

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук**

**На правах рукописи**

**Лаврентьева Елена Андреевна**

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЯДРЫШЕК В РАННИХ ЗАРОДЫШАХ МЫШИ  
И ОСОБЕННОСТИ ИХ ДВИЖЕНИЯ НА СТАДИИ ЗИГОТЫ**

**03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:  
д.б.н., проф. Зацепина О.В.**

**Москва – 2019**

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

Список сокращений .....	6
Введение.....	8
1. Обзор литературы.....	17
1.1. Развитие женских половых клеток.....	17
1.2. Раннее эмбриональное развитие млекопитающих .....	26
1.2.1. Оплодотворение .....	26
1.2.2. Слияние генетического материала млекопитающих.....	29
1.2.3. Активация зиготического генома .....	31
1.2.4. Приготовление к дроблению.....	35
1.2.5. Выход из блестящей оболочки .....	37
1.3. Морфология ядрышек эмбрионов мыши на стадии зиготы .....	39
1.4. Транскрипционная активность ПЯ в ранних преимплантационных эмбрионах мыши .....	40
1.5. Анализ молекулярного состава ПЯ в преимплантационных эмбрионах мыши.....	43
1.6. Участие предшественников ядрышек в пространственной организации хромосом в одноклеточных эмбрионах .....	44
1.7. Участие предшественников ядрышек в формировании хромоцентров ...	47
1.8. Ассоциация предшественников ядрышка в течение первого клеточного цикла после оплодотворения .....	48
2. Материалы и методы .....	50
2.1. Лабораторное оборудование .....	50
2.2. Реактивы.....	51
2.3. Антитела.....	52

2.4. Культура клеток .....	54
2.4.1. Окрашивание фибробластов NIH/3T3 РНК-связывающим красителем пиронином Y и белок-связывающим красителем ФИТЦ .....	54
2.4.2. Иммуноцитохимическое выявление белков ядрышка в фибробластах NIH/3T3 .....	54
2.4.3. Иммуноцитохимическое окрашивание фибробластов NIH/3T3 после фиксации 70%-ным этанолом .....	55
2.4.4. Выявление рРНК в эмбриональных фибробластах мыши линии NIH/3T3 методом флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i> .....	55
2.5. Лабораторные животные .....	57
2.6. Гормональная стимуляция мышей и получение ооцитов и эмбрионов ...	58
2.7. Прижизненное окрашивание эмбрионов и ооцитов Hoechst 33342.....	59
2.8. Окрашивание эмбрионов мыши красителями пиронином Y и ФИТЦ.....	59
2.9. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши антителами к ядрышковым белкам после фиксации ПФА и обработки протеиназой К .....	60
2.10. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши антителами к белкам ядрышка после фиксации 70%-ным этиловым спиртом.....	61
2.11. Выявление рРНК в преимплантационных эмбрионах мыши методом флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i> .....	62
2.12. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия .....	63
2.13. Прижизненные наблюдения.....	63
2.13.1. Цейтраферная видеосъемка зигот мыши .....	63
2.13.2. Цейтраферная видеосъемка GV ооцитов мыши .....	64
2.13.3. Определение положения ядра в GV ооцитах мыши.....	65
2.13.4. Расчет расстояния и скорости движения ядер, ЯПТ GV ооцитов и ПЯ зигот .....	66

3. Результаты.....	67
3.1. Оптимизация условий выявления РНК и белков в фибробластах мышцы NIH/3T3 с помощью флуоресцентных красителей, антител к ядрышковым белкам и зондов к рРНК .....	67
3.1.1. Оптимизация условий выявления РНК в фибробластах мышцы пиронином Y .....	67
3.1.2. Оптимизация условий для выявления белка в фибробластах мышцы с помощью ФИТЦ.....	69
3.1.3. Выявления ядрышковых белков в фибробластах NIH/3T3 с помощью иммуноцитохимического окрашивания антителами без обработки, после инкубации с протеиназой К и фиксации 70 % этиловым спиртом .....	69
3.1.4. Оценка специфичности олигонуклетидных зондов к рРНК в фибробластах мышцы NIH/3T3.....	73
3.2. Цитохимическое выявления РНК и белков в зрелых ооцитах и эмбрионах мышцы до имплантации.....	74
3.3. Иммуноцитохимическое выявление белков ядрышка в эмбрионах мышцы.....	78
3.4. Выявление рРНК в эмбрионах мышцы методом FISH.....	83
3.5. Анализ числа ПЯ на разных стадиях зиготы.....	86
3.6. Прижизненные наблюдения.....	88
3.6.1. Цейтраферная видеосъемка зигот мышцы .....	88
3.6.2. Характер динамики движения ЯПТ GV ооцитов мышцы. Движение многочисленных ЯПТ в составе ооцита .....	90
3.6.3. Характер движения ядер в GV ооцитах NSN- и SN-типа.....	92
4. Обсуждение.....	97
4.1. Ядрышковые компоненты ПЯ эмбрионов мышцы .....	97

4.2. Динамика движения ПЯ эмбрионов мыши в течение первого клеточного цикла после оплодотворения .....	103
4.3. Динамика движения ядер GV ооцитов мыши .....	106
5. Заключение .....	108
6. Выводы .....	109
Список литературы .....	111

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 47S пре-рРНК – первичный транскрипт, 47S предшественник 18S, 5.8S и 28S рРНК;
- АЭГ – активация эмбрионального генома
- Бр-УТФ - бром-уридин-трифосфат, Br-UTP - bromouridine-triphosphate;
- ГК – гранулярный компонент;
- ГСЖК – гонадотропин сыворотки жеребой кобылы (PMSG - pregnantmare's serum gonadotropin);
- дбцАМФ - дибутирил-циклический аденозинмонофосфат, dbcAMP – dibutyryl cyclic adenosinemonophosphate;
- ЗГА – активация зиготического генома;
- ЛГ - лютеинизирующий гормон;
- МII – метафаза второго мейотического деления;
- МЕ – международная единица;
- ППК – первичные половые клетки, PGCs - primordialgermcells;
- ПФА – параформальдегид;
- ПФК – плотный фибриллярный компонент;
- ПЯ – предшественники ядрышек, NPBs - nucleolus-precursorbodies;
- ФСБ - изотоничный фосфатно–солевой буфер, PBS - phosphate-buffered saline;
- ФСГ - фолликулостимулирующий гормон;
- ФИТЦ - флуоресцеин-5-изотиоцианат, FITC – fluorescein-5-isothiocyanate isomer I;
- ФЦ – фибриллярный центр;
- ХГЧ - хорионический гонадотропин человека, hCG – human chorionic gonadotropin;
- ЯПТ – ядрышко-подобное тельце, NLB – nucleolus-likebody;
- 3'ETS – external transcribed spacer, 3'-внешний транскрибируемый спейсер;
- 5'ETS – external transcribed spacer, 5'-внешний транскрибируемый спейсер;
- СОС - cumulus oocyte complex, ооцит-кумуляный комплекс;

DAPI – 4', 6-diamidino-2-phenylindole, ДАФИ - 4', 6-диамидино-2-фенилиндол;

DIC - differential interference contrast, дифференциальный интерференционный контраст;

GV - germinal vesicle, зародышевый пузырек;

GV ооциты – ооциты в составе преовуляторных фолликулов, ядро – зародышевый пузырек;

GVBD – germinal vesicle breakdown, разрушение зародышевого пузырька;

ITS1 – internal transcribed spacer 1, первый внутренний транскрибируемый спейсер;

ITS2 – internal transcribed spacer 2, второй внутренний транскрибируемый спейсер;

NSN-тип ооцитов – not-surrounded nucleolus oocytes, ооциты с ядрышком, «неокруженным» непрерывным слоем хроматина;

SN-тип ооцитов (кариосфера) – surrounded nucleolus oocytes, ооциты с ядрышком, «окруженным» непрерывным слоем хроматина;

RPL26 – ribosomal protein L26, белок большой субъединицы рибосом;

RPS10 – ribosomal protein S10, белок малой субъединицы рибосом;

UBF – upstream binding factor, специфический кофактор РНК полимеразы I;

ZGA – zygotic gene activation, активация зиготического генома;

ZP – zona pellucida, блестящая оболочка;

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

Преимплантационное развитие млекопитающих животных и человека начинается со стадии оплодотворения яйцеклетки с образованием зиготы (одноклеточного эмбриона), включает несколько раундов клеточных делений, установление клеточной полярности, компактизацию морулы, линейную дифференцировку с формированием бластоцисты и ее имплантацию. Отличительной особенностью ранних эмбрионов млекопитающих является отсутствие в них нормальных ядрышек, характерных для соматических клеток. Вместо них в ядрах (пронуклеусах) одноклеточных эмбрионов формируются структуры, которые получили название предшественников ядрышек (ПЯ). В основу этого термина положена способность ПЯ давать начало нормальным ядрышкам на более поздних стадиях эмбриогенеза, когда в ядрах возобновляются транскрипция рДНК, синтез рибосом и происходит глобальная активация эмбрионального генома. Принято считать, что по морфологии и функциональному состоянию ПЯ по ряду признаков резко отличаются от ядрышек соматических клеток и растущих ооцитов, способных к биогенезу рибосом. В отличие от активных ядрышек, ПЯ лишены характерных структурных ядрышковых субдоменов (фибриллярных центров, плотного фибриллярного компонента и гранулярного компонента) и образованы плотноупакованным фибриллярным материалом неизвестной природы. Первая стадия активации рДНК (минорная активация транскрипции) у мышей начинается в S-фазе первого клеточного цикла, то есть через 5 часов после формирования пронуклеусов и характеризуется низкой транскрипционной активностью. Активные рибосомные гены и ядрышковые белки удается локализовать только на поверхности ПЯ, тогда как в нормальных ядрышках они отчетливо выявляются внутри ядрышек. Последнее обстоятельство не позволяет сделать вывод о белковом составе ПЯ, тогда как протеом соматических ядрышек в разных типах клеток млекопитающих описан на



сегодняшний день достаточно подробно (Lam et al., 2011; Boisvert et al., 2011). Лимитированность количества зигот, которое можно получить от животного (до 20 зигот от одной лабораторной мыши), а также сложность механического изолирования ПЯ, не позволяет получить их в достаточном для протеомного анализа количестве (необходимо более 500 ПЯ). Поэтому на данный момент единственным подходом для изучения биохимического состава ПЯ являются традиционный метод иммуоцитохимии с использованием антител к белкам интереса. Однако этот метод нуждается в значительном усовершенствовании, так как в стандартных условиях, используемых для изучения предшественников ядрышек эмбрионов млекопитающих, после их фиксации альдегидными фиксаторами, белки внутри ПЯ выявить не удастся. Таким образом, вопрос о присутствии в этих тельцах ядрышковых белков до сих пор остается открытым.

Хотя вопрос присутствия РНК в ПЯ поднимался во многих работах, интактную РНК из ПЯ, на данный момент, выделить не удастся. На сегодняшний день существует лишь одна работа (Biggiogera et al., 1994), в которой методом электронной иммуоцитохимии были выявлены следовые количества РНК в ПЯ одноклеточных эмбрионов мыши, однако в дальнейшем эти наблюдения не нашли экспериментального подтверждения этим же методом. В связи с этим, основными подходами для анализа присутствия РНК в ПЯ является флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), основанная на применении меченых зондов к различным типам нуклеиновых кислот. На данный момент не существует работ, в которых используются как стандартные условия, так и модифицированные протоколы для FISH – анализа ПЯ в эмбрионах. В связи с этим, одной из ключевых стадий данного исследования являлось усовершенствование подходов для выявления РНК в ПЯ преимплантационных эмбрионов млекопитающих (на примере мыши).

Существующие методы оценки качества эмбрионов и ооцитов основываются по большей части на статическом анализе морфологии на определенной стадии развития. Учитывая то, что развитие эмбрионов и ооцитов

представляют собой динамические процессы, наблюдение определенных этапов, ограниченных временным интервалом, может привести к потере информации о критически важных промежуточных стадиях. Рассмотрение динамики финальных этапов созревания ооцитов и промежутка времени между оплодотворением и первым делением дробления может дать максимально точное представление о жизнеспособности эмбриона. Таким образом, метод прижизненных наблюдений может значительно сократить количество подсаживаемых эмбрионов и многоплодных беременностей, соответственно, что значительно упростит процедуру отбора материала для эмбриологов.

Наиболее распространенной лабораторной моделью считают мышь, эмбриогенез у которой, несмотря на некоторые видовые особенности, в целом, повторяет события, происходящие при развитии зародышей человека. На сегодняшний день большая часть новых эмбриологических техник, протоколов и материалов сначала проходит проверку на ооцитах и эмбрионах мыши. В настоящей работе использован метод прижизненной цейтраферной видеосъемки для наблюдения за предовуляторными ооцитами и одноклеточными эмбрионами мыши и уточнения критериев компетентности к развитию.

Долгое время было общепринято, что в течение раннего эмбрионального развития, инертные ПЯ ступенчато трансформируются в типичные нуклеолонемные ядрышки к стадии поздней морулы-ранней бластоцисты (Fulka et al., 2012; Chouinard, 1971). На ультраструктурном уровне эта трансформация выражается в появлении на поверхности ПЯ эмбрионов мыши стадии 4-8 бластомеров основных структурных компонентов активных ядрышек соматических клеток: ФЦ, ПФК и ГК, окружающие компактный материал ПЯ. Процесс трансформации ПЯ в транскрибирующие ядрышки сопровождается их разборкой при делениях бластомеров и последующей сборкой более зрелых форм ПЯ (ядрышек) в начале следующего клеточного цикла. В 2014 году Киооку с соавторами выдвинули гипотезу о том, что ПЯ

зигот не обязательны для нормального эмбрионального развития мышей (Kyogoku et al., 2014). Было показано, что удаление (энуклеолирование) ПЯ из пронуклеусов одноклеточных эмбрионов мыши не ведет к остановке развития, в отличие от удаления ЯПТ (ядрышко-подобных телец) GV ооцитов, которые останавливаются в развитии после оплодотворения. В энуклеолированных одноклеточных эмбрионах, начиная со стадии 4 бластомеров, происходит пассивное реформирование более зрелых форм ПЯ, а эмбрионы успешно развиваются до стадии бластоцисты. Несмотря на то, что ПЯ образуются в пронуклеусах зигот большинства млекопитающих (Fléchon, Коресну, 1998; Laurinčik et al., 1998; Salvaing et al., 2012), до сих пор остается непонятным их функциональное значение во время раннего эмбрионального развития. Кроме того, динамические характеристики, происходящие с ПЯ вплоть до первого деления дробления, до сих пор не были изучены. Не была установлена также динамика и причины уменьшения числа ПЯ в пронуклеусах зигот мыши.

Ближайшим аналогом ПЯ эмбрионов являются ЯПТ в многоядрышковых предовуляторных GV ооцитах. По ультраструктурной организации ЯПТ кардинальным образом отличаются от ядрышек в соматических клетках и напоминают ПЯ эмбрионов (Коресну et al., 1996b; Почукалина, Парфенов, 2008). Их состав также, как и состав ПЯ, недоступен для идентификации с помощью классических протоколов иммуоцитохимического анализа и фиксации клеток (Zatsepina et al., 2000; Fair et al., 2001; Romanova et al., 2006a; Почукалина, Парфенов, 2008), а динамика движения не рассматривалась в современной литературе. На основании общей конфигурации хроматина у мыши выделяют два основных типа GV ооцитов: NSN-тип (non-surrounded; NSN-ооциты), ооциты, в ядре которых присутствуют блоки центрального гетерохроматина (хромоцентры), контактирующие с ЯПТ и SN-тип (surrounded, SN-ооциты), в которых присутствует непрерывное кольцо гетерохроматина вокруг ЯПТ (Debey et al., 1993; Zuccotti et al., 2005; De La Fuente, 2006). В ядре GV ооцита может находиться от одного до четырех ЯПТ (Дыбан, 1988; Pesty et

al., 2007). Благодаря описанному сходству, ЯПТ GV ооцитов можно использовать как модель для сравнения с ПЯ зигот.

### **Степень разработанности темы исследования.**

Долгое время предпринимались безуспешные попытки идентифицировать белки ядрышка и РНК в составе ПЯ ранних эмбрионов мыши (Baran et al., 1995; Zatsperina et al., 2003; Kyogoku et al., 2014a). На сегодняшний день данные о составе ПЯ зигот немногочисленны и фрагментарны (Fulka and Langerova, 2014; Kyogoku et al., 2014). Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* не использовался для изучения локализации РНК в ПЯ эмбрионов. Известна только одна работа, в которой методом электронной иммуноцитохимии были выявлены следовые количества РНК в ПЯ зигот мыши (Biggiogera et al., 1994). Уменьшение числа ПЯ в обоих пронуклеусах зигот мыши упоминается в некоторых статьях (Salvaing et al., 2012; Lan et al., 2016), однако природа этого процесса остается до сих пор не охарактеризованной. Динамика движения многочисленных ЯПТ GV ооцитов мыши не рассматривалась в современной литературе.

**Цель исследования** – охарактеризовать молекулярно-биологический состав предшественников ядрышек преимплантационных эмбрионов мыши и динамику их движения на стадии зиготы в сравнении с ядрышко-подобными тельцами предовуляторных ооцитов.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить природу материала предшественников ядрышек в преимплантационных эмбрионах мыши с помощью белок-связывающего красителя флуоресцеин-5'-изотиоцианата (ФИТЦ) и РНК-связывающего красителя пиронина Y.
2. Исследовать с помощью метода иммуноцитохимии состав предшественников ядрышек в ранних зародышах мыши с использованием разных способов их фиксации и антител к ключевым

белкам нормального ядрышка – маркерам основных стадий биогенеза рибосом.

3. Изучить локализацию разных типов рРНК в предшественниках ядрышек эмбрионов мыши методом флуоресцентной гибридизации *in situ*
4. Обобщить закономерности изменения состава предшественников ядрышек на последовательных стадиях раннего развития зародышей мыши.
5. Проанализировать возможность предшественников ядрышек в зиготах и ядрышко-подобных телец в предовуляторных ооцитах мыши с разной конфигурацией хроматина к слиянию.
6. Изучить динамику движения ядер предовуляторных ооцитов мыши разных типов.

**Объект и предмет исследования:** предшественники ядрышек в преимплантационных (ранних) эмбрионах мыши, молекулярно-биологическая характеристика и динамика движения предшественников ядрышка на стадии зиготы.

**Теоретической и методологической базой исследования** диссертации являются научные работы и методические разработки отечественных и зарубежных авторов, посвященных изучению структуры, состава и функций производных ядрышка в ранних эмбрионах и предовуляторных ооцитах млекопитающих.

**Информационной базой исследования** являются научные статьи в рецензируемых научных журналах, монографии, материалы конференций, соответствующие научной тематике.

**Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04** клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 1, 7.

**Научная новизна**

С помощью белок - и РНК-связывающих красителей ФИТЦ и пиронина Y впервые показано, что предшественники ядрышек зародышей млекопитающих содержат белки, но обеднены РНК.

В разных условиях фиксации или пост-фиксационной обработки зародышей иммуоцитохимическими методами впервые показано, что предшественники ядрышек зигот содержат ключевые белки ядрышка. По сравнению с нормальными ядрышками и ядрышко-подобными тельцами ооцитов, их набор меньше, что указывает на инертность ПЯ в отношении биогенеза рибосом.

Впервые установлено присутствие и описана локализация рРНК в предшественниках ядрышек на разных стадиях развития преимплантационных эмбрионов мыши методом FISH. Впервые приведены доказательства слияния предшественников ядрышек зигот и ядрышко-подобных телец предовуляторных ооцитов мыши *in vitro*.

Показана возможность перехода NSN-типа конфигурации хроматина предовуляторных ооцитов в SN-тип *in vitro*. Проанализирована динамика движения ядер предовуляторных ооцитов мыши с разной конфигурацией хроматина. Установлено, что дополнительным критерием компетентности к созреванию может служить подвижность ядра в GV ооците.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные данные расширяют и систематизируют существующие представления об участии предшественников ядрышек в раннем эмбриогенезе млекопитающих. Предшественники ядрышек зигот мыши, служат хранилищем «спящих» (неактивных) ядрышковых белков (фибрилларин, NPM1, нуклеолин), перенесенных из ооцита. Процесс трансформации предшественников ядрышек в нормальные ядрышки начинается на стадии двух бластомеров с появления рРНК на поверхности предшественников ядрышек и постепенного замещения материнских белков, перенесенных из яйцеклетки, вновь синтезированными компонентами.

Результаты, полученные при изучении динамических характеристик ядрышковых производных и ядер предовуляторных ооцитов, целесообразно использовать в клиниках репродуктивной медицины для стандартизации критериев компетентности ооцитов к созреванию.

**Методология и методы исследования.** В работе применяли современные цитологические методы получения и анализа данных, включая: культивирование фибробластов NIH/3T3 (использовали для контроля специфичности антител и FISH-зондов), эмбрионов и ооцитов, прижизненные наблюдения за ооцитами и зиготами методом цейтраферной видеосъемки, методы цито- и иммуноцитохимии, метод флуоресцентной гибридизации *in situ*, конфокальную сканирующую лазерную микроскопию, статистическую обработку результатов.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Окрашивание с помощью белок-связывающего красителя флуоресцеин-5'-изотиоцианата (ФИТЦ) и РНК-связывающего красителя пиронина Y показало, что предшественники ядрышек зигот мыши содержат белки, но обеднены РНК.
2. С помощью разных способов подготовки зародышей для иммуноцитохимического анализа в предшественниках ядрышек зигот мыши выявлены белки ядрышка, участвующие в раннем (фибрилларин) и позднем процессинге рРНК (NPM1, нуклеолин). В предшественниках ядрышек зигот не выявлен транскрипционный фактор РНК полимеразы I UBF и рибосомные белки RPL26 и RPS10.
3. Прослежена локализация разных типов рРНК в ранних эмбрионах мыши методом флуоресцентной гибридизации *in situ*. Показано, что предшественники ядрышек зигот мыши содержат только следовые количества материнской 28S рРНК. Новосинтезированная рРНК появляется, начиная со стадии двух бластомеров, сначала на периферии

предшественников ядрышек, а затем к стадии поздней морулы – бластоцисты, она распределяется по всему предшественнику.

4. Показано, что предшественники ядрышек в зиготах и ядрышкоподобные тельца в предовуляторных ооцитах мыши способны к слиянию.

#### **Степень достоверности и апробация результатов.**

Достоверность результатов работы обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, воспроизводимостью результатов, использованием современных методов исследования, включающих флуоресцентную гибридизацию *in situ*, конфокальную сканирующую лазерную микроскопию, метод прижизненных наблюдений, корректным применением статистических методов анализа, критическим анализом результатов исследования в сопоставлении с актуальными литературными данными.

**Материалы диссертации доложены:** на всероссийском симпозиуме «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 2014), зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2014, 2018), международной конференции «FEBS EMBO 2014 Conference» (Париж, Франция, 2014), международном конгрессе «12th International Congress of Cell Biology» (Прага, Чехия, 2016), международной конференции «International Conference on Histochemistry and Cell Biology» (Финикс, США, 2016).

**Личное участие автора.** Работа полностью выполнена автором, включая анализ научной литературы, разработку экспериментальной части, получение и обработку результатов, подготовку публикаций.

**Публикации.** Материалы диссертации отражены в 11 научных работах, из них 3 статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные



результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук, 1 патент на изобретение, 6 публикаций – в материалах всероссийских и международных конференций.

**Внедрение результатов работы.** Основные результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста и дополнена иллюстративным материалом в количестве 32 рисунков и 5 таблиц. Текст диссертации состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, и библиографического списка (239 источников).

## **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1. Развитие женских половых клеток**

Морфология ооцитов млекопитающих в процессе оогенеза последовательно изменяется до овуляции, когда ооцит приобретает компетентность к оплодотворению. Параллельные изменения происходят в окружающих ооцит фолликулярных клетках, которые поддерживают его развитие (Kurilo, 1981; Matzuk et al., 2002; Picton et al., 2008; Gosden, Lee, 2010; Collado-Fernandez et al., 2012; Li, Albertini, 2013). В период эмбрионального развития женской особи, с миграции первичных половых клеток (ППК, primordial germ cells, PGCs) области эктодермы через желточный мешок в закладку гонады начинается созревание ооцитов млекопитающих. Этот отрезок времени, получивший название периода размножения, сопровождается репликацией ДНК и последовательными митотическими делениями оогониев (Oktem, Urman, 2010; Lim, Choi, 2012; Sanchez, Smitz, 2012; Курило, 2012). ППК

мышь образуются на 7.5 сутки после оплодотворения в слое эмбриональной мезодермы, а их миграция начинается с 10.5 суток эмбрионального развития. Пролиферация и колонизация ППК зависит от таких факторов, как OCT4 и NANOG, которые повышают выживаемость ППК, а также BLIMP 1 и PRDM14, которые необходимы для их пролиферации и миграции (Yamaji et al., 2008; Ohinata et al., 2005). Именно на 10.5 сутки эмбрионального развития происходит определение пола особи: дифференцировка в яичники является путем развития по умолчанию, тогда как развитие по XY-типу находится под влиянием Y-связанного гена SRY (Kashimada, Koopman, 2010). После колонизации в закладке гонады (13.5. день эмбрионального развития), ППК вступают в фазу митотических делений с неполным цитокинезом, что ведет к формированию зародышевых цист (germ cell cyst, germ cell nest; Pepling, 2006). Впоследствии происходит разрыв зародышевых цист, стадия активных митотических делений завершается, и герминативная клетка инициирует вступление в мейоз, становясь первичным ооцитом, окруженным соматическими клетками (клетки пре-гранулезы), формируя примордиальный фолликул (Oktem, Urman, 2010). Процесс формирования примордиальных фолликулов у человека происходит пренатально на стадии диплотены, в течение второго триместра (Kurilo, 1981), а у мыши непосредственно после рождения (Pepling, 2006). Переход на стадию мейоза в яичниках мыши находится под влиянием ретиноевой кислоты и сигнала Stra8 (stimulated by retinoic acid gene 8). STRA8 - цитоплазматический фактор, экспрессируемый женскими герминативными клетками в ответ на ретиноевую кислоту перед переходом на стадию профазы I, необходимый как для премейотической репликации ДНК, так и для событий профазы I мейоза, таких как конденсация хромосом, рекомбинация, когезия (Menke et al., 2003; Koubova et al., 2006). В пренатальном развитии первичные ооциты вступают в профазу первого мейотического деления, или профазу I (рис. 2), проходят стадию лептотены (завершение репликации ДНК), зиготены (конъюгация гомологичных

хромосом, образование бивалентов) и пахитены (кроссинговер, рекомбинация генов) (Nguyen-Chi, Morello, 2011).

Активация транскрипции инициируется к концу стадии пахитены – началу диплотены, затем мейоз блокируется, и ооциты на стадии поздней диплотены переходят в состояние относительного покоя, которое получило название диктиотены (Дыбан, 1988). Так как стадия диктиотены относится к диплотене, ее называют диктиотенной стадией мейотической профазы или

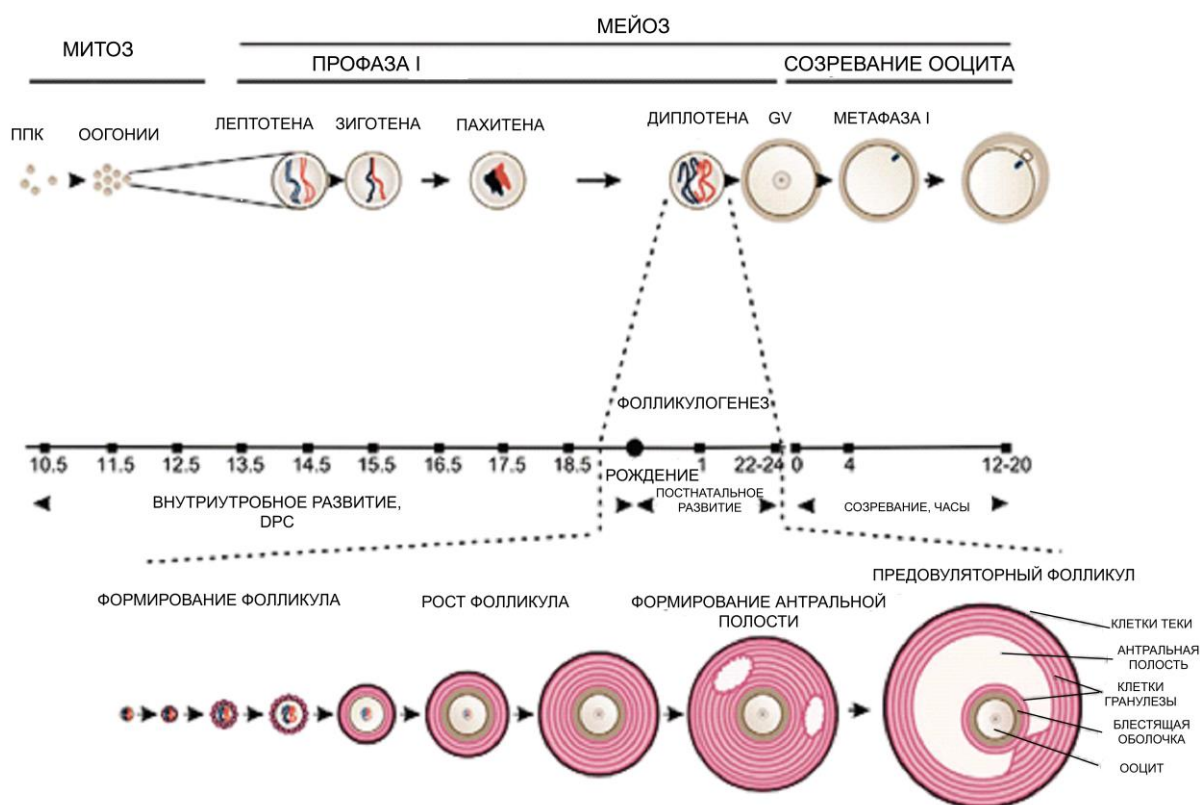


Рис. 1. Соотношение стадий мейоза и роста фолликула мыши. Адаптировано из статьи Racki, Richter, 2006.

стадией диффузной диплотены (Baker, 1963, 1982). Ооциты остаются заблокированными на стадии диктиотены мейоза I до тех пор, пока резкое увеличение концентрации лютеинизирующего гормона (ЛГ) не инициирует финальные стадии созревания. У млекопитающих при переходе на стадию диктиотены вокруг ооцита формируется один слой уплощенных фолликулярных клеток (предшественников клеток гранулезы), образующих

примордиальный фолликул (Gosden, Lee, 2010; Oktem, Urman, 2010; Lim, Choi, 2012; Sanchez, Smitz, 2012).

В составе примордиальных фолликулов ооциты длительное время сохраняются в яичниках, составляя у большинства видов млекопитающих запас половых клеток для реализации оогенеза. На стадии диктиотены размеры ооцитов остаются неизменными, при этом, благодаря транскрипционной активности хромосом ооцитов, сохраняется их жизнеспособность (Дыбан, 1988; Зыбина, 1971). После стадии диктиотены начинается период основного роста ооцитов, продолжительность которого варьируется в зависимости от вида млекопитающего (Дыбан, 1988). Период роста ооцитов соответствует определенным стадиям профазы. Выделяют раннюю профазу (лептотена, зиготена, пахитена и ранняя диплотена) и позднюю профазу (стадия диктиотены, или диффузной диплотены; продвинутая диплотена, или основной рост ооцитов; поздняя диплотена, диакинез – прекращение роста ооцитов и реорганизация ядрышкового аппарата (Дыбан, 1988; Курило, 2012; Денисенко и др., 2016).

Значительное увеличение размера (в 5-7 раз) ооцитов начинается в конце диплотены, после их перехода со стадии диктиотены, и сопровождается изменением их морфологии и увеличением транскрипционной активности хромосом (McLaren, 1981). Рост фолликула происходит одновременно с увеличением размеров ооцита. Процесс перехода примордиальных фолликулов в первичные, затем во вторичные или преантральные и, наконец, в антральные и предовуляторные называется фолликулогенезом (McGee, Hsueh, 2000; Matzuk et al., 2002; Griffin et al., 2006; Zuccotti et al., 2011). С увеличением размера фолликула вокруг него формируется слой мезенхимных клеток теки. Блестящая оболочка (*zona pellucida*, ZP) состоит из гликопротеинов (Bleil, Wassarman, 1980; Voja et al., 2003; Avella et al., 2013) и начинает синтезироваться ооцитом во время перехода примордиального фолликула в первичный (Oktem, Urman, 2010; Zuccotti et al., 2011). Одной из функций блестящей оболочки является

изоляция ооцита от окружающих его фолликулярных клеток. Активация примордиального фолликула является динамичным процессом, контролируемым фосфоинозитол-3-киназным каскадом: его активация ведет к инициированию АКТ-компонента, который в фосфорилированном состоянии активирует транскрипционный фактор FOXO3, что ведет к активации фолликулогенеза (Sánchez and Smitz, 2012). Было показано, что отсутствие гена Foxo3 у мышей ведет к преждевременной активации примордиальных фолликулов и истощению их пула к 18 неделе постнатального развития (Castrillin et al., 2003). Прогрессия раннего фолликулогенез у мыши также зависит от большого числа транскрипционных факторов, таких как TGF $\beta$ , GDF9, BMP15, TAF4B (TATA box binding protein (TBP)-associated factor; Falender et al., 2005). Экспрессия материнских генов (Mater, Zar1, Npm2), необходимых для раннего эмбриогенеза, также иницируется на стадии первичного фолликула и продолжается до стадии антрального (Bebbere et al., 2008; Burns et al., 2003).

Развитие фолликула на ранних стадиях не зависит от гонадотропных гормонов и осуществляется за счет локально синтезируемых факторов яичника. По достижении стадии преантрального фолликула, начинается экспрессия функциональных рецепторов к ФСГ и ЛГ, которые используются фолликулом начиная со следующей стадии антрального фолликула (Eppig et al., 1991). Было показано, что культивирование преантральных фолликулов в среде, содержащей гонадотропины, повышает выживаемость и скорость созревания ооцитов (Adriaens et al., 2004; Sha et al., 2010). Клетки гранулезы преантрального фолликула пролиферируют с высокой скоростью, увеличивая количество слоев и размер фолликула. Когда диаметр фолликула достигает максимального диаметра 200-500 мкм, в зависимости от вида млекопитающего (Picton et al., 1998), формируется антральная полость. Антральная полость заполнена фолликулярной жидкостью, которая содержит аминокислоты, ростовые факторы, кислород, гормоны и другие составляющие, необходимые для

метаболизма. Выделяют два типа клеток гранулезы: муральные клетки гранулезы (пристеночные), которые подстилают базальную мембрану фолликула и выполняют эндокринную функцию, и клетки кумулюса, которые прилегают к ооциту, поддерживая его метаболизм и развитие (рис. 2) (Matzuk et al., 2002; Collado-Fernandez, 2012; Hennet, Combelles, 2012; Li, Albertini, 2013). Клетки кумулюса и ооцит объединяют в ооцит-кумуляный комплекс (cumulus oocyte complex, СОС), который может сохраняться вокруг яйцеклетки после овуляции (Zuccotti et al., 2011; Hennet, Combelles, 2012). Ход фолликулогенеза, до стадии преантрального фолликула, не зависит от уровня гипофизарных гонадотропинов и называется гормонезависимой фазой роста, гормонозависимая фаза начинается с формированием антрума (McGee, Hsueh, 2000; Oktem, Urman, 2010; Zuccotti et al., 2011). Гипоталамус выделяет релизинг фактор, который является регулятором репродуктивной функции первого порядка и стимулирует гипофиз к секреции гонадотропинов. К ключевым гонадотропинам относятся фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ), обеспечивающие пролиферацию фолликулярных клеток и секрецию эстрогенов (Zuccotti et al., 2011; Sanchez, Smitz, 2012). Эстрогены повышают чувствительность фолликулярных клеток к гонадотропным гормонам, стимулируют пролиферативные процессы в клетках гранулезы и теки, инициируют образование рецепторов к ФСГ и ЛГ (McGee, Hsueh, 2000; Hennet, Combelles, 2012). ФСГ является ключевым стимулятором развития антральных фолликулов *in vivo*. Он также индуцирует рецепторы к ЛГ на муральных клетках гранулезы, что впоследствии играет важнейшую роль в запуске процесса овуляции (Falender et al., 2005; Sanchez, Smitz, 2012). На стадии поздней диплотены происходит снижение транскрипционной активности хромосом, изменяется морфология ядра, постепенно замедляется процесс роста ооцитов, и они останавливаются (блокируются) в развитии до дальнейшего возобновления мейоза. (Kiknadze et al., 1980; Parfenov et al., 1989; Gruzova, Parfenov, 1993; Bachvarova et al., 1985; De La Fuente, Eppig et al., 2001).

Возобновление мейоза начинается с ооцитов, находящихся в составе предовуляторных фолликулов. Для названия таких ооцитов в литературе используют термин «GV ооциты», а для обозначения их ядра используется термин «зародышевый пузырек» или «germinal vesicle». Возобновление мейоза находится под контролем циклического аденозина монофосфата (цАМФ),

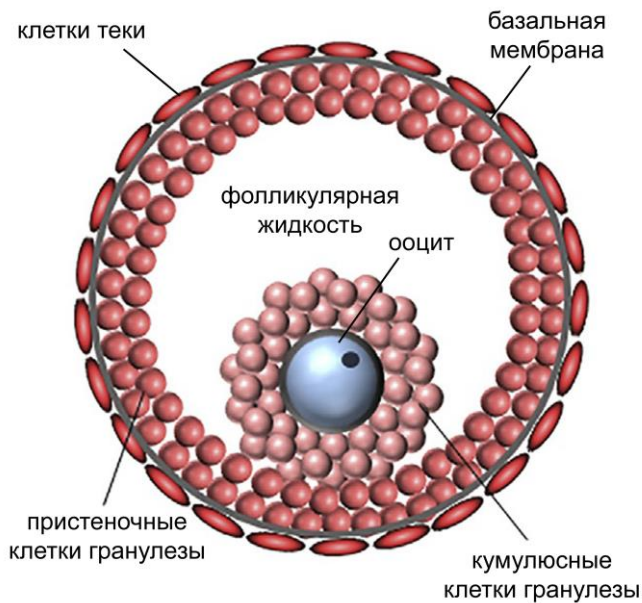


Рис. 2. Строение предовуляторного фолликула. Адаптировано из статьи Findlay, et al., 2019.

производимого аденилатциклазой (Doherty et al., 1989; Nogueira et al. 2003). В ооцитах источником цАМФ является его поток через щелевой контакт между кумулюсными клетками и ооцитом или синтез эндогенного цАМФ внутри ооцита, который индуцируется после активации G-protein coupled receptors 3 and 12 (GPR3, 12; Mehlmann, 2005; Vaccari et. al., 2008). Предовуляторные GV ооциты мыши являются финальной стадией развития герминативных клеток внутри яичника (Brunet, Maro, 2007; Talbot et al., 2003). Конечное созревание GV ооцитов сопровождается разрушением ядра (зародышевого пузырька, germinal vesicle breakdown, GVBD), образованием веретена первого

мейотического деления и его остановкой в развитии на стадии метафазы второго мейотического деления до оплодотворения (Sathananthan et al., 2006; Coticchio et al., 2015). Принято считать, что компетентность преовуляторных GV ооцитов мыши к созреванию определяется по двум основным морфологическим критериям: характеру организации хроматина и положению ядра ооцита. GV ооциты мыши различаются по общей конфигурации хроматина, позволяющей разделять их на два основных типа: NSN (non-surrounded; NSN-ооциты) и SN или “кариосфера” (surrounded, SN-ооциты; Debey et al., 1993; Zuccotti et al., 2005; De La Fuente, 2006). Для ооцитов NSN-типа характерно наличие блоков центрального гетерохроматина (хромоцентров), контактирующих с ядрышко-подобным тельцем (ЯПТ, nucleolus-like body, NLB; Tan et al., 2009). Для ооцитов SN-типа является специфичным непрерывный слой хроматина на поверхности ЯПТ (Parfenov et al., 1989; Zuccotti et al., 1998). Ооциты NSN- и SN-типов различаются по транскрипционной активности, паттерну экспрессирующихся генов и компетентности к созреванию (Bouniol-Baly et al., 1999; Shishova et al., 2015). У мыши наиболее компетентными к созреванию считают SN-ооциты, поскольку только они позволяют получать эмбрионы, способные *in vitro* развиваться до бластоцисты (Zuccotti et al., 2011; Inoue et al., 2008). Как NSN-ооциты, так и SN-ооциты способны достигать метафазы второго мейотического деления, однако эмбрионы, полученные *in vitro* после оплодотворения NSN-ооцитов, останавливаются в развитии на стадии двух бластомеров (Zuccotti et al., 1998, 2002). Согласно имеющимся данным, центральное положение ядра GV ооцита на стадии профазы первого мейотического деления свидетельствует о его компетентности к созреванию, т.е. способности к переходу на стадию GVBD, завершению первого мейотического деления и вступлению во второе (Bellone et al., 2009; Sathananthan et al., 2006; Coticchio et al., 2015; Brunet, Verlhac, 2010; Brunet, Maro; 2007).



В конце периода созревания завершается первое мейотическое деление, ооцит достигает стадии метафазы второго мейотического деления (Beker-van Woudenberg et al., 2004; Hennet, Combelles, 2012; Дыбан, 1988). Изменение уровня гормонов, циркулирующих в крови – важный маркер стадий развития ооцита. Уровень ФСГ повышается только на короткое время, в начале периода роста ооцита, и в дальнейшем сохраняется на одном уровне (Hennet, Combelles, 2012; Chaffin, Vande Voort, 2013). Незадолго до овуляции происходит резкий, но кратковременный подъем уровня ЛГ и менее значительный подъем уровня ФСГ. Именно пик выделения ЛГ в кровь считается пусковым механизмом, снимающим первый блок мейоза на стадии диплотены, инициирующий дальнейшее созревание ооцитов млекопитающих (Scaramuzzi et al., 2011; Hennet, Combelles, 2012; Sanchez, Smitz, 2012; Coticchio et al., 2015). Овуляция ооцита происходит на стадии предовуляторного фолликула во время наибольшей концентрации ЛГ в крови (McGee, Hsueh, 2000; Hennet, Combelles, 2012).

Созревание ооцитов сопровождается разрушением зародышевого пузырька (GVBD) GV ооцита и образованием веретена первого мейотического деления (рис. 3) (Nguyen-Chi, Morello, 2011; Coticchio et al., 2015). Биваленты гомологичных хромосом, прикрепленные к веретену, перемещаются к периферии ооцита и занимают радиальное положение. Расхождение гомологичных хромосом происходит таким образом, что одна из гомологичной пары хромосом остается в периферической части ооцита, а другая переходит в полярное тельце (рис. 3). Для первого и второго полярного тельца характерны значительно меньшие размеры по сравнению с самим ооцитом. Это связано с расположением контрактильного кольца на периферии одного из полюсов ооцита (Brunet, Verlhac, 2010).

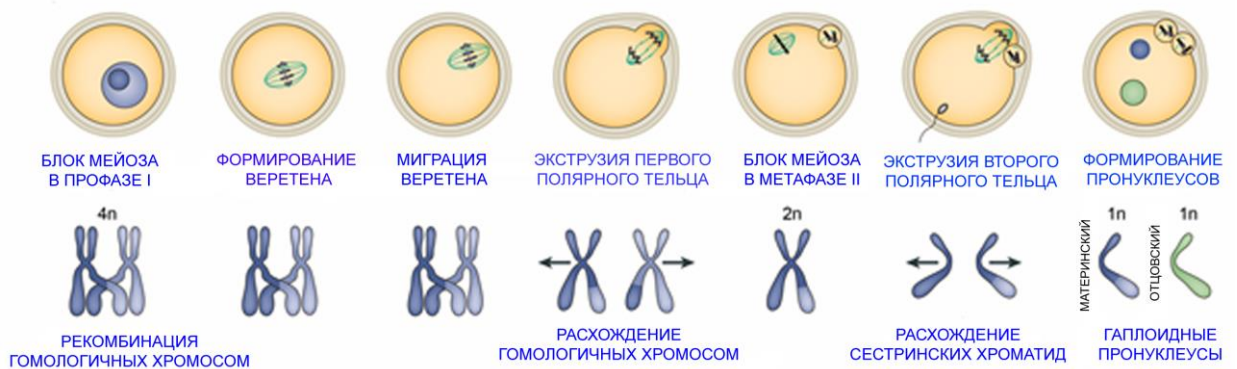


Рис. 3. Стадии созревания ооцита и соответствующие хромосомные конфигурации. Адаптировано из статьи Clift, Schuh, 2013.

Ооцит, компетентный к дальнейшему оплодотворению, останавливается в развитии на стадии метафазы II, после овуляции. Мейоз полностью завершается только после оплодотворения или искусственной активации яйцеклетки, в противном случае ооцит гибнет (Saunders et al., 2002; Oktem, Urman, 2010; Sanchez, Smitz, 2012; Clift, Schuh, 2013).

## 1.2. Раннее эмбриональное развитие млекопитающих

### 1.2.1. Оплодотворение

Оплодотворение начинается с контакта и узнавания яйцеклетки и сперматозоида, затем сперматозоид проникает в яйцеклетку, происходит соединения генетического материала двух гамет, активации метаболизма эмбриона для дальнейшего развития (Li et al., 2010, 2013; Clift, Schuh, 2013). Оплодотворение происходит в расширенной (ампулярной) части яйцевода (Okabe, 2013). Попавшая в ампулу яйцевода яйцеклетка окружена блестящей оболочкой (zona pellucida) и кумулюсными клетками, образующими лучистый венец (corona radiata), переходящий в яйценосный бугорок (cumulus oophorus; Tanghe et al., 2002; Avella et al., 2013). Блестящая оболочка ооцитов мыши состоит из трех гликопротеинов (ZP1-ZP3; Bleil, Wassarman, 1980), у ооцитов человека - из четырех (ZP1-ZP4, Lefievre et al., 2004). В процессе проникновения сперматозоида в яйцеклетку выделяют пять последовательных

событий: (1) активацию сперматозоида с помощью сигнальных молекул яйцеклетки; (2) проникновение сперматозоида в слой кумулюсных клеток и его присоединение к блестящей оболочке; (3) экзоцитоз содержимого акросомы сперматозоида; (4) прохождение головки сперматозоида через блестящую оболочку яйцеклетки; (5) слияние плазматической мембраны яйцеклетки и сперматозоида.

Процесс активации сперматозоида и природа хемотаксических молекул, выделяемых яйцеклеткой млекопитающих до сих пор не до конца выяснены из-за недоступности места оплодотворения яйцеклетки млекопитающих (ампула яйцевода). Выдвинуто предположение, что за узнавание ооцита-сперматозоида ответственен домен белка блестящей оболочки ZP2 (ZP2<sup>51-149</sup>, Avella et al., 2014). На примере морских ежей, молекулы, выделение которых активирует сперматозоиды, выявлены с высокой точностью: инъекция пептидного гормона ресакта (resact) в каплю со спермой морского ежа, ведет к миграции сперматозоидов в зону инъекции (Ward et al., 1985). Состав гликопротеинового матрикса блестящей оболочки играет ключевую роль в контакте головки сперматозоида с яйцеклеткой и инициации акросомной реакции. Было показано, что ZP3-гликопротеин ответственен за связывание гамет, является его “рецептором”, специфическое связывание с которым обеспечивается олигосахаридами ZP3 и включает с-концевой фрагмент молекулы, который у мыши кодируется седьмым экзоном *zp3* гена (Wassarman, Litscher, 2008). Два других гликопротеина также важны для формирования блестящей оболочки и выполнения ее функций. У мышей, мутантных по гену *zp1*, блестящая оболочка теряет свою целостность и нормальную трехмерную структуру, а в случае мышей *zp2-null*, ооциты имеют очень тонкую блестящую оболочку и эмбрионы не переходят на стадию двух клеток после оплодотворения (Rankin et al., 1999, 2001).

После вхождения сперматозоида в слой кумулюсных клеток и его контакта с яйцеклеткой, происходит экзоцитоз кортикальных гранул

яйцеклетки и выделившиеся из них ферменты модифицируют блестящую оболочку, в том числе гликопротеины ZP2 и ZP3, что приводит к процессу, получившему название «zona reaction» (Cherr, 1990; Cran, Esper, 1990; Hoodbhoy, Talbot, 1994; Voja et al., 2003; Okabe, 2013). Было показано, что кортикальные гранулы яйцеклетки содержат фермент N-ацетилглюкозаминидазу, которая обрезает N-ацетилглюкозамин ZP3, который является одной из углеводных цепей, присоединяющих сперматозоид (Miller et al., 1993a, 1993b). Проникновение в яйцеклетку других сперматозоидов после этого становится невозможным и таким образом обеспечивается блок полиспермии, в связи с «затвердеванием» блестящей оболочки (Avella et al., 2013; Li et al., 2013; Burkart et al., 2012). Под затвердеванием блестящей оболочки понимается устойчивость к протеолитической обработке и конформационные изменения в протофиламентах ZP3 и ZP2 (Coy, Aviles, 2010). Практически одновременно (или незадолго до) с присоединением сперматозоида происходит акросомная реакция – высвобождение из акросомы сперматозоида ферментов, что позволяет сперматозоиду проникнуть через блестящую оболочку яйцеклетки и запускает процесс слияния плазматических мембран сперматозоида и яйцеклетки (Wassarman et al., 2001), который способствует завершению второго мейотического деления. Акросомная реакция осуществляется связыванием ZP3 блестящей оболочки с акросомным белком сперматозоида sp56 (Buffone et al., 2004, 2009). Это связывание инициирует открытие  $Ca^{2+}$ -каналов, внутриклеточная концентрация кальция повышается и стимулирует экзоцитоз кортикальных гранул ооцита, трансляцию материнских мРНК и переход от мейоза к митозу (Ducibella et al., 2002; Miyazaki, Ito, 2006; Horner, Wolfner, 2008). Далее происходит прохождение головки сперматозоида через блестящую оболочку и слияние мембран двух гамет. Были выявлены белки, необходимые для слияния двух мембран: тетраспанин CD9 на мембране яйцеклетки и иммуноглобулин IZUMO1 на мембране сперматозоида (Ziyat et al., 2006). Несмотря на то, что

оплодотворение обычно описывается как простое слияние двух гаплоидных ядер, этот процесс имеет большое значение в качестве начального этапа эмбрионального развития: две высокоспециализированные гаметы претерпевают ремоделирование, восстанавливая тотипотентность и формируя диплоидную зиготу.

### **1.2.2. Слияние генетического материала млекопитающих.**

На терминальных стадиях сперматогенеза ДНК сперматозоида становится высококомпактизированной, благодаря замещению гистонов белками, богатыми аргинином и цистеином, которые называются протаминами (Braun, 2001). Непосредственно после вхождения ядра сперматозоида в цитоплазму ооцита, протамины замещаются на материнские гистоны (Wright, 1999). Это происходит в связи с разрушением дисульфидных связей протаминов с помощью глутатиона, находящегося в цитоплазме ооцита (Bedford, Calvin, 1974). У мышей гистоны H3 и H4 синтезируются из материнской мРНК, хранящейся в ооцитах, а гистоны H2A и H2B уже присутствуют в эмбрионе (Lin et al., 2014). Помимо канонических гистонов, которые синтезируются исключительно во время S-фазы, другие модификации гистонов могут быть включены в хроматин в течение клеточного цикла. Независимый от репликации вариант H3, H3.3 чаще включается в мужской пронуклеус (Torres-Padilla et al., 2006), в то время как репликационно-зависимые варианты H3.1/2 обнаруживаются преимущественно в женском пронуклеусе (van der Heijden et al., 2006). Изменения в метилировании гистона H3 происходит после оплодотворения, также, как и распределение модификаций гистонов между пронуклеусами (Santenard et al., 2010). Так, уровень метилирования H3K4, H3K9 и H3K27 более низкий в мужском пронуклеусе. Сперматозоиды млекопитающих входят в яйцеклетки практически по касательной, при этом ядро разрывается, хроматин деконденсируется и реконструируется. Мужской пронуклеус увеличивается в размере, в то время как женский завершает второе деление мейоза. Центросома, сопровождающая мужской пронуклеус,

продуцирует микротрубочки, по большей части из белков яйцеклетки и контактирует с женским пронуклеусом. После этого, каждый пронуклеус мигрирует по направлению к другому, реплицируя ДНК (Manandhar et al., 2005). После встречи пронуклеусов, обе ядерные оболочки разрываются, хроматин конденсируется в хромосомы и ориентируется как в обычном митотическом веретене.

В течение первого клеточного цикла ремоделирование материнского и отцовского материала восстанавливает транскрипционную активность или активацию зиготических генов на стадии поздней зиготы (Latham, Schultz, 2001; Ram, Schultz, 1977, 1986, 1993). Эпигенетические изменения играют центральную роль в этот момент, включая изменения уровня метилирования хроматина. В течение первого часа после оплодотворения инициируется деметилирование в отцовском пронуклеусе, в то время как в материнском пронуклеусе начинается процесс метилирования *de novo*, что доказывает асимметричность развития пронуклеусов в раннем эмбриогенезе (Santos et al., 2002, 2004, 2005).

Активное снижение уровня метилирования в мужском пронуклеусе в первом клеточном цикле после оплодотворения сопровождается ремоделированием хроматина и создает асимметрию между мужским и женским геномом (пронуклеусами). Деметилирование мужского пронуклеуса происходит в два последовательных этапа, один из которых предшествует репликации ДНК, другой осуществляется непосредственно во время репликации. Основными механизмами этого процесса являются ТЕТ3-опосредованное гидроксиметилирование и действие фермента цитозиндезаминазы (Santos et al., 2004). Процесс метилирования женского генома защищен от воздействия ТЕТ-3 – оксидазы белком Drra3, который необходим для преимплантационного развития (Payer et al., 2003), а его отсутствие ведет к глобальному деметилированию как в мужском, так и в женском пронуклеусе (Nakamura et al., 2007).

### 1.2.3. Активация зиготического генома.

После оплодотворения происходит процесс перехода от материнского контроля развития к эмбриональному: мРНК и белки, унаследованные от яйцеклетки, деградируют и замещаются эмбриональными транскриптами и белками. У мышей процесс перехода от материнского контроля к эмбриональному, который начинается на стадии поздней зиготы (минорная активация) и продолжается до стадии раннего двухклеточного эмбриона (мажорная активация), происходит благодаря активации зиготического генома (ЗГА, ZGA; Schultz, 1993, 2002; Bouniol et al., 1995). Процесс активации генов зиготы происходит в три последовательных этапа: деградация материнских транскриптов, в том числе ооцит-специфичных, замещение их зиготическими транскриптами, получение новых эмбриональных транскриптов путем изменения уровня экспрессии генов (Schultz, 2002). Важность минорной активации генома была показана с помощью воздействия ингибитора синтеза РНК,  $\alpha$ -аманитина, на одноклеточные эмбрионы мыши (Warner, Versteegh, 1974). После инкубации в среде с  $\alpha$ -аманитином, эмбрионы вступали в первое деление дробления, но более чем у половины эмбрионов деление блокировалось на стадии двух бластомеров. В литературе это явление описывается как двухклеточный блок (Goddard, Pratt, 1983). Это явление показывает, что первое деление дробления зависит от унаследованных, материнских РНК и белков, а для перехода на стадию четырех бластомеров необходимы новосинтезированные продукты. Феномен блокирования развития на стадии двух клеток связан с отложенной активацией генов зиготы (Qiu et al., 2003), что часто встречается при культивировании эмбрионов млекопитающих *in vitro*. Активация генов эмбриона играет важнейшую роль в преимплантационном развитии и состоит из двух последовательных событий – активации генов зиготы и активации эмбрионального генома. Активация генов зиготы, как было описано ранее, состоит из минорной активации, которая происходит на стадии поздней зиготы (ЗГА, ZGA), и мажорной активации,

которая у мышей происходит на стадии позднего двухклеточного эмбриона, а у человека на стадии четырехклеточного эмбриона (Lee et al. 2014). Вторая волна активации эмбрионального генома соответствует стадии 8 бластомеров, предшествуя формированию морулы и компактизации бластоцисты (АЭГ, mid-preimplantation gene activation; Hamatani et al., 2004; Wang et al., 2006).

В течение первого клеточного цикла транскрипционная активность детектируется в S-фазе с помощью включения предшественника Бр-УТФ в РНК полимеразы II-зависимые транскрипты и экспрессии гена MuERV-L (Kigami et al., 2003). Функциональный тест, позволяющий оценить уровень синтеза рРНК по включению предшественника – бромированного уридинтрифосфата. Включение галогенизированных предшественников в синтезирующуюся РНК позволяет получать препараты с высоким разрешением и исследовать временные особенности этого процесса. В основе этого метода лежит способность клеток усваивать галогенизированные нуклеотидтрифосфаты и включать их в состав синтезирующейся РНК. Было показано, что уровень транскрипции выше в мужском пронуклеусе, чем в женском (Aoki et al., 1997). Повышенный уровень транскрипции в мужском пронуклеусе связан с различным составом ядерных компонентов родительских геномов. Так, гистоны, ассоциированные с хроматином отцовского пронуклеуса, находятся в более ацетилированной форме, чем в материнском (Adenot et al., 1998; Santos et al., 2002), что и ведет к разнице в транскрипционной активности (Ura et al., 1997). Было показано, что нокаут и нокадаун некоторых генов, активно транскрибируемых при ЗГА, ведет к остановке развития на стадии двух бластомеров. В число этих генов входят: HSp70.1, heat-shockprotein, альфа-аманитин чувствительный белок Mater, Hsf1, Dnmt1o, Pms2, Zar1, Npm2, Stella, Zfp3612 (Bebbere et al., 2008).

В отличие от эмбрионов *Drosophilla* и *Xenopus*, у которых материнские мРНК остаются стабильными, регулируя множество аспектов эмбрионального



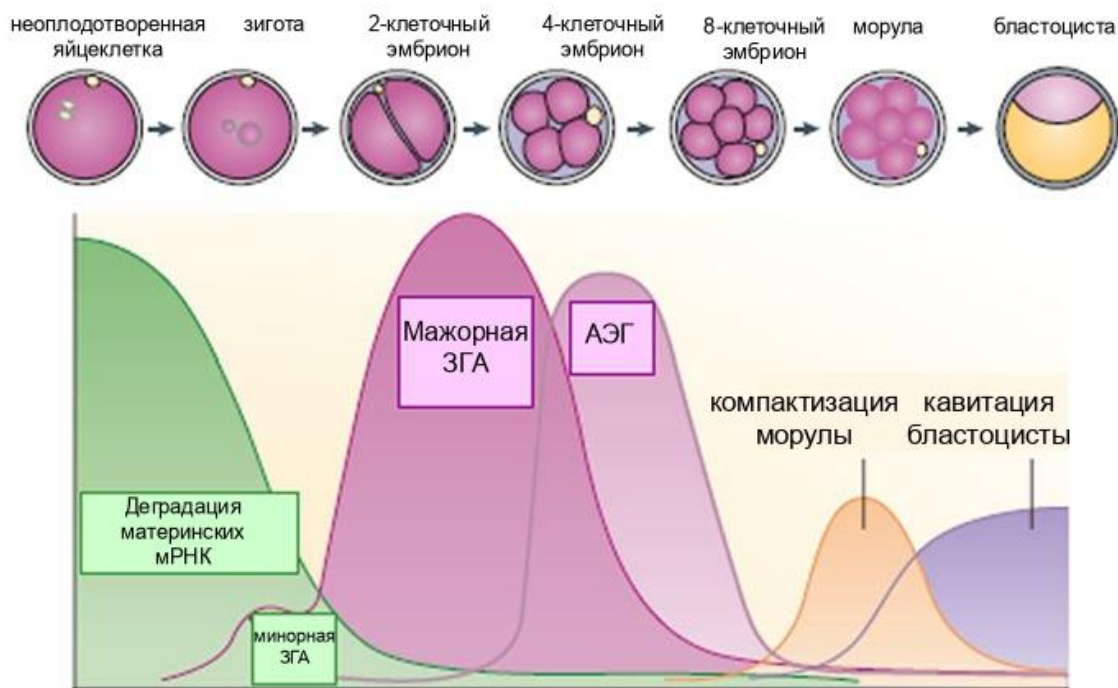


Рис. 4. Изменение уровня экспрессии генов в течение преимплантационного развития эмбрионов мыши. Адаптировано из статьи Wang et al., 2006.

развития, (Akam, 1987; Duval et al., 1990), у млекопитающих, 90% материнской мРНК деградирует к концу стадии двух бластомеров (Schultz, 1993). Материнские транскрипты, присутствующие в эмбрионе первые циклы развития, можно разделить на два типа: ре-синтезированные после ЗГА, соответствующие мРНК ооцитов и специфичные для созревания ооцитов, но отрицательно влияющие на эмбриональное развитие. К первому типу относится актин, который деградирует к позднему двухклеточному эмбриону и вновь синтезируется на стадии четырех бластомеров, ко второму типу относится *s-mos* мРНК (Paynton et al., 1988; Keshet et al., 1988).

Было показано, что минорная активация важна для подготовки эмбриона к дроблению (Minami et al., 2007). Более того, было сделано предположение, что минорная активация является активным компонентом ремоделирования хроматина 1-клеточного эмбриона (Abe et al., 2015). Продемонстрировано, что распределение предшественников ядрышек связано с накоплением рРНК

(Falahati et al., 2016). Небольшие и диспергированные ПЯ с пониженной репликацией ДНК были зарегистрированы в двойных нокаутных H3.3 зиготах (Tang et al., 2015), что еще раз подчеркивает важность рРНК в дроблении одноклеточных эмбрионов. Более того, механическое удаление ЯПТ GV ооцитов не влияло на уровень рРНК, что указывает либо на отсутствие рДНК в ЯПТ, либо на присутствие не идентифицированных транскрипционных машин в составе зигот (Fulka, Langerova, 2014, Fulka, Aoki, 2016).

Существует наиболее популярная модель для описания активации зиготических генов. С одной стороны, увеличение цитоплазматического соотношения за счет повышения объема ядерного компартмента ведет к уменьшению транскрипционной репрессии. В этом случае барьером для ZGA являются материнские факторы, уровни которых должны понизиться до активации эмбрионального генома. Как было описано выше, существует два типа модификации гистонов, которые вовлечены в экспрессию и активацию генов зиготы: ацетилирование по лизину и метилирование по лизину. У мыши, активное ацетилирование гистона H4 позволяет отличить транскрипционно активный отцовский пронуклеус от неактивного материнского (Adenot et al., 1998; vander Heijden et al., 2006). После минорной активации транскрипции следует переходный период транскрипционной репрессии, сопровождающийся волной деацетилирования гистонов: инъекцированные плазмиды, как и эндогенные гены, которые в норме экспрессируются на стадии зиготы, не транскрибируются на стадии двухклеточного эмбриона (Martinez-Salas et al., 1989; Wiekowski et al., 1991). Высокий уровень метилирования также оказывает влияние на время активации в течение перехода от материнского к эмбриональному контролю (Schier et al., 2007; Tadros, Lipshitz, 2009). У мышей, транскрипционно инертный женский пронуклеус ассоциирован с H3K27me3, а мужской пронуклеус приобретает H3K27me3 только к концу минорной активации зиготического генома (Santos et al., 2005). В итоге, транскрипционная активность достигается с помощью регулирования

доступности хроматина, которая в свою очередь достигается с помощью модификации гистонов и метилирования ДНК.

#### **1.2.4. Приготовление к дроблению.**

В результате первого деления дробления образуется двухклеточный эмбрион с двумя равными по размеру бластомерами (рис.5; Zernicka-Goetz, 2005). Важным является вопрос о локализации места борозды первого деления дробления. Было высказано предположение, что место слияния сперматозоида и яйцеклетки и локализация второго полярного тельца являются маркерами места первого деления дробления (Plusa et al., 2002). Было показано, что более чем у половины зигот мужской и женский пронуклеус выровнены по одной линии со вторым полярным тельцем, а первая борозда деления проходит именно по этой линии. При этом максимальный угол между диаметром, соединяющим пронуклеусы и линией, проходящей через полярное тельце, составляет  $30^\circ$  (Plusa et al., 2002).

Во время подготовки к делению дроблению происходит увеличение уровня свободных ионов кальция, которое активирует синтез ДНК и белков и приводит в движение аппарат для деления дробления. Механизмы, по которым проходит активация дробления, зависят от стадии мейоза, на которой происходит оплодотворение. Однако практически у всех видов млекопитающих ритм деления дробления регулируется синтезом и деградацией белков–циклинов (Tsai et al., 1993). Циклин В блокирует клетки в интерфазе, а его деградация, которая инициируется ионами кальция, делает невозможным возврат на стадию интерфазы (Watanabe et al. 1991). После деградации циклина начинается новый клеточный цикл. Деление дробление млекопитающих является одним из самых медленных, по сравнению с другими видами, и занимает около 12 часов. Во время делений дроблений эмбрион непрерывно движется, реснички яйцевода проталкивают эмбрион в сторону матки (рис. 5). Отличительной особенностью является ориентация бластомеров по отношению

друг к другу: первое деление дробления является обычным меридианным, однако во время второго деления дробления один бластомер делится меридианно, а другой экваториально. Такой тип дробления называется ротационным (Gulyas, 1975). Особенностью делений дроблений эмбрионов млекопитающих является асинхронность: бластомеры не делятся все одновременно, число бластомеров не возрастает экспоненциально от двух до четырех, восьми и т.д., а часто содержит нечетное число бластомеров. В отличие от других видов животных, геном млекопитающих активируется в течение первых делений дробления и продуцирует все белки, необходимые для дальнейшего дробления.

Для последних стадий преимплантационного развития характерен феномен компактизации. После серии последующих митотических делений формируются восемь эмбриональных бластомеров (рис. 5), которые в течение последующих стадий делений дробления взаимодействуют друг с другом, изменяя свою форму, уплощаются, их границы становятся плохо заметными, так как происходит плотная компактизация, и формируется морула (Zernicka-Goetz, 2005). Бластомеры эмбрионов мыши до стадии восьми клеток образуют свободную компоновку с довольно большим расстоянием между ними. Однако после третьего деления дробления они внезапно сжимаются вместе, максимизируют контакт друг с другом, формируя компактный шар (Рис.5). Клетки в составе компактизированного 8-клеточного эмбриона делятся, продуцируя 16-клеточную морулу. Морула состоит из маленькой группы внутренних клеток, окруженных большой группой внешних клеток (Tabansky et al., 2013). Большая часть потомков внешних клеток, становится клетками трофобласта (трофоэктодермы). Эта группа клеток не дает начало эмбриональным структурам, но образует ткань хориона и эмбриональную часть плаценты (Plusa et al., 2002, Nishioka et al., 2009). Хорион обеспечивает плод кислородом и питанием от матери, секретирует гормоны, которые способствуют сохранению плода в матке матери и производят регуляторы

иммунного ответа. Непосредственно эмбрион мыши образуется из потомков внутренних клеток 16-клеточной стадии, дополненных клетками трофобласта во время перехода на 32-клеточную стадию (Pedersen et al. 1986; Fleming, 1987). К стадии 32 бластомеров морула преобразуется в раннюю бластоцисту (около 4 суток после оплодотворения) и эмбрион мигрирует в матку. Бластоциста представляет собой пузырек, состоящий из стенки (трофобласта), полости с жидкостью и скопления клеток (внутренней клеточной массы) на одном из полюсов внутренней поверхности трофобласта (Watson, Barcroft, 2001). После формирования бластоцисты доимплантационное развитие эмбриона заканчивается и происходит его имплантация в рога матки у мыши (Yoshinaga, 2013) или в стенку матки у человека, где эмбрион продолжает свое дальнейшее развитие (рис. 5) (Zernicka-Goetz, 2005; Li et al., 2010; Clift, Schuh, 2013). К стадии 64 клеток, внутренняя клеточная масса (ВКМ, около 13 клеток) и клетки трофобласта становятся отдельными слоями клеток (Dyce et al. 1987; Fleming, 1987). Таким образом, различие между клетками трофобласта и внутренней клеточной массы представляет собой первое событие дифференциации в развитии млекопитающих. Эта дифференциация необходима для того, чтобы зародыш раннего млекопитающего имплантировался в стенку матки.

#### **1.2.5. Выход из блестящей оболочки.**

Когда эмбрион движется по яйцеводу по направлению к матке, бластоциста расширяется в пределах блестящей оболочки. Плазматическая мембрана клеток трофобласта содержит  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  насос ( $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ ) расположенный перед бластоцелью, накапливающий ионы в центральной

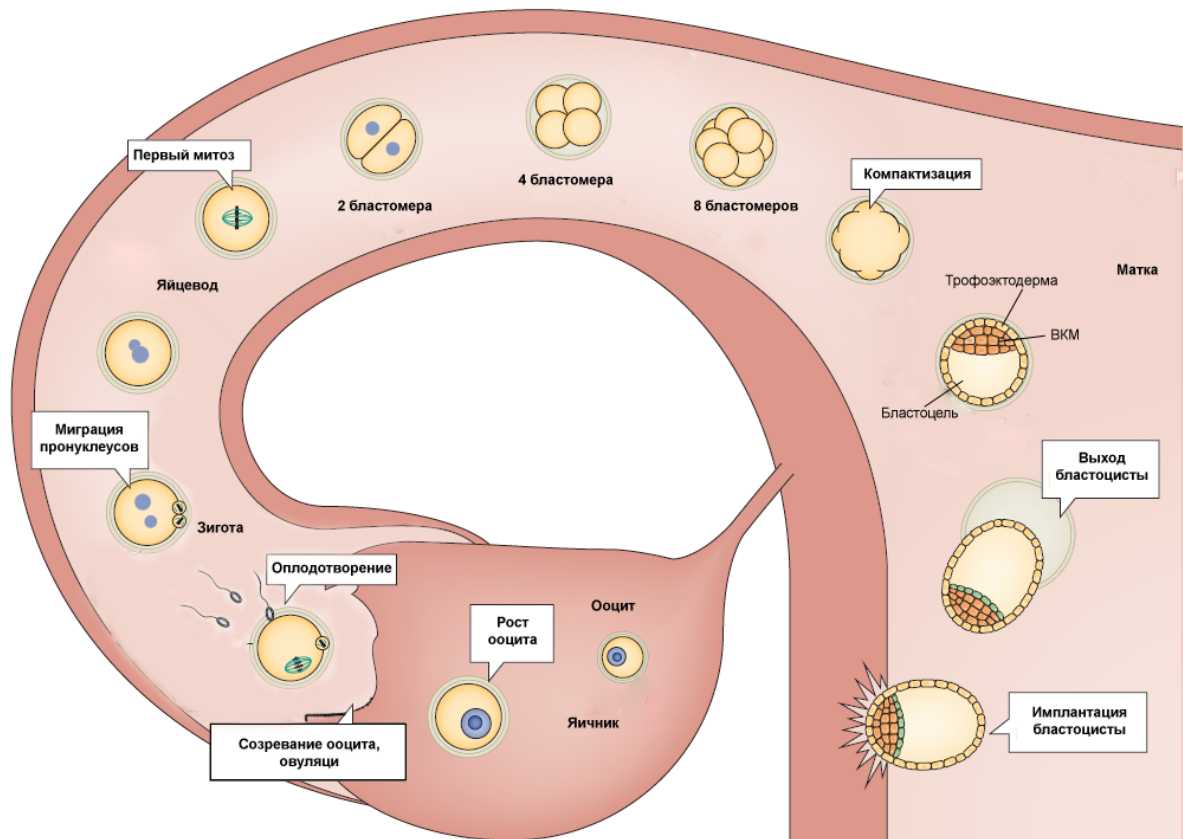


Рис. 5. Изображение доимплантационного развития эмбриона. Адаптировано из статьи Clift, Schuh, 2013.

полости. Во время миграции эмбриона по яйцеводу блестящая оболочка предотвращает имплантацию в стенку яйцевода, когда он достигает эндометрия матки. Бластоциста только выходит из блестящей оболочки после возникновения небольшого отверстия в оболочке с помощью трипсиноподобной протеазы, вырабатываемой клетками трофобласта (Yamazaki, Kato 1989). Эндометрий матки захватывает бластоцисту на внеклеточный матрикс, содержащий коллаген, ламинин, фибронектин, гиалуроновую кислоту и рецепторы к гепарон-сульфату. Клетки трофобласта, в свою очередь, содержат интегрины, которые соединяются с коллагеном, фибронектином и ламинином эндотелия, синтезируют гепарин-сульфат протеогликан (Carson et al. 1993). После контакта с эндометрием, трофобласт секретирует новый набор протеаз, включающий коллагеназу, стромелизин и активатор плазминогена, которые

переваривают внеклеточный матрикс и позволяют бластоцисте полностью внедриться в стенку матки (Clift, Schuh, 2013, рис. 5).

### 1.3. Морфология ядрышек эмбрионов мыши на стадии зиготы

Отличительной особенностью преимплантационных эмбрионов всех видов млекопитающих является присутствие внутриядерных телец, получивших название «предшественников ядрышка» (ПЯ, nucleolus-precursor bodies, NPBs) (Fakan, Odartchenko, 1980; Geuskens, Alexandre, 1984; Flechon, Коресну, 1998; Коробова и др., 2003). ПЯ – многочисленные, крупные (до 10 мкм в диаметре), оптически плотные, сферические структуры, присутствующие в обоих пронуклеусах одноклеточного эмбриона после его формирования (рис. 6; Flechon, Коресну, 1998; Hyttel et al., 2000; Maddox-Hyttel et al., 2005, 2007; Aguirre-Lavin et al., 2012; Kyogoku et al., 2014a, 2014b).

Число предшественников ядрышка на пронуклеус изменяется в процессе развития эмбриона, при этом количество ПЯ в мужском пронуклеусе обычно превышает количество ПЯ в женском в 1.5-2 (Aguirre-Lavin et al., 2012). По мере развития, к стадии поздней зиготы (24-27h phCG) количество ПЯ в них уменьшается, однако процесс образования одного большого NPB в обоих



Рис. 6. Фотография одноклеточного эмбриона мыши, полученная методом дифференциального интерференционного контраста по Номарскому (DIC). Стрелки указывают на ПЯ. Масштабная линия, 20 мкм (Kyogoku et al., 2014a).

пронуклеусах до сих остается неопианным (Tesarik, Коресну, 1989; Li et al., 2011). Все ПЯ на стадии зиготы однообразны по морфологии: лишены мембранных и других структурных компонентов клеточного ядра, образованы однородным электронно-плотным материалом, состоящим преимущественно из фибрилл высокой плотности (Fakan, Odartchenko, 1980; Tesarik et al., 1987; Hyttel et al., 2000). На стадии зиготы ПЯ окружены гало из гетерохроматина, которое перераспределяется с поверхности ПЯ в нуклеоплазму на стадии двух бластомеров, что способствует формированию прохромоцентров (Martin et al., 2006; Merico et al., 2007; Deshmukh et al., 2012). Формирование фибриллярных центров в процессе эмбрионального развития начинается на стадии 4 бластомеров, с периферии ПЯ. В то же время, центральная часть, обладающая фибриллярной структурой ПЯ, остается неизменной до стадии поздней морулы-бластоцисты (Fakan, Odartchenko, 1980; Geuskens, Alexandre, 1984; Biggiogera et al., 1994; Flechon, Коресну, 1998; Maddox-Hyttel et al., 2005; Kyogoku et al., 2014b).

#### **1.4. Транскрипционная активность ПЯ в ранних преимплантационных эмбрионах мыши**

На протяжении долгого времени было общепринято, что в ПЯ эмбрионов мыши отсутствует транскрипция на стадии зиготы и раннего двухклеточного эмбриона. Однако несколькими группами ученых было показано (Ram, Schultz, 1993; Bouniol et al., 1995; Aoki et al., 1997; Minami et al., 2007), что первая стадия активации рибосомных генов (минорная активация транскрипции) у мышей начинается в S-фазе первого клеточного цикла, то есть через 5 часов после формирования пронуклеусов (Aoki et al., 1997), и характеризуется низкой



транскрипционной активностью, причем в мужском пронуклеусе уровень транскрипции в 4-5 раз выше, чем в женском (Ram, Schultz, 1993; Bouniol et al., 1995; Aoki et al., 1997; Schultz, 2002). Преобладание транскрипции в мужском пронуклеусе связано с эпигенетическими модификациями хроматина в родительских геномах, кроме того, после оплодотворения зрелого ооцита, на ранних стадиях развития зиготы происходит замена белков протаминов на гистоны, что индуцирует открытый статус хроматина (Burton, Torres-Padilla, 2010; Li et al., 2013; Lee et al., 2014). Известно, что мажорная активация эмбрионального генома (рис. 4) у мышей происходит на стадии двух бластомеров (Schultz, 1993; Hamatani et al., 2004; Wang et al., 2004; Li et al., 2010), через 46-48 часов после инъекции хорионического гонадотропина человека (Zatsepina et al., 2003). Полное завершение активации эмбрионального генома происходит позднее, на стадии морулы-бластоцисты (Hamatani et al., 2004).

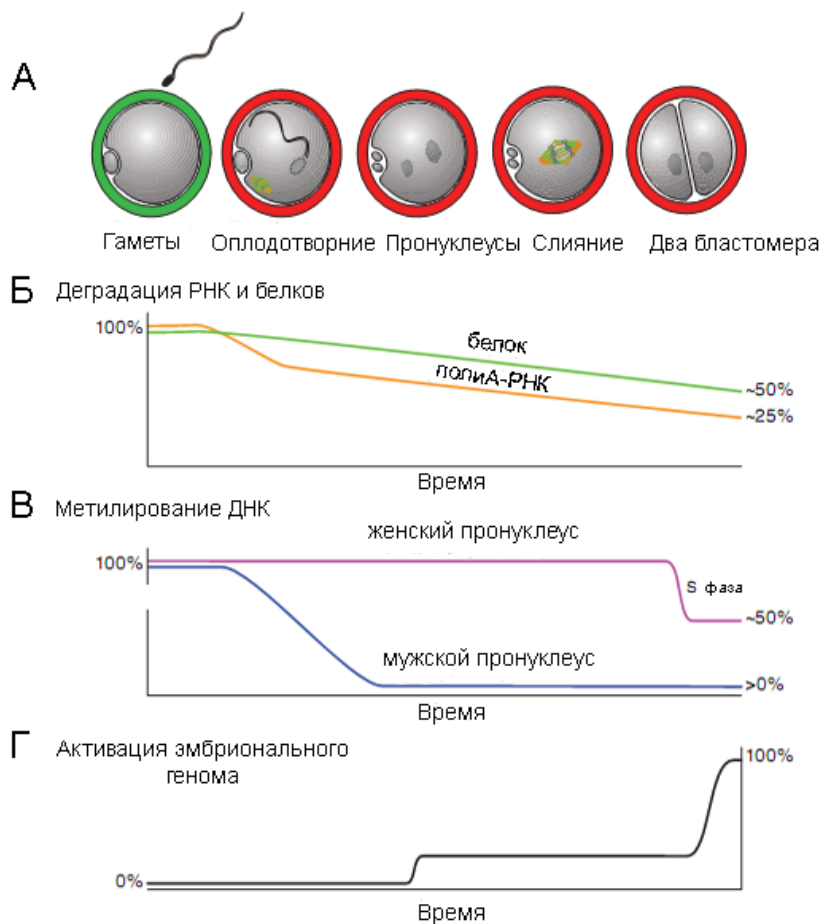


Рис. 7. А - раннее эмбриональное развитие мышцы. Зеленым цветом выделена блестящая оболочка до оплодотворения, красным – модифицированная блестящая оболочка после оплодотворения; Б - деградация РНК и белков; В - уровни метилирования ДНК в мужском и женском пронуклеусах; Г - активация эмбрионального генома. Адаптировано из статьи Li et al., 2010.

Внутри ооцита накапливаются разные типы РНК в течение периода роста (Bachvarova, 1985; Shultz, 1986), большая часть которых представляют собой рРНК (Wassarman, Josefowicz, 1978; Ihara et al., 2011), а также мРНК, которые впоследствии транслируются в белки (Song, Wessel, 2005; Wang et al., 2010; Ihara et al., 2011). Трансляции накопленных транскриптов начинается после формирования зиготы, так как накопленные РНК и белки требуются для прохождения первых клеточных циклов во время эмбрионального развития. В процессе перехода от материнского к эмбриональному контролю, после основной активации транскрипции на стадии 2 бластомеров, количество накопленных материнских транскриптов резко уменьшается. Такой процесс описывается как деградация унаследованных от ооцита РНК. К концу стадии двух бластомеров деградации подвергается около 25% материнской полиА-РНК и около 50% материнских белков (рис. 7, Б; Clegg, Piko, 1983; De Leon et al., 1983; Schultz, 2002; Li et al., 2010; Wang et al., 2010). Появление активных генов зиготы, сопровождается заменой мРНК, синтезированных в ооците, на новые зиготические транскрипты, специфичные для эмбриона с помощью изменения экспрессии генов (Minami et al., 2007).

Активация транскрипции рДНК совпадает с началом преобразования инертных ПЯ в зрелые ядрышки, которое завершается на стадии поздней морулы-ранней бластоцисты (Geuskens, Alexandre, 1984; Biggiogera et al., 1994; Maddox-Hyttel et al., 2005; Kyogoku et al., 2014a, 2014b). На ультраструктурном уровне эта трансформация выражается в появлении на поверхности ПЯ эмбрионов мышцы стадии 4-8 бластомеров основных структурных компонентов

активных ядрышек соматических клеток: ФЦ, ПФК и ГК (Flechon, Коресну 1998; Zatsepina et al., 2003; Maddox-Hyttel et al., 2005, 2007; Svarcova et al., 2009). На периферии ПЯ многоклеточных эмбрионов располагаются также рибосомные гены и белки, необходимые для биогенеза рибосом (Zatsepina et al., 2003; Svarcova et al., 2009). Процесс трансформации ПЯ в транскрибирующие ядрышки сопровождается их разборкой при делениях бластомеров и последующей сборкой более зрелых форм ПЯ/ядрышек в начале следующего клеточного цикла. Таким образом, для перехода ПЯ ранних эмбрионов в зрелые ядрышки более поздних многоклеточных эмбрионов, требуется около 4 суток (Дыбан, 1988). В настоящее время природа, динамика и механизмы ассоциация предшественников ядрышка остаются неизвестными.

### **1.5. Анализ молекулярного состава ПЯ в преимплантационных эмбрионах мыши.**

Долгое время предпринимались безуспешные попытки идентификации белков ядрышка в составе ПЯ одноклеточных эмбрионов с помощью классических методов иммуоцитохимии (Baran et al., 1995; Cuadros-Fernandez, Esponda, 1996; Zatsepina et al., 2003; Romanova et al., 2006b; Svarcova et al., 2009; Kyogoku et al., 2014a). На рисунке 8 показан классический пример иммуномечения антителами к белку NPM1 одноклеточных эмбрионов мыши. Видно, что белок хорошо идентифицируется в пронуклеусах зиготы, в то время как в центральном компоненте ПЯ отсутствует полностью (рис. 8). Белки ядрышек, характерные для соматических клеток, такие как РНК-полимераза I, UBF, фибрилларин и NPM1/B23/нуклеофозмин начинают выявляться на поверхности ПЯ после активации транскрипции рДНК на стадии двухклеточного эмбриона (Biggioera et al., 1994; Cuandros-Fernandez, Esponda, 1996; Zatsepina et al., 2003). Аккумуляция РНК-полимеразы I и фибрилларина на периферии ПЯ в зиготах и двухклеточных эмбрионах мыши показано в нескольких научных работах (Ferreira, Carmo-Fonseca, 1995; Zatsepina et al., 2003). В период основной активации эмбрионального генома, в период

реформирования трехкомпонентной структуры ядрышка, на его поверхности происходит накопление маркера телец Кахаля, белка коилина (Zatsepina et al., 2003). Вопрос о присутствии РНК в составе ПЯ зигот и двухклеточных эмбрионов остается открытым до сих пор. Существует только одна статья

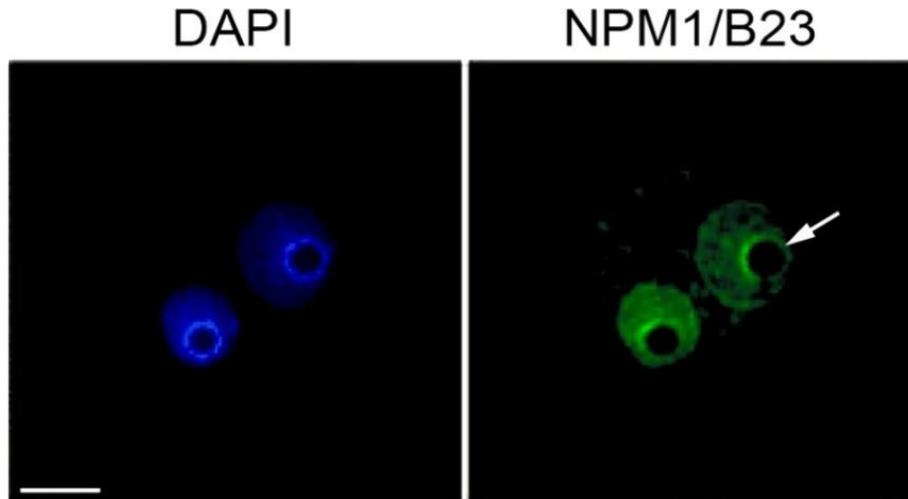


Рис. 8. Иммуномечение одноклеточных эмбрионов мыши антителами к ядрышковому белку NPM1/B23/нуклеофозмина и окрашивание хроматина красителем DAPI. Масштабная линия 20 мкм. Kyogoku et al., 2014a.

(Biggiogera et al., 1994), в которой были показаны следовые количества ядрышковых белков и РНК с помощью методов электронной микроскопии. Полученные в этой работе экспериментальные данные впоследствии не были подтверждены ни в одной работе.

### **1.6. Участие предшественников ядрышек в пространственной организации хромосом в одноклеточных эмбрионах**

В компетентных к созреванию предовуляторных GV (germinal vesicle) ооцитах SN-типа ЯПТ окружено непрерывным слоем гетерохроматина (ооциты SN-типа), также, как и ПЯ одноклеточных эмбрионов (De La Fuente, 2006; Martin et al., 2006; Almouzni, Probst, 2011; Bonnet-Garnier et al., 2012; Desmukh et al., 2012). В ооцитах NSN-типа прицентромерный гетерохроматин и центромерная ДНК агрегируются внутри хромоцентров (Bonnet-Garnier et al.,

2012). При переходе NSN-конфигурации хроматина в SN- распределение прицентромерного гетерохроматина изменяется, число хромоцентров значительно уменьшается, а ЯПТ становится транскрипционно инертным (Debey et al., 1993; Bouniol-Baly et al., 1999; De La Fuente, Eppig, 2001, рис. 9). Ооциты NSN-типа могут быть оплодотворены с последующим формированием нормальной зиготы с двумя пронуклеусами, но впоследствии такие эмбрионы останавливаются в развитии на стадии двух бластомеров, что указывает на важность ассоциации ЯПТ и хроматина (Zuccotti et al., 1998, 2002; Inoue et al., 2008). С увеличением возраста мышей, повышается доля выделяемых GV ооцитов SN-типа (Zuccotti et al., 2011). Несмотря на это была показана невозможность перехода хроматина ооцита NSN-типа в SN-тип *in vitro* (Belli et al., 2014).

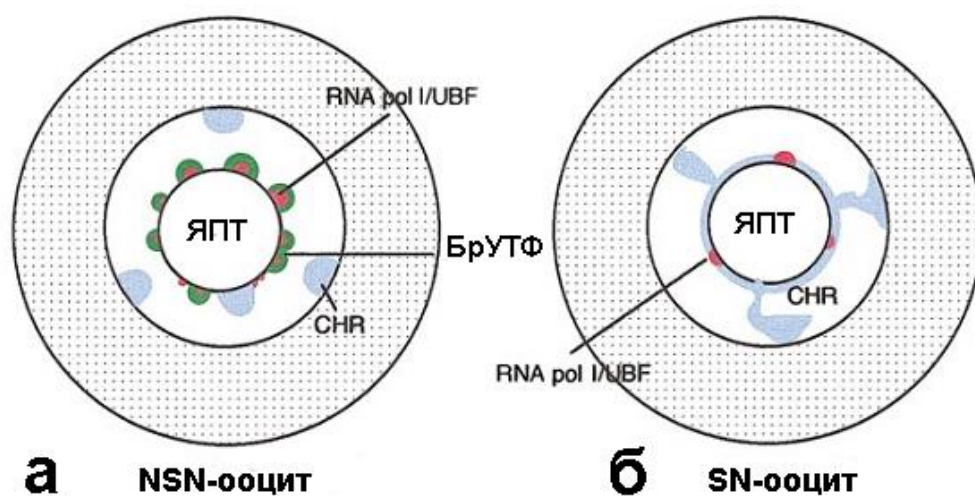


Рис. 9. Схема расположения компонентов РНК-синтезирующей машины в транскрипционно активных ооцитах NSN-типа (а) и транскрипционно инертных ооцитах, SN-типа (б). ЯПТ – ядрышко-подобное тельце; CHR – хроматин; RNApolI/UBF – РНК-полимераза I/UBF; БрУТФ – бром-уридин-трифосфат. Адаптировано из статьи Zatsepina et al., 2000.

Для того чтобы выяснить роль ПЯ и ЯПТ в эмбриональном развитии, проводят эксперименты по их удалению (энуклеолированию) с дальнейшим прижизненным наблюдением. Было показано, что организация хроматина в энуклеолированных зиготах и образованных после оплодотворения энуклеолированных GV ооцитов зигот, значительно отличалась от нормы. Для нормальных зигот характерна ассоциация центромерных участков хромосом с ПЯ, в противоположенности энуклеированным зиготам, в которых они беспорядочно распределены внутри пронуклеусов (Ogushi, Saitou, 2010; Fulka, Langerova, 2014; Kyogoku et al., 2014a). Эмбрионы, полученные из энуклеолированных GV ооцитов, останавливаются в развитии из-за нарушений в ремоделировании хроматина, репликации и экспрессии центромерных и прицентромерных сателлитных ДНК (Fulka, Langerova, 2014). В пользу участия ПЯ в структурной организации во время эмбрионального развития, также свидетельствуют данные о том, что сателлитные ДНК центромерных и прицентромерных районов хромосом ассоциированы с ПЯ в течение первого клеточного цикла. Можно выдвинуть гипотезу, что одной из функций ПЯ является упорядочение хромосом и их удержание в определенной части ядра при прохождении клеточного цикла (Гаврилова и др., 2009).

В связи с тем, что активные рибосомные гены выявляются на поверхности ПЯ в местах локализации транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I, была выдвинута гипотеза о том, что ПЯ могут выполнять функцию структурной основой для активации транскрипции (Flechon, Кореспу, 1998; Lin et al., 2014). В тоже время было показано, что в эмбрионах мыши некоторые ПЯ не связаны с рибосомными генами (Коробова и др., 2003; Romanova et al., 2006a), что показывает, что ПЯ даже в одном ядре обладают разной способностью к активации транскрипции рДНК и реорганизации ядрышкового аппарата. Этот вывод подтверждается работой Зацепиной с соавторами (Zatsepina et al., 2003) где было показано, что ПЯ одного

пронуклеуса обладают неодинаковой способностью к возобновлению транскрипции рДНК.

### **1.7. Участие предшественников ядрышек в формировании хромоцентров**

Перераспределение хроматина с поверхности ПЯ в нуклеоплазму на стадии двух бластомеров происходит одновременно с мажорной активацией генома и формированием в ядрах эмбрионов прохромоцентров, в состав которых входит преимущественно поздно реплицирующиеся центромерные и прицентромерные районы хромосом (Martin et al., 2006; Merico et al., 2007; Almouzni, Probst, 2011). Данное явление говорит в пользу того, что ПЯ принимают участие в формировании хромоцентров (Гаврилова и др, 2009; Almouzni, Probst, 2011). Было показано, что нарушение структуры хромоцентров в мышинных эмбрионах приводит к блокировке их развития (Probst et al., 2010; Santenard et al., 2010).

Степень ассоциация прицентромерных районов хромосом с ПЯ снижается от стадии позднего двухклеточного эмбриона к стадии четырехклеточного эмбриона. К стадии четырехклеточного эмбриона они полностью диссоциированы, чему способствует уплотнение прицентромерного гетерохроматина и появление новых структур, напоминающих классические хромоцентры (компактная масса прицентромерного гетерохроматина окружается индивидуальными центромерами); Aguirre-Lavin et al., 2012). Таким образом, материал предшественников ядрышек зигот может иметь нестандартные функции, такие как участие в пространственной организации хромосом, деконденсации и модификации хроматина, формировании хромоцентров, что значительно отличает их от функций ядрышек соматических клеток. Выяснение молекулярного состава ПЯ позволит уточнить роль этих структур в эмбриональном развитии. В связи с этим, в первой части настоящей работы

изучали молекулярный состав этих структур, а также проводили сравнительный анализ состава ПЯ зигот и ЯПТ ооцитов мыши.

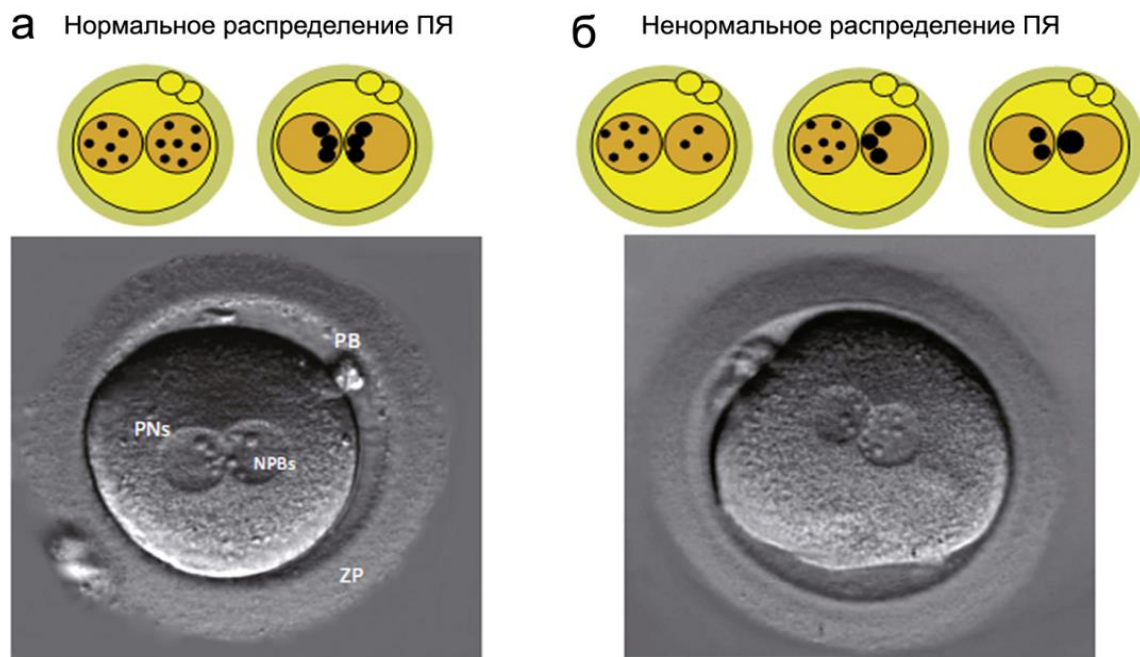
### **1.8. Ассоциация предшественников ядрышка в течение первого клеточного цикла после оплодотворения**

Снижение числа ПЯ с течением времени в обоих пронуклеусах одноклеточных эмбрионов мыши описано во многих статьях (Salvaing et al., 2012; Lan et al., 2016), однако до сих пор остается неизвестной динамика этого процесса. Хотя принято говорить о слиянии ПЯ на стадии зиготы, этот процесс не был показан в динамике прижизненного наблюдения. На момент начала данной работы существовало только 2 статьи, в которых обсуждали уменьшение количества ПЯ к стадии поздней зиготы (Lian et al., 2014; Li et al., 2011). Однако эти статьи были посвящены влиянию элементов цитоскелета на количество ПЯ в пронуклеусах: было показано, что инкубация с ингибитором микрофиламентов - цитохалазином D или с ингибитором промежуточных филаментов - акриламидом ведет к увеличению числа ПЯ на стадии поздней зиготы (Lian et al., 2014). Следует заметить, что во всех статьях, посвященных объединению ПЯ, объектом исследования были партеногенетически активированные ооциты, а не яйцеклетки, оплодотворенные *in vitro* или эмбрионы, полученные *in vivo* (Lian et al., 2014; Li et al., 2011).

Характер распределения ПЯ в одноклеточном эмбрионе человека является важным маркером способности к нормальному развитию до стадии бластоцисты и дальнейшей имплантации. С формированием пронуклеусов, через 12-16 ч после оплодотворения, в каждом из них образуется множество мелких произвольно распределенных ПЯ. Затем, в процессе нормального развития, происходит перераспределение ПЯ и увеличение их размеров к поздней зиготе (Tesarik, Greco, 1999). ПЯ оказываются поляризованными в экваториальной области эмбриона, в зоне “соприкосновения” двух пронуклеусов (рис. 10а). Важной особенностью является синхронность



перераспределения ПЯ, их размер и количество: если число ПЯ отличается в одном пронуклеусе более чем на 3 структуры, размер ПЯ сильно различается в двух пронуклеусах, отсутствует поляризация ПЯ хотя бы в одном из пронуклеусов, то такие эмбрионы считаются непригодными для развития (Tesarik, Greco, 1999; Scott et al., 2000; Fulka et al., 2015; рис. 10). Количество ПЯ на пронуклеус, характерное для нормального эмбриона на стадии зиготы после поляризации ПЯ, было выявлено с помощью клинических



Fulka et al., 2015

Рис. 10. Характер распределения ПЯ в одноклеточных эмбрионах человека. а - нормальное распределение ПЯ; б - патологическое распределение ПЯ. PNs - пронуклеусы; NPBs - ПЯ; PB- полярное тельце; ZP - блестящая оболочка. Адаптировано из статьи Fulka et al., 2015.

Наблюдений (успешных имплантаций эмбрионов пациентам) и составило от 1 до 4 ПЯ на пронуклеус (Senn et al., 2006). Для эмбрионов мыши не было показано никаких особенностей распределения ПЯ в зиготе. Тем не менее, удаление ПЯ ведет к аномалиям в сегрегации хромосом и отложенному делению дроблению, а в некоторых случаях - к двухклеточному блоку (Fulka et al., 2014). Таким образом, при очевидной важности ПЯ для развития эмбрионов

мышь, неизвестен их характер распределения и динамика ассоциации в течение первого клеточного цикла. В связи с этим, вторая часть настоящей работы была посвящена изучению динамических процессов, связанных с движением ПЯ у одноклеточных эмбрионов мыши, с помощью прижизненной видеосъемки.

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1. Лабораторное оборудование**

1. Стереомикроскоп Stemi 2000–С («CarlZeiss» Германия), с осветительным элементом CL 1500 ECO («CarlZeiss» Германия);
2. Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 510 DuoScanMETA («CarlZeiss» Германия). Лазеры: аргоновый (мощность 30 мВт), твердотельный лазер с диодной накачкой (DPSS 561-10, мощность 15 мВт), диодный (405-50, мощность 50 мВт), гелий-неоновый (мощность 5 мВт) лазерами;
3. Световой эпифлуоресцентный микроскоп AxioObserver («CarlZeiss» Германия), сопряженный с инкубатором для прижизненных наблюдений, CCD камерой Hamamatsu (Япония), необходимыми контроллерами, фильтрами, объективами;
4. Ламинарный бокс (BH-EN 2004, «Faster», Италия);
5. CO<sub>2</sub>-инкубатор («Sanyo», Japan);
6. Термостат («BinderGmbH», Германия);
7. Термостат для эппендорфов CH-100 («Biosan», Латвия);
8. Магнитная мешалка с подогревом MSH 300 («Biosan», Латвия)
9. Система очистки воды Direct-Q 5 («Millipore», США);
- 10.Центрифуга (5415R «Eppendorf», США);
- 11.Механические микропипетки Stripper («Origio», США) с пластиковыми наконечниками; внутренний диаметр капилляра - 175 мкм;
- 12.Пипетки разного объема («Eppendorf», США);

### 13. Холодильники, компьютеры.

#### 2.2. Реактивы

1. ФСБ (изотоничный фосфатно–солевой буфер, 140мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1.5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.1 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), pH 7.2;
2. 20×SSC (двадцатикратный цитратно-натриевый буфер, 3 М NaCl, 0.3 М  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), pH 7.0;
3. 2×SSC (двукратный цитратно-натриевый буфер, 0.3 М NaCl, 0.03 М  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), pH 7.0;
4. 4×SSC/0.05% Tween 20 (четырёхкратный цитратно-натриевый буфер, 0.6 М NaCl, 0.06 М  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  с добавлением Tween 20 w/w), pH 7.0
5. 3%-ный и 4%-ный растворы параформальдегида (ПФА) на ФСБ. Фиксатор готовили перед использованием, растворяя 0.3, 0.4 г ПФА («MP Biomedical, Inc.», Франция) в 10 мл ФСБ при 60°C;
6. 70% раствор этилового спирта, раствор готовили из 98% раствора этанола на бидистиллированной воде;
7. Тритон X-100 («MP Biomedicals, Inc», Франция), 0.2 %-ный раствор Тритона X-100 на ФСБ, готовили перед использованием из 10%-ного стокового раствора;
8. Среда M2 для выделения ооцитов и эмбрионов (4.15 мМ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 20.85 мМ HEPES, 4 мг/мл BSA, «Sigma-Aldrich», США);
9. дбцАМФ (дибутирил-циклический аденозинмонофосфат, «Sigma-Aldrich», США), в рабочей концентрации, 100 мкг/мл, в среде M2;
10. Гиалуронидаза (hyaluronidase) («Sigma-Aldrich», США) в рабочей концентрации 100 мкг/мл. Готовили в среде M2 непосредственно перед использованием;
11. Среда EmbryoMax® KSOM Medium (MerckMillipore, USA) для культивирования эмбрионов
12. среда  $\alpha$ -MEM для созревания ооцитов («Life Technologies» или «ПанЭко»)

13. Na pyruvate (пируват натрия, «Sigma-Aldrich», США), в конечной концентрации 146 мкг/мл на среде  $\alpha$ -MEM
14. Taurine (таурин, «Sigma-Aldrich», США), в конечной концентрации 5мМ на среде  $\alpha$ -MEM
15. FBS (фетальная бычья сыворотка, «Sigma-Aldrich», США), в концентрации 5% в среде  $\alpha$ -MEM
16. Протеиназа К («Amresco», США). В концентрациях 1 мкг/мл и 2 мкг/мл, на ФСБ;
17. Рибонуклеаза А («Sigma-Aldrich», США);
18. Пиронин Y («Sigma-Aldrich», США);
19. ФИТЦ, изомер 1 (флуоресцеин-5-изотиоцианат, FITC, fluorescein-5-isothiocyanate isomer I, «Biotium», США);
20. Формамид («Panreac», Испания);
21. Деионизированный формамид («Sigma-Aldrich», США);
22. 50% Декстрансульфат («Loba chemie, Fischamend», Австрия);
23. Среды для заключения клеток Vectashield («Vector laboratories Inc.», США) и DAPI/Antifade («MetaSystem», Германия);
24. DAPI - 4',6-диамидин-2-фенилиндол («Life Technologies», USA);
25. Hoeschst 33258 («Sigma-Aldrich», США);
26. Hoeschst 33342 («Sigma-Aldrich», США);
27. Гонадотропин сыворотки жеребой кобылы (ГСЖК, pregnant mare serum gonadotropin, PMSG, «Sigma-Aldrich», США);
28. Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ, human chorionic gonadotropin, hCG) («Sigma-Aldrich», США).

### **2.3. Антитела**

#### **Первичные антитела к белкам ядрышка и рибосомным белкам:**

1. Белок UBF (Аутоиммунная сыворотка человека P419 против белка UBF; Zatssepina et al., 1993)

2. Белок фибрилларин (Кроличьи поликлональные антитела против белка фибрилларина; «Абсам», Великобритания, ab5821)
3. Белок NPM1 (Мышиные моноклональные антитела против белка NPM1; «Абсам», Великобритания, ab5821)
4. Белок нуклеолин (Кроличьи поликлональные антитела против белка нуклеолина; «Абсам», Великобритания, ab70493)
5. Белок RPL26 (Кроличьи поликлональные антитела против белка RPL26; «Абсам», Великобритания, ab59567)
6. Белок RPS10 (Кроличьи поликлональные антитела против белка RPS10; «Абсам», Великобритания, ab95944).

Все первичные антитела использовались в разведении 1:200 (на ФСБ), кроме антител к белку нуклеолину (1:100, на ФСБ).

**Вторичные антитела:**

1. Козьи вторичные антитела против IgG (H+L) кролика конъюгированные с флюорохромом Alexa-488® («Lifetechnologies») использовались для детектирования фибрилларина, нуклеолина, RPL26, RPS10 10;
2. Козьи вторичные антитела против IgG (H+L) кролика конъюгированные с флюорохромом Alexa-568® («Lifetechnologies») использовались для детектирования нуклеолина;
3. Козьи вторичные антитела против IgG (H+L) мыши, конъюгированные с флюорохромом Alexa-488® («Lifetechnologies») использовались для детектирования NPM1;
4. Козьи вторичные антитела против IgG (H+L) мыши конъюгированные с флюорохромом Alexa-568® («Lifetechnologies»), использовались для детектирования NPM1;
5. Козьи вторичные антитела против IgG человека, конъюгированные с флюорохромом ФИТЦ («Sigma-Aldrich») использовались для детектирования UBF.

Все вторичные антитела использовали в разведении 1:200 на ФСБ.

## **2.4. Культура клеток**

Фибробласты мыши линии NIH/3T3 выращивали в среде DMEM (модифицированная среда Дульбекко, “ПанЭко”, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (“HyClone”, США), 2 мМL-глутамин, антибиотики пенициллин и стрептомицин (по 250 ЕД каждого), при 37° С и 5% CO<sub>2</sub> в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (“Sanyo”, Япония) и пересаживали дважды в неделю. Клетки приобретены в Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН) и не контаминированы микоплазмой.

### **2.4.1. Окрашивание фибробластов NIH/3T3 РНК-связывающим красителем пиронином Y и белок-связывающим красителем ФИТЦ.**

Клетки, выращенные на покровных стеклах, промывали в ФСБ и фиксировали 3%-ным ПФА на ФСБ в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем, клетки отмывали в трех сменах ФСБ и обрабатывали 0.2%-ным раствором Тритона X-100 в ФСБ 10 мин на льду (при 4° С). После этого, клетки отмывали в трех сменах ФСБ и окрашивали в смеси двух красителей: 10 мкг/мл пиронина Y (PY, Sigma-Aldrich) и 1 мкг/мл ФИТЦ (FITC, fluorescein-5'-isothiocyanate isomer I; Biotium Inc., USA) в ФСБ в течение 60 мин. Стоковый раствор ФИТЦ готовили на DMSO, для окрашивания использовали краситель в концентрации 1 мкг/мл, разведенный в ФСБ. После окрашивания, клетки промывали в ФСБ и заключали в заливочную среду Мовиол с добавлением DABCO.

### **2.4.2. Иммуноцитохимическое выявление белков ядрышка в фибробластах NIH/3T3**

Фибробласты фиксировали 3%-ным ПФА в ФСБ в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки отмывали от фиксатора в ФСБ (3 раза по 10 мин), обрабатывали 0.2%-ным Тритоном X-100 в ФСБ в течение 10 мин на льду (при 4°С) и отмывали от детергента в ФСБ. Затем часть стекол с клетками обрабатывали раствором протеиназы К в концентрации 1 мкг/мл или 2 мкг/мл, разведенной в ФСБ, и инкубировали при 22° С 15-30 минут во влажной камере.

В качестве контроля использовались клетки, инкубированные в ФСБ без протеиназы К в течение того же времени. Клетки отмывали от протеиназы К в ФСБ (3 раза по 10 мин). Затем клетки переносили в раствор первичных антител и инкубировали в течение 45-60 мин во влажной камере в темноте. После этого клетки отмывали от первичных антител в ФСБ (3 раза по 10 мин) и переносили в раствор вторичных антител на 45-60 мин. Клетки отмывали от вторичных антител в трех сменах ФСБ по 10 мин каждая и переносили в раствор ДНК-связывающего красителя Hoechst 33258 или DAPI в рабочей концентрации 1 мкг/мл на 10 минут (в темноте, во влажной камере). Затем клетки промывали в ФСБ и заключали в заливочную среду Мовиол.

#### **2.4.3. Иммуоцитохимическое окрашивание фибробластов NIH/3T3 после фиксации 70%-ным этанолом**

Фибробласты фиксировали 70%-ным раствором этилового спирта в течение 15 мин. Затем отмывали в трех сменах ФСБ по 10 мин каждая и переносили в первичные антитела во влажную камеру на 60 мин в темноте. Затем клетки отмывали от первичных антител в трех сменах ФСБ по 10 мин и переносили в раствор вторичных антител во влажную камеру и инкубировали 60 минут. Затем клетки отмывали в ФСБ и переносили в раствор красителя Hoechst 33258 или DAPI в рабочей концентрации 1 мкг/мл (инкубировали 10 мин во влажной камере в темноте). Клетки отмывали в ФСБ и заключали в Мовиол.

#### **2.4.4. Выявление рРНК в эмбриональных фибробластах мыши линии NIH/3T3 методом флуоресцентной гибридизации *in situ***

Клетки фиксировали 4%-ным раствором ПФА на ФСБ в течение 20-30 мин при комнатной температуре. Промывали в трех сменах ФСБ по 5 мин каждая, обрабатывали 0.2%-ным Тритоном X-100 на ФСБ 10 мин на льду (при 4°C). После этого клетки отмывали в ФСБ в течение 5 мин, затем клетки отмывали двукратным стандартным солевым буфером (2×SSC, 0.3 M NaCl, 0.03 M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, pH 7.0) в течение 5 мин. Для приготовления гибридизационной

смеси пробы денатурировали в деионизированном формамиде в течение 10 мин при 70°C. Гибридизационная смесь содержала 50% деионизированного формамида, 10% декстрансульфата, 5% 20×SSC и 8 нг/мкл олигонуклеотидных зондов (список зондов представлен в таблице 1, положение зондов относительно первичного транскрипта мыши представлено на рис. 11). Гибридизацию производили 16 ч при 42°C во влажной камере. После гибридизации клетки отмывали 50%-ным формамидом на 2×SSC (3×10 мин) при 42°C, 2×SSC (10 мин) при 42°C и 2×SSC 10 мин при комнатной температуре, в ФСБ 10 мин при комнатной температуре и окрашивали хроматин Hoechst 33258 или DAPI. Клетки промывали в ФСБ (10 мин) и заключали в заливочную среду Мовиол. Полученные препараты анализировали в конфокальном лазерном микроскопе LSM510 DuoScanMETA («CarlZeiss», Германия)

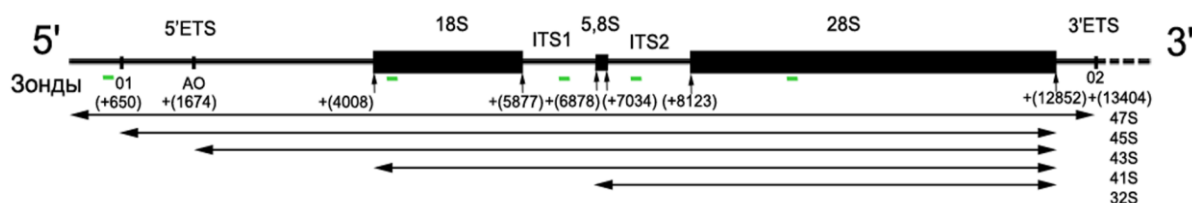


Рис. 11. Структура первичного транскрипта мыши. 5'ETS - 5'-внешний транскрибируемый спейсер, ITS1 – первый внутренний транскрибируемый спейсер; ITS2 – второй внутренний транскрибируемый спейсер; 3'ETS - 3'-внешний транскрибируемый спейсер; 5'ETS - внешний транскрибируемый спейсер. 18S, 5.8S, 28S – зрелые рРНК. Зелеными штрихами отмечено положение олигонуклеотидных проб к 5'ETS, ITS1, ITS1, 18S и 28S рРНК. 01, 02, AO – сайты расщепления. Положения основных участков в составе 47S пре-рРНК указаны в скобках.

Таблица 1. Олигонуклеотидные пробы, использованные для FISH-анализа. Положение зонда указано относительно 5'-конца 47S пре-рРНК мыши.



<b>Антисмысловые зонды</b>	<b>Последовательность 5' - 3'</b>	<b>Положение зонда</b>
<b>5'ETS</b>	Cy3- ATCGGGAGAAACAAGCGAGATAGGAA TGTCTTA	602-634
<b>ITS1</b>	Cy3- AAACCTCCGCGCCGGAACGCGACAGC TAGG	6391-6420
<b>18S</b>	FAM- ATCGAAAGTTGATAGGGCAGACGTTC GAAT	4351-4380
<b>ITS2</b>	Cy3- CAGACAACCGCAGGCGACCGACCGGC C	7471-7500
<b>28S</b>	FAM- GAGGGAACCAGCTACTAGATGGTTCG ATTA	9571-9600

## 2.5. Лабораторные животные

В работе использовали самок инбредных мышей линии C57Bl/6 в возрасте 5-9 недель и самцов той же линии в возрасте 2-6 месяцев. Животных содержали в виварии ИБХ РАН в зоне, свободной от патогенных возбудителей, с неограниченным доступом к воде и пище. Животных приобретали в питомнике ФИБХ РАН (Пушино, Россия) и использовали в соответствии с Правилами (Приказ Министерства Здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”).

## 2.6. Гормональная стимуляция мышей и получение ооцитов и эмбрионов

Для получения эмбрионов в экспериментах использовали двух самок мышей линии C57Bl/6 возрастом 5-9 недель и двух самцов мышей той же линии возрастом 2-6 месяцев. Животных содержали в виварии ИБХ РАН с неограниченным доступом к воде и пище. Животных приобретали в питомнике ФИБХ РАН (Пушино, Россия) и использовали в соответствии с Правилами (Приказ Министерства Здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”). Для стимуляции роста ооцитов и фолликулов у самок, проводили внутрибрюшинные инъекции гормонов: ГСЖК (гонадотропин сыворотки жеребой кобылы, PMSG, Sigma-Aldrich) в концентрации 7 МЕ/мышь. Через 46-48 часов после введения ГСЖК проводили вторую инъекцию – ХГЧ (7 МЕ/мышь, хорионический гонадотропин человека, Merck, Германия) и подсаживали самку к самцу. Возраст эмбрионов отсчитывали от времени инъекции ХГЧ (Вагина и др., 1997), а успешное оплодотворение определяли по наличию вагинальной пробки у самок. Выведение самок из эксперимента проводили путем цервикальной дислокации шейных позвонков. Эмбрионы выделяли из яйцеводов через 19-27 ч (стадия зиготы), 44-49 ч (стадия двух бластомеров); 59-60 ч (стадия четырех бластомеров) после введения ХГЧ. Эмбрионы выделяли в среде M2 под контролем стереомикроскопа Stemi2000 из ампулярной части яйцевода и переносили в каплю среды M2 с добавлением гиалуронидазы в концентрации 100 мкг/мл для диссоциации клеток кумулюса. В альтернативных экспериментах, для получения более поздних эмбрионов, зиготы извлекали из ампулярной части яйцевода, и культивировали в среде EmbryoMax® KSOM (Millipore, США) до достижения нужной стадии развития при атмосфере 5% CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub> и 37° С. Развитие эмбрионов контролировали в инвертированный микроскоп PrimoVert («CarlZeiss», Германия).

Для получения зрелых ооцитов на стадии метафазы II, самкам инъецировали ГСЖК в концентрации 7 МЕ/мышь. Через 46-48 часов после введения ГСЖК, самкам внутрибрюшинно инъецировали ХГЧ, 7 МЕ/мышь, и выделяли ооциты из ампулярной части яйцевода через 19-24 ч после инъекции.

GV ооциты получали после инъекции 7 МЕ ГСЖК. Через 46-48 ч после инъекции животных выводили из эксперимента, как описано выше и выделяли GV ооциты непосредственно из изолированных яичников, с помощью их пунктирования препаративными иглами под контролем стереомикроскопа Stemі 2000–С в среде M2 с добавлением дбцАМФ (дибутирил-циклический аденозинмонофосфат, 100 мкг/мл) для предотвращения спонтанной активации ооцитов и вступления в метафазу I мейотического созревания. Манипуляции с эмбрионами и ооцитами производили с использованием механических микропипеток Stripper со сменными наконечниками с внутренним диаметром 175 мкм. Получали 20-30 зигот от каждой самки.

### **2.7. Прижизненное окрашивание эмбрионов и ооцитов Hoechst 33342**

Несколько эмбрионов и/или ооцитов помещали в каплю объемом 100-200 мкл среды M2 с добавлением дбцАМФ (дибутирил-циклический аденозинмонофосфат, «Sigma-Aldrich», США, 100 мкг/мл) и 0,1 мкг/мл Hoechst 33342 и инкубировали в течение 5-7 мин в темноте. Затем эмбрионы/ооциты отмывали 10 мин в среде M2 с добавлением дбцАМФ (100 мкг/мл) в темноте и фотографировали в режиме флуоресценции и дифференциального интерференционного контраста по Номарскому (DIC), с помощью эпифлуоресцентного микроскопа AxioObserver, используя объектив ECPlan-NeofluarDIC×40/0.6 (числовая апертура) или с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200, используя объектив ECPlan-Neofluar ×40/0.75 (числовая апертура).

### **2.8. Окрашивание эмбрионов мыши красителями пиронином Y и ФИТЦ**

Эмбрионы и ооциты фиксировали 3% параформальдегидом (ПФА) в ФСБ 30 мин при комнатной температуре, отмывали от фиксатора в трех сменах ФСБ по 10 мин каждая. Затем клетки обрабатывали детергентом 0.2% Тритоном X-100 в ФСБ в течение 20 мин на льду (при 4° С). После этого, эмбрионы и/или ооциты переносили в смесь 10 мкг/мл пиронина Y (PY, Sigma-Aldrich) и 1 мкг/мл ФИТЦ и инкубировали в смеси красителей при комнатной температуре в темноте в течение 2 часов. Затем эмбрионы и ооциты отмывали в двух сменах ФСБ по 10 мин каждая. После этого клетки окрашивали DAPI или Hoechst 33342 в конечной концентрации 1 мкг/мл в течение 15 мин. После отмывки клеток в ФСБ в течение 10 мин, клетки заключали в Vectashield или DAPI/Antifade и изучали с помощью конфокального микроскопа LSM510 DuoScanMETA.

Для того, чтобы показать специфичность окрашивания PY, фиксированные и пермеабелизованные эмбрионы обрабатывали 1 мг/мл РНКазы А (Sigma-Aldrich) в ФСБ в течение 2 ч перед переносом в смесь красителей. Специфичность окрашивания ФИТЦ была доказана преинкубацией эмбрионов в 1 мкг/мл растворе протеиназы К (Sigma-Aldrich) в ФСБ в течение 20-30 мин при комнатной температуре (20-23°С). В контрольных группах эмбрионы инкубировали в ФСБ в тех же условиях, что и клетки, обработанные ферментами.

## **2.9. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши антителами к ядрышковым белкам после фиксации ПФА и обработки протеиназой К**

Эмбрионы мыши на разных стадиях развития фиксировали 3%-ным ПФА в ФСБ 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки отмывали от фиксатора в трех сменах ФСБ, по 5 мин каждая и обрабатывали детергентом, 0.2%-ным раствором Тритона X-100 в течение 20 мин на льду (при 4° С). После отмывки эмбрионов трех сменах ФСБ по 5 мин каждая, клетки опытной группы

переносили в раствор протеиназы К в концентрации 1 мкг/мл или 2 мкг/мл, приготовленный на ФСБ, и инкубировали в течение 15 мин или 30 мин при 22° С. Эмбрионы контрольной группы выдерживали 15 мин и 30 мин соответственно, при 22° С в ФСБ в отсутствие фермента. После этого эмбрионы контрольной и опытной групп фиксировали 3%-ным ПФА в ФСБ 30 мин, отмывали в двух сменах ФСБ по 5 мин каждая и переносили в 0.2%-ный раствор Тритона X-100 на 20 мин, при 4° С. После двух отмывок в ФСБ по 5 мин каждая, клетки инкубировали с первичными антителами в течение 45-60 мин во влажной камере в темноте. После этого эмбрионы промывали в трех сменах ФСБ по 5 мин каждая и переносили в соответствующие вторичные антителана 45-60 мин во влажной камере в темноте. После вторичных антител клетки промывали в двух сменах ФСБ по 5 мин каждая и окрашивали DAPI или Hoechst 33258 в течение 15 мин. Затем эмбрионы промывали в ФСБ и заключали в заливочную среду DAPI/Antifade. Более 20 эмбрионов было использовано для каждого первичного антитела.

#### **2.10. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши антителами к белкам ядрышка после фиксации 70%-ным этиловым спиртом**

Эмбрионы фиксировали 70%-этиловым спиртом ПФА в ФСБ 20-25 мин, отмывали в трех сменах ФСБ по 5 мин каждая и обрабатывали 0.2%-ным раствором Тритона X-100 в течение 10 мин при 4° С. Затем клетки отмывали в ФСБ и инкубировали с первичными антителами в течение 45-60 мин во влажной камере в темноте. После этого, эмбрионы отмывали от антител в двух сменах ФСБ по 5 мин каждая и переносили в соответствующие вторичные антитела, инкубировали во влажной камере, в темноте, в течение 45-60 мин. После отмывки в двух сменах ФСБ по 5 мин каждая эмбрионы окрашивали DAPI или Hoechst 33258 в течение 15 мин. Затем эмбрионы отмывали в двух сменах ФСБ по 5 мин каждая и заключали в заливочную среду DAPI/Antifade.

## **2.11. Выявление рРНК в преимплантационных эмбрионах мыши методом флуоресцентной гибридизации *in situ***

Для выявления рРНК использовали олигонуклеотидные зонды, меченные с 5'-конца флуорохромом Cy3 или FAM к фрагменту 28S рРНК. В качестве контроля использовали смысловые (sense) зонды. Антисмысловые (antisense) и смысловые (sense) зонды были приобретены у фирмы «ДНК-синтез» (Россия); концентрация проб в стоковых растворах составляла около 2 мкг/мкл. Для того чтобы минимизировать артефакты фиксации, использовали две методики фиксации эмбрионов: (1) Клетки фиксировали 3% раствором ПФА на ФСБ 30 мин при комнатной температуре. Промывали ФСБ (2×10 мин), пермеабелизовали 0.2%-ным Тритоном X-100 (20 мин при 4° С); (2) Клетки фиксировали 70%-ным этиловым спиртом 20-25 мин, отмывали ФСБ (2×10 мин) и обрабатывали 0.2%-ным раствором Тритона X-100 в течение 10 мин при 4° С. После отмывки в ФСБ, в случае обоих протоколов фиксации, клетки промывали двукратным цитратно-натриевым буфером (2×SSC, 0.3 М NaCl, 0.03 М Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, pH 7.0) 10 мин и перемещали в гибридизационную смесь. Гибридизационная смесь содержала 50% деионизованного формамида («Sigma-Aldrich», США), 10% декстрансульфата («Loba chemie, Fischamend», Австрия), 5% 20×SSC (3 М NaCl, 0.3 М Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, pH 7.0) и 8 нг/мкл олигонуклеотидных зондов (Таблица 2). Гибридизацию проводили во влажной камере в течение 16-18 ч при 42°С. После этого клетки сначала отмывали 50% формамидом на 2×SSC (3 смены по 10 мин) при 42°С, затем 2×SSC при 42°С (10 мин) и 2×SSC (10 мин) при комнатной температуре. Затем эмбрионы промывали ФСБ (2 смены по 10 мин). В некоторых экспериментах производили одновременное иммуноцитохимическое выявление белков. Для этого клетки инкубировали с первичными и вторичными антителами, как описано в разделе 2.10. и 2.11. Хроматин окрашивали красителем DAPI или Hoechst 33258 (1 мкг/мл) в течение 15 мин. Затем эмбрионы отмывали в ФСБ и заключали в среду DAPI/Antifade или Vectashield.

## **2.12. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия**

Анализ препаратов производили в конфокальном лазерном микроскопе LSM510 DuoScanMETA (CarlZeiss, Германия), снабженного аргоновым (мощность 200 мВт) и гелий-неоновым (мощность 5 мВт) лазерами, с использованием иммерсионного объектива PlanAprochromat ×63/ЧА (числовая апертура) 1.4. Сканирование всего поля зрения (для фибробластов мыши NIH/3T3) или каждого эмбриона производили одновременно в нескольких каналах, используя следующие характеристики возбуждения/детекции: для флуоресценции в зеленом канале – 488 нм/505-550 нм, для флуоресценции в красном канале – 561 нм/575 нм; для голубой флуоресценции – 405 нм/450 нм. Серии оптических срезов по Z-оси получали путем фотографирования изображений через интервал 0.5-1 мкм.

## **2.13. Прижизненные наблюдения**

В данной части работы осуществляли прижизненную видеосъемку эмбрионов мыши на стадии зиготы и ооцитов мыши на стадии зародышевого пузырька.

### **2.13.1. Цейтраферная видеосъемка зигот мыши**

Выделенные зиготы, окрашенные прижизненным красителем Hoechst33342 (как описано в 2.7.), помещали в каплю среды для культивирования эмбрионов EmbryoMax® KSOM Medium (Merck Millipore, USA), объемом 20 мкл (для 5 эмбрионов), находящуюся в центре чашки Петри со стеклянным дном диаметром 35 мм, и покрывали минеральным маслом (Ovoil, «Vitrolife», Швеция) во избежание испарения среды. Чашку с каплей помещали в камеру-инкубатор PMS1 («Carl Zeiss», Германия) с нагревательным столиком PS1 («CarlZeiss», Германия) и снимали на инвертированном микроскопе AxioObserver («Carl Zeiss», Германия) с помощью CCD камеры Hamamatsu («Hamamatsu», Япония), используя объектив ECPlan-Neofluar 40x (числовая апертура 0.6)/DIC. Съёмка осуществлялась в течение 1-5 ч с частотой 1 кадр в 10-30 минут при температуре +37°C, в увлажнённой атмосфере с

концентрацией CO<sub>2</sub> 5%. С помощью метода цейтраферной видеосъемки было проанализировано 25 зигот мыши.

### **2.13.2. Цейтраферная видеосъемка GV ооцитов мыши**

После выделения GV ооцитов производили их классификацию на два типа, исходя из текущего положения ядра: ооциты с центральным и периферическим положением ядер, для чего использовали стереомикроскоп Stemi2000 и эпифлуоресцентный микроскоп Axio Observer («Carl Zeiss», Германия). Определение конфигурации хроматина, т.е. типа GV ооцита, производили после окраски витальным ДНК-связывающим красителем Hoechst 33342 («Thermo Fisher Scientific», США). Выделенные ооциты помещали в раствор 0,1 мкг/мл Hoechst 33342 в среде M2 с добавлением 100 мкг/мл dbcAMP на 5-7 мин при комнатной температуре. Затем ооциты переносили в среду M2 с добавлением dbcAMP и фотографировали в режиме флуоресценции и дифференциального интерференционного контраста по Номарскому (DIC), используя световой эпифлуоресцентный микроскоп AxioObserver («Carl Zeiss», Германия) и коррекционный объектив LD Plan-Neofluar ×40 (числовая апертура 0.6)/DIC.

Для прижизненных наблюдений ооциты переносили в среду α-MEM («Life Technologies», 12561056) с добавлением 5% (по объему) инактивированной фетальной бычьей сыворотки, 4 мМ L-глутамин, 5 мМ таурин и 146 мкг/мл пирувата натрия (Belli et al., 2014). Несколько ооцитов (до 5 шт) помещали в каплю α-MEM объемом 20 мкл находящуюся в центре чашки Петри со стеклянным дном диаметром 35 мм, и покрывали минеральным маслом во избежание испарения среды. Чашку с каплей помещали в камеру-инкубатор PMS1 («Carl Zeiss», Германия) с нагревательным столиком PS1 («Carl Zeiss», Германия) и снимали на инвертированном микроскопе Axio Observer («Carl Zeiss», Германия) с помощью CCD камеры Hamamatsu («Hamamatsu», Япония), используя объектив ECPlan-Neofluar 40x (числовая апертура 0.6)/DIC. Съёмку осуществляли в течение 18-24 ч, с частотой 1 кадр в



10-30 минут, при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ , в увлажнённой атмосфере с концентрацией  $\text{CO}_2$  5%. По результатам съёмки анализировали ооциты, вступившие в стадию распада зародышевого пузырька (GVBD). С помощью метода цейтраферной видеосъёмки было проанализирован характер движения ЯПТ в 27 GV ооцитах мыши.

### 2.13.3. Определение положения ядра в GV ооцитах мыши

Ооциты мыши на стадии в составе предовуляторного фолликула классифицируются на два основных типа, исходя из положения ядра: ооцит с центральным и периферическим ядром (Bellone et al., 2009; Brunet, Maro; 2007). Чтобы разделить ооциты на два типа, для каждого ооцита были измерены диаметр без блестящей оболочки (zona pellucida), диаметр ядра (зародышевого пузырька), расстояние между центром (центроидом, centroid) ооцита и центром (центроидом, centroid) ядра. Определение положения ядра относительно центра ооцита производили способом, основанным на вычислениях коэффициента  $\rho$

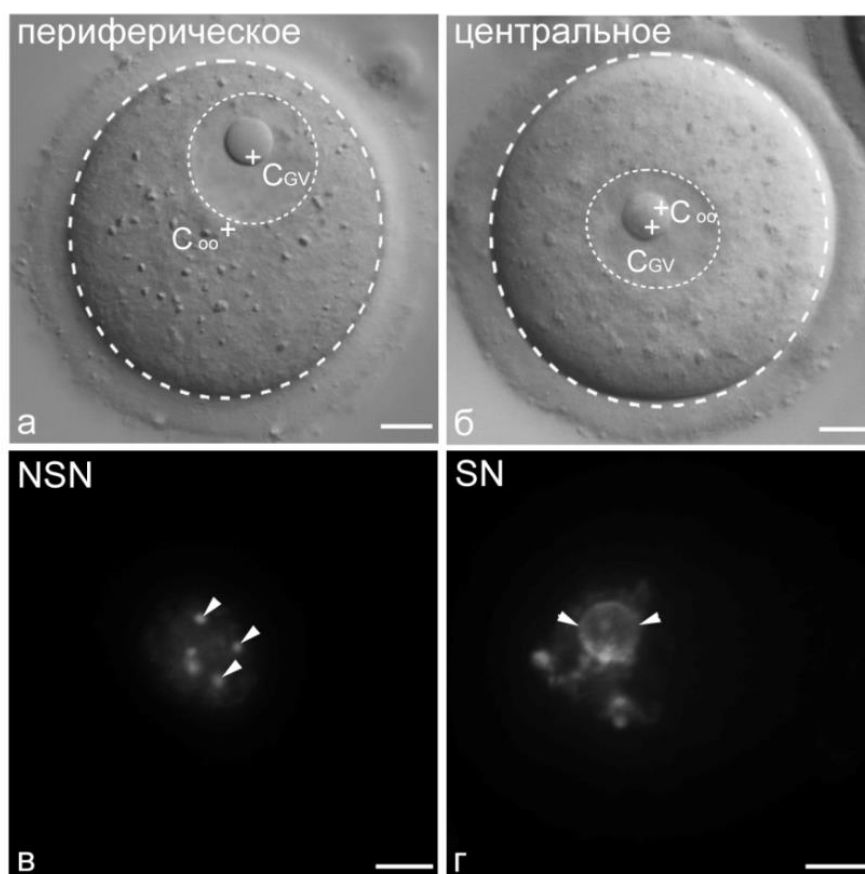


Рис. 12. Классификация GV ооцитов мыши. а, б - по положению ядра (зародышевого пузырька) на основе коэффициента  $\rho$ :  $0 < \rho \leq 0.5$  (центральное положение, б), и  $0.5 < \rho \leq 1$  (периферическое положение ядра, а). в, г - по конфигурации хроматина. Пунктирными линиями обозначены контуры ооцита и ядра; крестиками отмечены центр ооцита и центр ядра ( $C_{oo}$  и  $C_{GV}$ ). Головки стрелок – хромоцентры (в, NSN) и кольцо гетерохроматина (г, SN). Масштабная линия, 10 мкм

( $\rho$ ), который отражает расстояние между центрами ооцита ( $oo$ ) и зародышевого пузырька (ядра,  $я$ ) и рассчитывается по формуле  $\rho = \frac{d(C_{я} - C_{oo})}{d(R_{oo} - R_{я})}$ , где  $d(C_{я} - C_{oo})$  - расстояние между центрами ( $C$ ) ядра и ооцита (в мкм), а  $d(R_{oo} - R_{я})$  - разница между средними радиусами ( $R$ , в мкм) ооцита и ядра. Таким образом,  $\rho$  является параметром, указывающим на позицию ядра внутри ооцита и может колебаться от 0 (когда центр ядра совпадает с центром ооцита) до 1 (когда центр ядра расположен на кортексе ооцита). Для  $\rho$ :  $0 < \rho \leq 0.5$  ядро имело центральное положение, для  $0.5 < \rho \leq 1$  - периферическое положение ядра (Рис.12; Levi et al, 2013). Определение средних радиусов, центров ядер и ооцитов производили с использованием программ ImageJ1.47 (НИН, США; <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>) и LSM ImageBrowser («CarlZeiss», Германия; [http://www.zeiss.com/microscopy/en\\_us/website/downloads/lsm-image-browser.html](http://www.zeiss.com/microscopy/en_us/website/downloads/lsm-image-browser.html)), доступных для свободного использования (Рис. 12). Статистическую обработку результатов производили с помощью Microsoft Office Excel 2007. Средние значения сравнивали по критерию Стьюдента ( $t$ -test); достоверными считали значения, при которых  $P < 0.05$ .

#### **2.13.4. Расчет расстояния и скорости движения ядер, ЯПТ GV ооцитов и ПЯ зигот**

Для расчета расстояния, пройденного ядром/ЯПТ/ПЯ, а также средней скорости движения, для каждого GV ооцита/зиготы с помощью программы ImageJ1.47 определяли координаты центра ядра/ЯПТ/ПЯ ( $X$ ,  $Y$ ) на всех кадрах

прижизненной видеосъемки. Для ооцитов SN-типа с центральным ядром и ооцитов NSN-типа с периферическим или центральным положением ядра рассчитывали суммарный путь, пройденный ядром в течение 60 мин и среднюю скорость движения, учитывая изменение его положения на каждом кадре. Для GV ооцитов SN-типа с начальным положением ядра на периферии, вычисляли величину его перемещения в область центра, сравнивая начальные координаты с координатами центра ядра после его перехода в центральную область ооцита ( $0 < \rho \leq 0.5$ ). Для того чтобы учитывать возможное изменение положения самого GV ооцита/зиготы в процессе съемки, для каждого кадра определяли координаты центра ооцита без блестящей оболочки.

### **3. Результаты**

#### **3.1. Оптимизация условий выявления РНК и белков в фибробластах мышцы NIH/3T3 с помощью флуоресцентных красителей, антител к ядрышковым белкам и зондов к рРНК**

##### **3.1.1. Оптимизация условий выявления РНК в фибробластах мышцы пиронином Y**

Пиронин Y (пиронин G, производный ксантена) - флуоресцентный катионный краситель, традиционно использующийся для выявления внутриклеточной РНК в живых и фиксированных клетках (Zelenin, 1999; Karuscinski and Darzynkiewicz, 1987; Andrews et al., 2013). PY рутинно используется в проточной цитофлуориметрии, т.к. при оптимальных концентрациях (1-10 мкг/мл) стехиометрически связывается с РНК (Shapiro et al., 1981). Для микроскопических исследований ранние доимплантационные эмбрионы традиционно фиксируют альдегидными фиксаторами (Fléchon and Коресну, 1998; Hyttel et al., 2000; Zatsepina et al., 2003; Боголюбова и Боголюбова, 2009; Aguirre-Lavin et al., 2012). Условия выявления РНК с помощью пиронина Y, были оптимизированы на фибробластах мышцы,

зафиксированных параформальдегидом. Клетки фиксировали 3%-ным раствором параформальдегида, обрабатывали детергентом (для облегчения проникновения красителя) и окрашивали пиронином Y от 5 до 60 минут в

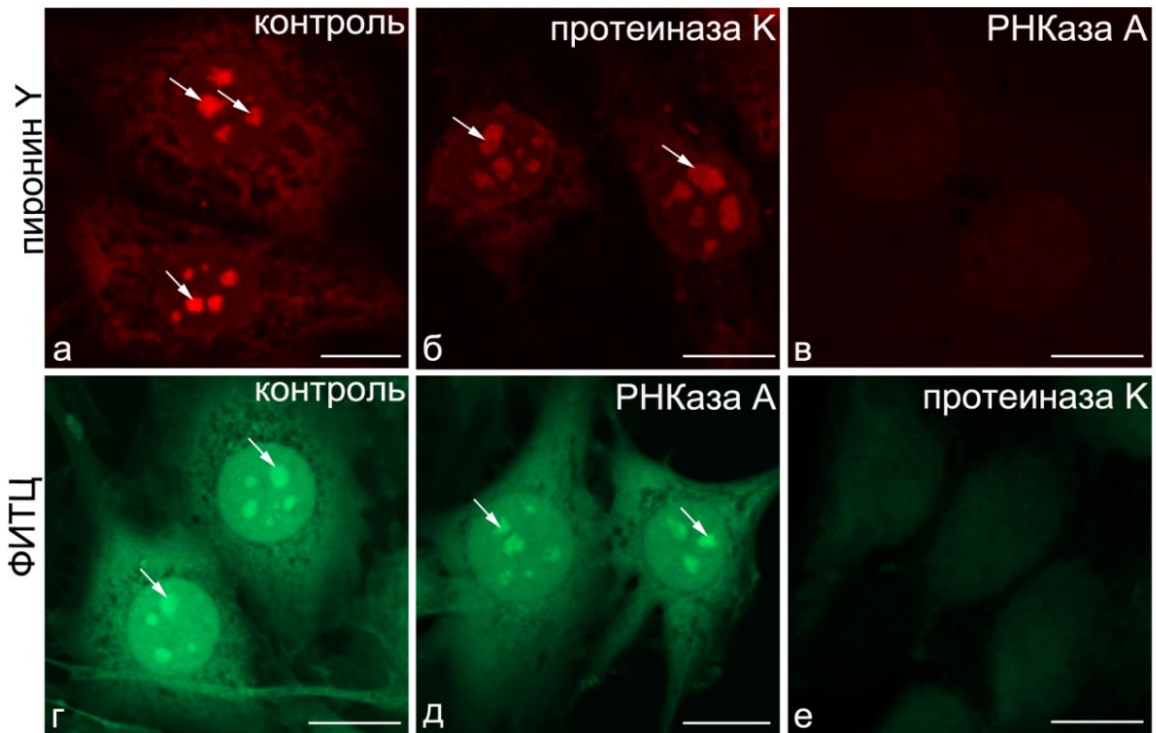


Рис. 13. Окраска фибробластов мыши линии NIH/3T3 пиронином Y (а-в) и ФИТЦ (г-е) в контроле (а, г), после обработки протеиназой К (б, е) и после обработки РНКазой А (в, д). стрелки указывают на ядрышки. Масштабная линия, 10 мкм.

растворах с концентрацией красителя 5 и 10 мкг/мл. Наиболее насыщенная и устойчивая окраска проявлялась при окрашивании фибробластов пиронином Y в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин. В этих условиях в клетках отчетливо выявлялись ядрышки, более слабая окраска проявлялась в цитоплазме и нуклеоплазме (рис. 13а). При обработке клеток раствором РНКазы А в концентрации 1-2 мг/мл в течение 2 ч до инкубации с красителем, преимущественная окраска ядрышек исчезала, а ядра слабо и равномерно окрашивались красителем (рис. 13в). Окрашивание клеток и ядрышек пиронином Y сохранялось после обработки протеиназой К (рис. 13б) и

ДНКазой I (не иллюстрировано). На основании этих наблюдений мы сделали заключение, что фиксация клеток параформальдегидом в контролируемых условиях не препятствует специфическому связыванию пиронина Y с РНК.

### **3.1.2. Оптимизация условий для выявления белка в фибробластах мыши с помощью ФИТЦ**

В отличие от пиронина Y, ФИТЦ до настоящей работы не использовали для микроскопического анализа клеток. Условия выявления внутриклеточных белков с помощью ФИТЦ нам пришлось разрабатывать экспериментально, варьируя, в первую очередь, такими параметрами, как концентрация красителя и время окрашивания клеток. На рис. 13г показана типичная окраска фибробластов мыши NIH/3T3 красителем ФИТЦ в оптимальных условиях: при рабочей концентрации красителя 1 мкг/мл и времени окрашивания – 60 минут. Так же, как и после окрашивания клеток пиронином Y, наиболее яркий сигнал флуоресценции наблюдается в ядрышках, средняя по яркости флуоресценция проявляется в цитоплазме и наиболее бледная – в ядрах (рис. 13г). Окраска ФИТЦ была чувствительна к протеазной обработке (рис. 13е), но практически не ослаблялась после обработки клеток РНКазой А (рис. 13д) или ДНКазой I (не иллюстрировано). В совокупности, эти наблюдения говорят о том, что разработанные условия выявления белкового компонента ядрышек и других компартментов клетки красителем ФИТЦ являются специфическими.

Преимущественная окраска ядрышек пиронином Y и ФИТЦ говорит о том, что ядрышки характеризуются высокой локальной концентрацией РНК и белка, что соответствует результатам биохимического анализа состава ядрышек пролиферирующих клеток млекопитающих (Boisvert et al., 2007; Ahmad et al., 2009).

### **3.1.3. Выявления ядрышковых белков в фибробластах NIH/3T3 с помощью иммуноцитохимического окрашивания антителами без**

**обработки, после инкубации с протеиназой К и фиксации 70 % этиловым спиртом.**

Для иммуноцитохимического окрашивания как эмбрионов, так и соматических клеток млекопитающих рутинно используется кросс-линкерный фиксатор параформальдегид. К «кросс-линкерам» относятся: формалин, параформальдегид, глутаровый альдегид, этилен-гликоль-бис-сукцинимидил сукцинат, акролеин, пикриновая кислота. Фиксация обеспечивается за счет ковалентного связывания молекул после фиксации.

В настоящей работе для обнаружения ядрышковых белков использовали метод демаскирования скрытого антигена, который позволяет открыть эпитопы для связывания с антителом после фиксации «кросс-линкерами», и выявляет антиген, оставляя неизменной общую морфологию объекта (Taylor et al., 1996; Sheriffs et al., 2001). Выявление скрытого антигена осуществляется за счет разрушения сшивок между белками, которые образовались при фиксации (D'Amico et al., 2009). Одним из наиболее результативных способов демаскирования является ферментативная обработка (частичная протеолитическая обработка). Используют такие ферменты как протеиназа К (Svistunova et al., 2012; MacIntyre et al., 2001; Werner et al., 1996), трипсин (Curran, Gregory, 1977; Ordonez et al., 1988) и пепсин (Shi et al., 1993; MacIntyre et al., 2001).

Протеиназа К (протеаза К, эндопептидаза К) – сериновая протеаза широкого спектра, которая расщепляет пептидные связи в белках после карбоксильных групп, N-замещенных гидрофобных алифатических и ароматических аминокислот (Perona, Craik, 1995; Ebeling et al., 1974). Протеиназа К стабильна в широком диапазоне pH (4-12), с оптимумом pH 8.0. Для подбора оптимальных условий частичного протеолиза клеток мы использовали две концентрации протеиназы К – 1 мкг/мл и 2 мкг/мл, время обработки ферментом установили в интервале от 10 до 40 минут при температуре 22°C. Наиболее значимые результаты по выявлению белков в

ядрышках соматических клеток были получены после обработки клеток раствором протеиназы К в концентрации 1 мкг/мл в течение 20 минут или в концентрации 2 мкг/мл в течение 10 минут при температуре 22°C. На рис. 14

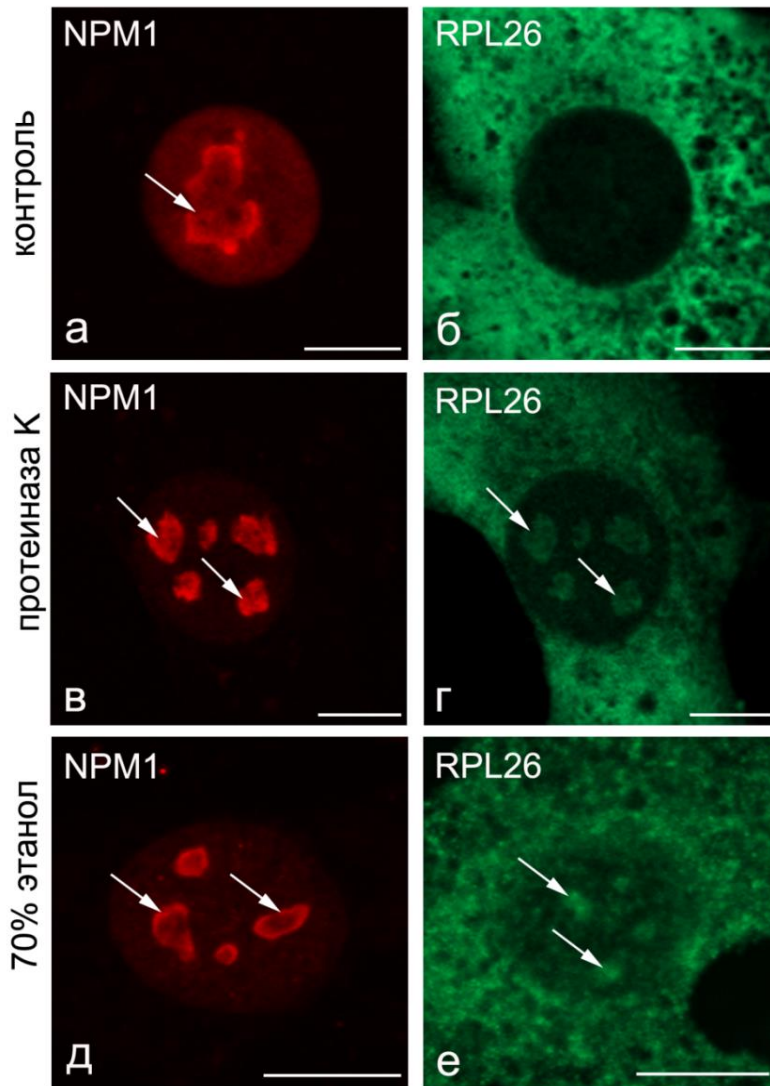


Рис. 14. Иммуноцитохимическое выявление белков NPM1 и RPL26 в ядрышках эмбриональных фибробластов мышцы линии NIH/3T3 после фиксации 3%-ным раствором ПФА (а-г) в контроле (а, б) и после обработки протеиназой К (в, г) или фиксации 70%-ным раствором этилового спирта (д, е). Стрелки указывают на ядрышки. Масштабная линия 10 мкм.

показан пример иммуноцитохимического мечения фибробластов антителами к белку NPM1 (B23/нуклеофозмин, рис.14а, в, д) и рибосомному белку RPL26 (рис. 14б, г, е). После фиксации 3%-ным раствором ПФА NPM1 локализован

Таблица 2. Иммуноцитохимическое выявление белков в ядрышках эмбриональных фибробластов мышцы линии N1H/3T3 после фиксации 3%-ным раствором ПФА в контроле и после обработки протеиназой К и 70%-ным раствором этилового спирта. К – контроль, ПК – протеиназа К. «+» - белок выявляется, «++» - белок выявляется более отчетливо, «+-» - белок выявляется менее отчетливо, «-» - белок не выявляется

Белок	Ядрышки			Нуклеоплазма			Цитоплазма		
	3% ПФА		70% этанол	3% ПФА		70% этанол	3% ПФА		70% этанол
	К	ПК		К	ПК		К	ПК	
UBF	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Фибрилларин	+	++	+	-	-	-	-	-	-
NPM1/B23	+	++	+	+	+-	+	-	-	-
C23/нуклеолин	+	++	+	+	+-	+	-	-	-
RPL26	-	+	+	-	+-	+-	+	+	+
RPS10	-	+	+	-	+-	+-	+	+	+

преимущественно в ядрышках и в меньшей степени в ядре клеток как в контроле, так и после обработки протеиназой К (рис. 14а, в), однако после обработки протеиназой К флуоресценция в нуклеоплазме ослабевает. После фиксации 3%-ным раствором ПФА белок большой рибосомной субъединицы RPL26 выявляется только в цитоплазме клеток (рис. 14б), однако после обработки протеиназой К белок становится отчетливо виден в ядрышках (рис.



14г). Фиксация 70%-ным этиловым спиртом позволяет выявить белок В23/нуклеофозмин в ядрышках и нуклеоплазме клеток (рис. 14д), характер распределения белка похож на контроль (рис. 14а). Белок большой рибосомной субъединицы RPL26 также выявляется в цитоплазме и ядрышках фибробластов (рис. 14е), однако после фиксации спиртом происходит сильное сжатие клеток, что делает результат менее репрезентативным, по сравнению с фиксацией 3% ПФА.

Суммарные результаты иммуноцитохимического выявления белков в ядрышках соматических клеток после фиксации двумя различными фиксаторами и применения метода частичной протеолитической обработки после фиксации 3%-ным раствором ПФА представлены в таблице 2.

#### **3.1.4. Оценка специфичности олигонуклеотидных зондов к рРНК в фибробластах мыши NIH/3T3**

Для выявления специфических последовательностей РНК в данной работе использовался метод FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*) с использованием флуоресцентных зондов к разным участкам 47S пре-рРНК мыши. Зонд к короткоживущему лидерному 5'ETS-концу позволил выявлять первичные 47S транскрипты (рис. 15а) в ядрышке, где он колокализовался с белком фибрилларинном (рис. 15б, в). Частично процессированная рРНК (зонды к ITS1, ITS2) была мечена флуорохромом Cy3 (рис. 15к), 28S рРНК была мечена флуорохромом FAM (рис. 15д, з). На рисунке 15 видно, что сигналы ITS1 (рис. 15к, м; Preti et al., 2013), 28S рРНК (рис. 15д, е, з, и) равномерно распространены по ядрышкам фибробластов, 28S рРНК а также выявляется в цитоплазме клеток (рис. 15д, е, з, и). Контролем к антисмысловым зондам служили смысловые зонды. При использовании всех смысловых зондов FISH-сигналы отсутствовали (не иллюстрировано).

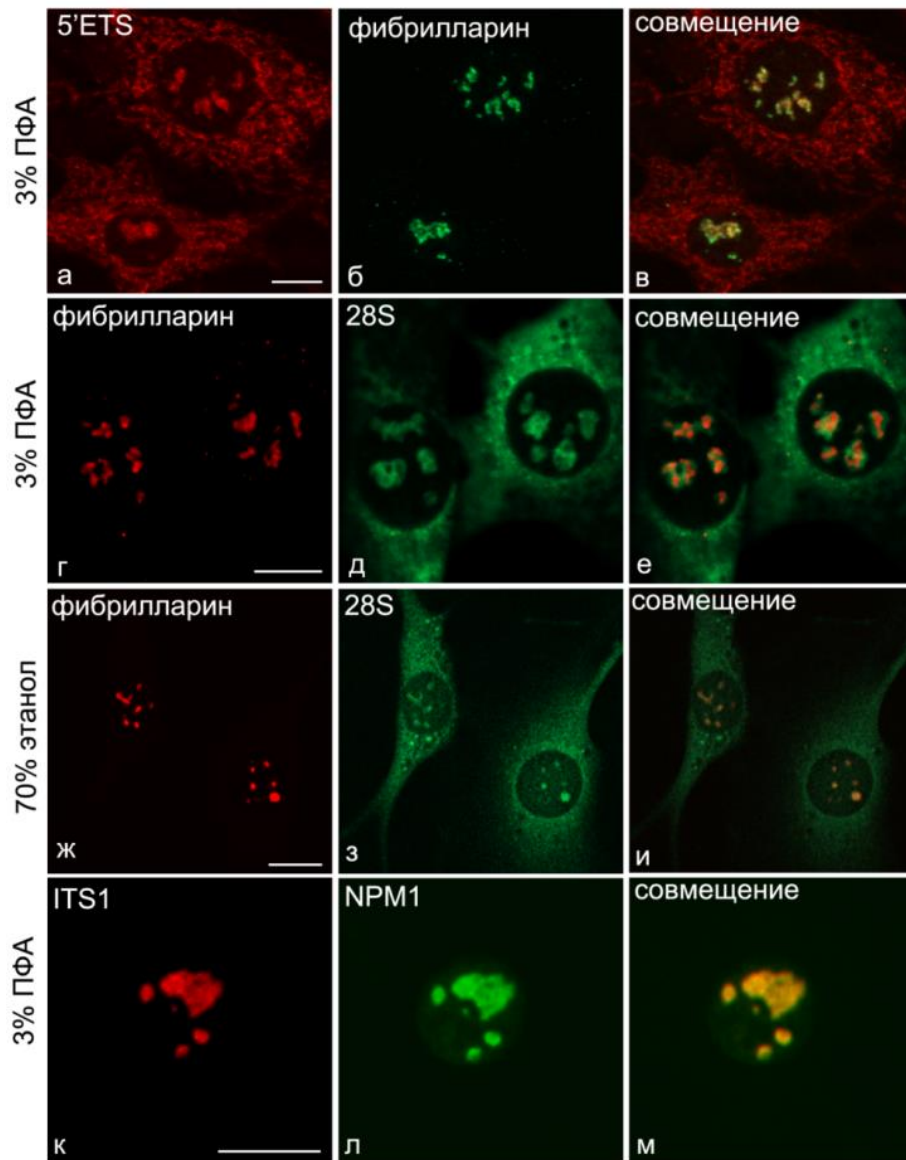


Рис. 15. Локализация 47S пре-рРНК, выявляемая зондом к 5'ETS (а, в), фибрилларина (б, в, г, е, ж, и), ITS1 (к, м), NPM1 (л, м), и 28S рРНК (д, е, з, и) в ядрышках клеток НИИ/3Т3, фиксированных 3% ПФА (а-е) 70% этанолом (ж-м). Совмещение показано на рисунках в, е, и, м. Масштабные линии, 10 мкм.

### 3.2. Цитохимическое выявление РНК и белков в зрелых ооцитах и эмбрионах мыши до имплантации

Принимая во внимание оптимизированные условия для выявления РНК и белков в ядрышках фибробластов мыши (рис. 13), мы использовали пиронин Y и ФИТЦ для окрашивания эмбрионов мыши, находящихся на разных стадиях

доимплантационного развития, а также зрелых ооцитов на стадии метафазы второго деления (ооциты МII). На рисунках 16, 17 и 18 показаны МII ооциты и эмбрионы, окрашенные в смеси двух красителей. Сходные результаты были

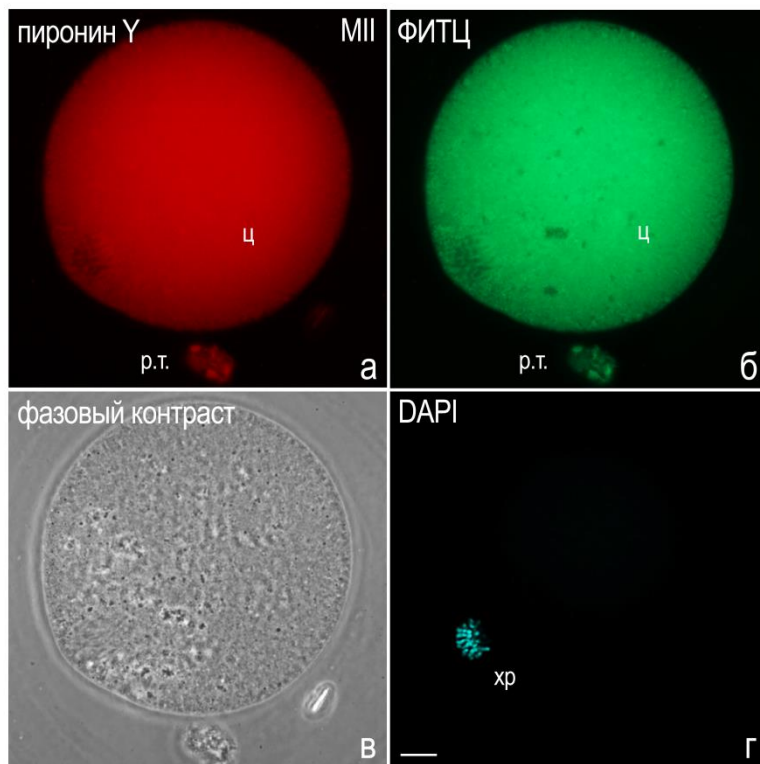


Рис. 16. Окраска ооцитов мыши на стадии метафазы II пиронином Y (а) и ФИТЦ (б). в - фазово-контрастная микроскопия; г – окраска DAPI; хр – хромосомы; ц – цитоплазма; р.т. – редукционное тельце. Масштабная линия, 10 мкм.

получены при использовании каждого из красителей в отдельности. Как видно на рис. 16, цитоплазма МII ооцитов, за исключением области хромосом (рис. 16г), ярко окрашивается как пиронином Y (рис. 16а), так и ФИТЦ (рис. 16б), что указывает на наличие большого количества РНК и белков в неоплодотворенных яйцеклетках. Это наблюдение соответствует литературным данным о переносе белков и РНК, синтезированных яйцеклеткой, в эмбрионы (Hamatani et al., 2004; Ihara et al., 2011). Окраска цитоплазмы обоими красителями, как и ожидалось, сохранялась в бластомерах на всех стадиях

развития эмбриона (рис. 17 и 18). Заметные количества РНК и белка выявлялись также в ядрах бластомеров. Однако окраска как инертных ПЯ на стадии зиготы (рис. 17а, б, г, д), так и активных ПЯ в двухклеточных (рис. 17ж, з), 4-клеточных (рис. 17к, л) эмбрионах ФИТЦ резко различалась от их окраски пиронином У. ПЯ на стадии зиготы ярко окрашивались красителем ФИТЦ, а сигнал РУ-РНК проявлялся в следовых количествах. Начиная со стадии 4-клеточного эмбриона, на периферии ПЯ выявлялся ободок, окрашенный пиронином У, шириной 1-2 мкм, при этом центральная часть ПЯ окрашивается

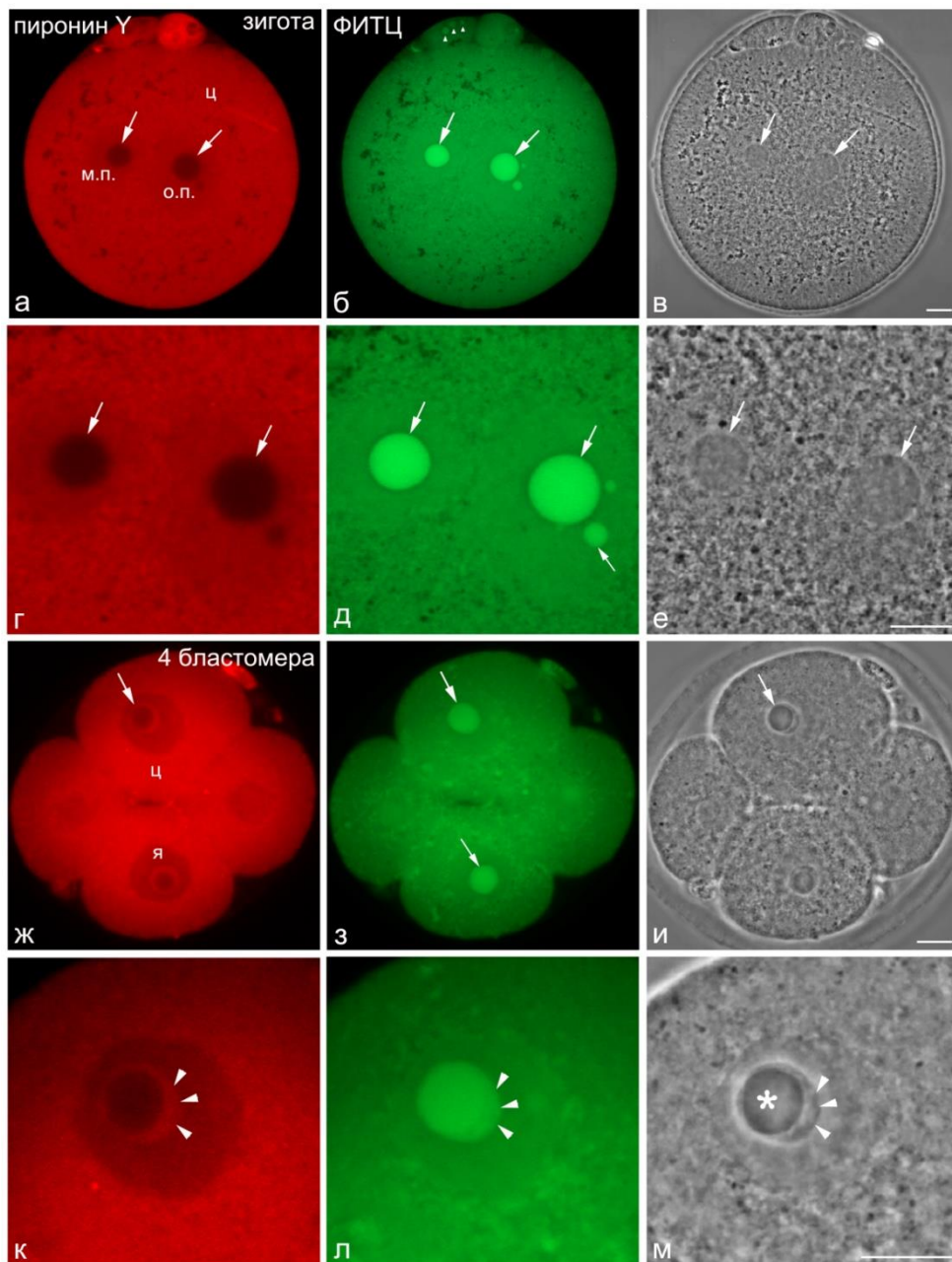


Рис. 17. Окраска эмбрионов мыши на стадии зиготы и четырех бластомеров пиронином Y (а, г, ж, з) и ФИТЦ (б, д, з, л). в, е, и, м - фазово-контрастная микроскопия; ц – цитоплазма; р.т. – редуционное тельце; м. п. – материнский пронуклеус; о. п. – отцовский пронуклеус. Стрелки указывают на ПЯ (а-и); головки стрелок указывают на ядрышки в редуционном тельце (б) и периферию ПЯ (к-м). Масштабная линия, 10 мкм.

с меньшей интенсивностью (рис. 17ж, к). Периферический участок ПЯ, ярко окрашенный пиронином Y и, следовательно, содержащий РНК, на светооптическом уровне выглядит более светлым и соответствует нуклеолонеме (Geuskens, Alexandre, 1984; рис. 17к, м). ФИТЦ окрашивает центральную часть ПЯ, а также внешнюю (периферическую) РНК-содержащую часть (рис. 17з, л). Эти данные соответствуют литературным, согласно которым, на поверхности ПЯ локализованы белки ядрышка, участвующие в

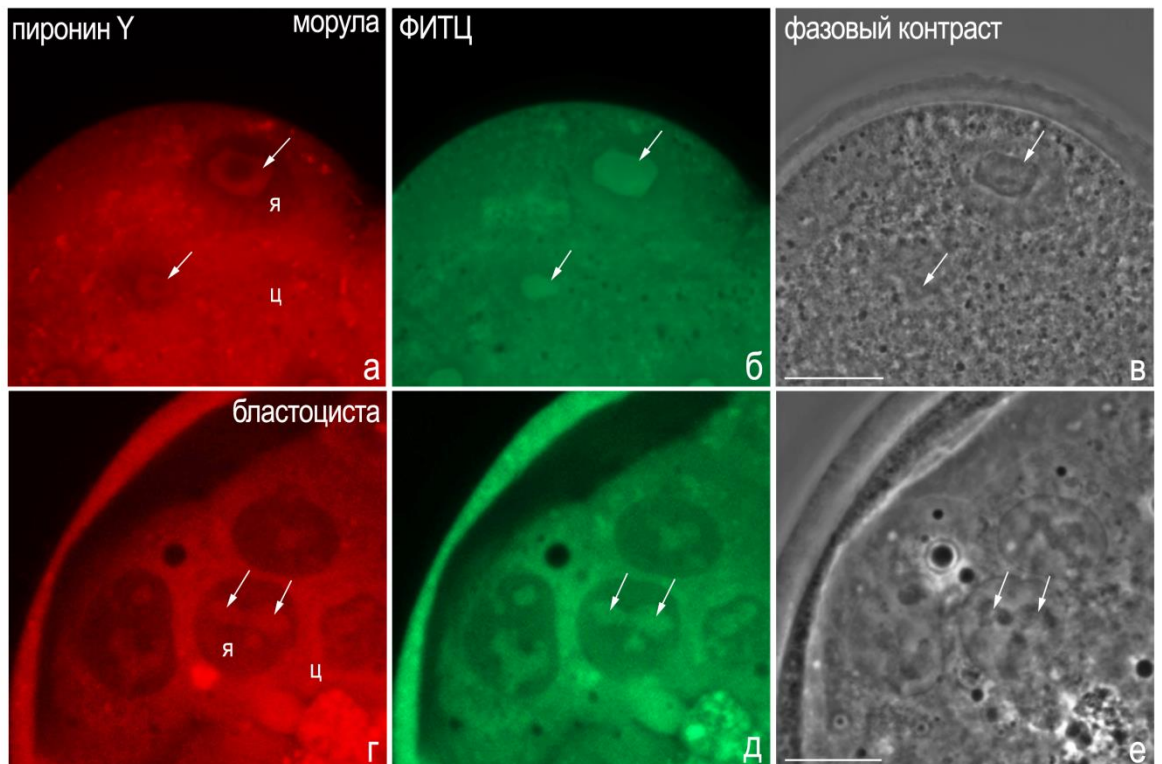


Рис. 18. Окраска эмбрионов мыши на стадии морулы (а-в) и бластоцисты (г-е) пиронином Y (а, г) и ФИТЦ (б, д). в, е - фазово-контрастная микроскопия;



ц – цитоплазма; я – ядро. Стрелки указывают на ядрышки. Масштабная линия, 10 мкм.

биогенезе рибосом: РНК-полимераза I, UBF, фибрилларин, B23/нуклеофозмин, Surf6 (Baran et al., 1995, 2004; Romanova et al, 2006b, Zatsepina et al, 2003). Вероятно, пиронин Y выявляет новосинтезированную 47S пре-рРНК и частично процессированные транскрипты, аналогом для сравнения можно считать клетки NIH/3T3, в ядрышках которых выявляются данные типы РНК (Shishova et al. 2011). На стадии морулы ядрышки равномерно окрашиваются красителем ФИТЦ (рис.18б), а в случае PУ остается небольшая центральная область, не содержащая красителя (рис. 18а). На стадии бластоцисты ядрышки равномерно окрашиваются PУ (рис. 18г) и ФИТЦ (рис. 18д), характер окрашивания напоминает фибробласты мыши линии NIH/3T3 (рис. 13г). Однако окраска ядрышек бластоцисты пиронином Y сопоставима по яркости с окраской цитоплазмы, что отличает их от фибробластов (рис. 13а). Мы полагаем, что это различие связано с быстрым экспортом синтезируемых рибосом из ядрышек в цитоплазму на стадии морулы, что может быть необходимо для ускоренного синтеза белков при репрограммировании эмбрионального генома (Hamatani et al., 2004). Суммируя результаты окрашивание доимплантационных эмбрионов флуоресцентными красителями можно сделать вывод о том, что основным компонентом как инертных, так и активированных ПЯ эмбрионов млекопитающих являются белки, но не РНК. По этому признаку ПЯ резко отличаются от ядрышек соматических клеток.

### **3.3. Иммуноцитохимическое выявление белков ядрышка в эмбрионах мыши**

Окрашивание эмбрионов мыши ФИТЦ показало, что ПЯ содержат белки. Тем не менее, в их составе не было найдено ни одного белка соматических ядрышек при использовании стандартных иммуноцитохимических подходов (Zatsepina et al., 2000; Vjerregaarde et al. 2004; Romanova et al., 2006a; Maddox-

Hyttel et al. 2007). В данной работе мы использовали два подхода для выявления белков внутри ПЯ: (1) демаскирование ядрышковых белков путем обработки одноклеточных эмбрионов мыши протеиназой К, который помог выявить некоторые белки внутри соматических ядрышек (рис. 14г), фиксация 70% этиловым спиртом (рис.14е). В первом случае эмбрионы фиксировали параформальдегидом и обрабатывали Тритоном Х-100 по стандартному протоколу (Zatserina et al., 2000). После этого инкубировали с протеиназой К в концентрации 1 мкг/мл или 2 мкг/мл в течение 15-40 мин и окрашивали антителами к ключевым белкам соматических ядрышек, характер расположения которых указывает на способность ядрышек синтезировать рибосомы. Наиболее убедительные результаты были получены при инкубации эмбрионов с протеиназой К в концентрации 1 мкг/мл или 2 мкг/мл в течение 15 или 30 мин, соответственно (22°C, рис. 19). После более короткой инкубации и низкой концентрации фермента характер выявления белков соответствует случаю без обработки ферментом, тогда как более длительная инкубация (до 40 минут) часто приводила к полному исчезновению ПЯ. После фиксации 1-клеточных эмбрионов 70% спиртом, качественный результат не изменился: после окрашивания антителами, внутри ПЯ выявлялись те же белки, что и после обработки протеиназой К (рис.19а, в, г, е, ж). В составе ПЯ одноклеточных эмбрионов мыши удалось выявить следующие белки: фибрилларин (рис.19а, в), NPM1/нуклеофозмин (рис. 19г, е), нуклеолин (рис. 19ж).

Описанными выше методиками пре-фиксационной обработки и фиксацией 70 % этанолом, не удалось показать присутствие рибосомных белков и белка UBF (рис. 19к, л; не иллюстрировано). Фиксация 70% этанолом отрицательно влияет на общую морфологию зигот и характер выявления хроматина. На рис. 20 видно, что характер окрашивания пронуклеусов зиготы DAPI не соответствует норме: в результате фиксации 70%-ным раствором этанола DAPI окрашивает предшественники ядрышек (рис. 20в, з, и), которые

не окрашиваются после фиксации 3%-ным раствором ПФА и обработки протеиназой (рис. 19б, д, з, и, м). После фиксации эмбрионов 50% (рис. 20г-е) спиртом сохраняется неспецифичное окрашивание пронуклеусов DAPI.

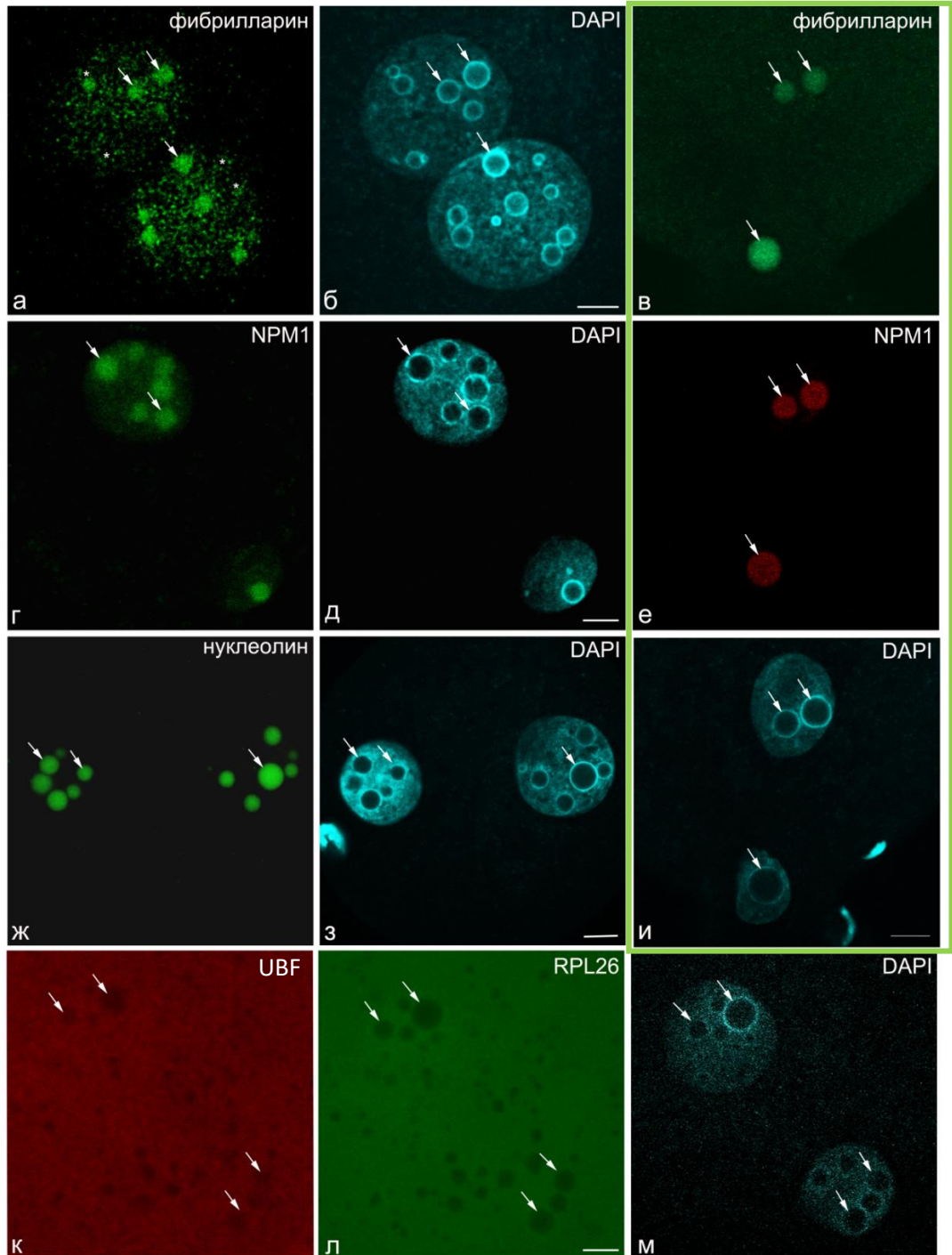


Рис. 19. Иммуноцитохимическое выявление белков фибрилларина (а, в), NPM1 (г, е), нуклеолина (ж), UBF (к) UBF (к) и RPL26 (л) в зиготах мыши после фиксации 3%-ным раствором ПФА и обработки протеиназой К. б, д, з, и, м).



м - выявление хроматина с использованием красителя DAPI. а, б, г, д, ж, з, к, л, м – ранняя зигота; в, е, и – поздняя зигота. Масштабная линия 10 мкм.

Список использованных антител и результаты экспериментов по выявлению белков в составе ПЯ зиготы после обработки протеиназой К и фиксации 70% этиловым спиртом суммированы в таблице 3.

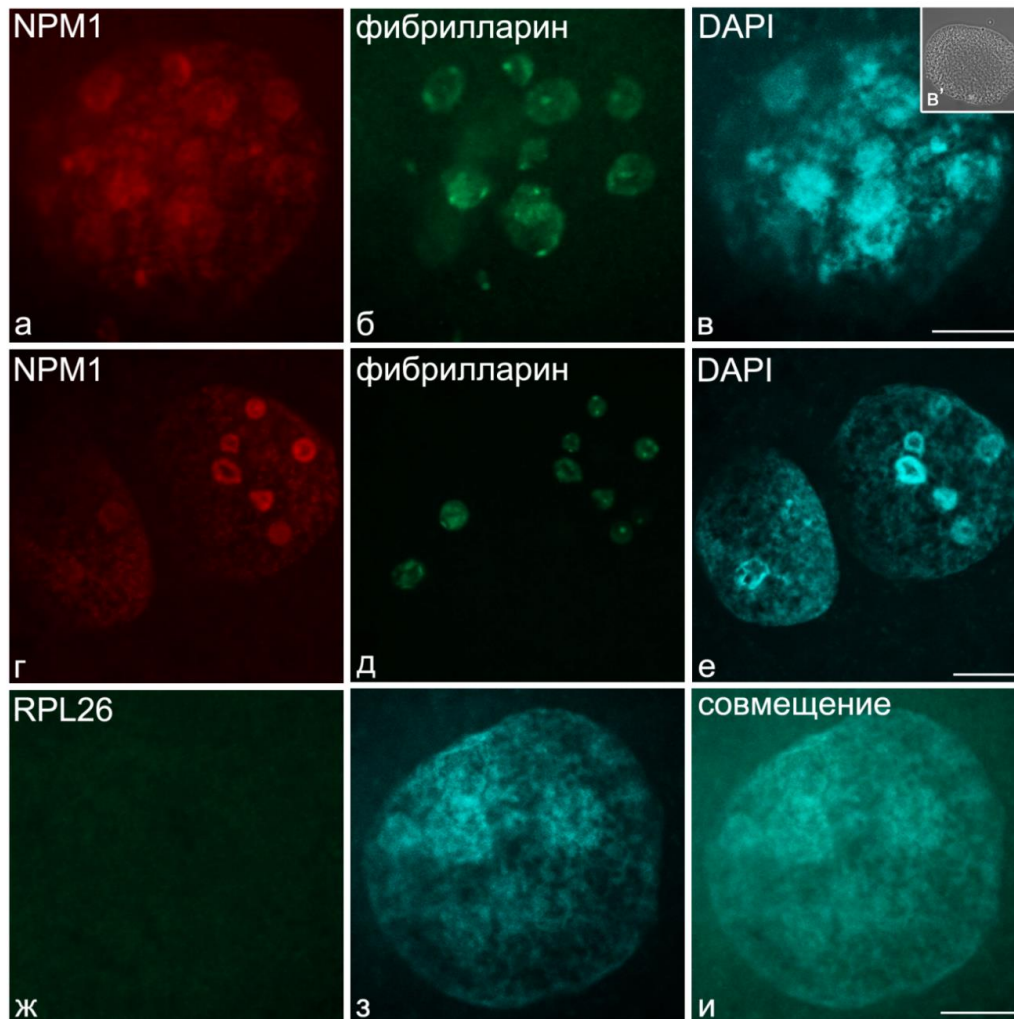


Рис. 20. Иммуноцитохимическое выявление белков NPM1 (а, г), фибрилларина (б, д), и RPL26 (ж, и) в зиготах мыши после фиксации 70%-ным этиловым спиртом (а-в; ж-к) и 50%-ным этиловым спиртом (г-е). в, е, з, и – окрашивание хроматина с красителем DAPI. в' – фазовый контраст. Масштабная линия 10 мкм.

Таблица 3. Иммуноцитохимическое выявление белков в предшественниках ядрышек зигот мыши после фиксации 3%-ным раствором ПФА в контроле и

после обработки протеиназой К и 70%-ным раствором этилового спирта. «+» - белок выявляется, «-» - белок не выявляется.

Белок	Источник антител	Разведение	3% ПФА		70% этанол
			контроль	протеиназа К	
UBF	Zatsepina et al., 1993	1:200	-	-	-
фибрилларин	Abcam, ab5821/1 mg/ml	1:200	-	+	+
NPM1/B23	Sigma-Aldrich, B0556/0.5 mg/ml	1:200	-	+	+
нуклеолин/ C23	Abcam, ab70493/0.2 mg/ml	1:100	-	+	+
RPL26	Abcam, ab59567/1.1 mg/ml	1:200	-	-	-
RPS10	Abcam, ab151550 /1.027mg/ml	1:200	-	-	-

### 3.4. Выявление рРНК в эмбрионах мыши методом FISH

Для того чтобы показать, входит ли в состав ПЯ на различных стадиях развития рРНК, мы использовали зонды, меченные флуорохромом Су3 или FAM, которые специфически гибридизуются с участком внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 или ITS2, маркер непроцессированной рРНК) и 28S рРНК первичного транскрипта мыши 47S пре-рРНК (маркер процессированной и непроцессированной рРНК) соответственно. Для выявления новосинтезированной пре-рРНК мы использовали зонд к короткоживущему лидерному фрагменту 47S пре-рРНК (5'ETS), время полу-жизни которого в клетках мыши составляет 1-2 минуты (Lazdins et al., 1997; Mullineux et al.,

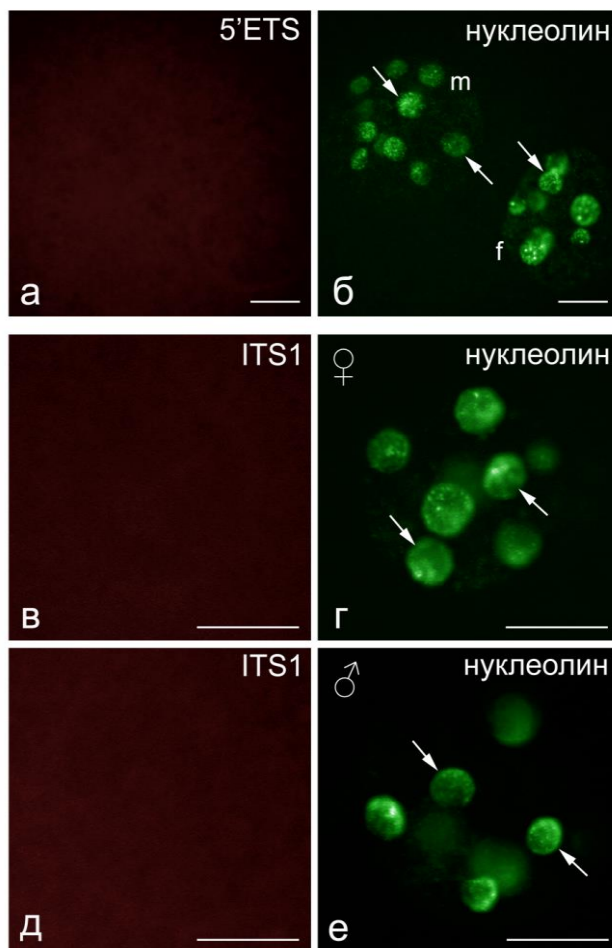


Рис. 21. Флуоресцентная гибридизация *in situ* ранних одноклеточных эмбрионов мыши, зафиксированных 70 % этанолом с олигонуклеотидными зондами, меченными Су3 к участкам 47S пре-рРНК мыши: 5'ETS (а) и ITS1 (в, д). б, г, е – иммуноцитохимическое выявление белка нуклеолина.

ITS1 – первый внутренний транскрибируемый спейсер; Стрелки указывают на ПЯ; m – отцовский пронуклеус, f – материнский пронуклеус.

Масштабные линии, 10 мкм

2012). В качестве контроля использовали смысловые зонды (Таблица 2). Как и ожидалось, при гибридизации с ними FISH-сигналы не выявлялись (не иллюстрировано). Эмбрионы мыши фиксировали одним из двух способов: стандартным, т.е. 3%-ным ПФА, или 70%-ным этанолом. В случае

одноклеточных эмбрионов было показано, что фиксация 3% ПФА (без протеиназы и в сочетании с протеиназой К) не позволяет выявить внутри ПЯ ни один из перечисленных типов рРНК, сигналы рРНК видны только в цитоплазме (не иллюстрировано).

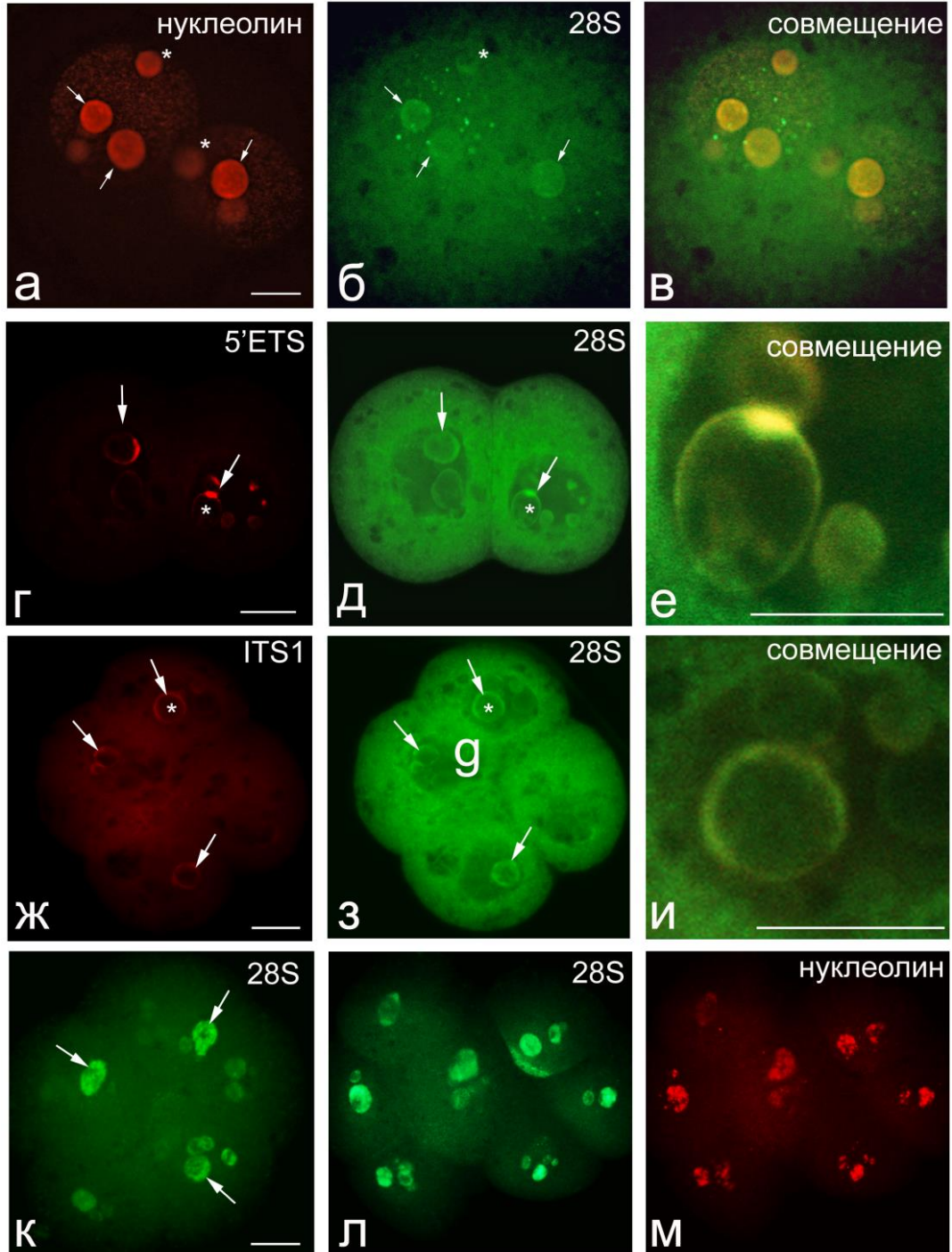


Рис. 22. Флуоресцентная гибридизация *in situ* ранних одноклеточных (а-в), поздних двухклеточных (г-е), четырехклеточных (ж-и) 6-ти клеточных (к) и 8-ми клеточных эмбрионов мыши (л, м), зафиксированных 70 % этанолом (а-в,

к-м) и 3%-ным ПФА (г-и), с олигонуклеотидными зондами, меченными Су3 или FAM, к разным участкам 47S пре-рРНК мыши: 28 S (б, в, д, е, з, и, к, л), 5'ETS (г) и ITS1 (ж, и). а, м – иммуноцитохимическое выявление белка нуклеолина. 5'ETS - 5'-внешний транскрибируемый спейсер; ITS1 – первый внутренний транскрибируемый спейсер; ITS2 – второй внутренний спейсер; Стрелки указывают на ПЯ. Масштабные линии, 10 мкм.

В эмбрионах мыши на стадии зиготы 5'ETS и ITS1 не были выявлены в составе ПЯ даже после фиксации 70% спиртом (рис. 21, в, д). Иммуноцитохимическое окрашивание зигот антителами к нуклеолину позволило идентифицировать положение ПЯ внутри пронуклеусов. Только в случае 28S рРНК внутри ПЯ одноклеточных эмбрионов после фиксации спиртом выявляются слабые FISH-сигналы (рис.22б, в). Видно, что не во всех ПЯ, отчетливо показанных антителами к нуклеолину, присутствует 28 рРНК: в меньших по размеру ПЯ, FISH-сигналы очень слабые или отсутствуют вовсе (рис. 22а-в). В случае поздних двух-клеточных и четырех-клеточных эмбрионов, в которых идет активный синтез рДНК (Engel et al., 1977; Zatsepina et al., 2003), FISH-сигналы были локализованы преимущественно на периферии ПЯ и обладали большей интенсивностью, чем в ПЯ зигот (22г-и). В многоклеточных (более четырех бластомеров) эмбрионах 28рРНК выявляется не только на периферии, ну и внутри предшественников ядрышек (рис. 22к, л), а характер распределения рРНК напоминает таковой в случае окрашивания пиронином Y на стадии морулы и бластоцисты (рис.18). Также видно, что ядрышковый белок нуклеолин присутствует как на периферии, так и в центральной части ПЯ многоклеточных эмбрионов мыши (рис. 22м). Такие же результаты были получены после окрашивания многоклеточных эмбрионов, фиксированных 70% этиловым спиртом, антителами к другим ядрышковым белкам (фибрилларин, NPM1, UBF; не иллюстрировано).



Таким образом, использование двух фиксаторов (3% ПФА и 70% этилового спирта) указало на присутствие внутри ПЯ только следовых количеств 28 S рРНК (рис. 22б). Основное накопление рРНК начинается на периферии ПЯ со стадии двух бластомеров (рис. 22г-е), а к стадии многоклеточного эмбриона рРНК постепенно занимает весь объем ПЯ (рис. 22к, л)

### 3.5. Анализ числа ПЯ на разных стадиях зиготы

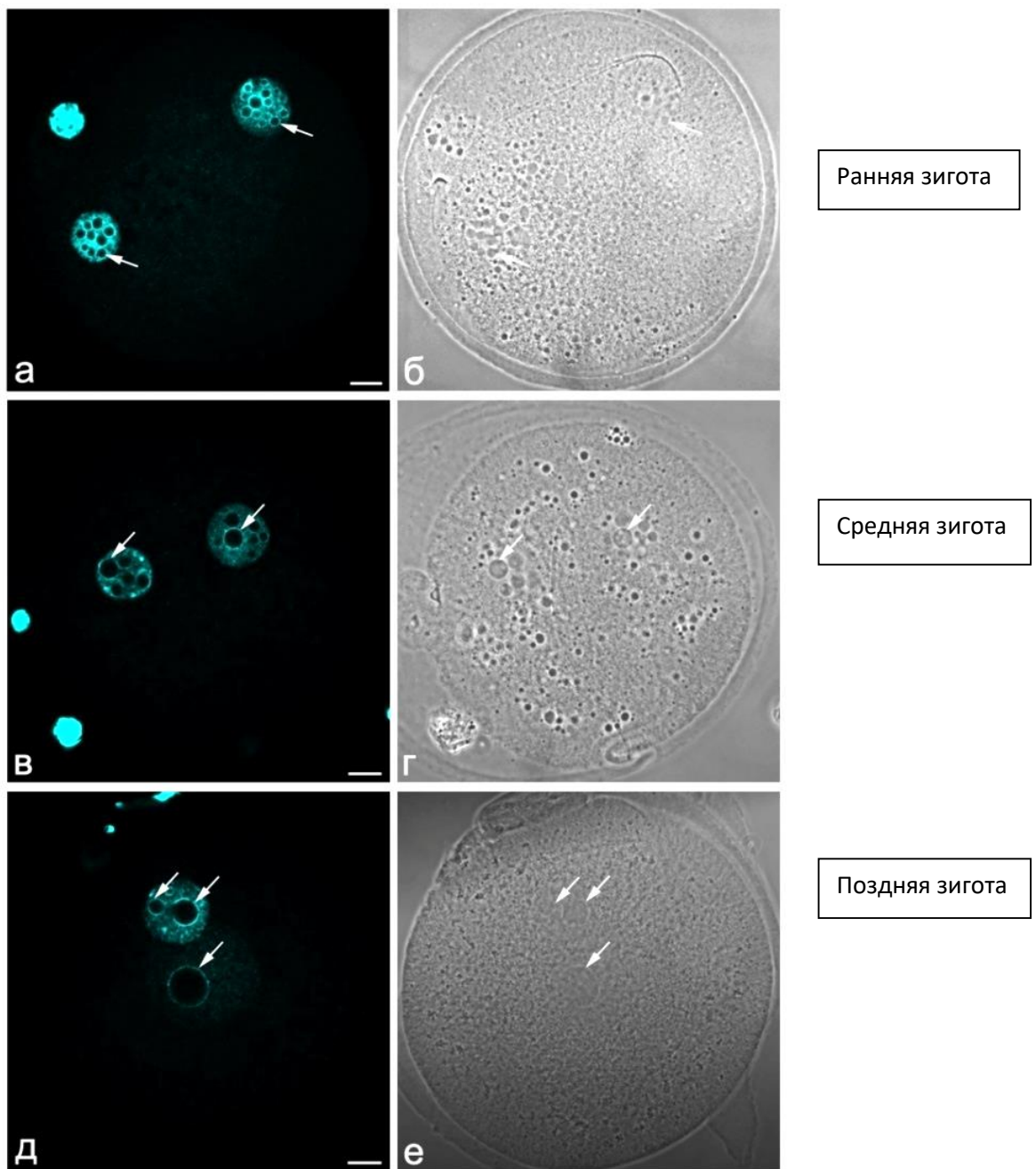


Рис. 23. Анализ числа ПЯ на разных стадиях развития зиготы. а, б – ранняя зигота; в, г – средняя зигота; д, е – поздняя зигота. Масштабная линия, 10 мкм

Выделяют основные стадии развития зигот мыши:

- 1) раннюю зиготу (18-19 часов после инъекции ХГЧ), для которой характерно значительное расстояние между мужским и женским пронуклеусами и наличие большого количества мелких ПЯ, трудно различимых на светооптическом уровне (рис. 23а, б)
- 2) среднюю зиготу (21-22 часа после инъекции ХГЧ), для которой характерно сближение пронуклеусов, уменьшение количества ПЯ при визуальном увеличении их размера (рис. 23в, г)
- 3) позднюю зиготу (24-25 часа после инъекции ХГЧ), для которой характерно максимальное сближение пронуклеусов, уменьшение количества ПЯ до 1-3 штук в каждом пронуклеусе, увеличение размеров ПЯ (рис. 23д, е)

Было посчитано число ПЯ в женском и мужском пронуклеусе в 16 ранних, 20 средних и 15 поздних зиготах мыши. Полученные результаты суммированы на рис. 24. Видно, что число ПЯ в обоих пронуклеусах уменьшается с течением времени (рис.24). При этом, число ПЯ в женском пронуклеусе превышает число ПЯ в мужском пронуклеусе, как на стадии средней, так и на стадиях поздней и средней зиготы (рис. 24; t-test,  $p < 0,05$ ). Число ПЯ на разных стадиях зиготы оценивалось после фиксации 3% ПФА, окрашивания DAPI и иммуномечения антителами к ядрышковым белкам (нуклеолин, NPM1) и заключения в среду DAPI/Antifade.

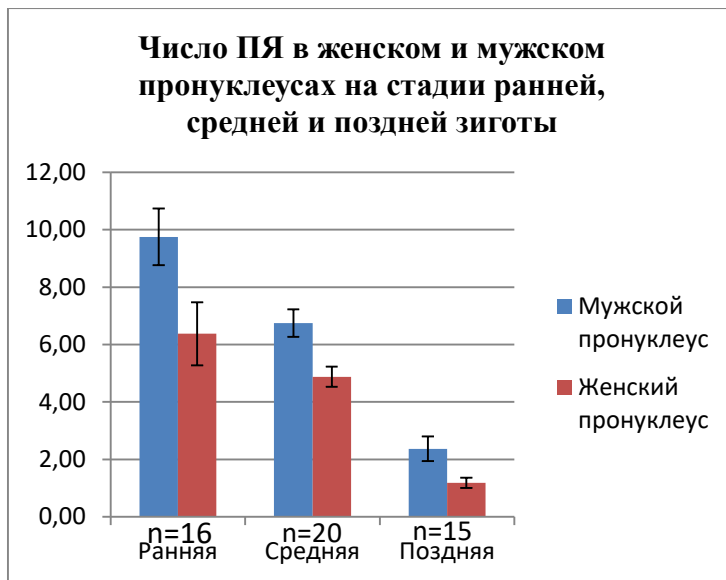


Рис. 24. Изменение числа ПЯ на стадии ранней, средней и поздней зиготы. На гистограмме показаны средние значения, ошибка определения среднего значения.

n – число изученных эмбрионов.

### 3.6. Прижизненные наблюдения

#### 3.6.1. Цейтраферная видеосъемка зигот мыши

Так как в процессе развития зиготы происходит сокращения числа ПЯ, одной из основных задач экспериментов по прижизненному наблюдению была демонстрация динамики движения и морфологических изменения, которые претерпевают ПЯ. Для наблюдения удобнее всего выбирать мужские пронуклеусы, которые в зиготах мыши всегда крупнее женских пронуклеусов, что облегчает видеоанализ. Для того чтобы определить характер движения ПЯ, мы выделяли зиготы через 19-20 часов после инъекции ХГЧ и подсадки самки к самцу. На более ранней стадии (17-19 часов после ХГЧ) ПЯ было невозможно различить на светооптическом уровне из-за маленького размера, а женский и мужской пронуклеусы имели уплощенную форму и находились на периферии анимального и вегетативного полюсов соответственно. Для выявления характера движения ПЯ в зиготах, видеосъемка проводилась в течение 10-12 часов с частотой 1 кадр в 10 минут. Для того чтобы максимально точно определить положение пронуклеусов в каждую временную точку, одновременно проводилась съемка по оси Z с интервалом 3-5 мкм.



На рисунке 25 показан характер движения ПЯ в течение 30 минут съемки. В начале съемки два ПЯ (1 и 2, рис. 25а) находятся в непосредственной близости друг от друга, через 10 минут прижизненных наблюдений “пересекаются” (рис. 25б). На 20-й минуте съемки видны первые признаки объединения (рис. 25в), а через 30 минут после ее начала вместо двух ПЯ (1 и 2) образуется одно (1+2; рис. 25г). В отличие от зигот человека, в зиготах мыши не происходит никакой группировки ПЯ (рис. 10; рис. 25). Видно, что ПЯ (3-6) перемещаются друг относительно друга во время видеосъемки, ПЯ (3) и ПЯ (4)

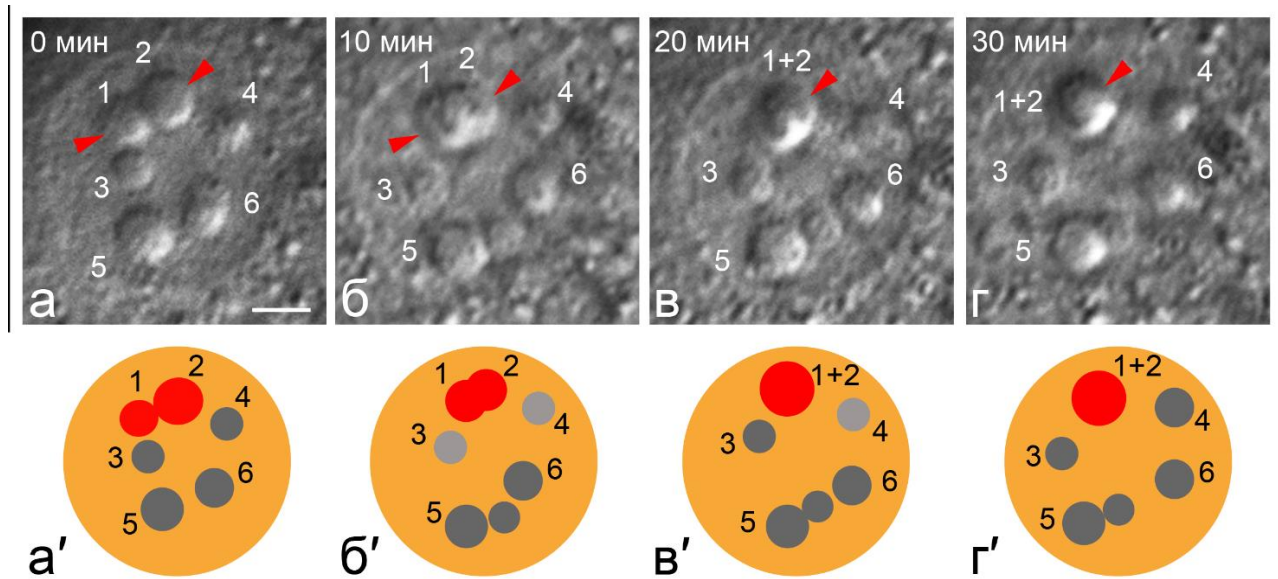


Рис. 25. Покадровая визуализация ПЯ в женском пронуклеусе зиготы мыши в течение 30 мин. (а – б) – дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому (DIC). а' - г' - схематичное изображение движения ПЯ. Цифрами 1-6 отмечены ПЯ. Красные головки стрелок (а - г) и красные кружки (а' - г') – объединяющиеся ПЯ. Масштабная линия, 5 мкм.

ненадолго выходят из фокуса (рис. 25б, в, б', в'). Еще один пример динамики движения ПЯ в одноклеточном эмбрионе мыши показан на рисунке 26. Видно, что через 20 минут после начала съемки два ПЯ, обозначенные красными головками стрелок, приближаются максимально близко друг к другу (рис. 26б), а затем объединяются, образуя ПЯ большего размера (рис. 26в, г). Диаметр начальных ПЯ составлял 3.52 и 3.24 мкм, тогда как после слияния диаметр ПЯ составлял 5.72 мкм (рис. 26а-г). Таким образом, объединение материала ПЯ

происходит чрезвычайно быстро, занимая около 10-20 минут. Такой активный процесс сложно зарегистрировать с высокой точностью, в связи с чувствительностью эмбрионов к частой и длительной видеосъемке, а также окрашиванию флуоресцентными красителями (Tsunoda et al., 1988; Versieren et al., 2014).

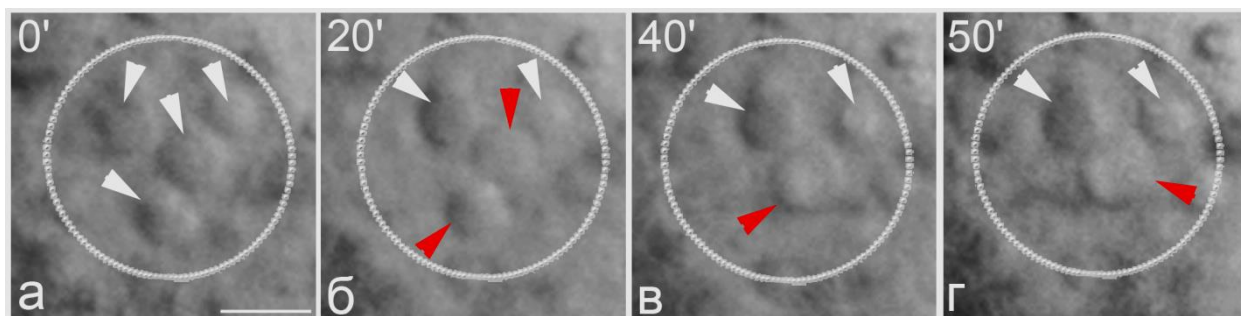


Рис. 26. Покадровая визуализация динамики движения ПЯ в мужском пронуклеусе одноклеточных эмбрионов мыши в течение 50 мин. (а – г) – дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому (DIC); Красные головки стрелок - сливающиеся ПЯ. Масштабная линия 10 мкм

### 3.6.2. Характер динамики движения ЯПТ GV ооцитов мыши. Движение многочисленных ЯПТ в составе ооцита

Присутствие в ядре GV ооцита мыши нескольких ЯПТ было показано ранее (Дыбан, 1988; Pesty et al., 2007), однако динамика их движения и способность к созреванию оставалась до сих пор неизученной. Многочисленные ЯПТ легко идентифицируются методами световой микроскопии. Их присутствие может служить дополнительным критерием компетентности (или не компетентности) GV ооцита к созреванию. Динамика перемещений нескольких ЯПТ в GV ооците NSN-типа рассмотрена на рис. 27.

Видно, что на начальной минуте съемки в ядре ооцита присутствуют 3 ЯПТ, которые находятся в движении в течение первых 220 минут (рис. 27а-в). После длительной видеосъемки, на 680-й минуте (рис. 27д) происходит максимальное сближение двух ЯПТ и их слияние на 700-710 минуте (рис. 27ж,

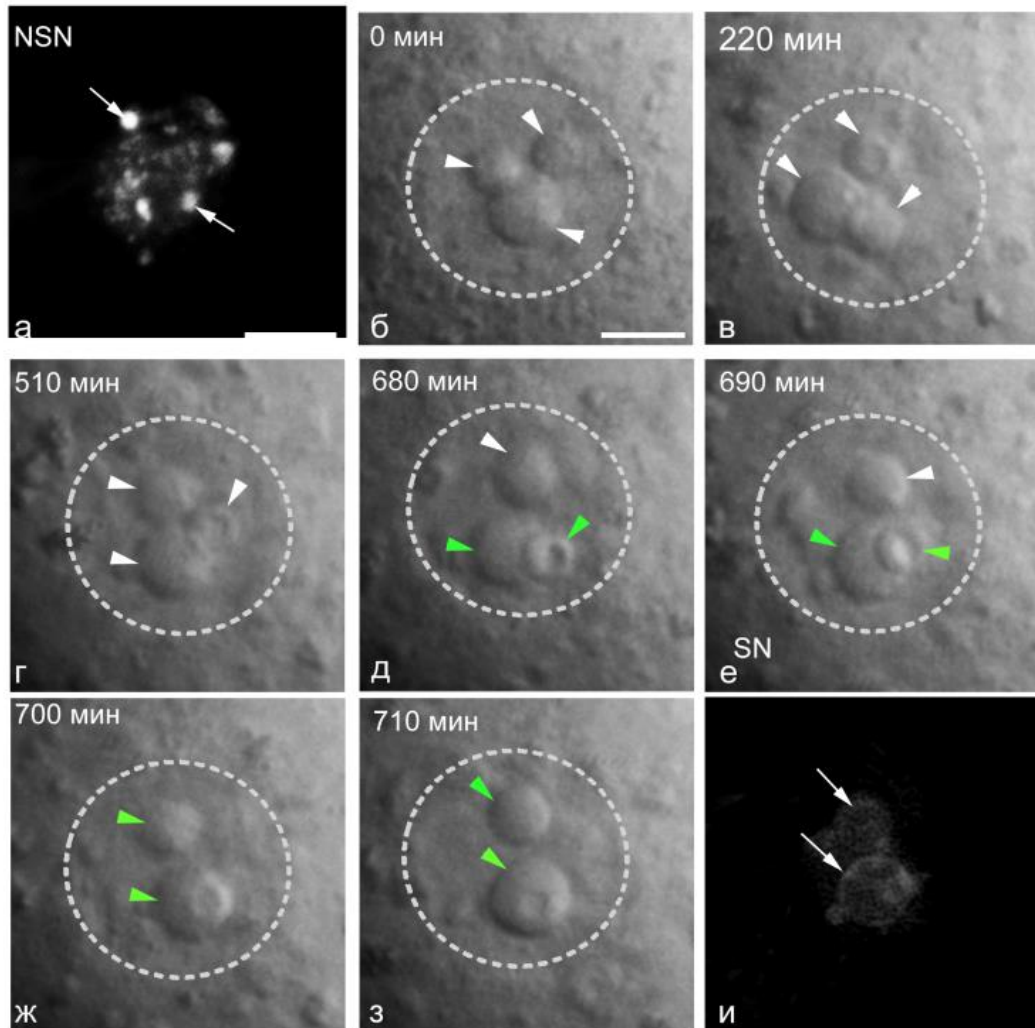


Рис. 27. Покадровая визуализация GV ооцита NSN типа с тремя ЯПТ в течение 15 часов. (а', и') – окрашивание ДНК-связывающим красителем Hoechst 33342; (а'', б – н) – дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому (DIC). Контуром отмечено положение ядра ооцита. Головки стрелок указывают на ЯПТ. Масштабные линии, 10 мкм.

з). Вероятно, длительный процесс слияния и отсутствие перехода на стадию GVBD и говорит о незрелости NSN-ооцитов с несколькими ЯПТ. То же самое относится и к изменению конфигурации хроматина GV ооцитов: происходит созревание, которое выражается в переходе конфигурации NSN в SN (рис. 27а, и). Это соответствует данным литературы об увеличении доли SN-ооцитов с возрастом мышей (Zuccotti et al., 1995). Таким образом, в впервые *in vitro* был показан процесс перехода конфигурации хроматина менее зрелого NSN-ооцита

в более зрелый SN-тип и процесс слияния ЯПТ в многоядрышковых GV ооцитах.

### 3.6.3. Характер движения ядер в GV ооцитах NSN- и SN-типа

Результаты данной части работы описывают закономерности перемещения другой высокоподвижной органеллы – ядра в GV ооцитах с разной конфигурацией хроматина (NSN- и SN-) и начальным положением (периферическое и центральное положение ядра). Условия съемки предполагают использование многокомпонентной среды, приготовленной на основе среды  $\alpha$ -MEM с добавлением 5% (по объёму) инактивированной фетальной бычьей сыворотки, 4 мМ L-глутамина, 5 мМ таурина и 146 мкг/мл пирувата натрия, культивирования при физиологической температуре (37° C), увлажнённой атмосфере и при концентрации CO<sub>2</sub> 5%. Использование зелёного фильтра позволяет минимизировать действие такого фактора как проходящий свет от галогеновой лампы.

GV ооциты NSN-типа.

Было изучено 35 GV ооцитов NSN-типа с периферическим расположением ядра и 30 ооцитов с центральным положением ядра. Один из ооцитов NSN-типа с ядром на периферии показан на рис. 28а-б. По выбранному критерию оценки положения ядра (Levi et al., 2013;  $\rho=0.5$ ), на нулевой минуте съёмки ядро занимает периферическое положение ( $\rho=0.91$ ; рис. 28б, белая пунктирная линия). На последующих фотографиях (Рис. 28в-и) показан тот же ооцит при съёмке каждые 10 мин вплоть до исчезновения видимой границы ядра (Рис. 28и). На каждом кадре белыми пунктирными линиями обозначены контуры ядра в момент наблюдения, а черными пунктирами – положение, которое занимало ядро на предыдущем кадре. Видно, что в течение первых 30 мин съёмки (Рис. 28б – г) ядро совершает небольшие перемещения в районе периферии ооцита. Начиная с 100-ой мин, ядро ооцита, находясь на периферии, не изменяет своего положения (Рис. 28д-ж).

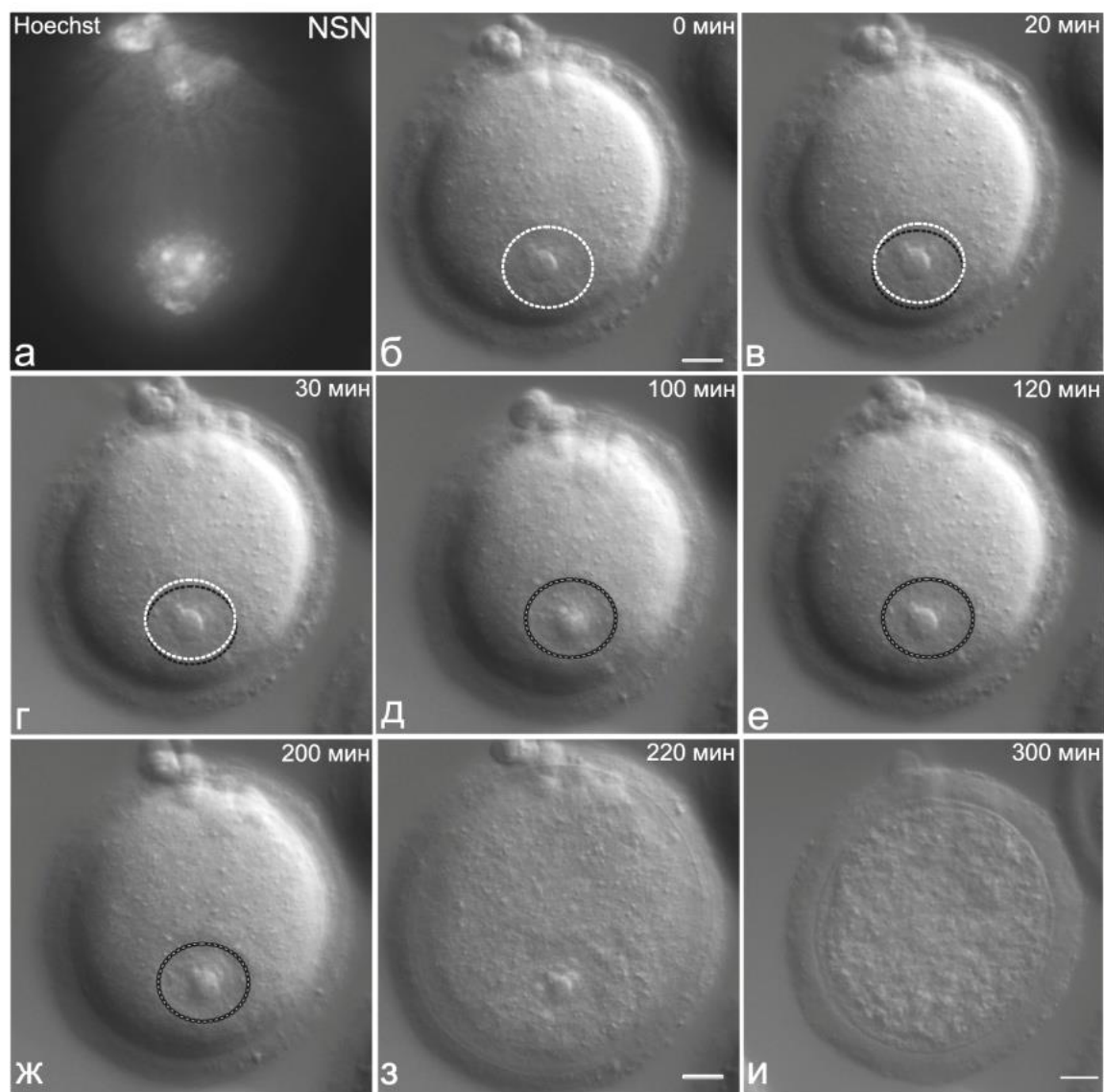


Рис. 28. Покадровая визуализация GV ооцита NSN-типа с периферическим ядром в течение 300 мин. (б – и) – дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому (DIC); (а) – Hoechst 33342 (GV-NSN). Белым контуром отмечено текущее положение ядра ооцита относительно предыдущего кадра (черный контур). Масштабная линия 10 мкм

На 220-ой мин наблюдения ооцит значительно увеличивается в размерах, без перехода на стадию GVBD, а ядро теряет чёткие очертания (Рис. 28з). К 300-минуте размер GV-ооцита уменьшается и снова принимает свои первоначальные размеры, при этом, границы ядра и ЯПТ становятся практически неразличимыми. Прекращение движения ядра и ЯПТ, нарушение нормальной структуры ядра, значительное увеличение размера ооцита в



процессе видеосъемки (рис. 28з, и) и остановка в развитии всех исследованных ооцитов NSN-типа с ядром на периферии, являются признаками гибели.

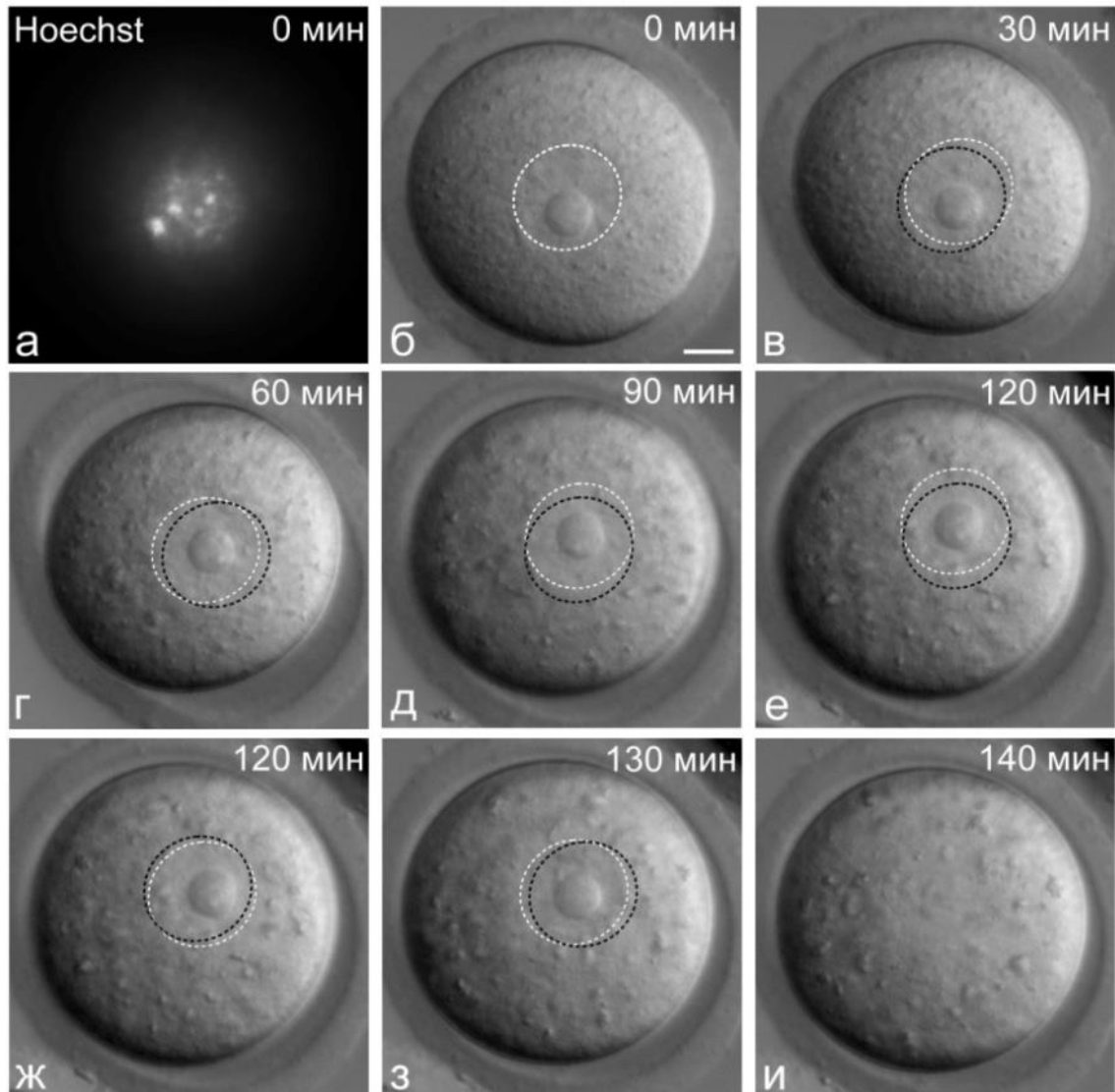


Рис. 29. Покадровая визуализация GV ооцита в течение 140 мин. (б – и) – дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому (DIC); (а) – Hoechst 33342 (GV-NSN). Белым контуром отмечен текущее положение ядра; черный контур – положение ядра на предыдущем кадре. Масштабная линия 10 мкм

На рис. 29 представлен GV ооцит NSN-типа с начальным положением ядра в центре ооцита ( $\rho=0.29$ ). Ядро совершает небольшие перемещения в области центра (центроида) ооцита вплоть до стадии GVBD (Рис. 29б – и).

Наиболее заметное смещение ядра относительно предыдущего положения наблюдалось через 90 мин ( $\rho=0.33$ ) после начала съёмки (Рис. 29е). Ядро GV ооцита сохраняет центральное расположение на протяжении всей видеосъёмки, до вступления в стадию GVBD (рис. 29и), т.к. значения коэффициента  $\rho$  варьируются от 0.29 (0 мин; рис. 29б), до 0.38 (130 мин; рис. 29з).

GV ооциты SN-типа.

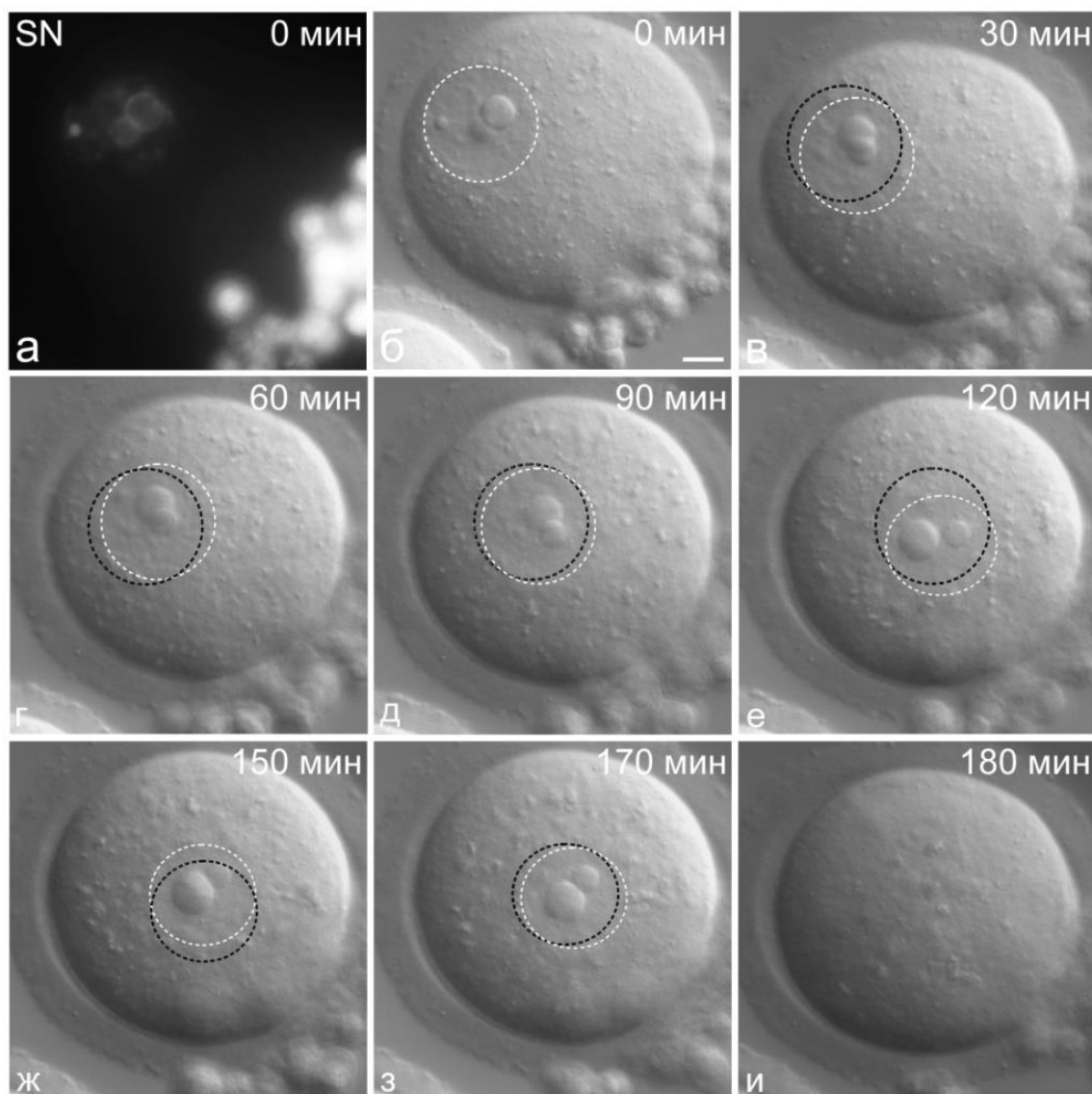


Рис. 30. Покадровая визуализация GV ооцита в течение 180 мин. (b – h) – дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому (DIC); (a) – Hoechst 33342 (GV-SN). Белым контуром отмечено текущее положение ядра;

черный контур – положение ядра на предыдущем кадре. Масштабная линия 10 мкм

Было изучено 30 ооцитов SN-типа с периферическим расположением ядра и 30 ооцитов - с центральным. На рис. 30 представлен GV ооцит SN-типа с начальным расположением ядра на периферии. Первые 90 мин съемки ядро ооцита движется с периферии по направлению к центру, достигая наиболее центрального положения на 120 минуте ( $\rho=0.17$ ; рис. 30б-е). Через 180 минут после начала съемки происходит распад зародышевого пузырька (рис. 30и). По выбранному критерию оценки, ядро на нулевой минуте съёмки расположено на

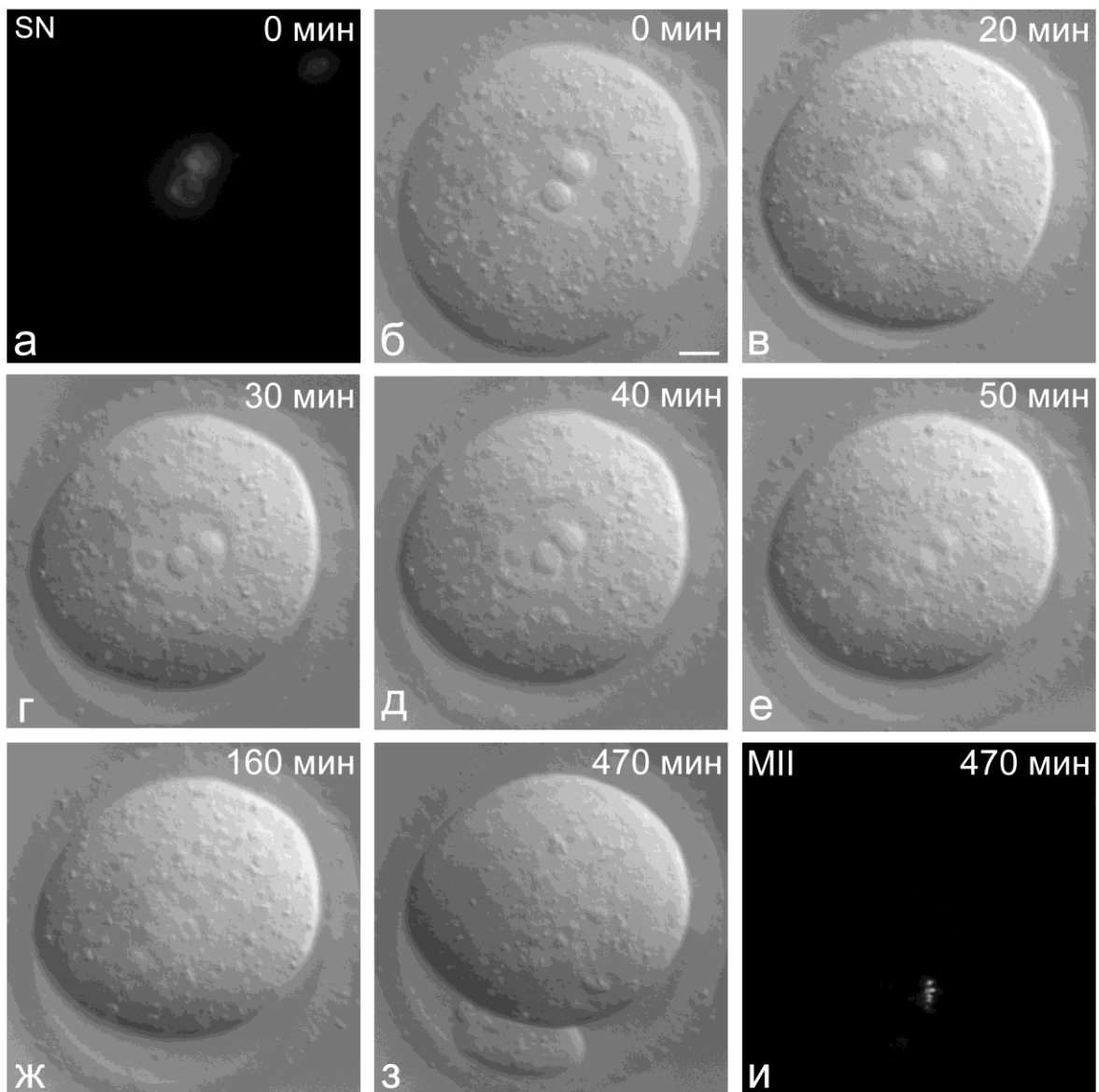




Рис. 31. Покадровая визуализация GV ооцита в течение 470 мин. (б – и) – дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому (DIC); (а) – Hoechst 33342 (GV-SN). Белым контуром отмечено текущее положение ядра; черный контур – положение ядра на предыдущем кадре. Масштабная линия 10 мкм.

периферии ( $\rho=0.86$ ; 0 мин; рис. 30б). Затем, к 120-ой мин видеосъемки, ядро GV ооцита перемещается в центральную область ( $\rho=0.17$ ; рис.30е) и сохраняет центральное расположение до стадии GVBD ( $\rho=0.23$ ; рис. 30з). Таким образом, положение ядра GV ооцита SN-типа, показанном на рис. 30, является периферическим в начале съемки и центральным перед распадом ядра.

На рис. 31 представлен GV ооцит SN-типа с начальным положением ядра в центре ооцита ( $\rho=0.28$ ). Так же, как и в ооците NSN-типа, показанном на рис. 31 (б – и), ядро ооцита совершает небольшие перемещения в области центра (центроида) вплоть до стадии GVBD (Рис. 31б-е). По выбранному критерию оценки, ядро GV ооцита расположено в центральной области на протяжении всей видеосъемки, до распада ядра (рис. 31е), т.к. значения коэффициента  $\rho$  варьируются от 0.28 (0 мин; рис. 31б), до 0.18 (80 мин; рис. 31д). Через 470 мин после начала съемки, происходит экструзия полярного тельца (рис. 31з) и ооцит переходит на стадию метафазы II. В ядре ооцита, представленного на рис. 31 присутствует два ЯПТ, которые не объединяются до вступления в стадию GVBD (рис. 31а-е). Таким образом, показано, что GV ооциты с несколькими ЯПТ могут завершать созревание, переходя на стадию метафазы II.

## 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Ядрышковые компоненты ПЯ эмбрионов мыши

Вместо типичных фибриллярно-гранулярных ядрышек для одноклеточных эмбрионов млекопитающих характерно присутствие

транскрипционно инертных органелл, получивших название предшественников ядрышек (ПЯ, NPBs, nucleolus-precursor bodies). Исторически ПЯ рассматривали как пассивные хранилища ядрышковых белков, необходимых для формирования функциональных ядрышек к стадии поздней морулы - ранней бластоцисты (Geuskens, Alexandre, 1984; Kyogoku et al., 2014a). Однако, попытки выявить белки зрелых ядрышек в составе инертных ПЯ методами световой иммуноцитохимии долгое время не давали результатов: ни один из ядрышковых белков, включая факторы транскрипции рДНК (РНК полимеразы I, UBF), процессинга пре-рРНК и сборки рибосом (фибрилларин, NPM1/B23/нуклеофозмин, C23/нуклеолин, SURF6, рибосомные белки) внутри ПЯ не были выявлены (Biggiogera et al., 1994; Baran et al., 1995; Ferreira, Carmo-Fonseca, 1995; Zatsepina et al., 2000, 2003; Romanova et al., 2006a; Svarcova et al., 2009). В предшественниках ядрышек не были показаны также какие-либо ядерные или цитоплазматические белки, включая белки, играющие ключевую роль в раннем развитии эмбрионов млекопитающих, такие как актин, плюрипотентный фактор LIN28, факторы метилирования и деметелирования ДНК (Vogt et al., 2012; Bogolyubova et al., 2013). Единственным белком, который был выявлен в составе ПЯ одноклеточных эмбрионов, является нуклеоплазмин 2 (Inoue, Aoki, 2010).

До последнего времени, существовала лишь одна работа (Biggiogera et al., 1990), в которой методом электронной иммуноцитохимии авторы обнаружили следовые количества ядрышковых белков и РНК в ПЯ зародышей мыши, однако, в дальнейшем эти наблюдения не нашли экспериментального подтверждения этим же методом (Biggiogera et al., 1994; Flecon, Коресну, 1998). Было показано, что в ПЯ зигот мышей отсутствуют новосинтезированные нуклеиновые кислоты, поэтому было высказано предположение, что ПЯ ранних эмбрионов содержат РНК, синтезированные во время поздних стадий оогенеза, однако, тип и функции этих РНК остаются неизвестными (Biggiogera et al., 1994; Коресну et al., 1995). В настоящей работе, для анализа состава ПЯ

преимплантационных эмбрионов мыши использовали следующие методики: окрашивание флуоресцентными красителями для выявления РНК и белков, метод демаскирования антигена с помощью ферментативной обработки, метод флуоресцентной гибридизации *in situ* для определения локализации рРНК. Исследование проводили с использованием как ранних форм ПЯ (стадия зиготы и двухклеточного эмбриона), так и с использованием переходных форм ПЯ (до стадии восьми бластомеров), а также зрелых форм (стадия поздней морулы, бластоцисты).

Принимая во внимание условия выявления РНК и белков в ядрышках фибробластов мыши, мы использовали пиронин Y и ФИТЦ для окрашивания эмбрионов мыши, находящихся на разных стадиях преимплантационного развития, а также в зрелых ооцитах на стадии метафазы второго деления мейоза (ооциты МII). На рисунках 16, 17 и 18 показаны МII ооцит и эмбрионы, окрашенные в смеси двух красителей. Как видно на рис. 16, цитоплазма МII ооцитов, за исключением области хромосом, ярко окрашивается как пиронином Y, так и ФИТЦ, что указывает на наличие большого количества РНК и белков в неоплодотворенных яйцеклетках. Это наблюдение соответствует литературным данным о переносе белков и РНК, синтезированных яйцеклеткой, в зародыши (Hamatani et al., 2004; Ihara et al., 2011): заметные количества РНК и белков выявляли также в пронуклеусах зиготы и ядрах бластомеров (рис. 17а, б, г, д, ж, з). Локализация белкового компонента в инертных ПЯ на стадии зиготы (рис. 17б, д) и в активированных ПЯ четырехклеточных эмбрионов (рис. 17з, л) отличается от содержания РНК. Белковый компонент выявляется на всех стадиях развития эмбрионов (рис. 17б, д, з, л), а РНК присутствует только в следовых количествах или практически отсутствует на стадии зиготы (рис. 17а, г). На стадии четырехклеточного эмбриона РНК начала выявляться на периферии ПЯ (ободок, шириной 1-2 мкм, окрашенный пиронином Y (рис 17ж, к). ФИТЦ полностью окрашивает ПЯ: как центральную, так и внешнюю РНК-содержащую часть (Рис. 17б, д, з, л). Эти данные соответствуют литературным,

согласно которым, на этой стадии развития эмбриона на поверхности ПЯ локализованы белки ядрышка, участвующие в биогенезе рибосом: РНК-полимераза I, UBF, фибрилларин, B23/нуклеофозмин, Surf6 (Baran et al., 1995, 2004; Romanova et al, 2006b, Zatsepina et al, 2003). Вероятно, пиронин Y выявляет новосинтезированную 47S пре-рРНК и частично процессированные транскрипты, аналогом для сравнения можно считать клетки NIH/3T3, в ядрышках которых выявляются данные типы РНК (Shishova et al. 2011).

В эмбрионе на стадии бластоцисты ядрышки бластомеров равномерно окрашиваются РY (Рис. 18г) и ФИТЦ (Рис. 18д). Характер окрашивания ядрышек напоминает окрашивание фибробластов мыши линии NIH/3T3 (12а, г), однако окраска ядрышек пиронином Y была сопоставима по яркости с окраской цитоплазмы (т.е. не была преимущественной), что отличало их от окрашивания ядрышек в фибробластах (рис. 18г). Это различие связано с быстрым экспортом синтезируемых рибосом из ядрышек в цитоплазму в моруле, что может быть необходимо для быстрого синтеза белков при репрограммировании эмбрионального генома (Wossidlo et al., 2011; Hamatani et al., 2004). Суммируя наши наблюдения, можно заключить, что основным компонентом как инертных, так и активированных ПЯ эмбрионов мыши являются белки, но не РНК, аккумулирующаяся на периферии ПЯ только начиная со стадии четырех бластомеров. По этому признаку ЯПТ резко отличаются от ядрышек соматических клеток и ЯПТ GV ооцитов (Fulka et al., 2014; Boisvert et al., 2011).

Идентификация белков в составе ПЯ потребовала усовершенствования методик, поскольку, как указано во «Введении», традиционными методами белки в ПЯ не выявляются, а применение современных методов протеомного анализа ядрышек соматических клеток (Ahmad et al., 2009) для изучения состава ПЯ ограничено сложностью их выделения в препаративных количествах. Долгое время ЯПТ GV ооцитов и ПЯ одноклеточных эмбрионов считались аналогичными структурами по своему происхождению, составу и

функциям. В настоящей работе приведено отличие белкового состава предшественников ядрышек одноклеточных эмбрионов мыши от состава ядрышко-подобных телец GV ооцитов. В предшественниках ядрышка зигот не выявляется белок UBF (рис. 19к; рис. 32), но присутствует белок фибрилларин, который располагается гомогенно по всему объему в ПЯ обоих пронуклеусов (рис. 19а, рис. 19б), что говорит об их инертности в отношении процессинга рРНК. Также гомогенно располагаются белки позднего процессинга и сборки рибосом – NPM1 и нуклеолин (рис. 19г, ж; 20а). В предшественниках ядрышек, в отличие от ядрышко-подобных телец GV ооцитов (Shishova et al., 2015; 2016), не были обнаружены рибосомные белки (RPL26 и RPS10; рис. 19к; рис. 32).

По-видимому, фибрилларин, NPM1 и нуклеолин транспортируются из ооцита в зиготу, в то время как UBF, RPL26, RPS10 синтезируются в зиготе *de novo*. В ПЯ зигот мыши удалось обнаружить только следовые количества 28S рРНК, в отличие от ЯПТ предовуляторных ооцитов (рис. 32; Shishova et al., 2015).

Механизмы переноса белков процессинга пре-рРНК в зиготы остаются неизвестными, также неизвестно, возможно ли развитие зародыша без этих ключевых белков ядрышка (кроме литературных данных для фибрилларина; Newton et al., 2003). Унаследованные от ооцита ядрышковые белки, по-видимому, выполняют различные функции в раннем эмбриональном развитии: они могут использоваться для продукции рибосом до момента полной активации эмбрионального генома, которая происходит позднее, на стадии морулы-бластоцисты (Hamatani et al., 2004; Wang et al., 2004; Zeng et al., 2004; Hamatani et al., 2008). Остается непонятной причина отсутствия в ПЯ ключевого белка транскрипции рДНК – UBF и рибосомных белков, в отличие от фибрилларина, NPM1 и нуклеолина, которые сохраняются после оплодотворения в составе ядрышковых производных (ПЯ зигот). При этом, по характеру локализации фибрилларина, который располагается гомогенно по всему объему ПЯ обоих пронуклеусов, как и в SN-типе ооцитов (Shishova et al.,

2015), можно предположить, что ПЯ инертны в отношении процессинга рРНК. Присутствие белков процессинга в составе ПЯ связано с тем, что фибрилларин, NPM1/B23/нуклеофозмин и C23/нуклеолин – многофункциональные белки, и помимо своих основных функций участвуют во множестве клеточных процессов, в том числе в регуляции

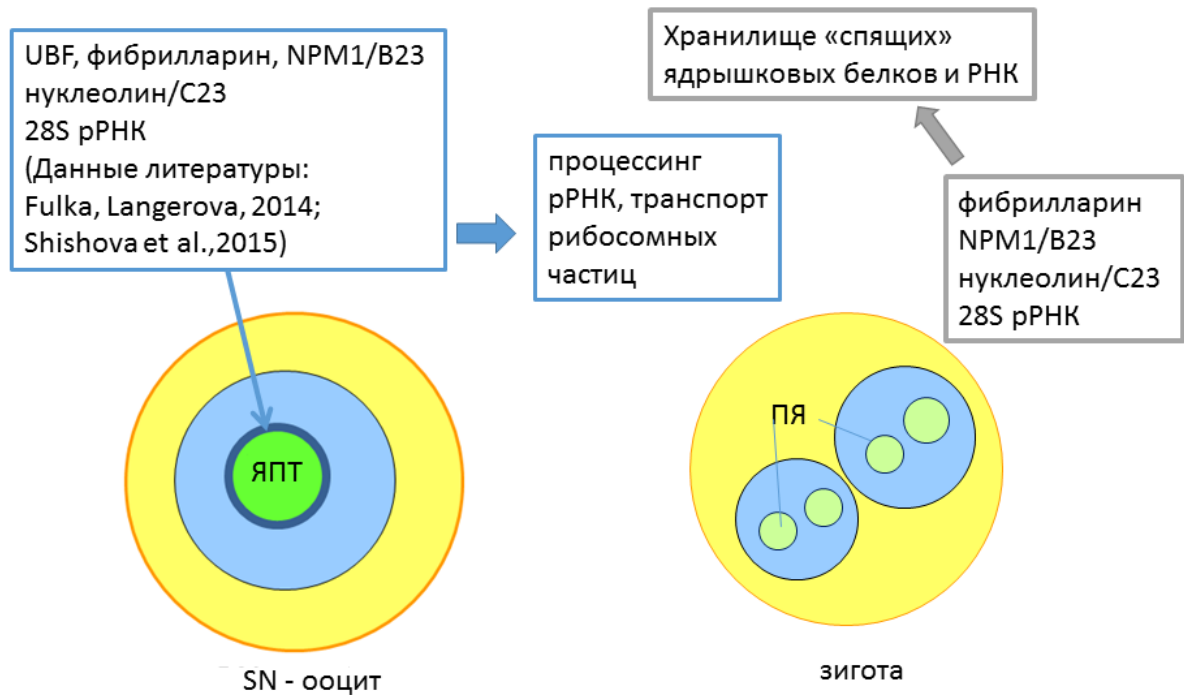


Рис. 32. Сравнительная характеристика состава ЯПТ в GV ооцитах мыши SN-типа и ПЯ эмбрионов на стадии зиготы согласно полученным данным и данным литературы (Fulka, Langerova, 2014; Shishova et al., 2015).

метаболизма ДНК и РНК, поддержании структуры хроматина и пролиферации клеток (Newton et al., 2003; Lindstrom, 2011). Следовательно, в зиготах они могут активно выполнять свои второстепенные функции. В пользу этого также свидетельствуют данные о том, что удаление фибрилларина приводит к гибели эмбрионов на стадиях развития эмбриона до имплантации (Newton et al., 2003). Таким образом, сходство ЯПТ и ПЯ было переоценено: ядрышковые производные различаются по составу белков и РНК. ПЯ одноклеточных эмбрионов, в отличие от ЯПТ GV ооцитов, обладают

ограниченными способностями к синтезу рибосом, не участвуют в процессинге рРНК и сборке рибосомных частиц. Показано, что роль ЯПТ и ПЯ в раннем преимплантационном развитии различна: удаление ПЯ не влияет на дальнейшее развитие эмбриона, тогда как после удаления ЯПТ из GV ооцита, развитие оплодотворенного зародыша останавливается на стадии двух клеток (Kyogoku et al., 2014a). Следовательно, ЯПТ ооцитов содержат молекулярные составляющие, необходимые для раннего эмбрионального развития, которые пассивно переносятся из ооцита в зиготу, а в ПЯ зигот они отсутствуют. На основании настоящей работы, такими составляющими могут быть рибосомные белки, фактор транскрипции UBF и рРНК.

На более поздних стадиях преимплантационного развития, на поверхности ПЯ появляется рРНК (рис 22), в последствии распределяющаяся в их центральную область к стадии 8-ми клеточного эмбриона. Параллельно начинается постепенное замещение материнских белков, перенесенных из яйцеклетки (фибрилларин, NPM1/B23, нуклеолин/C23) вновь синтезированными ядрышковыми белками. К поздней моруле (бластоцисте) ядрышки состоят из рРНК и белков, имеющих эмбриональное происхождение.

#### **4.2. Динамика движения ПЯ эмбрионов мыши в течение первого клеточного цикла после оплодотворения**

Ядрышко - важнейший компартмент клеточного ядра, присутствующий в клетках эукариот. Его основной функцией является биогенез рибосом, который включает в себя три основных этапа: транскрипцию рибосомных генов РНК-полимеразой I, процессинг предшественника рибосомной РНК (пре-рРНК) и сборку рибосомных частиц (Boisvert et al., 2007; Hernandez-Verdun et al., 2006, 2010; Nemeth, Langst, 2011; Dundr, 2012). В соматических клетках ядрышки формируются в конце митоза вокруг кластеров, повторяющихся рибосомных генов, которые занимают определенные районы в некоторых хромосомах кариотипа, получивших название «ядрышкообразующих хромосом» (ЯО-

хромосом). Ядрышки герминативных клеток значительно отличаются от соматических: после оплодотворения в одноклеточных эмбрионах млекопитающих в каждом пронуклеусе собираются множественные мелкие структуры, получившие название предшественников ядрышек (Fléchon and Кореспу; 1998). Мажорная активация транскрипции у мыши начинается на стадии двух бластомеров, а полное восстановление уровня транскрипции эмбриона завершается к стадии поздней морулы/ранней бластоцисты (Hamatani et al., 2004). Постепенно, в течение 4-5 раундов делений дробления, ПЯ преобразовываются в более зрелые формы, по структуре и функциям соответствующие ядрышкам соматических клеток (рис. 21; Flecon and Кореспу, 1998).

Для эмбрионов человека, характер распределения, количество и размер ПЯ в зиготе является одним из наиболее простых не инвазивных критериев компетентности эмбрионов к дальнейшему развитию и имплантации (Tesarik, Greco, 1999; Scott et. al., 2000; Azzarello et al., 2012). Было показано, что для стадии ранней зиготы человека характерно присутствие множественных мелких (до 12 штук), произвольно распределенных ПЯ внутри каждого пронуклеуса (Payne et al., 2005). На более поздней стадии развития зиготы, в каждом пронуклеусе присутствует меньшее количество более крупных ПЯ, поляризованных на периферии, в экваториальной области зиготы, в месте соприкосновения с другим пронуклеусом (Tesarik, Greco, 1999). Хотя принято говорить о слиянии ПЯ на стадии зиготы мыши, об этом процессе судят по уменьшению их количества к более поздним стадиям. Однако процесс объединения ПЯ до настоящей работы не был показан в динамике прижизненного наблюдения. Были рассчитаны параметры динамики движения ПЯ средней-поздней зиготы (21-23 ч после инъекции ХГЧ) и ЯПТ (диаметр ЯПТ:  $8.9 \pm 0.16$  мкм) “многоядрышковых” GV ооцитов. Скорости движения ядрышковых производных совпадают в пределах погрешностей (Таблица 4).



Таблица 4. Параметры динамики движения ЯПТ GV ооцитов NSN- и SN-типа и ПЯ 1-клеточных эмбрионов мыши. Для каждой величины было измерено 10 ЯПТ/ПЯ, в таблице показан средний путь, пройденный центроидами ЯПТ и ПЯ в течение 60 мин, а также средняя скорость с учетом ошибки определения среднего.

	Пройденный путь, мкм	Средняя скорость, мкм/мин
ЯПТ/ GV NSN-ооцит	6.73±1,19	0,14±0,02
ЯПТ/ GV SN-ооцит	6.43±1,07	0,14±0,01
ПЯ /зигота	7.37±1.12	0.15±0.02

В настоящей работе с помощью прижизненных наблюдений за ПЯ одноклеточных эмбрионов, впервые получены доказательства слияния ПЯ, описан временной промежуток этого процесса: объединение ПЯ происходит за короткий промежуток времени (10-20 минут, Рис. 26б-е).

ЯПТ наиболее зрелых и компетентных GV ооцитов мыши SN-типа окружены непрерывным кольцом гетерохроматина (Zuccotti et al., 1998; 2002). Показано, что ЯПТ ооцитов SN-типа не могут сливаться в процессе созревания (рис. 28). В отличие от ооцитов SN-типа, из NSN-ооцитов могут образоваться зиготы после оплодотворения, однако их развитие останавливается на стадии двух бластомеров (Inoue et al., 2008). Показано, что к слиянию предрасположены ЯПТ GV ооцитов NSN-типа, для которых характерны хромоцентры и нет кольца гетерохроматина (рис. 27). Вероятно, предрасположенность ядрышковых производных (ЯПТ и ПЯ) к слиянию может зависеть как от конфигурации хроматина, так и от разницы синтетических процессов на стадии предовуляторного GV ооцита и одноклеточного эмбриона. GV ооциты SN-типа являются транскрипционно инертными, в отличие от

ооцитов NSN-типа, и поздней зиготы (Kigami et al., 2003; Latham, Schultz, 2002; Zatssepina et al., 2000; Shishova et al., 2015). Примечательным является переход NSN конфигурации хроматина в SN, после слияния ЯПТ, что может быть связано с “дозреванием” NSN-ооцитов и находится в хорошем соответствии с данными литературы: известно, что процент SN ооцитов увеличивается с возрастом мышей, а SN - конфигурация хроматина считается наиболее зрелой (Zuccotti et al., 1995, 1998; Debey et al., 1993). Замедленное развитие ооцитов NSN-типа со сливающимися ЯПТ сопровождается переходом менее зрелой конфигурации хроматина NSN-типа в более зрелую SN. Гипотеза о негативном влиянии преждевременного перехода NSN-конфигурации в SN *in vivo* на способность ооцитов к овуляции (Zuccotti et al., 1995) соотносится с нашими данными о замедлении созревания ооцитов NSN-типа с несколькими ядрышковыми производными. Таким образом, одновременное присутствие нескольких ЯПТ и конфигурация хроматина NSN-типа может являться признаком незрелости ооцита.

### **4.3. Динамика движения ядер GV ооцитов мыши**

После расчета средних скоростей движения ПЯ зигот и ЯПТ GV ооцитов в течение 1 часа видео наблюдений, было выявлено, что они совпадают в пределах погрешностей:  $0.15 \pm 0.02$  мкм/ мин для ПЯ и  $0.14 \pm 0.02$  мкм/мин для ЯПТ в GV ооцитах NSN-типа. Для того чтобы охарактеризовать динамику и скорость движения ЯПТ, мы провели сравнение с другой высокоподвижной органеллой – ядром GV ооцита. Мы проанализировали характер движения ядер путем длительных видеонаблюдений. Были рассмотрены закономерности движения ядер предовуляторных GV ооцитов мыши с разной конфигурацией хроматина и начальным положением ядра. Разница скоростей движения ядер NSN/SN-ооцитов в центре и ядер SN-ооцитов на периферии не является статистически значимой ( $p < 0,001$ ; t-тест; Табл. 5). В то время как скорость движения ядер NSN-ооцитов в районе периферии значительно отличается от скорости движения ядер всех рассмотренных ранее типов (Табл. 5).

Таблица 5. Параметры динамики ядер GV ооцитов мышцы. Для каждой величины было измерено 5 ооцитов, в таблице показан средний путь, пройденный центроидами ядер в течение 60 мин, а также средняя скорость с учетом ошибки определения среднего.

Тип/положение ядра	Пройденный путь, мкм	Средняя скорость, мкм/мин
SN-ооцит/периферия	12.69±1.39	0.21±0.02
NSN-ооцит/периферия	3.02±0.12	0.011±0.001
SN-ооцит/центр	14.76±0.46	0.25±0.01
NSN-ооцит/центр	14.65±1.60	0.24±0.03

На основании полученных данных о динамике ядер можно сделать вывод о том, что обязательным критерием жизнеспособности GV ооцитов является подвижность их ядра, которая должна сохраняться вплоть до распада, т.е. перехода на стадию GVBD – следующую стадию развития ооцита. Длительная иммобилизация ядра является признаком гибели GV ооцита. Наиболее жизнеспособными являются GV ооциты SN-типа с центрально расположенным ядром (Bellone et al., 2009; Zuccotti et al., 2011). Средняя скорость движения ядра таких ооцитов, рассчитанная по результатам 1-часовой видеосъемки, составила  $0.25 \pm 0,01$  мкм/мин, что значительно превышает скорость движения ЯПТ SN-ооцитов ( $0.14 \pm 0,01$  мкм/мин). Более низкую скорость движения ПЯ и ЯПТ можно объяснить менее развитой системой актиновых филаментов внутри ядра по сравнению с цитоплазмой.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью оптимизированных способов подготовки эмбрионов мыши для иммуноцитохимического анализа, в предшественниках ядрышек зигот выявлены ключевые белки ядрышка, участвующие в раннем (фибрилларин) и позднем процессинге рРНК (NPM1, нуклеолин), не удалось выявить транскрипционный фактор РНК полимеразы I UBF и рибосомные белки RPL26 и RPS10. Вероятно белки раннего и позднего процессинга унаследованы от GV ооцитов, в отличие от белка UBF и рибосомных белков, которые синтезируются в ПЯ эмбрионов *de novo* на более поздних стадиях преимплантационного развития. Впервые была показана локализация рРНК в ПЯ зигот мыши и в переходных формах производных ядрышка, после основной активации транскрипции рибосомных генов на стадии двух бластомеров.

Как ПЯ зигот, так и ЯПТ GV ооцитов мыши, способны к слиянию, однако скорости этих процессов различаются: ПЯ сливаются в течении 10-20, ЯПТ сливаются в процессе длительных многочасовых видеонаблюдений и культивации. Только ЯПТ в GV ооцитах с конфигурацией по типу NSN способны к слиянию, ЯПТ в ооцитах SN-типа не сливаются. Методом цейтраферной видеосъемки нам удалось выявить дополнительный критерий компетентности GV ооцитов мыши к созреванию, который заключается в непрерывной подвижности ЯПТ и ядра вплоть до его распада. Этот признак может быть рекомендован для использования в клиниках по репродуктивной медицине как дополнительный критерий мейотической компетентности ооцитов человека.

Было показано, что ядро GV ооцита является более динамичной органеллой, по сравнению с ЯПТ ооцитов и ПЯ зигот: скорость движения ядра наиболее компетентного к развитию предовуляторного ооцита SN-типа с центральным ядром более чем в 1.5 раза превышает скорость движения ЯПТ или ПЯ.

## 6. ВЫВОДЫ

1. Белок-связывающий краситель флуоресцеин-5'-изотиоцианат (ФИТЦ) и РНК-связывающий краситель пиронин Y позволяют выявлять белки и РНК в составе предшественников ядрышек зигот мыши и их переходных форм на поздних стадиях развития.
2. С помощью разных способов подготовки образцов для иммуноцитохимического анализа установлено, что в предшественниках ядрышек зигот мыши присутствуют белки нормальных ядрышек, участвующие в раннем (фибрилларин) и позднем (NPM1/B23, нуклеолин/C23) процессинге рРНК, но отсутствуют транскрипционный фактор РНК полимеразы I UBF и рибосомные белки RPL26 и RPS10. Данных в пользу участие предшественники ядрышек зигот мыши в биогенезе рибосом не выявлено.
3. С использованием метода флуоресцентной гибридизации *in situ* впервые описана локализация рРНК в предшественниках ядрышек и ядрышках ранних зародышей мыши. Предшественники ядрышек зигот содержат только следовые количества 28S рРНК, а появление новосинтезированной рРНК на поверхности предшественников ядрышек начинается на стадии двухклеточного эмбриона после активации транскрипции рДНК.
4. Предложена модель трансформации предшественников ядрышек зигот в нормальные ядрышки. Трансформация начинается на стадии двух бластомеров, когда на поверхности предшественников ядрышек появляются первые транскрипты новосинтезированной рРНК. Материнские белки, перенесенные из яйцеклетки (фибрилларин, NPM1/B23, нуклеолин/C23) постепенно замещаются вновь синтезированными ядрышковыми белками. К поздней моруле – бластоцисте ядрышки состоят из рРНК и белков, имеющих эмбриональное происхождение.

5. Установлено, что предшественники ядрышек зигот и ядрышко-подобные тельца предовуляторных ооцитов способны к слиянию. Слияние ядрышко-подобных телец сопровождается преобразованием конфигурации хроматина NSN-типа в SN-тип, который является более благоприятным для завершения мейотического созревания предовуляторных ооцитов.
6. Подвижность ядра является признаком жизнеспособности предовуляторного ооцита. Иммобилизация ядра на периферии предовуляторных ооцитов мыши NSN-типа является дополнительным критерием их некомпетентности к мейотическому созреванию.

### Список литературы

1. Боголюбова Н.А., Боголюбова И.О. Локализация актина в ядрах двухклеточных зародышей мыши //Цитология. – 2009. – Т. 51. – №. 8. – С. 663-669.
2. Гаврилова Е.В., Кузнецова И.С., Енукашвили Н.И., Нониашвили Е.М., Дыбан А.П., Подгорная О.И. Локализация сателлитной ДНК и ассоциированных с ней белков относительно проядрышек у одно- и двухклеточных зародышей мыши //Цитология. – 2009. – Т. 51. – №.5. – С. 455-464.
3. Денисенко М.В., Курцер М.А., Курило Л.Ф. Динамика формирования фолликулярного резерва яичников //Андрология и генитальная хирургия. – 2016. – Т.17. – С. 20-28
4. Дыбан А. П.Раннее развитие млекопитающих. Ленинград, Наука. 1988. 228 с.
5. Зыбина Е. В. Синтез РНК и белка в растущем ооците и фолликуле мыши //Цитология. – 1971. – Т.13. – С. 768-775.
6. Коробова Ф.В., Нониашвили Е.М., Романова Л.Г., Ларионов О.А., Дыбан А.П., Зацепина О.В. Локализация рибосомных генов в двухклеточных зародышах мыши // Биологические мембраны. – 2003. – Т. 20. – №.6. – С. 464-471.
7. Курило Л. Ф. Закономерности овариогенеза и оогенеза млекопитающих. Москва, Lambert Acad. Publ. – 2012. 282 с.
8. Почукалина Г.Н., Парфенов В.Н. Трансформация ядрышек ооцитов антральных фолликулов мыши. Выявление коилина и компонентов комплекса РНК-полимеразы //Цитология. – 2008. – Т. 50. – №.8. – С. 671-680.
9. Adenot P.G., Mercier Y., Renard J.P., Thompson E.M. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and

- differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos //Development. – 1998. – V. 124 – №. 22. – P. 4615-4625.
10. Adriaens I., Cortvrindt R., and Smitz, J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence //Hum. Reprod. – 2004. V. 19. – №. 2. – P. 398-408.
  11. Abe K. I., Yamamoto R., Franke V., Cao M., Suzuki Y., Suzuki M. G., Vlahovicek K., Svoboda P., Schultz R.M. and Aoki F. The first murine zygotic transcription is promiscuous and uncoupled from splicing and 3' processing //EMBO. – 2015. DOI: 10.15252/emj.201490648.
  12. Aguirre-Lavin T., Adenot P., Bonnet-Garnier A., Lehmann G., Fleuret R., Boulesteix C., Debey P., Beaujean N. 3D-FISH analysis of embryonic nuclei in mouse highlights several abrupt changes of nuclear organization during preimplantation development //Dev. Biol. – 2012. – V. 12. – №. 30. – P. 1-19.
  13. Ahmad Y., Boisvert F.M., Gregor P., Goble A., Lamond A.I. NOPdb: Nucleolar Proteome Database //Nucleic Acids Res. – 2009. – V.37. – P. 181-184.
  14. Akam M. The molecular basis for metameric pattern in the Drosophila embryo //Development. – 1987. – V. 101. – №. 1. – P. 1-22.
  15. Almouzni G., Probst A.V. Heterochromatin maintenance and establishment. Lessons from the mouse pericentromere //Nucleus. – 2011.V. 2. – №. 5. – P. 332-338.
  16. Andrews L. M., Jones M. R., Digman M. A., and Gratton E. Detecting Pyronin Y labeled RNA transcripts in live cell microenvironments by phasor-FLIM analysis //Methods and applications in fluorescence. – 2013. – V. 1. – №. 1. – P. 015001.
  17. Aoki F., Worrad D.M., Schultz R.M. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo //Dev. Biol. – 1997. V.181. – №. 2. – P. 296-307.



18. Avella M.A., Xiong B., Dean J. The molecular basis of gamete recognition in mice and humans //Mol. Hum. Reprod. – 2013. – V. 19. – №. 5. – P. 279-289.
19. Azzarello A., Hoest, T., and Mikkelsen, A. L. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture //Human reproduction. – 2012. V. 27. – №.9. P. 2649-2657.
20. Bachvarova R. Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals //Dev. Biol. – 1985. – V. 1. – P. 453-524.
21. Baker T.G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries //Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 1963. – V.158. – P. 417-433.
22. Baker T.G. Oogenesis and ovulation. (In): Austin C. R., Short R.V (eds). Reproduction in mammal 1: Germ cells and fertilization. – 1982.
23. Baran V., Vesela J., Rehak P., Koppel J., Flechon J.E. Localization of fibrillarin and nucleolin in nucleoli of mouse preimplantation embryos //Mol. Reprod. Dev. – 1995.V. 40. – №. 3. – P. 305-310.
24. Baran V., Pavlok A., Bjerregaard B., Wrenzycki C., Hermann D., Philimonenko V.V., Lapathitis G., Hozak P., Niemann H., Motlik J. Immunolocalization of upstream binding factor and pocket protein p130 during final stages of bovine oocyte growth //Biol. Reprod. – 2004. – V. 70. – №. 4. – P. 877-886.
25. Bebbere D., Bogliolo L., Ariu F., Fois S., Leoni G.G., Tore S., Succu S., Berlinguer F., Naitana S. and Ledda S. Expression pattern of zygote arrest 1 (ZAR1), maternal antigen that embryo requires (MATER), growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) genes in ovine oocytes and in vitro-produced preimplantation embryos //Reproduction, Fertility and Development. – 2008. V. 20. – № 8. – P. 908-915.
26. Bedford J. M., and Calvin H. I. The occurrence and possible functional significance of-S-S-crosslinks in sperm heads, with particular reference to

- eutherian mammals //Journal of Exp. Zool. Part A. – 1974. – V. 188. – №. 2. – P. 137-155.
27. Beker-van Woudenberg A.R., van Tol H.T., Roelen B.A., Colenbrander B., Bevers M.M. Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality //Biol. Reprod. – 2004. – V. 70. – №. 5. – P. 1465-1474.
28. Belli M., Vigone G., Merico V., Redi C. A., Garagna S., and Zuccotti M. Time-lapse dynamics of the mouse oocyte chromatin organisation during meiotic resumption //BioMed Res. Int. – 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/207357>
29. Bellone M., Zuccotti M., Redi C.A., Garagna S. The position of the germinal vesicle and the chromatin organization together provide a marker of the developmental competence of mouse antral oocytes //Reproduction. – 2009. – V. 138. – №. 4. – P. 639-643.
30. Biggiogera, M., Burki, K., Kaufmann, S. H., Shaper, J. H., Gas, N., Amalric, F., & Fakan, S. Nucleolar distribution of proteins B23 and nucleolin in mouse preimplantation embryos as visualized by immunoelectron microscopy //Development. – 1990. – V. 110. – №.4. – P. 1263-1270.
31. Biggiogera M., Martin T.E., Gordon J., Amalric F., Fakan S. Physiologically inactive nucleoli contain nucleoplasmic ribonucleoproteins: immunoelectron microscopy of mouse spermatids and early embryos //Exp. Cell Res. – 1994. – V. 213. – №. 1. – P. 55-63.
32. Bjerregaarde B., Wrenzycki C., Philimonenko V. V., Hozak P., Laurincik J., Niemann H., Motlik J., Maddox-Hyttel P. Regulation of ribosomal RNA synthesis during the final phases of porcine oocyte growth //Biol. Reprod. – 2004. – V. 70. – №. 4. – P. 925-935.

33. Bleil J.D., Wassarman P.M. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucid //Dev. Biol. – 1980. – V. 76. – №. 1. – P. 185-202.
34. Bogolyubova, I., Stein, G., & Bogolyubov, D. FRET analysis of interactions between actin and exon-exon-junction complex proteins in early mouse embryos //Cell and tissue research. – 2013. – V. 352. – №. 2. – P. 277-285.
35. Boisvert F.-M., van Koningsbruggen S., Navascues J., Lamond A.I. The multifunctional nucleolus //Nature. – 2007. V. 8. – №. 7. P. 574-585.
36. Boisvert F. M., Ahmad Y., Lamond A. I. The dynamic proteome of the nucleolus //The nucleolus. – 2011. – P. 29-42.
37. Boja E.S., Hoodbhoy T., Fales H.M., Dean J. Structural characterization of native mouse zona pellucida proteins using mass spectrometry //J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – №. 36. – P. 34189-34202.
38. Bonnet-Garnier A., Feuerstein P., Chebrout M., Fleurot R., Jan H.-U., Debey P., Beaujean N. Genome organization and epigenetic marks in mouse germinal vesicle oocytes //Int. J. Dev. Biol. – 2012. – V. 56. – №. 10-12. – P. 877-887.
39. Bouniol C., Nguyen E., Debey P. Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryo //Exp. Cell Res. – 1995. – V. 218. – №. 1. – P. 57-62.
40. Bouniol-Baly C., Hamraoui L., Guibert J., Beaujean N., Szollosi M.S., Debey P. Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes //Biol. Reprod. – 1999. – V. 60. – №.3. – P. 580-587.
41. Braun R. E. Packaging paternal chromosomes with protamine //Nature Genetics. – 2001. – V. 28. – P. 10-12
42. Brunet S., Verlhac M.H. Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division //Hum. Reprod. Update. – 2010. – V. 7. – №. 1. P. 68-75.
43. Brunet S., and Maro B. Germinal vesicle position and meiotic maturation in mouse oocyte //Reproduction. – 2007. V. 133. – №. 6. – P. 1069-1072.

44. Buffone, M. G., Foster, J. A., & Gerton, G. L. The role of the acrosomal matrix in fertilization //Int. J. Dev. Biol. – 2004. – V. 52. – №.5-6. – P. 511-522.
45. Buffone, M. G., Rodriguez-Miranda, E., Storey, B. T., & Gerton, G. L. Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida //J. Cell. Physiol. – 2009. – V. 220. – №.3. – P. 611-620.
46. Burkart, A. D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-Movilla, M., & Dean, J. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy //J Cell Biol. – 2012. – V. 197. – №. 1. – P. 37-44.
47. Burns, K. H., Viveiros, M. M., Ren, Y., Wang, P., DeMayo, F. J., Frail, D. E., Eppig J.J. & Matzuk, M. M. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos //Science. – 2003. – V. 300. – №. 5619. – P. 633-636.
48. Burton A., Torres-Padilla M.-E. Epigenetic reprogramming and development: a unique heterochromatin organization in the preimplantation mouse embryo //Brief. Funct. Genomics. – 2010. – V. 9. – №. 6. – P. 444-454.
49. Carson D. D., Tang J. P. and Julian J. Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence //Dev. Biol. – 1993. – V. 155. – №. 1. – P. 97-106.
50. Chaffin C.L., VandeVoort C.A. Follicle growth, ovulation, and luteal formation in primates and rodents: a comparative perspective //Exp. Biol. Med. – 2013. – V. 238. – №. 5. – P. 539-548.
51. Chouinard L. A. A light-and electron-microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepubertal mouse //J. Cell Sci. – 1971. – V. 9. – №. 3. – P. 637-663.
52. Cherr G. N. Activation of mammalian egg; Cortical granule distribution, exocytosis and the block to polyspermy //Fertilization in Mammals. – 1990. – P. 309-330.

53. Clegg K.B., Piko L. Poly (A) length, cytoplasmic adenylation and synthesis of poly (A) + RNA in early mouse embryos // *Dev. Biol.* – 1983. – V. 95. – №. 2. – P. 331-341.
54. Clift D., Schuh M. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis // *Nature.* – 2013. – V. 14. – №. 9. – P. 549-562.
55. Collado-Fernandez E., Picton H.M., Dumollard R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals // *Int. J. Dev. Biol.* – 2012. – V. 56. – №. 10-12. – P. 799-808.
56. Coticchio G., Dal Canto M., Renzini M.M., Guglielmo M.C., Brambillasca F., Turchi D., Novara P.V., Fadini R. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization // *Hum. Reprod. Update.* – 2015. – V. 1. – P. 28.
57. Coy P. and Avilés M. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? // *Biological Reviews.* – 2010. – V. 85. – №. 3. – P. 593-605.
58. Cran D.G., Esper C.R. Cortical granules and the cortical reaction in mammals // *J. Reprod. Fertil.* – 1990. – V. 42. P. 177-188.
59. Cuadros-Fernandez J.M., Esponda P. Immunocytochemical localisation of the nucleolar protein fibrillarin and RNA polymerase I during mouse early embryogenesis // *Zygote.* – 1996. – V. 4. – №. 1. – P. 49-58.
60. Curran R.C., Gregory J. The unmasking of antigens in paraffin sections of tissue by trypsin // *Experientia.* – 1977. – V. 33. – №. 10. P. 1400-1401.
61. D'Amico F., Skarmoutsou E., Stivala F. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry // *J. Immunol. Methods.* – 2009. – V. 341. – №. 1-2. – P. 1-18.
62. Debey P., Szollosi M. S., Szollosi D., Vautier D., Grousse A., and Besombes D. Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics // *Mol. Reprod. Dev.* – 1993. – V. 36. – №. 1. – P. 59-74.

63. De La Fuente R., Eppig J.J. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling // *Dev. Biol.* – 2001. – V. 229. – №. 1. – P. 224-236.
64. De La Fuente R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. // *Dev. Biol.* – 2006. – V. 292. – №. 1. – P. 1-12.
65. De Leon V., Johnson A., Bachvarova R. Half-lives and relative amounts of stored and polysomal ribosomes and poly (A) + RNA in mouse oocytes // *Dev. Biol.* – 1983. – V. 98. – №. 2. – P. 400-408.
66. Deshmukh R.S., Ostrup O., Strejcek F., Vejlsted M., Lucas-Hahn A., Petersen B., Li J., Callesen H., Niemann H., Hyttel P. Early aberrations in chromatin dynamics in embryos produced under in vitro conditions // *Cell Reprogram.* – 2012. – V. 14. – №. 3. – P. 225-234.
67. Doherty L., Sheen M.R., Vlachos A., Choismel V., O'Donohue M.F., Clinton C., Schneider H.E., Downs, S. M., Daniel, S. A., Bornslaeger, E. A., Hoppe, P. C., and Eppig, J. J. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity // *Molecular Reproduction and Development.* – 1989. – V. 23. – №. 3. – P. 323-334.
68. Ducibella T., Huneau T., Angelichio E., Xu Z., Schultz R.M., Kopf G.S., Fissore R., Madoux S., Ozil J.P. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca<sup>2+</sup> oscillation number // *Dev. Biol.* – 2002. – V. 250. – №. 2. – P. 280-291.
69. Dundr M. Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012. – V. 24. – №. 3. – P. 415-422.
70. Duval C., Bouvet P., Omilli F., Roghi C., Dorel C., LeGuellec R., Paris J. and Osborne H. B. Stability of maternal mRNA in *Xenopus* embryos: role of transcription and translation // *Mol. Cell. Biol.* – 1990. V. 10. – №. 8. – P. 4123-4129.

71. Dyce J., George M., Goodall, H., and Fleming, T. P. Do trophectoderm and inner cell mass cells in the mouse blastocyst maintain discrete lineages? // *Development*. – 1987. V. 100. – №. 4. – P. 685-698.
72. Ebeling W., Hennrich N., Klockow M., Metz H., Orth H.D., Lang H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber // *Eur. J. Biochem.* – 1974. – V. 47. – №. 1. – P. 91-97.
73. Engel W., Zenzes M. T., and Schmid M. Activation of mouse ribosomal RNA genes at the 2-cell stage // *Human genetics*. – 1977. – V. 38. – №. 1. – P. 57-63.
74. Eppig, J. J. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles // *Biol. Reprod.* – 1991. V. 45. – №. 6. – P. 824-830.
75. Eppig J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals // *Reproduction*. – 2001. – V. 122. – №. 6. – P. 829-838.
76. Fair T., Hyttel P., Lonergan P., Boland M.P. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation, and fertilization // *Biol Reprod.* – 2001. – V. 64. – P. 1516-1525.
77. Fakan S., Odartchenko N. Ultrastructural organization of the cell nucleus in early mouse embryos // *Biol. Cell.* – 1980. – V. 37. – P. 211-218.
78. Falahati H., Pelham-Webb B., Blythe S., and Wieschaus E. Nucleation by rRNA dictates the precision of nucleolus assembly // *Current Biology*. – 2016. – V. 26. – №. 3. – P. 277-285.
79. Falender A.E., Shimada M., Lo Y. K., Richards J.S. TAF4b, a TBP associated factor, is required for oocyte development and function // *Dev. Biol.* – 2005. – V. 288. – P. 405-419
80. Ferreira J. M., Carmo-Fonseca M. The biogenesis of the coiled body during early mouse development // *Development*. – 1995. – V. 121. – №. 2. – P. 601-612.

81. Flechon J.E., Kopecny V. The nature of the 'nucleolus precursor body' in early preimplantation embryos: a review of the fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function // *Zygote*. – 1998. – V. 6. – №. 2. – P. 183-191.
82. Fleming T. P. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst // *Dev. Biol.* – 1987. – V. 119. – №. 2. – P. 520-531.
83. Fulka H., Martinkova S., Kyogoku H., Langerova A., Fulka J. Production of giant mouse oocyte nucleoli and assessment of their protein content // *J. Reprod. Dev.* – 2012. – V. 58. – №. 3. – P. 371-376.
84. Fulka H., Langerova A. The maternal nucleolus plays a key role in centromere satellite maintenance during the oocyte to embryo transition // *Development*. – 2014. – V. 141. – №. 8. – P. 1694-1704.
85. Fulka H. and Aoki F. Nucleolus precursor bodies and ribosome biogenesis in early mammalian embryos: old theories and new discoveries // *Biol. Reprod.* – 2016. – V. 94. – №. 6. – P. 143-1.
86. Fulka H., Kyogoku H., Zatssepina O., Langerova A., and Fulka Jr. J. Can nucleoli be markers of developmental potential in human zygotes? // *Trends in molecular medicine*. – 2015. – V. 21. – №. 11. – P. 663-672.
87. Geuskens M., Alexandre H. Ultrastructural and autoradiographic studies of nucleolar development and rRNA transcription in preimplantation mouse embryos // *Cell Differ.* – 1984. – V. 14. – №. 2. – P. 125-34.
88. Goddard M. J., and Pratt H. P. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the '2-cell block' // *Development*. – 1983. – V. 73. – №. 1. – P. 111-133.
89. Gosden R., Lee B. Review series. Portrait of an oocyte: our obscure origin // *J. Clin. Invest.* – 2010. – V. 120. – №. 4. – P. 973-983.
90. Griffin J., Emery B.R., Huang I., Peterson C.M., Carrell D.T. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian



- species (mouse, hamster, pig and human) //J. Exp. Clin. Assist. Reprod. – 2006. – V. 3. – №. 2. – P. 1-9.
- 91.Gruzova M.N., Parfenov V.N. Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis //Int. Rev. Cytol. – 1993. – V. 144. – P. 1–52.
- 92.Gulyas B. J. A reexamination of cleavage patterns in eutherian mammalian eggs: rotation of blastomere pairs during second cleavage in the rabbit //Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology. – 1975. – V. 193. – №. 2. – P. 235-247.
- 93.Hamatani T., Carter M.G., Sharov A.A., Ko M.S. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development //Dev. Cell. – 2004. – V. 6. – №. 1. – P. 117-131.
- 94.Hamatani T., Yamada M., Akutsu H., Kuji N., Mochimaru Y., Takano M., Toyoda M., Miyado K., Umezawa A., Yoshimura Y. What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes? //Reproduction. – 2008. – V. 135. – №. 5. – P. 581-592.
- 95.Hennet M.L., Combelles C.M.H. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation //Int. J. Dev. Biol. – 2012. – V. 56. – №. 10-12. – P. 819-831.
- 96.Hernandez-Verdun D. Nucleolus: from structure to dynamics //Histochem. Cell Biol. – 2006. – V. 125. – №. 1-2. – P. 127-137.
- 97.Hernandez-Verdun D., Roussel P., Thiry M., Sirri V., Lafontaine D.L. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism //John Wiley and Sons, Ltd. – 2010. – V. 1. – №. 3. – P. 415-431.
- 98.Hoodbhoy T., Talbot P. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function //Mol. Reprod. Dev. – 1994. – V. 39. – №. 4. – P. 439-448.
- 99.Horner V. L., Wolfner M. F. Transitioning from egg to embryo: triggers and mechanisms of egg activation //Dev. Dyn. – 2008. – V. 237. – №. 3. – P. 527-544.

100. Hyttel P., Laurincik J., Rosenkranz C., Rath D., Niemann H., Ochs R.L., Schellander K. Nucleolar proteins and ultrastructure in pre-implantation porcine embryos developed in vivo //Biol. Reprod. – 2000. – V. 63. – №. 6. – P. 1848-1856.
101. Ihara M., Tseng H. and Schultz R.M. Expression of the variant ribosomal RNA genes in mouse oocytes and preimplantation embryos //Biol.reprod. – 2011. – V. 84. – №. 5. – P. 944-946.
102. Inoue A., Nakajima R., Nagata M., Aoki F. Contribution of the oocyte nucleus and cytoplasm to the determination of meiotic and developmental competence in mice //Hum. Reprod. – 2008. – V. 23. – №. 6. – P. 1377-1384.
103. Kapuscinski J., and Darzynkiewicz Z. Interactions of pyronin Y (G) with nucleic acids //Cytometry. – 1987. – V. 8. – №.2. – P. 129–137.
104. Kashimada K. and Koopman P. Sry: the master switch in mammalian sex determination //Development. – 2010. – V. 137. – P. 3921-3930
105. Keshet E., Rosenberg M. P., Mercer J. A., Propst F., Vande W. G., Jenkins N. A., and Copeland N. G. Developmental regulation of ovarian-specific Mos expression //Oncogene. – 1988. – V. 2. – №. 3. – P 235-240.
106. Kigami D., Minami N., Takayama H., and Imai H. MuERV-L is one of the earliest transcribed genes in mouse one-cell embryos //Biol. Reprod. – 2003. – V. 68. – №. 2. – P. 651-654.
107. Kiknadze, I. I., Zybina, T. G., Zybina, E. V., and Zhelezova, A. I. Peculiarities of the nuclear-structure and karyosphere formation in the oogenesis of the mink //Tsitologiya. – 1980. – V. 22. – №. 2. – P. 127.
108. Kopecny V., Landa V., Pavlok A. Localization of nucleic acids in the nucleoli of oocytes and early embryos of mouse and hamster. An autoradiographic study //Mol. Reprod. Develop. – 1995. – V. 41. – №. 4. – P. 449-458.
109. Kopecny V., Landa V., Malatesta M., Martin T. E., Fakan S. Immunoelectron microscope analysis of rat germinal vesicle-stage oocyte

- nucleolus-like bodies //Reprod. Nutr. Develop. – 1996b. – V. 36. – №. 6. – P. 667-679.
110. Koubova Y., Menke D. B., Zhou Q., Capel B., Griswold M. D., and Page D. C. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice //PNAS. – 2006. – V. 103. – №. 8. – P. 2474-2479
111. Kurilo L. F. Oogenesis in antenatal development in man //Human genetics. – 1981. – V. 57. – №. 1. – P. 86-92.
112. Kyogoku H., Fulka J., Wakayama T., Miyano T. De novo formation of nucleoli in developing mouse embryos originating from enucleolated zygotes //Development. – 2014a. – V. 141. – №. 11. – P. 2255-2259.
113. Kyogoku H., Kitajima T.S., Miyano T. Nucleolus precursor body (NPB): a distinct structure in mammalian oocytes and zygotes //Nucleus. – 2014b. – V. 5. – №. 6. – P. 493-498.
114. Laurinčík J., Hyttel P., Baran V., Eckert J., Lucas-Hahan A., Pivko J., Niemann H., Brem G., Schellander K. A detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vitro: Cell-cycle chronology and ultrastructure //Mol. Reprod. Dev. – 1998. – V. 50. – №. 2. – P. 192-199.
115. Latham K. E. and Schultz R. M. Embryonic genome activation //Front. Biosci. – 2001. – V. 6. – P. D748-D759.
116. Lee M.T., Bonneau A.R., Giraldez A.J. Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition //Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2014. – V. 30. – P. 581-613.
117. Lefievre L., Conner S. J., Salpekar A., Olufowobi O., Ashton P., Pavlovic B., Lenton W., Afnan M., Brewia I.A., Hughes, D. C., Barratt C.L.R. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human //Hum. Reprod. – 2004. – V. 19. – №. 7. – P. 1580-1586.
118. Li L., Zheng P., Dean J. Maternal control of early mouse development //Development. – 2010. – V. 137. – №. 6. – P. 859-870.

119. Li J.-J., Lian H.-Y., Zhang S.-Y., Cui W., Sui H.-S., Han D., Liu N., Tan J.-H. Regulation of fusion of the nucleolar precursor bodies following activation of mouse oocytes: roles of the maturation-promoting factors and mitogen-activated protein kinases //Zygote. – 2011. – V. 20. – №. 3. – P. 1-13.
120. Li L., Lu X., Dean J. The maternal to zygotic transition in mammals //Mol. Aspects Med. – 2013. – V. 34. – №. 5. – P. 919-938.
121. Li R., Albertini D.F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organisation of the mammalian oocyte //Nature. – 2013. – V. 14. – №. 3. – P. 141-152.
122. Lian H. Y., Jiao G. Z., Wang H. L., Tan X. W., Wang T. Y., Zheng L. L. and Tan J. H. Role of cytoskeleton in regulating fusion of nucleoli: a study using the activated mouse oocyte model //Biol. Reprod. – 2014. – V. 91. – №. 3. – P. 56-1.
123. Lim E.-J., Choi Y. Transcription factors in the maintenance and survival of primordial follicles //Clin. Exp. Reprod. Med. – 2012. – V. 39. – №. 4. – P. 127-131.
124. Lin C. J., Koh F. M., Wong P., Conti M., and Ramalho-Santos M. Hira-mediated H3.3 incorporation is required for DNA replication and ribosomal RNA transcription in the mouse zygote //Dev. Cell. – 2014. – V. 30. – №. 3. – P. 268-279.
125. Lindstrom M.S. NPM1/B23: a multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling //Biochem. Res. Int. – 2011. – P. 1-16.
126. MacIntyre N. Unmasking antigens for immunohistochemistry //British J. Biomed. Sci. – 2001. – V. 58. – №. 3. – P. 190.
127. Maddox-Hyttel P., Bjerregaard B., Laurincik J. Meiosis and embryo technology: renaissance of the nucleolus //Reprod. Fertil. Dev. – 2005. – V. 17. – №. 1-2. – P. 3-14.
128. Maddox-Hyttel P., Svarcova O., Laurincik J. Ribosomal RNA and nucleolar proteins from the oocyte are to some degree used for embryonic

- nucleolar formation in cattle and pig //Theriogenology. – 2007. – V. 68. – P. 63-70.
129. Manandhar G., Schatten H., Sutovsky P. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance //Biol. Reprod. – 2005. – V. 72. – №. 1. – P. 2-13.
130. Martin C., Beaujean N., Brochard V., Audouard C., Zink D., Debey P. Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development //Dev. Biol. – 2006. – V. 292. – №. 2. – P. 317-332.
131. Martinez-Salas E., Linney E., Hassell J., and De Pamphilis M. L. The need for enhancers in gene expression first appears during mouse development with formation of the zygotic nucleus //Genes and Development. – 1989. – V. 3. – №. 10. – P. 1493-1506.
132. Matzuk M. M., Burns K. H., Viveiros M. M., Eppig J. J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation //Science. – 2002. – V. 296. – №. 5576. – P. 2178-2180.
133. McGee E.A., Hsueh A.J.W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles //Endocrine Reviews. – 2000. – V. 21. – №. 2. – P. 200-214.
134. McLaren A. Germ cells and soma: a new look at an old problem //Yale, University Press, New Haven. – 1981. – P. 140.
135. Mehlmann L. M. Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes //Dev. Biol. – 2005. – V. 288. – №. 2. – P. 397-404.
136. Menke D.B., Koubova Y., and Page D.C. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave //Dev. Biol. – 2003. – V. 262. – P. 303–312
137. Merico V., Barbieri J., Zuccotti M., Joffe B., Cremer T., Redi C.A., Solovei I., Garagna S. Epigenomic differentiation in mouse preimplantation nuclei of biparental, parthenote and cloned embryos //Chromosome Res. – 2007. – V. 15. – №. 3. – P. 341-360.

138. Miller D. J., Gong X., Decker G., and Shur B. D. Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy //J. Cell Biol. – 1993a. – V. 123. – №. 6. – P. 1431-1440.
139. Miller D. J., Gong X., and Shur B. D. Sperm require beta-N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucid //Development. – 1993b. – V. 118. – №. 4. – P. 1279-1289.
140. Minami N., Suzuki T., Tsukamoto S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals //J. Reprod. Dev. – 2007. – V. 53. – №. 4. – P. 707-715.
141. Miyazaki S., Ito M. Calcium signals for egg activation in mammals //J. Pharmacol. Sci. – 2006. – V. 100. – №. 5. – P. 545-552.
142. Nakamura T., Arai Y., Umehara H., Masuhara M., Kimura T., Taniguchi H., Sekimoto T., Ikawa M., Yoneda Y., Okabe M., Tanaka S., Shiota K. and Tanaka, S. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis //Nat. Cell Biol. – 2007. – V. 9. – №. 1. – P. 64.
143. Nemeth A., Langst G. Genome organization in and around the nucleolus //Trends in Genetics. – 2011. – V. 27. – №. 4. – P. 149-156.
144. Newton K., Petfalski E., Tollervey D., and Cáceres J. F. Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse //Mol. Cell Biol. – 2003. – V. 23. – №. 23. – P. 8519-8527.
145. Nguyen-Chi M., Morello D. RNA-binding proteins, RNA granules, and gametes: is unity strength? //Reproduction. – 2011. – V. 142. – №. 6. – P. 803-817.
146. Nishioka N., Inoue K. I., Adachi K., Kiyonari H., Ota M., Ralston A. and Makita R. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass //Dev. Cell. – 2009. – V. 16. – №. 3. – P. 398-410.

147. Nogueira, D., Albano, C., Adriaenssens, T., Cortvrindt, R., Bourgain, C., Devroey, P., Smitz, J. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro //Biol. Reprod. – 2003. – V. 69. – №. 3. – P. 1042-1052.
148. Ohinata Y., Payer B., O'Carroll D., Ancelin K., Ono Y., Sano M., Barton S.C., Obukhanych T., Nussenzweig M., Tarakhovsky A., Saitou M., Surani M.A. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice //Nature. – 2005. – V. 436. – P. 207-213
149. Ogushi S., Saitou M. The nucleolus in the mouse oocyte is required for the early step of both female and male pronucleus organization //J. Reprod. Dev. – 2010. – V. 56. – №. 5. – P. 495-501.
150. Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization //Development. – 2013. – V. 140. – №. 22. – P. 4471-4479.
151. Oktem O., Urman B. Understanding follicle growth in vivo //Hum. Reprod. – 2010. – V. 25. – №. 12. – P. 2944-2954.
152. Ordonez N.G., Manning J.T., Brooks T.E. Effect of trypsinisation on the immunostaining of formalin-fixed paraffin-embedded tissues //Am. J. Surg. Pathol. – 1988. – V. 12. – №. 2. – P. 121-129.
153. Payer B., Saitou M., Barton S. C., Thresher R., Dixon J. P., Zahn D., Colledge W.H., Carlton M.B.L. Nakano T. and Surani, M. A. Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice //Current Biology. – 2003. – V. 13. – №. 23. – P. 2110-2117.
154. Paynton B. V., Rempel R., and Bachvarova R. Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse //Dev. Biol. – 1988. – V. 129. – №. 2. – P. 304-314.
155. Pedersen R. A., Wu K., and Bałakier H. Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection //Dev. Biol. – 1986. – V. 117. – №. 2. – P. 581-595.

156. Pepling M.E. From Primordial Germ Cell to Primordial Follicle: Mammalian Female Germ Cell Development //Genesis. – 2006. – V. 44. – P. 622–632
157. Pesty A., Miyara F., Debey P., Lefevre B., Poirot C. Multiparameter assessment of mouse oogenesis during follicular growth in vitro //Mol. Hum. Reprod. – 2007. – V. 13. – №. 1. – P. 3-9.
158. Perona J.J., Craik C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases //Protein Science. – 1995. – V. 4. – №. 3. P. 337-360.
159. Plusa B., Grabarek J. B., Piotrowska K., Glover, D. M., and Zernicka-Goetz M. Site of the previous meiotic division defines cleavage orientation in the mouse embryo //Nat. Cell Biol. – 2002. – V. 4. – №. 10. – P. 811.
160. Parfenov V., Potchukalina G., Dudina L., Kostyuchek D., Gruzova M. Human antral follicles: oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data) //Gamete research. – 1989. – V. 22. – №. 2. – P. 219-231.
161. Picton H., Briggs D., Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. Mol //Cell Endocrinol. – 1998. – V. 145. – №. 1-2. – P. 27-37.
162. Picton H.M., Harris S.E., Muruvi W., Chambers E.L. The in vitro growth and maturation of follicles //Reproduction. – 2008. – V. 136. – №. 6. – P. 703-715.
163. Preti M., O'Donohue M.-F., Montel-Lehry N., Bortolin-Cavaille M.-L., Choessel V., Gleizes P.-E. Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA //Nucleic Acids Res. – 2013. – V. 41. – №. 8. – P. 4709-4723.
164. Probst A.V., Okamoto I., Casanova M., Elmarjou F., Le P., Almouzni G., Marjou F.E., Baccon P.L. A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development //Dev. Cell. – 2010. – V. 19. – №. 4. – P. 625-638.



165. Qiu J. J., Zhang W. W., Wu Z. L., Wang Y. H., Qian M., and Li Y. P. Delay of ZGA initiation occurred in 2-cell blocked mouse embryos // *Cell Res.* – 2003. – V. 13. – №. 3. – P. 179.
166. Ram P.T., Schultz R.M. Reporter gene expression in G2 of the 1-cell mouse embryo // *Dev. Biol.* – 1993. – V. 156. – №. 2. – P. 552-556.
167. Rankin T., Talbot, P., Lee, E., and Dean, J. Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss // *Development.* – 1999. – V. 126. – №. 17. – P. 3847-3855.
168. Rankin, T. L., O'Brien, M., Lee, E., Wigglesworth, K. E. J. J., Eppig, J., and Dean, J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development // *Development.* – 2001. – V. 128. – №. 7. – P. 1119-1126.
169. Racki W.J., Richter J.D. CREB controls oocyte growth and follicle development in the mouse // *Development.* – 2006. – V. 133. – №. 22. – P. 4527-4537.
170. Romanova L., Korobova F., Noniashvilli E., Dyban A., Zatsepina O. High resolution mapping of ribosomal DNA in early mouse embryos by fluorescence in situ hybridization // *Biol. Reprod.* – 2006a. – V. 74. – №. 5. – P. 807-815.
171. Romanova L.G., Anger M., Zatsepina O.V. and Schultz R.M. Implication of nucleolar protein Surf6 in ribosome biogenesis and preimplantation mouse development // *Biol. Reprod.* – 2006b. – V. 75. – №. 5. – P. 690-696.
172. Salvaing J., Aguirre-Lavin T., Boulesteix C., Lehmann G., Debey P., Beaujean N. 5-Methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine spatiotemporal profiles in the mouse zygote // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – №. 5. – P. 1-10.
173. Sanchez F., Smitz J. Molecular control of oogenesis // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – V. 1822. – №. 12. – P. 1896-1912.

174. Santenard A., Ziegler-Birling C., Koch M., Tora L., Bannister A.J., Torres-Padilla M.-E. Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3 //Nat. Cell Biol. – 2010. – V. 12. – №. 9. – P. 853-862.
175. Santos F., Hendrich B., Reik W., Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo //Dev. Biol. – 2002. – V. 241. – №. 1. – P. 172-182.
176. Santos F., Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals //Reproduction. – 2004. – V. 127. – №. 6. – P. 643-651.
177. Santos F., Peters A. H., Otte A. P., Reik W., Dean W. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos //Dev. Biol. – 2005. – V. 280. – №. 1. – P. 225-236.
178. Sathananthan A. H., Selvaraj K., Girijashankar M. L., Ganesh V., Selvaraj P., Trounson A. O. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans //Microsc. Res. Tech. – 2006. – V. 69. – №. 6. – P. 396-407.
179. Saunders C.M., Larman M.G., Parrington J., Cox L.J., Royse J., Blayney L.M., Swann K., Lai F.A. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca (2+) oscillations in eggs and embryo development //Development. – 2002. – V. 129. – №. 15. – P. 3533-3544.
180. Scaramuzzi R.J., Baird D.T., Campbell B.K., Driancourt M.A., Dupont J., Fortune J.E., Gilchrist R.B., Martin G.B., McNatty K.P., McNeilly A.S., Monget P., Monniaux D., Vinoles C., Webb R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants // Reprod. Fertil. Dev. – 2011. – V. 23. – №. 3. – P. 444-467.
181. Schier A.F. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs //Science. – 2007. – V. 316. – №. 5823. – P. 406-407.

182. Schultz R.M., Wassarman P.M. Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse // *J. Cell Sci.* – 1977. – V. 24. – P. 167-194.
183. Schultz R. M. Molecular aspects of mammalian oocyte growth and maturation // *Experimental approaches to mammalian embryonic development.* – 1986. – P. 195-237.
184. Schultz R.M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse // *Bioessays.* – 1993. – V. 15. – №. 8. – P. 531-538.
185. Schultz R.M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo // *Hum. Reprod. Update.* – 2002. – V. 8. – №. 4. – P. 323-331.
186. Sha W., Xu, B. Z., Li, M., Liu, D., Feng, H. L., and Sun, Q. Y. Effect of gonadotropins on oocyte maturation in vitro: an animal model // *Fertility and sterility.* – 2010. – V. 93. – №. 5. – P. 1650-1661.
187. Shapiro H. M. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y // *Cytometry.* – 1981. – V. 2. – №. 3. – P. 143–150.
188. Sheriffs I.N., Rampling D., Smith V.V. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy // *J. Clin. Pathol.* – 2001. – V. 54. – №.7. – P. 517-520.
189. Shi S.R., Cote R.J., Taylor C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future // *J. Histochem. Cytochem.* – 1993. – V. 45. – №. 3. – P. 327-343.
190. Shishova K.V., Zharskaya O.O., Zatsepina O.V. The fate of the nucleolus during mitosis: comparative analysis of localization of some forms of pre-rRNA by fluorescent in situ hybridization in NIH/3T3 mouse fibroblasts // *Acta Nat.* – 2011. – V. 3. – №. 4. – P. 100-106.
191. Shishova K. V., Khodarovich Yu. M., Lavrentyeva E. A., and Zatsepina O. V. Analysis of the localization of fibrillar and sites of pre-rRNA synthesis

- in the nucleolus-like bodies of mouse GV oocytes after mild treatment with proteinase K //Russian Journal of Developmental Biology. – 2015. – V. 46. – №. 3. – P. 127 -136. DOI: 10.1134/S1062360415030066
192. Shishova Kseniya V., Khodarovich Yuriy M., Lavrentyeva Elena A., Zatsepina Olga V. Data on morphology, large-scale chromatin configuration and the occurrence of proteins and rRNA in nucleolus-like bodies of fully-grown mouse oocytes in different fixatives //Data in Brief. – 2016. – V. 7. – P. 1179-1184.
193. Song J.L., Wessel G.M. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes //Differentiation. – 2005. – V. 73. – №. 1. – P. 1-17.
194. Svarcova O., Dinnyes A., Polgar Z., Bodo S., Adorjan M., Meng Q., Maddox-Hyttel P. Nucleolar re-activation is delayed in mouse embryos cloned from two different cell lines //Mol. Reprod. Dev. – 2009. – V. 76. – №. 2. – P. 132-141.
195. Svistunova D.M., Musinova Y.R., Polyakov V.Y., Sheval E.V. A simple method for the immunocytochemical detection of proteins inside nuclear structures that are inaccessible to specific antibodies //J. Histochem. Cytochem. – 2012. – V. 60. – №. 2. – P. 152-158.
196. Tabansky I., Lenarcic A., Draft R. W., Loulier K., Keskin D. B., Rosains J., and Sanes, J. R. Developmental bias in cleavage-stage mouse blastomeres //Current Biology. – 2013. – V. 23. – №. 1. – P. 21-31.
197. Tadros W. and Lipshitz H. D. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts //Development. – 2009. – V. 136. – №. 18. – P. 3033-3042.
198. Talbot P., Dandekar P. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? //Microsc. Res. Tech. – 2003. – V. 61. – №. 4. – P. 349-357.
199. Tang M. C., Jacobs S. A., Mattiske D. M., Soh Y. M., Graham A. N., Tran A., Lim S.L., Damien F. Hudson D.F., Kalitsis P., O'Bryan M.K., Wong L.H., Mann J.R. and Wong L. H. Contribution of the two genes encoding

- histone variant h3.3 to viability and fertility in mice //PLOS genetics. – 2015. – V. 11. – №. 2. – P. e1004964.
200. Tanghe S., van Soom A., Nauwynck H., Coryn M., De Kruif A. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization //Mol. Reprod. Dev. – 2002. – V. 61. – №. 3. – P. 414-424.
201. Taylor C.R., Shi S.R., Cote R.J. Antigen retrieval for immunohistochemistry. Status and need for greater standardization //Appl. Immunohistochem. – 1996. – V. 4. – P. 144-146.
202. Tesarik J., Kopecny V., Plachot M., Mandelbaum J. High-resolution autoradiographic localization of DNA containing sites and RNA synthesis in developing nucleoli of human preimplantation embryos: a new concept of embryonic nucleologenesis //Development. – 1987. – V. 101. – №. 4. – P. 777-791.
203. Tesarik J., Kopecny V. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing //Gamete Res. – 1989. – V. 24. – №. 2. – P. 135–149.
204. Tesarik, J., and Greco, E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology //Hum. Reprod. – 1999. – V. 14. – №. 5. – P. 1318-1323.
205. Torres-Padilla M. E., Bannister A. J., Hurd P. J., Kouzarides T., and Zernicka-Goetz M. Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in the mouse oocyte and preimplantation embryos //Int. J. Dev. Biol. – 2006. – V. 50. – №. 5. – P. 455-461.
206. Tsai L. H., Takahashi T., Caviness V. S., and Harlow E. Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system //Development. – 1993. – V. 119. – №. 4. – P. 1029-1040.
207. Tsunoda Y., Shioda Y., Onodera M., Nakamura K., and Uchida T. Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoechst

- staining and ultraviolet irradiation //Reproduction. – 1988. – V. 82. – №. 1. – P. 173-178.
208. Ura K., Kurumizaka H., Dimitrov S., Almouzni G., and Wolffe A. P. Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression //The EMBO journal. – 1997. – V. 16. – №. 8. – P. 2096-2107.
209. Vaccari S., Horner, K., Mehlmann, L. M., and Conti, M. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest //Dev. Biol. – 2008. – V. 316. – №. 1. – P. 124-134.
210. van der Heijden G.W., Derijck A.A., Ramos L., Giele M., van der Vlag J., de Boer P. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin //Dev. Biol. – 2006. – V. 298. – №. 2. – P. 458-469.
211. Versieren K., Heindryckx B., Qian C., Gerris J., and De Sutter P. Toxic effects of Hoechst staining and UV irradiation on preimplantation development of parthenogenetically activated mouse oocytes //Zygote. – 2014. – V. 22. – №. 1. – P. 32-40.
212. Vogt E.J., Meglicki M., Hartung K.I., Borsuk E., Behr R. Importance of the pluripotency factor LIN28 in the mammalian nucleolus during early embryonic development //Development. – 2012. – V. 139. – №. 24. – P. 4514-4523.
213. Wang Q.T., Piotrowska K., Ciemerych M.A., Milenkovic L., Scott M.P., Davis R.W., Zernicka-Goetz M. A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo //Dev. Cell. – 2004. – V. 6. – №. 1. – P. 133-144.
214. Wang H., and Dey S. K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models //Nature reviews. Genetics. – 2006. – V. 7. – №. 3. – P. 185.

215. Wang S., Kou Z., Jing Z., Zhang Y., Guo X., Dong M., Wilmot I., Gao S. Proteome of mouse oocytes at different developmental stages //Proc. Natl. Acad. Sci. – 2010. – V. 107. – №. 41. – P. 17639-17644.
216. Ward G. E., Brokaw, C. J., Garbers, D. L., and Vacquier, V. D. Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer //The J. Cell Biol. – 1985. – V. 101. – №. 6. – P. 2324-2329.
217. Warner C. M. and Versteegh L. R. In vivo and in vitro effect of  $\alpha$ -amanitin on preimplantation mouse embryo RNA polymerase //Nature. – 1974. – V. 248. – №. 5450. – P. 678-680.
218. Wassarman P. M., Josefowicz W. J. Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence //J. Morphol. – 1978. – V. 156. – №. 2. – P. 209-235.
219. Wassarman P.M., Jovine L., Litscher E.S. A profile of fertilization in mammals //Nature Cell Biol. – 2001. – V. 3. – №. 2. – P. 59-64.
220. Wassarman P. M., and Litscher E. S. Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida //Int. J. Dev. Biol. – 2008. – V. 52. – №. 5-6. – P. 665-676.
221. Watanabe N., Hunt, T., Ikawa Y., and Sagata N. Independent inactivation of MPF and cytosolic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs //Nature. – 1991. – V. 352. – №. 6332. – P. 247-248.
222. Werner M., von Wasielewski R., Komminoth P. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry //Histochemistry and cell biology – 1996. – V. 105. – №. 4. – P. 253-260.
223. Wiekowsk M., Miranda M., and DePamphilis M. L. Regulation of gene expression in preimplantation mouse embryos: effects of the zygotic clock and the first mitosis on promoter and enhancer activities //Dev. Biol. – 1991. – V. 147. – №. 2. – P. 403-414.
224. Wossidlo M., Nakamura T., Lepikhov K., Marques C. J., Zakhartchenko V., Boiani M., Walter J. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is

- linked with epigenetic reprogramming //Nature communications. – 2011. – V. 2. – P. 241.
225. Wright S. J. Sperm Nuclear Activation during Fertilization //Current topics in developmental biology. – 1999. – V. 46. – P. 133-178.
226. Yamaji M., Yoshiyuki S., Kurimoto K., Yabuta Y., Yuasa M., Shigeta M., Yamanaka K., Ohinata Y., Saitou M. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice //Nat. Genet. – 2008. – V. 40. – №. 8. – P. 1016-1022
227. Yamazaki K. and Kato Y. Sites of zona pellucida shedding by mouse embryo other than muran trophectoderm //Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology. – 1989. – V. 249. – №. 3. – P. 347-349.
228. Zatsepina O. V., Voit R., Grummt I., Spring H., Semenov M. V., Trendelenburg M.F. The RNA polymerase I-specific transcription initiation factor UBF is associated with transcriptionally active and inactive ribosomal genes //Chromosoma. – 1993. – V. 102. – №. 9. – P. 599-611.
229. Zatsepina O. V., Bouniol-Baly C., Amirand C., Debey P. Functional and molecular reorganization of the nucleolar apparatus in maturing mouse oocytes //Dev. Biol. – 2000. – V. 223. – №. 2. – P. 354-370.
230. Zatsepina O. V., Baly C., Chebrout M., Debey P. The stepwise assembly of a functional nucleolus in preimplantation mouse embryos involves the Cajal (coiled) body //Dev. Biol. – 2003. – V. 253. – №. 1. – P. 66-83.
231. Zelenin A.V. Acridine orange as a probe for molecular and cell biology. Mason W.T., (Ed.), Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis //Academic Press, London. – 1999. – P. 83–99.
232. Zeng F., Baldwin D.A., Schultz R.M. Transcript profiling during preimplantation mouse development //Dev. Biol. – 2004. – V. 272. – P. 483-496.



233. Zernicka-Goetz M. Cleavage pattern and emerging asymmetry of the mouse embryo //Nature. – 2005. – V. 6. – №. 12. – P. 919-928.
234. Ziyyat A., Rubinstein E., Monier-Gavelle F., Barraud V., Kulski O., Prenant M., Boucheix C., Bomsel M. and Wolf J. P. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin  $\alpha 6\beta 1$ , which are involved in human and mouse gamete fusion //J. Cell Sci. – 2006. – V. 119. – №. 3. – P. 416-424.
235. Zuccotti M., Piccinelli A., Giorgi Rossi P., Garagna S., Redi C.A. Chromatin organization during mouse oocyte growth //Mol. Reprod. Dev. – 1995. – V. 41. – №. 4. – P. 479-485.
236. Zuccotti M., Giorgi Rossi P., Martinez A., Garagna S., Forabosco A., Redi C.A. Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes //Biol. Reprod. – 1998. – V. 58. – №. 3. – P. 700-704.
237. Zuccotti M., Ponce R.H., Boiani M., Guizzardi S., Govoni P., Scandroglio R., Garagna S., Redi C.A. The analysis of chromatin organisation allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst //Zygote. – 2002. – V. 10. – №. 1. – P. 73-78.
238. Zuccotti M., Garagna S., Merico V., Monti M., Redi C.A. Chromatin organisation and nuclear architecture in growing mouse oocytes //Mol. Cell Endocrinol. – 2005. – V. 234. – №. 1-2. – P. 11-17.
239. Zuccotti M., Merico V., Cecconi S., Redi C.A., Garagna S. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? //Hum.Reprod. Update. – 2011.