

УДК 576.315.45

АНАЛИЗ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФИБРИЛЛАРИНА И МЕСТ СИНТЕЗА ПРЕ-рРНК В ЯДРЫШКО-ПОДОБНЫХ ТЕЛЬЦАХ GV ООЦИТОВ МЫШИ ПОСЛЕ УМЕРЕННОЙ ОБРАБОТКИ ПРОТЕИНАЗОЙ К

© 2015 г. К. В. Шишова*, Ю. М. Ходарович*, Е. А. Лаврентьева**, О. В. Зацепина*

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

**Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского Государственного университета им. М.В. Ломоносова
119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 73

E-mail: zatsepina_olga@mail.ru, kseniya.shishova@inbox.ru

Поступила в редакцию 22.05.2014 г.

Окончательный вариант получен 12.11.2014 г.

Постнатальное развитие ооцитов млекопитающих сопровождается функциональной и структурной перестройкой ядрышкового аппарата, которая завершается в преовуляторных GV ооцитах появлением крупных (до 10 мкм в диаметре) телец, получивших название ядрышко-подобные тельца (ЯПТ, NLBs – nucleolus-like bodies). Показано, что материал ЯПТ необходим для раннего развития зародышей, однако, его состав до сих пор остается невыясненным. В настоящей работе с использованием белок-связывающего красителя флуоресцеин-5-изотиоцианата (ФИТЦ) мы показали, что обязательным компонентом ЯПТ в GV ооцитах мыши являются белки, характеризующиеся высокой локальной концентрацией. С помощью мягкой обработки ооцитов протеиназой К мы впервые установили, что одним из таких белков является фактор раннего процессинга пре-рРНК белок фибрилларин. Фибрилларин присутствует во внутренней массе ЯПТ всех ооцитов, способных к синтезу рРНК, но, в отличие от “поверхностного” фибрилларина, не колокализуется с местами включения БрУТФ, микроинъецируемого в ооциты для выявления транскрибирующихся рибосомных генов. Эти наблюдения косвенно свидетельствуют в пользу накопления внутри ЯПТ ядрышковых белков, не участвующих в биогенезе рибосом. В GV ооцитах NSN-типа все ЯПТ, присутствующие в одном ядре, содержат фибрилларин и связаны с активными рибосомными генами. Результаты, полученные в работе, говорят о том, что обработка GV ооцитов мыши протеиназой К позволяет: (1) выявлять “скрытые” белки внутри плотно уложенного материала ЯПТ, (2) повышает качество изображений ооцитов при выявлении мест синтеза рРНК с помощью БрУТФ, но (3) не выявляет активные рибосомные гены во внутренней массе ЯПТ. Флуоресцентный краситель ФИТЦ может быть рекомендован для локализации внутриклеточных белков в ооцитах всех млекопитающих.

Ключевые слова: ядрышко-подобное тельце (ЯПТ), ФИТЦ (FITC), протеиназа К, фибрилларин, синтез пре-рРНК, БрУТФ, GV ооциты мыши.

DOI: 10.7868/S0475145015030064

ВВЕДЕНИЕ

Созревание ооцитов и фолликулов в яичниках млекопитающих – это сложный и многоступенчатый процесс, который от начала роста ооцита до его овуляции у мыши занимает около трех недель (Gilbert, 2010). Одной из ключевых стадий фолликулогенеза является формирование антральной полости, которое совпадает с окончанием периода большого роста ооцита, частичной инактивацией синтетических процессов в ядре и началом структурной и функциональной перестройки ядрышкового аппарата (Rienzi et al., 2012). Трансформация ядрышка завершается в преовуляторных (или germinal vesicle, GV) ооцитах обра-

зованием структур, получивших название “ядрышко-подобные тельца” (nucleolus-like bodies, NLBs, ЯПТ), или “постъядрышки” (Боголюбов, 2000; Почукалина и Парфенов, 2008). Основными морфологическими признаками ЯПТ, резко отличающимися их от ядрышек соматических клеток и преантральных ооцитов, являются крупные размеры (диаметр ЯПТ в GV ооцитах мыши составляет около 10 мкм), правильная округлая форма и высокая оптическая плотность, свидетельствующая о высокой плотности упаковки их материала (Chouinard, 1971). По функциональному состоянию ЯПТ делятся на две основные группы: синтезирующие и не синтезирующие пре-

рРНК. Первый тип характерен для “неокруженных” (non-surrounded, NSN-тип) ооцитов, основным признаком ядер которых является наличие хромоцентров, которые контактируют с ЯПТ и располагаются в нуклеоплазме (Debey et al., 1993; Zuccotti et al., 1998, 2005, 2011). В NSN-ооцитах активные рибосомные гены выявлены только на поверхности ЯПТ (Bouniol-Baly et al., 1999). Второй, транскрипционно инертный тип ЯПТ, характерен для более зрелых, или “окруженных”, ооцитов (ооциты SN-типа). В SN-ооцитах хромоцентры практически отсутствуют, а ЯПТ окружены слоем конденсированного хроматина (Bouniol-Baly et al., 1999; Zuccotti et al., 2005; De La Fuente, 2006; Почукалина и Парфенов, 2008; Bellone et al., 2009). В яичниках гормонально стимулированных самок всегда присутствуют также GV ооциты переходных стадий, что указывает на длительность процесса, связанного с пространственной реорганизацией хроматина (Debey et al., 1993). При культивировании *in vitro* развитие ооцита NSN-типа в ооцит SN-типа занимает 6–7 суток (Pesty et al., 2007). На светооптическом уровне ооциты NSN- и SN-типов не различаются по размерам или иным морфологическим признакам, поэтому для их идентификации необходимо использовать ДНК-связывающие красители. Методами электронной микроскопии установлено, что ЯПТ ооцитов обоих типов образованы фибриллами диаметром около 4 нм, которые однородно и плотно упакованы в GV ооцитах SN-типа. ЯПТ ооцитов NSN-типа имеют более сложную организацию. На ультратонких срезах в их составе описаны мелкие “сферулы”, содержащие рыхло-уложенные фибриллы, вакуоли разного размера, а также небольшие скопления гранул, размером около 15–20 нм (Почукалина и Парфенов, 2008). В ЯПТ обоих типов не выявляются основные структурно-функциональные домены активных ядрышек, включая фибриллярные центры (основные места локализации РНК полимеразы I), плотный фибриллярный компонент (область, где происходит ранний процессинг пре-рРНК) и гранулярный компонент, соответствующий местам сборки рибосомных частиц (Почукалина и Парфенов, 2008).

Однако вопрос о природе материала, образующего ЯПТ, до сих пор остается открытым. Из-за ограниченного числа ооцитов, способных к созреванию, фракцию выделенных ЯПТ для биохимического анализа получить чрезвычайно сложно, а для некоторых видов млекопитающих, включая человека – практически невозможно. Поэтому изучение ЯПТ, как правило, производят с использованием цито- и иммуноцитохимических методов, позволяющих манипулировать с отдельными клетками. Однако использование антител для выяснения состава ЯПТ в GV ооцитах разных видов млекопитающих не позволило убедительно вы-

явить в них какие-либо белки, включая белки ядрышка. Факторы транскрипции рДНК (РНК полимеразы I, UBF, PAF53) и процессинга рРНК (фибриллин, NPM1/нуклеофозмин, нуклеолин, SURF6) разными авторами были описаны только на поверхности ЯПТ и в нуклеоплазме, но не внутри ЯПТ (Zatsepina et al., 2000; Fair et al., 2001; Maddox-Hyttel et al., 2007; Romanova et al., 2006; Почукалина и Парфенов, 2008). Очевидно, что отсутствие сведений о молекулярном составе ЯПТ не позволяет установить их роль в оогенезе млекопитающих.

На необходимость изучения состава ЯПТ указывают также результаты исследований последних лет, которые были выполнены на эмбрионах, полученных из “энуклеированных” (т.е., лишенных ЯПТ) GV ооцитов. Этими работами доказано, что такие эмбрионы не формируют нормальные пронуклеусы (Ogushi, Saitou, 2010; Inoue et al., 2011), теряют часть центромерной сателлитной ДНК (Fulka, Langerova, 2014) и останавливаются в развитии на стадии двух- или четырех бластомеров (Fulka et al., 2003; Ogushi et al., 2008).

ЯПТ описаны в GV ооцитах всех изученных на сегодняшний день видов млекопитающих, включая мышью (Chouinard, 1971), крысу (Antoine et al., 1988), свинью (Koresny et al., 1996), корову (Hyttel et al., 2001) и человека (Parfenov, 1989). Это является свидетельством о пользе важности данных образований не только для эмбриогенеза, но и оогенеза млекопитающих.

Цель настоящей работы – анализ локализации и транскрипционной активности ЯПТ в GV ооцитах мыши в обычных условиях и после умеренной обработки ооцитов протеиназой К. В работе предлагается новый цитохимический метод, позволяющий выявлять внутриклеточные белки ооцитов с помощью флуоресцентного красителя флуоресцеин-5-изотиоцианата (ФИТЦ). ФИТЦ – это производное флуоресцеина, которое широко используется для мечения антител и других белков (пептидов) *in vitro*, а также в проточной цитофлуориметрии соматических и бактериальных клеток (Traganos et al., 1988). В составе белков (пептидов) ФИТЦ ковалентно связывается с α -аминогруппами аминокислот (Jullian et al., 2009). Однако ФИТЦ на сегодняшний день не применялся для анализа локализации внутриклеточных белков методами микроскопии. Другой подход, использованный в работе – это иммуноцитохимическое выявление белков ЯПТ после обработки фиксированных ооцитов протеиназой К. В соматических клетках такое воздействие способствует выявлению “скрытых” антигенных детерминант, которые недоступны для связывания антителами в стандартных условиях (D’Amico et al., 2009; Svislunova et al., 2012; собственные наблюдения). Перспективность применения такого подхода была изучена нами на примере ключевого яд-

рышкового белка и фактора раннего процессинга рРНК фибрилларина.

Окрашивание GV ооцитов флуоресцентным белок-связывающим красителем ФИТЦ позволило отчетливо выявить белки во внутренней массе ЯПТ ооцитов и показать высокую плотность их упаковки, используя метод конфокальной лазерной микроскопии. Путем умеренной обработки протеиназой К ооцитов, зафиксированных в стандартных условиях, во внутренней массе ЯПТ нами впервые выявлен один из типичных ядрышкового белков – фибрилларин. Однако отсутствие активных рибосомных генов внутри ЯПТ косвенно свидетельствует о его частичной или полной функциональной инертности. Множественные (более одного) ЯПТ, присутствующие в ядре GV ооцита NSN-типа, способны к синтезу пре-рРНК и содержат фибрилларин.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Лабораторные животные

Эксперименты выполняли на самках мышей линии C57Bl/6 4–8 недельного возраста. Животных приобретали в питомнике лабораторных животных “Пушино” (Московская область). Все животные в момент получения из питомника были свободны от патогенной флоры, содержались в барьерных условиях и получали стандартизированный корм и воду.

Гормональная стимуляция мышей и выделение ооцитов

Мышам инъецировали 7.5 МЕ фолликулостимулирующего гормона ГСЖК (гонадотропин сыворотки жеребой кобылы, “Sigma-Aldrich”, США) в 100 мкл стерильного 0.14 М раствора NaCl. Через 46–48 ч животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. Яичники извлекали и помещали в среду M2 (4.15 мМ Na₂CO₃, 20.85 мМ Hepes, 4 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, “Sigma-Aldrich”, США), содержащую 100 мкг/мл дибутирил-циклического аденозинмонофосфата (dbcAMP) (“Sigma-Aldrich”, США), добавляемого для предотвращения спонтанной активации созревания ооцитов. Ооциты, свободные от кумулюсных клеток, выделяли с помощью препаративных игл под контролем стереомикроскопа Stemi2000 (“Carl Zeiss”, Германия). Манипуляции с ооцитами производили, используя механические микропипетки Stripper (“Origio”, США) с внутренним диаметром капилляра 135 мкм.

Окрашивание ооцитов красителем ФИТЦ

Ооциты фиксировали 3%-ным раствором параформальдегида (“MPBiomedical, Inc.”, Франция), растворенного в фосфатно-солевом буфере

(PBS, 140 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1.5 мМ KН₂PO₄, 8.1 мМ Na₂HPO₄, pH 7.2), в течение 30 мин. Отмывали в PBS (3 × 10 мин), обрабатывали 0.2%-ным раствором Тритон X-100 на PBS 20 мин, вновь отмывали в PBS (3 × 10 мин) и помещали в PBS, содержащий 1 мкг/мл ФИТЦ (“Biotium”, США), на 2 ч. После отмывки в PBS (3 × 10 мин) ооциты инкубировали с красителем на хроматин DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), приготовленном на PBS в концентрации 1 мкг/мл, 10 мин. Затем ооциты переносили в чашки для прижизненных наблюдений (“MatTek”, США), содержащие 2 мл PBS, и изучали в конфокальный микроскоп LSM510 DuoScanMETA (“Carl Zeiss”, Германия), используя фазово-контрастный иммерсионный объектив PlanAprochromat ×63 (числовая апертура 1.4). Флуоресценцию ФИТЦ возбуждали аргонным лазером с длиной волны 488 нм и регистрировали с помощью полосно-пропускающего фильтра BP 505–550. Контроль специфичности связывания ФИТЦ с белками осуществляли после обработки ооцитов, зафиксированных и обработанных детергентом, как описано выше, 1 мкг/мл протеиназы К, растворенной в PBS, в течение 20–80 мин. Ооциты контрольной группы инкубировали то же время в PBS без протеиназы К. Ооциты обеих групп отмывали в PBS (3 × 10 мин), окрашивали DAPI и изучали в микроскоп, как описано раньше. Все обработки производили при комнатной температуре (22°C).

Иммуноцитохимическое выявление фибрилларина

Ооциты фиксировали и обрабатывали детергентом, как описано выше. Ооциты экспериментальной группы обрабатывали 1 мкг/мл протеиназы К в течение 20–80 мин. Ооциты контрольной группы выдерживали то же время в PBS. Опытные и контрольные ооциты отмывали в PBS (3 × 10 мин) и вторично фиксировали 3%-ным параформальдегидом (20 мин) и обрабатывали Тритон X-100 (10 мин). После отмывки в PBS (3 × 5 мин) ооциты переносили в кроличьи поликлональные антитела к фибрилларину (“Abcam”, США, каталожный номер ab5821) на 1 ч, а затем инкубировали то же время с антителами к иммуноглобулинам кролика, мечеными флуорохромом Alexa-488® (“Life Technologies”, США). Антитела разводили в PBS и использовали в концентрациях, рекомендованных производителями. Перед заключением в Vectashield (“Vector Laboratories Inc.”, США) ооциты докрасивали DAPI. Препараты изучали в микроскоп LSM510 DuoScanMETA, используя объектив PlanAprochromat ×63. Регистрацию изображений производили с использованием фильтров, оптимальных для возбуждения и регистрации флуоресценции Alexa-488®.

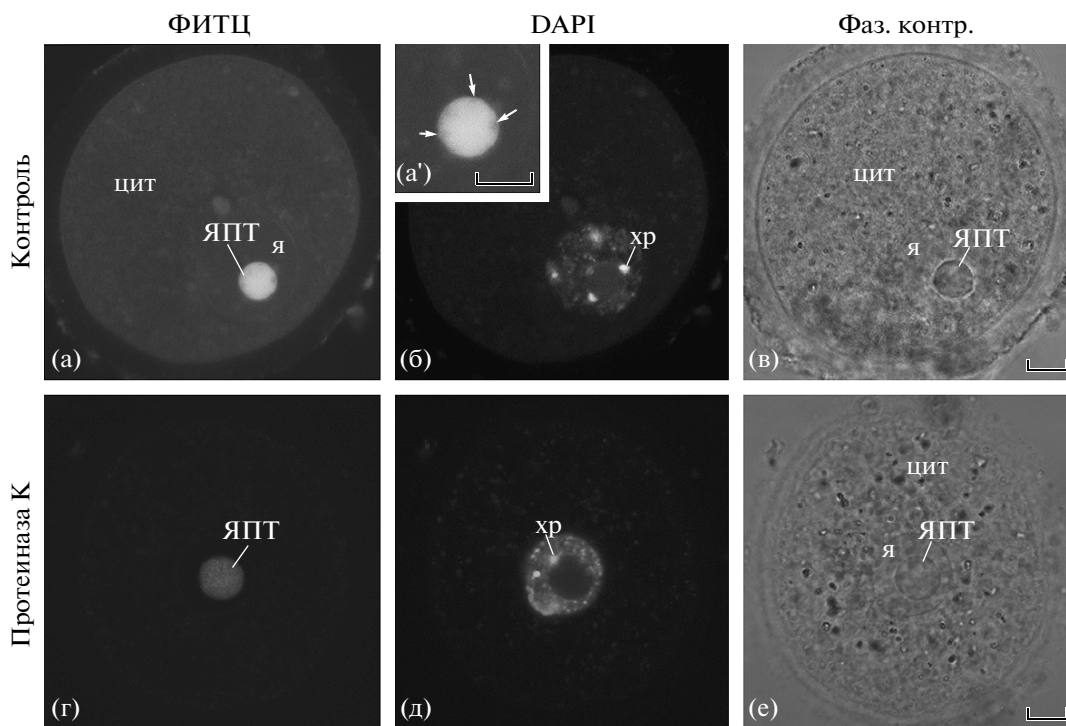


Рис. 1. Окрашивание GV ооцитов мыши NSN-типа красителями ФИТЦ (а, а', г) и DAPI (б, д) без (а–в) и после обработки протеиназой К (1 мкг/мл, 20 мин) (г–е); в, е – фазово-контрастные изображения ооцитов. ЯПТ – ядрышко-подобное тельце; я – ядро; хр – хромосомы; цит – цитоплазма; стрелки – зоны слабой окраски ЯПТ. Масштабные линии, 10 мкм.

Микроинъекции БрУТФ и визуализация мест его включения

Выделенные ооциты помещали в среду М2, содержащую 100 мкг/мл dbcAMP и 10 мкг/мл ингибитора РНК полимераз II и III α -аманитина (“AppliChem”, Германия), и инкубировали 30 мин при 37°С. В той же среде, но при комнатной температуре, в цитоплазму ооцита микроинъекцировали 1 ± 0.5 пл раствора, содержащего 100 мМ БрУТФ (5-бромоуридин 5'-трифосфат натриевая соль, “Sigma-Aldrich”, США), 50 мкг/мл α -аманитина, 140 мМ KCl, 2 мМ Pipes (“Sigma-Aldrich”, рН 7.4). Затем ооциты переносили в среду М2 с 100 мкг/мл dbcAMP и инкубировали 30 мин при 37°С. Фиксацию ооцитов и обработку протеиназой К производили, как описано в предыдущем разделе. После отмывки в PBS (3×10 мин) ооциты помещали в смесь мышинных моноклональных антител к бромдезоксисуридину (“Roche”, США) и кроличьих поликлональных антител к фибрилларину, разведенных в PBS до оптимальных рабочих концентраций, отмывали в PBS (3×15 мин) и переносили в смесь антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с Alexa-568® (“Life Technologies”, США), и к иммуноглобулинам кролика, конъюгированных с Alexa-488®, на 60 мин. Перед заключением в Vectashield хроматин окрашивали DAPI в течение 15 мин. Препараты изуча-

ли в микроскоп LSM510 DuoScanMETA, используя соответствующие фильтры.

Количественный анализ интенсивности флуоресценции производили с помощью программного обеспечения Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) для Windows. Для статистической обработки результатов использовали программу Microsoft Office Excel 2007, для работы с изображениями – Adobe Photoshop CS3.

Для изучения локализации фибрилларина и мест включения БрУТФ было проанализировано 164 ооцита. Из них в контроле (т.е., без обработки протеиназой К) 25 ооцитов были использованы для изучения локализации фибрилларина, 22 ооцита – для анализа включения БрУТФ, 35 ооцитов – для колокализации фибрилларина и БрУТФ. После обработки протеиназой К 30 ооцитов были использованы для выявления фибрилларина, 19 ооцитов – для анализа включения БрУТФ и 33 ооцита для колокализации фибрилларина и БрУТФ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке 1 показан типичный вариант окрашивания GV ооцита мыши, содержащего одно ЯПТ, ФИТЦ (а) и DAPI (б). Ооцит относится к NSN-типу, поскольку после окраски DAPI в его ядре отчетливо выявляются хромосомы (рис. 1б). Видно, что ФИТЦ окрашивает ядро и цитоплазму

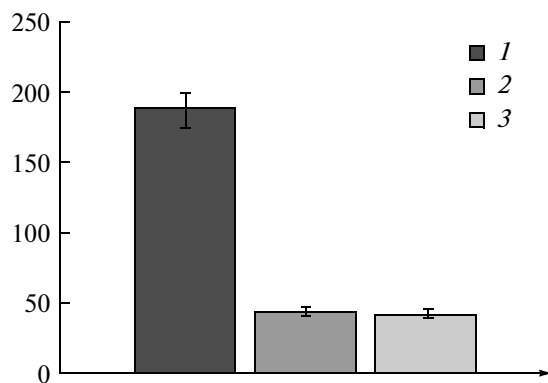


Рис. 2. Гистограмма, отражающая интенсивность (яркость) флуоресценции ФИТЦ в ЯПТ (1), нуклеоплазме (2) и цитоплазме (3) GV ооцитов NSN-типа в контроле. Для измерений использовали 8-битные компьютерные изображения 10 ооцитов, полученные в независимых сериях экспериментов. Вертикальная ось – интенсивность флуоресценции, измеренная по шкале серого цвета от значений 0 (наименее яркая флуоресценция) до 255 (наиболее яркая флуоресценция) с помощью программы Image J. Вертикальные черточки – стандартные отклонения от средних значений.

ооцита, но наиболее ярко и гомогенно флуоресцирует ЯПТ (рис. 1а). Окраска ЯПТ выглядит гомогенной, хотя на поверхности ЯПТ выявляются небольшие зоны (размером около 1 мкм), которые окрашиваются чуть слабее их основного содержимого (рис. 1а') и, возможно, соответствуют хромоцентрам, связанным с ЯПТ (рис. 1б). Нуклеоплазма и цитоплазма ооцитов визуальнo обладают сходной флуоресценцией. Результаты количественной оценки интенсивности (яркости) флуоресценции в ЯПТ, ядре и цитоплазме 10 GV ооцитов NSN-типа, окрашенных ФИТЦ, оцененной с помощью программного обеспечения Image J., показаны на рис. 2. На нем видно, что средняя интенсивность флуоресценции в ЯПТ в 4–5 раз выше, чем в ядре и цитоплазме, что указывает на высокую плотность упаковки ФИТЦ-положительного материала, входящего в их состав.

Для проверки специфичности связывания ФИТЦ с белковым компонентом ооциты, зафиксированные параформальдегидом и обработанные Тритоном X-100 (см. раздел “Материалы и Методы” для деталей), инкубировали с протеиназой К в течение 20–80 мин, а потом окрашивали ФИТЦ (рис. 1г) и DAPI (рис. 1д). Препараты изучали, а изображения обработанных ооцитов получали при тех же параметрах мощности лазера, возбуждения и эмиссии флуоресценции, что и в контроле. Нам не удалось обнаружить заметных различий в характере окрашивания ооцитов после разной по длительности обработки протеиназой К, поэтому на рисунке 1г представлен типичный вариант окраски GV ооцита NSN-типа, об-

работанного протеиназой К в течение 20 мин. Можно видеть, что протеолитическая обработка вызывает гашение флуоресценции ЯПТ, хотя и не удаляет окраску полностью. В режиме фазового контраста видно, что воздействие протеиназы К приводит к уменьшению оптической плотности ЯПТ, но мало влияет на их размер (рис. 1в, 1е). Флуоресценция ФИТЦ в ядре и цитоплазме после протеолитической обработки практически исчезает (рис. 1а, 1г). Эти наблюдения говорят о том, что в использованных условиях ФИТЦ окрашивает белковый материал GV ооцитов и что белки присутствуют внутри ЯПТ. Флуоресценция ФИТЦ практически не изменялась после обработки ооцитов РНКзой А (2 мкг/мл) или ДНКазой I (1 мкг/мл, 1 ч) в течение того же времени (не иллюстрировано).

Для того чтобы выяснить, способствует ли мягкая протеолитическая обработка выявлению внутри ЯПТ каких-либо ядрышковых белков, ооциты инкубировали с протеиназой К в течение 20–80 мин, а затем – с антителами к ядрышковому белку фибрилларину. Контролем служили ооциты, окрашенные антителами в стандартных условиях, т.е. без предобработки ферментом. Полученные результаты представлены на рисунках 3 и 4. Как видно на рисунках 3а и 4а' в стандартных условиях (контроль) фибрилларин образует локальные скопления только на поверхности ЯПТ ооцитов NSN-типа, что полностью соответствует данным литературы (Zatsepina et al., 2000). Однако после 20-минутной протеолитической обработки фибрилларин выявляется внутри ЯПТ в виде “фокусов” разного размера (рис. 3г). Более длительное воздействие протеиназы К приводило к исчезновению большинства скоплений, так что распределение фибрилларина внутри ЯПТ становилось более однородным (рис. 4б', 4в'). Если в ядре присутствовало несколько ЯПТ, они окрашивались антителами к фибрилларину сходным образом (рис. 4в').

Как известно, в ядрышках соматических клеток места локализации, или фокусы, фибрилларина колокализуются с местами синтеза пре-рРНК (Masson et al., 1996; Мухарьямова и Зацепина, 2001). Наличие похожих фокусов в GV ооцитах косвенно указывает на возможное присутствие транскрибируемых рДНК не только на поверхности, но и внутри ЯПТ. Для экспериментальной проверки этого предположения в GV ооциты микроинъектировали БрУТФ, который в присутствии α -аманитина включается только в новосинтезированную пре-рРНК (Masson et al., 1996; Zatsepina et al., 2000; Pesty et al., 2007). Места включения БрУТФ колокализовали с фибрилларинoм без и после обработки ооцитов протеиназой К. Дополнительное окрашивание DAPI позволило отобрать для анализа только GV ооциты NSN-типа (рис. 4а–4в). Результаты эксперимен-

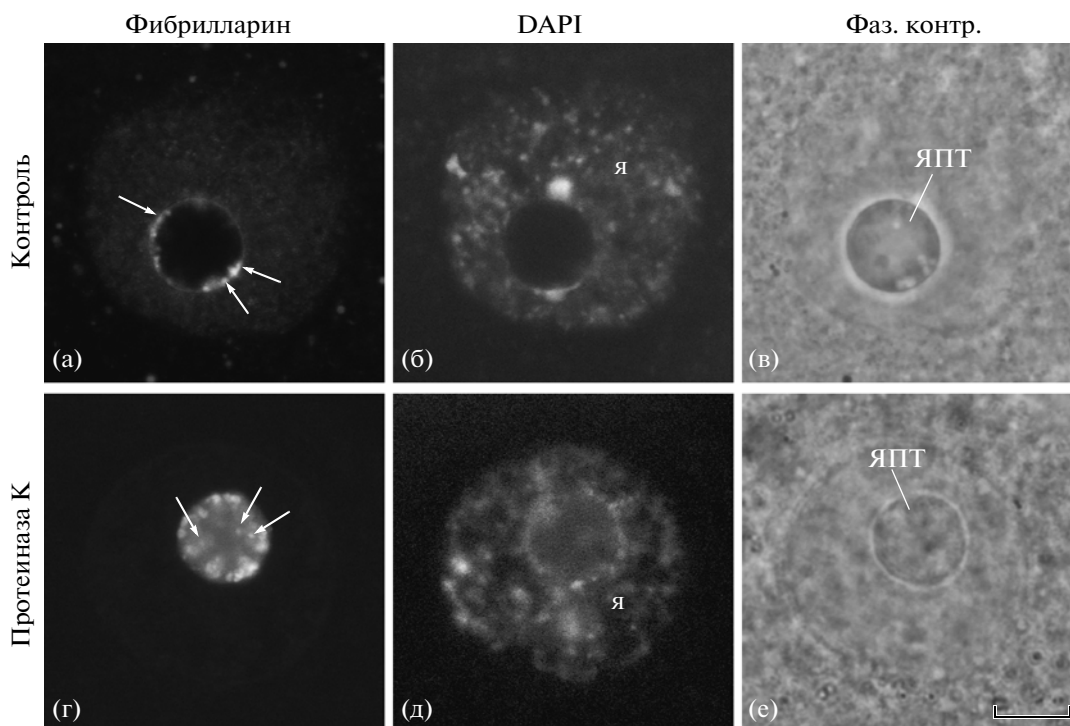


Рис. 3. Локализация фибрилларина в контрольных GV ооцитах NSN-типа (а–в) и ооцитах, обработанных протеиназой К в течение 20 мин (г–е). а, г – иммуномечение антителами к фибрилларину, б, д – окрашивание красителем на хроматин DAPI, в, е – фазово-контрастные изображения ооцитов. ЯПТ – ядрышко-подобное тельце; я – ядро; стрелки – локальные скопления фибрилларина на поверхности (а) и внутри (г) ЯПТ. Масштабная линия, 10 мкм.

тов иллюстрированы на рисунках 4 и 5. На рис. 4 видно, что в контрольных (т.е. необработанных протеиназой К) ооцитах включение предшественника происходит только на поверхности ЯПТ, где БрУТФ-позитивные сайты (рис. 4а'') хорошо совпадают с участками, содержащими фибрилларин (рис. 4а'''). Обработка протеиназой К сохраняла отдельные фокусы фибрилларина внутри ЯПТ (рис. 4б', 4в'), хотя Бр-РНК обнаруживалась только на поверхности ЯПТ (рис. 4б'', 4в''), так что места локализации фибрилларина и БрУТФ практически не совпадали (рис. 4б''', 4в'''). На рис. 4в–4в''' показан ооцит, ядро которого содержит два ЯПТ. Внутренняя масса обоих ЯПТ окрашивается антителами к фибрилларину (рис. 4в'), но включение предшественника проявляется только на их поверхности (рис. 4в''). Эти результаты говорят о том, что вне зависимости от характера локализации фибрилларина, активные рибосомные гены удается выявить только на поверхности ЯПТ как в стандартных условиях (рис. 4а'''), так и после обработки протеиназой К (рис. 4б'', 4в'').

Анализ GV ооцитов NSN-типа у мышей линии C57Bl/6, использованных в работе, показал, что в них может присутствовать от одного до четырех ЯПТ. При этом одно ЯПТ встречалось в 63% ооцитов, два – в 29%, три – в 5% и четыре – в 2.5%

случаев (таблица). Множественные (т.е., более одного) ЯПТ в GV ооцитах млекопитающих описаны также в литературе (Дыбан, 1988; Pesty et al., 2007; Rienzi et al., 2012). Однако вопрос о том, обладают ли разные ЯПТ внутри одного ядра GV ооцита общими свойствами, практически не изучался. С целью анализа способности множественных ЯПТ к синтезу пре-рРНК мы изучили характер их мечения БрУТФ и антителами к фибрилларину. На рис. 5 видно, что в GV ооцитах мыши размер множественных ЯПТ варьирует от 2 до 10 мкм. Однако вне зависимости от размера, все ЯПТ, присутствующие в одном ядре, включают БрУТФ. Подавляющее большинство мест включения БрУТФ (рис. 5 а–5г) колокализуются с фибрилларин (рис. 5 д–5з). Можно отметить также,

Число и доля (в %) GV ооцитов NSN-типа с разным количеством ядрышко-подобных телец (ЯПТ), выделенных из яичников самок мышей линии C57Bl/6 4–8 недельного возраста через 46–48 ч после стимуляции гонадотропином. Всего 164 ооцита

Число ЯПТ			
1	2	3	4
104 (63.4%)	48 (29.27%)	8 (4.88%)	4 (2.44%)

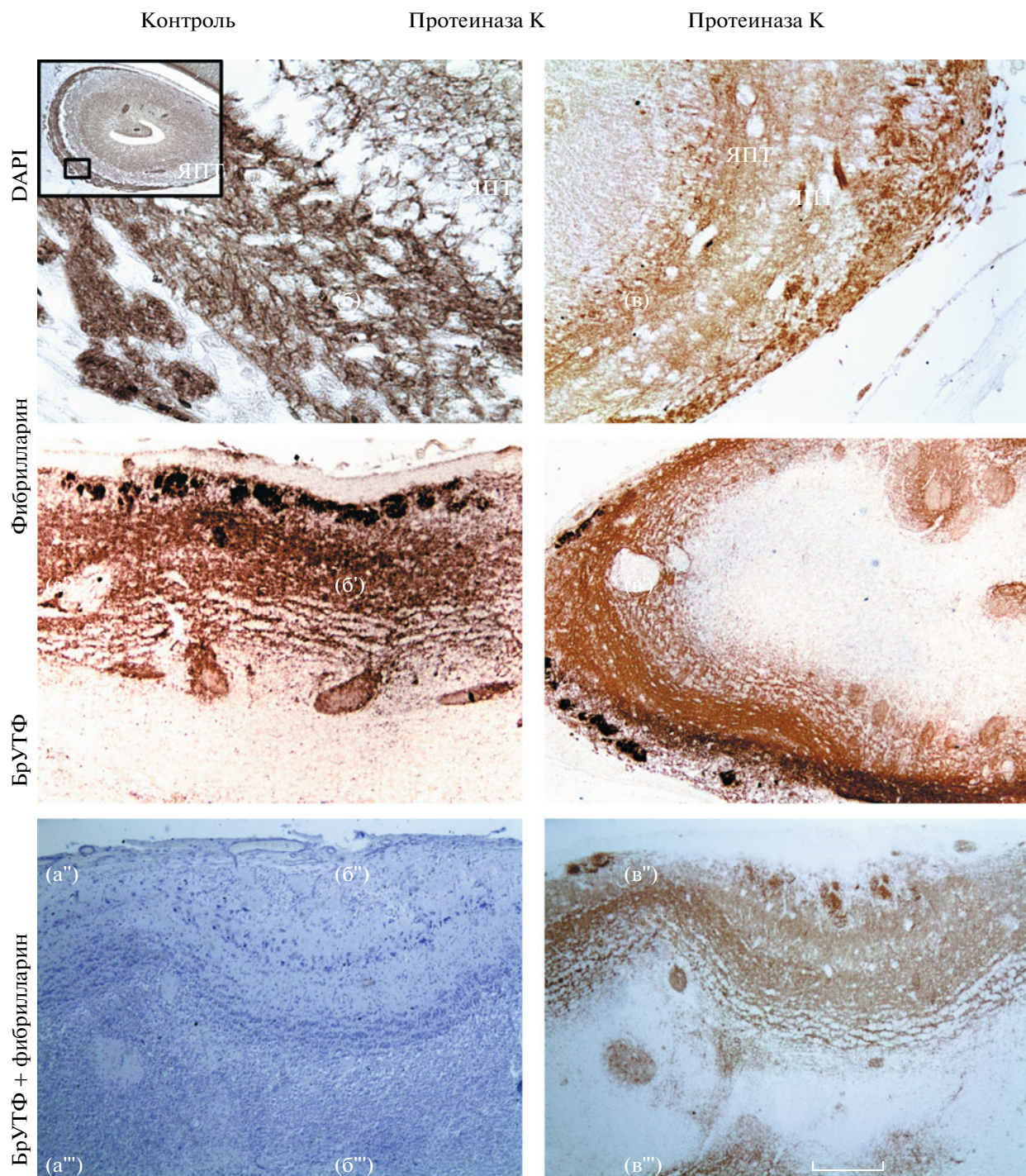


Рис. 4. Локализация фибрилларина (а', б', в') и выявление мест синтеза пре-рРНК с помощью БрУТФ (а'', б'', в'') в GV ооцитах мышцы NSN-типа в контроле (а–а''') и после обработки протеиназой К (б–б'', в–в'') в течение 80 минут; а, б, в – окрашивание ооцитов ДАPI. ЯПТ – ядрышко-подобное тельце; стрелки – локальные скопления фибрилларина; головки стрелок – места включения БрУТФ; звездочки – места колокализации фибрилларина и мест синтеза пре-рРНК. Масштабные линии, 10 мкм.

что более мелкие ЯПТ (диаметром около 2 мкм) ассоциированы с меньшим числом сигналов БрУТФ и сайтов связывания фибрилларина, чем крупные ЯПТ (диаметром около 10 мкм), что особенно хорошо видно на рис. 5г, 5з.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, в процессе развития ооциты млекопитающих, подобно ооцитам других позвоночных, накапливают огромное количество белка. Ранними биохимическими работами показана

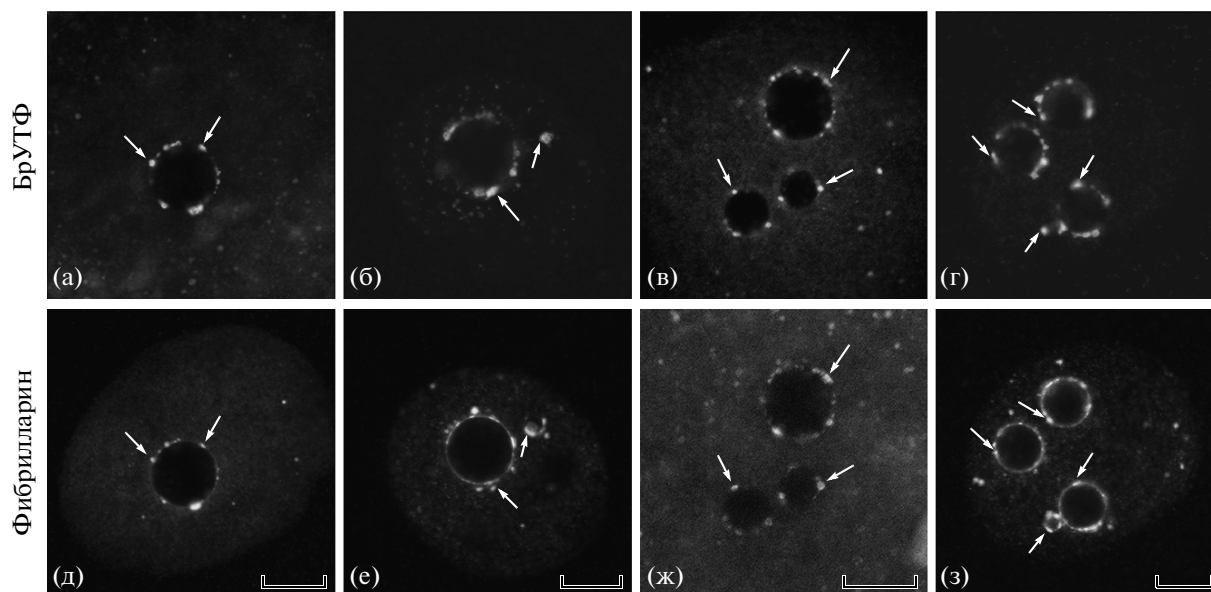


Рис. 5. Выявление мест синтеза пре-рРНК с помощью БрУТФ (а–г) и локализация фибрилларина (д–з) в GV ооцитах мыши NSN-типа, содержащих одно (а, д), два (б, е), три (в, ж) и четыре (г, з) ЯПТ. Стрелки – места колокализации БрУТФ и фибрилларина. Масштабные линии, 10 мкм.

но, что предовуляторный ооцит мыши содержат 25–30 нг суммарного белка (Schultz, Wassarman, 1977; Schultz et al., 1979), что почти в 50 раз превышает среднее содержание белка в соматической клетке (Wassarman and Kinloch, 1992). С помощью гистологических красителей было показано, что ЯПТ ооцитов крысы содержат белки, вероятно, кислой природы, но не содержат ДНК, РНК, липидов и полисахаридов (Antoine et al., 1988). На присутствие белков в ЯПТ указывают также недавние результаты Фульки с соавторами (Fulka et al., 2012), которые с помощью микроманипулятора изолировали из GV ооцитов мыши около 500 ЯПТ. Этого числа оказалось достаточно для определения среднего количества белка в одном ЯПТ. По оценкам авторов работы, одно ЯПТ GV ооцита мыши содержит около 1.6 нг белка.

Окрашивание ооцитов белок-связывающим флуорохромным красителем ФИТЦ с целью выявления внутриклеточных белков предпринято в настоящей работе впервые. Полученные результаты подтверждают данные литературы о присутствии белков в ЯПТ GV ооцитов млекопитающих (Antoine et al., 1988; Fulka et al., 2012). Кроме того, они показывают, что концентрация белка в ЯПТ, оцененная по яркости флуоресценции ФИТЦ, в 4–5 раз выше, чем в ядре и цитоплазме, где она практически одинакова (рис. 2). Однако, принимая во внимание, что объем ЯПТ диаметром около 10 мкм примерно в 500 раз меньше объема GV ооцита, диаметр которого у мыши составляет 70–80 мкм (Дыбан, 1988), мы можем заключить, что основным местом локализации белков в GV

ооцитах млекопитающих все же является цитоплазма.

К постоянным белкам активных ядрышек соматических клеток, как известно, относятся белки, принимающие участие в процессинге рРНК (Shaw, Brown, 2012). Поскольку ЯПТ формируются в результате перестройки активных ядрышек предовуляторных ооцитов (Choinard, 1971), мы решили выяснить, сохраняется ли внутри ЯПТ один из важнейших факторов раннего процессинга рРНК – фибрилларин, основными функциями которого являются удаление лидирующего 5'-конца внешнего транскрибируемого спейсера (5'-ETS) и метилирование рибозы в составе рРНК (Tollervey, Kiss, 1997; Wang et al., 2000). В неактивных ядрышках фибрилларин может играть также структурную роль (Verheggen et al., 2001; Барыгина и др., 2010; Bartova et al., 2010). В стандартных условиях иммуноцитохимического анализа GV ооцитов, которые не предполагают применение протеолитической обработки, фибрилларин на сегодняшний день описан только на поверхности ЯПТ, где места его локализации совпадают с местами синтеза пре-рРНК (Boniol-Baly et al., 1999; Zatschina et al., 2000). Результаты настоящей работы впервые показали, что мягкая протеолитическая обработка фиксированных ооцитов способствует выявлению фибрилларина не только на поверхности (рис. 4а'), но и во внутренней массе ЯПТ (рис. 3г; 4б', 4в'). Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что ЯПТ GV ооцитов NSN-типа являются местом хранения, по крайней мере, одного типичного ядрышкового белка – фибрилларина. Однако “внутренний” фибрилларин, в от-

личи от “поверхностного” фибрилларина не локализовался с местами синтеза пре-рРНК, поскольку включения предшественника БрУТФ во внутреннюю массу ЯПТ нам обнаружить не удалось ни в контрольных ооцитах (рис. 4а”), ни после обработки ооцитов протеиназой К (рис. 4б”, 4в”). Эти наблюдения свидетельствуют в пользу того, что фибрилларин внутри ЯПТ, в отличие от “поверхностного” фибрилларина, возможно, не участвует в процессинге рРНК и находится в функционально инертном состоянии. Однако мы не можем исключить, что выявлению активной рДНК внутри ЯПТ может препятствовать высокая плотность упаковки материала телец, ограничивающая доступность предшественника к местам синтеза пре-рРНК. Поэтому вопрос о функциональном состоянии фибрилларина в ЯПТ пока остается открытым.

Согласно данным литературы, материал ЯПТ GV ооцитов необходим для раннего развития эмбрионов на стадиях, предшествующих активации родительских рибосомных генов (Fulka et al., 2003; Ogushi et al., 2005; Ogushi et al., 2008; Ogushi, Saitou, 2010; Fulka, Langerova, 2014). В связи с этим можно предположить, что возможной функцией ЯПТ является хранение белков ядрышка, которые будут использованы для синтеза рибосом на ранних стадиях эмбрионального развития.

Вопрос о функциональной активности GV ооцитов долгое время оставался открытым. Путем внутрибрюшинного введения животным [³H]-уридина было показано, что уровень синтеза мРНК и рРНК находится на высоком уровне в растущих ооцитах двухслойных и многослойных фолликулов и резко падает в ооцитах антральных фолликулов (Moore et al., 1974; Kaplan et al., 1982). В настоящее время функциональное состояние хроматина в ооцитах млекопитающих на цитологическом уровне изучают путем микроинъекций БрУТФ с последующим иммуноцитохимическим выявлением мест его включения антителами к бромдезоксигуанидину (БрдУ, BrdU), узнающими также БрУТФ. При исследовании синтеза рРНК микроинъекции производят смесью БрУТФ с α -аманитином, полностью подавляющим активность РНК полимеразы II, частично ингибирующим активность РНК полимеразы III, но не влияющим на транскрипцию рДНК, контролируруемую РНК полимеразой I (Masson et al., 1996; Vouniol-Baly et al., 1999; Longo et al., 2003; Zatssepina et al., 2000; Pesty et al., 2007). Однако в опубликованных работах транскрипционное состояние рДНК изучали в GV ооцитах, содержащих одно ЯПТ, и вопрос о топологии активной рРНК в ооцитах с несколькими ЯПТ, не анализировался.

Согласно нашим данным, у мышей линии C57Bl/6, использованных в работе, как и у других млекопитающих, в яичниках преобладают GV ооциты, содержащие одно ЯПТ (63%). В осталь-

ных ооцитах выявлялось от двух до четырех ЯПТ (таблица). Эта закономерность позволила нам проанализировать состояние “дополнительных” ЯПТ, используя микроинъекции БрУТФ и антитела к фибрилларину (рис. 5). Полученные результаты убедительно говорят о том, что, несмотря на различия в размерах, все ЯПТ, присутствующие в ядрах GV ооцитов NSN-типа синтезируют пре-рРНК и связаны с фибрилларинном. Поскольку транскрипционная активность относительно мелких ЯПТ (диаметром около 2 мкм) ниже активности крупных ЯПТ (диаметром около 10 мкм), можно предположить, что, мелкие ЯПТ связаны с меньшим числом хромосомных ядрышковых организаторов или ЯО-хромосом (терминология по Howell, Black, 1980; Long, David, 1980).

На примере фибрилларина и NPM1/нуклеофозмина ранее было показано, что их избыточное содержание в ядрышках соматических клеток препятствует узнаванию специфичными антителами (Sheval et al., 2005; Svistunova et al., 2012). Высказано предположение, что это явление связано с высокой плотностью упаковки изучаемых белков внутри ядрышек, поскольку предобработка клеток протеолитическими ферментами до инкубации с антителами способствовала выявлению антигенов (Svistunova et al., 2012). Как показали результаты настоящей работы, этот подход оказался продуктивным для выявления фибрилларина внутри ЯПТ GV ооцитов (рис. 3г; 4б', 4в'). Обработка ооцитов протеиназой К также визуально уменьшала фоновую метку в экспериментах с БрУТФ. В частности, это можно видеть при сравнении рисунков 4б", 4в", иллюстрирующих ооциты, обработанные протеиназой К, и рисунков 4а" и 5а–5г, где показаны ооциты, необработанные ферментом. Видно, что после обработки протеиназой К изображения становятся чище из-за исчезновения бледных, но загрязняющих препарат “точек”. Эти наблюдения указывают на целесообразность включения протеолитической обработки в эксперименты, направленные на выявление, по крайней мере, активных рибосомных генов в ооцитах млекопитающих.

Суммируя результаты настоящей работы, можно сделать следующие основные выводы: внутренняя масса ЯПТ GV ооцитов мыши, безусловно, содержит белки, одним из которых является ключевой фактор процессинга и метилирования рРНК фибрилларин. Внутренняя масса ЯПТ, скорее всего, не содержит транскрибирующихся рибосомных генов, хотя транскрипционной активностью обладают все ЯПТ, присутствующие в ядре одного GV ооцита NSN-типа. Обработка фиксированных ооцитов протеиназой К способствует выявлению антигенов, недоступных для антител в обычных условиях, облегчает визуализацию мест синтеза пре-рРНК, но не вы-

являет активные рибосомные гены внутри ЯПТ. Флуоресцентный краситель ФИТЦ можно рекомендовать для окрашивания внутриклеточных белков в ооцитах разных видов млекопитающих.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00856).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барыгина В.В., Миронова А.А., Зацепина О.В.* Параметры, влияющие на оценку подвижности белков ядрышка в живых клетках методом FRAP на примере белка фибрилларина // *Цитология*. 2012. Т. 54. С. 17–24.
- Боголюбов Д.С.* Оогенез турбеллярий рода *Geocentrophora* по данным световой и электронной микроскопии. Ядерные структуры ооцитов, содержащие факторы сплайсинга пре-мРНК и процессинга пре-рРНК // *Цитология*. 2000. Т. 42. С. 136–145.
- Дыбан А.П.* Раннее развитие млекопитающих. М.: Наука, Ленинградское отд., 1988. 228 с.
- Мухарьямова К.Ш., Зацепина О.В.* Визуализация транскрипции рибосомных генов в клетках культуры ткани СПЭВ с помощью бромированного уридинтрифосфата // *Цитология*. 2001. Т. 9. С. 792–796.
- Почукалина Г.Н., Парфенов В.Н.* Трансформация ядрышек ооцитов антральных фолликулов мыши. Выявление коилина и компонентов комплекса РНК-полимеразы // *Цитология*. 2008. Т. 50. С. 671–680.
- Antoine N., Lepoint A., Baeckeland E. et al.* Ultrastructural and cytochemistry of the nucleolus in rat oocytes at the end of the folliculogenesis // *Histochemistry*. 1988. V. 89. P. 221–226.
- Bártová E., Horáková A.H., Uhlířová R. et al.* Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments // *J. Histochem. Cytochem.* 2010. V. 58. P. 391–403.
- Bellone M., Zuccotti M., Redi C.A., et al.* The position of the germinal vesicle and the chromatin organization together provide a marker of the developmental competence of mouse antral oocytes // *Reproduction*. 2009. V. 138. P. 639–643.
- Bouniol-Baly C., Hamraoui L., Guibert J. et al.* Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes // *Biol. Reprod.* 1999. V. 60. P. 580–587.
- Chouinard L.A.* A light- and electron-microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepubertal mouse // *J. Cell Sci.* 1971. V. 9. P. 637–663.
- D'Amico F., Skarmoutsou E., Stivala F.* State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry // *J. Immunol. Methods*. 2009. V. 341. P. 1–18.
- De La Fuente R.* Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes // *Dev. Biol.* 2006. V. 292. P. 1–12.
- Debey P., Szöllösi M.S., Szöllösi D. et al.* Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics // *Mol. Reprod. Dev.* 1993. V. 36. P. 59–74.
- Fair T., Hyttel P., Lonergan P. et al.* Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation, and fertilization // *Biol. Reprod.* 2001. V. 64. P. 1516–1525.
- Fulka H., Langerova A.* The maternal nucleolus plays a key role in centromere satellite maintenance during the oocyte to embryo transition // *Development*. 2014. V. 141. P. 1694–1704.
- Fulka H.Jr., Martinkova S., Kyogoku H. et al.* Production of giant mouse oocyte nucleoli and assessment of their protein content // *J. Reprod. Dev.* 2012. V. 58. P. 371–376.
- Fulka J., Jr., Moor R.M., Loi P. et al.* Enucleation of porcine oocytes // *Theriogenology*. 2003. V. 59. P. 1879–1885.
- Gilbert S.F.* *Developmental Biology*. Ninth Edition. Sinauer Associates, Inc., 2010. P. 711.
- Howell W.M., Black D.A.* Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a q-step method // *Experientia*. 1980. V. 36. P. 1014–1015.
- Hyttel P., Viuff D., Fair T. et al.* Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos // *Reproduction*. 2001. V. 122. P. 21–30.
- Inoue A., Ogushi S., Saitou M. et al.* Involvement of mouse Nucleoplasmin 2 in the decondensation of sperm chromatin after fertilization // *Biol. Reprod.* 2011. V. 85. P. 70–77.
- Jullian M., Hernandez A., Maurras A. et al.* N-terminus FITC labeling of peptides on solid support: the truth behind the spacer // *Tetrahedron Letters*. 2009. V. 50. P. 260–263.
- Kaplan G., Abreu S., Bachvarova R.* rRNA accumulation and protein synthetic patterns in growing mouse oocytes // *J. Exp. Zool.* 1982. V. 220. P. 361–370.
- Kopečný V., Biggogera M., Laurincik J. et al.* Fine structural cytochemical and immunocytochemical analysis of nucleic acids and ribonucleoprotein distribution in nuclei of pig oocytes and early preimplantation embryos // *Chromosoma*. 1996. V. 104. P. 561–574.
- Long E.O., Dawid I.B.* Repeated genes in eukaryotes // *Annu. Rev. Biochem.* 1980. V. 49. P. 727–764.
- Longo F., Garagna S., Merico V. et al.* Nuclear localization of NORs and centromeres in mouse oocytes during folliculogenesis // *Mol. Reprod. Dev.* 2003. V. 66. P. 279–290.
- Maddox-Hyttel P., Svarcova O., Laurincik J.* Ribosomal RNA and nucleolar proteins from the oocyte are to some degree used for embryonic nucleolar formation in cattle and pig // *Theriogenology*. 2007. V. 68. P. 63–70.
- Masson C., Bouniol C., Fomproix N. et al.* Conditions favoring RNA polymerase I transcription in permeabilized cells // *Exp. Cell Res.* 1996. V. 10. № 226(1). P. 114–125.
- Moore G.P.M., Linten-Moore S., Peters H. et al.* RNA synthesis in the mouse oocyte // *J. Cell Biol.* 1974. V. 60. P. 416–422.
- Ogushi S., Fulka J., Jr., Miyano T.* Germinal vesicle materials are requisite for male pronucleus formation but not for change in the activities of CDK1 and MAP kinase

- during maturation and fertilization of pig oocytes // *Dev. Biol.* 2005. V. 286. № 1. P. 287–298.
- Ogushi S., Palmieri C., Fulka H. et al. The maternal nucleolus is essential for early embryonic development in mammals // *Science*. 2008. V. 319. P. 613–616.
- Ogushi S., Saitou M. The nucleolus in the mouse oocyte is required for the early step of both female and male pronucleus organization // *J. Reprod. Dev.* 2010. V. 56. P. 495–501.
- Parfenov V.N., Pochukalina G., Dudina L. et al. Human antral follicles: oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data) // *Gamete Res.* 1989. V. 22. P. 219–231.
- Pesty A., Miyara F., Debey P. et al. Multiparameter assessment of mouse oogenesis during follicular growth *in vitro* // *Mol. Hum. Reprod.* 2007. V. 13. № 1. P. 3–9.
- Rienzi L., Balaban B., Ebner T. et al. The oocyte // *Human Reproduction*. 2012. V. 27. № S1. P. 12–121.
- Romanova L.G., Anger M., Zatssepina O.V. et al. Implication of nucleolar protein SURF6 in ribosome biogenesis and preimplantation mouse // *Biol. Reprod.* 2006. V. 75. P. 690–696.
- Schultz R.M., Wassarman P.M. Biochemical studies of mammalian oogenesis: Protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse // *J. Cell Sci.* 1977. V. 24. P. 167–194.
- Schultz R.M., Letourneau G.E., Wassarman P.M. Program of early development in the mammal: Changes in the patterns and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oocyte growth in the mouse // *Dev. Biol.* 1979. V. 73. P. 120–133.
- Shaw P., Brown J. Nucleoli: composition, function, and dynamics // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. P. 44–51.
- Sheval E.V., Polzikov M.A., Olson M.O. et al. A higher concentration of an antigen within the nucleolus may prevent its proper recognition by specific antibodies // *Eur. J. Histochem.* 2005. V. 49. № 2. P. 117–123.
- Svistunova D.M., Musinova Y.R., Polyakov V.Y. et al. A simple method for the immunocytochemical detection of proteins inside nuclear structures that are inaccessible to specific antibodies // *J. Histochem. Cytochem.* 2012. V. 60. № 2. P. 152–158.
- Tollervey D., Kiss T. Function and synthesis of small nucleolar RNAs // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997. V. 9. P. 337–342.
- Traganos F., Crissman H. A., Darzynkiewicz Z. Experimental staining with pyronin Y detects changes in conformation of RNA during mitosis and hyperthermia of CHO cells // *Cell Research*. 1988. V. 179. P. 535–544.
- Verheggen C., Le Panse S., Almouzni G. et al. Maintenance of nucleolar machineries and pre-rRNAs in remnant nucleolus of erythrocyte nuclei and remodeling in *Xenopus* egg extracts // *Exp. Cell Research*, 2001. V. 269. № 1. P. 23–34.
- Wang H., Boisvert D., Kim K.K. et al. Crystal structure of a fibrillarin homologue from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution // *EMBO J.*, 2000. V. 19. P. 317–323.
- Wassarman P.M., Kinloch R.A. Gene expression during oogenesis in mice // *Mutat. Res.* 1992. V. 296. P. 3–15.
- Zatssepina O.V., Bouniol-Baly C., Amirand C. et al. Functional and molecular reorganization of the nucleolar apparatus in maturing mouse oocytes // *Dev. Biol.* 2000. V. 223. P. 354–370.
- Zuccotti M., Rossi P.G., Martinez A. et al. Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes // *Biol. Reprod.* 1998. V. 58. P. 700–704.
- Zuccotti M., Bellone M., Longo F. et al. Fully-mature antral mouse oocytes are transcriptionally silent but their heterochromatin maintains a transcriptional permissive histone acetylation profile // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2011. V. 28. P. 1193–1196.
- Zuccotti M., Ponce R.H., Boiani M. et al. The analysis of chromatin organization allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst // *Zygote*. 2002. V. 10. P. 73–78.

Analysis of the Localization of Fibrillarin and Sites of Pre-rRNA Synthesis in the Nucleolus-Like Bodies of Mouse GV Oocytes after Mild Treatment with Proteinase K

K. V. Shishova^a, Yu. M. Hodarovich^a, E. A. Lavrent'eva^{a, b}, and O. V. Zatssepina^a

^a Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Mikluho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^b Department of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: zatssepina_olga@mail.ru, kseniya.shishova@inbox.ru

Received May 22, 2014; in final form, November 12, 2014

Postnatal development of mammalian oocytes is accompanied by functional and structural remodeling of the nucleolar apparatus: the final stage of this process is the formation of large objects (up to 10 μm in diameter) termed nucleolus-like bodies (NLBs) in preovulatory GV oocytes. NLB material was shown to be essential for early embryonic development, but its composition is still uncharacterized. In the present study, the protein-binding dye fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) was used to show that proteins characterized by a high local concentration are essential NLB components in mouse GV oocytes. One of these proteins was able to be identified for the first time using a mild treatment of oocytes with proteinase K; the protein identified was fibrillarin, a factor of early pre-rRNA processing. Fibrillarin is present in the inner NLB mass of all oocytes

capable of synthesizing rRNA; however, it is not colocalized with BrUTP microinjected into oocytes in order to identify transcribed ribosomal genes, in contrast to the “surface” fibrillarin. These observations imply the accumulation of nucleolar proteins not involved in ribosome biogenesis inside the NLB. All NLBs present in an individual nucleus of an NSN-type GV oocyte contain fibrillarin and are associated with active ribosomal genes. The results obtained in the present work demonstrate that proteinase K treatment of GV mouse oocytes allows for: (1) identification of “cryptic” proteins inside the densely packed NLB material and (2) the enhancement of oocyte image quality during BrUTP-based identification of rRNA synthesis sites but (3) not for the detection of active ribosomal genes in the inner mass of the NLB. The fluorescent dye FITC can be recommended for assessment of intracellular protein localization in the oocytes of all mammalian species.

Keywords: nucleolus-like body (NLB), FITC, proteinase K, fibrillarin, pre-rRNA synthesis, BrUTP, mouse GV oocytes