РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ХРОМАТИНА В ЯДРАХ РАСТУЩИХ ООЦИТОВ *XENOPUS LAEVIS*

К.Н. Морозова, А.А. Струнов, Е.В. Киселева

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: elka@bionet.nsc.ru

Проведено комплексное ультраструктурное исследование распределения хроматина в ядрах ооцитов *Xenopus laevis* на 3-й стадии роста. С использованием модифицированного метода выделения ядер из ооцитов и высокоразрешающей сканирующей электронной микроскопии установлено, что хроматин в ооцитах амфибий слабо связан с актинсодержащими филаментами и не взаимодействует непосредственно с ядерной оболочкой. С помощью иммуноэлектронной микроскопии выявлено присутствие белка LAP2β на хроматиновых фибриллах, свидетельствующее о возможном временном прикреплении хромосом к ламине ядерной оболочки. Впервые продемонстрировано стабильное и прочное взаимодействие хроматина с тельцами Кахала, содержащими комплекс сплайсосомных белков. Полученные данные свидетельствуют о специфическом распределении и взаимодействии хроматина с внутриядерными структурами в растущих ооцитах амфибий. Предложена схема организации внутриядерного пространства ооцитов амфибий.

Ключевые слова: хроматин, тельца Кахала, ядерная оболочка, ооциты амфибий, сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия.

Введение

Особенности организации интерфазного ядра в трехмерном пространстве, взаимодействие и динамика его индивидуальных компартментов, не имеющих, в отличие от цитоплазматических органелл, оболочек, интенсивно исследуются в настоящее время, поскольку это расширяет наши представления о механизмах регуляции экспрессии генов. В ядре различают хромосомные территории и межхромосомное пространство, по которому диффундируют макромолекулярные комплексы, необходимые для репликации, транскрипции, сплайсинга и репарации ДНК (Cremer, Cremer, 2001).

С использованием гибридизации *in situ* и многоцветного бэндинга (Multi Color Banding) показано, что в соматических клетках индивидуальные хромосомы занимают различные участки и радиально распределены во внутриядерном пространстве (Cremer, Cremer, 2010). Хромосомы, обедненные генами, как правило, выявляются на периферии ядра в отличие от центрально расположенных хромосом с большим числом кодирующих последовательностей. Хромосомные территории могут изменять свою организацию как в разных клетках одного организма, так и в ответ на различные внешние воздействия. Продемонстрирована эволюционная консервативность подобного расположения интерфазных хромосом (Tanabe *et al.*, 2002), однако пока точно не установлено, что определяет специфичность их местонахождения (Geyer *et al.*, 2011). Предполагается, что большую роль в этом играют компоненты внутриядерного матрикса, связь с которыми осуществляется с участием так называемых SAR/MAR (Scaffold/ Matrix attachment regions) последовательностей ДНК (Chattopadhyay, Pavithra, 2007).

На срезах интерфазных ядер соматических клеток конденсированный и обедненный генами хроматин располагается, как правило, по периферии ядра и тесно контактирует с внутренней мембраной ядерной оболочки (Kopecný, Fakan, 1992). При электронно-микроскопическом исследовании глыбок компактного хроматина внутри ядра транскрипционно активные домены определяются преимущественно на его поверхности, а внутри локализуются участки, содержащие молчащие гены (Koberna *et al.*, 2002).

Белковый состав внутриядерного матрикса гетерогенен и сильно зависит от способов и условий его выделения (Zbarsky, Georgiev, 1959; Georgiev, Chentsov, 1962; Berezney, Coffey, 1977; Nickerson, 2001). В составе ядерного матрикса после удаления из ядер ДНК, РНК и гистонов выявляются ламины, топоизомераза II, остаточные ядрышки, белок В23, а также некоторые РНК-связывающие и негистоновые белки, формирующие сеть микрофиламентов различного диаметра (Berezney et al., 1995). Недавно продемонстрировано наличие специфических белков на поверхности метафазных хромосом, которые, возможно, имеют отношение к белкам внутриядерного матрикса (Мурашева, Ченцов, 2010). К белкам ядерного матрикса относят также ДНК-связывающие белки – матрины, которые в комплексе с ламинами могут определять локализацию хромосом в интерфазном ядре и формировать гранулярно-фибриллярную сеть во внутриядерном пространстве (Erazo et al., 2011). Показано, что в процессе митоза белки ядерного матрикса вместе с белками ядерной оболочки могут принимать участие в регуляции формирования микротрубочек веретена деления и в перемещении метафазных хромосом (Johansen et al., 2011). В ядре также обнаружены актин и миозин, участвующие в регуляции транскрипции и биогенезе прерибосомных субъединиц (Castano et al., 2010; Obrdlik et al., 2010).

Ядерная ламина, входящая в состав ядерного матрикса, формирует сеть промежуточных филаментов, прилегающих к внутренней мембране ядерной оболочки, и через ламинсвязывающие домены ДНК (Guelen et al., 2008) вместе с белками внутренней мембраны ядерной оболочки участвует в регуляции репликации и транскрипции, а также определяет расположение интерфазных хромосом в трехмерном пространстве ядра (Towbin et al., 2009; Kind, van Steensel, 2010). Ядерные поровые комплексы (ЯПК) могут также взаимодействовать с ДНК (Liang, Hetzer, 2011), но это чаще всего регистрируется либо в нуклеоплазме, либо на филаментах, отходящих от баскет-структуры ЯПК, а не на индивидуальных компонентах пор (Arlucea et al., 1998; Capelson et al., 2010; Kalverda et al., 2010).

Характерным свойством ядра является наличие большого количества мобильных сферических телец, представляющих скопления специфических белков, участвующих в регуляции различных внутриядерных процессов (Lamond, Spector, 2003; Hancock, 2004). Среди них наиболее изученными являются ядрышки, представляющие центры синтеза рибосомальных РНК, и тельца Кахала, обеспечивающие процессинг мРНК и содержащие сплайсосомные белки в высокой концентрации, а также РНК-полимеразу II и многие транскрипционные факторы (Gall, 2003; Степанова и др., 2007). Характерным признаком телец Кахала является челночный белок коилин, способный доставлять к ним различные молекулярные комплексы (Cioce, Lamond, 2005).

Ооциты амфибий, благодаря своим крупным размерам, представляют удобный объект для исследования архитектуры ядра и динамической организации внутриядерных компартментов. Они были успешно использованы для изучения функциональной морфологии хромосом типа ламповых щеток (Красикова, Гагинская, 2010), а также анализа структуры хроматина и оценки уровня экспрессии генов (Sommerville, 2010). В огромном ядре ооцита Xenopus laevis содержится несколько тысяч ядрышек и сферических телец, среди которых большое количество телец Кахала (Callan et al., 1991). Показано, что в составе телец Кахала ооцитов амфибий выявляется, помимо сплайсосомных белков и коилина, высокая концентрация U7 мяРНК и других факторов, вовлеченных в процессинг гистоновой пре-мРНК (Wu, Gall, 1993; Abbott et al., 1999).

Использование высокоразрешающей сканирующей электронной микроскопии в сочетании с модифицированными методами изоляции ядер из ранних ооцитов *X. laevis* обеспечило существенный прогресс в изучении структурно-функциональной организации ядра и его индивидуальных компонентов (Kiseleva *et al.*, 1996, 2007; Goldberg *et al.*, 1997; Stick, Goldberg, 2010). В ядрах этих клеток была обнаружена сеть актинсодержащих филаментов, контактирующих с ядерной оболочкой и поровыми комплексами (Parfenov *et al.*, 1995; Kiseleva *et al.*, 2004). В работе с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было продемонстрировано радиальное распределение хромосом в ядре растущих ооцитов птиц (Маслова, Красикова, 2011). Это свидетельствует о том, что ооциты представляют удобную модель для изучения взаимного распределения индивидуальных компонентов ядра и его трехмерной организации.

В настоящей работе впервые с использованием высокоразрешающей сканирующей электронной микроскопии проведено исследование особенностей расположения и связывания хроматина с ядерной оболочкой, внутриядерными филаментами и тельцами Кахала в ранних ооцитах X. laevis.

Материалы и методы

Объектом исследования служили ооциты шпорцевых лягушек *X. laevis*. Амфибий содержали в профильтрованной и аэрированной воде при комнатной температуре. Животных усыпляли хлороформом, яичники с ооцитами выделяли из вскрытой брюшины и переносили в раствор Рингера для амфибий: 17мМ NaCl, 5мМ KCl и 1мМ CaCl₂ (Kiseleva *et al.*, 2004). Ооциты на ранней (2-й) стадии развития идентифицировали по размерам и пигментированности согласно классификации Дьюри (Dumont, 1972). Изолированные ядра выделяли по ранее описанной методике (Kiseleva *et al.*, 2004).

Просвечивающая электронная микроскопия

Для электронно-микроскопического анализа ооциты фиксировали 2,5%-м раствором глутаральдегида в 0,1 М НЕРЕЅ-буфере pH = 7,4 (Sigma, США) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем дофиксировали в 1%-м растворе тетраоксида осмия («Аурат», Россия) на буфере НЕРЕЅ в течение 1 ч при 4°С. После фиксации образцы отмывали в дистиллированной воде, обезвоживали, заключали в смолу Агар-100 (Agar Scientific, Англия) и полимеризовали в термостате при 60°С (Морозова, Киселева, 2006).

Для визуализации внутриядерных актиновых филаментов в просвечивающем электронном микроскопе использовали метод фиксации ооцитов по Parfenov с соавт. (1995). Ультратонкие срезы толщиной около 50–70 нм получали с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме Ultracut (Reichert, Австрия) и контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца (Serva, Германия). Окрашенные ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе LEO 910 (Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Сканирующая электронная микроскопия

Яичники удаляли хирургически и помещали в раствор Рингера для амфибий (111 мМ NaCl, 1,9 MM KCl, 1,1 MM CaCl₂, 2,4 MM NaHCO₃ (Kiseleva et al., 2004). Маленькие кусочки яичника помещали в чашку Петри с буфером А (83 MM KCl, 17 MM NaCl, 10 MM Hepes, 250 MM сахарозы, 3 мМ (или 0,3 мМ) MgCl₂, pH = 7,4). Кремниевые чипы, предварительно покрытые полилизином, размещали в той же чашке рядом с ооцитами. Все растворы держали на льду. Ооциты X. laevis на 2-й стадии развития идентифицировали по диаметру (около 400 мкм) и светло-коричневой окраске. Стадия 2 оогенеза была выбрана по причине высокой активности транскрипции в этот период, и поскольку изоляция ядер происходит легче и быстрее, чем на стадии 6, вероятно, из-за меньшего количества желточных гранул на стадии 2. Ядро каждого ооцита выделяли вручную с помощью стеклянных игл, после чего осторожно и быстро освобождали его от окружающей цитоплазмы. Два или три изолированных ядра переносили на расположенную рядом кремниевую пластинку (чип), а их ядерные оболочки аккуратно открывали с помощью стеклянной иглы. Для получения распластанного содержимого ядра нуклеоплазму слегка прижимали стеклянной иглой и осторожно слегка растягивали по поверхности чипа. Как в случае слегка распластанных, так и «интактных» образцов, чипы фиксировали и проводили в охлажденных на льду растворах: перенос чипов из чашки в чашку осуществляли, не допуская высыхания, каплю предыдущего раствора оставляли на чипе. Образцы фиксировали в течение 10 мин в растворе, содержащем 2%-й глутаральдегид (Sigma, CША), 0,2%-ю таниновую (tannic) кислоту, 10 мМ трис HCl (pH = 7,4) и 3 мМ MgCl₂ (фиксатор А). Важно отметить, что время,

проходящее от изоляции ядер до помещения их в фиксатор, не превышало 5-10 с. Фиксированные образцы подвергали постфиксации в 1 %-м растворе OsO_4 в течение 30 мин, промывали в 2 сменах дистиллированной воды, окрашивали 20 мин в 1 %-м уранилацетате, обезвоживали в этиловом спирте и подвергали высушиванию в критической точке, используя ацетон в качестве переходного растворителя. Затем образцы напыляли слоем хрома толщиной 4 нм, используя напылитель Edwards Auto 306 (UK) с криовакуумной системой, и изучали в высокоразрешающем сканирующем микроскопе DS 130F feSEM (Japan) при ускоряющем напряжении 30 кВ. Для подсчета контактов хроматина с ядерной оболочкой, внутриядерными филаментами и сферическими тельцами исследовали случайно выбранные участки периферии открытых ядер со слегка распластанным содержимым на малом увеличении (см. рис. 1, б в качестве примера). Всего было проанализировано по одному участку размером 12×20 мкм для каждого из 10 ядер, выделенных из ранних ооцитов.

Для проверки прочности связывания ДНК с внутриядерными структурами после вырезания большого фрагмента ядерной оболочки стеклянными иголками, покрытыми полилизином, прикасались к хроматиновым фибриллам и через сформированное отверстие вытягивали хроматин из внутреннего объема ядра, после чего ядро раскрывали полностью и быстро фиксировали образец потоком фиксатора А для сохранения нативной конформации внутриядерных структур. Далее образцы обрабатывали и подготавливали согласно вышеописанной методике для сканирующей электронной микроскопии. В электронном микроскопе анализировали контакты остаточных хроматиновых фрагментов с ядерной оболочкой, внутриядерными филаментами и сферическими тельцами.

Иммуногистохимия

Для иммуногистохимических исследований использовали коммерческие антитела к актину (Sigma, CIIIA), антитела Y-12, узнающие эпитопы 6 сплайсосомных белков (Pettersson *et al.*, 1984), а также поликлональные антитела к LAP2 β (Lang, Krohne, 2003). Ядра ооцитов *X. laevis* на 2–3-й стадии выделяли вручную, как описано выше. Затем их фиксировали 15 мин при 22–24 °С в 3,7 %-м формальдегиде, 3 мМ MgCl₂, 0,2 %-й таниновой кислоте и 10 мМ трис HCl (pH = 7,0). Зафиксированные образцы отмывали 3 раза (по 1 мин каждый) в солевом фосфатном буфере (PBS), затем инкубировали 30 мин в PBS, содержащем 1%-й бычий сывороточный альбумин (BSA), отмывали в PBS и инкубировали 1-3 ч с первичными антителами против актина, сплайсосомных белков или LAP2β (разведение 1:100) в PBS. Затем образцы отмывали 3 раза в PBS, после чего инкубировали 1 час с вторичными антителами, меченными золотом (диаметр частиц – 10 нм) (Amersham, Великобритания). В качестве отрицательного контроля использовали меченые золотом вторичные антитела, разведенные в PBS 1:20. Все образцы затем подготавливали для сканирующей микроскопии по методу, описанному выше.

Результаты и обсуждение

Незрелые ооциты X. laevis с 1-й по 6-ю стадии развития находятся в профазе І мейоза, которая может продолжаться в течение нескольких месяцев (Ferrell, 1999). При этом хроматин остается частично деконденсированным и транскрипционно активным, в то время как Cdc2 еще не функционирует, а ЯдО сохраняет свою целостность. При исследовании в сканирующем микроскопе изолированные ооциты амфибий на 2-й стадии развития содержат растущее ядро, на поверхности которого уже в световом микроскопе видны выпячивания ядерной оболочки, свидетельствующие об активном формировании ее новых фрагментов (рис. 1, а). При частичном удалении ЯдО изолированных ядер на препаратах, анализируемых в сканирующем электронном микроскопе, хорошо различаются наружная и внутренняя мембраны оболочки ядра с пузырьками ЭПР и разветвленная сеть внутриядерных филаментов, контактирующих с большим количеством сферических телец и ядерной оболочкой (рис. 1, б). Подробный анализ морфологии и состава внутриядерных филаментов, проведенный нами ранее с использованием сканирующей иммуноэлектронной микроскопии, показал, что они содержат актин и ряд других белков, обладают



Рис. 1. Визуализация компонентов ядра ооцита X. laevis на 2-й стадии роста.

а – общий вид ядра на малом увеличении; б – фрагмент «открытого» ядра, видны ядерная оболочка (ЯдО), внутриядерные филаменты и сферические тельца (СТ); в–д – фрагменты ядер на срезах целого ооцита, компактное ядрышко (ЯД) и хроматин (Х) средней электронной плотности располагаются вблизи мембраны ядерной оболочки; е – раздельное расположение скопления внутриядерных филаментов и хроматиновых фибрилл в изолированном нуклеоиде. а – световая микроскопия; б, в, г, д – просвечивающая электронная микроскопия; е – сканирующая электронная микроскопия.

спиральной скрученностью и имеют средний диаметр около 40 нм (Kiseleva *et al.*, 2004).

При исследовании срезов целых ооцитов в ядрах выявляется большое количество сферических телец, а также ядрышек (рис. 1, в), что свидетельствует о высокой транскрипционной активности в ядре ооцита на этой стадии развития. Известно, что в ооцитах *X. laevis* рибосомные гены (рДНК) селективно амплифицируются в течение поздней зиготены и ранней пахитены в профазе мейоза I, и амплифицированная рДНК распределяется приблизительно в 1,5 тыс. экстрахромосомных ядрышек диаметром 10-15 мкм (Wu, Gall, 1997). Наши исследования показали, что на срезах целых ооцитов компактные ядрышки располагаются по всему ядру, иногда недалеко от ЯдО, но никогда – в контакте с ней. В то же время глыбки хроматина средней электронной плотности могут находиться в непосредственной близости к оболочке ядра (рис. 1, г, д). При исследовании внутреннего содержимого ядер в сканирующем электронном микроскопе хроматин имеет вид крупных скоплений рыхлого материала, отличающегося по структуре от внутриядерных актинсодержащих филаментов (рис. 1, е). После осторожного диспергирования хроматина стеклянными иголками в его составе выявляются расправленные нити транскрипционно активной ДНК с короткими РНП фибриллами диаметром 7-10 нм (рис. 2, а), а также ДНК с регулярно расположенными РНП частицами диаметром от 10 нм до 22 нм (рис. 2, б). Исследование процесса транскрипции генов Колец Бальбиани (КБ2) в клетках слюнных желез хирономуса показало, что формирование РНП частиц происходит в результате упаковки 7 нм мРНК с белками в 10 нм фибриллу, которая увеличивается в размере и реорганизуется затем в зрелую РНП частицу (Daneholt, 1997).

Выявляемый на препаратах неактивный хроматин имеет вид скоплений, состоящих из скрученных 30 нм фибрилл (рис. 2, в). Несмотря на то что упаковка ДНК в 30 нм фибриллы оспаривается некоторыми авторами (Eltsov *et al.*, 2008), наши исследования с использованием как просвечивающей, так и сканирующей электронной микроскопии поддерживают существование подобного уровня организации ДНК.

В ядрах соматических клеток ламины А- и В-типа способны связывать ДНК и хроматин (Taniura *et al.*, 1995). Анализ распределения внутриядерных компонентов в периферических отделах ядра показал, что хроматин в виде диффузных скоплений контактирует с внутриядерными актинсодержащими филаментами и располагается вблизи ЯдО, однако прямой связи его с внутренней мембраной ЯдО или ядерными порами не наблюдается (рис. 3, а, б). Это согласуется с ранее проведенными исследованиями (Gall *et al.*, 1999; Красикова, Гагинская, 2010) и обусловлено, очевидно, необходимостью свободного перемещения хромосом и их бивалентов в нуклеоплазме на стадии профазы I мейоза. В то же время нельзя исключить возможность временного прикрепления хромосом к оболочке ядра через какие-либо белки-посредники, например ламинсвязывающие белки.

В отличие от высших позвоночных, в клетках которых экспрессируются ламины A/C (в дифференцированных клетках) и ламин B, необходимый для жизнедеятельности любых клеток (Hutchison, 2002), в ооцитах амфибий синтезируются 3 специфичных ламина B-типа: LI, LII (ламин B2) и LIII (ламин B3) (Lourim *et al.*, 1996). Ламин B3 участвует в формировании ламины ядра ооцита в виде тонкого слоя промежуточных филаментов, прилежащего к внутренней мембране ЯдО (Goldberg *et al.*, 2008).

Наши иммуно-электронно-микроскопические исследования показали, что антитела к ламину ВЗ слабо связываются с хроматином (рис. 4, а, б), в то время как антитела к ламинсвязывающему белку LAP2 выявляются в составе изолированного из ядра хроматина (рис. 4, в). Присутствие этого белка в ядрах ооцитов амфибий было известно (Lang, Krohne, 2003). Показано, что LAP2β взаимодействует с ламином ВЗ, а также с ВАГ (хроматин-ремодулирующий фактор) (Shumaker et al., 2001). LAP2-белки относятся к группе трансмембранных белков, связанных с ламиной, однако недавно было продемонстрировано, что один из этих белков (XLAP2β) выявляется также внутри ядра ооцитов в составе кластеров гетерохроматина (Chmielewska et al., 2011). Авторы предполагают, что на стадии профазы І мейоза, когда хроматин частично деконденсируется и активно перемещается внутрь ядра, его взаимодействие с интегральными белками мембран ЯдО нарушается и гидрофобные фрагменты (или изоформы) этих белков остаются ассоциированными с хроматином. Выявленное нами присутствие LAP2β на хроматине из ранних ооцитов амфибий согласуется с этими данными и позволяет предполагать, что LAP2β (или его изоформы) может быть вовлечен в организацию хроматина в профазе І мейоза.

Ранее была обнаружена тесная связь актинсодержащих филаментов со сферическими тельцами внутри ядер ранних ооцитов из *Rana temporaria* и из *X. laevis* (Parfenov *et al.*, 1995;



Рис. 2. Вид хроматина разной степени компактизации в нуклеоиде X. laevis.

а – расправленные нити транскрипционно активной ДНК (белые стрелки) и компактный хроматин (двойные белые стрелки); б – РНП частицы на нитях ДНК; в – фрагмент компактного хроматина, состоящий из скрученных 30 нм фибрилл на большом увеличении. Сканирующая электронная микроскопия.

Kiseleva *et al.*, 2004). Настоящие исследования показали, что многие из этих телец метятся антителами к сплайсосомным белкам (рис. 4, г, д) и являются тельцами Кахала, содержащими РНК-полимеразы и комплекс различных факторов, вовлеченных в транскрипцию и процессинг всех типов РНК (Gall, 2001). С каждым сферическим тельцем обычно контактируют от 2 и более внутриядерных филаментов, что обнаруживается не только внутри изолиро-



Рис. 3. Расположение хроматина вблизи внутренней мембраны ядерной оболочки.

а, б – хроматин имеет вид 30 нм фибрилл (стрелки) и контактирует с внутриядерными филаментами. Ядерные поровые комплексы (ЯПК) отмечены маленькими стрелками.

ванного ядра ооцитов, но и на срезах целых ооцитов в ядрах после удаления ДНК (рис. 5, а). Установлено, что скопления хроматиновых фибрилл часто контактируют со сферическими тельцами Кахала (рис. 5, б–д).

Количественный анализ наблюдаемых в сканирующем микроскопе контактов хроматина

с внутриядерными компонентами в ядрах, изолированных из 10 ооцитов *X. laevis*, подтвердил отсутствие его связи с ядерной оболочкой и незначительное взаимодействие с актинсодержащими филаментами (табл. 1).

Наиболее часто хроматин контактировал с тельцами Кахала и, как показали эксперименты



Рис. 4. Иммуногистохимическое выявление ламинов и сплайсосомных белков на внутриядерных структурах с помощью антител, меченных золотом.

а, б – слабое мечение хроматина антителами к ламину В3 (стрелки); в – интенсивное мечение хроматина антителами к ламинсвязывающему белку LAP2β (стрелки и кружки), г, д – распределение сплайсосомных белков в тельцах Кахала. а, в, г, д – сканирующая электронная микроскопия (позитивное изображение), б – сканирующая электронная микроскопия с использованием бэкскатера (backscatter) (негативное изображение).

по удалению большей части хроматина из ядер, эта связь является наиболее стабильной. Это обусловлено, очевидно, активными процессами транскрипции и сплайсинга РНК в функционально активных участках хроматина. Связь хроматина с внутриядерными филаментами в этом эксперименте практически не была зарегистрирована. На основании полученных результатов предложена гипотетическая схема организации периферических отделов ядра ран-



Рис. 5. Тесные контакты между внутриядерными компонентами.

а – контакты актинсодержащих филаментов со сферическими тельцами на срезах целых ооцитов после удаления ДНК; б–д – тесное взаимодействие между хроматином (X), сферическими тельцами (CT) и актинсодержащими внутриядерными филаментами (ВФ). а – просвечивающая, б–д – сканируюшая электронная микроскопия. Таблица 1

Контакты хроматина с внутриядерными структурами

	Контакты хроматина		
Ядро	с внутри- ядерными филамен- тами	с ядерной оболочкой	со сфери- ческими тельцами
1	5	3	10
2	3	0	8
3	2	0	12
4	0	2	16
5	2	0	12
6	5	0	18
7	3	2	15
8	7	3	10
9	3	0	17
10	6	3	13
Суммарное количество контактов	36	13	131
Среднее количество контактов	3,6 ± 1,5	1,3 ± 1,0	13,1 ± 2,4

него ооцита амфибий (рис. 6), согласно которой хроматин имеет специфическое, отличное от интерфазных клеток, распределение во внутриядерном пространстве.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили впервые исследовать трехмерную организацию периферических отделов ядра ранних ооцитов X. laevis в сканирующем электронном микроскопе и получить дополнительную информацию о возможных контактах хроматина с внутриядерными компонентами. Несмотря на то что стабильная связь хроматина была выявлена только с тельцами Кахала, следует отметить, что эти тельца тесно взаимодействуют с высокодинамичными филаментами ядерного матрикса, содержащими актин и миозин (Obrdlik, 2010). Известно, что концентрация актина в ядре ооцитов амфибий существенно выше, чем в ядре соматических клеток и составляет 4-6 мг/мл (Clark, Rosenbaum, 1979; Pederson, Aebi, 2002). Совокупность этих данных свидетельствует о том, что компоненты ядерного матрикса могут



Рис. 6. Схема взаимодействия хроматина с внутриядерными структурами.

Хроматин наиболее стабильно контактирует с тельцами Кахала – участками сплайсинга РНК (отмечено кольцами) и слабо – с актинсодержащими филаментами и внутренней мембраной ядерной оболочки (отмечено двойными кольцами).

быть вовлечены в регуляцию активного перемещения и необходимой ориентации хромосом, а также, возможно, их реорганизации на разных стадиях профазы I в ооцитах амфибий.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 10-04-01426 и № 10-04-01469, и гранта Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (6.12).

Литература

- Красикова А.В., Гагинская Е.Р. Организация центромерных районов хромосом на стадии ламповых щеток // Цитология. 2010. Т. 52. № 7. С. 515–533.
- Маслова А.В., Красикова А.В. Пространственное распределение макро-, миди- и минихромосом в транскрипционно активных ядрах растущих ооцитов птиц отряда Calliformes // Цитология. 2011. Т. 53. № 2. С. 116–128.
- Морозова К.Н., Киселева Е.В. Морфометрический анализ динамики эндоплазматического ретику-

лума в растущих ооцитах амфибий // Цитология. 2006. Т. 48. № 12. С. 980–990.

- Мурашева М.И., Ченцов Ю.С. Белки ядерного матрикса с молекулярными массами 38 и 50 кДа, транспортируемые хромосомами в митозе // Цитология. 2010. Т. 52. № 9. С. 760–769.
- Степанова И.С., Боголюбов Д.С., Парфенов В.Н. Тельца Кахала в ооцитах насекомых. П. Новые данные по молекулярному составу телец Кахала ооцитов домового сверчка. К вопросу о взаимосвязи телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул // Цитология. 2007. Т. 49. № 1. С. 5–20.
- Abbott J., Marzluff W.F., Gall J.G. The stem loop binding protein (SLBP1) is present in coiled bodies of the *Xenopus* germinal vesicle // Mol. Biol. Cell. 1999. V. 10. P. 487–499.
- Arlucea J., Andrade R., Alonso R., Arechaga J. The nuclear basket of the nuclear pore complex is part of a higher-order filamentous network that is related to chromatin // J. Struct. Biol. 1998. V. 124. P. 51–58.
- Berezney R., Coffey D.S. Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei // J. Cell Biol. 1977. V. 73. N 3. P. 616–637.
- Berezney R., Mortillaro M.J., Ma H. *et al.* The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function // Int. Rev. Cytol. 1995. V. 162A. P. 1–65.
- Callan H.G., Gall J.G., Murphy C. Histone genes are located at the sphere loci of *Xenopus* lampbrush chromosomes // Chromosoma. 1991. V. 101. P. 245–251.
- Capelson M., Liang Y., Schulte R. *et al.* Chromatinbound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes // Cell. 2010. V. 140. N 3. P. 372–383.
- Castano E., Philimonenko V.V., Kahle M. *et al.* Actin complexes in the cell nucleus: new stones in an old field // Histochem. Cell Biol. 2010. V. 133. N 6. P. 607–626.
- Chattopadhyay S., Pavithra L. MARs and MARBPs: key modulators of gene regulation and disease manifestation // Subcell. Biochem. 2007. V. 41. P. 213–230.
- Chmielewska M., Dubińska-Magiera M., Sopel M. et al. Embryonic and adult isoforms of XLAP2 form microdomains associated with chromatin and the nuclear envelope // Cell Tissue Res. 2011. V. 344. P. 97–110.
- Cioce M., Lamond A.I. Cajal bodies: a long history of discovery // Annu. Rev. Cell. Develop. Biol. 2005. V. 21. P. 105–131.
- Clark T.G., Rosenbaum J.L. An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes // Cell. 1979. V. 18. N 4. P. 1101–1108.
- Cremer T., Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells // Nat. Rev. Genet. 2001. V. 2. N 4. P. 292–301.

- Cremer T., Cremer M. Chromosome territories // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010. V. 2. N 3. P. 1–22.
- Daneholt B.A. Look at messenger RNP moving through the nuclear pore // Cell. 1997. V. 88. N 5. P. 585–588.
- Dumont J.N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals // J. Morphol. 1972. V. 136. P. 153–179.
- Eltsov M., Maclellan K.M., Maeshima K. *et al.* Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes *in situ* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. N 50. P. 19732–19737.
- Erazo A., Yee M.B., Banfield B.W., Kinchington P.R. The alphaherpesvirus US3/ORF66 protein kinases direct phosphorylation of the nuclear matrix protein matrin 3 // J. Virol. 2011. V. 85. N 1. P. 568–581.
- Ferrell J.E. Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg // BioEssays. 1999. V. 21. P. 833–842.
- Gall J.G. A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery // FEBS Lett. 2001. V. 498. P. 164–167.
- Gall J.G. The centennial of the Cajal body // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003. V. 4. P. 975–980.
- Gall J.G., Bellini M., Wu Z., Murphy C. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes // Mol. Biol. Cell. 1999. V. 12. P. 4385–4402.
- Georgiev G.P., Chentsov J.S. On the structural organization of nucleolo-chromosomal ribonucleoproteins // Exp. Cell Res. 1962. V. 27. P. 570–572.
- Geyer P.K., Vitalini M.W., Wallrath L.L. Nuclear organization: taking a position on gene expression // Curr. Opin. Cell Biol. 2011. V. 23. N 3. P. 354–359.
- Goldberg M.W., Huttenlauch I., Hutchison C.J., Stick R. Filaments made from A- and B-type lamins differ in structure and organization // J. Cell Sci. 2008. V. 121. P. 215–225.
- Goldberg M.W., Wiese C., Allen T.D., Wilson K.L. Dimples, pores, star-rings, and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structural intermediates in nuclear pore complex assembly // J. Cell Sci. 1997. V. 110. P. 409–420.
- Guelen L., Pagie L., Brasset E. *et. al.* Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions // Nature. 2008. V. 453. N 7197. P. 948–951.
- Hancock R. Internal organization of the nucleus: assembly of compartments by macromolecular crowding and the nuclear matrix model // Biol. Cell. 2004. V. 96. N 8. P. 595–601.
- Hutchison C.J. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002. V. 3. N 11. P. 848–858.

- Johansen K.M., Forer A., Yao C. *et al.* Do nuclear envelope and intranuclear proteins reorganize during mitosis to form an elastic, hydrogel-like spindle matrix? // Chromosome Res. 2011. V. 19. N 3. P. 345–365.
- Kalverda B., Pickersgill H., Shloma V.V., Fornerod M. Nucleoporins directly stimulate expression of developmental and cell-cycle genes inside the nucleoplasm // Cell. 2010. V. 140. N 3. P. 360–371.
- Kind J., van Steensel B. Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation // Curr. Opin. Cell Biol. 2010. V. 22. N 3. P. 320–325.
- Kiseleva E., Drummond S.P., Goldberg M.W. *et al.* Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei // J. Cell Sci. 2004. V. 117. Pt 12. P. 2481–2490.
- Kiseleva E., Goldberg M.W., Daneholt B., Allen T.D. RNP export is mediated by structural reorganization of the nuclear pore basket // J. Mol. Biol. 1996. V. 260. N 3. P. 304–311.
- Kiseleva E., Morozova K.N., Voeltz G.K. *et al.* Reticulon 4a/NogoA and nuclear envelope growth // J. Struct. Biol. 2007. V. 160. N 2. P. 224–235.
- Koberna K., Malínský J., Pliss A. *et al.* Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of «Christmas trees» *in situ* // J. Cell Biol. 2002. V. 157. N 5. P. 743–748.
- Kopecný V., Fakan S. Extranucleolar genome reactivation: topochemical studies on early bovine embryo. A review // Acta Histochem. Suppl. 1992. V. 42. P. 301–309.
- Lamond A.I., Spector D.L. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003. V. 4. P. 605–612.
- Lang C., Krohne G. Lamina-associated polypeptide 2beta (LAP2beta) is contained in a protein complex together with A- and B-type lamins // Eur. J. Cell Biol. 2003. V. 82. N 3. P. 143–53.
- Liang Y., Hetzer M.W. Functional interactions between nucleoporins and chromatin // Curr. Opin. Cell Biol. 2011. V. 23. N 1. P. 65–70.
- Lourim D., Kempf A., Krohne G. Characterization and quantitation of three B-type lamins in Xenopus oocytes and eggs: increase of lamin LI protein synthesis during meiotic maturation // J. Cell Sci. 1996. V. 109. P. 1775–1785.
- Nickerson J. Experimental observations of a nuclear matrix // J. Cell Sci. 2001. V. 114. P. 463–474.

- Obrdlik A., Louvet E., Kukalev A. *et al.* Nuclear myosin 1 is in complex with mature rRNA transcripts and associates with the nuclear pore basket // FASEB J. 2010. V. 24. N 1. P. 146–157.
- Parfenov V.N., Davis D.S., Pochukalina G.N. *et al.* Nuclear actin filaments and their topological changes in frog oocytes // Exp. Cell Res. 1995. V. 217. N 2. P. 385–394.
- Pederson T., Aebi U. Actin in the nucleus: what form and what for? // J. Struct. Biol. 2002. V. 140. N 1. P. 3–9.
- Pettersson I., Hinterberger M., Mimori T. *et al.* The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins. Identification of multiple protein components reactive with anti-(U1)ribonucleoprotein and anti-Sm autoantibodies // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. N 9. P. 5907–5914.
- Shumaker D.K., Lee K.K., Tanhehco Y.C. *et al.* LAP2 binds to BAF-DNA complexes: requirement for the LEM domain and modulation by variable regions // The EMBO J. 2001. V. 20. P. 1754–1764.
- Sommerville J. Using oocyte nuclei for studies on chromatin structure and gene expression // Methods. 2010. V. 51. N 1. P. 157–164.
- Stick R., Goldberg M.W. Oocytes as an experimental system to analyze the ultrastructure of endogenous and ectopically expressed nuclear envelope components by field-emission scanning electron microscopy // Methods. 2010. V. 51. N 1. P. 170–176.
- Tanabe H., Habermann F., Solovei I. *et al.* Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications // Mutat. Res. 2002. V. 504. P. 37–45.
- Taniura H., Glass C., Gerace L. A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones // J. Cell Biol. 1995. V. 131. P. 33–44.
- Towbin B.D., Meister P., Gasser S.M. The nuclear envelope – a scaffold for silencing? // Curr. Opin. Genet. Dev. 2009. V. 19. N 2. P. 180–186.
- Wu Z., Gall J.G. U7 small nuclear RNA in C snurposomes of the *Xenopus* germinal vesicle // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. N 13. P. 6257–6259.
- Wu Z., Gall J.G. «Micronucleoli» in the *Xenopus* germinal vesicle // Chromosoma. 1997. V. 105. N 7/8. P. 438–443.
- Zbarsky I.B., Georgiev G.P. Cytological characteristics of protein and nucleoprotein fractions of cell nuclei // Biochim. Biophys. Acta. 1959. V. 32. N 1. P. 301–302.

CHROMATIN DISTRIBUTION IN THE NUCLEI OF GROWING *XENOPUS LAEVIS* OOCYTES

K.N. Morozova, A.A. Strunov, E.V. Kiseleva

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: elka@bionet.nsc.ru

Summary

A comprehensive ultrastructural investigation of chromatin distribution in the nuclei of *Xenopus laevis* oocytes at the 2–3rd growing stages has been made. It has been shown by a modified method of oocyte nuclei isolation and high-resolution scanning electron microscopy that chromatin in amphibian oocytes is weakly linked to actin-related filaments and does not interact directly with the nuclear envelope. Immune-electron microscopy reveals a large amount of LAP2 β but not lamin B and A linked to chromatin. For the first time, a stable and strong interaction of chromatin with Cajal bodies, containing the splicing protein complex, is shown. The results point to a specific actin distribution and interaction with intranuclear structures in growing amphibian oocytes. A scheme of intranuclear space organization in amphibian oocyte nuclei is proposed.

Key words: chromatin, Cajal bodies, nuclear envelope, amphibian oocytes, scanning and transmission electron microscopy.