

На правах рукописи

**Боголюбов  
Дмитрий Сергеевич**

**Морфофункциональная компартиментализация  
ядра ооцитов беспозвоночных**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Санкт-Петербург — 2008

**Работа выполнена в Лаборатории морфологии клетки Института цитологии РАН,  
Санкт-Петербург**

**Научный консультант:** доктор биологических наук, профессор  
**Парфенов Владимир Николаевич**  
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Гагинская Елена Романовна**  
Санкт-Петербургский государственный университет

доктор биологических наук  
**Кузнецова Татьяна Владимировна**  
Институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН,  
Санкт-Петербург

доктор биологических наук  
**Зайцева Ольга Викторовна**  
Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург

**Ведущая организация:** ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Защита состоится «31» октября 2008 года в 14 час на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4,.

Сайт института: [www.cytspb.rssi.ru](http://www.cytspb.rssi.ru)

Адрес электронной почты института: [cellbio@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:cellbio@mail.cytspb.rssi.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2008 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Е. В. Каминская

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы.** Ядро эукариотической клетки – сложная, высоко структурированная и динамичная система, важнейшая функция которой состоит в осуществлении и регуляции экспрессии генов: транскрипции, созревания и транспорта РНК. В настоящее время установлено, что на регуляцию экспрессии генов и координацию составляющих ее многостадийных событий наряду с особенностями упаковки генетического материала в хроматине, специфической позицией в ядре собственно хромосом оказывают влияние и высокоорганизованные структуры нуклеоплазмы – экстрахромосомные ядерные домены (Misteli, Spector, 1998; Misteli, 2007).

Эти ядерные домены, или компартменты, представленные различными ядерными тельцами, – динамичные образования, имеющие сложную организацию и молекулярный состав, которые меняются в ответ на клеточные сигналы и изменение активности ядра в тех или иных условиях. Они в высокой степени обогащены ведущими молекулярными компонентами экспрессии генов и принимают непосредственное участие в их метаболизме.

Основные концепции теории функциональной компартиментализации клеточного ядра, сформулированной в начале 1990-х годов, к настоящему времени сложились в результате изучения ядер культивируемых соматических клеток млекопитающих (Spector, 1993, 1996; Lamond, Earnshaw, 1998; Matera, 1999; Dundr, Misteli, 2001). Насколько эти концепции являются всеобщими и распространяются на клетки различного происхождения, а также насколько консервативны ведущие ядерные домены – тельца Кахала (ТК) (Gall, 2000; Cioce, Lamond, 2005) и кластеры интерхроматиновых гранул (КИГ) (Lamond, Spector, 2003) – можно определить только путем сравнительного анализа. В этом отношении уникальную и весьма перспективную модельную систему представляют собой ооциты беспозвоночных животных, характеризующихся в разных филогенетических группах широким спектром особенностей организации и состава их ядерных экстрахромосомных доменов.

Перспективность ооцитов как модельных систем для исследований структуры, функций, динамики поведения и молекулярного состава компонентов клеточного ядра усиливается благодаря уникальному функциональному значению этих клеток, поскольку именно в оогенезе происходит накопление значительной морфогенетической информации и

макромолекул, необходимых для будущего зародыша, формируется белоксинтезирующая система, функционирующая на ранних стадиях эмбриогенеза, создается ооплазматическая сегрегация, лежащая в основе первичной дифференцировки клеток.

При всем многообразии типов оогенеза и особенно тех сложных пространственно-гистологических отношений, в которые вступает развивающийся ооцит с окружающими клетками и тканями гонады, существует два типа ооцитов (Гагинская, 1975). Они отчетливо выражены в оогенезе беспозвоночных, особенно у насекомых. В первом случае ооцит развивается при отсутствии питающих клеток (автотрофный оогенез), а его ядро остается активным в течение продолжительного времени. Во втором случае (гетеротрофный оогенез) основная РНК-синтетическая нагрузка ложится на ядра специализированных питающих клеток, или трофоцитов, а ядро ооцита в той или иной степени инактивируется. При этом в нем формируется кариосфера – особая структура, образованная конденсированными хромосомами и экстрахромосомным материалом (Gruzova, Parfenov, 1993).

Встает вопрос, в какой степени при разных типах оогенеза будет различаться состав и строение экстрахромосомных ядерных доменов, а также характер их ассоциации с хромосомным аппаратом и ведущими компонентами экспрессии генов: РНК-полимеразой II, базальными факторами и коактиваторами транскрипции, а также факторами процессинга разных типов РНК, включая факторы сплайсинга пре-мРНК.

До начала наших исследований такие данные практически не были представлены в литературе. Ничего не было известно и о характере морфодинамики экстрахромосомных ядерных доменов ооцитов беспозвоночных, о том, меняется ли их молекулярный состав на разных стадиях оогенеза и как события, связанные с формированием кариосферы в оогенезе, скоординированы с поведением экстрахромосомных ядерных структур.

В ходе выполнения данной работы требовалось проверить наши рабочие гипотезы: а) о присутствии ТК и КИГ в ооцитах животных с различными типами оогенеза вне зависимости от активности ядер ооцитов; б) о возможном существовании единых принципов организации и функционального сходства универсальных ядерных доменов – ТК и КИГ у животных с солитарным и фолликулярным (автотрофным) оогенезом и у видов с нутриментарным (гетеротрофным) оогенезом на активных стадиях, т.е. до формирования в ядрах кариосферы. Требовал также доказательства известный постулат об

инактивации хромосом ооцита, собранных в кариосферу (Gruzova, Parfenov, 1993).

**Цель и задачи исследования.** Основная цель работы заключалась в сравнительном исследовании структурно-функциональной организации ядерных доменов ооцитов у ряда беспозвоночных животных, обладающих разными типами оогенеза; специальное внимание было уделено параллельному анализу поведения хромосомного аппарата, строения кариосферы и динамики взаимоотношений двух ведущих экстрахромосомных доменов – телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул.

Конкретные задачи работы состояли в следующем.

1. Идентифицировать в ядрах ооцитов беспозвоночных тельца Кахала и кластеры интерхроматиновых гранул, выявить их структурные и молекулярные особенности и провести сравнение этих доменов с тельцами Кахала и кластерами интерхроматиновых гранул соматических клеток млекопитающих, которые были приняты за определенный «эталон».

2. В ядрах ооцитов у ряда беспозвоночных исследовать структурно-композиционные характеристики уникальных комплексов, тесно объединяющих компоненты телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул в составе единых структур.

3. С помощью комплексного подхода (электронная микроскопия, флуоресцентная и ультраструктурная иммуноцитохимия, микроинъекции) локализовать ряд ведущих компонентов экспрессии генов, характеризующих тельца Кахала и кластеры интерхроматиновых гранул, в ядрах ооцитов животных, обладающих разными типами оогенеза: автотрофным (активно ядро самого ооцита) и гетеротрофным (РНК поступает в ооплазму из питающих клеток).

4. Подтвердить существование поэтапной инактивации хромосомного аппарата ооцитов в ходе развития кариосферы при гетеротрофном (нутриментарном) типе оогенеза с помощью микроинъекций в ооциты предшественника синтеза РНК (бромоеуридинтрифосфата). Исследовать ультраструктуру кариосферы, выявить особенности ее строения у разных видов, проследить ее морфодинамику и вскрыть особенности молекулярного состава экстрахромосомного материала кариосферы.

5. Проверить гипотезу об отсутствии синтеза рибосомной РНК и ядрышек в ооцитах некоторых животных при нутриментарном оогенезе с использованием для этого гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*.

6. В условиях инактивации ядер ооцитов (в естественных условиях и при действии ингибиторов транскрипции) изучить связь с ядерными структурами ряда ведущих компонентов экспрессии генов, включая компоненты голоэнзима РНК-полимеразы II, белков-коактиваторов транскрипции и факторов сплайсинга пре-мРНК.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Ядра ооцитов, развивающихся при отсутствии в гонаде питающих клеток (автотрофный оогенез), сохраняют свою транскрипционную активность в ходе роста ооцита. При наличии питающих клеток (гетеротрофный оогенез) в ядрах ооцитов формируется кариосфера, а хромосомы при этом постепенно инактивируются.

2. В ядрах ооцитов, развивающихся по гетеротрофному типу, могут не синтезироваться рибосомные РНК и, соответственно, отсутствовать ядрышки.

3. Независимо от типа оогенеза и, соответственно, от функционального статуса ядер ооцитов в них присутствуют универсальные и эволюционно консервативные ядерные домены, содержащие ведущие компоненты экспрессии генов, – тельца Кахала и кластеры интерхроматиновых гранул, ультраструктурная организация которых отличается от таковой в соматических клетках млекопитающих.

4. У беспозвоночных животных тельца Кахала и кластеры интерхроматиновых гранул могут объединяться в единые комплексы, сочетающие компоненты этих двух доменов с различной степенью их морфологической обособленности.

**Научная новизна работы.** Данная работа представляет собой первое комплексное исследование ядерных доменов ооцитов беспозвоночных, выполненное на широком круге объектов с применением современных цитоморфологических методик. Впервые обоснована необходимость комплексного подхода для идентификации различных экстрахромосомных образований ооцитов, прежде всего кластеров интерхроматиновых гранул и телец Кахала.

На материале ооцитов беспозвоночных впервые были получены прямые доказательства инактивации хромосомного аппарата ооцитов, растущих по гетеротрофному (нутриментарному) типу, на завершающих стадиях развития в их ядрах кариосферы, а также сохранения транскрипционной активности ядер ооцитов, развивающихся по автотрофному типу. Впервые получены сведения о

функциональном состоянии ядер в оогенезе низших Bilateria – ресничных червей.

Благодаря использованию в работе видов беспозвоночных, далеко отстоящих друг от друга в филогенетическом отношении, с привлечением обширных данных литературы по соматическим клеткам млекопитающих впервые подтверждена концепция универсальности и эволюционной консервативности кластеров интерхроматиновых гранул и телец Кахала. При этом показано, что присутствие этих ядерных доменов не зависит от транскрипционной активности ядер ооцитов.

Впервые в ооцитах беспозвоночных выявлена тенденция к объединению телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул в единые комплексы вплоть до потери морфологической обособленности входящих в их состав соответствующих субкомпартов.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Работа имеет фундаментальную направленность. Ее результаты важны в первую очередь для понимания структуры и функций ядерных компартов, поскольку создают научно-теоретический базис и открывают перспективы их дальнейшего исследования в контексте функционирования в трехмерном пространстве клеточного ядра.

В представленной работе была продемонстрирована плодотворность использования модельных систем «ооциты беспозвоночных с разными типами оогенеза» для изучения трансформации ядерных структур. Данная модель может быть рекомендована для углубленного изучения ряда проблем функциональной морфологии клеточного ядра. В условиях выявленных в работе существенных различий в функциональном статусе ядер ооцитов, развивающихся по автотрофному и гетеротрофному типам, она может быть полезной для дальнейшего исследования структурно-функциональных взаимоотношений различных экстрахромосомных ядерных доменов, динамики их молекулярного состава в различных активных и неактивных клеточных системах.

Результаты работы используются при чтении специальных курсов лекций для студентов Санкт-Петербургского государственного технического университета. Они могут быть использованы в курсах лекций по частным разделам биологии развития и клеточной биологии при подготовке специалистов в других высших учебных заведениях биологического профиля и включены в руководства и учебные пособия по данным специальностям.

**Апробация работы.** Основные положения работы были доложены и обсуждены на Всесоюзной конференции «Функциональная морфология клетки» (С.-Петербург, 1991), XI, XII, XIII, XIV и XV Всероссийских симпозиумах «Структура и функция клеточного ядра» (С.-Петербург, 1993, 1997, 1999, 2002, 2005), 14-м Международном совещании по клеточному ядру (Спа, Бельгия, 1995), 20-м Международном конгрессе по энтомологии (Флоренция, Италия, 1996), 6-м Европейском конгрессе по энтомологии (Ческе Будейовицы, Чехия, 1998), школе-конференции «Горизонты физико-химической биологии» (Пушино, 2000), 7-м Европейском конгрессе по энтомологии (Салоники, Греция, 2002), 2-м Международном совещании им. Л. Эйлера (С.-Петербург, 2003), 1-м Международном симпозиуме «Яичники, оогенез и филогения насекомых» (Затварница, Польша, 2003), I и II Всероссийских съездах Общества клеточной биологии (С.-Петербург, 2003, 2007), конгрессе ELSO (Ницца, Франция, 2004), XIV школе-конференции «Актуальные проблемы биологии развития и биотехнологии» (Звенигород, 2005), научных семинарах Зоологического института при Вроцлавском университете (Вроцлав, Польша, 2005) и Лаборатории морфологии клетки Института цитологии РАН.

**Финансовая поддержка работы.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты 97-04-48895, 97-04-96218, 00-04-49121, 03-04-49389, 04-04-48080, 06-04-48904), Государственной стипендии для молодых ученых (1996, 2000), Фонда содействия отечественной науке, программы «Ведущие научные школы РФ» (НШ-1125.2006.4) и Администрации Санкт-Петербурга.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 46 работ в отечественных и международных научных изданиях, из них статей – 25, тезисов докладов – 21.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, посвященного проблеме структурно-функциональной компартментализации ядра эукариотических клеток, описания материалов и методов исследования, главы «Результаты и обсуждение», объединяющей три подглавы, в которых приводится изложение экспериментальных данных с их обсуждением, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (наименования). Работа изложена на \_\_\_\_\_ страницах машинописного текста и содержит 108 иллюстраций и 4 таблицы.

## КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основная часть исследований проведена на ядрах ооцитов следующих видов животных: ресничных червей *Geocentrophora baltica*, *G. sphyrocephala* (европейские виды), *G. incognita*, *G. interstitialis*, *G. porfirievae*, *G. wagini*, *G. wasiliewi* (эндемики оз. Байкал) (Plathelminthes-Turbellaria: Lecithoepitheliata, Prorhynchidae), моллюска *Achatina fulica* (Gastropoda-Pulmonata: Stylommatophora, Achatinidae), насекомых *Acheta domesticus* (Orthoptera, Gryllidae), *Panorpa communis* (Mecoptera, Panorpidae), *Sarcophaga* sp. (Diptera, Sarcophagidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera-Polyphaga, Tenebrionidae), *Notostira elongata*, *Capsodes gothicus* (Hemiptera, Miridae), *Velia caprai* (Hemiptera, Veliidae) и паука *Araneus diadematus* (Aranei, Araneidae).

Более подробная характеристика объектов исследования, способов изоляции гонад, ооцитов, их ядер, методик фиксации и подготовки материала для светооптических и электронно-микроскопических исследований и ссылки на первоисточники приведены в статьях из списка работ, опубликованных по теме диссертации.

Распределение в ядре ооцитов специфических антигенов изучали с помощью непрямой иммунофлуоресцентной (в том числе конфокальной) и иммуноэлектронной микроскопии с использованием набора различных антител к ДНК, факторам сплайсинга пре-мРНК (мяРП и SR-белку SC35), РНК-полимеразе II, коилину, фибрилларину, базальному фактору транскрипции TFIIID и белкам-коактиваторам транскрипции СВР/p300. В иммуноцитохимических опытах широко применяли двойное иммуномечение на светооптическом и ультраструктурном уровнях. В некоторых случаях для сравнения интенсивности мечения ядерных структур, выявляемого с помощью иммуноэлектронной микроскопии, использовали статистическую обработку данных.

Для изучения возможных связей с ядерными структурами экзогенных маркеров использовали микроинъекции в ооциты флуоресцентно меченной U7 мяРНК и синтезированной *in vitro* мРНК тус-коилина.

Микроинъекции на разных стадиях роста ооцита применяли также для исследования динамики включения в ядра 5-бромουридин-5'-трифосфата как предшественника синтеза РНК. Общую РНК-синтетическую активность ядер ооцитов также качественно оценивали с помощью светооптической <sup>3</sup>H-уридиновой автордиографии. Для изучения рРНК-синтетической активности

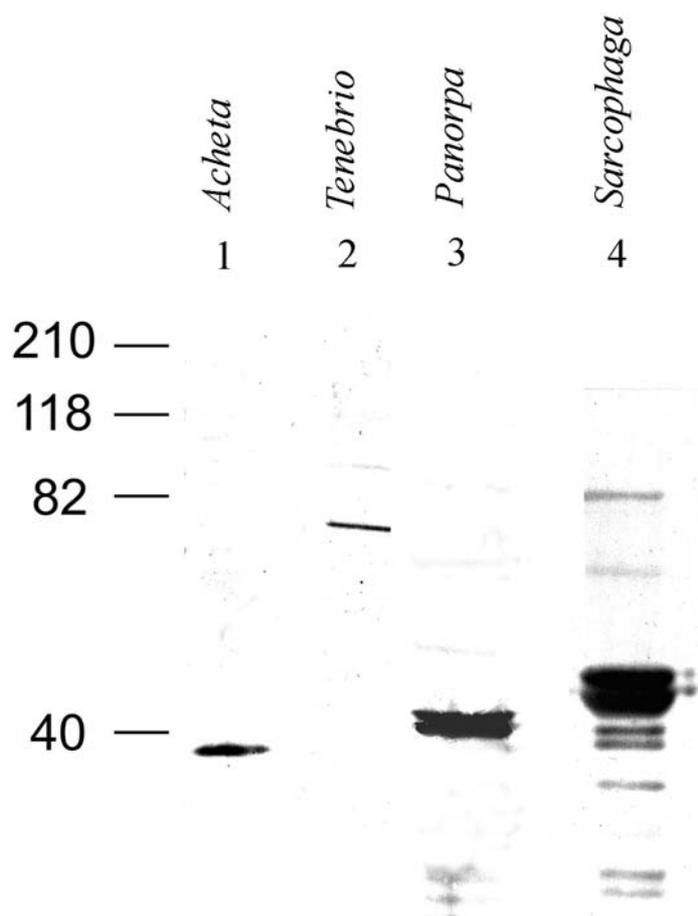
ядер ооцитов применяли РНК-РНК гибридизацию *in situ* с использованием радиоактивных или биотинилированных рРНК-зондов. Для подавления транскрипции в ядрах ооцитов использовали актиномицин D или DRB.

С целью проверки специфичности работы на материале беспозвоночных поликлональной сыворотки к коилину р80 человека использовали электрофоретическое разделение белков лизатов овариол насекомых или белков изолированных вручную ядер ооцитов с последующим иммуноблотингом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Коилин – маркерный белок тельца Кахала ооцитов беспозвоночных

Поскольку в нашей работе в качестве одного из критериев, по которому те или иные ядерные структуры были идентифицированы как тельца Кахала



**Рис. 1.** Иммуноблотинг белков ядер ооцитов (1, 2) и овариол (3, 4) с антителами к коилину.

(ТК), рассматривали их способность связываться с антителами к маркерному белку коилину (Andrade et al., 1991; Raška et al., 1991), необходимо было убедиться, что эти антитела, полученные к коилину р80 человека, специфичны также для ооцитов беспозвоночных. Следует отметить, что до сих пор ортологи коилина млекопитающих не были идентифицированы у беспозвоночных животных.

Мы провели анализ с помощью Вестерн-иммуноблотинга белков овариол *Panorpa communis* и *Sarcophaga* sp., а также белков изолированных ядер ооцитов

*Acheta domesticus* и *Tenebrio molitor* (Bogolyubov, Parfenov, 2001; Batalova, Bogolyubov, Parfenov, 2005; Stepanova, Bogolyubov et al., 2007; рис. 1).

Оказалось, что во всех случаях (за исключением *Sarcophaga*) антитела к коилину на блотах выявляют единственную полосу специфического окрашивания. В случае *Sarcophaga* такая реакция была не столь отчетлива, хотя мажорная полоса также присутствовала. Таким образом, хотя использование антител к коилину млекопитающих в иммуноцитохимических опытах на разном материале часто, на наш взгляд, оправдано, оно не может служить единственным подходом для идентификации ТК.

В опытах по иммуноблотингу неожиданно оказалось, что если сыворотка к коилину демонстрирует свою специфичность, то молекулярная масса выявляемых белков насекомых, с одной стороны, оказалась меньше ожидаемой массы коилина р80, которая составляет 80 кДа (Andrade et al., 1991). С другой стороны, она значительно варьировала у разных видов: от ~ 38 кДа у *A. domesticus*, ~ 43 кДа у *P. communis* до ~ 70 кДа у *T. molitor* (рис. 1). Мы предполагаем, что такой разброс может быть объяснен разницей в длине срединного варибельного участка молекулы этого белка при наличии константного консервативного С-концевого фрагмента, ответственного за связывание антител к коилину (Bellini, 2000; Shpargel et al., 2003).

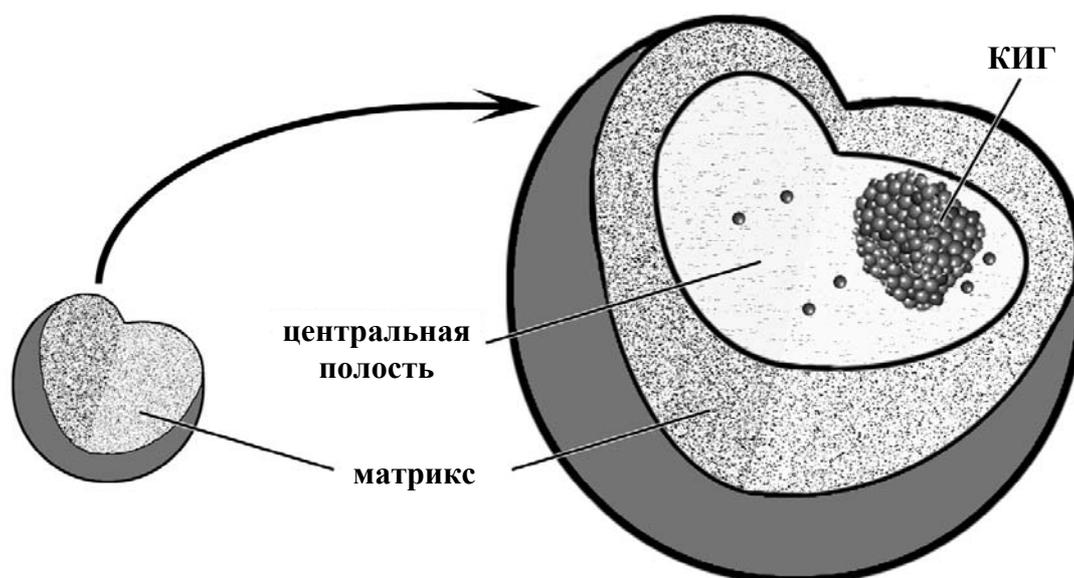
### **Ядро при автотрофном оогенезе**

#### ***Ядерные структуры ооцитов домового сверчка *Acheta domesticus*.***

Ооциты сверчка развиваются в яичниках паноистического типа: в окружении только фолликулярного эпителия, при отсутствии в гонаде питающих клеток. В ядрах молодых ооцитов (ранняя диплотена) хроматин занимает весь объем ядра, образуя интенсивно флуоресцирующую сеть при использовании флуоресцентных красителей к ДНК. На стадии поздней диплотены хромосомы приобретают вид ламповых щеток с короткими латеральными петлями. Ни на одной стадии роста ооцита не наблюдали стягивания хромосом в кариосферу и их конденсации (Степанова, Боголюбов, Парфенов, 2007; Stepanova, Bogolyubov et al., 2007).

С помощью микроинъекций бромоуридинтрифосфата установлено, что синтез РНК в ядрах ооцитов *A. domesticus* продолжается в течение всего периода роста ооцита без сколько-нибудь заметного уменьшения его интенсивности к концу оогенеза (Bogolyubov, 2007). Сигнал преимущественно выявлялся в виде дискретных доменов, что может свидетельствовать об избирательном характере транскрипционной активности различных генных локусов ооцитов *A. domesticus* в течение протяженной диплотены.

Заметная особенность ядер диплотенных ооцитов *A. domesticus* – развитие в них крупной (до 30 мкм в диаметре) экстрахромосомной структуры, которая была ранее идентифицирована как ТК (Gall et al., 1995), что нашло полное подтверждение и в нашей работе (Степанова, Боголюбов, Парфенов, 2007; Stepanova, Bogolyubov et al., 2007). В ядрах ооцитов *A. domesticus* ТК имеют сложную морфодинамику (рис. 2). В ранних превителлогенных ооцитах они относительно многочисленны и имеют однородную тонкофибриллярную ультраструктуру. В период вителлогенеза в ядре сохраняется единственное ТК, которое включает три морфологические части: тонкофибриллярный матрикс (фибриллы 5 нм толщиной), обширную центральную полость и эксцентрично расположенное внутри полости фиброгранулярное тельце; последнее состоит из гранул диаметром 35–45 нм, связанных с тонкофибриллярным материалом.

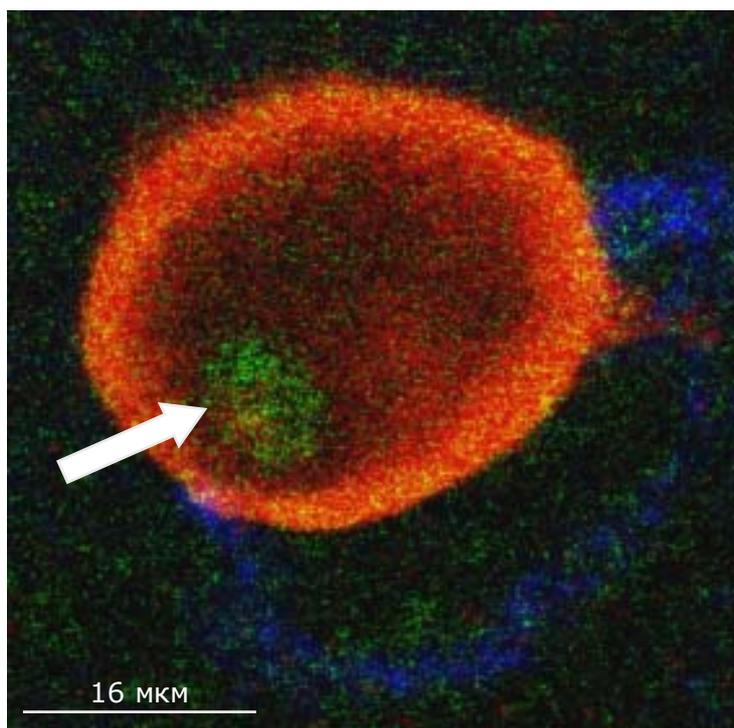


**Рис. 2.** Морфодинамика телец Кахала в ядрах ооцитов *Acheta domesticus*.

Фибриллярный матрикс ТК – единственная структура ядра ооцитов *A. domesticus*, с которой связываются антитела к коилину в иммуноцитохимических опытах, а также U7 мяРНК после микроинъекций последней в ооциты (Stepanova, Bogolyubov et al., 2007). Эта же структура содержит мяРНК с триметилгуанозинным кэпом, коровые Sm-белки мяРНК, а также фибрилларин – мажорный ядрышковый белок, который, однако, был одним из первых белков, идентифицированных в ТК соматических клеток млекопитающих (Raška et al., 1991). Кроме того, в составе матрикса ТК ооцитов *A. domesticus* нами были впервые выявлены белок ТВР, являющийся компонентом базального фактора транскрипции TFIID, и белки-коактиваторы

транскрипции СВР/p300. Однако заметных количеств самой РНК-полимеразы II в ТК ооцитов *A. domesticus* обнаружить не удалось.

Фиброгранулярное тельце, расположенное внутри центральной полости ТК, мы определили как «внутренний» КИГ. Основанием для этого служило не только наличие гранул в его составе (ультраструктурный критерий, как будет показано ниже, не всегда четко применим для идентификации КИГ в ооцитах беспозвоночных), но прежде всего его интенсивная реакция с антителами к факторам сплайсинга: белку SC35 (рис. 3) – маркерному белку КИГ (Spector et al., 1991), а также к мяРНП.



**Рис. 3.** Сложное тельце Кахала вителлогенных ооцитов *Acheta domesticus* после обработки препаратов антителами к белку SC35 (зеленый), коилину (красный) и окрашивания ДНК красителем То-Про-3 (синий). Стрелкой указан внутренний кластер интерхроматиновых гранул.

Структуры, напоминающие «внутренний» КИГ, – «свободные» КИГ – немногочисленны, но тем не менее иногда обнаруживаются в нуклеоплазме ооцитов *A. domesticus*. Их ультраструктура и молекулярный состав по данным иммуноэлектронной микроскопии оказались сходными.

Таким образом, на примере ооцитов *A. domesticus* мы видим возможность объединения ТК и КИГ в единые структуры; при этом в данном случае сохраняется морфологическая обособленность их компонентов вместе с присутствием свободных КИГ в нуклеоплазме. До сих пор подобное явление было известно на примере ооцитов амфибий, у которых сложные ТК состоят из коилин- и U7-содержащего матрикса, с которым связаны КИГ (В-снёрпосомы) различного размера (Wu et al., 1991; Gall et al., 1995, 1999). Однако в ооцитах амфибий КИГ, связанные с ТК, многочисленны, а в ТК отсутствует

центральная полость, характерная для ТК ооцитов сверчка (рис. 4). Есть отличия и по молекулярному составу: в ТК ооцитов амфибий основной компонент матрикса – U7 мяРНК, а мяРНК сплайсинга и белок SC35 сосредоточены в КИГ (Wu et al., 1991; Wu, Gall, 1993); в матриксе ТК ооцитов сверчка локализуется не только U7 мяРНК, но также U1, U2 и U6 мяРНК сплайсинга (Tsvetkov, ... Bogolyubov, Gruzova, 1997).

В нашей работе мы получили данные, уточняющие сделанные ранее наблюдения других авторов (Gall et al., 1995) о распределении маркерного белка КИГ – SC35 – в составе сложных ТК ооцитов *A. domesticus*.

Мы обнаружили, что этот белок не только маркирует внутренний КИГ, но некоторое его количество выявляется и в матриксе ТК. Эти данные были получены в опытах по двойному иммуномечению ТК антителами к коилину и белку SC35 на светооптическом (рис. 3) и ультраструктурном уровнях.

Присутствие белка SC35 в ТК – особенность, по видимому, только ооцитов как позвоночных (Parfenov et al., 2003), так и беспозвоночных животных (Bogolyubov, Parfenov, 2008). В ТК соматических клеток млекопитающих этот белок отсутствует (Raška et al., 1991; Spector et al., 1991).

Подавление транскрипции в ооцитах *A. domesticus* с помощью актиномицина D или DRB приводило к появлению многочисленных свободных КИГ в нуклеоплазме и к существенным структурным перестройкам сложного ТК (Степанова, Боголюбов, Парфенов, 2007; Stepanova, Bogolyubov et al., 2007), заключающимся прежде всего в массивном выходе на поверхность ТК интерхроматиновых гранул в виде сплошного SC35-содержащего гранулярного слоя; при этом  $\alpha$ SC35-сигнал в матриксе ТК исчезал (рис. 5). Действие ингибиторов не влияло на распределение коилина и фибрилларина. РНК-полимераза II по-прежнему не выявлялась в ТК, но обнаруживалась в составе сегрегированных фибриллярных областей КИГ; эти же области накапливали сопутствующие факторы – коактиваторы транскрипции СВР/p300 и белок ТВР – подобно тому, как это происходит в соматических клетках млекопитающих (von Mikecz et al., 2000).

Имея ввиду одну из моделей функционирования ТК, постулированную для ооцитов *Xenopus* (Gall et al., 1999), которая предполагает сборку в матриксе ТК унитарных частиц – транскриптосом, откуда они транспортируются к сайтам транскрипции, осуществляемой соответствующими РНК-полимеразами, мы считаем, что к ооцитам *Acheta* данная модель может быть применима лишь с существенными оговорками. Если ТК ооцитов сверчка участвуют во

внутриядерном распределении некоторых компонентов транскрипции и процессинга РНК, включая белок SC35, то их роль в распределении РНК-полимеразы II, вероятно, менее существенна. Не исключено, что эту функцию принимает на себя особый субкомпаратмент КИГ – их фибриллярные зоны.

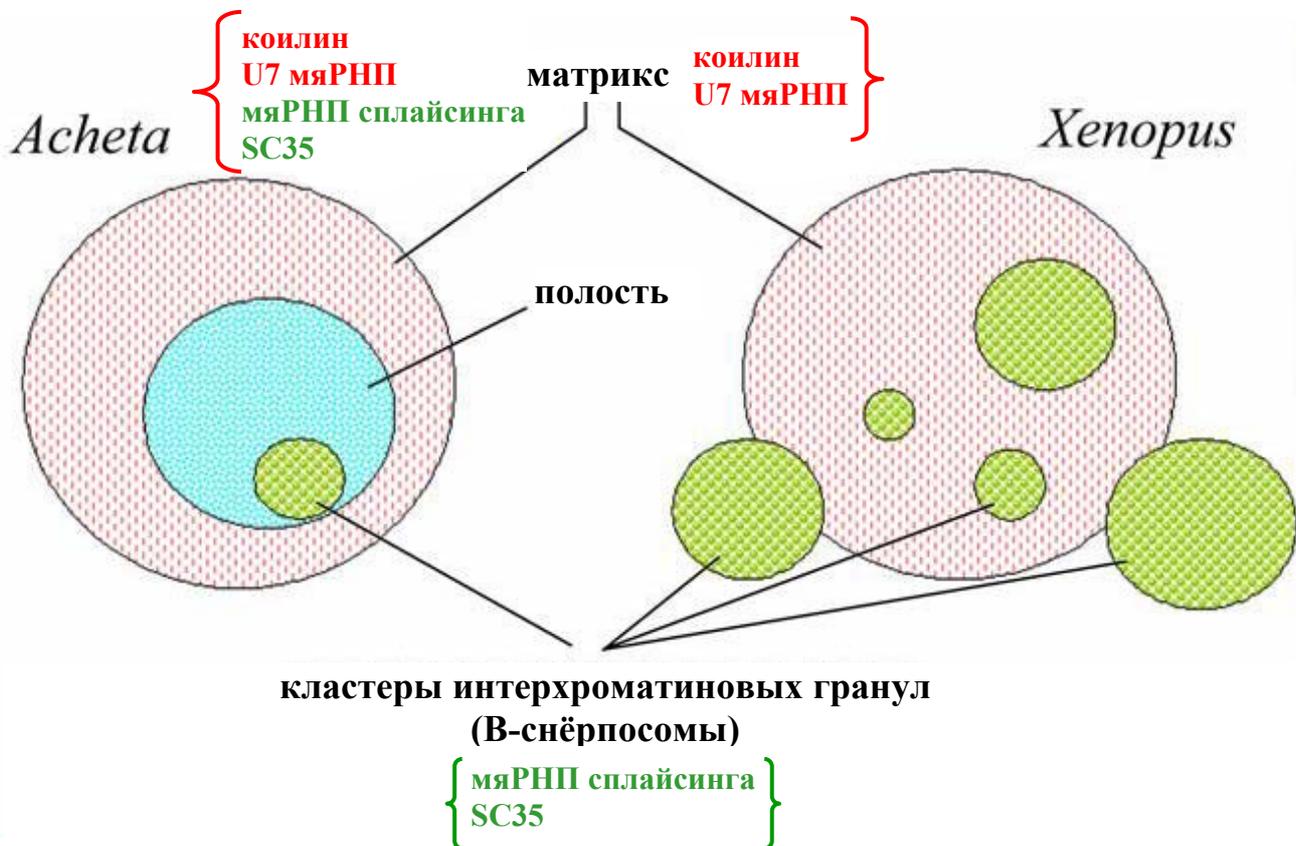


Рис. 4. Схема организации телец Кахала ооцитов *Acheta* и *Xenopus*.

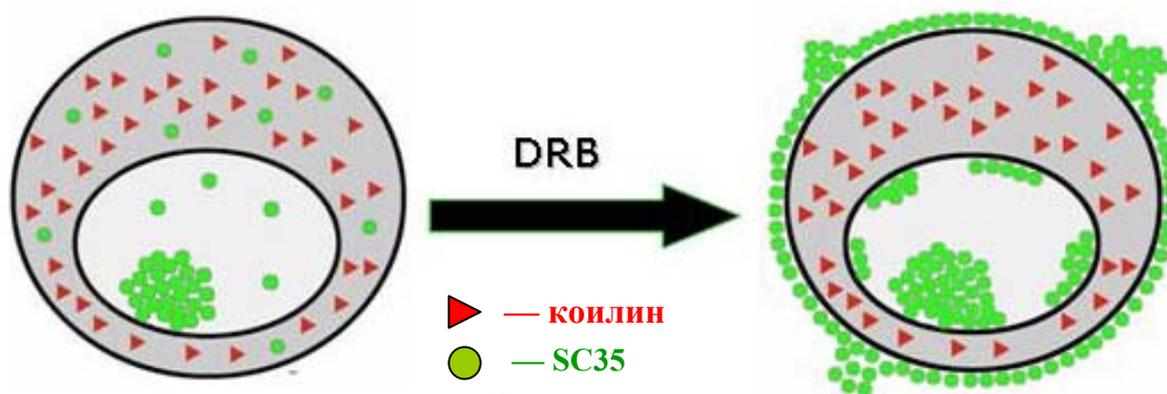
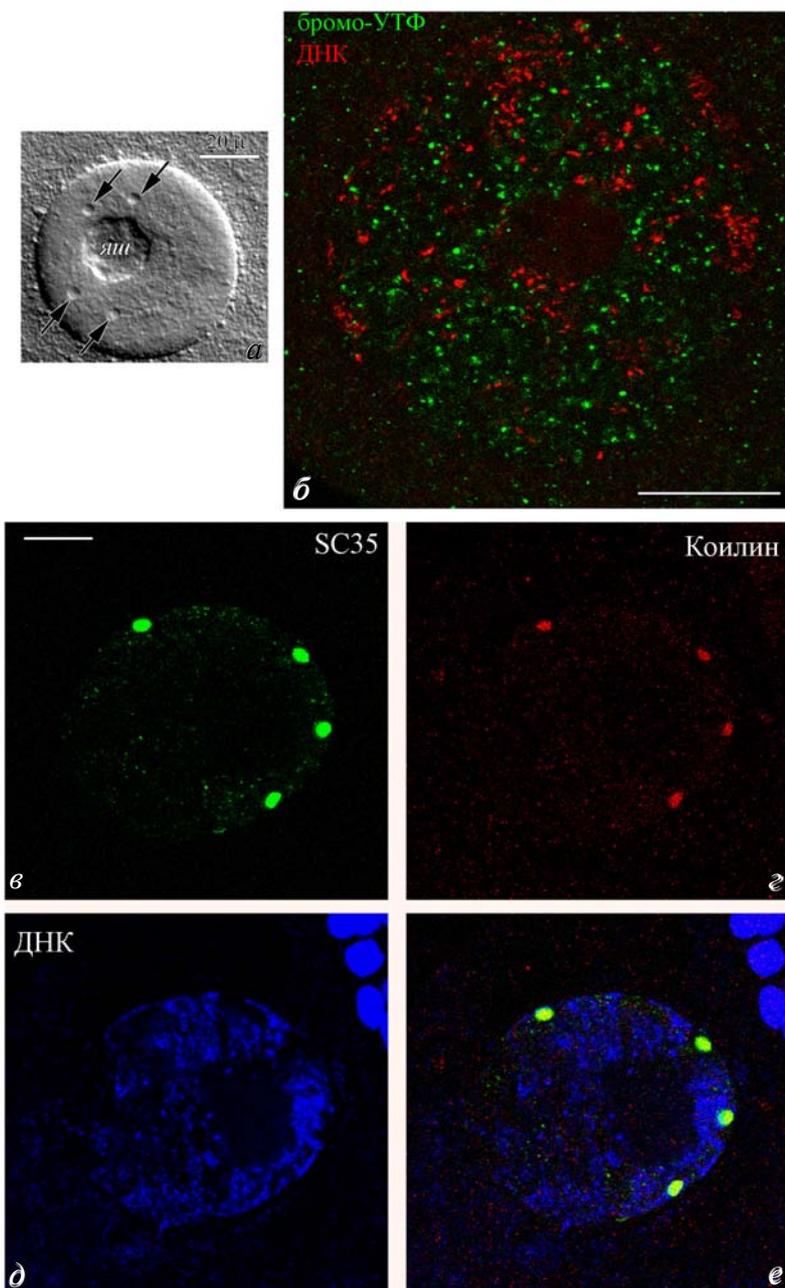


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая ответ SC35-содержащего домена сложных телец Кахала ооцитов *Acheta domesticus* на действие ингибиторов транскрипции.

**Ядерные структуры ооцитов паука-крестовика.** Оогенез пауков и особенности ядерных структур их ооцитов до сих пор изучены крайне слабо. Данный объект заинтересовал нас прежде всего тем, что оогенез пауков, включая использованный нами вид *Araneus diadematus*, в отличие от насекомых



**Рис. 5.** Ядерные структуры ооцитов *Araneus diadematus*.

*а* — нефиксированное ядро ооцита, оптика по Номарскому, *стрелками* указаны «внутренние тельца», *яш* – ядрышко.

*б* — ядро ооцита после микроинъекции в ооплазму бромουридинтрифосфата (зеленый), хроматин окрашен красителем То-Pro-3 (красный).

*в—д* – ядро ооцита после тройного флуоресцентного окрашивания с помощью антител к белку SC35 (*в*), коилину (*г*) и ДНК-специфичным флуорохромом То-Pro-3 (*д*); *е* – совмещенное изображение.

с паноистическими яичниками, – типичный солитарный, при котором ооцит развивается не только без питающих клеток, но и вообще не в составе фолликулов. До начала нашей работы (Боголюбов, Боголюбова, 2007), с одной стороны, было известно, что ядра ооцитов пауков содержат крупные структуры (рис. 6, *а*), напоминающие «простые» ТК молодых ооцитов сверчка и некоторых других насекомых (Badian et al., 2002), а с другой – то, что эти структуры интенсивно окрашиваются с помощью антител к Sm-эпиту по мяРНК и триметилгуанозинового кэпу мяРНК – типичным компонентам ТК (Gall, Callan, 1989).

С помощью микроинъекций в ооциты бромουридинтрифосфата мы установили, что ядра даже поздних вителлогенных ооцитов *A. diadematus*

транскрипционно активны (рис. 6, б), что полностью соответствует их «стратегии» при автотрофном оогенезе; при этом никогда не наблюдали в них признаков формирования кариосферы.

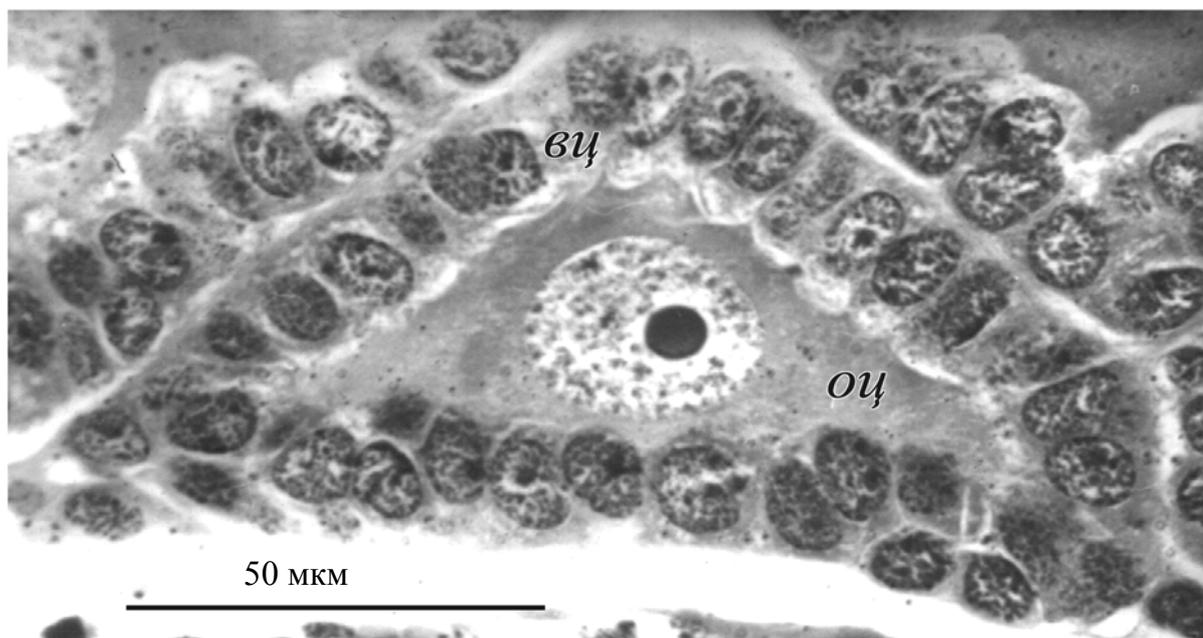
Одновременное иммуноцитохимическое окрашивание давленных препаратов ооцитов *A. diadematus* с помощью антител к белку SC35 и коилину и последующий их анализ с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии выявили связывание антител к коилину со сферическими ядерными структурами (рис. 6, в). По этому признаку их следует, очевидно, считать ТК. Однако была отмечена и необычайно яркая флуоресценция этих телец после применения антител к белку SC35 (рис. 6, г), маркирующему КИГ. Таким образом, белок SC35 и коилин оказываются колокализированными в одной и той же ядерной структуре (рис. 6, е). Антитела к белку SC35, кроме того, выявляют в ядрах более слабую диффузную флуоресценцию в перихроматиновых участках, которая, очевидно, соответствует местам транскрипции и сплайсинга. Окрашивание тех же препаратов с помощью ДНК-специфического флуорохрома То-Pro-3 (рис. 6, д) продемонстрировало заполняющую ядро хроматиновую сеть, что представляется типичным для автотрофного оогенеза, а также отсутствие ДНК в составе сферических телец ооцитов *A. diadematus* – ТК/КИГ.

Возможность присутствия белка SC35 в составе ТК ооцитов уже обсуждалась нами выше и будет обсуждаться в дальнейшем, когда речь пойдет о ядрах ооцитов при гетеротрофном оогенезе в период их инактивации в связи с формированием кариосферы. Ооциты паука впервые продемонстрировали столь интенсивную реакцию ТК с антителами к белку SC35 в транскрипционно активных ядрах.

**Ядерные структуры ооцитов турбеллярий-лецитоэпителиат.** Среди низших Bilateria есть группа животных – турбеллярии-лецитоэпителиаты, интересные прежде всего их необычным типом оогенеза, при котором рост ооцита происходит внутри своеобразных фолликулов (рис. 7), стенка которых образована особыми специализированными клетками – вителлоцитами, принимающими на себя функцию синтеза желтка (Боголюбов и др., 1990; Боголюбов, Тимошкин, 1993; Боголюбов, 1994а–в). Если развитие вителлоцитов (желточных клеток) характеризует многие отряды плоских червей (Gremigni, 1988), то уникальность женских гонад лецитозэпителиат заключается в стабильной ассоциации вителлоцитов с ооцитом; при этом,

однако, между ними отсутствуют прямые цитоплазматические связи, как это имеет место при нутритивном оогенезе.

Чему будет соответствовать ядро ооцитов турбеллярий-лецитоэпителиат при таком необычном типе оогенеза: ядру яйцеклетки, развивающейся по автотрофному или же гетеротрофному типу? Все данные, полученные нами при изучении ядер ооцитов нескольких видов лецитозэпителиат – представителей рода *Geocentrophora* свидетельствуют в пользу автотрофного характера оогенеза лецитозэпителиат.



**Рис. 7.** Фолликул *Geocentrophora wasiliewi*.

*вц* – вителлоциты, *оц* – ооцит, *пя* – постъядрышко, *стрелкой* указано тельце Кахала.

Хроматин в ооцитах *Geocentrophora* до конца периода роста остается в деконденсированном состоянии. С помощью ДНК-специфичных флуорохромов выявляли дисперсное распределение хроматина по всему ядру (за исключением области расположения очень крупного ядрышка – постъядрышка; см. ниже) в виде диффузной флуоресцирующей сети тонких тяжей, среди которых выявляются более интенсивно светящиеся мелкие хромоцентры. Эти хромоцентры, по-видимому, соответствуют глыбкам конденсированного хроматина, наблюдаемым на ультраструктурном уровне. Такое состояние хроматина характеризует ядра даже наиболее продвинутых в развитии ооцитов, заканчивающих рост. Ни у одного исследованного вида не отмечали формирования в ядре ооцитов структуры, напоминающей кариосферу (Боголюбов, 2000, 2007). Такое состояние хромосомного аппарата наводит на

мысль о его транскрипционной активности в течение всего периода роста ооцита.

Известно, что отчетливым показателем транскрипционно активного хроматина является присутствие в связи с ним перихроматиновых фибрилл (ПФ) (Сmarko et al., 1999), представляющих собой на ультраструктурном уровне морфологическое «выражение» первичных транскриптов мРНК (Fakan, 1994). В наших опытах при использовании иммуноэлектронной микроскопии особенно плодотворным для визуализации ПФ оказалось использование двойного иммуномечения с применением антител к ДНК для четкого маркирования хроматина на ультратонких срезах.

Присутствие в перихроматиновых участках ядер вителлогенных ооцитов *Geocentrophora* фибриллярного материала (ПФ), содержащего РНК-полимеразу II, белки-коактиваторы транскрипции СВР/p300, базальный фактор транскрипции TFIID, а также факторы сплайсинга (мяРНП и белок SC35), вместе с диффузным состоянием хроматина и отсутствием признаков формирования кариосферы служит, на наш взгляд, аргументом в пользу гипотезы о сохранении ядрами ооцитов *Lecithoepitheliata* собственной транскрипционной активности (Боголюбов, 2000, 2007). Морфологическое подобие в организации ядер ооцитов представителей других отрядов плоских червей (по данным литературы) наводит на мысль о том, что автотрофный характер оогенеза характеризует представителей типа Plathelminthes в целом, вне зависимости от особенностей организации их женских гонад.

В нуклеоплазме ооцитов *Geocentrophora* присутствуют многочисленные гранулы около 40 нм в диаметре, являющиеся, по-видимому, интерхроматиновыми. Такие гранулы иногда собраны в кластеры неправильной формы, но чаще занимают в нуклеоплазме довольно обширные аморфные «поля». В ядрах ооцитов *Geocentrophora* можно также обнаружить немногочисленные тельца, которые, по нашим представлениям, являются своеобразными ТК. Они интенсивно метятся антителами к мяРНП, а также (хотя и менее интенсивно) – к белку SC35 и фибрилларину. К сожалению, на материале ооцитов турбеллярий не представилось возможным локализовать в составе ТК маркерный белок коилин, поскольку использованная нами сыворотка либо не связывалась с какими-либо структурами (в стандартных разведениях), либо давала неспецифическую реакцию (при более высоких концентрациях).

Наиболее заметная ядерная структура вителлогенных ооцитов геоцентрофор – крупное постъядрышко. В ядрах молодых ооцитов (пахитена – начало диплотены) в ядре присутствует типичное с морфологической точки зрения ядрышко, которое обнаруживает ретикулярную по периферии структуру; от периферической части ядрышка, где расположен гранулярный компонент, в нуклеоплазму отделяются агрегаты прорибосомных гранул. По нашим данным (Боголюбов, Грузова, 1994), на описанной стадии ядрышко ооцита интенсивно включает  $^3\text{H}$ -уридин. По мере работы ядрышка в сформированных фолликулах его внешний вид заметно изменяется, и оно превращается в постъядрышко, приобретая характерное строение. На ультраструктурном уровне оно состоит из 2–3 зон: центральной части, образованной плотно упакованными фибриллами около 3 нм толщиной, названной нами «центральной фибриллярной массой», фиброгранулярного электронноплотного слоя и периферической гранулярной зоны, представляющей собой остаток гранулярного компонента, который полностью исчезает по завершении нуклеологенеза.

В результате иммуноэлектронного исследования (Боголюбов, 2000) обнаружено, что постъядрышко метится, хотя и слабо, с помощью антител к белку SC35, а также в его составе обнаруживаются мяРНП при использовании антител к Sm-белкам. Мечение постъядрышка обнаруживается и при использовании антител к фибрилларину. Мы предполагаем, что одна из функций постъядрышек в ооцитах *Geocentrophora* может состоять в том, что эти структуры наряду с ТК и (или) КИГ запасают ряд макромолекул, в том числе факторы сплайсинга пре-мРНК (мяРНП и SC35) и процессинга пре-рРНК (фибрилларин), которые необходимы при возобновлении транскрипционной активности в раннем эмбриогенезе. Однако на поздних стадиях оогенеза судьба постъядрышка не прослежена.

#### ***Ядерные структуры ооцитов брюхоногого моллюска Achatina fulica.***

Поиск среди животных новых объектов, обладающих разными типами оогенеза, которые представляли бы интерес для сравнительных исследований внутриядерной организации ооцитов, заставил нас обратиться к исследованию ядер ооцитов моллюсков, обладающих солитарным типом оогенеза (Степанова, Боголюбов, 2003), при котором ооцит, как известно, развивается без каких-либо вспомогательных клеток. В качестве объекта был выбран брюхоногий моллюск *A. fulica*, у которого развитие ооцита протекает в гермафродитной половой железе – овотестисе.

Картины, наблюдаемые после обработки препаратов ядер ооцитов *A. fulica* флуоресцентными красителями к ДНК, оказались весьма сходными с таковыми у турбеллярий: хромосомы были распределены по всему объему ядра, имели вид длинных тонких нитей с гладкой, без заметных петель поверхностью, образующих в ядре интенсивно флуоресцирующую сеть. Признаков формирования кариосферы не наблюдали. С помощью иммуноэлектронной микроскопии в перихроматиновых участках ядер ооцитов *A. fulica* выявлены скопления ПФ, содержащих РНК-полимеразу II и факторы сплайсинга (мяРНП и белок SC35).

В ядрах ооцитов *A. fulica* присутствуют единичные ядерные тельца около 2.5 мкм в диаметре, большую часть которых занимает тонкофибрилярная сердцевина, с периферией которых обычно ассоциированы аморфные участки, образованные электронноплотными гранулами около 60 нм в диаметре. Эти периферические гранулярные области метились с помощью антител к белку SC35 и представляют собой аналоги КИГ.

### **Ядро ооцитов при гетеротрофном типе оогенеза**

При изучении ядерных структур ооцитов, развивающихся по гетеротрофному типу, нашими объектами являлись насекомые с мероистическими яичниками – как политрофного (*Panorpa*, *Sarcophaga*), так и телотрофного типа (*Tenebrio*, *Notostira*, *Capsodes*, *Velia*).

**В ооцитах животных с гетеротрофным оогенезом могут отсутствовать ядрышки.** В опытах по гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* с использованием биотинилированной РНК, антисмысловой по отношению к рРНК, с РНК на давленных препаратах овариол *P. communis* (Баталова, Степанова, Боголюбов, 2000) или радиоактивных рРНК-зондов на парафиновых срезах овариол (Александрова, Боголюбов, Цветков, 1999) не наблюдали реакции в ядрах диплотенных ооцитов, включая связывание рРНК-зондов с какими-либо ядерными тельцами. Рибосомная РНК выявлялась в ооплазме, а также в трофоцитах и фолликулярных клетках.

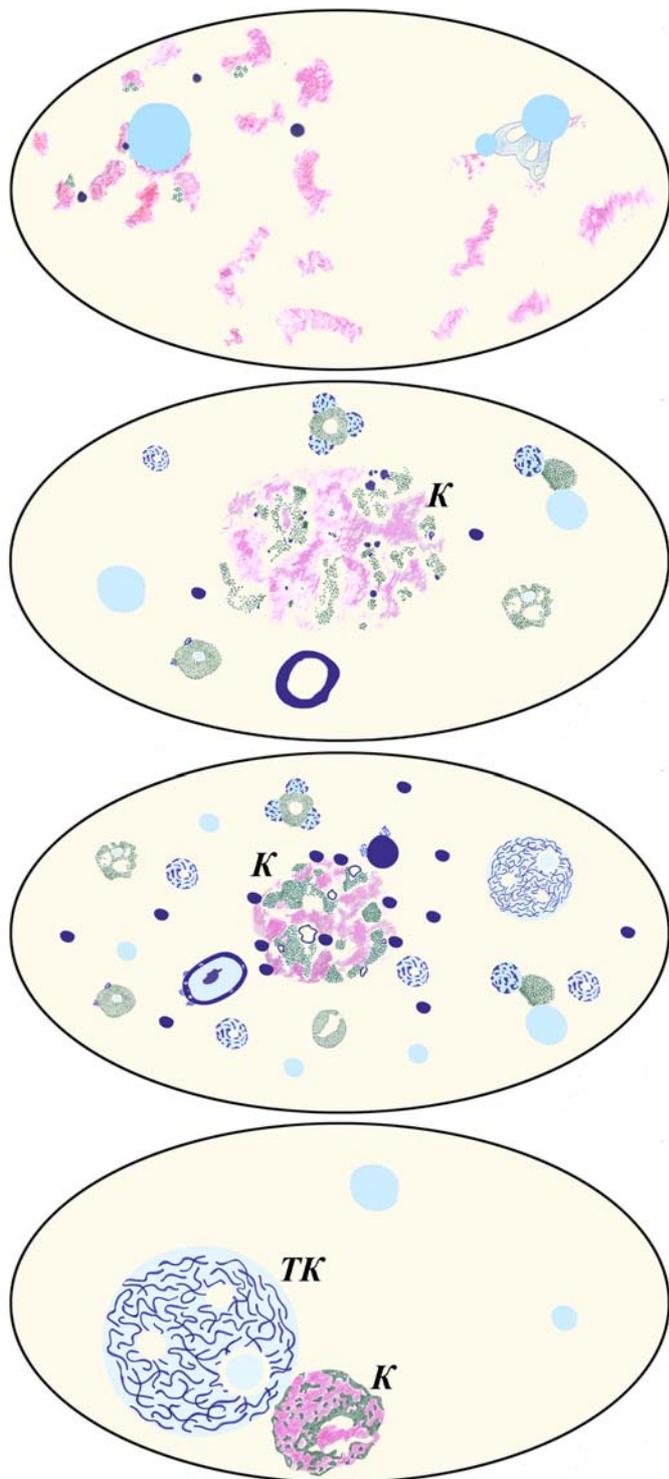
Полученные данные указывают: а) на отсутствие синтеза рРНК в ядрах диплотенных ооцитов этих видов и, следовательно, на отсутствие в них ядрышек; б) на то, что крайнее разделение функций в отношении синтеза рРНК между ооцитами и трофоцитами в эволюции мероистических яичников могло происходить неоднократно.

Тем не менее, отсутствие ядрышек не является общим правилом для всех животных с гетеротрофным (нутриментарным) оогенезом. Например, развитие сложного нуклеолярного аппарата в ооцитах насекомых с мероистическими яичниками характеризует насекомых из рода *Chrysopa* (Neuroptera) (Gruzova et al., 1972).

**Ядерные структуры ооцитов *Panorpa communis*.** На стадиях, предшествующих формированию кариосферы (пахитена – ранняя диплотена), нуклеоплазма ооцитов *P. communis* содержит диспергированный хроматин и отдельные небольшие участки конденсированного хроматина. В перихроматиновых участках ядра с помощью иммуноэлектронной микроскопии были выявлены ПФ, идентифицированные по мечению расположенного здесь фибриллярного материала антителами к РНК-полимеразе II и факторам сплайсинга (Баталова, Боголюбов, Парфенов, 2005). На данной стадии в ооцитах практически не было обнаружено морфологически оформленных ядерных телец.

В ранних превителлогенных ооцитах (ранняя диплотена) хромосомы начинают конденсироваться, а формирование кариосферы как компактного образования, занимающего ограниченное пространство в ядре, начинается со стадии среднего вителлогенеза (Batalova, ... Bogolyubov, Parfenov, 2005). Кариосфера *P. communis* не имеет волокнистой капсулы, присутствие которой характерно для ооцитов многих животных, в том числе ряда насекомых. На ультраструктурном уровне в составе ранней ретикулярной кариосферы среди рыхлых блоков хроматина четко видны большие скопления гранулярного материала. По мере роста ооцита в кариосфере продолжается конденсация хромосом и увеличивается количество гранулярного материала. В вителлогенных ооцитах кариосфера достигает своей максимальной компактизации, а хроматин – максимальной конденсации. Блоки конденсированного хроматина по-прежнему окружены гранулярным материалом, который на этой стадии заметно более уплотнен. С помощью микроинъекций в ооциты *P. communis* бромOURИДИНТРИФОСФАТА было установлено, что в оогенезе *P. communis* в период развития кариосферы происходит значительное снижение транскрипционной активности хромосом вплоть до практически полного их выключения из РНК-синтетических процессов на стадии вителлогенеза (Bogolyubov, 2007).

Морфодинамика ядерных телец ооцитов *P. communis*, включая их количественные и структурные изменения, четко коррелирует с этапами



**Рис. 8.** Морфодинамика кариосферы (*K*) и экстрахромосомных ядерных структур в оогенезе *Panorpa communis*.

*Сиреневым* цветом показан хроматин, *зеленым* – гранулярный материал, *голубым* и *синим* – фибриллярный материал, обнаруживающий разную плотность упаковки фибрилл.

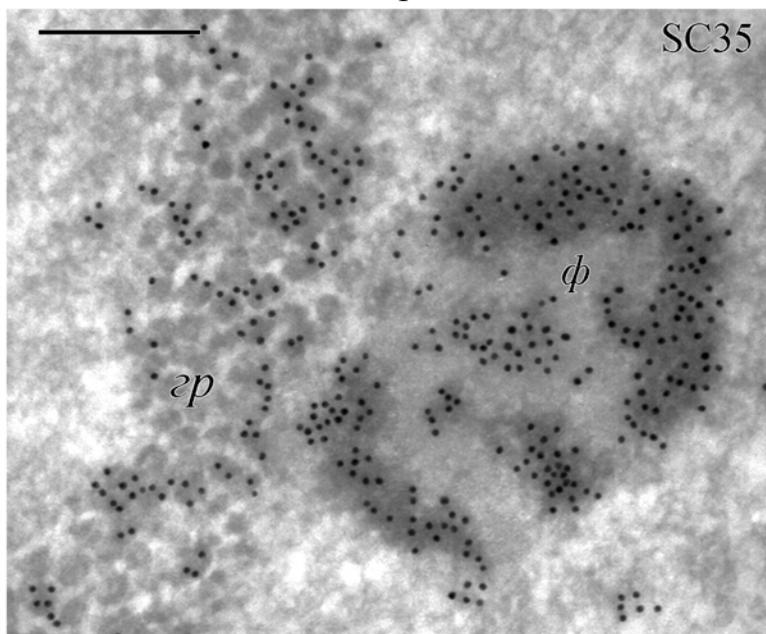
*TK* – самое крупное тельце Кахала.

развития кариосферы (Batalova,... Bogolyubov, Parfenov, 2005; рис. 8). Морфологически оформленные ядерные тельца ооцитов *P. communis* могут включать в различных сочетаниях гранулярный (гранулы 30–50 нм с ясно очерченными контурами) и фибриллярный (различающийся по степени упаковки фибрилл и электронной плотности) материал.

Наличие ТК в ооцитах *P. communis* было установлено прежде всего по связыванию антител к коилину с разнообразными ядерными доменами, различающимися как по размеру, так и по ультраструктуре, что свидетельствует о значительной гетерогенности популяции ТК в ооцитах *P. communis*. Меченым при этом оказывался не только фибриллярный, но и характерный гранулярный материал, входящий в состав сложных телец.

Другим способом идентификации ТК послужили опыты по микроинъекциям в диплотенные ооциты флуоресцентно меченной U7 мРНК (Batalova,... Bogolyubov, Parfenov, 2005), в результате которых наблюдали свечение многочисленных и самых разнообразных по размеру доменов.

Использование антител к белку SC35 с целью идентификации КИГ в ооцитах *P. communis* при использовании непрямой иммунофлуоресцентной



микроскопии выявило свечение в ядре многочисленных доменов. При иммуноэлектронном исследовании оказалось, что данные антитела маркируют не только гранулярный, но и фибриллярный материал в составе сложных ядерных телец ооцитов *P. communis* (рис. 9) (Баталова, Боголюбов, Парфенов, 2005; Batalova,... Bogolyubov, Parfenov, 2005).

**Рис. 9.** Кластер интерхроматиновых гранул ооцитов *Rapora communis* после иммуноэлектронного мечения антителами к белку SC35.

*gr* – гранулярный материал, *ph* – фибриллярный материал. Масштабная линейка – 0.25 мкм.

В результате наших исследований было показано, что в ооцитах *P. communis*

коилин-содержащие домены (ТК) и SC35-содержащие домены (КИГ) не разобщены друг от друга и не имеют четких морфологических признаков, позволяющих их разграничивать.

**Ядерные тельца вителлогенных ооцитов *Sarcophaga*.** На стадии вителлогенеза хромосомы ооцитов исследованного нами вида *Sarcophaga* sp. собраны в лишённую капсулы кариосферу, морфологически напоминающую таковую в ооцитах некоторых других высших Diptera, включая *Drosophila* (Liu

et al., 2006a). Кариосфера находилась в тесном контакте с крупным сферическим тельцем, формируя характерный для высших Diptera и некоторых других насекомых структурный комплекс. К настоящему времени природа этого тельца как своеобразного ТК была доказана для ооцитов *Drosophila* (Liu et al., 2006a, b).

Помимо крупного сферического тельца, связанного с кариосферой, ядра ооцитов *Sarcophaga* содержат множество мелких гетероморфных телец, размер которых варьирует в среднем от 0.5 до 5 мкм. На ультраструктурном уровне они имеют неправильную форму и состоят из довольно обособленных друг от друга зон, образованных гранулярным (диаметр гранул 20–40 нм) и фибриллярным материалом. Отдельные фибриллярные зоны таких телец заметно различаются по своей электронной плотности. Гранулярный материал, составляющий их большую часть, представлен интерхроматиновыми гранулами, на что указывает его реакция с антителами к белку SC35, а также мечение антителами к Sm-эпиту по мяРНП и триметилгуанозинному кэпу мяРНК. Антитела к белку SC35 метят не только гранулярный материал, но и участки, образованные фибриллярным материалом высокой электронной плотности. Фибриллярные же области, образованные материалом низкой электронной плотности, метятся антителами к нефосфорилированной РНК-полимеразе II.

Итак, в ооцитах *Sarcophaga* присутствует крупное одиночное ТК, связанное с кариосферой, и множество мелких КИГ, в которых SC35-содержащий домен представлен как гранулярным материалом (интерхроматиновые гранулы), так и фибриллярным материалом высокой электронной плотности, а фибриллярные зоны низкой электронной плотности представляют собой особые субдомены КИГ, накапливающие РНК-полимеразу II (Bogolyubov, Stepanova, 2007).

**Ядерные структуры ооцитов Hemiptera.** Данные по молекулярному составу, структуре и функциям ядерных телец ооцитов Hemiptera до сих пор крайне скудны. У исследованных нами видов клопов ядерные тельца ооцитов оказались в морфологическом отношении крайне разнообразными и различались даже у представителей одного семейства (Bogolyubov et al., 2007).

Ранние превителлогенные ооциты *Notostira elongata* содержат крупное тельце, которое сохраняется на последующих стадиях роста ооцита. Оно имеет сложную структуру и состоит из нескольких морфологических частей: центрального тела неправильной формы со множеством вакуолей и электронно-

плотных «почек», связанных с его периферией. Эти «почки» состоят из хаотичным образом ориентированных фибрилл и отдельных гранул с нечеткими очертаниями. С помощью антител к коилину и нефосфорилированной РНК-полимеразе II – характерным компонентам ТК – наблюдали мечение центральной части таких телец, которая, однако, совершенно не метилась антителами к белку SC35, которые, наоборот, интенсивно метили периферические «почки». Кроме крупного одиночного тельца ооциты *N. elongata* содержат многочисленные значительно более мелкие тельца, которые содержат коилин, мяРНП и РНК-полимеразу II.

Весьма противоречивые результаты были получены при использовании антител к белку SC35. В противоположность самому крупному тельцу, в котором данные антитела метили исключительно периферические «почки», но не центральную часть, в мелких тельцах наблюдали мечение их центральных фибриллярных частей (содержащих коилин!), а не периферических структур.

Наконец, в нуклеоплазме *N. elongata* присутствуют и простые гранулярные КИГ, которые слабо, но тем не менее весьма специфично метятся антителами к нефосфорилированной РНК-полимеразе II и, что наиболее показательно, антителами к белку SC35.

У *Capsodes gothicus* – представителя того же семейства Miridae – ооциты содержат многочисленные и морфологически сложно устроенные ядерные тельца. Большая их группа представляет собой фибриллярные образования, включающие в себя неправильной формы области, различающиеся плотностью упаковки и электронной плотностью входящих в их состав фибрилл. Такие тельца оказались мечеными при использовании для целей иммуоэлектронной цитохимии антител как к коилину, так и к белку SC35. Периферические части таких телец содержали характерные электронноплотные «шапочки», пронизанные электроннопрозрачными интерстициями. Эти «шапочки» метились антителами к белку SC35.

У клопа-водомерки *Velia caprai* ооциты содержат одно крупное и множество мелких ядерных телец, имеющих фибриллярное строение. Самое крупное тельце – морфологически сложное и состоит из электронноплотной вакуолизированной центральной части, окруженной материалом более низкой электронной плотности, и участков неправильной формы, образованных волокнистым материалом. Центральная часть таких телец метилась антителами к коилину, в то время как антитела к белку SC35 метили только их периферические зоны.

Таким образом, наше исследование явилось первой работой, в которой специально рассматривали ядерные тельца ооцитов Hemiptera (на примере трех видов клопов). На этом этапе мы попытались найти аналоги ТК и КИГ в ооцитах этих видов. При этом мы столкнулись, во-первых, с большим морфологическим разнообразием ядерных доменов ооцитов, во-вторых, – с возможностью присутствия белка SC35 в фибриллярном, а не в гранулярном материале, который напрямую соответствовал бы интерхроматиновым гранулам, и, наконец, в третьих, – с новыми ясными примерами того, что ядерные тельца ооцитов по своему составу могут объединять свойства различных ядерных доменов (например, ТК и КИГ; см. также обсуждение этого вопроса в разделе «Заключение» и рис. 12) и потому не могут быть однозначно отнесены к ядерным тельцам одного какого-нибудь типа. Среди исследованных видов только у *N. elongata* в ооцитах присутствовали ядерные тельца, которые более или менее четко можно было классифицировать как ТК или КИГ.

**Ядерные структуры ооцитов *Tenebrio molitor*.** Ядра молодых ооцитов *T. molitor* (ранняя диплотена), до формирования в них кариосферы, по морфологическим признакам напоминают ядра ооцитов, развивающихся по автотрофному типу (Bogolyubov et al., 2000; Bogolyubov, Parfenov, 2001). Нуклеоплазма, в том числе ее перихроматиновые участки, заполнена рыхлым фиброгранулярным материалом, в котором идентифицируются ПФ с помощью иммуномечения ультратонких срезов антителами к гипер- и нефосфорилированной формам РНК-полимеразы II, белку SC35, Sm-белкам мяРНК и триметилгуанозинового кэпу мяРНК. Обилие ПФ и деконденсированное состояние хроматина наводят на мысль о высокой транскрипционной активности ядер ооцитов на данной стадии оогенеза. Прямые подтверждения такому предположению мы получили, во-первых, в автордиографических исследованиях с использованием <sup>3</sup>H-уридина (Боголюбов и др., 1997), а во-вторых, – в опытах по микроинъекциям бромоуридинтрифосфата (Bogolyubov, 2007). В последнем случае отчетливый диффузный сигнал, соответствующий вновь синтезированной меченой РНК, был зарегистрирован в местах расположения хроматина.

Первые ядерные тельца в ооцитах *T. molitor* можно обнаружить на стадии ранней диплотены, начиная со стадии раннего превителлогенеза (Bogolyubov et al., 2000). Размер таких телец обычно составляет около 0.3 мкм. На данной стадии оогенеза все тельца – простые фибриллярные образования. Использование антител к факторам сплайсинга позволило выявить по крайней

мере две генерации таких телец, которые морфологически совершенно не различались между собой, однако демонстрировали различную способность связывать антитела к этим факторам.

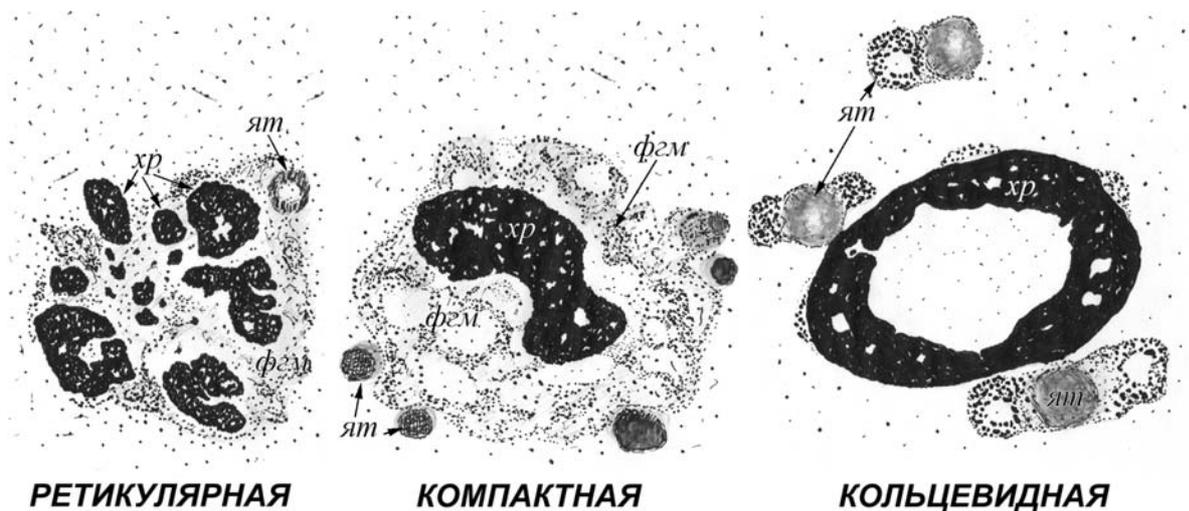
В превителлогенных ооцитах *T. molitor* начинается формирование кариосферы. Этот процесс связан с постепенной все более значительной конденсацией хроматина и сопровождается формированием в ядре большого количества разнородного экстрахромосомного материала, который постепенно реорганизуется в многочисленные и разнообразные ядерные тельца (Александрова, Боголюбов, Грузова, 1995; Боголюбов и др., 1997; Bogolyubov et al., 2000; Bogolyubov, Parfenov, 2001; рис. 10).

В нашем авторадиографическом исследовании (Боголюбов и др., 1997; Tsvetkov, ... Bogolyubov, Gruzova, 1997) мы наблюдали включение  $^3\text{H}$ -уридина в область расположения сформированной кариосферы, что свидетельствует о том, что геном ооцита *T. molitor* полностью не инактивируется при начальной сборке хромосом в кариосферу. Эти данные нашли подтверждение в опытах по микроинъекциям бромоеуридинтрифосфата (Bogolyubov, 2007), однако по мере роста ооцита наблюдалось резкое снижение интенсивности включения предшественника вплоть до полного отсутствия сигнала на конечной стадии ее развития. Данные, полученные при исследовании включения бромоеуридинтрифосфата в кариосферу *T. molitor*, находятся в соответствии с результатами, полученными на ооцитах *P. communis* (см. выше).

К концу развития кариосферы (стадия позднего вителлогенеза) нуклеоплазма ооцитов *T. molitor* содержит многочисленные ядерные тельца от 0.5 до 2.0 мкм в диаметре, состоящие из материала двух основных типов. Материал 1-го типа – крупные (25–35 нм) электронноплотные гранулы, связанные между собой фибриллами примерно такой же толщины и электронной плотности. Материал 2-го типа представлен фибриллами около 10–15 нм, которые имеют среднюю или низкую электронную плотность. Наиболее часто в ядре присутствуют тельца, в состав которых входит материал обоих типов, а отдельные тельца различаются между собой количеством материала определенного типа в их составе и плотностью упаковки материала 2-го типа. Иногда в ооцитах *T. molitor* встречаются крупные тела сферической формы, достигающие в диаметре 6–8 мкм. Это полностью фибриллярные структуры, однако они встречаются довольно редко и не во всех ооцитах одной и той же стадии развития. Тем не менее, если такие тельца присутствуют, то

они реагируют с антителами к коилину (Боголюбов, 2003) и, таким образом, могут рассматриваться в качестве своеобразных ТК.

Следует отметить, что ультраструктурные исследования выявили гетерогенную, но очень немногочисленную популяцию ТК в ооцитах *T. molitor*. При этом на одном и том же срезе ядра можно наблюдать как меченую структуру, так и немеченые тельца. При этом каких-либо заметных



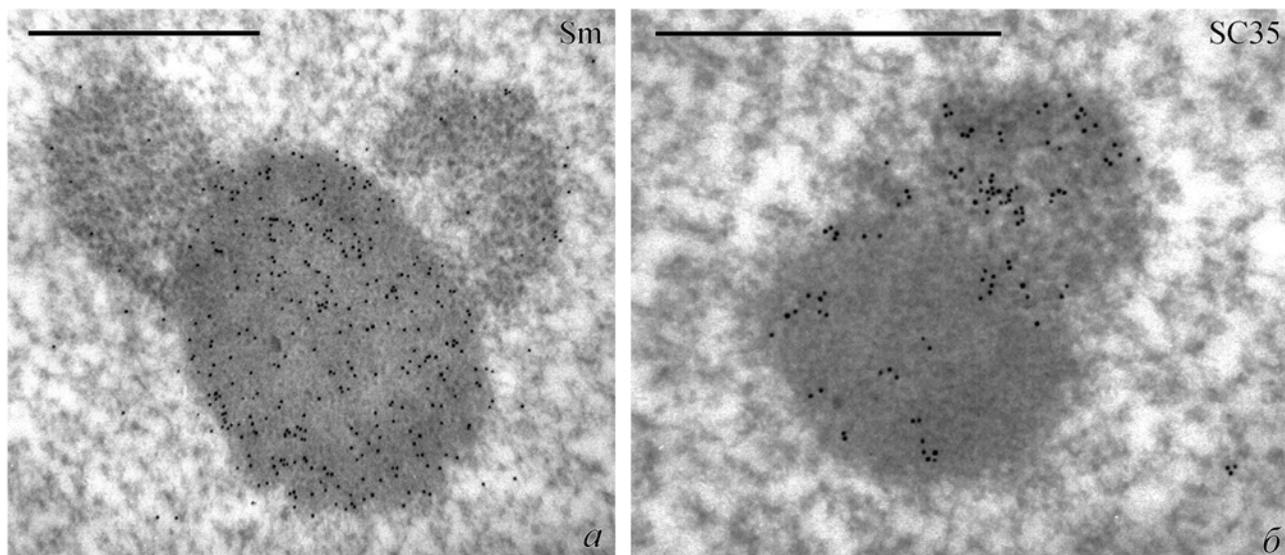
**Рис. 10.** Ключевые стадии развития кариосферы *Tenebrio molitor*.

*хр* – хроматин, *фгм* – экстрахромосомный фиброгранулярный материал, *ят* – ядерные тельца.

морфологических особенностей, позволяющих провести различия между структурами, с которыми связываются антитела к коилину, и тельцами, не содержащими метки, выявлено не было. В случае мечения сложных телец, состоящих из материала различных типов, антитела к коилину связывались преимущественно с материалом 2-го типа.

В серии экспериментов (Боголюбов, 2003) ТК ооцитов *T. molitor* были идентифицированы с помощью микроинъекций в ооциты синтезированной *in vitro* кэпированной мРНК коилина, содержащей на 5'-конце 6 повторяющихся последовательностей, соответствующих 10-аминокислотному эпитопу онкогена *c-myc*. Поскольку ген *c-myc* не экспрессируется у насекомых, последующее выявление вновь синтезированного белка *myc*-коилина возможно с помощью антител к *myc*-эпитопу. В результате выявляли 1–3 мелких домена в нуклеоплазме, что соответствует картинам распределения в ядре эндогенного коилина. Эти домены никогда не были расположены вблизи кариосферы, т.е. у *T. molitor* в отличие от ряда других насекомых структурный комплекс кариосфера–ТК в ооцитах отсутствует.

Иммунофлуоресцентная и иммуноэлектронная микроскопия позволили составить представление о присутствии в составе ядерных телец ооцитов *T. molitor* РНК-полимеразы II, мяРНП и белка SC35. В случае сложных телец материал обоих типов, входящий в их состав, оказался меченым с помощью антител к Sm-эпитопу мяРНП (Y12) (рис. 11, а), белку SC35 ( $\alpha$ SC35) (рис. 11, б) и нефосфорилированной форме РНК-полимеразы II (8WG16). В то же время, антитела Y12 и 8WG16 более интенсивно метили материал 2-го типа, а антитела  $\alpha$ SC35, наоборот, – материал 1-го типа (таблица).



**Рис. 11.** Ядерные тельца (кластеры интерхроматиновых гранул) ооцитов *Tenebrio molitor* после иммуноэлектронного мечения антителами к Sm-белкам мяРНП (а) и белку SC35 (б).

Масштабные линейки – 1 мкм.

В случае использования антител к белку SC35 некоторые ядерные тельца, состоящие из материала 2-го типа, оказались полностью не мечеными данными антителами (Tsvetkov,... Bogolyubov, Gruzova, 1997). В составе некоторых телец материал 2-го типа оказывался практически полностью не мечен и антителами 8WG16 к нефосфорилированной форме РНК-полимеразы II (Bogolyubov, Parfenov, 2004). Эти наблюдения были сделаны в результате просмотра серийных срезов.

Чтобы окончательно подтвердить присутствие в составе ядерных телец ооцитов *T. molitor* РНК-полимеразы II, мы использовали антитела ARNA3, распознающие ее эпитоп вне СТД, т.е. вне зависимости от степени фосфорилирования. Большинство телец в этом случае оказалось мечено, как и в случае использования поликлональной сыворотки к гиперфосфорилированному СТД.

Таблица

Распределение частиц золота над сформированными ядерными тельцами ооцитов *T. molitor* после иммуноцитохимического мечения ультратонких срезов антителами к факторам сплайсинга

Моноклональные антитела	Количество метки ( $\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$ )	
	Материал 1-го типа	Материал 2-го типа
Y12	6.87±0.70	31.09±1.99
αSC35	16.38±1.30	1.56±0.31
8WG16	2.55±0.70	5.31±0.57

Примечание: Подсчеты сделаны на случайно выбранных областях площадью 0.25 мкм<sup>2</sup>; по каждому из трех антител между выборками имеются достоверные различия (P<0.05).

Для того, чтобы проверить, присутствуют ли в составе ядерных телец ооцитов *T. molitor* одновременно две формы РНК-полимеразы II, мы использовали технику двойного иммуномечения ультратонких срезов антителами к ее нефосфорилированной и гиперфосфорилированной формам (Bogolyubov, Parfenov, 2004). Оказалось, что некоторые тельца действительно содержат две формы РНК-полимеразы II, а другие демонстрируют различный характер мечения: некоторые части сложных телец содержали только нефосфорилированную РНК-полимеразу II, а другие, наоборот, – только гиперфосфорилированную.

В заключение следует отметить, что ооциты *T. molitor* показывают нам в очередной раз сложность организации экстрахромосомных доменов как по морфологическим признакам, так и по молекулярному составу. Как и в случае ооцитов других исследованных беспозвоночных животных, идентификация ТК и КИГ встречает определенные трудности.

На основании проведенных нами исследований мы можем заключить, что материал, содержащий маркерные компоненты ТК и (или) КИГ, в большом

количестве присутствует в ядрах ооцитов *T. molitor*, однако выделить четкие морфологические критерии, позволяющие однозначно идентифицировать ТК или КИГ, в ряде случаев затруднительно. Усложняет ситуацию и то, что в отдельных случаях ядерные тельца, имеющие одинаковую организацию, могут различаться по молекулярному составу.

ТК в ооцитах *T. molitor* немногочисленны и представлены крупными фибриллярными структурами или мелкими фиброгранулярными тельцами.

КИГ среди ядерных телец ооцитов *T. molitor* представляют обширную и морфологически гетерогенную популяцию; при этом определению «КИГ» в наибольшей степени соответствует материал 1-го типа, содержащий гранулы размером около 35 нм и метящийся антителами к белку SC35.

Ядерные тельца, соответствующие ТК и (или) КИГ, могут содержать РНК-полимеразу II; при этом ее нефосфорилированная форма ассоциирована преимущественно с фибриллярным материалом 2-го типа. Некоторые тельца могут одновременно содержать обе (нефосфорилированную и гиперфосфорилированную) формы РНК-полимеразы II.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании, используя, с одной стороны, набор определенных антител для иммуноцитохимического выявления маркерных белков, с другой – ультраструктурный анализ, а также некоторые специальные подходы, включая микроинъекции в ооциты, мы сумели идентифицировать в ядрах ооцитов ряда беспозвоночных животных структурные аналоги ТК и КИГ, что, безусловно, подчеркивает универсальность и эволюционную консервативность этих ядерных доменов (Gall, 2003; Gall et al., 2004).

Вместе с тем, ядерные тельца ооцитов беспозвоночных – как КИГ, так и ТК – продемонстрировали ряд особенностей, которые заметно отличают их от типичных ТК и КИГ соматических клеток млекопитающих. Эти особенности касаются как ультраструктурной организации, так и молекулярного состава. Мы еще очень мало знаем о функциях КИГ и ТК в ооцитах, но и в этом отношении также очевидно, что они должны обладать некоторыми специфическими чертами.

КИГ ооцитов беспозвоночных в большинстве случаев содержат гранулы, размеры которых заметно больше (от 30 до 70 нм) по сравнению с типичными интерхроматиновыми гранулами (Monneron, Bernhard, 1969). В ооцитах КИГ практически всегда представляют собой морфологически хорошо оформленные

структуры (исключение – ооциты *Turbellaria-Lecithoepitheliata*), а не простые аморфные агрегаты гранул, как это нередко имеет место в соматических клетках.

В ооцитах насекомых, если рассматривать в целом, КИГ оказались по организации сходными вне зависимости от типа строения яичников. У насекомых в составе КИГ ооцитов обычно четко выражен фибриллярный компонент, из-за чего сам термин «кластер гранул» становится в определенной степени условным. При этом фибриллярный и гранулярный компоненты КИГ могут быть хаотичным образом перемешаны между собой, но часто фибриллярный материал занимает сегрегированные области, отличающиеся различной электронной плотностью и плотностью упаковки фибрилл в их составе. Любопытно, что некоторые из таких областей аккумулируют РНК-полимеразу II (преимущественно ее нефосфорилированную форму). Таким образом, фибриллярные области в составе КИГ ооцитов насекомых следует, по видимому, рассматривать как их специализированные субдомены.

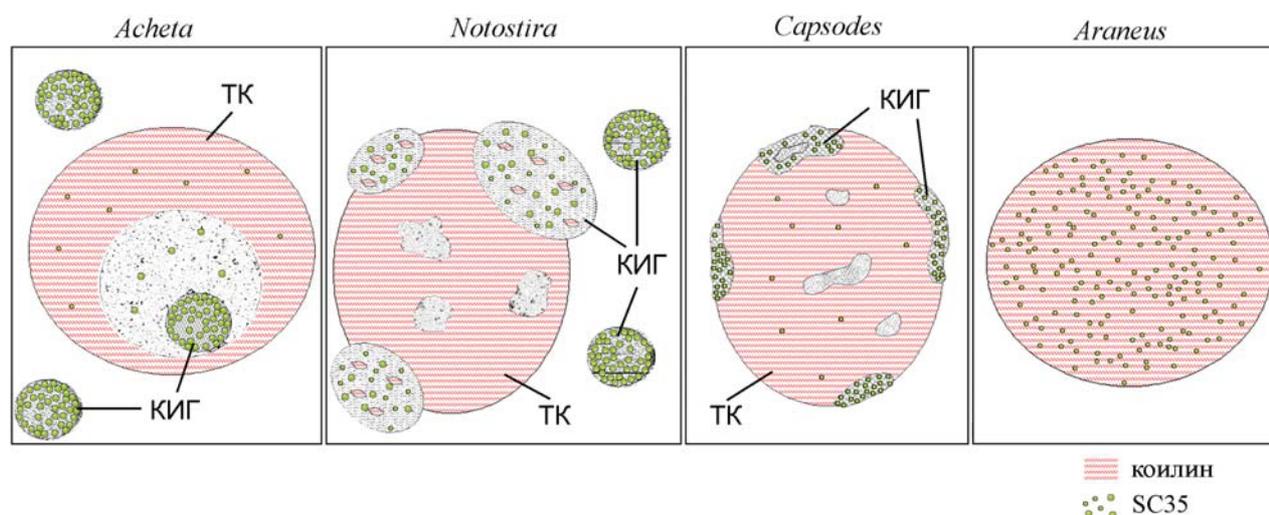
Что касается маркерного белка КИГ – SC35, то фактически становится правилом, что распределение этого белка в КИГ ооцитов не ограничено гранулами, и он часто присутствует в различных фибриллярных структурах. Таким образом, есть все основания говорить применительно к ооцитам беспозвоночных не о КИГ, а об «SC35-содержащем домене» (Hall et al., 2006), что исключает ультраструктурный мотив в этом определении.

Весьма своеобразны в ооцитах беспозвоночных ТК (коилин-содержащие домены). По ультраструктурной организации они могут быть фибриллярными, фиброгранулярными или даже гранулярными образованиями. Очень редко они морфологически напоминают типичные ТК соматических клеток млекопитающих.

Почему популяция ТК и родственных им структур в ооцитах беспозвоночных столь гетерогенна по своей ультраструктуре? Почему морфологические особенности ТК и их молекулярный состав сильно варьируют вне зависимости от таксономического и филогенетического положения конкретного вида? Почему имеет место слабая корреляция между ультраструктурной организацией ТК ооцитов и их молекулярным составом? Эти и другие вопросы до сих пор остаются без ответа и открывают перспективы для дальнейших исследований.

Если ранее на большом числе объектов при исследовании ядер соматических клеток млекопитающих была установлена функциональная связь

между ТК и КИГ (Dundr, Misteli, 2001; Lamond, Spector, 2003), то ооциты дают возможность проследить еще и структурную связь между ними: от присутствия в ядре независимых структур до формирования структурных комплексов, в которых, однако, составляющие их компоненты, в первую очередь КИГ, могут иметь разную степень обособленности (рис. 12). Полное слияние в единую структуру демонстрируют ядерные домены ооцитов паука, в которых коилин и белок SC35 локализируются совместно в едином образовании, которое на светооптическом уровне выглядит однородным.



**Рис. 12.** Схема, демонстрирующая варианты связей между компонентами телц Кахала (ТК) и кластеров интерхроматиновых гранул (КИГ) в составе сложных телц Кахала ооцитов некоторых беспозвоночных животных (Insecta + Aranei).

Очень трудно провести четкую «демаркационную линию» между ТК и КИГ в транскрипционно неактивных ооцитах, и в ряде случаев нам представляется более уместным говорить о существовании единого экстрахромосомного домена, объединяющего черты по крайней мере ТК и КИГ.

В этой связи интересно вспомнить гипотезу о «модульной» структуре ТК, которая была недавно предложена для соматических клеток млекопитающих (Lemm et al., 2006). По мнению авторов, ТК включают определенные функциональные модули, обеспечивающие различные ядерные функции. Эти модули могут, очевидно, по-разному комбинироваться в разных типах клеток в зависимости от их физиологического состояния.

Если распространить эту гипотезу на экстрахромосомный домен (ТК+КИГ) специализированных клеток – ооцитов, то можно себе представить, что на фоне разнообразных цитофизиологических особенностей оогенеза

сочетание структурно-функциональных модулей ТК и КИГ может заметно варьировать от стадии к стадии и от вида к виду. К сожалению, ни доказать, ни опровергнуть эту идею пока не представляется возможным.

Существование в оогенезе многих животных физиологически детерминированной инактивации ядер ооцитов со всей определенностью подводит к мысли о том, что функции ТК и КИГ на активных и неактивных стадиях оогенеза должны каким-то образом различаться. Очевидно, что в неактивных ядрах и ТК, и КИГ представляют собой «аккумуляторы», накапливающие неактивные молекулярные компоненты, включая РНК-полимеразу II и различные факторы сплайсинга, вовлеченные в транскрипцию и процессинг РНК на ранних (активных) стадиях оогенеза. В этих доменах, возможно, происходит утилизация этих избыточных компонентов.

Однако нельзя полностью исключить наше предположение о том, что рассматриваемые структуры могут также являться ядерными доменами, в которых в оогенезе запасается ряд молекулярных факторов для их последующего использования при возобновлении экспрессии генов в раннем эмбриогенезе при активации эмбрионального генома (Vogolyubov et al., 2000).

Мы считаем, что поиск фундаментальных закономерностей организации, функционирования и взаимодействия ядерных доменов (компарментов) в клетках в целом, а также их специфических особенностей в ооцитах невозможен без широкого сравнительного подхода на современном уровне. Накопленный к настоящему времени материал, полученный на ооцитах различных животных, показывает, сколь сложно организованной является внутриядерная функциональная компарментализация этих высокоспециализированных клеток. Еще предстоит выяснить, какие механизмы регулируют генез и функционирование этой сложной системы.

## ВЫВОДЫ

1. В ядрах ооцитов, развивающихся по автотрофному типу (при отсутствии питающих клеток), у исследованных беспозвоночных животных, принадлежащих к различным таксонам (*Geocentrophora* [Plathelminthes-Turbellaria], *Achatina* [Mollusca-Gastropoda], *Acheta* [Insecta], *Araneus* [Aranei]), кариосфера не формируется, а хромосомы сохраняют транскрипционную активность вплоть до завершающих этапов роста ооцита. В ооцитах животных с нутриментарным (гетеротрофным) оогенезом (*Panorpa* [Insecta-Mecoptera], *Tenebrio* [Insecta-Coleoptera]), напротив, образуется кариосфера, и ее формирование связано с периодом превителлогенеза.

2. Морфодинамика кариосферы сходна у видов, принадлежащих к разным отрядам насекомых, но различаются детали ее строения. В ходе развития кариосферы происходит высокая конденсация хроматина, что сопровождается полным исключением хромосом ооцита из РНК-синтетических процессов, а также реорганизацией экстрахромосомного материала кариосферы в морфологически оформленные ядерные тельца.

3. У насекомых с нутриментарным типом оогенеза существует тенденция к инактивации ядрышкового аппарата ооцитов; у некоторых видов наблюдается полное отсутствие ядрышек и синтеза рибосомной РНК. Крайнее разделение функций между ядрами ооцитов и трофоцитов в отношении синтеза рибосомной РНК в эволюции насекомых происходило неоднократно – по крайней мере, дважды: у Mecoptera и Coleoptera-Polyphaga.

4. Эквиваленты телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул соматических клеток млекопитающих присутствуют в ооцитах всех исследованных видов беспозвоночных животных, далеко отстоящих друг от друга в филогенетическом отношении, вне зависимости от типа оогенеза. Таким образом, на широком круге беспозвоночных животных подтверждена концепция универсальности и эволюционной консервативности телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул. Присутствие этих доменов в ооцитах не зависит от транскрипционного статуса ядер.

5. Кластеры интерхроматиновых гранул и тельца Кахала ооцитов беспозвоночных представляют собой сложные гетерогенные образования, включающие структурно-функциональные субдомены, обогащенные различными компонентами экспрессии генов (РНК-полимераза II, ряд транскрипционных факторов, факторов сплайсинга пре-мРНК). Существуют

видовые особенности ультраструктурной организации и молекулярного состава телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул ооцитов беспозвоночных животных.

6. Среди беспозвоночных животных существует тенденция к объединению телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул ооцитов в единые комплексы, сочетающие компоненты этих двух доменов с различной степенью их морфологической обособленности. Выдвинута гипотеза о возможности существования в ядрах ооцитов единого экстрахромосомного домена, объединяющего структурные и молекулярные черты телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул.

7. Подавление транскрипции (в ооцитах *Acheta*) вызывает согласованную реакцию структурных элементов телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул, входящих в состав комплексных образований ооцитов, что приводит не только к изменению их тонкого строения, но и к перераспределению факторов сплайсинга в их составе. В то же время, оно не влияет на внутриядерную локализацию коилина, фибрилларина, РНК-полимеразы II и некоторых сопутствующих ей факторов (TFIID, СВР/p300).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Боголюбов Д.С.**, Габаева Н.С., Мамкаев Ю.В., Тимошкин О.А. 1990. Морфодинамика гонад и гаметогенез байкальских проринхид (*Turbellaria*, *Lecithoeritheliata*). В сб.: Свободноживущие и паразитические плоские черви: фаунистика и морфология; под ред. Ю.В.Мамкаева и Б.И.Иоффе. Л.: Зоол. ин-т. / Труды ЗИН АН СССР. 221: 126-149.
2. **Боголюбов Д.С.** 1991. Электронно-микроскопическое исследование оогенеза байкальской турбеллярии *Geocentrophora porfirievae*. Цитология. 33 (9): 54-55.
3. **Боголюбов Д.С.**, Тимошкин О.А. 1993. Сравнительная характеристика женских гонад *Lecithoeritheliata* (*Plathelminthes*) с выводами о таксономии отряда. Зоол. журн. 72 (2): 17-26.
4. **Боголюбов Д.С.** 1993. Ультраструктура ядер ооцитов и вителлоцитов турбеллярий рода *Geocentrophora*. Цитология. 35 (10): 59-60.
5. **Боголюбов Д.С.**, Грузова М.Н. 1994. Оогенез турбеллярий рода *Geocentrophora* по данным световой и электронной микроскопии. I. Ядро ооцитов. Цитология. 36 (3): 275-282.

6. **Боголюбов Д.С.** 1994. Оогенез турбеллярий рода *Geocentrophora* по данным световой и электронной микроскопии. II. Ядро вителлоцитов. О так называемой «гигантской нуклеоли». Цитология. 36 (3): 283-288.
7. Alexandrova O.A., **Bogolyubov D.S.**, Tsvetkov A.G., Gruzova M.N. 1995. Nuclear bodies and karyosphere formation in oocytes of some insects. (Ultrastructural and immunocytochemical analysis). 14<sup>th</sup> Intern. Workshop on the Cell Nucleus. Spa. 68.
8. Александрова О.А., **Боголюбов Д.С.**, Грузова М.Н. 1995. Кариосфера и внутриядерные тельца в ядрах ооцитов жука-чернотелки *Tenebrio molitor*. Цитология. 37 (12): 1142-1150.
9. **Bogolyubov D.S.**, Alexandrova O.A., Tsvetkov A.G., Antipanova E.M., Gruzova M.N. 1996. Ultrastructural and immunocytochemical study of karyosphere and nuclear bodies in insects with different types of ovarioles. Proceedings of 20<sup>th</sup> Intern. Congress of Entomology. Florence. 132.
10. Tsvetkov A.G., Alexandrova O.A., **Bogolyubov D.S.**, Gruzova M.N. 1996. Nuclear bodies containing splicing factors in oocytes of insects with different types of oogenesis. Mol. Biol. Cell. 7, Suppl.: 305A.
11. **Боголюбов Д.С.**, Александрова О.А., Цветков А.Г., Грузова М.Н. 1997. Ультраструктурное, цитохимическое и автордиографическое исследование ядер ооцитов жука-чернотелки *Tenebrio molitor*. Цитология. 37 (1): 43.
12. **Боголюбов Д.С.**, Александрова О.А., Цветков А.Г. 1997. Ядро ооцитов жука-чернотелки *Tenebrio molitor*. (Электронно-микроскопическое, цитохимическое и автордиографическое исследование). Цитология. 39 (8): 643-650.
13. Tsvetkov A., Alexandrova O., **Bogolyubov D.**, Gruzova M. 1997. Nuclear bodies from cricket and mealworm oocytes contain splicing factors of pre-mRNA. Eur. J. Entomol. 94: 393-407.
14. Alexandrova O.A., **Bogolyubov D.S.**, Tsvetkov A.G. 1998. The RNA synthesis in ovarioles of *Tentyria nomas taurica* and *Tenebrio molitor*. 6<sup>th</sup> Eur. Congress of Entomology. České Budějovice. 196-197.
15. **Bogolyubov D.** 1998. Splicing factors in oocyte nuclei of the mealworm *Tenebrio molitor* pupae revealed by immunoelectron microscopy. 6<sup>th</sup> Eur. Congress of Entomology. České Budějovice. 198.

16. Александрова О.А., **Боголюбов Д.С.**, Цветков А.Г. 1999. Синтез рРНК в овариолах жуков-чернотелок *Tentyria nomas taurica* и *Tenebrio molitor*. Цитология. 41 (1): 60-65.
17. Tsvetkov A., Alexandrova O., **Bogolyubov D.** 1999. Distribution of pre-mRNA splicing factors in the germinal vesicles of a beetle as revealed by immunoelectron microscopy. Mol. Biol. Cell. 10., Suppl.: 292A.
18. **Боголюбов Д.С.** 2000. Оогенез турбеллярий рода *Geocentrophora* по данным световой и электронной микроскопии. V. Ядерные структуры ооцитов, содержащие факторы сплайсинга пре-мРНК и процессинга пре-рРНК. Цитология. 42 (2): 136-145.
19. Баталова Ф.М., Степанова И.С., **Боголюбов Д.С.** 2000. В ядрах ооцитов скорпионницы *Panorpa communis* отсутствуют ядрышки. Цитология. 42 (3): 263.
20. **Боголюбов Д.С.** 2000. Электронно-иммуноцитохимическое выявление факторов созревания РНК в ядре ооцитов турбеллярий рода *Geocentrophora*. Цитология. 42 (3): 266-267.
21. **Боголюбов Д.С.**, Александрова О.А., Цветков А.Г., Парфенов В.Н. 2000. Кариосфера и ядерные органеллы ооцитов жука мучного хрущака *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Polyphaga). Цитология. 42 (3): 267.
22. **Bogolyubov D.**, Alexandrova O., Tsvetkov A., Parfenov V. 2000. An immunoelectron study of karyosphere and nuclear bodies in oocytes of mealworm beetle, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Polyphaga). Chromosoma. 109: 415-425.
23. Баталова Ф.М., Степанова И.С., **Боголюбов Д.С.** 2000. Тельца Кахала в ядрах ооцитов скорпионницы *Panorpa communis*. Цитология. 42 (11): 1037-1047.
24. **Bogolyubov D.**, Parfenov V. 2001. Immunogold localization of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing factors in *Tenebrio molitor* oocyte nuclei with special emphasis on karyosphere development. Tissue Cell. 33: 549-561.
25. **Bogolyubov D.**, Batalova F., Tsvetkov A., Parfenov V. 2002. Karyosphere and Cajal bodies in *Tenebrio molitor* and *Panorpa communis* oocytes. 7<sup>th</sup> Eur. Congress of Entomology. Thessaloniki. 21.
26. **Боголюбов Д.С.**, Цветков А.Г., Степанова И.С., Парфенов В.Н. 2002. Кариосфера и тельца Кахала в ооцитах жука-чернотелки. Цитология. 44 (9): 863.

27. Степанова И.С., **Боголюбов Д.С.** 2002. Ядро диплотенных ооцитов гигантской африканской улитки: ультраструктурное и иммуноцитохимическое исследование. Цитология. 44 (9): 907-908.
28. Степанова И.С., **Боголюбов Д.С.** 2003. РНК-полимераза II и факторы сплайсинга пре-мРНК в ядрах диплотенных ооцитов гигантской африканской улитки *Achatina fulica*. Цитология. 45 (2): 166-178.
29. **Боголюбов Д.С.**, Степанова И.С. 2003. Идентификация и структурно-функциональная характеристика телец Кахала в ооцитах насекомых. Цитология. 45 (9): 850-851.
30. **Боголюбов Д.С.** 2003. Тельца Кахала в ооцитах насекомых. I. Идентификация и иммуноцитохимическая характеристика телец Кахала в вителлогенных ооцитах жука-чернотелки. Цитология. 45 (11): 1083-1093.
31. **Bogolyubov D.**, Parfenov V. 2004. Do nuclear bodies in oocytes of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Polyphaga, Tenebrionidae) contain two forms of RNA polymerase II? Tissue Cell. 36: 13-17.
32. Parfenov V., Stepanova I., Batalova F., Pochukalina G., **Bogolyubov D.** 2004. Nuclear bodies in insect and mammalian oocytes. ELSO 2004 Proceedings. Nice. 278.
33. Batalova F.M., Stepanova I.S., Skovorodkin I.N., **Bogolyubov D.S.**, Parfenov V.N. 2005. Identification and dynamics of Cajal bodies in relation to karyosphere formation in scorpionfly oocytes. Chromosoma. 113: 428-439.
34. Степанова И.С., **Боголюбов Д.С.** 2005. Тельца Кахала в ядрах ооцитов домового сверчка *Acheta domesticus*. Онтогенез. 36 (5): 395.
35. Баталова Ф.М., Сковородкин И.Н., Степанова И.С., **Боголюбов Д.С.**, Парфенов В.Н. 2005. Особенности организации ядерных структур ооцитов скорпионницы *Panorpa communis*. Цитология. 47 (9): 792-793.
36. Степанова И.С., **Боголюбов Д.С.** 2005. Организация и состав внутриядерных телец ооцитов домового сверчка в норме и при искусственном подавлении транскрипции. Цитология. 47 (9): 834-835.
37. Баталова Ф.М., **Боголюбов Д.С.**, Парфенов В.Н. 2005. Кариосфера и экстрахромосомные ядерные тельца ооцитов скорпионницы *Panorpa communis*. Цитология. 47 (10): 847-859.
38. Stepanova I.S., **Bogolyubov D.S.**, Skovorodkin I.N., Parfenov V.N. 2007. Cajal bodies and interchromatin granule clusters in cricket oocytes: composition, dynamics and interactions. Cell Biol. Int. 31: 203-214.

39. Степанова И.С., **Боголюбов Д.С.**, Парфенов В.Н. 2007. Тельца Кахала в ооцитах насекомых. II. Новые данные по молекулярному составу телец Кахала ооцитов домового сверчка. К вопросу о взаимосвязи телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул. Цитология. 49 (1): 5-20.
40. **Боголюбов Д.С.** 2007. Оогенез турбеллярий рода *Geocentrophora* по данным световой и электронной микроскопии. VI. Локализация компонентов транскрипции в перихроматиновых зонах ядра ооцитов *G. baltica* с помощью иммуноэлектронной микроскопии. Цитология. 49 (3): 210-218.
41. **Bogolyubov D.** 2007. Localization of RNA transcription sites in insect oocytes using microinjections of 5-bromouridine 5'-triphosphate. Folia Histochem. Cytobiol. 45: 129-134.
42. **Боголюбов Д.С.**, Боголюбова И.О. 2007. Фактор сплайсинга SC35 и коилин совместно локализуются во «внутренних тельцах» - ядерных структурах ооцитов паука-крестовика. Цитология. 49 (6): 497-501.
43. **Bogolyubov D.S.**, Batalova F.M., Ogorzałek A. 2007. Localization of interchromatin granule cluster and Cajal body components in oocyte nuclear bodies of the hemipterans. Tissue Cell. 39: 353-364.
44. **Боголюбов Д.С.** 2007. Динамика транскрипционной активности в оогенезе некоторых насекомых. Цитология. 49 (9): 717-718.
45. **Bogolyubov D.**, Stepanova I. 2007. Interchromatin granule clusters in vitellogenic oocytes of the fleshfly, *Sarcophaga* sp. Folia Histochem. Cytobiol. 45: 401-403.
46. **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. 269: 59-110.

## СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Александрова О.А.**, Боголюбов Д.С., Грузова М.Н. 1995. Цитология. 37 (12): 1142-1150. **Александрова О.А.**, Боголюбов Д.С., Цветков А.Г. 1999. Цитология. 41 (1): 60-65. **Баталова Ф.М.**, Степанова И.С., Боголюбов Д.С. 2000. Цитология. 42 (11): 1037-1047. **Баталова Ф.М.**, Боголюбов Д.С., Парфенов В.Н. 2005. Цитология. 47 (10): 847-859. **Боголюбов Д.С.** 1994а. Цитология. 36 (3): 283-288. **Боголюбов Д.С.** 1994б. Цитология. 36 (4): 330-337. **Боголюбов Д.С.** 1994в. Цитология. 36 (4): 338-344. **Боголюбов Д.С.** 2000. Цитология. 42 (2): 136-145. **Боголюбов Д.С.** 2003. Цитология. 45 (11): 1083-1093. **Боголюбов Д.С.** 2007. Цитология. 49 (3): 210-218. **Боголюбов Д.С.**, Боголюбова И.О. 2007. Цитология. 49 (6): 497-501. **Боголюбов Д.С.**, Грузова М.Н. 1994. Цитология. 36 (3): 275-282. **Боголюбов Д.С.**, Тимошкин О.А. 1993. Зоол. журн. 72 (2): 17-26. **Боголюбов Д.С.**, Габаева Н.С., Мамкаев Ю.В., Тимошкин О.А. 1990. Труды ЗИН АН СССР. 221: 126-149. **Боголюбов Д.С.**, Александрова О.А.,

Цветков А.Г. 1997. Цитология. 39 (8): 643-650. **Гагинская Е.Р.** 1975. Онтогенез. 6 (6): 539-545. **Степанова И.С., Боголюбов Д.С.** 2003. Цитология. 45 (2): 166-178. **Степанова И.С., Боголюбов Д.С., Парфенов В.Н.** 2007. Цитология. 49 (1): 5-20. **Andrade L.E.C., Chan E.K.L., Raška I., et al.** 1991. J. Exp. Med. 173: 1407-1419. **Badian Z., Simiczyjew B., Kubrakiewicz J.** 2002. Zool. Polon. 47, Suppl.: 7. **Batalova F.M., Stepanova I.S., Skovorodkin I.N., Bogolyubov D.S., Parfenov V.N.** 2005. Chromosoma. 113: 428-439. **Bellini M.** 2000. Bioessays. 22: 861-867. **Bogolyubov D.** 2007. Folia Histochem. Cytobiol. 45: 129-134. **Bogolyubov D., Parfenov V.** 2001. Tissue Cell. 33: 549-561. **Bogolyubov D., Parfenov V.** 2004. Tissue Cell. 36: 13-17. **Bogolyubov D., Parfenov V.** 2008. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 269: 59-110. **Bogolyubov D., Stepanova I.** 2007. Folia Histochem. Cytobiol. 45: 401-403. **Bogolyubov D., Alexandrova O., Tsvetkov A., Parfenov V.** 2000. Chromosoma. 109: 415-425. **Bogolyubov D.S., Batalova F.M., Ogorzałek A.** 2007. Tissue Cell. 39: 353-364. **Cioce M., Lamond A.I.** 2005. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 21: 105-131. **Cmarko D., Verschure P.J., Martin T.E., et al.** 1999. Mol. Biol. Cell 10: 211-223. **Dundr M., Misteli T.** 2001. Biochem. J. 356: 297-310. **Fakan S.** 1994. Trends Cell Biol. 4: 86-90. **Gall J.G.** 2000. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 16: 273-300. **Gall J.G.** 2003. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 975-980. **Gall J.G., Callan H.G.** 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6635-6639. **Gall J.G., Tsvetkov A., Wu Z., Murphy C.** 1995. Dev. Genet. 16: 25-35. **Gall J.G., Bellini M., Wu Z., Murphy C.** 1999. Mol. Biol. Cell. 10: 4385-4402. **Gall J.G., Wu Z., Murphy C., Gao H.** 2004. Exp. Cell Res. 296: 28-34. **Gremigni V.** 1988. Fortschr. Zool. 36: 245-261. **Gruzova M.N., Parfenov V.N.** 1993. Int. Rev. Cytol. 144: 1-52. **Gruzova M.N., Zaichikova Z.P., Sokolov I.I.** 1972. Chromosoma. 37: 353-385. **Hall L.L., Smith K.P., Byron M., Lawrence J.B.** 2006. Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol. 288: 664-675. **Lamond A.I., Earnshaw W.C.** 1998. Science. 280: 547-553. **Lamond A.I., Spector D.L.** 2003. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 605-612. **Lemm I., Girard C., Kuhn A.N., et al.** 2006. Mol. Biol. Cell 17: 3221-3231. **Liu J.-L., Buszczak M., Gall J.G.** 2006a. Chromosome Res. 14: 465-475. **Liu J.-L., Murphy C., Buszczak M., et al.** 2006b. J. Cell Biol. 172: 875-884. **Matera A.G.** 1999. Trends Cell Biol. 9: 302-309. **von Mikecz A., Zhang S., Montminy M., et al.** 2000. J. Cell Biol. 150: 265-274. **Misteli T.** 2007. Cell. 128: 787-800. **Misteli T., Spector D.L.** 1998. Curr. Opin. Cell Biol. 10: 323-331. **Monneron A., Bernhard W.** 1969. J. Ultrastruct. Res. 27: 266-288. **Parfenov V.N., Pochukalina G.N., Davis D.S., et al.** J. Cell. Biochem. 89: 720-732. **Raška I., Andrade L.E.C., Ochs R.L., et al.** 1991. Exp. Cell Res. 195: 27-37. **Shpargel K.B., Ospina J.K., Tucker K.E., et al.** 2003. J. Cell Sci. 116: 303-312. **Spector D.L.** 1993. Annu. Rev. Cell Biol. USA. 9: 265-315. **Spector D.L.** 1996. Exp. Cell Res. 229: 189-197. **Spector D.L., Fu X.-D., Maniatis T.** 1991. EMBO J. 10: 3467-3481. **Stepanova I.S., Bogolyubov D.S., Skovorodkin I.N., Parfenov V.N.** 2007. Cell Biol. Int. 31: 203-214. **Tsvetkov A., Alexandrova O., Bogolyubov D., Gruzova M.** 1997. Eur. J. Entomol. 94: 393-407. **Wu C.-H., Gall J.G.** 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 6257-6259. **Wu Z., Murphy C., Callan H.G., Gall J.G.** 1991. J. Cell Biol. 113: 465-483.