

Санкт - Петербургский Государственный университет

Беляев Антон Владимирович

Функциональная морфология ядра в растущих ооцитах красноухой черепахи

Trachemys scripta

Выпускная квалификационная работа по основной образовательной программе
магистратуры

Научный руководитель:

д.б.н. профессор Гагинская Елена Романовна

Работа выполнена в лаборатории

Структуры и функции хромосом СПбГУ

(зав. лаб. - д.б.н. проф. Гагинская Елена Романовна)

Рецензент:

к.б.н. Почукалина Галина Николаевна

ст. научн. сотр. Институт цитологии РАН

Санкт-Петербург

2018

<u>Оглавление</u>	2
Список сокращений	4
Введение	5
1. Обзор литературы	7
1.1 Хромосомы типа ламповых щёток	7
1.2 Внутриядерные тельца: Ядрышки	11
1.3 Другие внутриядерные тельца	15
1.4 Кариотип <i>Trachemys scripta</i>	16
1.5 Оогенез <i>Trachemys scripta</i>	17
1.6 Биоинформатический обзор IGS	19
2. Материал и методы	22
2.1 Объект исследования	22
2.2 Фиксация тканей	22
2.3 Замораживание образцов	22
2.4 Приготовление криосрезов и отбор препаратов для исследования	22
2.5 Предподготовка или постфиксация препаратов для FISH или ИГХ	23
2.6 Зонд к последовательности 5' ETS рибосомного кластера	23
2.7 FISH на криосрезах яичников	24
2.8 Детекция сигнала FISH с помощью ИГХ	25
2.9 Иммуногистохимия	26
2.10 Используемые антитела	26
2.11 Красители и флуоресцентные метки	27
2.12 Препараты изолированных из ооцитов ядер и хромосом типа ЛЦ	27
2.13 Окраска изолированных ядер	28
2.14 Микроскопия	28
2.15 Программное обеспечение для анализа снимков и их обработки	28

3. Результаты	29
3.1 Общая морфология ядра в растущих ооцитах <i>T. scripta</i>	29
3.2 Характеристика хромосом в растущих ооцитах	30
3.3 Цитологические карты макрохромосом и микрохромосом	37
3.4 Нуклеолярный аппарат в растущих ооцитах <i>T. scripta</i>	39
3.5 Анализ транскрипционной активности рибосомных генов	41
3.6 Биоинформатический анализ последовательности IGS	43
4. Обсуждение	45
4.1 Хромосомы типа ламповых щёток в растущих ооцитах <i>T. scripta</i>	45
4.2 Ядрышки в растущих ооцитах <i>T. scripta</i>	46
Выводы	49
Список литературы	50
Благодарности	54

Список сокращений

LBC – хромосома на стадии ламповой щётки

ЛЩ – ламповая щётка

Ма – макрохромосома

Ми – микрохромосома

NOR – ядрышковый организатор

ЯОР – ядрышковый организатор

IGS – межгенный спейсер

DAPI - 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*

ИГХ – иммуногистохимия

PCR – цепная полимеразная реакция

GC – Гуанин Цитозин

п.н. – пар нуклеотидов

Введение

Растущие ооциты представляют собой высокоспециализированные клетки, в цитоплазме которых аккумулируются и запасаются огромные количества органелл, макромолекул и других энергоемких соединений, необходимых для осуществления ранних этапов эмбрионального развития. Разнообразие источников материнских РНК в значительной степени определяет огромное разнообразие способов развития женской половой клетки (Равен, 1964; Davidson, 1986; цит. по Koshel et al., 2016; Дондуа, 2005). Так, высокая транскрипционная активность хромосом, преобразованных в ламповые щетки, и амплификация рибосомных генов с образованием множества экстрахромосомных ядрышек характеризуют гипертранскрипционный тип оогенеза у представителей рыб, амфибий и ряда, низших вторичноротых (по Дондуа, 2005). Как известно, оогенез птиц и млекопитающих, в отличие от низших позвоночных, не сопровождается амплификацией рибосомных генов в ядрышковом аппарате (Koshel et al., 2016), при этом в растущих ооцитах птиц хромосомы преобразуются в хорошо развитые и транскрипционно активные ламповые щетки (Gaginskaya et al., 2009). Среди позвоночных, особенности организации и функционирования генетического аппарата в ходе оогенеза наиболее слабо изучены у представителей класса Reptilia. Результаты в основном получены с использованием гистологических подходов, в то время как современные данные по функциональной морфологии и макромолекулярному составу ядерных структур практически отсутствуют.

Рептилии, или пресмыкающиеся, представляют класс животных, в котором 3 отряда (Crocodilia - Крокодилы, Squamata - Чешуйчатые и Testudines - Черепахи) эволюционировали независимо друг от друга. Соответственно, можно предположить, что представители класса пресмыкающихся, отличаются между собой в особенностях гаметогенеза. Как пример можно привести отличия во взаимоотношениях фолликулярных клеток и растущих ооцитов (Andreuccetti et al., 1978; Rahil et al., 1973). Известны данные о различиях в функциональной активности нуклеолярного аппарата между ящерицами (Arronet, 1973; Lutes et al, 2010) и черепахами и крокодилами (Callebaut et al., 1997; Calderon et al., 2004). Наш выбор в качестве объекта представителя американских пресноводных черепах красноухой черепахи *Trachemys scripta* (сем. Emydidae, отр. Testudines) определялся следующими причинами. Во-первых, черепахи, наряду с крокодилами, филогенетически ближе к птицам, оогенез которых традиционно исследуется в лаборатории структуры и функции хромосом Санкт-Петербургского государственного университета; во-вторых, в интернете доступны данные о

расшифрованном геноме сестринского вида – бугорчатой черепахи *Malaclemys terrapin* и «сырые» последовательности из генома *T. Scripta*; в-третьих, эта черепаха легкодоступна для приобретения у заводчиков и проще для содержания в неволе по сравнению с другими видами рептилий (например, крокодилами).

Для изучения организации ядра и ядерных структур в ооцитах красноухой черепахи *T. scripta* мы применяли специфические для нуклеиновых кислот флуорохромы, иммунофлуоресцентную микроскопию с антителами против маркерных белков ядрышка, а также флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) с ДНК-зондом 5'ETS (транскрибируемый спейсер на 5'-конце кластера генов рРНК) данного вида. Таким образом, в работе использованы методы приготовления криосрезов, эпифлуоресцентной микроскопии, иммуногистохимии, молекулярной гибридизации *in situ* (FISH) и биоинформатический анализ.

Целью настоящей работы было изучение функциональной организации ядра и ядерных структур в растущих ооцитах красноухой черепахи *Trachemys scripta*. Для достижения этой цели были сформулированы следующие конкретные задачи:

1. Охарактеризовать общую организацию ядра в растущих ооцитах *T. scripta* на основе 3D-анализа изолированных из ооцитов ядер с использованием конфокальной микроскопии.

2. Описать детали организации хромосом в растущих ооцитах у половозрелых самок *T. scripta* на основе исследования препаратов содержимого изолированных из ооцитов ядер с использованием эпифлуоресцентной микроскопии.

3. Охарактеризовать особенности нуклеолярного аппарата в растущих ооцитах *T. scripta* на основе флуоресцентного иммуногистохимического анализа криосрезов яичников.

4. Проанализировать транскрипционную активность рибосомных генов методом ДНК-РНК FISH с ДНК зондом к 5' ETS.

5. Провести биоинформатический анализ последовательности межгенного спейсера (IGS) в рибосомной ДНК *T. scripta* и оценить наличие в нем повторяющихся элементов.

Полученные в работе результаты были частично представлены на Конференции с международным участием «Клеточная биология: проблемы и перспективы», Санкт-Петербург, 2-5 октября 2017 г.

1. Обзор литературы

1.1 Хромосомы типа ламповых щёток

Хромосомы типа ламповых щёток (ЛЩ), или Lampbrush chromosomes (LBC), были обнаружены впервые в ооцитах Аксолотля в 1882 году, немецким биологом по имени Вальтер Флемминг (Flemming, 1882). Уже прошло немало времени и на данный момент такой тип хромосом, был обнаружен в ооцитах различных животных, начиная с хрящевых рыб (Rückert, 1892), амфибий и заканчивая птицами (Callan, 1986). Хромосомы этого типа могут быть охарактеризованы как: огромные хромосомы с боковыми петлями разного размера, которые транскрипционно активны, а так же видны при использовании световой микроскопии.

В растущих ооцитах во время стадии диплотены в профазе первого мейотического деления хромосомы у представителей вышеперечисленных классов животных деконденсируются для возможности транскрипции и это ведёт к формированию характерной для ЛЩ структуры. Длина деконденсированных мейотических хромосом может варьировать от 400 до 800 мкм. Таким образом, ЛЩ примерно в 30 раз длиннее хромосом в метафазе митоза. Естественно размер и морфология хромосом типа ламповых щёток зависит от того к какому виду относится животное (Andraszek, Smalec, 2012). Хромосомы преобразуются в ЛЩ на диплотенной стадии профазы мейоза 1. Этому преобразованию предшествует конъюгация гомологичных хромосом с образованием бивалентов на зиготенной стадии, рекомбинация с образованием хиазм на пахитенной стадии и частичное расхождение бивалентов на диплотенной стадии. На диплотене биваленты остаются связанными в местах хиазм. Каждый гомолог в свою очередь состоит из двух сестринских хроматид. Каждый гомолог на стадии ЛЩ имеет характерную структуру, в которой хорошо выявляются хромеры и боковые петли (рис. 1). Хромеры представляют собой гетерохроматиновые, транскрипционно неактивные, однако динамичные участки ДНК. Структура же хромеров поддерживается благодаря белковым комплексам - конденсином (Gaginskaya, et al., 2009). Боковые петли в свою очередь имеют эухроматиновую природу и соответственно на них идёт активная транскрипция, боковые петли так же имеют динамичную структуру. Динамичность и хромеров и петель зависит от изменения транскрипционной активности хромосом и заключается в возможности тех и других изменять свои размеры, то есть если увеличивается петля, то хромер сжимается, становится меньше и становится более конденсированным, верна и обратная ситуация когда увеличивается хромер и уменьшается боковая петля. Другими словами материал ДНК может переходить из гетерохроматинового (в хромере) в эухроматиновое (в петле) состояние и обратно. На

ЛЩ существуют различные петли: Маркерные (шаблон которых уникален для определённой хромосомы и позволяет идентифицировать оную) и стандартные петли. Длина не маркерных петель зависит от интенсивности транскрипции с данной петли. Также петли и хромеры на ЛЩ могут трансформироваться в так называемые мосты (рис. 2), что происходит при разрыве хромера и растягивании хромосом типа ламповых щёток в разные стороны (Macgregor, 2012; Andraszek, Smalec, 2012; Callan, 1986).

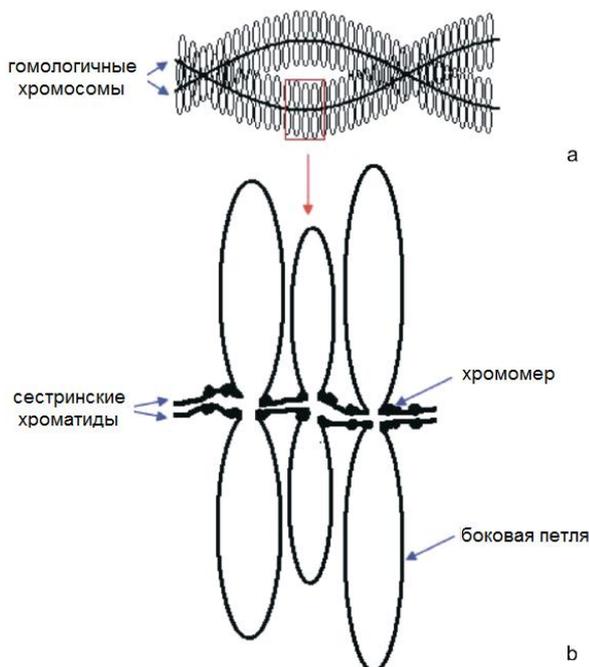


Рис. 1. Схематичное изображение хромосом типа ЛЩ, а - гомологичные хромосомы, б - подробная схема сестринских хроматид с обозначением хромера и боковой петли. Изображение заимствовано из Andraszek, Smalec, 2012 и переведено.

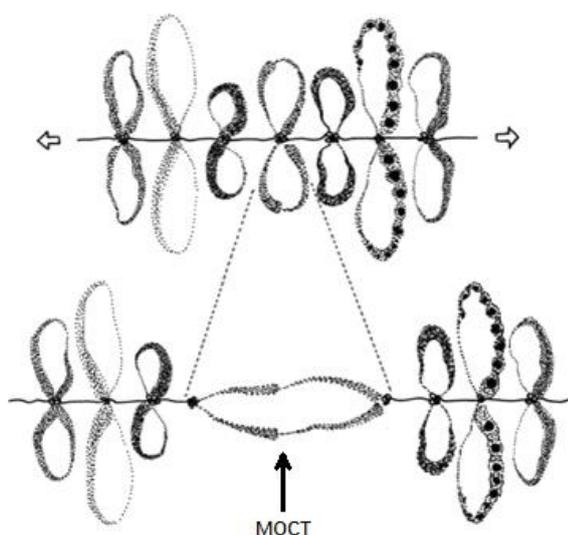


Рис. 2. Схематичное изображение процесса образования моста на хромосоме типа ЛЩ. Модифицированное изображение из Macgregor, 2012.

Как мы знаем, птицы так же имеют хромосомы типа ламповых щёток, но у них имеется некоторая особенность. У птиц, например у Голубя (Solovei, et al., 1996; Krasikova, et al., 2004) вместе с LBC всегда встречаются протеиновые тельца (ПТ) или protein bodies (PB) рис. 3, в гетерохроматичных районах хромосом с высокой концентрацией повторов и непосредственно в центромерных раёнах. Морфология данных протеиновых телец достаточно схожа с тельцами кохалия которые встречаются у амфибий на ламповых щётках и в свою очередь участвуют например в таких процессах как удлинение теломер или процессинге гистоновой мРНК. Однако функция протеиновых телец пока не определена, но есть данные, что они участвуют в пространственной организации хромосом (Andraszek, Smalec, 2012; Saifitdinova, et al., 2003). По данным Т. Куликовой и соавторов (Kulikova, et al., 2016) центромерные белковые тельца на ЛЩ птиц по внешней морфологии напоминают тельца гистонового локуса в ооцитах *X. laevis*. Они имеют гранулярную поверхность, большое количество пор и состоят из фибрил толщиной от 60 до 100 нм. Однако эти тельца не накапливают в себе рибонуклеопротеины и не содержат коилин (Saifitdinova, et al., 2003; Kulikova, et al., 2016). Теломерные районы хромосом на стадии ЛЩ маркированы крупными теломерными петлями, например у Зяблика на макро и микрохромосомах они образуют гигантские теломерные петли (рис. 3). Стоит отметить так же что данные теломерные петли имеют на себе транскрипционную активность (Solovei, et al., 1994; Saifitdinova, et al., 2003).

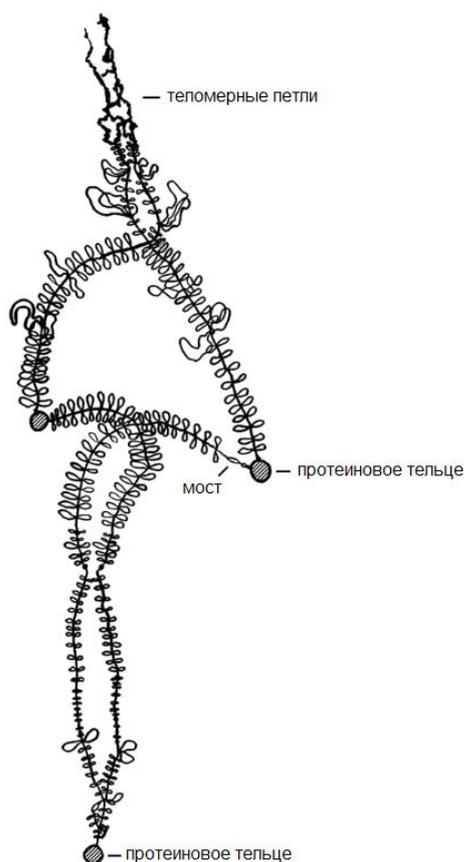


Рис. 3. Изображение хромосом ЛЩ зяблика, с присутствием протеиновых телец, моста и теломерных петель. Переведённый рисунок по Saifitdinova, et al., 2003.

Хромосомы типа ламповых щёток часто используются в качестве модели для изучения транскрипции, так как морфология хромосом напрямую коррелирует с их транскрипционной активностью, которая происходит на петлях. Основная стратегия у животных с хромосомами типа ламповых щёток в больших ооцитах это использование данных хромосом для производства и последующего запасания транскриптов для удачного и без проблемного протекания эмбрионального развития зародыша. Именно по этому, например у *Xenopus laevis* в ооцитах хромосомы большого размера в виде ламповых щёток и с них продуцируется огромное количество РНК, путём максимального обогащения петель РНК полимеразой 2 (РНК пол 2) и соответственно количество транскрипционных машин включающих в себя РНК пол 2, определяет скорость транскрипции. Кроме того для удачного развития эмбриона транскрипты должны быть стабильны и не подвергаться деградации, а так же их продукция должна продолжаться на протяжении существенного времени, так как скорость транскрипции с ламповых щёток не велика (Gall, 2012). Как было сказано ранее петли это динамичные структуры, продолжительность их существования напрямую зависит от количества

рибонуклеопротеинов (состоящих из синтезированной РНК и связанных с ней белков) покрывающих петли, что в свою очередь способствует гипертранскрипции (Morgan, 2018).

Некоторые организмы используют полиплоидизацию для синтеза большого количества транскриптов, не используя ЛЩ. Примером может служить *Drosophila melanogaster*, но стоит отметить, что это происходит не в ооците. По причине того что ооциту необходимо передать определённый пост мейотический набор хромосом, а не полиплоидный. У *D. melanogaster* половая клетка что станет ооцитом, запасает транскрипты путём принятия последних извне, а точнее из питающих клеток окружающих её. Яйцевая камера у данного насекомого состоит из одного ооцита и 15 высоко полиплоидных питающих клеток зародышевой природы, которые поставляют большое количество транскриптов и других клеточных компонентов в течении трёх дней в единственный созревающий ооцит. Для достижения производства транскриптов и своевременного созревания ооцита, полиплоидизация в питающих клетках достигается путём прохождения 10-12 эндоциклов (Dej, Spradling, 1999; Gall, 2012).

Хромосомы типа ламповых щёток производят РНК, на протяжении продолжительного периода, соответственно не так оперативно как 15 полиплоидных трофоцитов у Дроздофилы. Из этого можно сделать вывод, что стратегия запасания транскриптов с помощью LBC менее эффективна в плане времени, чем полиплоидизация питающих клеток (Gall, 2012).

Хромосомы типа ламповых щёток как мы уже знаем встречаются в разных организмах, но считается что данный тип хромосом никогда не образуется в ооцитах человека (Macgregor, 1987). Интересно то, что Ji-Long Liu и Joseph G. Gall удалось трансформировать хромосомы человеческого сперматозоида в хромосомы типа ЛЩ, путём инъекции спермиев в зародышевый пузырёк *Notophthalmus viridescens* и *X. Laevis*. Соответственно это показывает, что хроматин млекопитающих имеет компетенцию для перехода в состояние ЛЩ и переход определяется не самим хроматином, а факторами, содержащимися в цитоплазме ооцита (Liu, Gall, 2012).

1.2 Внутриядерные тельца: Ядрышки

Существует большое количество внутриядерных телец, которые участвуют в метаболических процессах внутри ядра, транспорте молекул в ядро и из него, но хотелось бы остановить внимание на ядрышках и некоторых других тельцах.

Одним из важнейших компонентов производства белка у организмов, наряду с матричной РНК является фабрика сборки полипептидов, - рибосома. Эта высоко консервативная РНК-белковая структура имеет древнее происхождение, так как не только

присутствует, но и имеет общую функцию производства протеинов, во всех организмах. Рибосома на 60% состоит из рибосомной РНК (рРНК) и на 40% из протеинов что с ней взаимодействуют (Chen, et al., 2016;), вместе эти компоненты образуют 2 рибосомальных сабъюнита, большой (60S) и малый (40S). Большой сабъюнит как раз ведёт активную сборку цепи полипептида, которая возможна благодаря каталитической активности рРНК в данной субъединице (Venema, Tollervey 1999). Столь необходимая для синтеза протеинов, рРНК берёт своё начало из ядрышка. Которое было открыто в 19-ом веке немецким биологом Рудольфом Вагнером и на тот момент носило название *macula germinativa*. Ядрышко представляет из себя не мембранную органеллу, в которой происходят различные процессы связанные с биогенезом рибосом, а также не связанные с ним. Отсутствие мембраны между ядрышком и нуклеоплазмой означает то что, различные молекулы способны перемешаться свободно, хотя и не известно в какой степени проницаемы все компоненты ядрышка. Биогенез рибосом начинается с транскрипции рДНК (рибосомные гены), после чего следует процессинг пре-рРНК (пре-рибосомной РНК) и завершается сборкой рибосомных протеинов с рибосомной РНК. Так как основной функцией ядрышка является производство рибосом, не удивительно, что размер и организация оною напрямую коррелирует со интенсивностью биогенеза рибосом (Mélèse, Xue, 1995).

У эукариот ядрышко-организующий раён (ЯОР) кодирует рРНК для вышеупомянутых субъединиц рибосом и ядрышки формируются вокруг этих организующих районов. Количество хромосом, которые несут в себе ЯОР может быть разным в разных организмах. Оценить данный параметр можно с помощью Флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) или окраской серебром. Было установлено что, для удачной транскрипции рДНК и соответственно синтеза пре-рРНК, необходима адекватная транскрипционная машина. Эта машина включает в себя ряд факторов и ферментов: транскрипционные факторы UBF, SL1 и комплекс РНК полимеразы 1. Однако данная транскрипционная машина колокализуется только с активными ЯОР во время митоза и мейоза. Так же немаловажным фактором для экспрессии рДНК, является клеточный цикл и клеточный рост (Roussel, et al., 1996; Goodfellow, Zomerdiijk 2012). Ядрышко-организующий район состоит из повторяющихся кластеров генов рРНК и внегеномных спэйсеров – IGS, которые фланкируют каждый кластер рДНК. IGS могут быть различного размера, например у дрожжей примерно 2 килобазы (кб) в длину, а у человека может достигать 30кб. Хотелось бы отметить что эти вне геномные спэйсеры не просто “мусорная” ДНК, а, как и интроны, содержат регуляторные элементы, в случае IGS это промоутеры и энхансеры (Goodfellow, Zomerdiijk 2012). Кластеры рРНК генов в свою

очередь имеют характерную структуру. Они включают в себя как повторяющиеся не кодирующие элементы, которые транскрибируются, так и гены, кодирующие рРНК. Размер одного кластера генов рРНК может варьироваться от 8 до 14 кб. Каждый кластер состоит из внешних транскрибируемых последовательностей (5' ETS и 3' ETS), которые располагаются соответственно на 5' и 3' концах кластера рРНК, из последовательности кодирующих рРНК (18S, 5.8S и 28S), в свою очередь разделённых ITS1 и ITS2 (внутренние транскрибируемые последовательности) рис. 4. Как выше сказано, размер одного кластера рДНК варьирует и это обусловлено размерами 5'ETS, 3'ETS, ITS1 и ITS2, однако размеры 18S (примерно 2300бп), 5.8S (примерно 158бп) и 28S (примерно 4200бп) остаются фиксированными. Каждый кластер генов рРНК считывается РНК полимеразой 1 как единая транскрипционная единица с образованием молекулы пре-рРНК (Dyomin, et al., 2016).

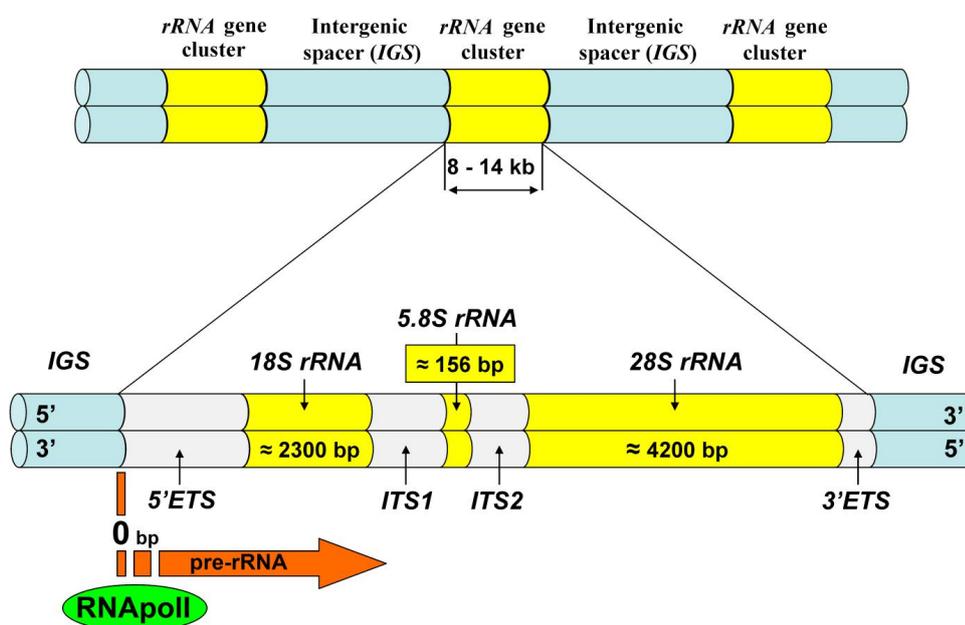


Рис. 4. Схема строения кластера генов рРНК, по Dyomin, et al., 2016.

Полноразмерная пре-рРНК эукариот как упоминалось выше содержит не только 18S, 5.8S и 28S, но и ETS (5', 3') вкуче с ITS (1,2), которые необходимо вырезать. Данный процесс удаления происходит благодаря использованию специальных рибонуклеопротеинов, которые включают в себя ядрышковые протеины и малые ядрышковые РНК (мяоРНК). Эти мяоРНК не только участвуют в процессинге пре-РНК, но так же определяют структуру рибонуклопротеинов и рРНК. Компонент ядрышка фибриллин так же взаимодействует с мяоРНК и играет ключевую роль в процессинге пре-рРНК. Предполагается, что фибриллин и U3 мяоРНК образуют комплекс и отрезают 5' ETS, после подсоединения к 5' концу пре-рРНК (Mélèse, Zhixiong, 1995). Другой белок

ядрышка, нуклеолин, способствует деконденсации ДНК, благодаря тому, что подсоединяется к гистону H1 и соответственно влияет на синтез пре-рРНК. Также нуклеолин, возможно, играет роль в упаковке рРНК при сборке рибосомы (Ginisty, et al., 1999).

Описаны два типа ядрышек: Би-партидные, содержащие только два компонента и Три-партидные, которые содержат три компонента (рис. 5). Двух компонентные ядрышки, включают в себя только фибрилярный и гранулярный компоненты, соответственно это более простая организация. Трёх компонентные ядрышки содержат фибрилярный центр, плотный фибрилярный компонент и гранулярный компонент. Если взять, к примеру, три-партидные ядрышки, то синтез пре-рРНК РНК полимеразой 1 и котранскрипционная модификация с помощью фибриллина происходит в районах ядрышка между центральным компонентом (фибрилярным центром) и плотным фибрилярным компонентом. Дальнейшее созревание и процессинг пре-рРНК, происходит в плотном фибрилярном компоненте, откуда уже созревшая рРНК выходит в гранулярный компонент, где содержится нуклеолин и происходит сборка рибосом из рРНК и рибосомальных протеинов. Разные виды животных характеризуются ядрышками определённого типа строения (McStay, 2016).

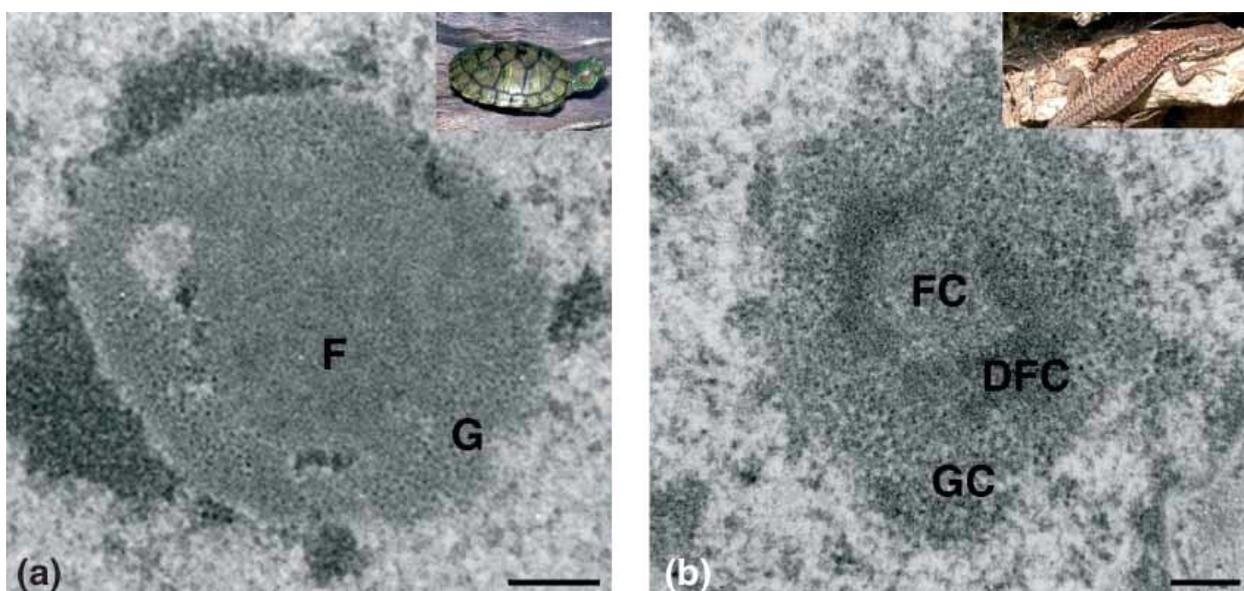


Рис. 5. Фотографии электронной микроскопии ядрышек, красноухой черепахи *Trachemys scripta* (а) и ящерицы *Podarcis muralis* (б). F - фибрилярный компонент, G - гранулярный компонент, FC - фибрилярный центр, DFC - плотный фибрилярный компонент, GC - гранулярный компонент. Масштабная линия 0.4 мкм, изображение из Hernandez-Verdun, et al., 2010.

Принято считать, что би-партидные ядрышки появились первыми, а три-партидные вышли из них в ходе эволюции. Данный переход от трёх к двум компонентному ядрышку, предполагается, произошёл в то время когда анамнии эволюционировали в амниот. Например, в соматических клетках анамний, таких как черепахи *Trachemys scripta* и *Pseudemys scripta*, ядрышко двух компонентное, а в соматических клетках других анамний, таких как крокодил *Crocodylus niloticus*, ящерица *Japalura splendida* и змея *Python regius*, трёх компонентное, как и у млекопитающих. На основании этого факта Françoise Lamaue (Lamaue, et al., 2011) считает, что черепахи более примитивны, чем другие живущие рептилии и соответственно более древние (Lamaue, et al., 2011; Thiry, Lafontaine, 2005).

1.3 Другие внутриядерные тельца

Помимо ядрышек, в ядре клетки также присутствуют и другие внутриядерные структуры, к их числу относятся тельца Кахаля (ТК), тельца гистонового локуса (ТГЛ) и кластеры интерхроматиновых гранул (КИГ), или спеклы. Данные внутриядерные структуры содержат малые ядерные РНК (мяРНК) - ТК, не РНКовые факторы сплайсинга (SC35) – КИГи, которые участвуют в сплайсинге и процессинге мРНК. Благодаря изучению выше упомянутых структур внутри ядра путём электронной микроскопии, было установлено что они, как и ядрышки не имеют какой либо мембраны. Это означает что такие структуры в зародышковом пузырьке (в данном случае у *X. laevis*) имеют своего рода "губчатое" строение, низкую плотность и способны пропускать через себя макромолекулы (Handwerger, et al., 2005).

Тельца гистонового локуса присутствуют в ядрах амфибийных ооцитов и, как и тельца Кахаля, являются экстрохромосомными колилин-содержащими внутриядерными тельцами, состоящими из достаточно тонких (от 30 до 40 нм) фибрилл. Эти внутриядерные структуры полностью пронизаны большим количеством пор, а также могут содержать или не содержать внутри или на поверхности КИГи, которые по своему строению схожи с ТГЛ по причине наличия огромного количества пор (Kulikova, et al., 2016).

Что касается телец Кахаля, в них происходит сборка и пост-транскрипционная модификация малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП - функциональных элементов сплайсосом) и малых ядрышковых рибонуклеопротеинов (мяоРНП), которые в свою очередь будут участвовать в сплайсинге пре-мРНК (мяРНП) и в процессинге пре-рРНК (мяоРНП). Пост-транскрипционную модификацию выше названных РНП, осуществляет коилин (p80), который, в свою очередь, также является маркером телец Кахаля. После

созревания они выходят из телец Кахалья и направляются в ядрышко (мяоРНП) и в интерхроматиновые гранулы (мяРНП) (Ogg, Lamond, 2002).

4. Кариотип *Trachemys scripta*

У *Trachemys scripta* диплоидный набор хромосом состоит из 50 хромосом: 8 пар метацентрических и субметацентрических хромосом (2 пары крупных и 6 средних по размеру), 5 пар акроцентриков, остальные 12 пар хромосом очень маленьких хромосом (микрохромосомы) рис. 6. Половые хромосомы не идентифицированы, а в исследовании Фантина Клейтона (Cleiton, Giuliano-Caetano, 2008) было отмечено, что у красноухой черепахи половые хромосомы не дифференцированы. Местоположение ядрышкового организатора у *T. scripta* было установлено при помощи окраски нитратом серебра и показано, что ЯОР находится на 14-ой паре хромосом. Местоположение ЯОР этими авторами было подтверждено с использованием FISH с зондом 18S рДНК и было показано, что у *T. scripta* в диплоидном наборе хромосом выявляется только 2 рДНК сайта с генами 18S (Cleiton, Giuliano-Caetano, 2008).

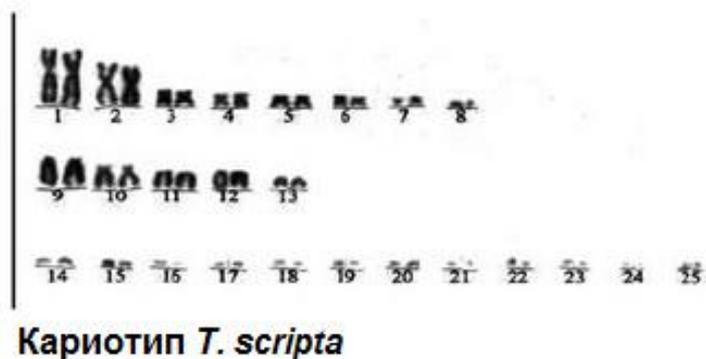


Рис. 6. Кариотип красноухой черепахи, по Cleiton, Giuliano-Caetano, 2008.

Общая длина генома у *Trachemys scripta* в соответствии с базой данных Animal Genome Size Database (Gregory, 2018) – 1.9-2.6 Гб. В соответствии с данными той же базы, у курицы *Gallus gallus domesticus* размер генома очень близок к черепахе и составляет 1.25-1.28 Гб, а крокодил *Crocodylus niloticus* имеет размер генома 2.8-3.9 Гб. Однако в исследовании Касай Ф. (Kasai, 2012), с помощью проточного кариотипирования было установлено, что геномы этих трёх животных более схожи по размеру, чем указано выше упомянутой базы данных, и составляют 1.29 Гб у *C. niloticus* (с содержанием GC 49.2%) и 1.21 Гб для *T. scripta* (с содержанием GC 47.4%), что очень близко по размеру к *G. g. domesticus* 1.15 Гб (с содержанием GC 45.2%). Из этих данных с очевидностью следует, что содержание GC в геномах у этих животных очень схоже между собой (Kasai, 2012).

По данным Джессики Альфолди (Alföldi, et al., 2011) общий предок амниот имел размер генома 1.78 Гб, с содержанием GC 40.3%, и имел несколько микрохромосом, которые ортологичны микрохромосомам *G. g. domesticus*, что означает появление этих хромосом ещё у рептилий (Alföldi, et al., 2011). Также есть предположение, что появление микрохромосом ведёт к снижению размера генома (Burt, 2002). Было установлено, что у *T. scripta* геном достаточно небольшой (1.21 Гб), а содержание GC в геноме 47.4%, что есть выше, чем у общего предка амниот. Это позволяет предполагать, что снижение размера генома коррелирует с формированием микрохромосом.

5. Оогенез *Trachemys scripta*

Оогенез это процесс развития яйцеклетки, который можно разделить на несколько стадий: (1) стадия размножения (когда оогонии делятся с помощью митоза, увеличивая своё число); (2) генеративная стадия оогенеза (ранняя профза мейоза - от прелептотенной до диплотенной стадий), когда происходит генетическая рекомбинация и кроссинговер; (3) вегетативная стадия оогенеза, во время которой происходит рост ооцита, и которую подразделяют на периоды превителлогенеза (цитоплазматического роста) и вителлогенеза; (4) стадия созревания яйцеклетки, на которой мейоз завершается редукционным и эквационным делениями.

Например, у шпорцевой лягушки на стадии оогоний входит в фазу активного синтеза ДНК или S-фазу, после чего следует профза 1-ого деления мейоза. Эта стадия мейоза включает в себя этапы лептотены, зиготены и пахитены. Именно в этот период происходит амплификация рибосомных генов в районе ядрышкового организатора с образованием на основе амплифицированных копий рДНК большого числа экстрахромосомных ядрышек, которые располагаются непосредственно под оболочкой ядра. На стадии диплотены хромосомы деконденсируются и преобразуются в ЛЩ. В течение стадии превителогенеза происходит накопление в ооплазме различных типов РНК (тРНК, мРНК и рРНК) для использования ооцитом после оплодотворения. Продукция огромного количества рРНК на этой стадии возможна как раз благодаря ранее амплифицированным экстрахромосомным ядрышкам.

После периода превителлогенеза идёт период поступления в ооцит разнообразных питательных веществ - вителлогенез, эти питательные вещества включают желток, жиры и гликогены. Желток образуется из вителлогенина, который у позвоночных производится в печени самки, после чего происходит его транспорт по системе кровообращения к фолликулу. Затем фолликулярные клетки поставляют вителлогенин в превителлиновое пространство, где он путём пинцитоза поглощается растущим ооцитом. Внутри ооплазмы

для формирования одной гранулы желтка используется большое количество пиноцитозных пузырьков с вителлогенином.

Следуя за стадией роста, идёт стадия созревания ооцита под влиянием половых гормонов. И начинается редукционное деление ооцита. В начале созревания яйцеклетки гонадотропные гормоны (синтезируемые гипофизом) способствуют повышению концентрации белкового фактора созревания ооцита путём стимуляции синтеза прогестерона в фолликулярных клетках. Этот гормон или его аналоги, в свою очередь блокируют поступление цАМФ в ооцит с помощью размыкания щелевых контактов, между ооцитом и фолликулярными клетками. Соответственно концентрация циклического аденин-моно-фосфата снижается и он более не способен блокировать фактор созревания ооцита путём его фосфорилирования. Под влиянием фактора созревания ооцита разбираются ядерная мембрана и ядрышки. Отсутствие ядерной мембраны, в свою очередь, способствует миграции хроматина к анимальному полюсу ооцита, в районе которого будут происходить деления хромосом. При первом редукционном делении формируется ооцит 2-ого порядка и первое полярное тельце. При втором редукционном делении формируется второе полярное тельце и зрелый ооцит. В этот момент и останавливается мейоз у большинства позвоночных, ожидая оплодотворения со стороны спермия (Белоусов, 2005).

В яичниках черепах, и в частности у красноухой черепахи *T. scripta*, было обнаружено, что ооцит окружён одиночным слоем фолликулярных клеток. Эти клетки при детальном изучении, как, оказалось, характеризуются активным синтезом разных белков, о чём свидетельствует наличие в них крупного аппарата Гольджи (необходимого для модификации, упаковки и транспортировки белков) и хорошо развитого шероховатого эндоплазматического ретикулума (несущего, соответственно, большое количество рибосом). В то же время, между фолликулярными клетками и ооцитом формируется огромное количество микроворсинок. На основании этих данных можно сделать вывод, о том, что фолликулярные клетки, которые окружают ооцит, способствуют не только его развитию, но и, возможно, развитию *zona pellucida*. Однако интересно, что у черепах, в отличие от ящериц, отсутствуют межклеточные мосты (каналы), соединяющие фолликулярные клетки и ооцит общей цитоплазмой, а также отсутствуют десмосомы. Соответственно, например, компоненты желтка выходят из фолликулярных клеток в перивителиновое пространство и поступают в ооцит путём пиноцитоза (Rahil, Narbaitz, 1973).

В работе Марка Каллебаута (Callebaut, et al., 1997) описаны отличия оогенеза красноухой черепахи от оогенеза птиц, например, перепела. У *T. scripta*, как и у всех

рептилий, оогонез продолжается, на протяжении всей жизни и у них в яичниках присутствуют такие структуры как зародышевые ложа. Внутри этих зон яичника находится запас стволовых половых клеток и как раз они и обеспечивают возможность возобновляющегося оогенеза. В зародышевом ложе происходит размножение оогоний и созревание их в первичные ооциты, путём прохождения стволовых половых клеток через сезонную митотическую фазу которая даёт начало оогониям которые позднее, после вступления в мейоз станут первичными ооцитами. Однако данные по тому, какое количество митотических делений происходит во время пролиферации оогоний, пока отсутствуют, но скорее всего их число зависит от сезона. С другой стороны, подобных зародышевых лож в яичниках птиц не обнаружено, так как во время эмбрионального периода развития животного и в начале постнатального, все оогонии созревают в первичные ооциты, так что в яичнике не остается половых стволовых клеток (Guraya, 1989). Во время нахождения созревающего ооцита черепахи в фолликуле он проходит через 3 определённые, следующие друг за другом стадии, которые также наблюдаются в растущих ооцитах птиц. Эти 3 стадии включают в себя: стадию пре-ламповых щёток, стадию ламповых щёток и стадию пост-ламповых щёток. На стадии пре-ЛЩ хромосомы ещё не в состоянии ламповых щёток, а находятся в стадии ранней диплотены и проходят подготовку к следующей стадии. По достижении ооцитом примерно 600-700 мкм в диаметре начинается стадия ламповых щёток, во время которой происходит значительное увеличение ядра ооцита в размере, как следствие того, что хромосомы увеличиваются в размере, "распуская" длинные петли, на которых идёт активная транскрипция, а также возникает большое количество амплифицированных ядрышек различного размера (в том числе и достаточно крупных). После стадии ламповых щёток наступает стадия пост-ЛЩ, которая начинается, когда ооцит достигает размера 3-4 мм в диаметре и в течение этой стадии ядро мигрирует в кортекс ооцита, где будут происходить 2 редукционных деления и соответственно образование 2-ух полярных телец, что приведёт к появлению зрелой яйцеклетки (Callebaut, et al., 1997; Kuchling, 1999).

6. Биоинформатический обзор IGS

Разные типы полимераз имеют разные задачи в метаболизме клетки, например РНК-полимераза 2 отвечает за продукцию мРНК и мяРНК, РНК-полимераза 3 определяет синтез тРНК и 5S рРНК, а РНК-полимераза 1 (РНК пол 1) продуцирует исключительно рРНК.

Как известно, формирующееся ядрышко локализуется на ядрышковом организаторе, где РНК пол 1 синтезирует пре-РНК, также там присутствуют такие

факторы как upstream binding factor (UBF). Этот фактор соединяется с ДНК, используя свою высоко мобильную группу (high mobility group - HMG), и топологически изменяет ДНК. Данные взаимодействия ведут к вытеснению характерного для репрессированного хроматина гистона H1 (Kermekchiev, et al., 1997), что в свою очередь способствует формированию эухроматинового состояния в этом районе рДНК.

Рибосомные повторы, как выше было сказано, содержат кластер генов рРНК и внегеномные спейсеры IGS. Структура IGS, к примеру, у млекопитающих, включает в себя не только повторяющиеся элементы, но и регуляторные, такие как энхансеры, промотеры и терминаторы (рис. 7).

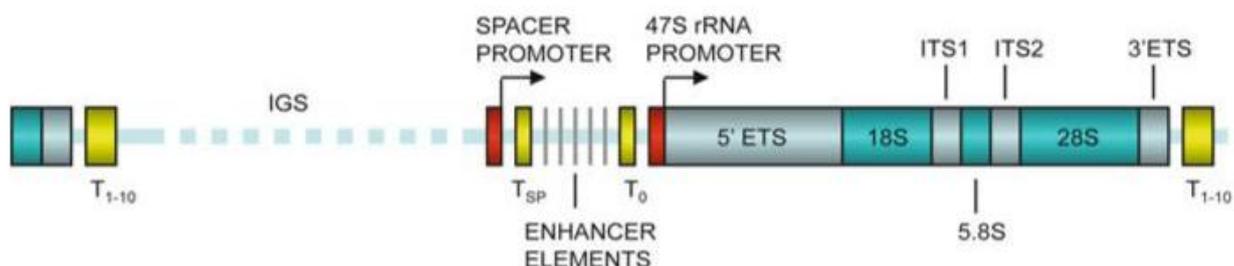


Рис. 7. На рисунке изображена общая организация IGS и кластера генов рРНК млекопитающего. IGS несёт в себе энхансеры (enhancer elements), места посадки TTF-I (T_0 and T_{sp}), промоторы (spacer promoter, 47S RNA promoter - core promoter), стрелки обозначают направление транскрипции, терминаторы транскрипции (T_{1-10}), внешние транскрибируемые последовательности (5' ETS и 3' ETS), кодирующие последовательности рРНК (18, 5.8 и 28S), внутренние транскрибируемые последовательности (ITS 1 и ITS 2). Модифицированный рисунок из Goodfellow, Zomerdiijk, 2012.

Сами по себе РНК полимеразы не садятся на промотеры и им необходимы транскрипционные факторы для этого, в частности для РНК пол 1 необходим транскрипционный фактор selectivity factor (SL1). Этот фактор распознаёт основной промотер (core promoter), стабилизирует взаимодействие UBF и рДНК, а также привлекает РНК пол 1 для начала транскрипции. Посадка же TTF-I (факторы терминации транскрипции) на терминаторы (T_{1-10}) и на специально отведённые последовательности (T_0 и T_{sp}), влияет на эпигенетическую и топологическую регуляцию рДНК и способствует остановке транскрипции. Соответственно при детальном изучении IGS становится очевидным, что у млекопитающих в них присутствуют не только повторы, но и масса регуляторных элементов для транскрипции рРНК (Goodfellow, Zomerdiijk, 2012). Есть

также свидетельства того, что у бактерий IGS содержит кодирующие последовательности – гены, кодирующие тРНК (Antón, et al., 1998).

Как известно, IGS несёт в себе большое количество повторов. Естественно, в разных организмах количество и протяженность повторов отличаются. Кроме того, IGS содержит необходимые регуляторные элементы для синтеза пре-рРНК. У представителя рыб, - озёрного голец-кривомера (*Salvelinus namaycush*), IGS имеет протяженность 9400-17800 пар нуклеотидов и несёт в себе 2 рамки считывания наряду с большим количеством повторов (Reed, Phillips, 2000). У обыкновенного тритона (*Triturus vulgaris*) IGS также содержит повторяющиеся элементы вкупе с регуляторными. Количество повторяющихся последовательностей в IGS тритона превышало 1000. Вариабельность структуры IGS отражает молекулярную эволюцию регуляторных последовательностей, так как повторяющиеся элементы в геномах склонны к дупликации, транслокации и т.п. Эти процессы происходят с повторами, но так как повторы расположены в непосредственной близости к регуляторным последовательностям, возможно "вовлечение" последних в вышеуказанные транслокационные и дупликационные события. В дополнение, интересно то, что у обыкновенного тритона были обнаружены последовательности IGS, локализованные в геноме вне сайта рибосомных повторов (вне ядрышкового организатора), что свидетельствует о возможной транслокации IGS (Lucchini, et al. 1997).

В ходе анализа литературных данных стало очевидным, что у животных, которые относятся к классу пресмыкающихся функциональная морфология нуклеолярного аппарата и хромосом на стадии ЛЩ исследована не полностью. Имеющиеся данные основаны преимущественно на использовании гистологических и гистохимических исследований тканей яичников и фолликулов. Мы же стремились применять более современные методы, такие как флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) и иммунофлуоресценция с использованием специфических флуорохромов для исследования ядерных структур в растущих ооцитах красноухой черепахи.

2. Материал и методы

2.1 Объект исследования

Объект исследования - красноухая черепаха *Trachemys scripta* принадлежащая семейству американских пресноводных черепах Emydidae (отр. Testudines). Животных приобретали у заводчиков и содержали в аквариуме. Исследовано 7 половозрелых самок с размером спинного панциря (карапакса) от 20-ти до 30-ти см (приблизительный возраст 5-7 лет). Животных умерщвляли в соответствии с международными правилами, подтвержденными Этическим комитетом СПбГУ (Заключение № 131-03-3 от 01.06.2017). Процедура умерщвления включала в себя наркоз с помощью хлороформа в течение 60 минут и последующую декапитацию. Для изъятия яичников умерщвленных самок вскрывали, делая пропилы боковых щитков брюшного панциря (пластрона).

2.2 Фиксация тканей

Перед фиксацией кусочки яичника отмывали в 1-кратном натриево-фосфатном буфере (1xPBS) в течение 30 минут, затем фиксировали в смеси 4% параформальдегида (PFA) и 0.1% Тритона X-100 (Triton X-100) в течение 24-х часов при комнатной температуре (20-25° C).

2.3 Замораживание образцов

После фиксации образцы отмывали от излишков PFA, используя 1xPBS, 3 раза по 20 минут. После этого фиксированные образцы яичников погружали для пропитки в криосреду Leica FSC22 clear на 60 минут и по прошествии этого времени помещали в свежую криосреду Leica FSC22 clear с последующей заморозкой в жидком азоте. Образцы (криоблоки) хранились при температуре -80° C.

2.4 Приготовление криосрезов и отбор препаратов для исследования

Криосрезы яичников толщиной 20 мкм делали на криотоме Leica CM1850UV. Полученные криосрезы размещали на предметных стеклах Leica Surgipath X-tra Adhesive. Стекла, содержащие срезы ядер ооцитов разных размеров, отбирали для выявления в них нуклеиновых кислот с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), а также для выявления белков ядрышек и телец Кахаля с помощью иммуногистохимии (ИГХ). Для этого криосрезы на стеклах отмывали от криосреды в трех сменах 1xPBS по 5 мин, окрашивали 4,6-диамидино-2-фенилиндолом дигидрохлоридом (DAPI) и просматривали в эпифлуоресцентном микроскопе.

2.5 Предподготовка или постфиксация препаратов для FISH или ИГХ (иммуногистохимии)

Срезы на стёклах сначала отмывали от остатков замораживающего компаунда в трех сменах 1xPBS, по 5 минут в каждой, после чего производилась обработка препаратов с помощью 0.1% Triton X-100. Затем следовала отмывка от Тритона X-100 в 1xPBS в течение 5 минут. Для разрушения дисульфидных связей (результат фиксации формальдегидом) срезы обрабатывали Proteinase K (6 мкг/мл) в течение 10 минут при температуре 4°C. Для очередной отмывки, в данном случае от Proteinase K, был использован 1xPBS, отмывка происходила 3 раза по 5 минут каждый. Для нейтрализации дальнейшего действия Proteinase K препараты обрабатывали 2% параформальдегидом в течение 5 минут. После этого препараты проводили через серию финальных отмывок в 1x PBS 3 раза, в течение 5 минут каждый. Обработки 0.1% Triton X-100, Proteinase K и 2% PFA проводили во влажной камере. В случае подготовки препаратов для FISH, препараты проводили по спиртам: сначала 70° этанол, после чего 90° этанол – для высушивания и, соответственно, предотвращения изменений концентрации зонда в гибридизационной смеси, при её нанесении на препарат.

2.6 Зонд к последовательности 5' ETS рибосомного кластера

Последовательность зонда к внешнему транскрибируемому спейсеру (5' ETS) кластера рДНК красноухой черепахи была разработана А.Г. Деминым на основе собранной им последовательности рибосомного повтора этого вида. Для синтеза ДНК-зонда с помощью ПЦР были использованы как «холодные» дезокси-нуклеотид-трифосфаты (dNTPs), так и меченые дигоксигенином (dig-dNTPs) для последующей прямой детекции антителами к дигоксигенину. Для ПЦР использовали следующие праймеры:

1. forward: GGTCGCTGACTTCTTCTCTA

2. reverse: AAGAAGGATGTCGGGAGTC

Сам зонд имел следующую последовательность:

5'...GGTCGCTGACTTCTTCTCTAGCGGGTTGCCCGGAAGGCGGTGGCGGCCTCTGCGC
CGCGTCGCCACGTACAAAAAAGGGACACCGGGAAAAGCGGGGCGAAGGGAGGGC
CCGAGGGGGCCCGGCTCCGTCTGACTCCCGACATCCTTCTT...3'

Реакционная смесь для ПЦР содержала в 20 мкл:

- 10x Taq буффер (+MgCl₂ 25 mM) 2.0 мкл
- dNTPs (dNTPs + dig-dNTPs) 2.0 мкл (dNTPs) + 0.7 (dUTPs)
- праймер №1 (F56) (10 пмоль/мкл) 1.0 мкл
- праймер №2 (R71) (10 пмоль/мкл) 1.0 мкл
- Taq - полимеразы (5 ед.а./мкл) 0.05 мкл
- ДНК 1.0 мкл
- Вода 11.08 мкл

ПЦР проводили в амплификаторе BioRad MJ Mini в соответствии со следующей программой:

- Разогрев PCR машины до температуры 94°С в течение 5 минут.
- T 94°С – 20 минут.
- Снижение температуры до 58°С и удержание её в течение 15 минут.
- Повышение температуры до 72°С и удержание её на протяжении 15 минут.
- Повторение шагов со 2-ого по 4-ый включительно, 35 раз.
- Поддержание T 72°С в течение 5 минут.

Синтезированный зонд представляет последовательность ДНК, комплементарную 5' ETS в кластере рибосомных генов красноухой черепахи. Этот зонд после денатурации пригоден для выявления как рДНК (ДНК/ДНК-гибридизация), так и не сплайсированной 45S пре-рРНК (ДНК/РНК-гибридизация) в ядрышках. Обнаружение в ядрышках 45S пре-рРНК должно свидетельствовать о транскрипционной активности в них генов рРНК.

2.7 FISH на криосрезах яичников

Первым делом готовили гибридизационную смесь, содержащую ниже перечисленные ингредиенты. (1) Формамид 100% (FA 100%) - применяют для снижения температуры денатурации ДНК и увеличения времени связывания зонда (в нашем случае с 5' ETS), кроме того, он способствует сохранению морфологии тканей и хромосом. (2) Солевой раствор цитрата натрия 20X (SSC 20X) был использован для поддержания pH и имитации физиологических условий. (3) Для снижения неспецифического связывания зонда, был применён 40% декстран-сульфат (DS 40%). (4) Также для снижения шансов посадки зонда в неспецифическом месте, использовалась тРНК. (5) ДНК-зонд к 5' ETS.

10 мкл гибридизационной смеси содержали:

- FA 100% 5.0 мкл
- SSC 20X 1.0 мкл
- DS 40% 2.5 мкл
- tPHK 0.5 мкл
- Зонд на 5' ETS 1.0 мкл

Приготовление гибридизационной смеси завершалось её кипячением при 100°C в течение 5 минут для денатурации зонда. Если необходимо было время на подготовку к нанесению гибридизационной смеси, ее помешали на лёд для предотвращения ренатурации зонда. По готовности, гибридизационную смесь наносили на препарат, накрывали покровным стеклом и заклеивали резиновым клеем. После этого препарат переносили в гибридайзер (Techne Genius) и включали соответствующую программу. Она имела простой алгоритм: гибридайзер нагревался до 81.3°C и держал эту температуру в течение 5 минут. Завершающим шагом был перенос препарата из гибридайзера во влажную камеру, которую помещали в термостат при 37° С на ночь.

2.8 Детекция сигнала FISH с помощью ИГХ

Первым делом убирался клей с препарата и происходила отмывка от не связавшегося зонда на водяной бане (температура воды была 62° С). Эти отмывки на водяной бане проводили в 1x PBS и каждая длилась по 5 минут. После этого было необходимо заблокировать неспецифичное связывание антител при помощи лошадиной сыворотки, 10% раствор которой содержал также 0.1% Tween и 0.01% азид натрия. Блокирование проводили в течение 60 минут при температуре 37° С во влажной камере. Рабочие разведения всех антител и дополнительная информация по ним приведены в разделе "Использованные антитела". После блока на препарат наносили первые антитела против дигоксигенина (конъюгированные с флуорохромом Cy3), так как использованный зонд содержал меченые дигоксигенином dNTPs. Препарат с первыми антителами инкубировали при 37° С в течение 120 минут, во влажной камере. За этим следовала отмывка от первых антител в 1xPBS + 0.1% Tween – 3 раза по 5 минут каждая. Для усиления сигнала наносили вторые антитела (IG H+L против первых антител, также конъюгированные с флуорохромом Cy3) и препараты инкубировали при 37° С во влажной камере, в течение 60 минут. Затем следовали троекратные отмывки в 1x PBS + 0.1% Tween по 5 минут каждая. Перед просмотром результатов под микроскопом на препарат наносили DAPI для визуализации хроматина и заключали под покровное стекло.

2.9 Иммуногистохимия

Стандартную иммуногистохимию (ИГХ) использовали для детекции и колокализации различных белков путём использования специфичных к ним антител. Процедуру ИГХ также проводили после предподготовки/постфиксации и начинали с нанесения 10% лошадиной сыворотки с 0.1% Tween и 0.01% азиды натрия на срезы для блокирования неспецифичных антигенов. Срезы инкубировали в лошадиной сыворотке при 37° С в течение 60 минут во влажной камере. За блоком следовало нанесение первых антител против определённого белка (рабочие разведения всех антител и дополнительную информацию по ним можно найти в разделе "Использованные антитела") на срезы и инкубация при 37° С во влажной камере в течение 120 минут. Затем шла троекратная отмывка от первых антител в 1xPBS + 0.1% Tween, по 5 минут каждая. За отмывкой следовало нанесение вторых антител и инкубация препаратов во влажной камере при 37° С в течение 60 минут. По завершении инкубации с вторыми антителами проводили последнюю отмывку от не связавшихся антител в 1xPBS+0.1% Tween – трижды по 5 минут. Процедуру ИГХ завершали окрашиванием препарата DAPI (для визуализации ДНК), после чего заключали под покровное стекло и исследовали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Leica DM4000B, оборудованного цифровой камерой

2.10 Используемые антитела

Все описанные ниже антитела разводили в 5% лошадиной сыворотке.

Первые антитела:

- Для детекции зонда к 5' ETS были использованы мышинные моноклональные антитела против дигоксигенина (с флуоресцентной меткой Cy3) фирмы Jackson ImmunoResearch, рабочее разведение составляло 1 к 200.
- Для детекции белка ядрышка фибрилларин использовали мышинные антитела: против фибрилларина (ab4566, Abcam), которые разводили в пропорции 1 к 100.
- Чтобы детектировать другой белок ядрышка – нуклеолин, использовали антитела C23 (кроличьи поликлональные, ab70493), рабочее разведение которых составляло 1 к 500.
- Для детекции маркерного белка телец Кахаля - коилина, использовали поликлональную сыворотку R288 (ранее получены от Joseph Gall, Ин-т Карнеги, Балтимор, США) в разведении 1 к 10.

Вторые антитела:

- Моноклональные антитела против мышинных антител (Jackson ImmunoResearch) несли на себе флуоресцентную метку Cy3, рабочее разведение данных антител составляло 1 к 400.
- Антитела были против кроличьих антител (Molecular probes) несли на себе метку FITC и имели рабочее разведение 1к 100.
- Антитела, против мышинных антител (Molecular probes) были конъюгированы с флуорохромом Alexa 488 и их рабочее разведение было 1 к 500.
- Антитела, против кроличьих антител (Molecular probes) были соединены с флуорохромом Alexa 546 рабочее разведение которых составляло 1 к 200.

2.11 Красители и флуоресцентные метки

- DAPI (SIGMA-ALDRICH): окрашивает ДНК в синий, длина испускаемой волны 461нм.
- Sytox Green (ThermoFiser Scientific): окрашивает ДНК и РНК в зелёный, длина испускаемой волны 523нм.
- Ribo Green (ThermoFiser Scientific): окрашивает только РНК в зелёный, длина испускаемой волны 536нм.

Ниже перечисленные флуорохромы были конъюгированы с антителами, упомянутыми в разделе “Использованные антитела”.

- Cy3: красный, длина испускаемой волны 568нм.
- FITC: зелёный, длина испускаемой волны 525нм.
- Alexa 488: зелёный, длина испускаемой волны 525нм.
- Alexa 546: красный, длина испускаемой волны 573нм.

2.12 Препараты изолированных из ооцитов ядер и хромосом типа ЛЩ

Метод микрохирургического выделения ядер и хромосом типа ламповых щёток из ооцитов черепах подробно описан в статье Алсу Сайфитдиновой (Saifitdinova et al., 2017). Мои попытки выделить ядро из ооцита черепахи, следуя приведенным в этой статье протоколам, не увенчались успехом. Препараты ядер и хромосом, выделенных из растущих ооцитов красноухой черепахи *Trachemys scripta*, для исследования были любезно предоставлены Светланой Анатольевной Галкиной и Анной Генриковной Давидьян.

2.13 Окраска изолированных ядер

Ядра растущих ооцитов *T. scripta* были окрашены красителями SytoxGreen и RiboGreen (информацию по ним см. выше), разведение красителей было 1 к 5000 на 1х PBS. Окраска проходила на протяжении 20 минут, затем следовала отмывка в 1х PBS, после чего препарат заключали под покровное стекло и снимали на конфокальном сканирующем микроскопе.

2.14 Микроскопия

Наблюдения были выполнены с использованием эпифлуоресцентных микроскопов Leica DMRXA и DM4000B (FISH, ИГХ, хромосомы типа ЛЩ) и конфокального сканирующего лазерного микроскопа Leica TCS SP5 (ядра ооцитов). Микрофотографии получены при помощи цифровых камер: цветная камера Leica DC500 на микроскопе DMRXA и монохромная камера DFC 350 на микроскопе DM4000B. Для получения микроскопических изображений использовано программное обеспечение: Leica LAS v4.8 (для DMRXA и DM4000B) и Leica LAS-X (для TCS SP5).

2.15 Программное обеспечение для анализа снимков и их обработки

Для анализа, обработки и составления панорамных фотографий была использована программа Adobe Photoshop CS6. Измерение хромосом типа ЛЩ и петель на них, проводилось в программе JMicro Vision 1.2.7., а для составления карт хромосом была применена программа CorelDRAW 2017.

3. Результаты

3.1 Общая морфология ядра в растущих ооцитах *T. scripta*

При наблюдении в конфокальном сканирующем микроскопе ядер, выделенных из растущих ооцитов *T. scripta* и окрашенных флуорохромами SytoxGreen (связывается с ДНК и РНК) и RiboGreen (специфично связывается с РНК), мы установили, что ядро содержит хорошо различимые хромосомы стадии ЛЩ и множественные, ярко флуоресцирующие экстрахромосомные тельца разных размеров – от 1 до более чем 13 мкм (рис. 8-10). На данном этапе мы не могли отличить ядрышки от других РНК-содержащих телец, присутствующих в ядре ооцита. Многие из этих телец расположены непосредственно под оболочкой ядра. Мы полагали, что, по крайней мере, часть экстрахромосомных телец должна соответствовать амплифицированным ядрышкам. На рис. 8 и 9 (ядра окрашены с помощью SytoxGreen) хорошо видны хромомеры на ЛЩ, особенно ярко флуоресцирующие на крупных хромосомах. После обработки ядер РНК-специфичным флуорохромом RiboGreen, характерная менее четкая флуоресценция ЛЩ подтверждает наличие на них РНК и, соответственно, свидетельствует о транскрипционной активности хромосом.

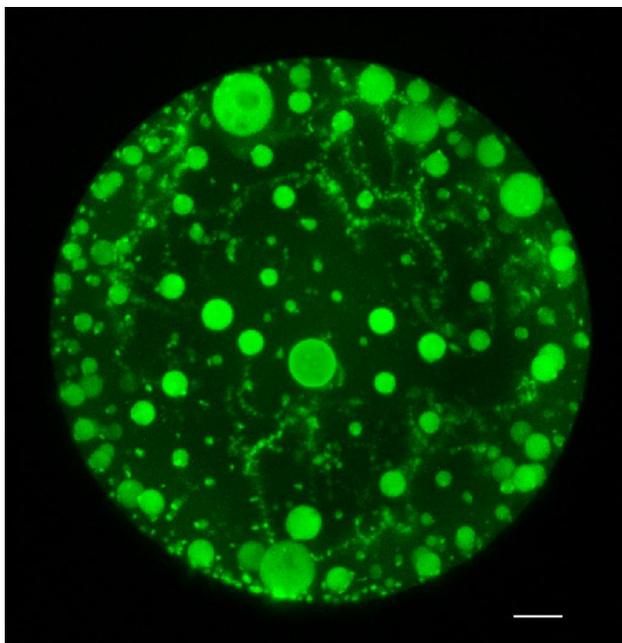


Рис. 8. Окраска ядра с помощью SYTOX® Green, видны хромосомы типа ламповых щёток и экстрахромосомные тельца разной морфологии и размеров. Конфокальная микроскопия – максимальная проекция, масштабная линия 10 мкм.

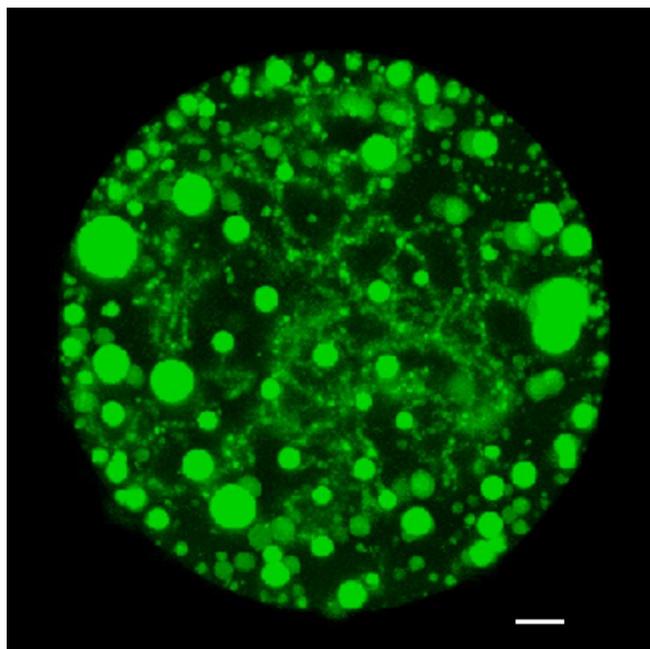


Рис. 9. Окраска ядра с помощью SYTOX® Green, видны хромосомы типа ламповых щёток и экстрахромосомные тельца разной морфологии и размеров. Конфокальная микроскопия – максимальная проекция, масштабная линия 10 мкм.

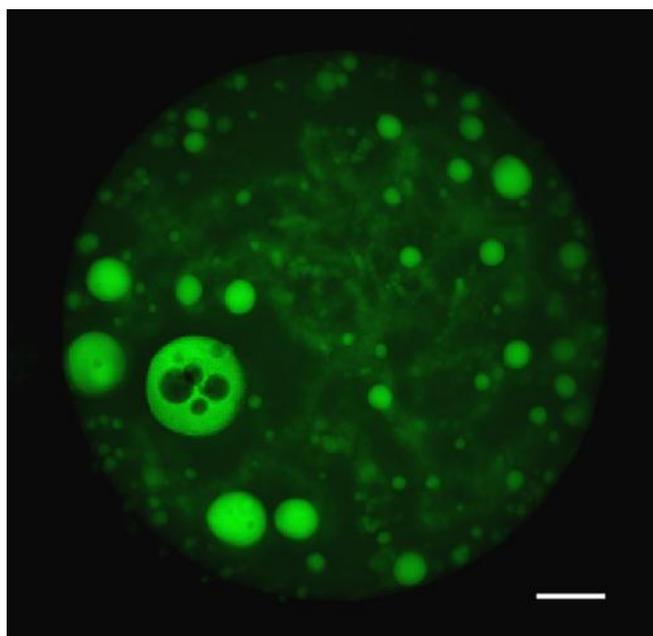


Рис. 10. Окраска ядра с помощью RiboGreen, видны РНК-содержащие тельца и РНК на ламповых щётках. Конфокальная микроскопия – максимальная проекция, масштабная линия 10 мкм.

3.2 Характеристика хромосом в растущих ооцитах

При анализе хромосом, изолированных микрохирургическим методом из ядер растущих ооцитов и снятых на эпифлуоресцентном микроскопе, стало очевидно, что у *T. scripta* во время оогенеза все хромосомы без исключения (микро и макро хромосомы),

принимают форму ламповых щёток, имеющих характерное хромомерно-петлевое строение (рис. 11). Были проанализированы препараты содержимого ядер ооцитов у 7-ми взрослых самок. Помимо хромосом, препараты содержали амплифицированные экстрахромосомные ядрышки (АЯ).

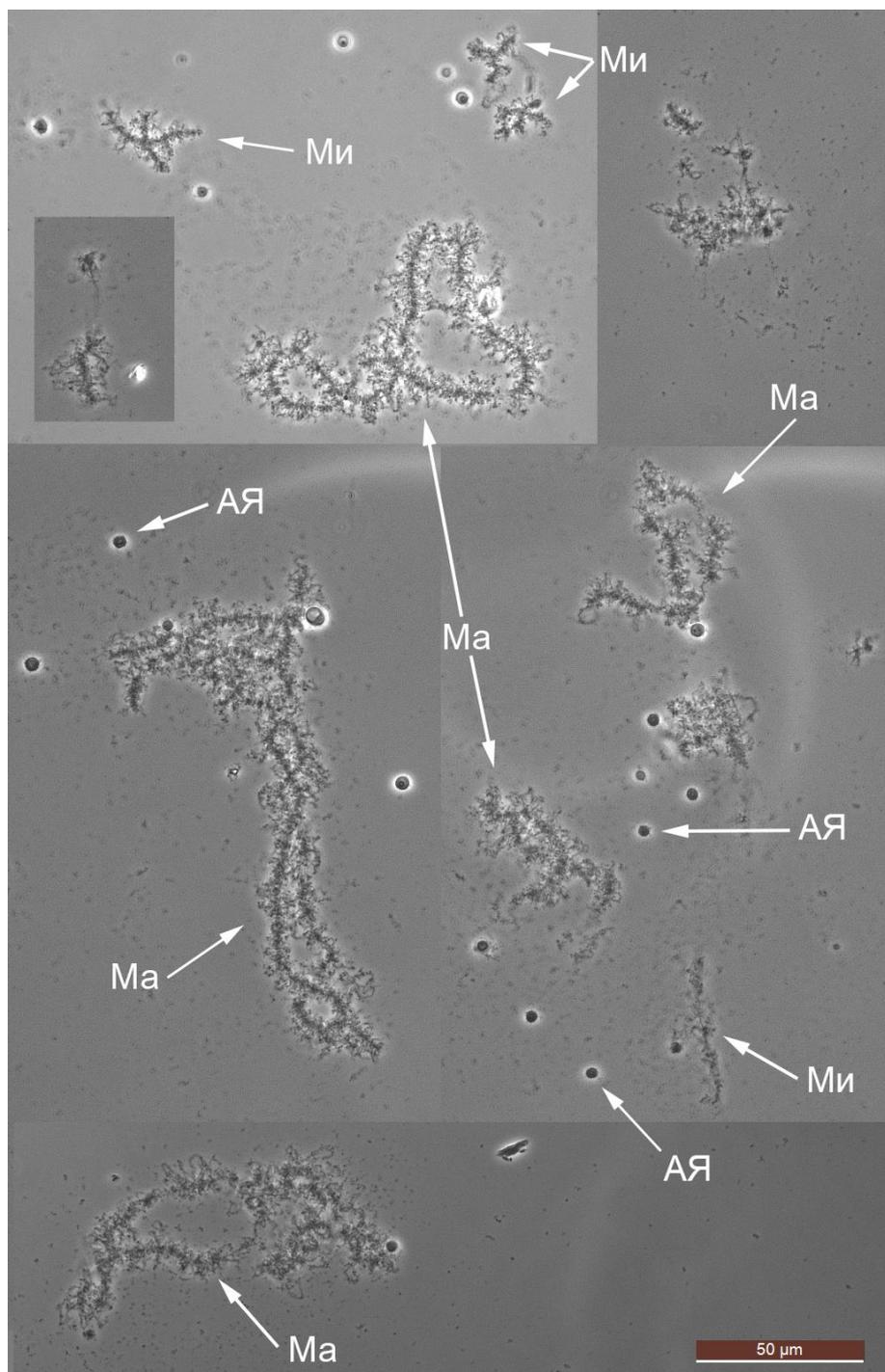


Рис. 11. Хромосомы типа ЛЩ из одного ядра. Фазовый контраст, увеличение 40х. Ма – макрохромосома, Миди – Мидихромосома, Ми – микрохромосома, АЯ – Амплифицированное ядрышко.

Макрохромосомы

В кариотипе *T. scripta* две макрохромосомы, которые на стадии ЛЩ в несколько раз крупнее микрохромосом. Число хиазм в макробивалентах достигает 5-ти. Приведенная на рис. 12 и 13 хромосома была самой крупной и имела длину 135 мкм. Этот бивалент имел 4 хиазмы, и боковые петли на нем достигали в длину 26 мкм. Другая крупная ЛЩ (рис.14 и15) имела длину 130 мкм, на этом биваленте видны 3 хиазмы и длина самой длинной петли составляет 35 мкм. Мы полагаем, что два эти бивалента представляли макрохромосомы, хотя полный кариотип *T. scripta* на стадии ЛЩ не был нами проанализирован.

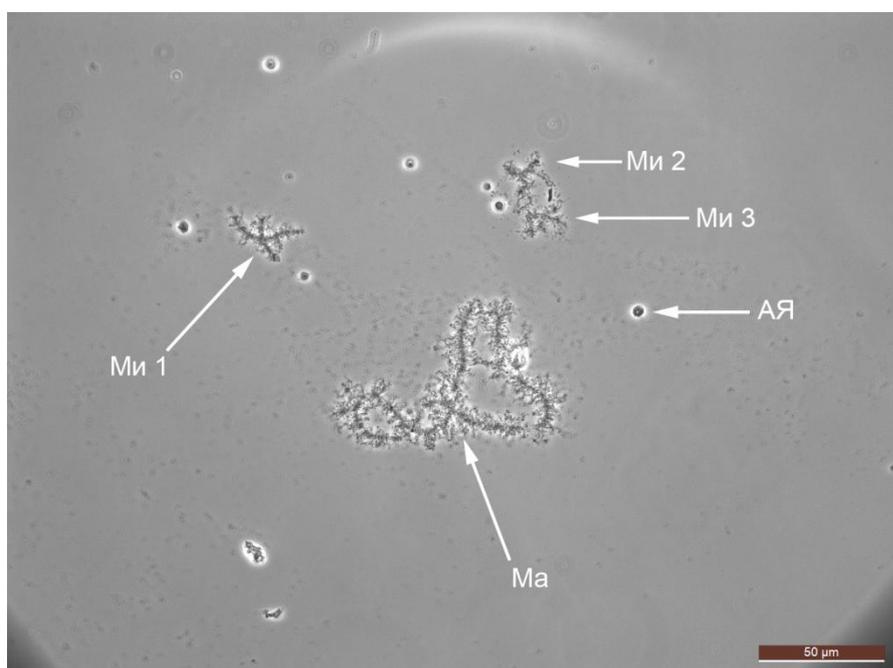


Рис. 12. Фазовый контраст, увеличение 40х. Ма – макрохромосома, Ми1 - микрохромосома 1, Ми2 – микрохромосома 2, Ми3 – микрохромосома 3, АЯ – амплифицированное ядрышко.

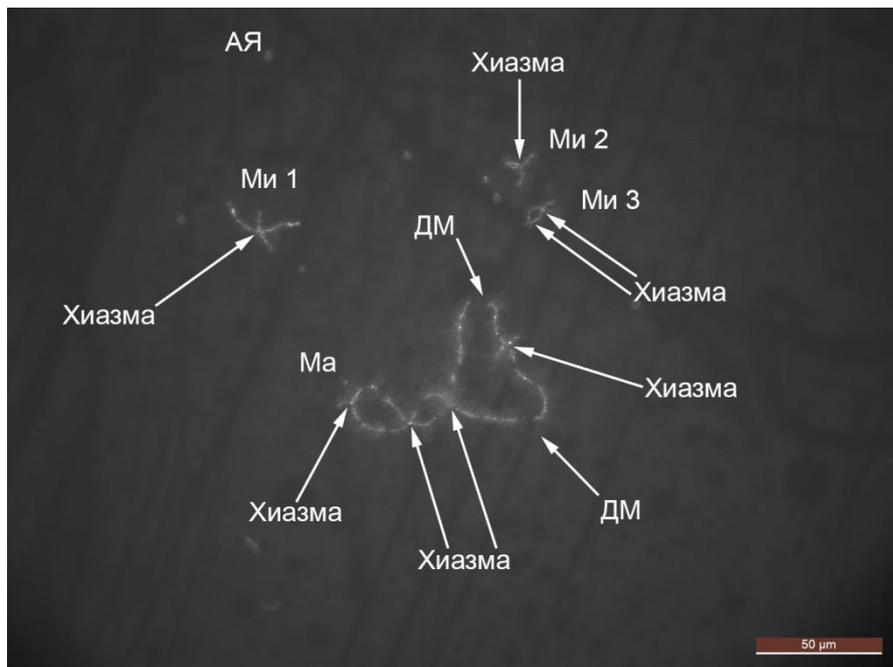


Рис. 13. Та же хромосома, что и на рис. 12. DAPI, флуоресцентная микроскопия, увеличение 40х. Ма – макрохромосома, Ми1 - микрохромосома 1, Ми2 – микрохромосома 2, Ми3 – микрохромосома 3, АЯ – амплифицированное ядрышко, ДМ – двойной мост.

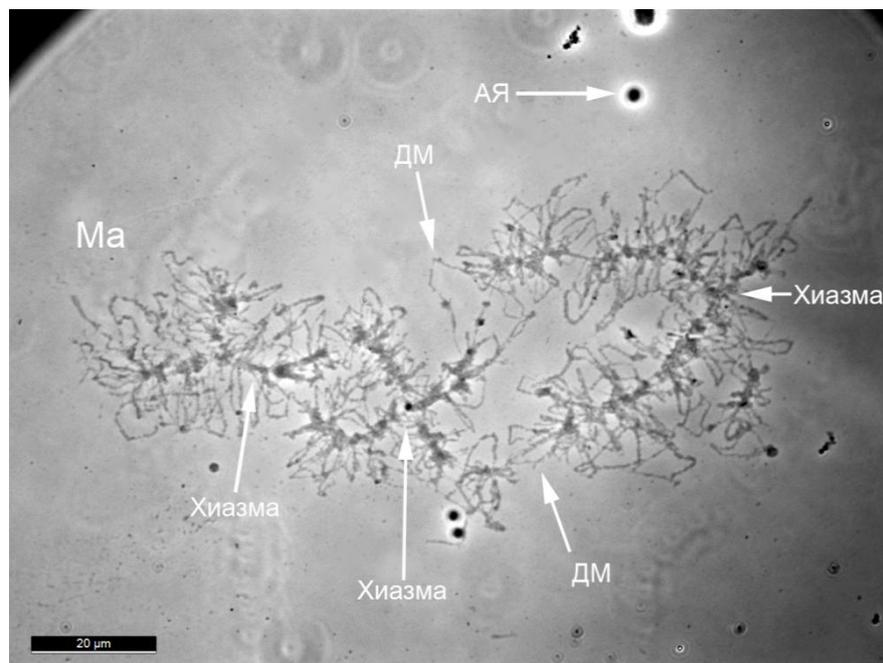


Рис. 14. Фазовый контраст, увеличение 100х. Ма – макрохромосома, АЯ – амплифицированное ядрышко, ДМ – двойной мост.

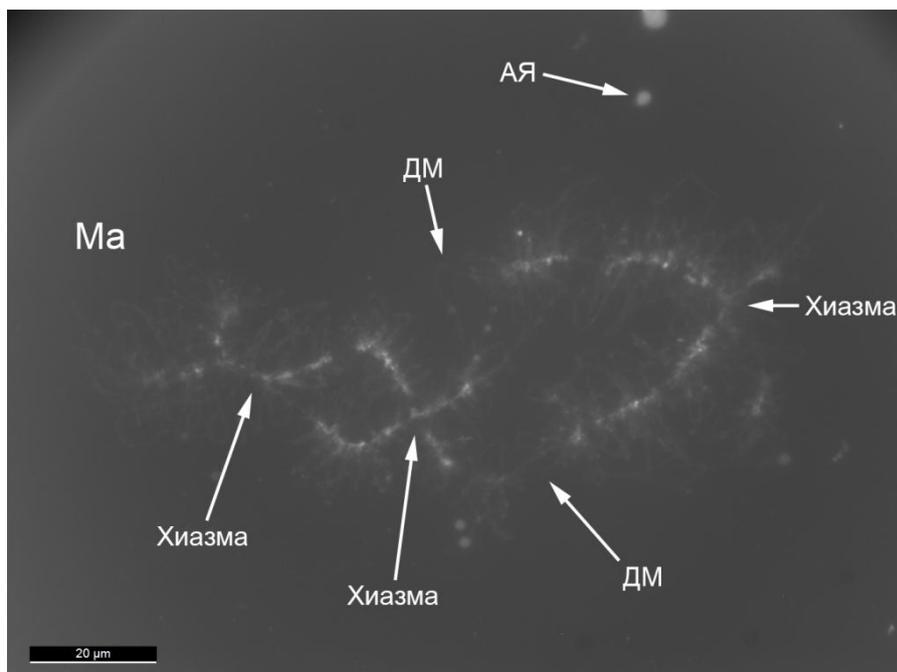


Рис. 15. Та же хромосома, что и на рис. 14. DAPI, флуоресцентная микроскопия, 100х.

Ма – макрохромосома, АЯ – амплифицированное ядрышко, ДМ – двойной мост.

Микрохромосомы

Микрохромосомы значительно менее крупные чем макрохромосомы и, как мы считаем, обладают одной или двумя хиазмами. Микрохромосомы представлены на рис. 12 и 13 (обозначены Ми1, Ми2, Ми3). Ми1 имеет размер 25 мкм, длина её максимальной петли составляет 10 мкм и у этой микрохромосомы имеется одна хиазма. Ми2 имеет размер 12 мкм, одну хиазму, и её самая длинная петля достигает 25 мкм. Ми3 имеет размер 15 мкм, обладает 2-мя хиазмами и самая длинная её петля достигает 10 мкм. Микробивалент на рис. 16 и 17 – из другого ядра, имеет две хиазмы, длина гомологов – 45 мкм, максимальный размер петель – 50 мкм.

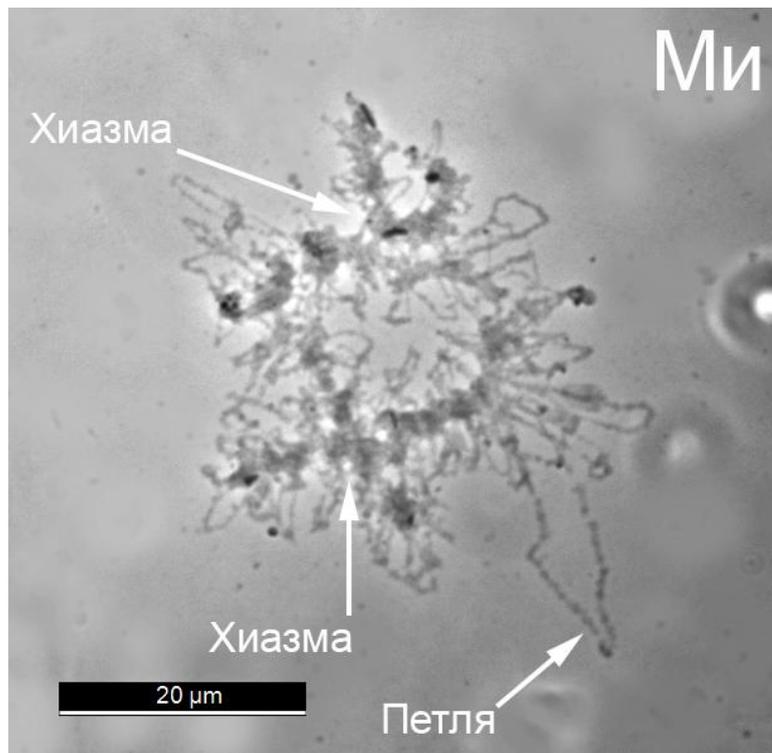


Рис. 16. Фазовый контраст, увеличение 100х, Ми – микрохромосома.

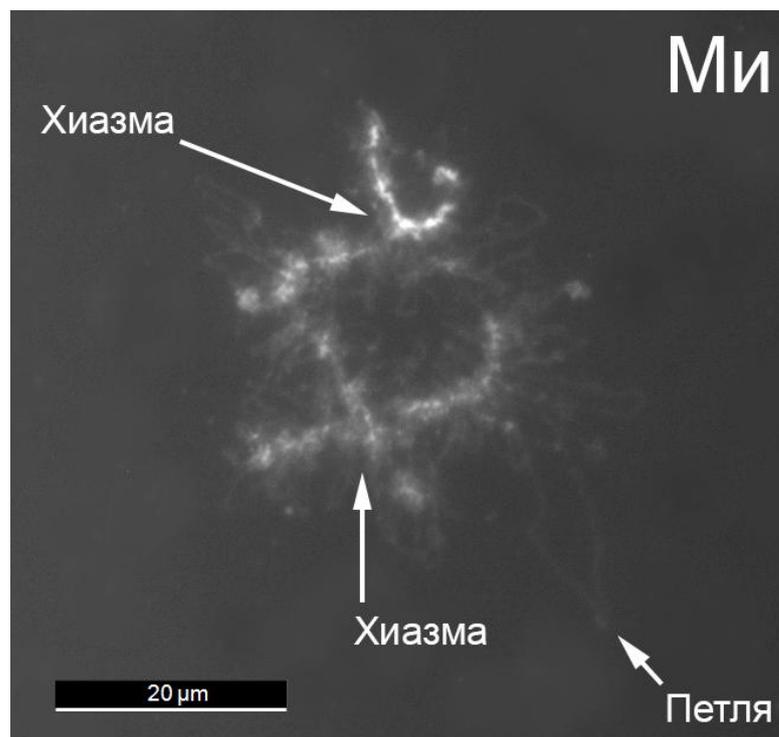


Рис. 17. Та же хромосома, что и на рис. 16. DAPI, флуоресцентная микроскопия, 100х,
Ми – микрохромосома.

На рис. 18 можно видеть, что боковые петли ЛЩ содержат асимметричные единицы РНП-матрикса, которые, как известно, соответствуют единицам транскрипции. На длинных петлях эти единицы могут быть очень длинными и по градиенту матрикса можно определить направление транскрипции. По всей видимости, однако, на самой длинной петле описываемой микрохромосомы присутствует более, чем одна, транскрипционная единица. Петли на микробивалентах, могут превышать размер самих хромосом ЛЩ, образуя огромные выпетливания (рис. 16-18).

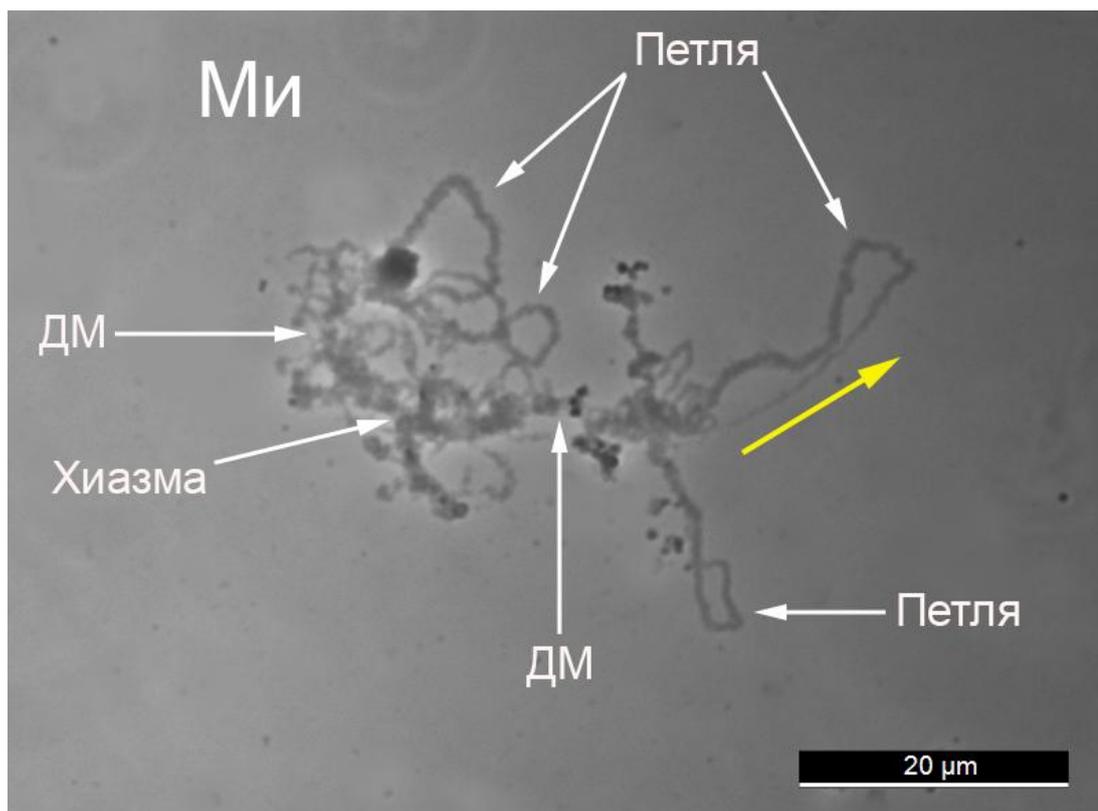


Рис. 18. Микрохромосома (Ми). Отчетливо видны градиенты РНП-матрикса на боковых петлях. Фазовый контраст, увеличение 100х. ДМ – двойной мост, жёлтая стрелка показывает направление транскрипции.

К сожалению, идентифицировать биваленты в соответствии с кариотипом *T. scripta*, опубликованным Ф. Клейтоном (Cleiton, Giuliano-Caetano, 2008), нам не удалось, также как несостоятельной оказалась попытка выявить одни и те же хромосомы в разных ядрах. Причина заключалась в том, что на предоставленных нам препаратах не было полных наборов бивалентов и, кроме того, схожие признаки на хромосомах (хромомеры, двойные мосты, маркерные петли) были не столь очевидны, как ожидалось. Здесь следует отметить, что по нашим наблюдениям, на ламповых щетках красноухой черепахи все боковые петли могут быть отнесены к категории простых боковых петель по классификации Г. Моргана

(Morgan, 2002), а сложные боковые петли, судя по всему, отсутствуют. Это обстоятельство создает сложности при идентификации бивалентов и составлении цитологических карт ЛЩ.

3.3 Цитологические карты макрохромосом и микрохромосом

На приведенных выше микрофотографиях фазовоконтрастных изображений бивалентов и окрашенных DAPI ЛЩ мы измерили длины гомологов, просчитали число и оценили размеры хромомеров, на основании чего составили цитологические карты 2-ух макро- и 4-ех микрохромосом в фазе ЛЩ. На картах отражена степень конденсации хромомеров (чем более тёмные гранулы, тем более конденсированные хромомеры), их размер (чем более крупные гранулы, тем более крупные хромомеры), а также порядок их расположения на хромосоме и расстояния между соседними хромомерами.

Цитологические карты макрохромосом

Ma



Рис. 19. Цитологическая карта макрохромосомы, приведенной на рис. 12 и 13. Длина каждого гомолога 135 мкм (на карте эквивалентно 2700 пикселям), число хромомеров разного размера - 64.

На следующем рисунке приведена цитологическая карта макрохромосомы ЛЩ из ядра другого ооцита.

Ma



Рис. 20. Цитологическая карта макрохромосомы, приведенной на рис. 14 и 15. Длина – 130 мкм (2600 пикселей на карте), общее число хромомеров разного размера – 40.

Цитологические карты микрохромосом

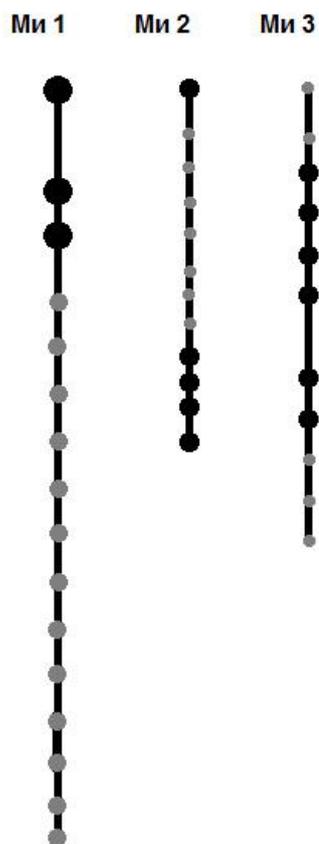


Рис. 21. Карты трех микрохромосом (Ми1, Ми2, Ми3), приведенных соответственно на рис. 12 и 13.

На рис. 21 представлены карты трёх микрохромосом из одного ядра. Микрохромосома 1 (Ми1) имеет длину 25 мкм, что соответствует 500 пикселям на карте. Число хромомеров на Ми1 – 16. Микрохромосома 2 (Ми2), длина этой хромосомы – 12 мкм (240 пикселей на карте), число хромомеров – 12. Микрохромосома 3 (Ми3) имеет длину 15 мкм, что эквивалентно 300 пикселям на карте, число хромомеров – 11.

Ми



Рис. 22. Цитологическая карта микрохромосомы из другого ядра (изображение приведено на рис. 16 и 17). Длина бивалента 45 мкм (900 пикселей на карте), число хромомеров – 22. Мы предполагаем, что приведенную на рис. 16, 17 и картированную на рис. 22 хромосому следует отнести к средней модальной группе хромосом *T. scripta*, а именно к мидихромосомам. Она имеет большую длину чем описанные выше микрохромосомы, содержит больше хромомеров, отличающихся по степени конденсации и расположению.

3.4 Нуклеолярный аппарат в растущих ооцитах *T. scripta*

Используя сочетание иммунофлуоресценции антител против нуклеолина и РНК-ДНК FISH с ДНК-зондом к 5' ETS рибосомного повтора *T. scripta* на криосрезях яичников красноухой черепахи (рис.23 - 26), мы получили результаты, свидетельствующие о том, что находящиеся под оболочкой ядра тельца бесспорно представляют амплифицированные ядрышки. На рис. 26 видно, что флуоресцентные сигналы маркерного белка ядрышек нуклеолина и ДНК-зонда 5' ETS колокализуются в этих структурах.

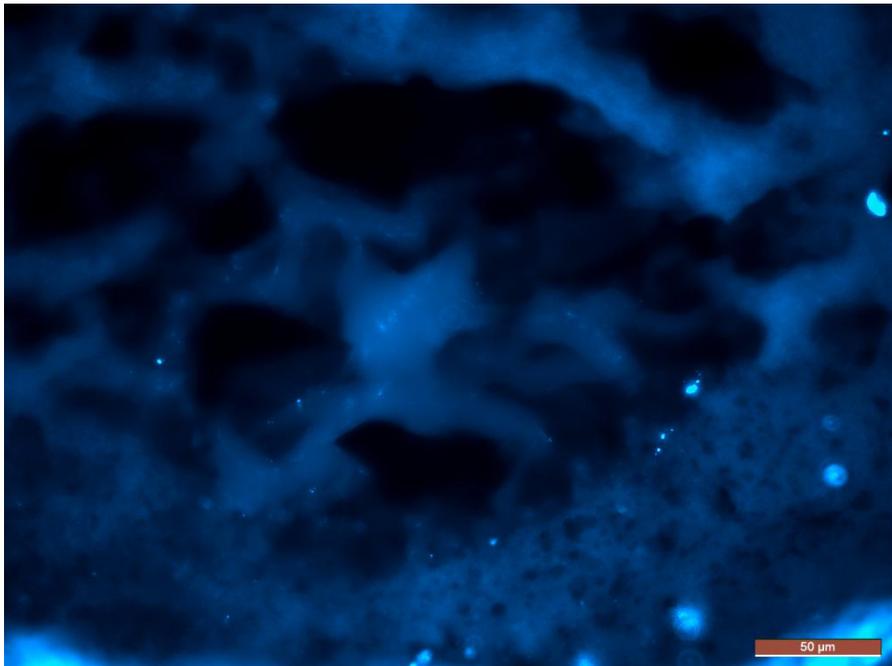


Рис. 23. Фрагмент яичника красноухой черепахи. Криосрез, окраска DAPI, флуоресцентная микроскопия, увеличение 40х.

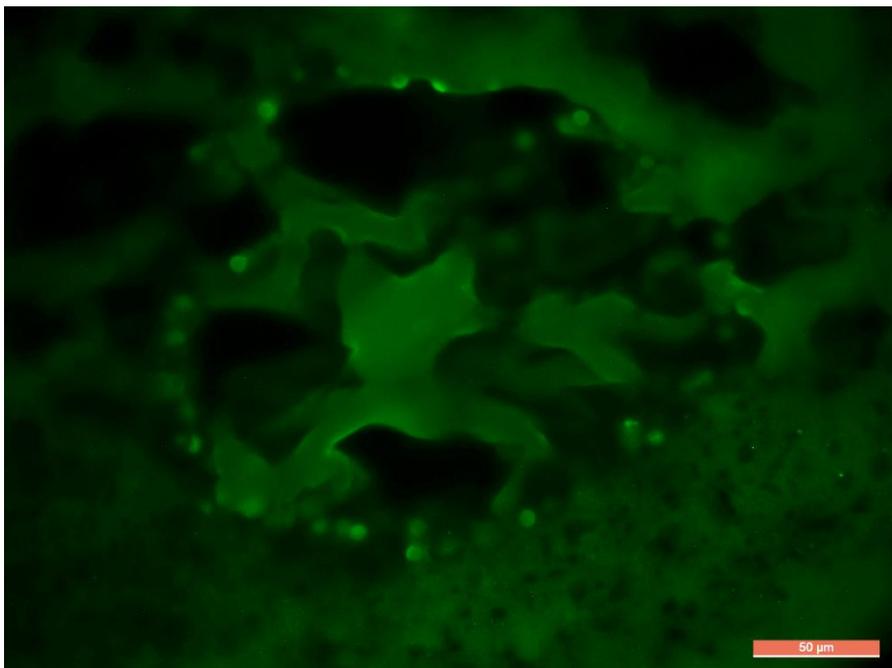


Рис. 24. Тот же срез, что на предыдущем рисунке. Иммунофлуоресценция маркерного белка ядрышка - нуклеолина, увеличение 40х. Ядрышки локализованы по периферии ядра.

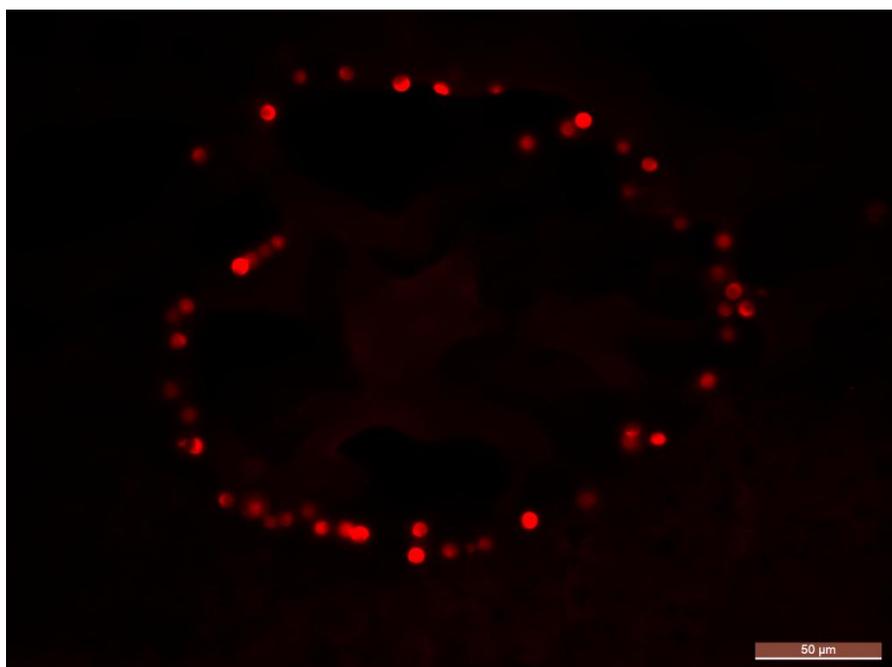


Рис. 25. Тот же срез, что на рис. 23 и 24. Локализация 5' ETS-зонда, флуоресцентная микроскопия, увеличение 40х.

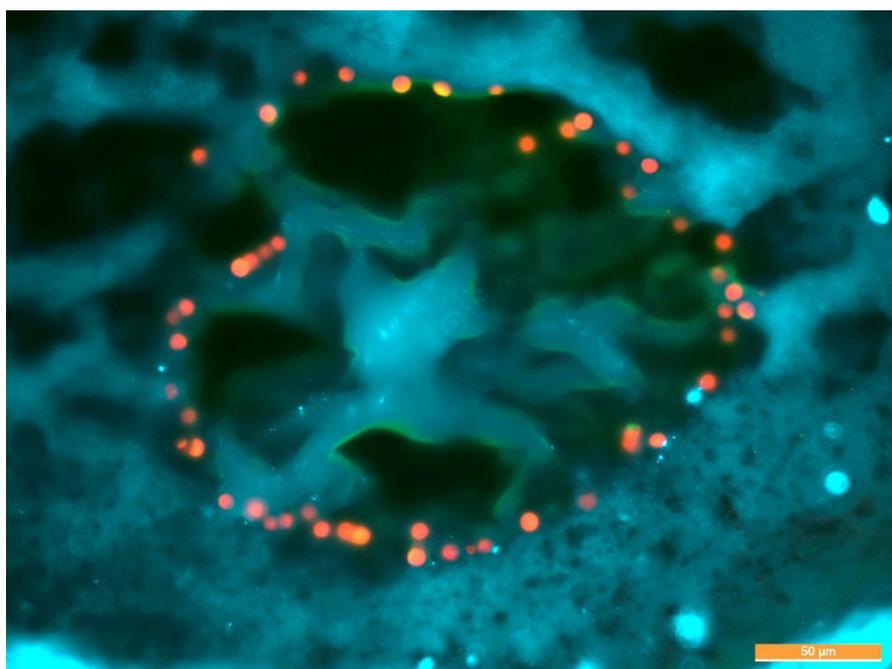


Рис. 26. Совмещение предыдущих изображений (рис. 23-25) и демонстрация колокализации нуклеолина и зонда 5' ETS.

3.5 Анализ транскрипционной активности рибосомных генов

Анализ транскрипционной активности рибосомных генов был проведён с использованием ДНК-РНК FISH с денатурированным ДНК зондом к 5' ETS на криосрезах, без обработки РНКазой.

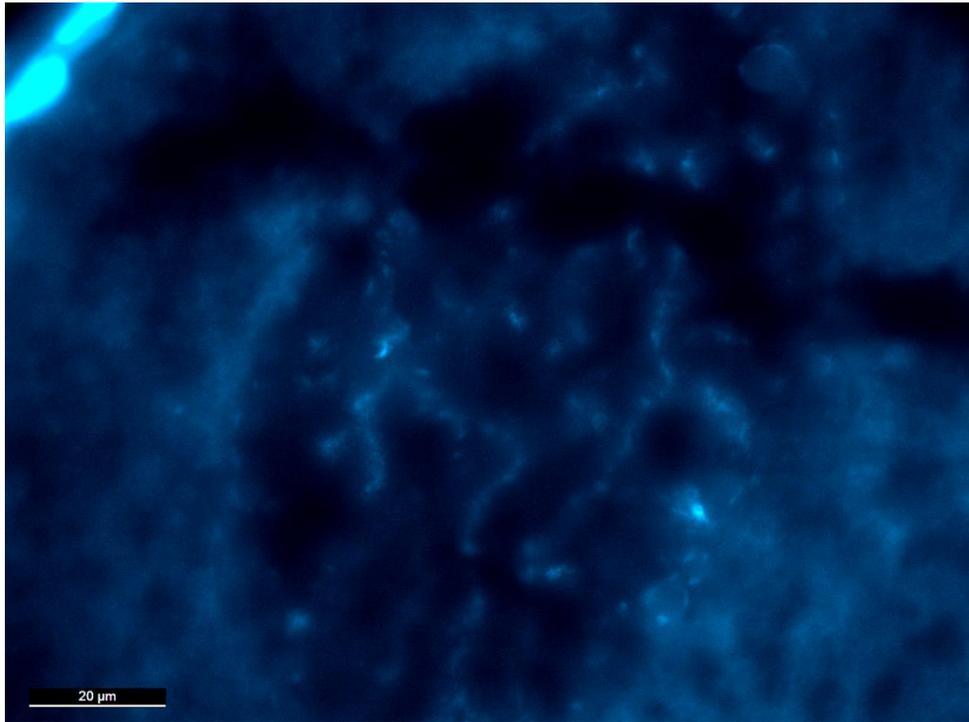


Рис. 27. Окраска хроматина с помощью DAPI, флуоресцентная микроскопия, увеличение 100х.

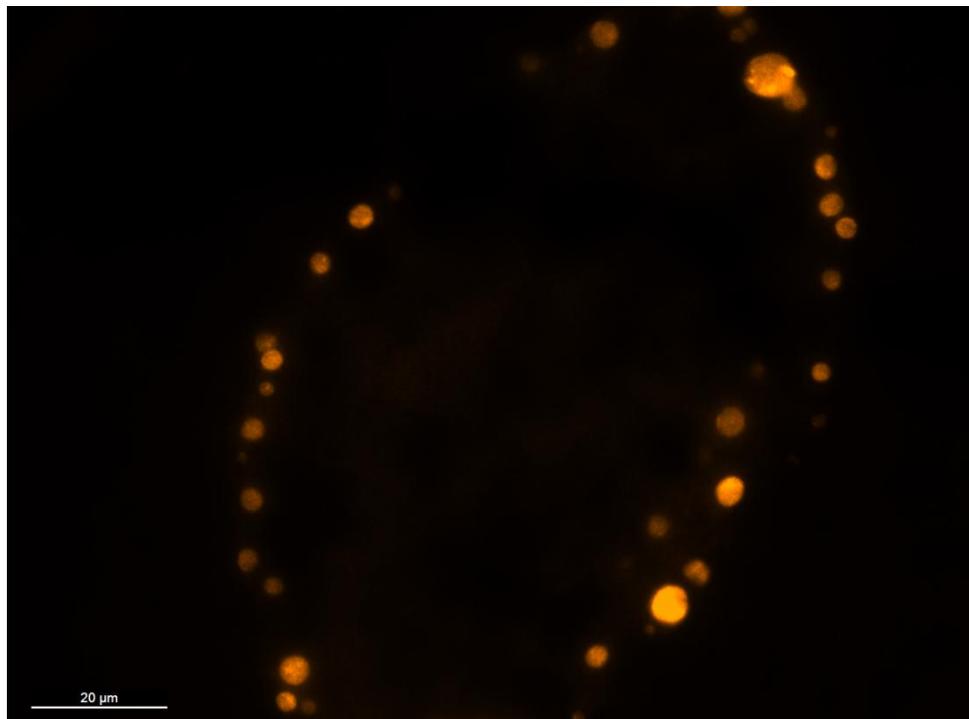


Рис. 28. Гибридизация 5' ETS зонда в ядрышках, флуоресцентная микроскопия, увеличение 100х.

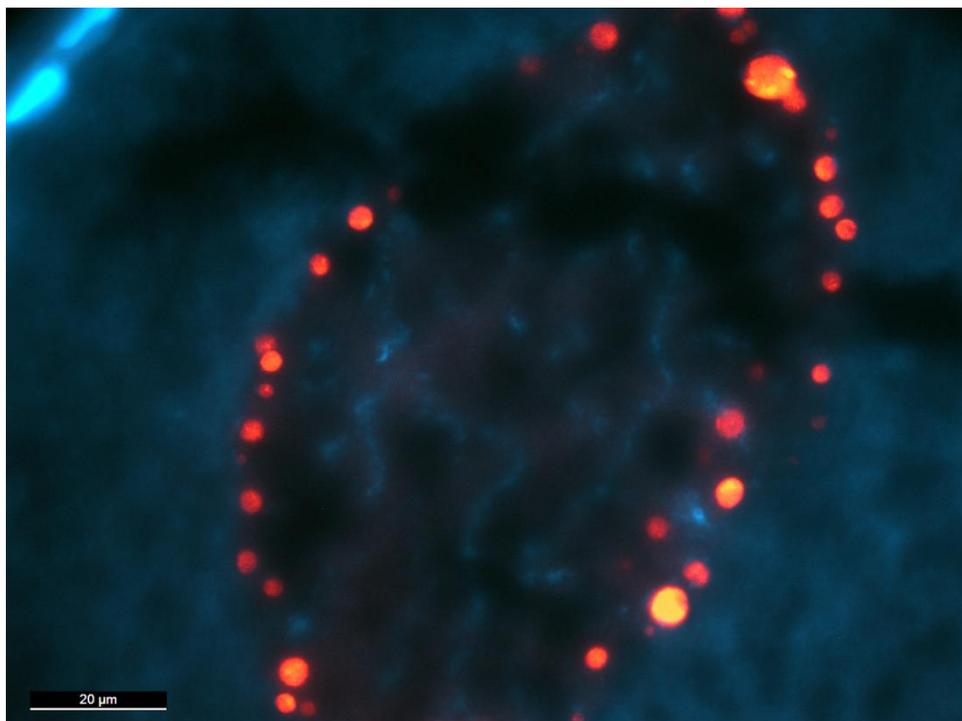


Рис. 29. Совмещение двух изображений (рис. 27 и 28), увеличение 100х.

Из трёх выше расположенных изображений (Рис. 27, 28, 29) можно сделать вывод, что в ядре растущего ооцита *T. scripta* присутствует большое число амплифицированных экстрахромосомных ядрышек, которые имеют разные размеры и локализуются непосредственно под оболочкой ядра. Ядрышки имеют очень разные размеры и демонстрируют неоднородную флуоресценцию зонда. На рис. 28 и 29 внутри наиболее крупных ядрышек видны более ярко флуоресцирующие точки. Мы полагаем, что гомогенная флуоресценция ядрышек обусловлена гибридизацией зонда с новосинтезированной пре-рРНК, тогда как более ярко флуоресцирующие гранулы внутри ядрышек могут представлять амплифицированные гены рРНК, выявленные ДНК-ДНК гибридизацией

3.6 Биоинформатический анализ последовательности IGS

Используя последовательность геномной сборки бугорчатой черепахи *Malaclemys terrapin* (вид - двойник *T. scripta*), Александр Демин собрал нуклеотидную последовательность кластера генов рРНК и межгенного спейсера IGS *M. Terrapin*, после чего эта последовательность была использована как референс для сборки рибосомного повтора *T. scripta*. Основываясь на этих данных, мы провели детальный анализ структуры IGS, то есть межгенного спейсера, структура которого предположительно может влиять на структуру ядрышка (Thiry, Lafontaine, 2005).

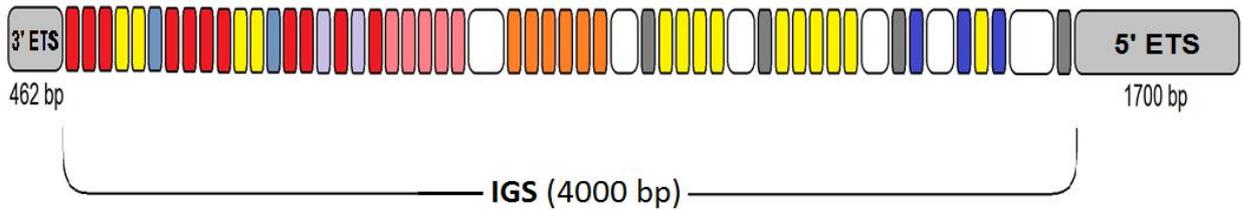


Рис. 30. Схема организации межгенного спейсера IGS. Длина последовательности IGS – 4000 пар нуклеотидов, разными цветами внутри IGS отмечены разные повторяющиеся элементы.

В результате проведенного анализа, мы установили, что у красноухой черепахи длина межгенного спейсера - 4000 п.н. Его сложное строение обусловлено большим числом вырожденных повторов, порядок которых указан на Рис. 30. Установленная структура межгенного спейсера не имеет общих черт со структурой IGS птиц (которые представляют эволюционно наиболее близкий рептилиям класс). Кроме того, длина межгенного спейсера (4000 п. н.) у *T. scripta* практически в 4 раза меньше, чем у птиц (у них размер IGS колеблется от 12000 до 14000 п. н.). Таким образом, если брать во внимание, что у птиц функционируют неамплифицированные трехкомпонентные ядрышки, а у красноухой черепахи амплифицированные двухкомпонентные ядрышки, корреляция между размером межгенного спейсера и ультраструктурой ядрышка подтверждается.

4. Обсуждение

Два класса позвоночных – Птицы (Aves) и Рептилии (Reptilia) являются эволюционно близкими и объединены в группу Sauropsida. Сходство в развитии ооцитов и, в частности, функциональной организации ядер (зародышевых пузырьков) в растущем ооците между птицами и рептилиями на примере домашней курицы и ящериц было отмечено ранее (Koshel et al, 2016). Однако функциональная организация ядра в растущих ооцитах птиц изучена значительно лучше (Gaginskaya et al., 2009), чем в ооцитах рептилий, в частности у представителей отрядов Crocrodilia и Testudines, которые эволюционно находятся к птицам ближе, чем ящерицы. Нашей целью было изучение организации ядра и ядерных структур в растущих ооцитах половозрелых самок красноухой черепахи *Trachemys scripta* и сравнение с особенностями организации зародышевых пузырьков в растущих ооцитах птиц.

4.1 Хромосомы типа ламповых щёток в растущих ооцитах *T. scripta*

Мы провели анализ конфокальных 3D изображений ядер ооцитов *T. scripta* (рис. 8, 9, 10). Эти ядра были изолированы из ооцитов взрослых самок и окрашены с помощью флуорохромов, специфичных к нуклеиновым кислотам. Был сделан определённый вывод, что все хромосомы в зародышевых пузырьках красноухой черепахи находятся в состоянии ламповых щёток, а также были выдвинуты логичные предположения, что в ядре на стадии ламповых щеток идёт активная транскрипция ДНК на боковых петлях ламповых щеток и что многочисленные экстрахромосомные тельца являются ядрышками. Последнее предположение было впоследствии подтверждено с использованием зонда к 5' ETS на рДНК-рРНК (рис. 26 и 29).

Нам удалось охарактеризовать хромосомы, изолированные из растущих ооцитов красноухой черепахи, в ходе анализа препаратов изолированного содержимого зародышевых пузырьков и мы пришли к заключению, что все хромосомы, включая и микро-, и макрохромосомы в них преобразуются в ЛЩ. При оогенезе у *T. scripta* хромосомы имеют выраженное хромомерно-петлевое строение (рис. 11), которое имеют хромосомы данного типа и в других организмах, таких как *Fringilla coelebs* (зяблик) или *Coturnix japonica* (перепел) (Saifitdinova, et al., 2003; Daks, et al., 2010). Следует отметить, что таких структур как центромерные белковые тела (присутствующие на ламповых щетках зяблика и других птиц) на ламповых щетках черепахи мы не наблюдали. В то же время, нам удалось выявить и охарактеризовать в ядрах растущих ооцитов красноухой черепахи экстрахромосомные амплифицированные ядрышки (рис. 11). Таким образом мы подтвердили высказанное ранее Каллебаутом (Callebaut et al., 1997) предположение о том,

что в оогенезе красноухой черепахи происходит амплификация рибосомных генов. Это существенно отличает оогенез черепах (и, по-видимому, крокодилов) от оогенеза птиц. Общие характеристики оогенеза, такие как: множественные ядрышки, расположенные по периферии ядерной мембраны, увеличение самого ядра в размерах благодаря деконденсации хроматина и формированию ламповых щеток, активное развитие фолликулярного эпителия, также наблюдаются среди других черепах, например у морской черепахи *Eretmochelys imbricata*, или у китайской мягко-телой черепахи *Pelodiseus sinensis* (Pérez-Bermúdez, et al., 2012; Nainan, et al., 2010).

Причина того что при анализе препаратов изолированного из ооцитов содержимого ядер на них не оказывалось полного набора хромосом, может заключаться в том что при выделении хромосом из зародышевого пузырька разорванная ядерная оболочка может скрыть в себе хромосомы. Помимо этого, хромосомы имеют свойство сильно агрегировать друг с другом и, кроме того, возможна диссоциация хромосом со стекла во время центрифугирования препаратов ламповых щеток в соответствии с протоколом. Для более эффективного выделения хромосом типа ламповых щеток из ооцитов красноухой черепахи, возможно, следует изменить протокол для предотвращения агрегации хромосом друг с другом.

Несмотря на указанные выше помехи, нам удалось оценить строение ламповых щеток и составить цитологические карты хромосом рис. 19, 20, 21 и 22, они наглядно демонстрируют относительные размеры хромосом и особенности хромомеров на них (размер, конденсацию, порядок распределения, а также расстояния между хромомерами).

4.2 Ядрышки в растущих ооцитах *T. scripta*

Как упоминалось ранее, у разных животных ядрышко может состоять из разного количества компонентов, предположительно переход от 2-ух компонентному к 3-ёх компонентному ядрышку произошёл вследствие амплификации повторов внутри IGS, возможно, в ходе эволюции ананний в амниот. M. Thiry и D. Lafontaine (Thiry and Lafontain, 2005) высказали предположение, что в ходе эволюции межгенный спейсер, который располагается между кластерами генов рРНК, увеличивался в размере в результате дупликации и/или транслокации повторов внутри него. Это привело к "выталкиванию" части рДНК из фибрилярного компонента, образованию, таким образом, еще одного (плотного фибрилярного) компонента и, соответственно, формированию в эволюции трёх-компонентного ядрышка. Появление дополнительного компонента в ядрышке позволило ему более быстро и эффективно выполнять свои функции (Thiry, Lafontaine, 2005).

В то же время, наши данные указывают на то, что межгенный спейсер в рибосомном повторе *T. scripta* достаточно мал и имеет длину около 4000 пар нуклеотидов, что почти в 4 раза меньше чем у птиц (у которых он составляет 12-14000 пар нуклеотидов). Соответственно, полученные результаты косвенно подтверждают предположения M. Thiry и D. Lafontaine (Thiry and Lafontain, 2005) о связи размера IGS с количеством компонентов в ядрышке.

Превиталогенные ооциты черепах, амфибий и рыб имеют в основном периферийное расположение множественных ядрышек в ядре, в то время как в ядрах ооцитов птиц и чешуйчатых присутствует небольшое число центрально расположенных ядрышек. Соответственно, наверно, только центрально расположенные ядрышки в ядре ооцита у черепах, присутствовавшие на стадиях пре-ЛЩ и ЛЩ, сравнимы с ядрышками, которые найдены в ядрах ооцитов ящериц и птиц (Callebaut, et al., 1997).

У амфибий существует два пути образования ядрышек, в которые вовлечены и не вовлечены хромосомы на стадии ламповых щёток. В первом случае ядрышки образуются в районе ядрышкового организатора на хромосомах – либо на стадии ламповых щёток, либо до того, как хромосомы приняли данную форму. Так происходит у гребенчатого тритона *Triturus c. cristatus*. Второй способ подразумевает, что хромосомы на стадии ламповых щёток не участвуют в образовании ядрышек, соответственно, рДНК ядрышкового организатора амплифицирована прежде, чем хромосомы принимают форму ламповых щеток, но сборка ядрышек на амплифицированных копиях р-ДНК происходит уже после принятия хромосомами данной формы. Примером амфибии у которой происходит именно таким путём синтез ядрышек является *T. c. carnifex* (Macgregor, 1965). Однако на данный момент не известно, гомологичен ли механизм синтеза ядрышек у красноухой черепахи, одному из выше перечисленных механизмов образования ядрышек у амфибий. Мы не анализировали ранние стадии развития ооцитов.

В дополнение, наши результаты анализа транскрипционной активности рибосомных генов с использованием ДНК-РНК FISH с денатурированным ДНК зондом к 5' ETS, демонстрируют в ядрышках неоднородную флуоресценцию зонда (рис. 28 и 29). Причиной неоднородной флуоресценции, как мы считаем, является гибридизация зонда с пре-РНК (гомогенная флуоресценция ядрышек) и с рДНК (точки с яркой флуоресценцией). Яркая флуоресценция дискретных точек, как мы полагаем, демонстрирует амплифицированные копии рибосомных повторов, подтверждая амплификацию генов рРНК и, соответственно, амплификационную или экстрахромосомную природу краевых ядрышек.

Примером другого пути эволюции оогенеза могут быть ящерицы, при исследовании ядерных структур в оогенезе которых (семейства Lacertidae и Agamidae), было установлено что у всех хромосомы, принимали состояние ламповых щеток (как и у *T. scripta*), но периферийных амплифицированных ядрышек не обнаруживалось, однако, отсутствие ядрышек по периферии ядра и их функционирования, компенсируется хорошо развитым фолликулярным эпителием, который поставляет в ооцит белки и макромолекулы (Arronet, 1973).

Большое количество ядрышек у *T. scripta* локализуется непосредственно по периметру ядра с внутренней стороны ядерной мембраны, рис. 26 и 29. Это может быть объяснено тем, что ядрышки соединены с ядерными порами. Например, в дрожжах (*Saccharomyces cerevisiae*) продукт гена *Srp1*, который предотвращает фрагментацию ядрышек, а также, по-видимому, способствует не прямому взаимодействию РНК полимеразы 1 (в составе ядрышка) с нуклеопоринами в составе ядерных пор (Mélèse, Xue, 1995). Также при анализе мутантных клеток дрожжей (в плане экспорта мРНК из ядра) было высказано предположение, что ядрышко, находясь в непосредственной близости к ядерным порам, участвует в экспорте мРНК из ядра. Эти предположения были основаны на том, что в ядрышках у дрожжей обнаруживали мРНК с поли-адениновыми хвостами. (Kadowaki, et al., 1994; Mélèse, Xue, 1995)

Возможно, ядрышки у красноухой черепахи также соединены с нуклеопоринами (что объясняет их существенную локализацию непосредственно под ядерной мембраной) и, возможно, ядрышки участвуют в экспорте мРНК из ядра, но на данный момент, это только предположения.

Выводы

Подводя итог, в соответствии с поставленными задачами, были сделаны определённые выводы:

1. Ядро растущего ооцита *Trachemys scripta* на стадии ламповых щёток имеет сложную морфологию и содержит большое количество экстрахромосомных ДНК-РНК содержащих телец разных размеров.
2. Все хромосомы в растущих ооцитах красноухой черепахи преобразуются в типичные ламповые щётки с характерным хромомерно-петлевым строением.
3. В оогенезе *T. scripta* происходит амплификация рибосомных генов с образованием множественных экстрахромосомных ядрышек, активно транскрибирующих пре-рРНК.
4. Многочисленные РНК-содержащие тельца в ядрах растущих ооцитов красноухой черепахи, представляют собой типичные ядрышки, обогащённые маркерным белком нуклеолином.
5. В рибосомных повторах генома *Trachemys scripta*, межгенный спейсер (IGS) значительно короче и гораздо менее сложно организован, чем IGS у эволюционно близкой группы Aves, а также IGS красноухой черепахи более схож по структуре повторов с IGS амфибий.

Соответственно, на основе данных литературы и собственного исследования мы пришли к заключению, что ядро в растущем ооците черепахи по своей функциональной морфологии более схоже с ядром в растущих ооцитах представителей класса Amphibia, чем в ооцитах домашней курицы, относящейся к эволюционно более близкому рептилиям классу Aves.

Список литературы

1. Белоусов Л.В. Основы общей эмбриологии. — Москва: Издательство Московского университета: Наука, 2005.
2. Дондуа А.К. Биология развития. Том1. СПб.: Изд-во С.-Пб. ун-та, 2005
3. Равен Х. Оогенез: накопление биологической информации. М.: Мир. 1964
4. Callan, H. G. Lampbrush Chromosomes. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1986.
5. Davidson, E. Gene Activity in Early Development, 3rd Ed. Academic Press, Orlando, FL., 1986.
6. Flemming W. Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung. F. C. W. Vogel; Leipzig: 1882.
7. Gerald Kuchling, The Reproductive Biology of the Chelonia. Zoophysiology, 1999.
8. Alföldi Jessica, Federica Di Palma, Kerstin Lindblad-Toh, et al., The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. Nature. 2011; 477: 587–591.
9. Andraszek, Katarzyna and Elżbieta Smalec. Structure and functions of lampbrush chromosomes. BioTechnologia. 2011; 92(4): 337-344.
10. Andreuccetti P, C. Taddei, S. Filosa, Intercellular bridges between follicle cells and oocyte during the differentiation of follicular epithelium in *Lacerta sicula* Raf. Journal of Cell Science 1978; 33: 341-350.
11. Antón A, Martínez-Murcia AJ, Rodríguez-Valera F. Sequence diversity in the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the *Escherichia coli* ECOR collection. J Mol Evol. 1998 Jul; 47(1): 62-72.
12. Arronet N, V. Morphological Changes of Nuclear Structures in the Oogenesis of Reptiles (*Lacertidae*, *Agamidae*). Journal of Herpetology. 1973; 7: 163-193.
13. Burt D, W. Origin and evolution of avian microchromosomes. Cytogenet Genome Res 2002; 96: 97-112.
14. Calderón L, Martha & R De Pérez, Gloria & Ramirez Pinilla, Martha Patricia. Morphology of the ovary of *Caiman crocodilus* (*Crocodylia: Alligatoridae*). Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft. 2004; 186: 13-24.
15. Callebaut Marc & Van Nassauw, Luc & Harrisson, F. Comparison between oogenesis and related ovarian structures in a reptile, *Pseudemys scripta elegans* (turtle) and in a bird *Coturnix coturnix japonica* (quail). Reproduction, nutrition, development. 1997; 37: 233-52.
16. Chen M, Xu R, Ji H, et al. Transcriptome and long noncoding RNA sequencing of three extracellular vesicle subtypes released from the human colon cancer LIM1863 cell line. Scientific Reports. 2016; 6: 38397.

17. Cleiton Fantin & Giuliano-Caetano Lucia. Cytogenetic characterization of two turtle species: *Trachemys dorbigni* and *Trachemys scripta elegans*. 2008; 253-257.
18. Daks A. A, Deryusheva S. E, A. V. Krasikova, A. M. Zlotina, E. R. Gaginskaya, and S. A. Galkina. Lampbrush Chromosomes of the Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*): A New Version of Cytogenetic Maps. *Russian Journal of Genetics*. 2010; 46(10): 1178–1181.
19. Dej K.J., A.C. Spradling. The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during *Drosophila* oogenesis. *Development*. 1999 ; 126: 293-303.
20. Dyomin AG, Koshel EI, Kiselev AM, Saifitdinova AF, Galkina SA, et al. Chicken rRNA Gene Cluster Structure. *PLOS ONE* 2016; 11(6).
21. Gaginskaya E, Kulikova T, Krasikova A. Avian Lampbrush Chromosomes: a Powerful Tool for Exploration of Genome Expression. *Cytogenet Genome Res*. 2009; 124: 251-267.
22. Gall JG. Are lampbrush chromosomes unique to meiotic cells? *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*. 2012; 8: 905-909.
23. Ginisty H, H. Sicard, B. Roger, P. Bouvet. Structure and functions of nucleolin. *Journal of Cell Science* 1999; 112: 761-772.
24. Goodfellow SJ, Zomerdijk JCBM. Basic Mechanisms in RNA Polymerase I Transcription of the Ribosomal RNA Genes. *Sub-cellular biochemistry*. 2013; 61: 211-36.
25. Gregory, T.R. (2018). Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com>.
26. Guraya S.S. Germinal Beds, Oogenesis and Folliculogenesis. In: *Ovarian Follicles in Reptiles and Birds*. *Zoophysiology*, 1989; 24.
27. Handwerger KE, Cordero JA, Gall JG. Cajal Bodies, Nucleoli, and Speckles in the *Xenopus* Oocyte Nucleus Have a Low-Density, Sponge-like Structure. Richard McIntosh J, ed. *Molecular Biology of the Cell*. 2005; 16(1): 202-211.
28. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DL. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2010; 1(3): 415-31.
29. Kadowaki T, Chen S, Hitomi M, Jacobs E, Kumagai C, Liang S, Schneiter R, Singleton D, Wisniewska J, Tartakoff AM. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA transport-defective (mtr) mutants. *The Journal of Cell Biology*. 1994; 126(3): 649-659.
30. Kasai F, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA. Reassessment of genome size in turtle and crocodile based on chromosome measurement by flow karyotyping: close similarity to chicken. *Biology Letters*. 2012; 8(4): 631-635.

31. Kermekchiev M, Workman JL, Pikaard CS. Nucleosome binding by the polymerase I transactivator upstream binding factor displaces linker histone H1. *Molecular and Cellular Biology*. 1997; 17(10): 5833-5842.
32. Koshel, E., Galkina, S., Saifitdinova, A., et al. *Cell Tissue Res*. 2016; 366: 533
33. Krasikova, Alla et al. Centromeric protein bodies on avian lampbrush chromosomes contain a protein detectable with an antibody against DNA topoisomerase II. *Chromosoma*. 2004; 113: 316-323.
34. Kulikova T, Khodyuchenko T, Petrov Y, Krasikova A. Low-voltage scanning electron microscopy study of lampbrush chromosomes and nuclear bodies in avian and amphibian oocytes. *Scientific Reports*. 2016; 6: 36878.
35. Lamaye Françoise, Sonia Galliot, Lorenzo Alibardi, Denis L.J. Lafontaine, Marc Thiry, Nucleolar structure across evolution: The transition between bi- and tricompartmentalized nucleoli lies within the class Reptilia, *Journal of Structural Biology*, 2011; 174(2): 352-359.
36. Liu J-L, Gall JG. Induction of human lampbrush chromosomes. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*. 2012; 20(8): 971-978.
37. Lucchini, Stefania de et al. Molecular structure of the rDNA intergenic spacer (IGS) in *Triturus*: implications for the hypervariability of rDNA loci. *Chromosoma* 106. 1997: 315-326.
38. Lutes AA, Neaves WB, Baumann DP, Wiegräbe W, Baumann P. Sister Chromosome Pairing Maintains Heterozygosity in Parthenogenetic Lizards. *Nature*. 2010; 464(7286): 283-286.
39. Macgregor H.C. Chromomeres revisited. *Chromosome Res*. 2012; 20: 911.
40. Macgregor H.C. Lampbrush chromosomes. *J Cell Sci*. 1987; 88: 7–9.
41. Macgregor HC. The role of lampbrush chromosomes in the formation of nucleoli in amphibian oocytes. *Q J Microsc Sci*. 1965; 106(3): 215-28.
42. McStay B. Nucleolar organizer regions: genomic “dark matter” requiring illumination. *Genes & Development*. 2016; 30(14): 1598-1610.
43. Mélése Teri , Xue Zhixiong. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Current Opinion in Cell Biology*. 1995; 7(3): 319-324.
44. Morgan GT, Lampbrush chromosomes and associated bodies: new insights into principles of nuclear structure and function. *Chromosome Res*. 2002; 10: 177-200.
45. Morgan GT. Imaging the dynamics of transcription loops in living chromosomes. *Chromosoma*. 2018 Apr 3. doi: 10.1007/s00412-018-0667-8. [Epub ahead of print]
46. Nainan Hei, YangPing, Yang Yang, Liu Jinxiong, Bao Huijun, Liu Haili, Zhang Hui and Chen Qiusheng. Fine structural observation on the oogenesis and vitellogenesis of the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). *Zygote*. 2010: 109–120.

47. Ogg SC, Lamond AI. Cajal bodies and coilin—moving towards function. *The Journal of Cell Biology*. 2002; 159(1): 17-21.
48. Pérez-Bermúdez E1, Ruiz-Urquiola A, Lee-González I, Petric B, Almaguer-Cuenca N, Sanz-Ochotorena A, Espinosa-López G. Ovarian follicular development in the hawksbill turtle (*Cheloniidae: Eretmochelys imbricata* L.). *J Morphol*. 2012; 273(12): 1338-52.
49. Rahil KS, Narbaitz R. Ultrastructural studies on the relationship between follicular cells and growing oocytes in the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *Journal of Anatomy*. 1973; 115(Pt 2): 175-186.
50. Reed KM, Phillips RB. Structure and organization of the rDNA intergenic spacer in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Chromosome Res*. 2000; 8(1): 5-16.
51. Roussel P, André C, Comai L, Hernandez-Verdun D. The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *The Journal of Cell Biology*. 1996; 133(2): 235-246.
52. Rückert J. Zur Entwicklungsgeschichte des Ovarialeies bei Selachiern. *Anat Anz*. 1892; 7: 107-158.
53. Saifitdinova, A., Galkina, S., Volodkina, V., & Gaginskaya, E. Preparation of lampbrush chromosomes dissected from avian and reptilian growing oocytes. *Biological Communications*, 2017; 62(3): 165–168.
54. Saifitdinova, Alsu & Deryusheva, Svetlana & Krasikova, Alla & Gaginskaya, Elena. Lampbrush chromosomes of the chaffinch (*Fringilla coelebs* L.). *Chromosome research*. 2003; 11: 99-113.
55. Solovei IV, Joffe BI, Gaginskaya ER, Macgregor HC. Transcription of lampbrush chromosomes of a centromerically localized highly repeated DNA in pigeon (*Columba*) relates to sequence arrangement. *Chromosome Res*. 1996; 4: 588–603.
56. Solovei, Irina & Gaginskaya, Elena & Macgregor, Herbert. The arrangement and transcription of telomere DNA sequences at the ends of lampbrush chromosomes of birds. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*. 1994; 2: 460-70.
57. Thiry Marc, Denis L.J. Lafontaine. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. 2005; 15(4): 194–199.
58. Venema Jaap and Tollervey David. Ribosome Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*. 1999, 33: 261-311.

Благодарность

Хотелось бы выразить благодарность своему научному руководителю Елене Романовной Гагинской за её огромное терпение и неоценимую помощь несмотря ни на что.

Благодарю А.Г. Давидьян, А.Г. Демина, Е.И.Кошель, С.А. Галкину за методическую помощь и предоставленные для анализа препараты изолированных ядер и хромосом.

Также выражаю благодарность всем сотрудникам лаборатории структуры и функции хромосом и ресурсного центра "Хромас" за поддержку.