

ЯДЕРНЫЙ АКТИН В ЭМБРИОНАХ МЫШИ НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ

Со времени обнаружения актина в ядрах соматических клеток было проведено большое количество исследований, цель которых состояла в выяснении функций внутриядерного актина. Предполагалось, что в ядре актин представлен в гранулярной, олигомерной и фибриллярной формах, что и обуславливает многообразие его ролей в ядре.

Нужно уточнить, что эксперименты, призванные дать ответы на уже четко сформулированные вопросы, касающиеся ядерного актина, выполнялись почти исключительно на соматических клетках. Поэтому, проведение экспериментов по выявлению и изучению локализации актина в ядрах предимплантационных эмбрионов мыши, вполне могут дать важную информацию, как о функциях внутриядерного актина, так и о его форме.

Нами было исследовано распределение гранулярного и фибриллярного актина в пронуклеусах зиготы на двух разных сроках: у ранней зиготы – вскоре после оплодотворения, и у поздней зиготы – незадолго до первого деления и перехода эмбриона на двуклеточную стадию. Кроме того, нами была прослежена локализация гранулярного актина в интерфазных ядрах бластомеров на двуклеточной стадии развития эмбриона. Также нами был проведен сравнительный анализ локализации гранулярного актина в ядрах эмбриона и пронуклеусах зиготы, в том числе и анализ солокализации актина с хроматином.

Для получения зародышей нужного возраста и синхронизации их развития использовали гормональную стимуляцию самок. Распределение гранулярного актина исследовали методом непрямого иммуофлуоресцентного окрашивания с помощью поликлональных антител к актину (2066 Sigma), которые используют для выявления гранулярного актина. Для выявления фибриллярного актина как маркер использовали TRITC-фаллоидин. Хроматин окрашивали люминесцентным красителем TO-PRO-3. Окрашенные зародыши монтировали на предметные стекла и анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TSC SL.

У ранних зигот в пределах женского пронуклеуса актин распределен очень неравномерно. Наиболее яркая люминесценция характерна для периферии проядрышек и отдельных агрегатов актина вокруг них, а также зон с расплывчатыми очертаниями в центральных областях нуклеоплазмы. Часто интенсивно окрашена нуклеоплазма, подстилающая оболочку ядра. Слабolumинесцирующие зоны встречаются в нуклеоплазме, где они имеют форму пятен неправильной формы, часто окруженных в свою очередь зонами, богатыми актином.

Если, окрашенный при помощи антител к актину женский пронуклеус, хорошо виден на фоне цитоплазмы, то мужской пронуклеус на ее фоне практически не выявляется, поэтому определить местонахождение этого пронуклеуса можно исключительно при помощи окрашивания хроматина. Вместе с тем, в отдельных случаях просматриваются «темные» зоны, соответствующие проядрышкам мужского пронуклеуса, и видна небольшая концентрация актина на периферии пронуклеуса.

У поздних зигот в женском пронуклеусе ядерный актин распределен более равномерно. Периферия проядрышек и самого пронуклеуса по-прежнему выделяются на фоне нуклеоплазмы и цитоплазмы, но контрастирующие темные и светлые области в нуклеоплазме выделяются уже гораздо слабее. Изменения в распределении актина в мужском пронуклеусе проследить не удалось, так как он по-прежнему не виден.

Анализ наложений изображений пронуклеусов, полученных у зародышей, окрашенным одновременно при помощи антител к актину и TO-PRO-3, позволил проследить

солокализацию актина и хроматина. Как у ранней, так и у поздней зиготы, мы не наблюдали солокализации актина и хроматина в мужском пронуклеусе. При анализе распределения актина и хроматина в женском пронуклеусе на обоих сроках наблюдения мы наблюдали их солокализацию на периферии, как самого женского пронуклеуса, так и на периферии проядрышек. При этом, у ранних зигот солокализация четко видна, в отличие от поздних зигот, где она выражена слабее. При этом в нуклеоплазме женских пронуклеусов у поздних зигот наблюдается солокализация отдельных актиновых агрегатов с хроматиновыми.

В пронуклеусах зигот мыши мы наблюдали пониженное по сравнению с цитоплазмой содержание фибриллярного актина: внутриядерная зона выглядела как область более слабой люминесценции TRITC, чем цитоплазма.

Для ядер двуклеточного эмбриона мы отметили идентичное распределение гранулярного актина для обоих бластомеров. Кроме того, характер локализации актина в них был сходен с распределением гранулярного актина в женском пронуклеусе зиготы.

На основе уже полученных данных мы предполагаем в дальнейшем продолжить исследование внутриядерного актина в зиготе и двуклеточном эмбрионе, а также получить необходимые данные для четырехклеточной и более поздних стадий развития.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00685).