

КИНЕТИКА СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ БЕЛКОВ (ГИСТОНОВ)
 В ЯДРЕ ООЦИТА КОШЕНИЛИ В СВЯЗИ С МОРФО-
 ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ ЕГО ХРОМОСОМНО-
 ЯДРЫШКОВОГО АППАРАТА В ООГЕНЕЗЕ

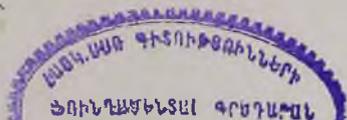
М. Г. ХАЧАТРЯН, Ю. А. МАГАКЯН, Е. М. КАРАЛОВА

Методами радиоавтографии и цитофотометрии исследовали кинетику содержания гистонов в ядре ооцита кошенили в течение фолликулярного периода развития овариолы. ^3H -лейцин интенсивно включается в ядро на всем протяжении его развития. Цитофотометрия показала, что увеличение количества белка в ядре связано главным образом с возрастанием содержания гистонов.

Ключевые слова: кошениль, ядро ооцита, гистоны.

Согласно данным предыдущих исследований [6, 7, 9], ядро ооцита кошенили, развивающегося по нутриментарному типу, обладает высокой РНК- и ДНК-синтезирующей активностью. На основании анализа результатов цитоморфологических, радиоавтографических и цитофотометрических исследований, проведенных нами, и литературных сведений [2, 5] предполагается, что синтез и накопление нуклеиновых кислот в ядре ооцита кошенили являются следствием амплификации р-генов [7]. В то же время известно, что экстрахромосомный хроматин (р-ДНП) отличается низким содержанием гистонов. Следовательно, синтез и накопление в ядре р-ДНК должны были бы повлечь за собой понижение значений отношения гистон/ДНК. Вместе с тем возрастание количества ДНК в ядре в большей или меньшей степени должно сопровождаться увеличением количества гистонов и, очевидно, активацией транспорта белка в ядро из ооплазмы. Для решения указанных вопросов нами были предприняты радиоавтографическое и цитофотометрическое исследования кинетики содержания гистонов в ядре ооцита кошенили в фолликулярный период развития овариолы.

Материал и методика. Яичники личинок и половозрелых самок кошенили извлекали в изотоническом (0,75%) растворе NaCl, переносили в аналогичный раствор, содержащий ^3H -лейцин (уд. акт. 4,6 Кп/ммоль, конечная концентрация изотопа в растворе 50 мКп/мл), инкубировали при 26° 30 мин—2 ч и в некоторых случаях продолжали культивирование в среде С-15 (для культивирования клеток насекомых; Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР), содержащей «холодный» предшественник в той же концентрации, в течение 2—24 ч, фиксировали в смеси формалин—этанол—уксусная кислота (9:3:1) и заливали в парафин. Срезы (5 мкм) покрывали эмульсией типа «М» (НИИХИМФОТОПРОЕКТ), экспонировали 14 сут, про-



являли и окрашивали гематоксилином, по Майеру, и эозином. Определяли наличие метки, характер ее распределения и фотографировали.

Основные белки ядра выявляли окрашиванием срезов (5 мкм) 1%-ным водным раствором алцианового синего (Schuchardt, München), pH 1,07, в течение 60 мин, после предварительной инкубации в растворе, содержащем 1000 ИЕ натриевой соли гепарина, 0,9% NaCl, 0,2 М ЭДТА, 0,1 М трис-буфера (pH 7,0), в течение 3 ч при 37° [3, 12]. Гепарин избирательно осаждает гистоны [8, 11], поэтому можно считать, что в использованном нами методе алциановый синий связывался только с гистонами.

Для определения количества гистонов на зондовом микротофотометре двухволновым методом измеряли поглощение света комплексом гистон-алциановый синий. (λ_1 650 нм, λ_2 600 нм), вычисляли массу белка (услов. ед.) по средней оптической плотности и площади ядра [1] и данные обрабатывали статистически. Коэффициент прироста массы определяли по формуле Майнотта [7]. В каждом случае измеряли по 50—60 ядер. Описание радиоавтографических препаратов и измерения количества белка проводили на каждой из 5 стадий, на которые подразделяется фолликулярный период развития овариолы [9].

Результаты и обсуждение. Данные радиоавтографии говорят о том, что в ядро ооцита на всех стадиях развития фолликула поступает меченный ^3H -лейцином белок, который в зависимости от функционального состояния хромосомно-ядрышкового аппарата меняет свою топографию в площади среза ядра (рис. а—к). На самой ранней стадии (рис. а) интенсивность мечения невысока, и метка располагается главным образом в зоне конденсированных бивалентов и в районе ядерной оболочки. К концу I стадии интенсивность накопления меченого белка в ядре значительно возрастает, не обнаруживая при этом каких-либо специфических скоплений меченого материала, так как практически метится все ядро (рис. б). На II стадии (рис. в) можно видеть, что меченый белок присутствуя в большом количестве в ядре, не содержится в ядрышке: над ядрышком нет гранул восстановленного серебра. После этого, начиная с III стадии и почти до завершения оогенеза, метка обнаруживается и в ядрышке, и в остальной части ядра (рис. г—и), при этом на всех стадиях ее концентрация в ядрышке более значительна, чем в остальных участках ядра, за исключением, пожалуй, зоны ядерной оболочки, где на III стадии и к началу V концентрации меченого белка сравнима с его концентрацией в ядрышке (рис. г, ж—и). На представленных микрофотографиях четко прослеживается постепенное передвижение ядрышка с его меченым по тритию белковым материалом к периферии ядра и исчезновение ядрышка в связи с выходом его в ооплазму (рис. г—и). Следует отметить, что при увеличении продолжительности культивирования овариолы в среде с «холодным» предшественником интенсивность мечения ядра, исключая зону ядрышка, снижается, что свидетельствует о двустороннем транспорте белка между ядром и соплазмой (рис. д—и). К концу оогенеза интенсивность накопления в ядре меченого белка вновь значительно возрастает, и последний заполняет все ядро (рис. к).

Таким образом, радиоавтографическое исследование позволяет прийти к двум важным выводам: в ядре ооцита в период фолликулярного развития овариолы идет интенсивный белковый обмен и обоудо-

сторонний транспорт белка между ядром и ооплазмой; в ядрышке происходит накопление белка вплоть до его экстррузии в ооплазму.

Вместе с этим радиоавтографические данные не позволяют судить о природе белка, накапливающегося в ядрышке и в ядре, однако ис-

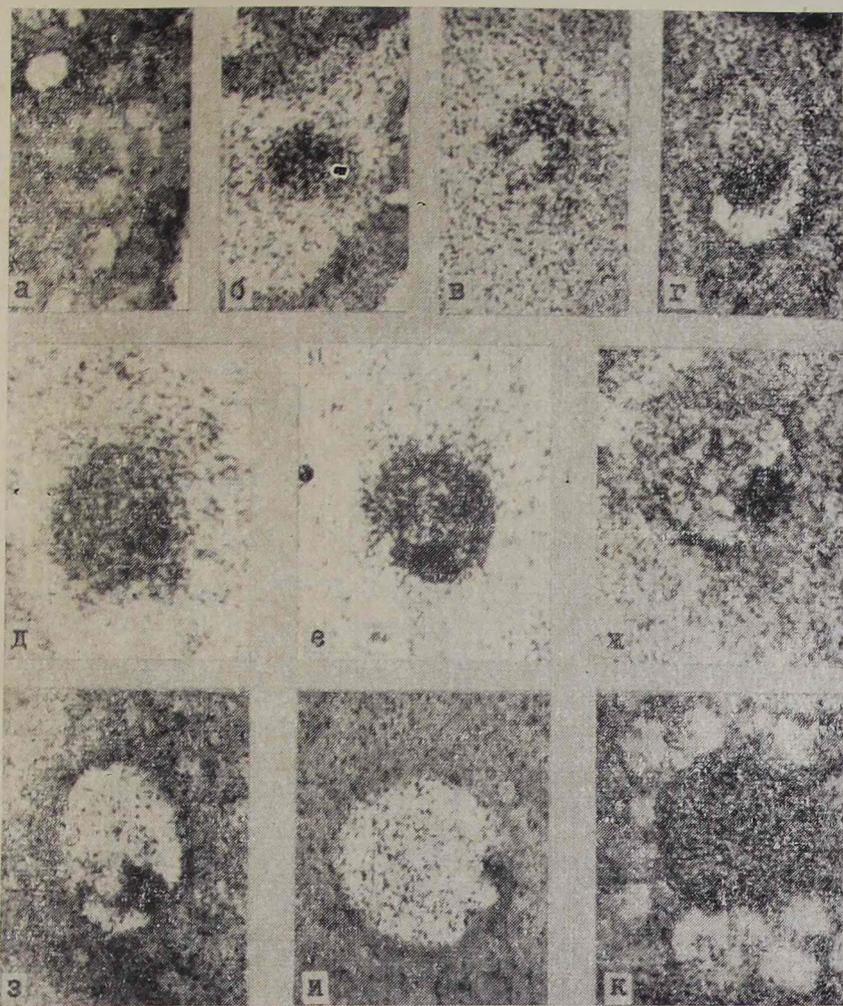


Рис. Кинетика меченого ^3H -лейцином белка в ядре ооцита кошензли.
а—б—распределение метки в ядре ооцита в начале (а) и в конце (б) I стадии, гранулы восстановленного серебра над хромосомами и над периферическими участками ядра (а), равномерное распределение метки по всему ядру (б). в—к—то же на II (в), III (г), IV (д—и) и V (к) стадиях, отсутствие метки в ядрышке (в), интенсивное мечение ядрышка и зоны, прилегающей к оболочке ядра (г, ж—и), интенсивное мечение всего ядра и ядрышка (д, е), постепенный выход ядрышка в ооплазму вместе с меченым белком (ж—и), понижение уровня мечения ядра (ж—и), интенсивное включение метки по всей площади ядра (к). Условия инкубации с изотопом: а—1, б—2, в—и—1 час в «горячей» и затем: 2 (г), 4 (д), 6 (е), 8 (ж), 12 (з) и 16 (и) в «холодной» среде, к—2 час с изотопом. Окраска гематоксилином по Майеру и эозинном Увел.: об. 100 \times , ок. 12,5 \times .

пользованные нами методы специфического выявления гистонов и их количественного анализа с помощью цитофотометрии вносят определенную ясность в этот вопрос.

Из приведенных данных следует, что содержание гистонов в ядре ооцита непрерывно возрастает от стадии к стадии, и к концу оогенеза их количество превышает таковое к началу фолликулярного периода более, чем в 10 раз. Отсюда можно сделать, по крайней мере, один вывод о том, что гистоны вносят существенный вклад в увеличение массы суммарного белка в ядре ооцита. Представляют интерес данные, характеризующие интенсивность накопления гистонов в различные стадии (таблица). Наибольшая интенсивность этого процесса наблюдается

Таблица

Изменения в содержании и интенсивности накопления массы гистонов в ядре ооцита кошенили

| Показатели | Стадии развития | | | | |
|---|-----------------|----------|----------|----------|----------|
| | I | II | III | IV | V |
| Содержание гистонов, услов. ед. | 4,0±0,2 | 24,5±2,0 | 26,9±3,4 | 36,0±1,4 | 42,5±5,5 |
| Коэффициент интенсивности прироста массы, % | 100 | 601 | 109 | 134 | 116 |

ся в течение I стадии развития овариолы, когда количество гистонов увеличивается в 6 раз. В дальнейшем скорость резко снижается и накопление гистонов идет значительно медленнее, чем в начале периода. При сравнении этих данных с результатами, характеризующими накопление в ядре ооцита ДНК за тот же период времени [6], обнаруживается отсутствие параллелизма в процессах накопления ДНК и белка, что, естественно, приводит к изменению отношения гистон/ДНК. Так, если на I стадии оно равно 1,3, то на II—III стадиях это отношение имеет значительно более высокие показатели (3,2 и 3,3 соответственно), а затем снова резко понижается до 1,6 на IV и 0,8 на V стадиях.

Данные, характеризующие отношение гистон/ДНК, весьма показательны и тесно связаны с изменениями в структуре хроматина и в соотношении различных типов хроматина в ядре ооцита. Так, понижение показателей указанного отношения в течение III и последующих стадий определяется синтезом и накоплением в это время в ядре ооцита экстрахромосомного ДНП (о чем свидетельствуют наши данные, представленные в предыдущих сообщениях, см.: [6, 7, 10]), который, как известно, характеризуется низким содержанием гистонов [2]. Повышенное же содержание гистонов в хроматине, наблюдаемое на начальных стадиях, по-видимому, обусловлено конденсацией хроматина в укороченных и плотных бивалентах, так как, согласно современным представлениям [4, 6, 8], агрегация хроматина (компактизация его на уровне олигонуклеосом) определяется присутствием в нем большого количества гистона H1.

Таким образом, результаты настоящего исследования, дополняя сведения, представленные в ранее опубликованных сообщениях (см. выше), позволяют (в совокупности) утверждать, что в период фолликулярного развития овариолы кошенили, т. е. тогда, когда идут интенсивные процессы накопления в ооплазме РНК и других питательных веществ, используемых в дальнейшем развитии зародыша, ядро ооцита активно функционирует и принимает участие в этих процессах. Последнее, как указывалось ранее [6, 7, 10], является исключением для овариол, развивающихся по нутриментарному типу.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 30.VIII 1979 г.

ՈՐԴԱՆ ԿԱՐՄԻ ԶՎԱԲՋՁԻ ԿՈՐԻՉՈՒՄ ՀԻՄՆԱԿԱՆ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ
(ՀԻՍՏՈՆՆԵՐԻ) ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԿԻՆԵՏԻԿԱՆ ԿԱՊՎԱԾ ՕՕԳԵՆԵԶՈՒՄ
ՆՐԱ ՔՐՈՄՈՍՈՄԱԿՈՐԻՉԱՅԻՆ ԱՊԱՐԱՏԻ ՄՈՐՖՈ-ՖՈՒՆԿՑԻՆԱԿՅԻՆՈՒԱԿ
ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՀԵՏ

Մ. Գ. ԽԱԶԱՏՐՅԱՆ, ՅՈՒ. Հ. ՄԱԳԱՔՅԱՆ, Ե. Մ. ԿԱՐԱՆՈՎԱ

Ռադիոավտոգրաֆիկ և ցիտոֆոտոմետրիկ մեթոդներով ուսումնասիրվել է որդան կարմրի ձվաբջջի կորիզում հիստոնների պարունակության կինետիկան՝ օվարիոլի զարգացման ֆոլիկուլյար ժամանակամիջոցում: ^3H -լեյցինը ակտիվ կերպով մտնում է կորիզ ամբողջ պրոցեսի ընթացքում: Ամենավաղ շրջանում սպիտակուցը հայտնաբերվում է կորիզի ծայրամասերում և քրոմոսոմներում: Հետագայում այն ներ է առնվում կորիզակի մեջ, ընդ որում նկատվում է սպիտակուցի կորիզակ ներթափանցման քիչ թե շատ ինտենսիվ ժամանակամիջոցներ: Վիտելոգենների սկզբում կորիզը նշվում է ավելի թույլ, քան նրա ավելի վաղ փուլերում, բայց կորիզակը շարունակում է, գրեթե մինչև կորիզից դուրս գալը, ինտենսիվ ներգրավել ^3H -լեյցին: Օօգենեզի վերջում կորիզն ամբողջությամբ նորից ինտենսիվ կերպով ներ է գրավում ^3H -լեյցին:

Ռադիոավտոգրաֆիայի տվյալները վկայում են կորիզում ^3H -լեյցին սպիտակուցների ակտիվ տեղափոխության մասին: Ցիտոֆոտոմետրիան ցույց ավեց, որ կորիզում սպիտակուցի քանակի ավելացումը կապված է գլխավորապես հիստոնների պարունակության աճի հետ, որոնց քանակն ավելանում է 10 անգամ:

THE CONTENT KINETICS OF THE MAIN PROTEINS (HISTONES)
IN THE OOCYTE NUCLEUS OF COCHINEAL RELATED WITH
MORPHO-FUNCTIONAL APPARATUS IN THE OOGENESIS

M. G. KHACHATRIAN, Yu. A. MAGAKIAN, E. M. KARALOVA

The kinetics of the histone content in the oocyte nucleus of cochineal was investigated by radioautographic and cytophotometric methods, during the follicular period of ovarirole development. ^3H -leucin is intensively included in the nucleus during its whole extent: at the very early stage the label is detected in the chromosomes and on the nucleus

periphery, of and then it is included in the nucleolus, with detection of periods of more or less intensive nucleolus labelling. At the beginning of vitellogenesis the nucleus is labeled more slightly than at earlier stages, but the nucleolus continues to include intensively ^3H -leucin, until it comes out of the nucleus. At the end of the oogenesis the nucleus as a whole again includes ^3H -leucin. The radioautographic data indicate an active transport of proteins labeled by ^3H -leucin into the nucleus. Cytophotometry has shown that the increase of protein number in the nucleus is related mainly with the increase of histone content, the number of which increases 10 times. In spite of this the correlation of histone/DNA decreases in the course of oogenesis, which indicates the increase of DNA number poor in histones such DNA is, rDNA amplification of which, probably, takes place at this time.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агроскин Л. С., Папаян Г. В. Цитофотометрия. Л., 1977.
2. Айзенштадт Т. Б. В кн.: Современные проблемы оогенеза. 5—50. М., 1977.
3. Брумберг В. А., Певзнер Л. З. Цитология, 18, 6, 770—772, 1976.
4. Георгиев Г. П., Бакаев В. В. Мол. биология, 12, 6, 1205—1230, 1978.
5. Грузова М. Н. В кн.: Современные проблемы оогенеза. 51—98. М., 1977.
6. Магакян Ю. А., Каралова Е. М., Хачатрян М. Г. Биолог. ж. Армении, 32, 12, 1209—1214, 1979.
7. Магакян Ю. А., Макарян С. Р., Акопян Л. А., Петросян А. В. Биолог. ж. Армении, 32, 11, 1129—1134, 1979.
8. Паносян Г. А. Структура и функция гистонов. Ереван, 1978.
9. Хачатрян М. Г., Акопян Л. А., Петросян А. В., Каралова Е. М., Макарян С. Р., Магакян Ю. А. Цитология, 21, 4, 382—390, 1979.
10. Хачатрян М. Г., Каралова Е. М., Магакян Ю. А. Биолог. ж. Армении, 33, 7, 686—691, 1980.
11. Kent P. W., Hickens M., Ward P. P. Biochem. J., 68, 568—572, 1958.
12. Labelle J. L., Briere N. Acta histochem., 41, 338—343, 1971.