi.org/10.1007/BF02933867>
- Carnoy J.B., Lebrun H.* 1898. La vésicule germinative et les globules polaires chez les Batraciens. *Cellule*. V. 14. P. 113.
- Clark T.G., Merriam R.W.* 1977. Diffusible and bound actin nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell*. V. 12. P. 883. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90152-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90152-0)
- Clark T.G., Rosenbaum J.L.* 1979. An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. *Cell*. V. 18. P. 1101. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90223-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90223-x)
- Cullen C.F., Brittle A.L., Ito T., Ohkura H.* 2005. The conserved kinase NHK-1 is essential for mitotic progression and unifying acentrosomal meiotic spindles in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* V. 171. P. 593. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508127>
- De La Fuente R., Viveiros M.M., Burns K.H., Adashi E.Y., Matzuk M.M., Eppig J.J.* 2004. Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev. Biol.* V. 275. P. 447. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.028>
- Dumont J.N.* 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* V. 136. P. 153. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051360203>
- Dunkley S., Scheffler K., Mogessie B.* 2022. Cytoskeletal form and function in mammalian oocytes and zygotes. *Curr. Opin. Cell Biol.* V. 75. 102073. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2022.02.007>
- Duryee W.R.* 1950. Chromosomal physiology in relation to nuclear structure. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* V. 50. P. 920. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1950.tb39892.x>
- Engelhardt P., Plagens U., Zbarsky I.B., Filatova L.S.* 1982. Granules 25–30 nm in diameter: basic constituent of the nuclear matrix, chromosome scaffold, and nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 79. P. 6937. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.22.6937>
- Fil A.* 1974. Structural and functional modifications of the nucleus during oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Cell Sci.* V. 14. P. 51. <https://doi.org/10.1242/jcs.14.1.51>
- Fil A.* 1976. Polycomplexes and intranuclear annulate lamellae in mosquito oocytes. *Hereditas*. V. 84. P. 117. <https://doi.org/10.1111/J.1601-5223.1976.TB01200.X>
- Fil A., Moens P.* 1973. The development structure and function of modified synaptonemal complexes in mosquito oocytes. *Chromosoma*. V. 41. P. 37. <https://doi.org/10.1007/BF00284073>
- Flora P., McCarthy A., Upadhyay M., Rangan P.* 2017. Role of chromatin modifications in *Drosophila* germline stem cell differentiation. *Results Probl. Cell Differ.* V. 59. P. 1. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44820-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44820-6_1)
- Foisner R.* 2003. Cell cycle dynamics of the nuclear envelope. *Scientific World Journal*. V. 3. 450586. <https://doi.org/10.1100/tsw.2003.06>
- Fulka J.J., Benc M., Loi P., Langerova A., Fulka H.* 2019. Function of atypical mammalian oocyte/zygote nucleoli and its implications for reproductive biology and medicine. *Int. J. Dev. Biol.* V. 63. P. 105. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180329jf>
- Gaginskaya E., Kulikova T., Krasikova A.* 2009. Avian lampbrush chromosomes: a powerful tool for exploration of genome expression. *Cytogenet. Genome Res.* V. 124. P. 251. <https://doi.org/10.1159/000218130>
- Gall J.G.* 2006. Exporting actin. *Nat. Cell Biol.* V. 8. P. 205. <https://doi.org/10.1038/ncb0306-205>
- Gall J.G., Stephenson E.C., Erba H.P., Diaz M.O., Barsacchi-Pilone G.* 1981. Histone genes are located at the sphere loci of newt lampbrush chromosomes. *Chromosoma*. V. 84. P. 159. <https://doi.org/10.1007/BF00399128>
- Gall J.G., Tsvetkov A., Wu Z., Murphy C.* 1995. Is the sphere organelle/coiled body a universal nuclear component? *Dev. Genet.* V. 16. P. 25. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020160107>
- Gruzova M.N.* 1988. The nucleus during oogenesis with special reference to extrachromosomal structures. In *Oocyte Growth and Maturation*. N.Y.: Consultants Bureau. P. 77.

- Gruzova M.N., Parfenov V.N. 1977. Ultrastructure of late oocyte nuclei in *Rana temporaria*. J. Cell Sci. V. 28. P. 1. <https://doi.org/10.1242/jcs.28.1.1>
- Gruzova M.N., Parfenov V.N. 1993. Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis. Int. Rev. Cytol. V. 144. P. 1. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61512-0](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61512-0)
- Gruzova M.N., Parfyonov V.N. 1973. The karyosphere in late oogenesis of frogs. Monit. Zool. Ital. V. 7. P. 225. <https://doi.org/10.1080/00269786.1973.10736215>
- Hampoelz B., Schwarz A., Ronchi P., Bragulat-Teixidor H., Tischer C., Gaspar I., Ephrussi A., Schwab Y., Beck M. 2019. Nuclear pores assemble from nucleoporin condensates during oogenesis. Cell. V. 179. P. 671.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.022>
- Hyrskyluoto A., Vartiainen M.K. 2020. Regulation of nuclear actin dynamics in development and disease. Curr. Opin. Cell Biol. V. 64. P. 18. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.01.012>
- Ilicheva N., Podgornaya O., Bogolyubov D., Pochukalina G. 2018. The karyosphere capsule in *Rana temporaria* oocytes contains structural and DNA-binding proteins. Nucleus. V. 9. P. 516. <https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1530935>
- Ilicheva N.V., Pochukalina G.N., Podgornaya O.I. 2019. Actin depolymerization disrupts karyosphere capsule integrity but not residual transcription in late oocytes of the grass frog *Rana temporaria*. J. Cell. Biochem. V. 120. P. 15057. <https://doi.org/10.1002/jcb.28767>
- 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. Gen. Dev. V. 19. P. 2571. <https://doi.org/10.1101/gad.1348905>
- Jamin A., Wiebe M.S. 2015. Barrier to Autointegration Factor (BANF1): interwoven roles in nuclear structure, genome integrity, innate immunity, stress responses and progeria. Curr. Opin. Cell Biol. V. 34. P. 61. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.05.006>
- Kenny A., Morgan M.B., Mohr S., Macdonald P.M. 2021. Knock down analysis reveals critical phases for specific *oskar* non-coding RNA functions during *Drosophila* oogenesis. G3 (Bethesda). V. 11. jkab340. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab340>
- 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. V. 117. P. 2481. <https://doi.org/10.1242/jcs.01098>
- Kloc M., Chanana P., Vaughn N., Usef A., Kubiak J.Z., Ghobrial R.M. 2021. New insights into cellular functions of nuclear actin. Biology (Basel). V. 10. 304. <https://doi.org/10.3390/biology10040304>
- Konishi H.A., Yoshimura S.H. 2020. Interactions between non-structured domains of FG- and non-FG-nucleoporins coordinate the ordered assembly of the nuclear pore complex in mitosis. FASEB J. V. 34. P. 1532. <https://doi.org/10.1096/fj.201901669R2020>
- Krasikova A., Kulikova T., Saifitdinova A., Derjusheva S., Gaginskaya E. 2004. Centromeric protein bodies on avian lampbrush chromosomes contain a protein detectable with an antibody against DNA topoisomerase II. Chromosoma. V. 113. P. 316. <https://doi.org/10.1007/s00412-004-0321-5>
- Kyheröinen S., Vartiainen M.K. 2020. Nuclear actin dynamics in gene expression and genome organization. Semin. Cell Dev. Biol. V. 102. P. 105. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.10.012>
- Labade A.S., Karmodiya K., Sengupta K. 2016. HOXA repression is mediated by nucleoporin Nup93 assisted by its interactors Nup188 and Nup205. Epigenetics Chromatin. V. 9. 54. <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0106-0>
- Lamm N., Read M.N., Nobis M., Van Ly D., Page S.G., Masamsetti V.P., Timpson P., Biro M., Cesare A.J. 2020. Nuclear F-actin counteracts nuclear deformation and promotes fork repair during replication stress. Nat. Cell Biol. V. 22. P. 1460. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00605-6>
- 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. V. 179. P. 817. <https://doi.org/10.1083/jcb.200706067>
- Lancaster O.M., Breuer M., Cullen C.F., Ito T., Ohkura H. 2010. The meiotic recombination checkpoint suppresses NHK-1 kinase to prevent reorganization of the oocyte nucleus in *Drosophila*. PLoS Genet. V. 6. e1001179. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001179>
- Maslova A., Krasikova A. 2012. Nuclear actin depolymerization in transcriptionally active avian and amphibian oocytes leads to collapse of intranuclear structures. Nucleus. V. 3. P. 300. <https://doi.org/10.4161/nucl.20393>
- Morris J.Z., Navarro C., Lehmann R. 2003. Identification and analysis of mutations in *bob*, *Doa* and eight new genes required for oocyte specification and development in *Drosophila melanogaster*. Genetics. V. 164. P. 1435. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1435>
- Nag N., Sasidharan S., Uversky V.N., Saudagar P., Tripathi T. 2022. Phase separation of FG-nucleoporins in nuclear pore complexes. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res. V. 1869. 119205. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119205>
- Nizami Z., Deryusheva S., Gall J.G. 2010. The Cajal body and histone locus body. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. V. 2. a000653. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000653>
- Parfenov V.N. 1979. The karyosphere during late oogenesis in *Rana ridibunda*. Eur. J. Cell Biol. V. 19. P. 102.
- Parfenov V., 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. V. 22. P. 219. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120220209>
- 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.* V. 217. P. 385.  
<https://doi.org/10.1006/excr.1995.1101>
- Pederson T.* 2008. As functional nuclear actin comes into view, is it globular, filamentous, or both? *J. Cell Biol.* V. 180. P. 1061.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200709082>
- Pederson T., Aebi U.* 2002. Actin in the nucleus: what form and what for? *J. Struct. Biol.* V. 140. P. 3.  
[https://doi.org/10.1016/s1047-8477\(02\)00528-2](https://doi.org/10.1016/s1047-8477(02)00528-2)
- Pederson T., Aebi U.* 2005. Nuclear actin extends, with no contraction in sight. *Mol. Biol. Cell.* V. 16. P. 5055.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.e05-07-0656>
- Podgornaya O.I., Bugaeva E.A., Voronin A.P., Gilson E., Mitchell A.R.* 2000. Nuclear envelope associated protein that binds telomeric DNAs. *Mol. Reprod. Dev.* V. 57. P. 16.  
[https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200009\)57:1<16::AID-MRD4>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200009)57:1<16::AID-MRD4>3.0.CO;2-8)
- Razin S.V., Iarovaia O.V., Vassetzky Y.S.* 2014. A requiem to the nuclear matrix: from a controversial concept to 3D organization of the nucleus. *Chromosoma.* V. 123. P. 217.  
<https://doi.org/10.1007/s00412-014-0459-8>
- Ródenas E., Klerkx E.P.F., Ayuso C., Audhya A., Askjaer P.* 2009. Early embryonic requirement for nucleoporin Nup35/NPP-19 in nuclear assembly. *Dev. Biol.* V. 327. P. 399.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.12.024>
- Rübsam R., Büning J.* 2001. F-actin is a component of the karyosome in neuropteran oocyte nuclei. *Arthropod Struct. Dev.* V. 30. P. 125.  
[https://doi.org/10.1016/s1467-8039\(01\)00026-3](https://doi.org/10.1016/s1467-8039(01)00026-3)
- Schultze O.* 1887. Untersuchungen über die Reifung und Befruchtung des Amphibieneies. *Z. Wiss. Zool.* Bd. 45. S. 177.
- Segura-Totten M., Wilson K.L.* 2004. BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol.* V. 14. P. 261.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.03.004>
- Singh A., Dutta D., Paul M.S., Verma D., Mutsuddi M., Mukherjee A.* 2018. Pleiotropic functions of the chromodomain-containing protein Hat-trick during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *G3 (Bethesda).* V. 8. P. 1067.  
<https://doi.org/10.1534/g3.117.300526>
- Stüven T., Hartmann E., Görlich D.* 2003. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin-actin complexes. *EMBO J.* V. 22. P. 5928.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg565>
- Świątek P.* 1999. Formation of the karyosome in developing oocytes of weevils (Coleoptera, Curculionidae). *Tissue Cell.* V. 31. P. 587.  
<https://doi.org/10.1054/tice.1999.0073>
- Takeo S., Lake C.M., Morais-de-Sá E., Sunkel C.E., Hawley R.S.* 2011. Synaptonemal complex-dependent centromeric clustering and the initiation of synapsis in *Drosophila* oocytes. *Curr. Biol.* V. 21. P. 1845.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.044>
- Ulferts S., Prajapati B., Grosse R., Vartiainen M.K.* 2021. Emerging properties and functions of actin and actin filaments inside the nucleus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 13. a040121.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040121>
- Visa N., Percipalle P.* 2010. Nuclear functions of actin. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 2. a000620.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000620>
- Wagner K.* 1923. Über die Entwicklung des Froscheies. *Arch. Zellforsch.* Bd. 17. S. 1.
- Wallace R.A., Jared D.W., Dumont J.N., Sega M.W.* 1973. Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. III. Optimum incubation conditions. *J. Exp. Zool.* V. 184. P. 321.  
<https://doi.org/10.1002/jez.1401840305>

## Karyosphere Capsule in Oocytes of the Grass Frog: To Be or not to Be? A Critical View

D. S. Bogolyubov<sup>a, \*</sup>, A. O. Travina<sup>a</sup>, and I. O. Bogolyubova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

*\*e-mail: dbogol@mail.ru*

The karyosphere (karyosome) is a meiosis-specific and evolutionarily conserved structure that represents condensed bivalents assembled together in a limited volume of the large nucleus at the diplotene stage of meiotic prophase. In some organisms, the karyosphere is additionally separated from the rest of the nucleoplasm by a suprastructural extrachromosomal compartment called the karyosphere capsule (KC). It is traditionally assumed that the KC is a specialized element of the oocyte nucleus (germinal vesicle, GV), which supports the karyosphere due to the presence of structural proteins, especially filamentous actin (F-actin). We present here new insights into the KC previously thought to form in the GV of the European common (grass) frog *Rana temporaria*. The *R. temporaria* karyosphere is a simple knot of chromosomes (karyosome). The *R. temporaria* GV is highly enriched in F-actin filaments, which form a global meshwork in the nucleus but are not concentrated in a special zone (capsule) around condensed chromosomes. In this respect, the structure of the *R. temporaria* GV does not differ significantly from that in *Xenopus laevis*, in which the karyosphere and, accordingly, its capsule are not expressed. The membraneless strands (formerly called “pseudomembranes”), typical for the *R. temporaria* GV, and the so-called “annuli”, thought to represent autonomous pore complexes, are readily identified. However, the annuli were not found to contain nucleoporin 35 (Nup35) and therefore, in our opinion, cannot be regarded to as counterparts of the nuclear pore complexes. The electron-dense strands linking the “annuli” contain neither F-actin nor lamin B and do not form a continuous cover sheath around the karyosphere. The structural proteins such as lamins enrich the nucleoplasm and also appear in

local electron-dense clumps that apparently represent specific biomolecular condensates of polymeric molecules—proteins and perhaps RNAs. A fibrous scaffold for the karyosphere is therefore absent in the *R. temporaria* GV. For comparison, we used material of the KC of the beetle *Tribolium castaneum*, in which a stable and extensive layer (frame or shell) consisting of F-actin does exist. We believe that the structural significance of KC in the *R. temporaria* GV is somewhat exaggerated. However, the *R. temporaria* karyosphere is submerged in a large assemblage consisting of hundreds of free amplified nucleoli, which resembles formation of a KC. This nucleolar assemblage with chromosomes inside is rather stable and can be easily isolated under a conventional binocular microscope. Since the nucleoli are separate liquid droplets, they cannot be considered as structures forming a typical KC, which by definition is a fibrous structure. A similar situation is also characteristic of the GV of the beetle *Tenebrio molitor*, in which the nucleoli are absent, but the karyosome can be located inside a special fibrogranular material lacking F-actin.

**Keywords:** nuclear compartments, karyosphere, karyosphere capsule, karyosome, nuclear F-actin, electron microscopy, oocyte nucleus, germinal vesicle, *Rana temporaria*