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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Зацепина Ольга Владимировна**

Официальные оппоненты:

Попенко Владимир Иванович

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Семенова Мария Львовна

доктор биологических наук, профессор кафедры эмбриологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «___» _____ 20__ г. в ___ часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте http://morfolhum.ru//

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного

совета, доктор медицинских наук Михайлова Лилия Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Выяснение механизмов, регулирующих раннее развитие эмбрионов млекопитающих животных и человека - одно из важнейших направлений современной биологии развития. Наиболее распространенными моделями в этих исследованиях являются лабораторные мыши, раннее эмбриональное развитие которых, несмотря на некоторые видовые особенности, повторяет события, происходящие при развитии зародышей человека (Kurilo, 1981; Денисенко и др., 2016). Основным сходством между обоими видами является формирование в пронуклеусах зигот структур, которые получили название предшественников ядрышек, (ПЯ). ПЯ лишены типичных структурных субдоменов ядрышек (фибриллярных центров, плотного фибриллярного компонента и гранулярного компонента) и образованы плотноупакованным материалом неизвестной природы. Ограниченное количество зигот, получаемых от одного животного, и сложность выделения ПЯ в количествах, достаточных для масс-спектрометрического протеомного анализа, делает основным подходом для изучения биохимического состава ПЯ метод иммуноцитохимии с использованием антител к целевым белкам. Вопрос о присутствии РНК в ПЯ также является предметом многолетних исследований.

Ближайшими аналогами ПЯ зигот являются ядрышко-подобные тельца (ЯПТ), описанные в предовуляторных, или GV (от germinal vesicle – зародышевый пузырек, или ядро) ооцитах млекопитающих всех видов, изученных на сегодняшний день. 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 центромерного гетерохроматина (хромоцентры), контактирующие с ЯПТ, и SN-тип (surrounded, SN-ооциты), ЯПТ которых окружены непрерывным слоем гетерохроматина (Debey et al., 1993; Zuccotti et al., 2005; De La Fuente, 2006). В ядре GV ооцита может находиться 1-4 ЯПТ (Дыбан, 1988; Pesty et al., 2007; Rienzi et al., 2012). ЯПТ, подобно ПЯ, лишены типичной трехкомпонентной

организации, образованы однородным фибриллярным материалом, обладают пониженной транскрипционной активностью (Parfenov, Gruzova, 1984; Parfenov et al., 1989). Благодаря этому сходству, ЯПТ можно использовать как модель для сравнения с ПЯ зигот. Известно, что качество ооцита определяет его способность к оплодотворению и последующему эмбриональному развитию. Основным признаком качества ооцита является общая морфология (размер, форма, структурированность цитоплазмы), анализ которой не требует применения инвазивных методов. Однако во многих случаях фенотипические критерии оказываются недостаточными. Выявление дополнительных морфологических признаков, позволяющих оценить способность ооцита к развитию, остается актуальной задачей. Одним из таких признаков может быть анализ положения и поведения ядра в GV ооците, как наиболее крупной и легко различимой органеллы.

Степень разработанности темы исследования. Долгое время предпринимались безуспешные попытки идентифицировать белки ядрышка и РНК в составе ПЯ ранних эмбрионов мыши (Baran et al., 1995; Zatsepina et al., 2003; Kyogoku et al., 2014). 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 иммуноцитохимическими 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. 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 ядрышко-подобные 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 статья, не входящая в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, 6 публикаций – в материалах всероссийских и международных конференций, 1 патент на изобретение.

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 105 странницах 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).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение ооцитов и эмбрионов. Для выполнения работы использовали самок инбредных мышей линии C57Bl/6 в возрасте 5-9 недель и самцов линии C57Bl/6 в возрасте 2-6 месяцев. Животных содержали в виварии ИБХ РАН с неограниченным доступом к воде и пище. Животных приобретали в питомнике ФИБХ РАН (Пущино, Россия) и использовали в соответствии с Правилами (Приказ Министерства Здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”). Для получения эмбрионов, проводили две последовательные внутрибрюшинные инъекции гормонов: ГСЖК (гонадотропин сыворотки жеребой кобылы) в концентрации 7 МЕ/мышь. Через 46-48 часов после введения первого гормона проводили вторую инъекцию – ХГЧ (7 МЕ/мышь, хорионический гонадотропин

человека) и подсаживали самку к самцу. Возраст зародышей отсчитывали от времени инъекции ХГЧ, а оплодотворение определяли по наличию вагинальной пробки. Выведение самок из эксперимента проводили путем цервикальной дислокации шейных позвонков. Эмбрионы выделяли из яйцеводов в среду М2 через 19-27 ч (стадия зиготы), 44-49 ч (стадия двух бластомеров); 59-60 ч (стадия четырех бластомеров) после введения ХГЧ. GV ооциты получали после инъекций 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 препаровальными иглами в среде М2 с добавлением дбцАМФ (дибутирил-циклический аденозинмонофосфат, 100 мкг/мл) для предотвращения спонтанной активации ооцитов. Получали 15-20 зигот от каждой самки.

Прижизненные наблюдения за ЯПТ в ооцитах и ПЯ в зиготах. После выделения, зиготы и ооциты окрашивали витальным красителем Hoechst 33342 (в течение 5-7 мин, 0.1 мкг/мл, в среде М2 с добавлением дбцАМФ в случае GV ооцитов). Для культивирования эмбрионов использовали среду EmbryoMax® KSOM, для культивирования GV ооцитов - среду α-MEM (Life Technologies) с добавлением 5% (по объему) инактивированной фетальной бычьей сыворотки, 4 мМ L-глутамина, 5 мМ таурина и 146 мкг/мл пирувата натрия. Прижизненную видеосъёмку осуществляли в течение 1-24 ч с частотой 1 кадр в 10-30 минут при температуре 37ºС и в увлажнённой атмосфере с концентрацией CO_2 5%, с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver (Carl Zeiss, Германия) и CCD камеры Hamamatsu (Hamamatsu, Япония), используя объектив EC Plan-Neofluar 40x (числовая апертура 0.6)/DIC. Всего было проанализировано 25 зигот и 27 GV ооцитов мыши.

Окрашивание эмбрионов мыши пиронином Y и ФИТЦ. Эмбрионы фиксировали 3%-ным параформальдегидом (ПФА) на фосфатно-солевом буфере (ФСБ; 0,14 М NaCl, 2,7 мМKCl, 8,1 мМ Na_2HPO_4, 1,5 мМ KH_2PO_4, pH 7.2-7.4) в течение 30 мин, отмывали в ФСБ (3×10 мин) и обрабатывали 0.2% Тритоном Х-100 в ФСБ 20 мин (при 4ºС). После отмывки в ФСБ, клетки

переносили в смесь 10 мкг/мл пиронина Y (ПY) и 1 мкг/мл ФИТЦ (флуоресцеин-5’-изотиоционат) в ФСБ на 2 часа при комнатной температуре в темноте. После отмывки в ФСБ эмбрионы окрашивания DAPI в конечной концентрации 1 мкг/мл в течение 15 мин и заключали в DAPI/Antifade. Для каждой стадии развития было проанализировано более 15 эмбрионов.

Иммуноцитохимическое выявление ядрышковых белков в зародышах мыши. Выделенные эмбрионы фиксировали 3%-ным ПФА в ФСБ 15 мин при комнатной температуре, отмывали в ФСБ и обрабатывали 0.2%-ным раствором Тритона Х–100 20 мин. После отмывки от детергента эмбрионы 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 или 30 мин, соответственно, при 22°С. Эмбрионы контрольной группы выдерживали тоже время в ФСБ без протеиназы К. Затем зародыши обеих групп дополнительно фиксировали 3%-ным ПФА в ФСБ 30 мин, отмывали в ФСБ и обрабатывали 0.2%-ным раствором Тритона Х–100 20 мин. После отмывки в ФСБ клетки инкубировали с первичными антителами к белкам ядрышка (UBF (upstream binding factor), фибрилларин, NPM1, нуклеолин, RPL26, RPS10) 45-60 мин, отмывали в ФСБ и переносили в соответствующие вторичные антитела на 45-60 мин. После инкубации с антителами клетки промывали в ФСБ, окрашивали DAPI или Hoechst 33258 в конечной концентрации 1 мкг/мл в течение 15 мин в темноте и заключали в среду DAPI/Antifade. В альтернативном случае**,** зародыши фиксировали 70%-ным этанолом в ФСБ 20-25 мин, отмывали ФСБ и обрабатывали 0.2%-ным раствором Тритона Х–100 10 мин. Более 20 эмбрионов было использовано для каждого первичного антитела.

Флуоресцентная гибридизация *in situ.* В работе использовали олигонуклеотидные зонды, меченные с 5'-конца флуорохромом Cy3 или FAM, и специфически выявляющие следующие участки 47S пре-рРНК мыши (рис. 1): лидерный участок 5'-внешнего транскрибируемого спейсера (5'ETS), первый (ITS1) и второй (ITS2) внутренние транскрибируемые спейсеры, 18S и 28S

рРНК. Концентрация зондов в стоковых растворах составляла около 2 мкг/мкл. Для того чтобы минимизировать артефакты фиксации, использовали два

Рис. 1. Структура первичного транскрипта мыши. 18S, 5.8 S, 28S –зрелые рРНК. Зелеными штрихами отмечено положение олигонуклеотидных проб к 5'ETS, ITS1, ITS1, 18S и 28S рРНК. 01, 02, A0' – сайты расщепления. В скобках указаны положения основных участков в составе 47S пре-рРНК.

подхода: (1) эмбрионы фиксировали 3%-ным ПФА, как описано в разделе, посвященном иммуноцитохимическому выявлению белков, и (2) эмбрионы фиксировали 70%-ным этиловым спиртом. В обоих случаях, клетки отмывали в ФСБ, двукратном цитратно-натриевым буфере (2×SSC, 0.3 M NaCl, 0.03 M $Na_3C_6H_5O_7$, pH 7.0; 10 мин) и помещали в гибридизационную смесь, содержащую 50% деионизованного формамида (Merck, Германия), 10% декстрансульфата (Lobachemie, Fischamen», Австрия), 5% 20×SSC и 8 нг/мкл олигонуклеотидных зондов («ДНК-синтез», Россия). Гибридизацию проводили во влажной камере в течение 16-18 ч при 42° С. После этого клетки отмывали 50%-ным формамидом (Panreac, Испания) в 2×SSC при 42°C, затем 2×SSC при 42° С и 2×SSC при комнатной температуре. Эмбрионы заключали в DAPI/Antifade.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Все полученные препараты анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM510 DuoScan META (Carl Zeiss, Германия), снабженного аргоновым лазером (мощность 30 мВт), твердотельным лазером с диодной накачкой (DPSS 561-10, мощность 15 мВт), диодным лазером (405-450, мощность 50 мВт). Для съемки использовали иммерсионный объектив PlanApochromat ×63/ЧА (числовая апертура) 1,4. Флуоресценцию в зеленом канале возбуждали и регистрировали при 488 нм и 505-550 нм, соответственно;

флуоресценцию в красном канале – при 561 нм/575 нм; в синем канале – при 405 нм/450 нм.

Определение положения ядра в GV ооцитах мыши. Определение положения ядра относительно центра ооцита производили способом, основанным на вычислениях коэффициента ρ, который отражает расстояние между центрами ооцита (оо) и ядра (я) и рассчитывается по формуле $\rho=\frac{d(Cя-Coo)}{d(Roo-Rя)}$, где d (Ся-Соо) - расстояние между центрами (С) ядра и ооцита (в мкм), а $d(Roo - Rя)$ - разность средних радиусов (R, в мкм) ооцита и ядра. При $0 < \rho \leq 0.5$ ядро считают центрально-расположенным, при $0.5 < \rho \leq 1$ - периферическим (рис. 2; Levi et al., 2013). Определение средних радиусов, а также центров ядер и ооцитов производили с использованием программных обеспечений Image J1.47 (NIH, США) и LSM Image Browser (Carl Zeiss, США).

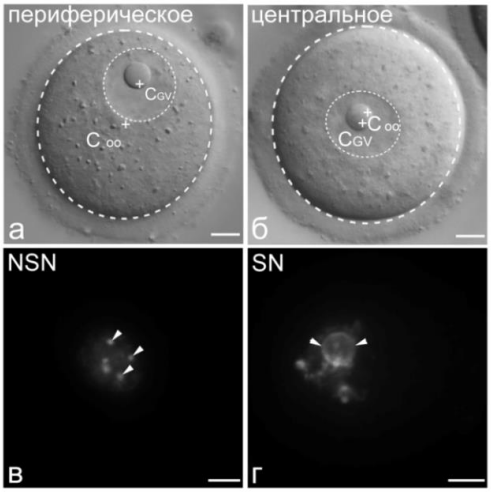

Рис. 2. Классификация GV ооцитов мыши. а, б - по положению ядра на основе коэффициента ρ. в, г - по конфигурации хроматина. Пунктирные линии - контуры ооцита и ядра; кресты - центры ооцита и ядра (C_{oo} и C_{GV}). Головки стрелок – хромоцентры (в, NSN) и кольцо гетерохроматина (г, SN). а, б – DIC по Номарскому. в, г - Hoechst 33342. Масштабная линия, 10 мкм

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Цитохимическое выявление РНК и белков в ооцитах и зародышах.

После окрашивания зрелых MII ооцитов пиронином Y (ПY) и ФИТЦ их цитоплазма окрашивалась насыщенно, за исключением области хромосом (не иллюстрировано), что соответствует данным литературы о переносе белков и РНК, синтезированных яйцеклеткой, в эмбрионы (Hamatani et al., 2004; Ihara et al., 2011). В зиготе (рис. 3а-е) ПЯ также ярко окрашивались ФИТЦ, однако, окраска ПY в них практически отсутствовала, что говорит о наличии в них

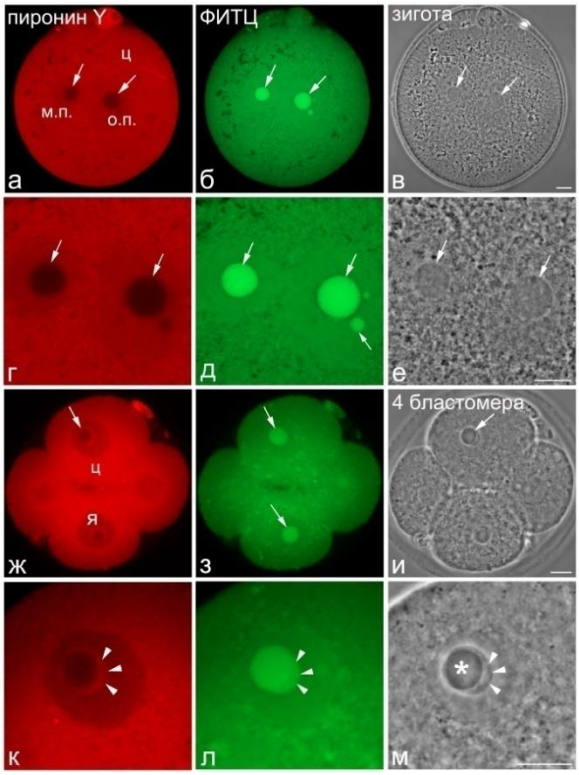

Рис. 3. Окрашивание эмбрионов мыши в зиготе (а-е) и на стадии 4-х бластомеров (ж-м) пиронином Y (а, г, ж, к) и ФИТЦ (б, д, з, л). в, е, и, м - фазово-контрастная микроскопия; ц – цитоплазма; р.т. – полярные тельца; м. п. – материнский пронуклеус; о. п. – отцовский пронуклеус. Стрелки указывают на ПЯ (а-и); головки стрелок указывают на периферию ПЯ (к-м). Звездочкой на (м) обозначена ПY-отрицательная область ПЯ.

Масштабная линия, 10 мкм.

только следовых количеств РНК (рис. 3а, б, г, д). Начиная со стадии 4-х клеточного зародыша, на периферии ПЯ отчетливо выявлялся ПY-позитивный ободок, свидетельствующий о начале накопления там РНК, который может соответствовать новосинтезированной рРНК (рис. 3ж, к).

Иммуноцитохимическое выявление ядрышковых белков в преимплантационных эмбрионах мыши. Принимая во внимание, что ПЯ в зиготах ступенчато трансформируются в нормальные трехкомпонентные ядрышки к поздним стадиям преимплантационного развития зародышей, мы, в первую очередь, попытались выявить в их составе ядрышковые белки, такие как UBF (транскрипционный фактор РНК полимеразы I), фибрилларин (фактор раннего процессинга рРНК, основная ядрышковая метилтрансфераза), NPM1/B23 (мультифункциональный белок, участвует в поздних этапах биогенеза рибосом), нуклеолин/C23 (мультифункциональный белок, участвует в поздних этапах биогенеза рибосом), RPL26 и RPS10 (белки большой и малой субъединиц рибосомы, соответственно). Однако в условиях стандартной фиксации эмбрионов параформальдегидом ни один из этих белков в ПЯ нам выявить не удалось, что соответствует данным литературы (Baran et al., 1995;

Zatsepina et al., 2003; Romanova et al., 2006b). Тем не менее, с помощью метода демаскирования антигенов путем обработки протеиназой К зародышей, фиксированных параформальдегидом, мы показали, что ПЯ зигот мыши содержат некоторые ядрышковые белки. К таким белкам относят фибрилларин (рис. 4а, в), а также многофункциональные белки NPM1/B23/нуклеофозмин (рис. 4г, е) и нуклеолин/C23 (рис. 4ж), которые участвуют в разных стадиях биогенеза рибосом, от транскрипции рДНК до сборки рибосомных частиц (Boisvert et al., 2007; Preti et al., 2013). Однако ни при каких условиях фиксации или пост-фиксационной обработки нам не удалось выявить в составе ПЯ фактора транскрипции РНК полимеразы I, белка UBF (рис. 4к) и рибосомных белов RPL26 (рис. 4л) и RPS10 (не иллюстрировано). Мы показали, что ПЯ в одном эмбрионе могут отличаться по белковому составу: в некоторых ПЯ, определенных с помощью DAPI, отсутствовал белок фибрилларин (рис. 4а, ПЯ отмечены звездочками).

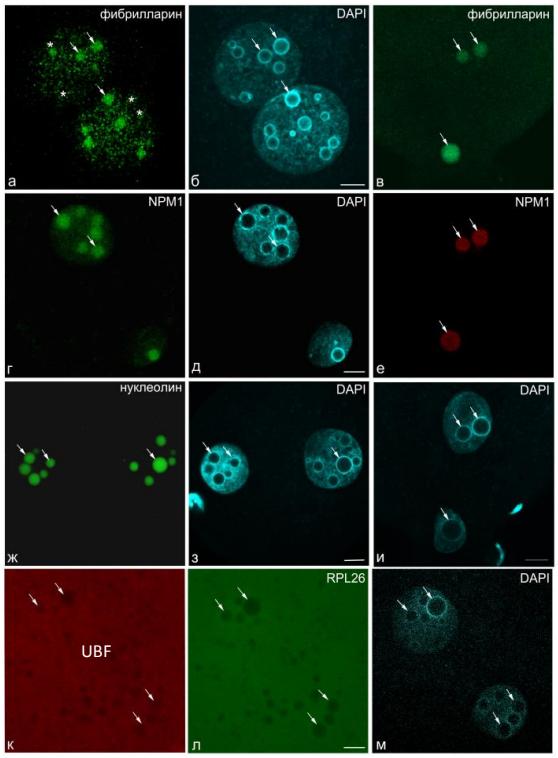

Рис. 4. Иммуноцитохимическое выявление белков фибрилларина (а, в), NPM1 (г, е), нуклеолина (ж), UBF (к) и RPL26 (л) в ранней (а, б, г, д, ж, з, к-м) и поздней (в, е, и) зиготах мыши после фиксации 3%-ным раствором ПФА и обработки протеиназой К. (б, д, з, и, м) - окрашивание хроматина красителем DAPI.

Масштабная линия, 10 мкм.

Выявление рРНК в эмбрионах мыши методом FISH. FISH-сигналы нам удалось выявить в составе ПЯ только после фиксации зародышей 70%-ным спиртом. При этом в зиготе выявляли только 28S рРНК (рис. 6б, в), тогда как

другие зонды к 47S пре-рРНК (рис. 5) с ПЯ зигот не гибридизовались. Обращало на себя внимание, что не все ПЯ содержат 28 рРНК: в ПЯ меньших размеров (2-4 мкм), которые можно выявить с помощью антител к нуклеолину (рис. 6а) FISH-сигналы очень слабые или отсутствуют вовсе (рис. 6а-в). В случае поздних 2-х клеточных и 4-х клеточных зародышей, способных к синтезу рРНК (Zatsepina et al., 2003), FISH-сигналы локализуются преимущественно на периферии ПЯ. В многоклеточных (более 4 бластомеров) эмбрионах все использованные гибридизационные зонды выявляют рРНК во внутренней части ПЯ (рис. 6к, л). Примечательно, что возобновление синтеза рРНК, позволяет выявлять ее в зафиксированных параформальдегидом

Рис. 5

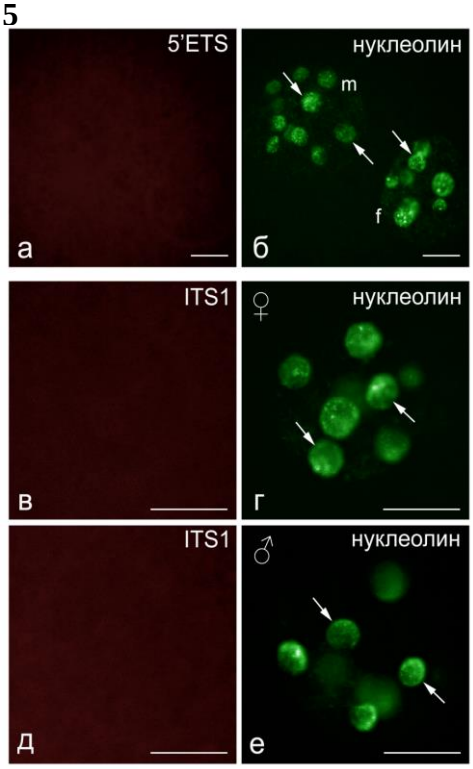

Рис. 6.

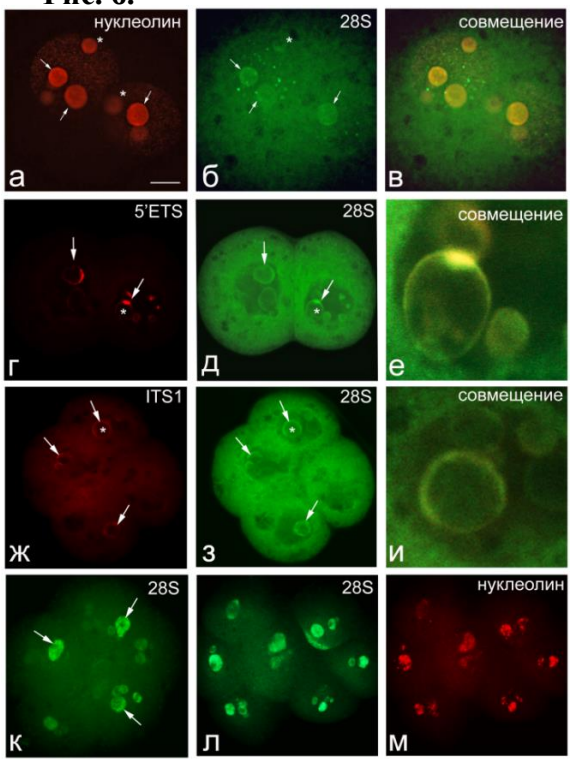

Рис. 5. Флуоресцентная гибридизация in situ зигот мыши, после фиксации 70 % этанолом, с олигонуклеотидными зондами к 5'ETS (а) и ITS1 (в, д). б, г, е – нуклеолин.

Рис. 6. Флуоресцентная гибридизация *in situ* ранних зигот (а-в), поздних 2-х клеточных (г-е), 4-х клеточных (ж-и), 6-ти клеточных (к) и 8-ми клеточных (л, м) эмбрионов мыши, после фиксации 70 % этанолом (а-в, к-м) или 3%-ным ПФА (г-и), с олигонуклеотидными зондами к 28 SpРНК (б, в, д, е, з, и-л), 5'ETS (г) и ITS1 (ж, и). а, м – нуклеолин.

Стрелки – ПЯ. Масштабные линии, 10 мкм.

зародышах (рис. 6г-м), что соответствует условиям выявления рРНК с помощью FISH в ядрышках соматических клеток (Dundr et al., 2002).

Прижизненные наблюдения за ПЯ в зиготах и ЯПТ в GV ооцитах мыши. Цейтраферная видеосъемка эмбрионов на стадии средней зиготы (22 ч пост-ХГЧ) была предпринята с тем, чтобы выяснить, способны ли ПЯ сливаться, подобно тому, как это происходит с ядрышками соматических клеток после митоза (Savino et al., 2001) или с амплифицированными ядрышками ооцитов амфибий (Brangwynne et al., 2011). Наши наблюдения показали, что уже через 20 минут после начала видеосъемки некоторые ПЯ (рис. 7б) сближаются, располагаются максимально близко друг к другу, а затем объединяются, образуя ПЯ большего размера (рис. 7в, г). Таким образом, слияние ПЯ представляет довольно быстрый процесс, завершающийся в течение нескольких минут, хотя и более протяженный, по сравнению с соматическими и амплифицированными ядрышками, которые объединяются

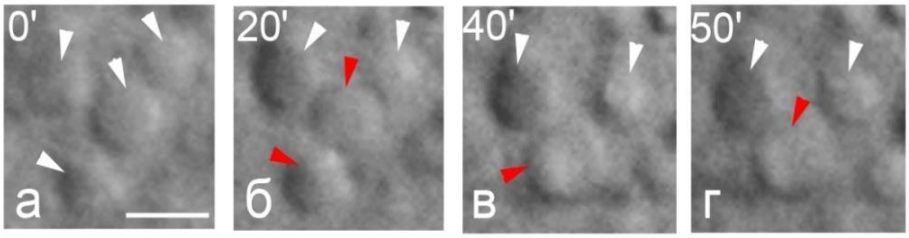

Рис. 7. Покадровая визуализация динамики движения ПЯ в мужском пронуклеусе одноклеточных эмбрионов мыши. (а – г) – дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому (DIC); Красные головки стрелок - объединяющиеся ПЯ. Масштабная линия, 5 мкм

практически мгновенно. Объединение отдельных ПЯ, по-видимому, является основной причиной уменьшения их числа в зиготе. Известно, что в начале зиготы в пронуклеусах образуется до 10 ПЯ, тогда как к концу стадии зиготы их количество уменьшается до одного-двух на ядро (Fulka et al., 2015). В связи с малым размером ПЯ, чувствительностью зародышей к частой видеосъемке и воздействию флуоресцентных красителей (Tsunoda et al., 1988), чрезвычайно сложно получить иллюстрацию морфологических изменений ПЯ в момент объединения.

На следующем этапе мы сравнили динамические характеристики ПЯ с их ближайшими аналогами - ЯПТ, которые присутствуют в GV ооцитах. Для ответа на этот вопрос мы исследовали возможность слияния ЯПТ в многоядрышковых ооцитах, т.е. ооцитах, которые содержат более одного ЯПТ. Доля таких ооцитов у мышей C57Bl/6 может достигать 40% (Шишова и др., 2015). На рис. 8 показано ядро GV ооцита с 3 ЯПТ. Исходя из общей конфигурации хроматина, ооцит относится к NSN-типу в начале съемки, так как вокруг ЯПТ присутствуют хромоцентры и нет кольца конденсированного хроматина (рис. 8а). Признаки слияния ЯПТ в данном ооците проявляются в процессе длительной видеосъемки, через 680-690 мин (рис. 8 д, е) после ее начала. Видно, что в конце эксперимента в ядре остается только два ЯПТ (8з). Удивительным является тот факт, что слияние ядрышек сопровождается изменением общей конфигурации хроматина с NSN-типа (в начале; рис. 8а)

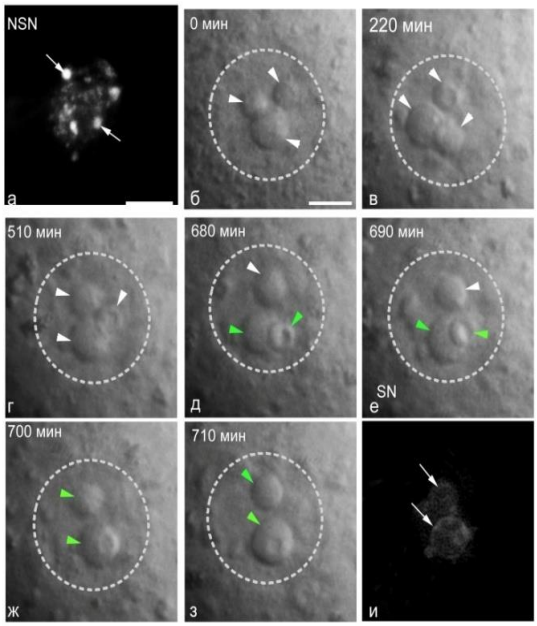

Рис. 8. Покадровая визуализация GV ооцита NSN типа с тремя ЯПТ.

(а, и) –Hoechst 33342; (б – з) – DIC по Номарскому. Контуры - граница ядра ооцита. Стрелки - хромоцентры (а), кольцо гетерохроматина (и); Головки стрелок – ЯПТ; Зеленые головки стрелок – сливающиеся ЯПТ.

Масштабные линии, 10 мкм.

в SN-тип с отчетливо выраженным кольцом хроматина вокруг обоих ПЯ (в конце; рис. 8и). Механизмы этих изменений остаются неизвестными. Более того возможность перехода конфигурации хроматина NSN-типа в SN-тип *in vitro* в литературе отрицается (Belli et al., 2014).

Сравнительная характеристика динамики движения ядрышко-подобных телец и ядер в GV ооцитах мыши. Расчет средних скоростей движения ПЯ зигот и ЯПТ GV ооцитов в течение 1 часа видео наблюдений,

показал, что они (скорости) совпадают в пределах погрешностей: 0,15±0,02 мкм/ мин для ПЯ и 0,14±0,02 мкм/мин для ЯПТ в GV ооцитах NSN-типа. Для того чтобы дополнительно охарактеризовать динамику и скорость движения ЯПТ, мы провели анализ движения другой органеллы – ядра GV ооцита, которое хорошо выявляется во всех GV ооцитах. Для анализа выбирали ооциты исходя из общей конфигурации хроматина и начального положения ядра (рис. 2). Всего было проанализировано 307 ооцитов. Показали, что характер движения центральных ядер не зависит от конфигурации хроматина: как в ооцитах NSN-типа, так и в ооцитах SN-типа "центральные" ядра совершают небольшие перемещения в центре, которые продолжаются вплоть до распада ядра. Однако судьба ооцитов с ядром на периферии прямо зависит от типа хроматина. Так, ядра с периферии ооцитов SN-типа перемещаются в центральную область, где совершают колебательные движения, описанные выше. "Периферические" ядра ооцитов NSN-типа, напротив, совершают лишь незначительные перемещения на периферии ооцита, полностью останавливаясь примерно через один час после начала наблюдений и гибнут через 2,5-3 часа. Таким образом, характер движения ядра может быть дополнительным признаком качества GV ооцита, особенно в тех случаях, когда его ядро на находится на периферии. По совокупным признакам, 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±0,01 мкм/мин, что значительно превышает скорость движения ЯПТ SN-ооцитов (0,14±0,01 мкм/мин). Более низкую скорость движения ПЯ и ЯПТ можно объяснить менее развитой системой актиновых филаментов внутри ядра по сравнению с цитоплазмой.

Заключение. Методы, апробированные для выявления белков и РНК в составе ПЯ мыши, могут быть использованы для уточнения состава ПЯ в эмбрионах других видов млекопитающих, включая человека. ПЯ зигот мыши служат хранилищем унаследованных от GV ооцитов "спящих" ядрышковых

белков: фибрилларина, NPM1/B23 и C23/нуклеолина, а также 28S рРНК. Как ПЯ зигот, так и ЯПТ GV ооцитов мыши, способны к слиянию. В течение длительной видеосъемки, показан переход NSN-конфигурации хроматина в SN-тип *in vitro* в составе многоядрышковых GV ооцитов. Методом цейтраферной видеосъемки выявлен дополнительный критерий компетентности GV ооцитов мыши к созреванию, который заключается в непрерывной подвижности ядра вплоть до его распада. Этот признак рекомендован для использования в качестве дополнительного критерия мейотической компетентности ооцитов человека в клиниках репродуктивной медицины.

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 работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах, входящих в Перечень РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук:

1. Lavrentyeva E., Shishova K., Kagarlitsky G., Zatsepina O. Localisation of RNAs and proteins in nucleolar precursor bodies of early mouse embryos //Reproduction, Fertility and Development. – 2017. – V. 29. – №. 3. – P. 509-520. doi: 10.1071/RD15200.
2. Шишова К.В.*, Лаврентьева Е.А.*, Хамидуллина А.И., Зацепина О.В. Положение ядра в предовуляторных ооцитах мыши с разной

конфигурацией хроматина //Онтогенез. – 2016. – Т. 47. – №. 6. – С. 331-338.

3. Лаврентьева Е.А., Шишова К.В., Зацепина О. В. Различия в характере движения ядер GV ооцитов мыши с разной конфигурацией хроматина //Известия РАН. Серия биологическая. – 2019. – №. 4. – С. 1-10. doi: 10.1134/S000233291904009X

Статьи в рецензируемых журналах, не входящих в Перечень РФ:

1. Lavrentyeva E.A., Shishova K.V., Mikoyan V.S., Stanishevsky Y.M., Zatsepina O.V. Immunolabeling of “Nucleoli” in Mouse Fully-Grown Oocytes and One-Cell Embryos is Dependent on Upstream Molecular Fixatives //International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB). – 2017. – V. 5. – №. 7. – P. 69-78. doi: 10.20431/2349-0365.0507010

Материалах всероссийских и международных конференций:

1. Е.А. Лаврентьева, О.В. Зацепина. Динамика ядер GV ооцитов мыши с различной конфигурацией хроматина //Материалы XXX зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 12-15 февраля 2018 г
2. Lavrentyeva E.A., Shishova K.V., Zatsepina O.V. Nucleolus-like bodies of fully-grown oocytes and nucleolar precursor bodies of zygotic embryos are not full biochemical analogs //12th International Congress of Cell Biology, Prague Congress Centre, Czech Republic, July 21-25 2016.
3. Zatsepina Olga V., Lavrentyeva Elena A., Kseniya V.Shishova. Comperative immunocytochemical analysis of nucleolus-like bodies of fully-grown oocytes and nucleolar precursor bodies of zygotic embryos //International Conference on Histochemistry and Cell Biology, Phoenix, Arizona, USA, September 14-15 2016.

4. Лаврентьева Е.А., Шишова К.В., Зацепина О.В. Простой метод высокочувствительного выявления внутриклеточных белков с помощью флуоресцеин-5-изотиоцианата //Материалы XXVI зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", С. 50. 10-14 февраля 2014 г.
5. Е. А. Лаврентьева, К. В. Шишова, О. В. Зацепина. Анализ состава предшественников ядрышек в ранних эмбрионах мыши с помощью РНК- и белокспецифичных флуорохромных красителей //Материалы XVII Всероссийского симпозиума «Структура и функции клеточного ядра» //Цитология. – 2014. – Т 56. – №. 9 – С. 672-672.
6. O. Zatsepina, E. Lavrentyeva, K. Shishova. Molecular composition of the nucleolus-associated bodies in mouse fully-grown oocytes: extended cytochemical, immunocytochemical and FISH analysis of their proteins and RNAs //FEBS Journal Special Issue: FEBS EMBO 2014 Conference - Paris, 2014. – V 281 – Suppl. s1 – P. 330.

Патент на изобретение:

1. Шишова К.В., Лаврентьева Е.А., Зацепина О.В. «Способ выявления белков в разных типах клеток млекопитающих и человека с помощью флуоресцеин-5-изотиоционата на микроскопическом уровне». Патент на изобретение 2547594 от 12 марта 2015 г.

Соискатель: Лаврентьева Е.А.