

ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ ВЫСОКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

Том 2



**Сборник статей
Научные редакторы
Кудинов А.П., Кудинов И.А, Крылов Б.В.**

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2015**

Боголюбова И.О.*, **Чеблов А.А.****, **Боголюбов Д.С.***
**ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ХРОМАТИН-
РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО БЕЛКА ATRX В КАРИОСФЕРЕ
И ЕЕ ДЕРИВАТАХ**

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
**Санкт-Петербургский государственный политехнический университет

Bogolyubova I.O.*, **Cheblov A.A.****, **Bogolyubov D.S.***
**IMMUNOCYTOCHEMICAL REVEALING OF A CHROMATIN
REMODELING PROTEIN ATRX IN THE KARYOSPHERE
AND ITS DERIVATES**

*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia
**Saint-Petersburg State Polytechnical University, Russia

Реферат: Впервые представлены данные по иммунофлуоресцентной локализации белка ATRX в связи с гетерохроматином (кариосферой) в ооцитах насекомого и перинуклеолярным гетерохроматином (аналогом кариосферы) на начальных стадиях раннего эмбриогенеза мыши.

Abstract: Data on immunofluorescent localization of ATRX protein in connection with heterochromatin (karyosphere) in oocytes of an insect and perinucleolar heterochromatin analogous to the karyosphere at different stages of early embryogenesis of the mouse are presented for the first time.

Структурные и функциональные перестройки хроматина, которые приводят к его переходу в состояние конденсированного гетерохроматина, представляют собой один из важнейших механизмов регуляции экспрессии генов. В поздних ооцитах многих животных наблюдается значительная конденсация хроматина, что коррелирует со снижением транскрипционной активности и приводит к формированию особого ядерного компартмента — кариосферы, или кариосомы [1]. Кариосфера формируется за счет объединения всех хромосом ооцита в ограниченном пространстве крупного ядра. Несмотря на более чем 100-летнюю историю изучения, молекулярный состав и функции кариосферы остаются практически не исследованными. В ядрах соматических клеток и ооцитов млекопитающих процессы образования кариосферы связаны с хроматин-ремоделирующими белками, в том числе АТФ-зависимой геликазой ATRX (*alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*) — основным фактором ремоделирования хроматина [2, 3]. Данные по локализации ATRX в составе кариосферы ооцитов беспозвоночных и его потенциальной роли в ремоделировании хроматина при формировании кариосферы отсутствуют. Малоизученной в данном плане остается и другая экспериментальная модель — ядра доимплантационных эмбрионов мыши, в которых наблюдаются заметные гетерохроматиновые области вокруг особых ядерных доменов (проядрышек, 'nucleolus precursor bodies'), специфических для ранних стадий дробления млекопитающих [4]. Кольцевидные участки перинуклеолярного гетерохроматина в ядрах эмбрионов морфологически напоминают кариосферу

в ядрах ооцитов этих животных и, возможно, представляют ее структурно-функциональный аналог.

В нашей работе впервые получены предварительные иммуоцитохимические данные по локализации белка ATRX в связи с конденсированным хроматином (кариосферой) в ооцитах лабораторного насекомого *Tenebrio molitor*, а также в связи с перинуклеолярным гетерохроматином в ядрах ранних эмбрионов мыши. Исследованные стадии эмбриогенеза (ранняя зигота, до начала активации эмбрионального генома) и поздняя 2-клеточная стадия (после завершения процессов его активации) принципиально различаются по уровню транскрипционной активности ядер [5] и характеру ядерного распределения молекулярных факторов транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II [6].

В ядрах ооцитов насекомого *T. molitor* антитела к белку ATRX специфически метят область кариосферы (рис. 1), при этом наблюдаются отдельные мелкие фокусы более интенсивной флуоресценции в связи с блоками конденсированного хроматина.



Рис. 1. Фрагмент изолированного ядра вителлогенного ооцита *Tenebrio molitor*; область расположения кариосферы указана стрелкой; микроскопия по Номарскому (DIC), результат обработки антителами (ATR) и окрашивания DAPI. Масштабный отрезок = 20 мкм.

Исследования на эмбриональном материале мыши позволили представить сравнительную картину динамики локализации ATRX в связи с гетерохроматином на транскрипционно инертной стадии ранней зиготы и в транскрипционно активных ядрах бластомеров на поздней 2-клеточной стадии. На стадии ранней зиготы в эмбрионах мыши белок ATRX выявляется как в мужском, так и в женском пронуклеусе, однако мечение носит диффузный характер (рис. 2А). В составе гетерохроматина, окружающего проядрышки, ATRX на этой стадии не обнаруживается. На поздней двухклеточной стадии кроме диффузного мечения нуклеоплазмы наблюдаются области локализации ATRX на периферии проядрышек (рис. 2Б), где ATRX солокализован с ДНК. Подобные области солокализации выявляются не по всему периметру кольцевого гетерохроматина, окружающего проядрышко, а только на его отдельных участках. Интересно, что подобные области солокализации характерны не для всей популяции проядрышек, а лишь для некоторых из них. Помимо этого зоны интенсивного мечения ATRX выявляются также в некоторых областях периферического гетерохроматина.

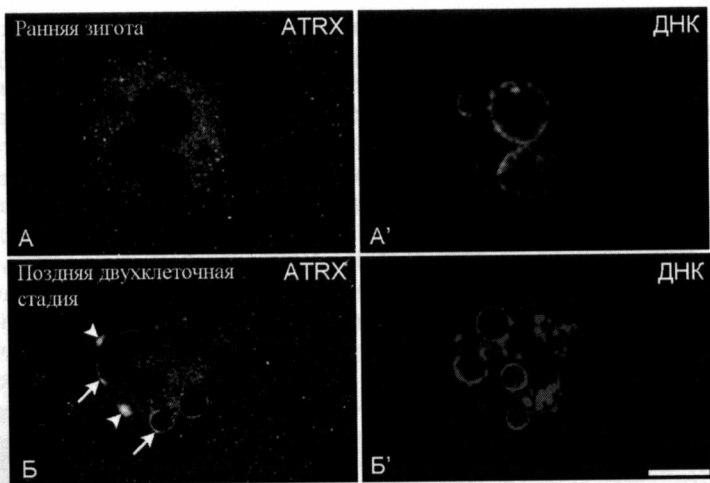


Рис. 2. Иммунофлуоресцентная локализация белка ATRX в ядрах ранних эмбрионов мыши на стадии ранней зиготы (А) и на поздней двухклеточной стадии (Б). А'—Б' – распределение хроматина на тех же оптических срезах. В ядрах поздних двухклеточных эмбрионов выявляются области повышенной концентрации ATRX на периферии проядрышек (стрелки), а также в отдельных гетерохроматиновых блоках (головки стрелок).

Масштабный отрезок = 10 мкм.

Таким образом, в процессе становления транскрипционной активности ядер в эмбриогенезе мыши происходит выраженное перераспределение белка ATRX, которое включает в себя его накопление в отдельных участках перинуклеолярного хроматина, рассматриваемого нами как дериват особой (так называемой «инвертированной») кариосферы млекопитающих. В составе типичной кариосферы ооцитов *Tenebrio* белок ATRX также локализуется в области кариосферы, а дискретные локусы его наибольшей концентрации, по-видимому, соответствуют участкам расположения центромерного и (или) теломерного гетерохроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-04-01857) и Программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Литература

1. Gruzova M.N., Parfenov V.N. Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis // *Int Rev Cytol.* – 1993. – Vol. 144. – p. 1–52
2. De La Fuente R., Baumann C., Viveiros M.M. Chromatin structure and ATRX function in mouse oocytes // *Results and Problems in Cell Differentiation.* – 2012. – Vol. 55. – p. 45-68.
3. Ratnakumar K., Bernstein E. ATRX. The case of a peculiar chromatin remodeler. // *Epigenetics.* – 2013. – Vol. 8, 1. – p. 3–9.
4. Fléchon J.E., Kopečný V. The nature of the 'nucleolus precursor body' in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical,

immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. *Zygote*. – 1998. – Vol. 6. – p. 183-191.

5. Minami N., Suzuki T., Tsukamoto S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals // *J Reprod Dev*. – 2007. – Vol. 53. – p. 707–715.

6. Bogolyubova I.O., Bogolyubov D.S. Nuclear distribution of RNA polymerase II and mRNA processing machinery in early mammalian embryos // *BioMed Research Int*. – 2014. – 681596.

Тютина К.В.*, Боголюбова И.О., Скопичев В.Г.*, Боголюбов Д.С.**
ВЛИЯНИЕ ОКСИТОЦИНА НА ВНУТРИЯДЕРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ
ХРОМАТИН-РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО БЕЛКА ATRX В СЕКРЕТОРНЫХ
КЛЕТКАХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛАКТИРУЮЩИХ МЫШЕЙ**

* Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины
** Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Tyutina K.V.*, Bogolyubova I.O., Skopichev V.G.*, Bogolyubov D.S.**
AN EFFECT OF OXYTOCIN ON THE NUCLEAR DISTRIBUTION OF
CHROMATIN REMODELING PROTEIN ATRX IN THE SECRETORY
CELLS OF MAMMARY GLANDS OF LACTATING MICE**

* Saint Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, Russia
** Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

Реферат: Впервые представлены данные о внутриядерном перераспределении хроматин-ремоделирующего белка ATRX в клетках секреторного эпителия лактирующих мышей при действии окситоцина. Показано, что окситоцин вызывает быстрое перераспределение белка ATRX, которое сводится, в первую очередь, к его выходу из областей гетерохроматина и увеличению его концентрации в нуклеоплазме.

Abstract: Data on oxytocin-effected nuclear redistribution of chromatin remodeling protein ATRX in the cells of the secretory epithelium of lactating mice are presented for the first time. We showed that oxytocin causes fast redistribution of ATRX. This mainly involves ATRX exit from heterochromatin areas followed by the increase of ATRX concentration in the nucleoplasm.

Функциональная роль окситоцина в регуляции функциональной активности молочной железы известна уже давно, однако традиционно полагали, что основная роль окситоцина заключается в стимуляции сокращения миоэпителиальных клеток и, соответственно, активации процессов выведения уже синтезированного молока [1, 2]. Однако в последние годы накапливаются прямые доказательства влияния окситоцина не только на миоэпителиальные, но и на секреторные клетки молочной железы. Так было показано, что добавление окситоцина к фрагментам молочной железы кролика *in vitro* приводило к увеличению секреторной активности секреторных клеток путем увеличения темпов внутриклеточного транспорта вновь синтезированных белков [3].