

УДК 576.3; 576.523

АНАНЬИНА Т.В., СТЕГНИЙ В.Н.

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета,

Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36, e-mail: tany_a@list.ru

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И КОЛЬЦЕВЫХ КАНАЛОВ ПИТАЮЩИХ КЛЕТОК *CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA* В ООГЕНЕЗЕ

Изучение оогенеза вносит существенный вклад в наше понимание механизмов, лежащих в основе процессов пролиферации и дифференцировки. Половые клетки часто развиваются в составе синцитиальных кластеров [1–3]. Оогенез в политрофных овариолах двукрылых насекомых начинается с асимметричного деления стволовых клеток: формируется дочерняя стволовая клетка и цистобласт, который затем подвергается нескольким раундам неполных митозов, в результате чего формируются группы из нескольких клеток, в которой одна из клеток дифференцируется в ооцит, а остальные начинают выполнять трофическую функцию – становятся питающими клетками (трофоцитами) [4, 5]. Ранний оогенез у двукрылых насекомых является привлекательной моделью для изучения формирования паттернов синцитиальных кластеров, и дифференцировки клеток в их пределах.

Деление стволовых клеток и формирование кластеров (цист генеративной линии) происходит в переднем отделе овариолы – гермарию. На начальных стадиях образования цисты важную роль в этом процессе играет внутриклеточная цитоскелетная структура – фусома. Фусома формируется в областях цитоплазматических мостиков и объединяет клетки кластера. С фусомой ассоциирован один из полюсов веретена деления при очередном делении клетки [6]. После того, как цистообразующие митозы завершились, фусома деградирует [7] и функцию обеспечения целостности и нормального функционирования многоклеточной цисты начинает выполнять цитоскелет входящих в её состав клеток. Ключевая роль в выполнении этой функции принадлежит кольцевым каналам – цитоскелетным образованиям, которые формируются во время митозов в местах неполного цитокинеза и обеспечивают свободный отток

цитоплазмы и нарабатываемых трофоцитами веществ в ооцит [8, 9]. Изменения, происходящие в актиновом цитоскелете трофоцитов во время оогенеза, направлены на поддержание формы клеток (кортикальный слой актина), обеспечение связи между клетками (кольцевые каналы) и нормального протекания процесса демпинга – быстрого выброса цитоплазмы питающих клеток в ооцит на заключительных этапах оогенеза (цитоплазматические актиновые фибриллы).

Исследования, проведенные нами ранее, показали сходство в строении овариол *C. erythrocephala* и *D. melanogaster* [10]. Также были изучены стадии формирования 16-ти клеточных кластеров в гермарию и показаны различия в рисунке связей клеток в разных цистах, который закладывается при формировании каждой цисты во время следующих друг за другом цистообразующих митозов. Рисунок связей между клетками (положение кольцевых каналов) фиксируется при смещении кластера в область гермарию 2b и остается неизменным в процессе роста и функционирования клеток в яйцевой камере [11]. Целью настоящего исследования было изучение изменения актинового цитоскелета синцитиальных кластеров в яичниках *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) на разных стадиях оогенеза.

Материалы и методы

C. erythrocephala из природной популяции г. Томска культивировали при 25 °С и длительности освещения 14 ч. в сут. В анализе использовали яичники самок имаго в возрасте от 1 до 7 сут. после выхода из пупария.

Овариолы были выделены в PBS и зафиксированы в 4% параформальдегиде (Sigma-Aldrich) в PBS 20 мин. Затем овариолы были инкубированы в 4% параформальдегиде в PBS с 0,1% Triton X-100 на протяжении 20 мин. при RT. Овариолы были окрашены раствором

фаллоидина, конъюгированного с FITC (Sigma) (1:100) в 4% параформальдегиде в PBS с 0,1% Triton X-100 20 мин. в темноте. После окрашивания овариолы были отмыты три раза по 5 мин. в PBS. Все процедуры проводились в микропробирках, объемом 1,5 мкл. Отдельные овариолы были помещены на предметное стекло в каплю DAPI-VECTASHIELD и накрыты покровным стеклом.

Анализ и регистрацию результатов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager Z.1 (Zeiss, Германия), CCD-камеры AxioCam и программного обеспечения AxioVision LE Rel. 4.5. Серии оптических срезов объемных препаратов получали с использованием модуля ApoTome (Zeiss). В программном модуле In Side 4D делали графическую реконструкцию части оптических срезов и анализировали трехмерные модели отдельных яйцевых камер, клеток и ядер.

Результаты и обсуждение

Актиновый цитоскелет трофоцитов и ооцита *C. erythrocephala* состоит из слоя кортикального F-актина, выстилающего внутреннюю поверхность клеточных стенок, актиновых фибрилл, находящихся в цитоплазме и актин-содержащих структур – кольцевых каналов. В процессе оогенеза происходят изменения всех трех составляющих актинового цитоскелета.

В германии фаллоидином интенсивно окрашиваются кольцевые каналы цист. Кортикальный актин в цистоцитах выражен слабо (рис. а). В среднем оогенезе на внутренней поверхности клеточных стенок ооцита и питающих клеток выявляются скопления актиновых филаментов, которые образуют многочисленные глыбки. На этой стадии кольцевые каналы, соединяющие трофоциты с ооцитом и трофоциты между собой, и области плазматической мембраны вокруг них морфологически сходны (рис. б, в). Затем области вокруг кольцевых каналов начинают укрепляться – формируется ореол из актиновых фибрилл, который придает кольцевому каналу дополнительную прочность (рис. г). Возле кольцевых каналов трофоцитов, контактирующих с ооцитом, по направлению к ядрам трофоцитов начинает формироваться сеть из толстых актиновых фибрилл. Эти конусы удерживают ядра трофоцитов не позволяя им заблокировать кольцевые каналы во время демпинга (рис. д).

В норме кольцевые каналы имеют

круглую форму. Утолщение краев кольцевых каналов и областей мембраны вокруг них путем интеграции актина и других дополнительных белков – фосфотирозина, аддуцина, Hts, Kelch и др. [12], направлено на поддержание максимального диаметра отверстий. Это важно для обеспечения оттока цитоплазмы и перемещения синтезируемых в питающих клетках продуктов в ооцит.

В овариолах старых мух встречаются яйцевые камеры с измененным количеством клеток в кластере и неправильно сформировавшимися кольцевыми каналами (рис. е). Такие каналы встречались чаще в яйцевых камерах с числом клеток меньше или больше 16-ти, т.е. в цистах, сформировавшихся в результате одного, двух, трех или пяти митотических делений. Нарушения в формировании актинового валика выражаются в изменении формы канала, в различной степени незамкнутости актинового валика, частичном расслоении или дополнительной полимеризации F-актина во внутренней области канала, которая может привести к практически полному закрыванию просвету канала (рис. е').

Дополнительная полимеризация актина вокруг кольцевых каналов и формирование актиновых филаментов в цитоплазме трофоцитов на поздних стадиях оогенеза характерны и для *D. melanogaster*: во время стадии оогенеза 10В от плазмалеммы в сторону ядер начинают полимеризоваться актиновые филаменты, образующие толстые пучки, фиксирующие ядра трофоцитов в центральной области клетки и не позволяющие им приблизиться к кольцевым каналам во время демпинга [13].

У *C. erythrocephala* на поздних стадиях оогенеза цитоплазматические пучки актина выражены в меньшей степени – они образуются только в непосредственной близости к кольцевым каналам между ооцитом и трофоцитами.

В исследованиях на дрозофиле показано, что белок Kelch играет роль в интеграции актина и белка HTS в формирующемся кольцевом канале. У Kelch-мутантов наблюдается образование диффузного массива актина в просвете канала [12]. Похожее нарушение мы наблюдали и у *C. erythrocephala*. Процесс формирования кольцевых каналов и их белковый состав консервативны [14], и дефекты кольцевых каналов у *C. erythrocephala*, вероятно, являются следствием тех же нарушений, которые происходят в оогенезе дрозофилы [12, 13, 15].

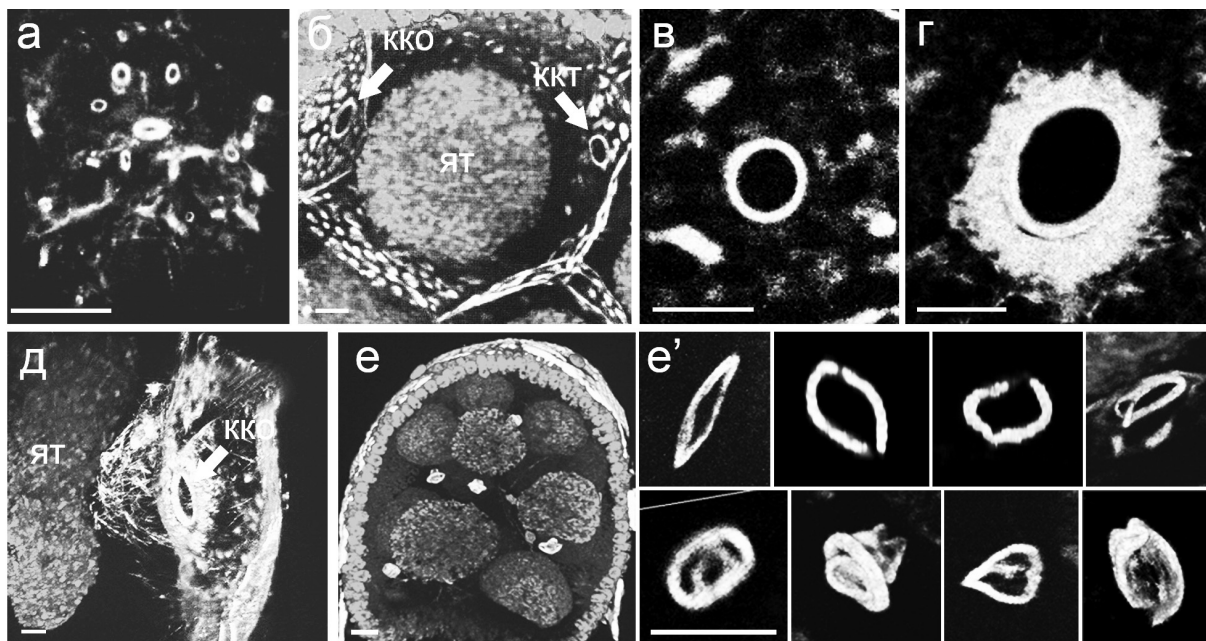


Рис. Актиновый цитоскелет синцитиальных кластеров ооцит-трофобласта в овариолах *C. erythrocephala*. а – кольцевые каналы цисты из региона гермария 2а; б – трофобласт, контактирующий с ооцитом; в – морфология кольцевого канала между двумя трофобластами; г – дополнительная полимеризация актина вокруг кольцевого канала; актиновые фибриллы вокруг кольцевого канала, соединяющего ооцит и трофобласт; е – фолликул с аномальными кольцевыми каналами; е' – примеры нарушений в формировании актинового валика кольцевых каналов. ККО – кольцевой канал между ооцитом и трофобластом; ККТ – кольцевой канал между двумя трофобластами; ЯТ – ядро трофобласта. Шкала – 20 мкм

Выводы

Изменения актинового цитоскелета в цистах из овариол яичников *C. erythrocephala* являются частью целого комплекса изменений, происходящих во время оогенеза. Увеличение количества F-актина в областях вокруг кольцевых каналов связано с ростом синтетической активности трофобластов и

направлено на обеспечение беспрепятственного оттока цитоплазмы из трофобластов в ооцит. Изменение формы и пропускной способности кольцевых каналов может являться следствием нарушения процесса формирования цист генеративной линии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта НШ-1279.2014.4.

Литература

1. Matova N., Cooley L. Comparative aspects of animal oogenesis // *Developmental Biology*. – 2001. – 231. – P. 291–320.
2. ЂwiNetek P., Kubrakiewicz Ja., Klag J. Formation of germ-line cysts with a central cytoplasmic core is accompanied by specific orientation of mitotic spindles and partitioning of existing intercellular bridges // *Cell Tissue Res*. – 2009. – 337, N 1. – P. 137–148.
3. Haglund K., Nezis I.P., Stenmark H. Structure and functions of stable intercellular bridges formed by incomplete cytokinesis during development // *Communicative & Integrative Biology*. – 2011. – 4, N 1. – P. 1–9.
4. Koch E.A., King R.C. The origin and early differentiation of the egg chamber of *Drosophila melanogaster* // *J. Morphol.* – 1966. – 119. – P. 283–304.
5. King R.C. *Ovarian Development in Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York, 1970. – 227 p.
6. de Cuevas M., Spradling A.C. Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification // *Development*. – 1998. – 125. – P. 2781–2789.
7. Snapp E.L., Iida T., Frescas D., Lippincott-Schwartz J., Lilly M.A. The Fusome mediates intercellular ER connectivity in *Drosophila* ovarian cysts // *Mol Biol Cell*. – 2004. – 15, N 10. – P. 4512–4521.
8. Robinson D.N., Cooley L. Stable intercellular bridges in development: the cytoskeleton lining the tunnel // *Trends Cell Biol*. – 1996. – 6, N 12. – P. 474–479.
9. Greenbaum M.P., Iwamori T., Buchold G.M., Matzuk M.M. Germ cell intercellular bridges [Электронный ресурс] // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2011. DOI 10.1101/cshperspect.a005850.

10. Anan'ina T.V., Vedernikov A.E., Khodzhanov A.E., and Stegnii V.N. Development of ovarioles and nurse cell cytoskeleton in *Calliphora erythrocephala* Mg (Diptera: Calliphoridae) // Cell and Tissue Biology. – 2010. – 4, N 2. – P. 192–198.
11. Anan'ina T.V., Kokhanenko A.A., Stegnyy V.N. Cyst geometry in the egg chambers of *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae) ovaries [Электронный ресурс] // Protoplasma. – 2013. DOI 10.1007/s00709-013-0593-9.
12. Robinson D.N., Cant K., Coole L. Morphogenesis of *Drosophila* ovarian ring canals // Development. – 1994. – 120. – P. 2015–2025.
13. Guild G.M., Connelly P.S., Shaw M.K., Tilney L.G. Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping // J Cell Biol. – 1997. – 25, N 138 (4). – P. 783–797.
14. Cell-cell channels. Edited by: Baluska F., Volkmann D., Barlow P. – Landes Bioscience & Shpringer Science, 2006. – 319 p.
15. Li M., Serr M., Edwards K., Ludmann S., Yamamoto D., Tilney L.G., Field Ch.M., Hays T.S. Filamin is required for ring canal assembly and actin organization during *Drosophila* oogenesis // The Journal of Cell Biology. – 1999. – 146, N 5. – P. 1061–1073.

ANAN'INA T.V., STEGNIY V.N.

*Research Institute of Biology and Biophysics, Tomsk State University,
Russia, 634050, Tomsk, Lenin str., 36, e-mail: tany_a@list.ru*

CHANGE OF THE ACTIN CYTOSKELETON AND RING CHANNELS IN THE NURSE CELLS CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA IN OOGENESIS

Aims. The purpose of this study was to investigate changes of the actin cytoskeleton syncytial clusters in ovaries *C. erythrocephala* at different stages of oogenesis. **Methods.** Ovarioles were stained phalloidin-FITC and DAPI. Series of optical sections were obtained using fluorescent microscope Axiomager Z.1 and module ApoTome (Zeiss). In a software module In Side 4D doing graphic reconstruction of the optical sections and analyzed by three-dimensional models of individual egg chambers, cells and nuclei. **Results.** We studied the changes that occur in the actin cytoskeleton cysts in different stages of oogenesis. The changes in the morphology of the ring channels which occur during normal oogenesis and violations in the formation of ring canals in the wrong formation of cysts. **Conclusions.** Increasing amounts of F-actin in the areas around the ring channels associated with an increase in synthetic activity of nurse cells and is aimed at ensuring the smooth movement of the cytoplasm of the nurse cells into the oocyte. Changing the shape and bandwidth ring channels may be a consequence of a breach of the formation of cysts in germarium.

Key words: Calliphora erythrocephala, oogenesis, ring channels, actin cytoskeleton.

УДК 575.1:581.163:577.151.64:633.413:577.213

ВИНИЧЕНКО Н.А., КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА ЛИСТЬЕВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ НА ПЦР-ПРОФИЛИ ФЕРМЕНТНЫХ ГЕНОВ

В настоящее время большое внимание уделяется изучению молекулярных механизмов, лежащих в основе наблюдаемых у растений изменений экспрессии генов под действием различных внутренних и внешних условий. Удобными маркерными локусами для таких исследований являются гены, контролирующие ферменты. Для изучения полиморфизма ДНК районов хромосом, содержащих маркерные ферментные гены, нами был предложен

модифицированный метод ISSR-амплификации (inter-simple sequence repeat, «между повторяющихся простых последовательностей»). В отличие от исходного оригинального метода, мы использовали в паре с микросателлитным праймером праймер, специфичный к локусу ферментного гена. Это упростило выявляемый на электрофореграмме профиль ПЦР-продуктов и позволило нам выявлять различия между ПЦР-профилями,