

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА БИОЛОГИЯ

ВЕНЕРА ПАНТАЛЕЕВА НИКОЛОВА

Организация на интермедиерните филаменти
(цитокератини, виментин и ламини)
и промените им по време на овоцитното зреене
при мишка

ДИСЕРТАЦИЯ

За присъждане на образователна и научна степен „доктор”

Област на висше образование 4. „Природни науки,
математика и информатика”

Професионално направление 4.3. „Биологически науки”
Докторска програма „Ембриология”

Научни ръководители:

Доц. СТЕФКА МЕТОДИЕВА ДЕЛИМИТРЕВА, д.б.

Доц. МАЙЯ ДЯНКОВА МАРКОВА, д.б.

София, 2015

Издавам сърдечна благодарност на научните си ръководители доц. Стефка Делимитрева и доц. Майя Маркова за ценните напътствия и всеотранната помощ. Благодаря и на колегите от катедра Биология за подкрепата при разработването на този труд.

Съдържание

Списък на използваните съкращения	1
1. ВЪВЕДЕНИЕ	2
Общи данни за клетъчните опорни структури	2
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	3
Интермедиерни филаменти в соматичните тъкани	3
<i>Молекулен състав и строеж</i>	3
<i>Ламини и ядрена ламина</i>	5
<i>Цитоплазмени интермедиерни филаменти</i>	8
<i>Връзка на IF с други клетъчни структури и помежду им</i>	14
Преобразувания на цитоскелета в хода на овоцитното зреене при бозайниците	18
<i>Времеви ход на овоцитната мейоза</i>	18
<i>Роля на микротубулите</i>	20
<i>Роля на микрофиламентите</i>	23
<i>Роля на цитоплазмените интермедиерни филаменти</i>	25
<i>Роля на ламините и нуклеопорините</i>	28
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	32
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	34
Материали	34
<i>Опитни животни</i>	34
<i>Реактиви за специфично визуализиране</i>	34
Методи	38
<i>Хормонална стимулация на животните за стимулирана овулация и получаване на зрели овоцити</i>	38
<i>Дисекция на яйчникови фоликули за получаване на незрели овоцити</i>	40
<i>Обработка на овоцитите и овоцит-кумулусните комплекси</i>	41
<i>In vitro зреене на миши овоцити (In vitro maturation, IVM)</i>	42
<i>Рутинна светлинна микроскопия</i>	45
<i>Имунофлуоресценция</i>	45
<i>Лазерна сканираща конфокална микроскопия</i>	46
<i>Екстракция за NM-IF</i>	46
<i>PAGE електрофореза</i>	48

Начин на Финансиране	53
5. РЕЗУЛТАТИ	55
Изследване на наличието и вътреклетъчното разпределение на набор от цитокератини и виментин в миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси с различна степен на зрялост	55
Изследване на миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси след екстракция за ядрен матрикс и интермедиерни филаменти (NM-IF)	60
Изследване на колокализацията на белтъците на цитоплазмените IF и актина в овоцити с различна степен на зрялост	69
Изследване на локализацията на ламини В и А/С и връзката им с промените на хроматина в овоцити с различна степен на зрялост	72
Изследване на локализацията на нуклеопорин Nup160 и връзката му с ламините в овоцити с различна степен на зрялост	82
Прецизиране на имуноцитохимичните изследвания чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия	86
<i>Прецизиране на локализацията на белтъци на цитоплазмените интермедиерни филаменти (цитокератини и виментин) и фибриларния актин</i>	86
<i>Прецизиране на локализацията на белтъци на ядрените интермедиерни филаменти (ламини), нуклеопорин Nup160 и тубулин</i>	93
6. ОБСЪЖДАНЕ	103
Цитоплазмените интермедиерни филаменти в миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси	103
NM-IF структури в мишия овоцит, разкрити чрез екстракция за ядрен матрикс и интермедиерни филаменти	108
Колокализация на цитоплазмените IF с фибриларния актин	111
Локализация на ламини В и А/С и връзката им с промените на хроматина в овоцити с различна степен на зрялост	112
Локализация на нуклеопорин Nup160 и връзката му с ламините в овоцити с различна степен на зрялост	114
Прецизиране на вътреклетъчната локализация на изследваните белтъци чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия	115
<i>Цитоплазмени интермедиерни филаменти и фибриларен актин</i>	115
<i>Ядрени интермедиерни филаменти, нуклеопорин Nup160 и тубулин</i>	118
7. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ	124
8. БИБЛИОГРАФИЯ	127

Списък на използваните съкращения

- ГТФаза – гуанозинтрифосфатаза
- ДНаза – дезоксирибонуклеаза
- РНаза – рибонуклеаза
- кат. No. – каталожен номер

- BSA – говежди серумен албумин
- FITC – флуоресцеин-изотиоцианат
- FSH – фоликул-стимулиращ хормон
- GV – зародишно мехурче
- GVBD – разпад на зародишното мехурче
- NEPES – N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфонова киселина
- IF – интермедиерни филаменти
- IU – международни единици
- IVM – In vitro зреене
- LSM – Лазерна сканираща микроскопия
- MEM – Есенциална среда на Eagle
- Mr – относителна молекулна маса
- MTOC – микротубулно-организиращи центрове
- NM-IF – ядрен матрикс и интермедиерни филаменти
- NPC – комплекс на ядрената пора
- PAGE – полиакриламидна гелна електрофореза
- PBS – физиологичен разтвор, буфериран с фосфат
- PMSF – фенилметилсулфонилфлуорид
- SDS – натриев додецилсулфат
- TEMED – N,N,N',N'-тетраметил-етилендиамин
- Tris – трис(хидроксиметил)-аминометан
- TRITC –тетраметил-родамин изотиоцианат
- v/v – обемни
- w/v – тегловни в обем

1. ВЪВЕДЕНИЕ

ОБЩИ ДАННИ ЗА КЛЕТЪЧНИТЕ ОПОРНИ СТРУКТУРИ

Еукариотната клетка се отличава със сложен триизмерен комплекс от белтъчни нишки, функциониращ като нейна вътрешна опора и двигателен апарат. Той създава и поддържа характерната ѝ пространствена организация, придава механична устойчивост на клетъчната мембрана и мембранните органели, осигурява необходимото им взаимно разположение, осъществява насочените движения на клетката и отделните ѝ части и поддържа формата на животинските клетки, които нямат твърда обвивка.

Основната част от клетъчните опорно-двигателни функции се осъществяват от нишковидни структури, разположени в цитоплазмата и общо наричани цитоскелет. Те се групират в три основни системи: микротубули (микротръбички), микрофиламенти (микронишки) и интермедиерни (междинни) филаменти. Микротубулите са полимери на α - и β -тубулин, изградени върху пръстенни комплекси от γ -тубулин; диаметърът им е 20-25 nm. Микрофиламентите са полимери на актина с диаметър 3-6 nm. Интермедиерните филаменти имат междинни размери (диаметър около 10 nm) и се отличават с голяма здравина. Те са полимери на различни тъканно-специфични белтъци, от които най-разпространени са цитокератините и виментинът (вж. Alberts et al., 2008 за обзор върху цитоскелета).

Ядрото по правило не съдържа същите цитоскелетни елементи, които откриваме в цитоплазмата. За ядрения компартмент са характерни други, по-дискретни опорни структури, наречени ядрена ламина и ядрен матрикс. По аналогия с цитоскелета се използва и терминът “нуклеоскелет” – от някои автори като синоним на ядрения матрикс, но все по-често като общо означение на двете структури (ламината и матрикса).

Ядрената ламина се разполага под вътрешната ядрена мембрана. Изградена е от белтъци, наречени ламини и сходни с белтъците на цитоплазмените интермедиерни филаменти (Gerace and Huber, 2012). С нея се свързват комплексите на ядрените пори (nuclear pore complexes, NPC). Ядреният матрикс е относително слабо изучен; простира се във вътрешността на ядрото, включва

известно количество ламини (освен ангажираните в ламината), т. нар. ядрен белтък на делителния апарат NuMA (съкр. от nuclear mitotic apparatus) и белтъци, хомоложни на компоненти на актиновия цитоскелет (Simon and Wilson, 2011).

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

ИНТЕРМЕДИЕРНИ ФИЛАМЕНТИ В СОМАТИЧНИТЕ ТЪКАНИ

Молекулен състав и строеж

IF са характерни за многоклетъчните животни. Измежду трите цитоскелетни системи те имат най-разнообразен състав. При човека са известни над 70 гена за белтъци на IF. Значителна част от последователностите им са хомоложни, което позволява обединяването им в едно семейство. В него според първичната структура се различават 6 групи белтъци: I тип (кисели кератини), II тип (основни и неутрални кератини), III тип (виментин, глиален фибриларен кисел белтък, десмин и периферин), IV тип (неврофиламентни белтъци и интернексин), V тип (ламини) и VI тип (нестин). За обзор върху IF вж. Gruenbaum and Aebi (2014).

Освен в аминокиселинната си последователност белтъците на IF имат прилики и в пространствената си структура. Молекулата им е удължена и съставена от три домена. Основен е централният "пръчковиден" домен, който представлява дълга α -спирала. Той е заграден между два крайни домена – "глава" и "опашка", които са много по-малки и с по-разнообразна структура.

Отделната молекула не остава самостоятелна, тъй като централният домен съдържа хидрофобни участъци. Две еднакви или различни молекули застават паралелно и образуват димер, като α -спиралните им домени се усукват заедно. Кератините са първите белтъци, при които е установен този много разпространен структурен мотив, наречен "усукана спирала" (coiled coil). Те винаги се обединяват по двойки – даден кератин от I тип с определен кератин от II тип – докато другите IF са съставени от еднотипни молекули.

Подреждането на димерите в по-сложни агрегати не е спирално и протича донякъде различно при отделните видове IF (Geisler et al., 1998; Herrmann and

Aebi, 1998; Herrmann et al., 1999; Strelkov et al., 2003). Крайният продукт обаче е сходен – 10 nm филамент, чието сечение има тетрагонална симетрия и обхваща 32 молекули, по-рядко 40, 24 или 16. Основните структурни единици – димерите, са полярни, но сближаването им изисква антипаралелно подреждане, така че филаментът като цяло е неполярен. По тази причина IF за разлика от микротубулите и микрофиламентите не могат да служат като структурна основа за транспортни механизми.

Образуването и динамиката на IF са все още недостатъчно изучени. Полимеризацията им е спонтанна и не изисква нито енергия, нито помощта на допълнителни белтъци (Панков и Марков, 1988; Herrmann and Aebi, 2000). За разлика от микротубулите и микрофиламентите IF при удължаването си присъединяват нови молекули по цялата си дължина, а не само към края си. Характерна за белтъците на IF е крайно ниската концентрация на разтворимите им форми (димери и тетрамери) в клетката, поради което IF изглеждат по-статични от другите две цитоскелетни системи. Стабилността на интермедиерния филамент обаче се понижава силно, когато съставните белтъци се фосфорилират на определени места. Това позволява на клетката с помощта на протеинкинази при необходимост (например при митоза) да реорганизира своите IF (Inagaki et al., 1996; Herrmann and Aebi, 2000).

Ламини и ядрена ламина

От шестте типа белтъци на IF пет са цитоплазмени и са компоненти на цитоскелета. Само ламините (V тип) са ядрени и изграждат ядрената ламина. Тя е двумерна мрежеста структура, която постила вътрешната ядрена мембрана и поддържа целостта ѝ (Verstraeten et al., 2007; Dechat et al., 2010). Ламините са еволюционно най-древните, функционално най-важните и филогенетично най-широко разпространените белтъци на IF – откриват се при всички многоклетъчни животни (Dittmer and Misteli, 2011; Peter and Reimer, 2012). Дрождите и другите изучени еноклетъчни еукариоти са лишени от ядрена ламина, но ламинов хомолог е описан съвсем неотдавна при моделния организъм *Dictyostelium*, който на някои етапи от жизнения си цикъл е многоклетъчен. Откривателите на тази молекула предполагат, че еволюцията на ламините е свързана с появата на

многоклетъчност (Batsios et al., 2012). При растенията ядрената обвивка притежава вътрешен ламиноподобен слой, важен за механичната ѝ здравина. Той е съставен от белтъци със споменатия мотив “усукана спирала”, сходен е по структура с животинската ламина и през клетъчния цикъл търпи същите преобразувания като нея, макар че явно е възникнал независимо (Ciska et al., 2014).

Повечето безгръбначни притежават само един ламин, наричан ламин от В-тип (или просто ламин В). От него в еволюцията на гръбначните чрез дупликация на съответния ген и дивергенция произлизат т. нар. ламини от А-тип. Повечето гръбначни притежават два В-ламина – В1 и В2, получени чрез по-късна дупликация на гена за ламин В, и един А-ламин. При бозайниците се появява и втори ламин от А-тип – т. нар. ламин С. Това става не чрез нова генна дупликация, а чрез алтернативно снаждане на транскрипта на гена за ламин А (Peter and Reimer, 2012). Затова ламините от А-тип се означават още като ламини А/С.

Ламините от В-тип имат универсално разпространение в организма, докато ламини А/С са характерни за диференцираните клетки (Erber et al., 1999). В хода на сперматогенезата при бозайници се експресират два тъканно-специфични ламина – С2 и В3. Те са скъсени варианти съответно на ламините А и В2, получени чрез алтернативно снаждане. При земноводни овоцитите имат специфичен В-ламин, кодиран от отделен ген. Първоначално той е наречен ламин В3, но днес се предпочита означението L-III, за да не става объркване с ламин В3 на бозайниците. Сперматидите от земноводни експресират свой специфичен ламин – L-IV, получен от гена за L-III чрез алтернативно снаждане. Ламините L-III и L-IV са характерни за земноводните и нямат структурни хомолози при бозайниците, макар че L-IV има функционален аналог – ламин В3 (von Moeller et al., 2010).

Ядрената ламина придава механична устойчивост на ядрото, доколкото служи като опора за вътрешната ядрена мембрана, NPC и ядрения матрикс (Prokocimer et al., 2009; Lussi et al., 2011). Когато някой от обичайните за дадена клетка ламини липсва или е дефектен, ядрата са крехки и с абнормална форма (Lammerding et al., 2004). Освен чисто структурната си роля ламините се свързват

с хетерохроматина (може би не пряко, а с посредничеството на други белтъци) и потискат експресията на близко разположените гени (Dechat et al., 2008).

Ламините имат основна роля за преобразуването на ядрото при отворения тип митоза. При прехода G2/M те се фосфорилират под контрола на циклин-зависимата киназа $p34^{cdc2}$, в резултат на което свойствата им се променят. Ламините от тип А през профазата изцяло се отделят от вътрешната ядрена мембрана и се разпръсват в целия обем на цитоплазмата чрез свободна дифузия. Ламините от тип В остават свързани с мембраната посредством прикрепен към С-края им фарнезиллов остатък, но вече не могат да й бъдат механична опора (Dechat et al., 2010). Така ядрената ламина се разрушава, а ядрената обвивка се подготвя за разпадането си в края на профазата. Получените от нея мехурчета все още съдържат ламин В, свързан с мембраната им. Според някои ранни съобщения (Stick et al., 1988) тези мехурчета в по-голямата си част се асоциират с ендоплазмения ретикулум. По-новите изследвания обаче сочат, че те се локализируют в непосредствена близост с митотичното вретено и образуват около него обвивка, наричана от някои автори „вретенов матрикс от ламин В” (lamin В spindle matrix). Натрупването на ламин В явно има значение за изграждането или запазването на вретеното, доколкото експерименталното премахване на ламин В от клетката или въвеждането на определени мутации в гена му води до дефекти на вретеното (Tsai et al., 2006; Ma et al., 2009; Civelekoglu-Scholey et al., 2010; Shi et al., 2014). В късните етапи на митозата протеин-фосфатази дефосфорилират ламините, позволявайки възстановяването на ядрото (Dechat et al., 2010; Olins et al., 2010; Dittmer and Misteli, 2011).

Важната функция на ламините се доказва от факта, че мутациите в техните гени водят до тежки последици (Camoszi et al., 2014). При човека те са причина за група наследствени болести, наречени ламинопатии. Само една от тях засяга В-ламин – автозомно-доминантната левкодистрофия при възрастни, дължаща се на дупликация на гена за ламин В1 (Padiath et al., 2006). Естествено възникнали мутации в гените за В-ламини почти не се наблюдават и явно в повечето случаи имат летално действие. За сметка на това са описани над 10 ламинопатии, дължащи се на мутации в гена за ламин А/С (Bertrand et al., 2011). Някои от тях причиняват дегенеративни промени в определена тъкан (скелетна и сърдечна мускулатура, мастна тъкан, епидермис или периферни нерви), а други –

преждевременно стареене на целия организъм. Примери са съответно автозомно-доминантната мускулна дистрофия на Емери-Драйфус, семейната липодистрофия от II тип, рестриктивната дермопатия и прогерията. Автозомно-доминантното унаследяване е характерно за болестите, дължащи се на ненулеви мутации в гени за IF, доколкото дефектният белтък разстройва организацията на опорните структури и така упражнява доминантно негативно действие.

С методите на генното инженерство са създадени миши модели на ламинопатиите – линии мишки с определена мутация в ламинов ген и фенотип, отговарящ на съответното човешко заболяване (Stewart et al., 2007). Със същия подход е изучено и действието на мутации, които не са наблюдавани при хора. Мишки, у които по генно-инженерен път са унищожени гените за ламини B1 и B2, изненадващо се развиват до раждането, но умират веднага след него поради дихателна недостатъчност. Белодробните им алвеоли са твърде малки, а диафрагмите – тънки, поради което самостоятелното дишане е невъзможно (Kim et al., 2011). Съвсем подобен е фенотипът при трансгенни мишки с привидно много по-лека мутация – отстраняване на няколко домена от ламин B1 (Vergness et al., 2004). Мишки с унищожен ген за ламин A се раждат и живеят седмици, но поради понижена механична устойчивост на ядрата страдат от мускулна дистрофия, подобна на човешката мускулна дистрофия на Емери-Драйфус (Sullivan et al., 1999; Mittelbronn et al., 2008).

Цитоплазмени интермедиерни филаменти

Сравнени с ламините, цитоплазмените IF имат по-ограничено разпространение – свойствени са на повечето, но не на всички групи многоклетъчни животни. Филогенетичните изследвания показват, че белтъците им са се появили рано в еволюцията на *Metazoa* и произлизат от ламини, загубили включен в първичната им структура сигнал за ядрена локализация (Erber et al., 1998). Макар и разположени извън ядрото, те са склонни да се организират сравнително плътно около него и могат да се оприличат на външен аналог на ламината (Alberts et al., 2008). Свързват се с белтъци от ядрената мембрана (Ketema and Sonnenberg, 2011), остават асоциирани с белтъци от ядрената ламина

и матрикс дори след интензивна химична дисекция и има данни, че влияят върху пространствената организация на хроматина (Tolstonog et al., 2002).

Съставът на цитоплазмените IF варира и зависи от типа на клетката. В повечето диференцирани клетки те изграждат добре развита мрежа, лесно забележима при електронномикроскопско наблюдение. Някои слабо диференцирани клетки изглеждат лишени от цитоплазмени IF, но тези данни не следва да се смятат за окончателни при честите съобщения за новооткрити елементи на тази система. Най-разпространените и добре изучени белтъци на цитоплазмените IF са кератините (цитокератините) в епителните клетки, виментинът в клетките от мезенхимен произход, десминът в мускулните клетки, неврофиламентните белтъци в невроните и глиалният фибриларен кисел белтък в астроцитите. Тъканната специфичност на цитоплазмените IF е толкова ясно изразена, че служи като основа за определяне на произхода на тумори (напр. Moll, 1998) и маркери за дегенеративни процеси в съответната тъкан (Strnad et al., 2012).

Функцията на IF е най-лесно установима в епителните тъкани, където кератиновата мрежа е необходима за запазването на целостта на клетката. При липса или променена структура на даден кератин клетките, които го експресират, стават склонни да се разкъсват при напрежение (Chiriev et al., 1994). От белтъците на IF, чиято липса или молекулни дефекти са установена причина за болести на човека, повечето са кератини. Днес такива мутации са известни за над 20 кератинови гена (Chamcheu et al., 2011). Според конкретния увреден кератин болестният процес засяга епидермиса, образуванията му, лигавицата на устата и хранопровода, роговицата или черния дроб. Най-известните наследствени болести, дължащи се на мутации в кератинови гени, са: булозна епидермолиза (засегнат е кератин 5 или 14), кератинопатични ихтиози (кератин 1, 2 или 10), пахионихия конгенита (кератин 6a, 6b, 16 или 17) и епидермолитична палмоплантарна кератодерма (кератин 1 или 9). Също като при ламините и тук изследванията върху редките патологии при човека се допълват с ценни данни от животински модели. Например при мишка е индуцирана нулева мутация на гена за кератин 8 (засега неоткрита при човека), която при част от хомозиготите води до смърт преди раждането, а при оцелелите – до колоректална хиперплазия (Fuchs and Cleveland, 1998).

Десминовите филаменти свързват миофибрилите в областта на Z-диска помежду им и с клетъчната и ядрената мембрана. Лишените от десмин мишки имат нормална миогенеза и се раждат видимо здрави, но с напредване на възрастта понижената механична устойчивост на мускулните клетки води до скелетна миопатия и кардиомиопатия (Thornell et al., 1997). При човека мутации в десминовия ген също причиняват скелетна миопатия и кардиомиопатия (Goldfarb et al., 2004).

Неврофиламентите заздравяват аксона и участват в определянето на диаметъра му, доколкото броят им на единица площ от сечението му е постоянна величина. При човека мутации на гените за неврофиламентни белтъци се свързват с болестта на Charcot-Marie-Tooth, с болестта на Паркинсон и с амиотрофната латерална склероза (al-Chalabi and Miller, 2003). Спонтанна нулева мутация на гена за NF-L при пъдпъдък води до намален диаметър на аксоните и оттам понижена скорост на провеждане, неконтролируемо треперене и нарушения в поведението. Мишките, при които е унищожен същият ген, имат видимо нормално развитие и поведение, но още в млада възраст губят 15-20% от двигателните си аксони (Fuchs and Cleveland, 1998), а регенерацията на миелиновите влакна след увреждане е твърде забавена (Zhu et al., 1997).

Глиалният фибриларен кисел белтък подпомага образуването на израстъци от астроцитите и изглежда необходим за правилното функциониране на тези клетки. При човека точкови мутации на гена за глиалния фибриларен кисел белтък причиняват болестта на Александър – прогресиращо невродегенеративно заболяване със смъртен изход (Johnson and Brenner, 2003). Мишките, лишени от гена, се развиват и размножават видимо нормално (Pekny et al., 1995), но внимателните изследвания разкриват нарушения в централната нервна система. В по-късна възраст се появяват увреждания на миелиновите обвивки, кръвно-мозъчната бариера и архитектурата на бялото вещество (Liedtke et al., 1996).

Виментинът е свойствен на клетките, способни на самостоятелни движения и/или често изложени на механичен стрес (Mendez et al., 2014). Той е тъканно-специфичният белтък на IF в клетките от мезенхимен произход, а освен това се експресира в набор от зародишни клетки, повечето клетъчни култури независимо от произхода им и редица метастазиращи тумори (Colucci-Guyon et al., 1994). Виментиновата мрежа може да достига клетъчната мембрана и да се свързва с нея

(Wu et al., 1999), но в по-голямата си част се разполага около ядрото и намира опора в микротубулите. Тази локализация на виментиновите филаменти обяснява защо те не „втвърдяват“ съществено клетъчната периферия и са оптимални за подвижни клетки, като същевременно повишават механичната устойчивост на цитоплазмата и стабилизират клетъчните органели, включително ядрото (Guo et al., 2013). Освен това виментинът е най-подходящият белтък на IF за клетки, които усилено се делят, поради изразената си връзка с ядрената обвивка. През прометафазата реорганизираните виментинови филаменти образуват около делителното вретено "кафез", с който специфично се свързват получените от ядрената обвивка мехурчета (Maison et al., 1993). Експресията на виментиновия ген се усилюва под действието на растежни фактори (Rogel et al., 2011).

При човека мутации, засягащи виментина, са установени в някои случаи на наследствена катаракта (Müller et al., 2009). При мишки унищожаването на виментиновия ген не причинява видими нарушения (Colucci-Guyon, 1994), но те се разкриват при по-късни подробни изследвания. Еластичността на артериите при нулевите мутанти е значително по-малка, отколкото при дивия тип (Henrion et al., 1997). След отстраняване на 3/4 от бъбречната маса умират всички лишени от виментин мишки и нито една от контролните (Terzi et al., 1997). Координацията на движенията е нарушена, а Бергмановата глия и клетките на Пуркинье в малкия мозък имат аномална морфология. Бергмановата глия при гризачите експресира виментин, а връзката ѝ с клетките на Пуркинье става ясна от това изследване (Colucci-Guyon et al., 1998). Фибробласти, изолирани от мишки без виментин, в култура показват понижена механична устойчивост и влошаване на свързаните с нея функции – подвижност, хемотаксис и способност за реорганизация на колагена (Eckes et al., 1998).

При редица патологични процеси се наблюдава не липса на IF, а техни натрупвания, най-често с променена структура, или поява на даден тип IF в клетки, които нормално не го експресират. Засега не е ясно дали тези явления са причина за болестния процес, странично следствие от него или опит на клетката да се защити в условия на стрес. Някои миопатии се отличават с десминови натрупвания; за една от тях, X-свързаната миотубулна миопатия, има данни, че това е изцяло вторично явление (van der Ven et al., 1995). Няколко невродегенеративни болести са свързани с натрупвания на невروفилamenti

(Houseweart and Cleveland, 1998). В Сертолиевите клетки, които нормално съдържат виментин, се наблюдава натрупване на виментинови филаменти (и нарушаване на подредбата им) при различни тежки нарушения на функцията на семенника – при идиопатичен "синдром на наличие само на Сертолиевите клетки", при крипторхизъм, след прилагане на антиандрогени и в близост до тестикулни тумори (Aumüller et al., 1992). Авторите предполагат, че това натрупване е неспецифична реакция в отговор на вредно външно въздействие. Човешките сперматозоиди, нормално съдържащи малко количество виментин в екваториалния сегмент, също са склонни при нарушения в структурата и функцията си да натрупват този белтък (Маринова и сътр., 1996).

Изследванията в тази област се усложняват от данните, че белтъците на IF не само се подчиняват на твърде сложна регулация на генната експресия, а и когато бъдат синтезирани, на свой ред поемат някакви неизяснени засега регулаторни функции, каквито не се очакват от типични структурни белтъци. Пример за това е наличието на аномални зъби при новородени с мутации в гена за кератин 17 (McLean et al., 1995). Аналогично трансфекция с гена за глиалния фибриларен кисел белтък значително забавя растежа на глиален тумор (Toda et al., 1999). Смъртта на лишени от виментин мишки след отстраняване на бъбречна маса не е резултат от крехкост на тъканите им, а от разстройване на равновесието между регулаторите ендотелин и азотен оксид и може да се предотврати чрез ендотелинови антагонисти (Terzi et al., 1997). Изобщо регулацията на експресията на белтъците на IF в норма и промените ѝ при болестни състояния, както и евентуалната регулаторна функция, упражнявана от тези белтъци върху клетъчните процеси, са все още слабо изучени въпроси. Те представляват значителен интерес както от фундаментална, така и от практическа гледна точка. Има данни, че белтъците на цитоплазмените IF дори могат специфично да влияят върху структурата и експресията на хроматина (Traub, 1995; Tolstonog et al., 2002).

Ако наличните данни се обобщят, изглежда, че функциите на IF са свързани с жизнената дейност на цялостния многоклетъчен животински организъм (за разлика от другите две цитоскелетни системи – микротубулите и микрофиламентите, които до голяма степен могат да се описват на клетъчно равнище). Повечето типове IF са необходими дори не за самото съществуване и

размножаване на организма, а за оптималното му функциониране. Тази цитоскелетна система позволява интензивна нервна и мускулна дейност през сравнително дълъг жизнен период. С други думи, IF са свързани с една от централните насоки в еволюцията на *Metazoa*.

Наличните бази данни позволяват да се сравни наличието на белтъци с даден структурен мотив при основните групи организми. Такова изследване показва, че относителният дял на дълги усукани спирали при многоклетъчните животни е около 4 пъти по-голям, отколкото при растенията, гъбите и едноклетъчните организми. Освен на IF дългата усукана спирала е свойствена на редица двигателни белтъци (миозини, кинезини, динеини), белтъци на нуклеоскелета (например NuMA) и на извънклетъчния матрикс (например ламинин). В епителните клетки цитоплазмените и ядрените IF и ядреният матрикс образуват взаимосвързана система, която пронизва тъканта изцяло. Тази мрежеста структура от белтъци на ядрения матрикс и IF, по-долу означавана с NM-IF (от nuclear matrix and intermediate filaments), според някои автори е механичната основа на многоклетъчния животински организъм (Odgren et al., 1996). Компонентите на NM-IF могат да се изолират чрез тристепенна екстракция, която отстранява останалите клетъчни съставки. Тя включва последователна обработка с нейонен детергент за разтваряне на мембраните, с висока солева концентрация за деполимеризиране на микротубулите и микрофиламентите и с нуклеази за смилане на хроматина. След тази химична дисекция остават само NM-IF, които съставят много малка част от изходното белтъчно съдържание на клетката, но запазват основните черти на нейната архитектура (Fey et al., 1984b).

Връзка на IF с други клетъчни структури и помежду им

За да изпълняват функцията си, интермедиерните филаменти трябва да могат да се свързват както помежду си, така и с редица други клетъчни структури. Това се осъществява с помощта на т. нар. IF-асоциирани белтъци. Някои от тях, например профилагринът, свързват IF помежду им (Jang et al., 1996), но повечето осъществяват връзка между IF и други клетъчни компоненти.

Ламините се свързват, от една страна, с хетерохроматинови участъци, а от друга – с вътрешната ядрена мембрана. Свързването на ламин В с вътрешната

ядрена мембрана се осъществява не само чрез ковалентна модификация (фарнезилиране) на ламина, а и чрез взаимодействие с белтъци от мембраната. Един от тях, наречен В-ламинов рецептор, в хода на клетъчния цикъл също като самия ламин В търпи фосфорилиране и дефосфорилиране спрегнато с динамиката на ядрената обвивка (Tseng and Chen, 2011). Други белтъци от вътрешната ядрена мембрана, наречени SUN, образуват комплекс както с ламин В, така и с белтъци от външната ядрена мембрана, наречени несприни. Тъй като несприните на свой ред се свързват с цитоскелета, комплексът между тях и SUN се нарича LINC (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton). Има няколко вида несприни, взаимодействащи с различни цитоскелетни белтъци. Несприни 1 и 2 се свързват с микрофиламентите, несприн 3 – с IF чрез плектина, а несприн 4 – с микротубулите чрез двигателния белтък кинезин 1 (Ketema and Sonnenberg, 2011). Мутациите, засягащи ламин-свързващи белтъци от вътрешната ядрена мембрана, водят до заболявания, сходни с ламинопатиите (Méndez-López and Worman, 2012).

Освен с ядрената мембрана ламините се свързват и с друг ключов компонент на ядрената обвивка – ядрения поров комплекс, който осъществява транспорта на макромолекули и надмолекулни комплекси между ядрото и цитоплазмата. Физическа връзка между ламината и NPC е установена още в пионерното изследване на Aebi et al., (1986), което за пръв път разкрива, че тя е изградена от IF. Механизмът, чрез който ламините се свързват с NPC, все още се изяснява. Според наличните данни обаче изглежда, че това свързване се осъществява не с посредничеството на допълнителни белтъци, а чрез пряко взаимодействие между ламините и някои от съставните белтъци на NPC – нуклеопорините (Al-Naboubi et al., 2011; Lussi et al., 2011).

В хода на митозата NPC се разпада, компонентите му променят разпределението си и впоследствие отново се организират; това контрастира с високата стабилност на комплекса в трайно неделящите се клетки (Imamoto and Funakoshi, 2012). Като пример за тяхната динамика можем да вземем структурата Nup107-160, която е образувана чрез асоциация на няколко нуклеопорина – девет при гръбначни животни и седем при дрожди. Тя е основна градивна единица на NPC, превъзхождаща по размери и сложност другите му компоненти, и е абсолютно необходима за транспорта на РНК от ядрото към цитоплазмата (Orjalo et al., 2006). Както и следва да се очаква, през интерфазата Nup107-160 се открива

в ядрената обвивка. През митозата тази група нуклеопорини остават свързани помежду си (Loiodice et al., 2004) и показват интересна динамика. На стадий прометафаза те първо се колокализират с вретеновите полюси и кинетохорите, а след това се асоциират с проксималните вретенови нишки. През метафазата обаче Nup107-160 се отделя от микротубулите на вретеното и се разпръсква в целия цитоплазмен обем. Едва през късната анафаза той се концентрира около хромозомните маси и се включва в изграждането на новите ядрени обвивки, като има водещо значение за самосглобяването на NPC (Orjalo et al., 2006; Güttinger et al., 2009). Свързаната с вретеното локализация на Nup107-160 не е само структурна особеност, а има и функционално значение – известни са дрождени щамове с мутации на гена за Nup160, при които митотичното вретено показва значителни дефекти (Orjalo et al., 2006).

През последните години за все повече нуклеопорини се установяват функции по време на митозата, независими от ролята им за ядрено-цитоплазмен транспорт през интерфазата и свързани с изграждането на делителното вретено, хромозомната кондензация, кохезията на сестринските хроматиди, организацията на кинетохорите, вретеновата контролна точка, разположението на центрозомите и цитокинезата. Промени в концентрацията на определени нуклеопорини могат да доведат до анеуплоидия и се предполага, че участват в патогенезата на някои тумори (Chatel and Fahrenkrog, 2011; Nakano et al., 2011).

Цитоплазмените IF също се асоциират с различни клетъчни структури. Това се осъществява чрез набор от асоциирани белтъци. Няколко от най-важните им представители си приличат по функция и първична структура и се обединяват в т. нар. плакиново семейство (името идва от най-рано изучения негов член – десмоплакина). От тях най-широка специфичност проявява плакинът плектин, който свързва различни IF с микрофиламентите, микротубулите и миозиновите филаменти (Svitkina et al., 1998). Както се спомена по-горе, той също така свързва цитоплазмените IF с ядрото чрез несприн 3. Мутации на плектиновия ген са открити у болни от епидермолизис булоза с мускулна дистрофия (Houseweart and Cleveland, 1998).

Разпределението на цитоплазмените IF в клетката е най-общо радиално от ядрото към периферията. Това предполага пряко или непряко взаимодействие на IF както с ядрената обвивка, така и с клетъчната мембрана. По-тясна е връзката с

ядрото, което личи както от микроскопските наблюдения на IF, така и от присъствието им в препарати от изолирани ядра. Днес много от молекулите, осъществяващи тази връзка, са идентифицирани – плектинът и компонентите на комплекса LINC.

Още по-добре са изучени механизмите, чрез които IF се свързват с клетъчната мембрана. В тях участват няколко IF-асоциирани белтъци от плакиновото семейство. В десмозомите кератиновите филаменти се свързват с мембранните белтъчни комплекси чрез десмоплакин, а в хемидесмозомите – чрез друг плакин, BPAG1e (bullous pemphigoid antigen) (Fuchs and Cleveland, 1998; Herrmann and Aebi, 2000). Ролята на тези два белтъка е потвърдена чрез насочена мутагенеза при мишки (Gallicano et al., 1998; Houseweart and Cleveland, 1998). Виментиновите филаменти могат да се свързват с клетъчната повърхност чрез т. нар. PLIC-белтъци, съкр. от protein ligand interaction clusters (Wu et al., 1999). Плектинът също е способен да прикрепя различни IF към клетъчната мембрана.

Важна особеност на животинския цитоскелет е тясната връзка между микротубулите и IF (Fuchs and Yang, 1999; Chang and Goldman, 2004). По правило цитоплазмените IF се опират върху микротубули. Ако последните бъдат разрушени (например чрез обработка с колхицин), IF колабират – свиват се плътно около ядрото. Този колапс е най-силно изразен при виментиновите филаменти, но се наблюдава в по-голяма или по-малка степен и при останалите IF с изключение на кератиновите, които са надеждно прикрепени към клетъчната повърхност чрез десмозомите и хемидесмозомите (Singh and Gupta, 1994). Връзката между IF и микротубулите може да се осъществи както от плектина, така и от асоциирания с микротубулите двигателен белтък кинезин (Herrmann and Aebi, 2000).

Нормално цитоплазмените микротубули на клетката често търпят контролиран преход между растеж и разпад, наречен динамична нестабилност (Human and Karsenti, 1996). Микротубулите, поддържащи IF, обаче са значително по-устойчиви от останалите микротубули в цитоплазмата, понеже не им е присъща динамична нестабилност. Това се постига чрез модифициране (детирозиниране) на част от съставния тубулин (Gurland and Gundersen, 1995). Детирозинирането е предпоставка и за взаимодействието на микротубулите с IF чрез кинезин (Kreitzer et al., 1999).

IF са свързани и с актиновия цитоскелет (Chang and Goldman, 2004), макар и не толкова тясно, колкото с микротубулите. Една от причините за това е, че IF се организират най-вече около ядрото, докато някои от най-важните функции на микрофиламентите изискват свързването им с клетъчната мембрана, поради което значителна част от микрофиламентите в клетката се намират непосредствено под повърхността ѝ, в т. нар. кортекс. (Hitt and Luna, 1994). Въпреки това поне в някои случаи актиновите филаменти направляват изграждането на кератиновите (Weber and Bement, 2002). Белтъкът VPAG1n, изоформа на гореспоменатия VPAG1e, прикрепва неврофиламентите към актиновия цитоскелет. Плектинът също свързва цитоплазмените IF с микрофиламентите (Fuchs and Cleveland, 1998). Мутации в гените за тези два плакина водят до видими фенотипни нарушения (Houseweart and Cleveland, 1998; Fuchs and Yang, 1999). Виментиновите и актиновите филаменти могат да се свързват и посредством актин-свързващия белтък фимбрин (Correia et al., 1999).

Тясното взаимодействие на IF с микротубулите и микрофиламентите е логично и следва да се очаква за всеки тип клетки независимо от конкретните им структурни и функционални особености. Тези две цитоскелетни системи са по-универсални и изпълняват в клетката по-фундаментална роля, която включва не само опорна, а и двигателна функция. Ето защо изучаването на IF във всяка тъкан изисква подробни познания за нейния тубулинов и актинов цитоскелет. В следващия подраздел ще се разглеждат и трите системи в развиващия се овоцит – клетка, която въпреки своята тотипотентност е продукт на изключително своеобразно диференциране.

ПРЕОБРАЗУВАНИЯ НА ЦИТОСКЕЛЕТА В ХОДА НА ОВОЦИТНОТО ЗРЕЕНЕ ПРИ БОЗАЙНИЦИТЕ

Времеви ход на овоцитната мейоза

Една от причините за своеобразието на овоцитния цитоскелет и нуклеоскелет е особенният и изключително удължен ход на женската мейоза във времето. Тя започва още в ембрионалния яйчник. След началото на овогенезата обаче овоцитите спират развитието си в края на профазата на първото мейотично

делене. Почти до самата овулация те остават блокирани в модифициран диплотен, наречен диктиотен (dictyotene) или по-често диктиат (dictyate). Продължителността на този период на застой е видово специфична и варира от няколко седмици при гризачи до повече от 10 години при човека и други дълголетни бозайници. Въпреки разликите между различните бозайници в това отношение, както и в други аспекти на овогенезата, тя протича по фундаментално общ план при различните бозайници, поради което мишката често се използва като модел при изследвания на репродукцията на клетъчно равнище (Ватев и Живков, 1986).

Овогенезата се възобновява в пубертета, когато под влияние на сложна верига от хормонални и паракринни стимули отделни яйцеклетки започват да растат и възобновяват мейозата си. Те търпят ядрени и цитоплазмени преобразувания и от диктиата на профаза I достигат до метафазата на второто мейотично делене. В този стадий овоцитът остава блокиран до оплождането. Активацията му при контакта със сперматозоида води до повторно възобновяване на мейозата и довършване на второто мейотично делене (Vatev and Zivkov, 1980).

Поредицата от събития, през които овоцитът преминава до достигането на метафаза II, се означават като мейотично зреене. Този процес се характеризира с уплътняване на хроматина, разпадане на ядрената обвивка и образуване на двуполусно вретено, което разделя генетичния материал между дъщерните клетки. Тъй като профазното ядро на първичния овоцит по традиция се нарича зародишно мехурче (GV – germinal vesicle), неговото разпадане при прехода към метафаза I често се означава със съкращението GVBD (germinal vesicle breakdown).

Мейотичното делене по време на овогенезата е асиметрично и в резултат почти цялото количество цитоплазма се запазва за овоцита. След отделянето на първото полярно телце бързо се формира второто мейотично вретено, което остава закотвено под плазмалемата до активирането на яйцето след оплождането. Всички тези последователни промени зависят от взаимодействията на хроматина с цитоплазмата и се опосредстват от цитоскелетните елементи.

В хода на зреенето се променя и взаимоотношението на овоцита с неговото обкръжение. В яйчника овоцитът е заобиколен от соматични клетки, заедно с които образува фоликул (Овчаров и Такева, 2009). Връзката между двата типа

клетки не е само структурна, а и функционална: диференцирането на овоците не е клетъчно-автономно, а в тясно взаимодействие и с помощта на фоликулните клетки, с които образува овоцит-кумулусен комплекс и които влияят върху хода на мейозата му (Alvarez et al., 2009; Luciano et al., 2014). Докато е на стадий GV (т.е. блокиран в диктиат), овоцитът е свързан с голям брой заобикалящи го фоликулни клетки, чиито цитоплазмени израстъци пронизват zona pellucida и достигат клетъчната му мембрана. На нивото на зоната тези израстъци са изключително тънки (диаметър под 1 микрон), но при достигане на оолемата образуват крайно разширение (foot process) за по-ефективен контакт (Hyttel et al., 1986). След възобновяването на мейозата тези междуклетъчни контакти започват да се прекъсват. Броят на израстъците прогресивно намалява и на етап метафаза II те рядко се наблюдават (Suzuki et al., 2000). Така зреенето започва при тясно взаимодействие на овоците с близките фоликулни клетки, но с напредване на овогенезата връзката отслабва и зрялото яйце е изолирано от околната тъкан. На този етап вече му е необходимо взаимодействие не със соматичните клетки на организма, а с клетка, идваща от друг организъм – мъжката гаметета.

Роля на микротубулите

Микротубулите в клетката водят началото си от т. нар. микротубулно-организиращи центрове (МТОС), съдържащи γ -тубулин (Oakley, 1992). За животинските клетки основен МТОС е центрозомата, чиято структура и функции са подробно разгледани от Ou and Rattner (2004) и Nigg et al., (2014). Нейният аморфен материал, заобикалящ центриолите, е богат на γ -тубулинови пръстенни комплекси, които нуклеират цитоплазмените микротубули и поддържат стабилен техният т. нар. минус-край. На другия (плюс) край се наблюдава динамична нестабилност – полимеризацията на α - и β -тубулин се редува с периодична бърза деполимеризация на част от тръбичката.

С навлизането на клетката в делене двете центрозоми, дотогава сближени, започват да се раздалечават, а динамичната нестабилност на микротубулите нараства многократно (Rusan et al., 2001). В резултат всички микротубули, които не успеят да стабилизират своя (+)-край чрез свързване с кинетохора или насрещна микротубула, се разпадат. Така мрежовидният тубулинов цитоскелет на

интерфазната клетка се преобразува в двуполусно делително вретено, което осигурява подреждането на хромозомите в екваториалната равнина през метафазата и сегрегацията им през анафазата.

През последните години се разкри един интересен факт: в делящите се клетки центрозомата не е единствен МТОС. Т. нар. кинетохорни или К-нишки, чийто (+)-край е свързан с кинетохората, често се нуклеират в непосредствено съседство с нея и се стабилизират от нея, в резултат на което тя се превръща в малък МТОС (Rieder, 2005; Mottier-Pavie et al., 2011). За целта след разпадането на ядрената обвивка с кинетохората се свързват белтъците NUP107-160 от ядрения поров комплекс. Към тях се присъединяват γ -тубулинови пръстенни комплекси, които ще нуклеират микротубулите. Този процес изисква участието на малката ГТФ-аза Ran в нейната фосфорилирана форма (RanGTP), която през интерфазата се намира в ядрото и остава концентрирана около хромозомите и след неговото разпадане (Mishra et al., 2010).

Горното описание в общи черти важи за всяко еукариотно клетъчно делене, независимо дали е митоза или мейоза. Овоцитната мейоза обаче има важна особеност – протича без центрозоми, което е уникален случай за животинските клетки (вероятно като механизъм за предотвратяване на партеногенеза). Овогониите и първичните овоцити до стадий пахитен имат нормални центрозоми. През следващите стадии обаче центриолите се разрушават, а заобикалящият ги аморфен материал се разпръсва (Manandhar et al., 2005). С това центрозомата престава да съществува, а нейният γ -тубулин се разпределя в многобройни малки МТОС в цитоплазмата (Maro et al., 1984; Dumont and Desai, 2012). Те през диакинезата се разполагат около ядрото и започват да нуклеират микротубули, с което започва изграждането на вретеното.

През прометафазата ядрената обвивка се разпада (GVBD) и тубулинът влиза в контакт с хроматина. Множеството звезди от тубулин, заобикалящи хромозомите, отначало са ориентирани случайно. Успоредно с продължаващото уплътняване на хромозомите обаче звездите постепенно нарастват и се сближават, като се организират в биполярно вретено с хромозомите на екватора. По този начин разпръснатите цитоплазмени МТОС се обединяват и образуват полюсите на вретеното без участието на центрозоми (Делимитрева, 2010). Нишките на вретеното ориентират бивалентите в екваториалната равнина през

метафаза I и транспортират хомоложните хромозоми към полюсите през анафаза I. Аналогично се образува и функционира вретеното през второто мейотично делене, докато бъде блокирано в метафаза II в очакване на оплождането.

Поради липсата на центрозома кинетохорните нишки, нуклеирани близо до хромозомите, имат далеч по-важна роля за изграждане на вретеното в зреещия овоцит, отколкото в митотично делящите се соматични клетки (Rieder, 2005). След като самите хромозоми на овоцита чрез кинетохорите си действат като МТОС, следва да очакваме всеки дефект в организацията на хроматина да доведе до дефект и във вретеното и да има драматични последици – мейозата да бъде блокирана или да завърши с неправилно разпределение на хромозомите. Известно е, че въпреки напредъка на техниките за асистирана репродукция шансът за постигане на бременност при всяка отделна процедура не надвишава 30% (Nyboe Andersen et al., 2009). При някои категории пациентки вероятността за зачеване е значително понижена поради склонност към мейотични грешки в хромозомното преразпределение (Delimitreva et al., 2005, Zhivkova, 2003, Zhivkova et al., 2007). Откакто е забелязано, че при човешките овоцити и ранни ембриони нивото на бройни хромозомни грешки е неочаквано високо, този факт се смята за една от основните причини за неуспешното *in vitro* (а вероятно и *in vivo*) оплождане. Причините за хромозомните грешки са в процес на изясняване и все повече изследвания подкрепят хипотезата, че те са последица от грешки в хромозомното ремоделиране, които водят до грешки в пренареждането на цитоскелета на овоцита по време на мейозата.

Роля на микрофиламентите

При деленето на животинските клетки актиновият цитоскелет осъществява цитокинезата, като образува контрактилен пръстен между телофазните ядра. В овоцитната мейоза обаче участието му става необходимо на много по-ранен етап по две причини. Първо, дължината на микротубулите е ограничена – те могат ефективно да се свързват с хромозомите само в клетки, чийто диаметър не надхвърля 30µm (Lenart et al., 2005). Овоцитът обаче се отличава с огромен обем и съответно неговото GV има необичайно голям диаметър за ядро. Ето защо в хода на GVBD мрежа от микрофиламенти се образува около хромозомите и

предизвиква първоначалното им сближаване (конгресия), за да могат да бъдат захванати от тубулиновото вретено (Lenart et al., 2005). Второ, за да бъде цитокинезата асиметрична, трябва да се осигури периферно разположение на мейотичното вретено. Именно микрофиламентите изтеглят вретеното в периферията на овоцита и го закотвят под клетъчната мембрана (Brunet and Verlhac, 2011).

На стадий GV актиновите филаменти се разполагат предимно в тънък кортикален слой и около ядрото. При разпадането на ядрената обвивка околядрената актинова мрежа се разполага около хроматина и запазва хромозомите близо една до друга. Това сближаване на хромозомите води до сближаване и на микротубулните звезди – предшественици на вретеното. При следващите стадии на мейозата микротубулите остават тясно свързани с актиновите филаменти и техния моторен белтък миозин. Така около вретеното, изградено от микротубули, актинът формира вторично “вретено” от микрофиламенти (Azoury et al., 2008).

След разпадането на ядрената обвивка (GVBD), първоначално вретеното се формира в центъра на клетката. В периферията срещу един от полюсите му започват да се струпват актинови филаменти. Изгражда се актиновата шапка, която с помощта на миозина, разположен около вретеновите полюси, определя посоката на миграция на вретеното към кортекса. Теглено от микрофиламентите, то започва да се премества към периферията. При мишка тази миграция протича 2,5 до 3 часа преди отделянето на първото полярно телце (Verlhac et al., 2000; Azoury et al., 2009). След като придвижат вретеното до кортекса, актиновите филаменти го закотвят под плазмалемата.

Актинът участва и в отделянето на полярните телца. Когато вретеното достигне до кортекса, овоцитът довършва първото си мейотично делене. Около екватора на телофазното вретено се формира контрактилен актинов пръстен. Този пръстен постепенно се стеснява и разделя овоцита от полярното телце. Следва бърза организация на второто мейотично вретено под оолемата. То остава закотвено там до оплождането.

При повечето изучени животни, включително мишката, мейотичното вретено на метафаза II първоначално е разположено успоредно на оолемата (Brunet and Verlhac, 2011). След проникването на сперматозоида и активацията на

овоцита вретеното се завърта, за да се отдели полярното телце с минимална загуба на цитоплазма. Този процес се контролира от актиновите филаменти. Доказателство за това дават Zhu et al., (2003), като използват цитохалазин В за разграждане на микрофиламентите. В резултат вретеното не се завърта и не се образува актинов пръстен, който да отдели полярното телце. Вместо това в цитоплазмата остават два хаплоидни хромозомни набора.

Важно значение за овогенезата има и актиновият цитоскелет на кумулусните клетки. Техни микрофиламенти служат като опора на израстъците им, които преминават през zona pellucida, навлизат в перивителинното пространство и се свързват със зреещия овоцит.

Роля на цитоплазмените интермедиерни филаменти

По-голямата част от изследванията на овоцитния скелет са съсредоточени върху актиновите и тубулиновите структури, които осъществяват мейозата и цитокинезата. IF остават на заден план и според някои изследвания изобщо липсват в овоцитите, макар да са добре представени в соматичните клетки на яйчника (Czernobilsky et al., 1985; Wendl et al., 2012). В последните години са натрупани данни за белтъци на IF (най-вече цитокератини), които присъстват в цитоскелета на яйцеклетките и изпълняват определени функции. Gall et al., (1992) наблюдават реакция в кортикалната област на овоцити от овца. Santini et al., (1993) имуноцитохимично локализируют кератини 8, 18 и 19 в човешки овоцити. Както във фетален, така и във възрастен яйчник при тази реакция се визуализира единичен околядрен агрегат. Кератин 8 е в малко количество и това според авторите би могло да обясни отрицателните резултати на други изследователи, търсили избирателно този кератин или партньора му кератин 18 в овоцити и ранни зародиши. Gallicano et al., (1994) изследват яйца от няколко вида бозайници (мишка, свиня, говедо, куче и човек) и описват в тях двумерни цитоскелетни структури, съставени от филаменти с диаметър 10-11 nm. Тези филаменти реагират положително за кератини 5, 6, 8, 16 и тип Z, както и за актин.

Plancha (1996) описва динамиката на цитокератиновите филаменти в зреещи хамстерови овоцити. Според този автор в края на профаза I (етап GV) кератините са съсредоточени в 4 до 10 големи агрегата в кортикалната

цитоплазма. През метафаза I агрегатите се разпадат на многобройни малки струпвания и към метафаза II реакцията за кератин става почти хомогенна. Kabashima et al., (2010) получават подобни резултати и въвеждат термини, с които описват разпределението на кератиновите структури в овогенезата при хамстер. Те наричат големите овални агрегати на етап GV кортикален модел, по-малките струпвания през метафаза I – фрагментарен модел, а многобройните разпръснати кератинови гранули през метафаза II – грануларен модел. Според авторите с напредването на овогенезата кератиновата мрежа се усложнява и вероятно играе роля за поддържането на целостта на яйцеклетката при голямото механично напрежение след овулацията. За разлика от Plancha (1996), на етап GV тези автори наблюдават освен кортикалните агрегати и фина мрежа от кератинови филаменти, която заобикаля плътно ядрото. Засега не е ясно дали съобщените разлики в имуноцитохимичната реакция за кератини при различните бозайници отразяват видово-специфични особености или са просто резултат от предварителния характер на изследванията. Подобна локализация на цитокератини в хода на овогенезата е описана при мишка (Wei et al., 2013).

Цитокератини са локализирани чрез специфични антители и в овоцити на други сухоземни гръбначни: жабата *Xenopus laevis* (Torrey et al., 1992; Gard et al., 1997) и гущера *Podarcis sicula* (Maurizii et al., 1997). При най-обстойно изучение обект – *Xenopus*, е установено, че кератиновият цитоскелет се организира през ранните етапи на овогенезата в кортикалната цитоплазма и около GV. В растящите овоцити той се разраства и поляризира, а към края на зреенето търпи разпад (Gard et al., 1997; Clarke and Allan, 2003; Kloc et al., 2005). При влечугото *Podarcis* кератин се наблюдава в растящите овоцити като тънък кортикален слой, който става по-дебел към края на превителогенния растеж. Не са съобщени данни за по-късните етапи (Maurizii et al., 1997).

Данните за други белтъци на цитоплазмените интермедиерни филаменти в яйцеклетките са много по-оскъдни. Има обаче данни за наличие и роля на втория по разпространение и важност (след цитокератините) цитоплазмен IF-белтък – виментина. Santini et al., (1993) освен за кератини изследват имуноцитохимично човешки яйчник и за виментин и не го откриват в овоцитите, макар да установяват положителна реакция във фоликулните клетки. За разлика от тях Payne et al., (2003) съобщават, че в хода на оплождането при говедо и резул

макаци виментинови филаменти образуват мрежа около пронуклеусите и специфично се свързват с една от субединиците на динактина – белтък, подпомагащ двигателната функция на динеина. Авторите инжектират в зиготите антитяло срещу виментин и установяват, че то пречи на сближаването на пронуклеусите. Въз основа на тези резултати те предполагат роля на виментина и динактина за нормалното развитие на пронуклеарните зиготи.

Може да се обобщи, че като цяло IF в женските гамети все още не са проучени. Valojerdi and Salehnia, (2005) изследват ултраструктурата и жизнеспособността на миши зрели яйцеклетки след различни процедури на замразяване и установяват, че IF са чувствителни към замразяване и степента, в която са съхранени, корелира с потенциала на развитие на замразените яйцеклетки. Plancha et al., (1989) се опитват да приложат екстракцията за NM-IF към овоцити от хамстер, но поради методологични трудности (клетките не се адхезират върху предметните стъкла) успяват да получат само предварителни резултати. Те посочват, че овоцитите остават положителни за кератин и след екстракцията, но не описват конкретни промени (или запазване) на видимата структура на клетката и не публикуват микроскопска документация. Kadam et al., (2006) екстрахират миши яйцеклетки за NM-IF и чрез имуноблот откриват конкретен белтък (миозин MYH9) в получените NM-IF екстракти, но не изследват екстрактите микроскопски и не публикуват електрофоретичния им профил. Следователно до момента NM-IF компонентите в овоцити не са характеризирани нито като микроскопска структура, нито като белтъчен състав.

Горе цитираните данни за наличие и динамика на IF в хода на овогенезата и оплождането са интересни и обещаващи, но все още имат предварителен характер. Те подчертават необходимостта от подробни изследвания върху IF в яйцеклетките от бозайници на различни етапи от развитието им.

Още по-оскъдни са сведенията за NM-IF компонентите при кумулусните клетки. Техният цитоскелет е важен за овогенезата, доколкото осигурява механичната основа на взаимодействието им с овоцита. В кумулусните клетки е установено едновременно наличие на цитокератини и виментин, което се среща често в клетъчните култури, но е рядко в тъканите *in vivo* (Czernobilsky et al., 1985; Gall et al., 1992). И двата белтъка на IF заедно с микротубули и микрофиламенти са концентрирани в цитоплазмените израстъци, които пронизват

zona pellucida и се свързват с мембраната на овоцита. Мрежата от интермедиерни филаменти, проникваща в израстъците, се разраства в отговор на хормонална стимулация (Sutovsky et al., 1994). При плъши модел на овариална поликистоза е установено особено разпределение на двата белтъка на IF – кумулусните клетки в непосредствена близост с овоцита съдържат виментин, докато по-периферно разположените фоликулни клетки, постилащи базалната мембрана, съдържат кератин. Тези предварителни данни сочат, че е много вероятно IF на кумулусните клетки да са важни за взаимодействието на тези клетки с овоцита и съответно за неговата диференциация. Въпреки това структурната организация на IF в кумулусните клетки и особено в техните израстъци все още не е добре изучена, най-вероятно поради значителните методични трудности.

Роля на ламините и нуклеопорините

Въпреки че сходството между ядрената ламина и цитоплазмените IF е установено най-напред при овоцити – от земноводното *Xenopus* (Aebi et al., 1986), преобразуванията на ламината в хода на мейозата все още са твърде слабо изучени. Това се дължи на големите методологични трудности при имуноцитохимичните изследвания на овоцити от бозайници и в частност на техните ядра.

Организация на хроматина в зреещите овоцити е много специфична и не докрай изучена. Първо, GV е многократно по-голямо от ядрата на соматичните клетки. Второ, дълго време след пълното спиране на транскрипцията в него се наблюдава структура, на пръв поглед приличаща на ядърце. Това не е същинското ядърце и не притежава активностите и белтъците, характерни за него (Inoue and Aoki, 2010), но е необходимо за развитието на зиготата след оплождането (Ogushi and Saitou, 2010). Представява правилна сферична структура и по време на растежа на овоцита (все още на етап GV) се загражда от добре оформен сферичен слой от хетерохроматин, превръщайки се в „оградено ядърце” (surrounded nucleolus, Tan et al., 2009) или „ядърце с очертана граница” (rimmed nucleolus, Can et al., 2003). Някои автори наричат този хетерохроматин със специален термин – кариосфера (de la Fuente et al., 2004). Оформянето на сферичния перинуклеоларен хетерохроматинов слой е свързано с прекратяване на транскрипцията (Bonnet-

Garnier et al., 2012) и е показател за мейотичната компетентност на овоцита, т.е. способността му да възобнови мейозата и да продължи със следващите етапи на зреенето (Wickramasinghe et al., 1991; Ma et al., 2013).

Огромните по мащаб преобразувания, които включва мейотичното зреене, засягат не само GV, но и цитоплазмата и клетъчната периферия. Има данни, че всички тези преобразувания се ръководят от хроматина и в частност от хроматиновите белтъци (Делимитрева, 2010). Въпреки важната роля на хроматина малко автори отдават нужното значение на промените в т. нар. едромасабна хроматинова структура (large-scale chromatin structure) в хода на овогенезата (De La Fuente, 2006). Предполага се, че в поддържането на характерната организация на хроматина преди GVBD участват ядрените IF, изградени от ламини.

Наличните данни сочат, че в ядрото на зреещия овоцит на стадий GV се съдържат ламини както от тип B, така и от тип A (Schatten et al., 1985; Prather et al., 1989), които изграждат добре развита ядрена ламина (Can et al., 2003). При бозайниците (за разлика от земноводните) не са установени ламини, специфични за женските гамети или техните предшественици. Интересно е, че според някои автори ламините от тип B, които поначало са по-широко разпространени, в ядрото на GV-овоцитите се съдържат в по-малко количество и показват по-променливо разпределение от „диференцирания“ тип ламини A/C (Hall et al., 2005; Foster et al., 2007).

С възобновяването на мейозата овоцитните ламини търпят динамични промени във вътреклетъчното си разпределение. На етап GVBD ламин A/C може да образува безформен агрегат близо до хромозомите (Prentice-Biensch et al, 2012). На по-късните етапи, т.е. в метафазните овоцити, се съобщава за изчезване на реакцията за ламини B и A/C (Prather et al., 1989; Prentice-Biensch et al, 2012). При оплождането в пронуклеарната зигота се установява ламина с типичен състав и структура, включваща ламини както от B, така и от A/C тип (Prather et al., 1989; Foster et al., 2007; Kelly et al., 2010), макар че ламини A/C изчезват от ядрената обвивка в по-късния зародиш (при прехода към бластоциста).

Един от малкото известни факти е, че непосредствено преди GVBD успоредно с фосфорилирането на ламин B2 в ядрената обвивка се появяват широки отвори, 10-20 пъти по-големи от обичайните ядрени пори (Choi, 1996). Предполага се, че тези отвори дават достъп на цитоплазмени белтъци до

хроматина още при интактно на вид ядро. Неясно обаче остава кой е точният стадий, в който протича този процес, и кои цитоплазмени белтъци специфично се свързват с хроматина. С голяма вероятност тези белтъци са цитоскелетни елементи, участващи в сближаването на хромозомите и сглобяването на мейотичното вретено.

Засега не е установена относителната роля на споменатите широки отвори в сравнение с транспорта през NPC на ядрената обвивка. Можем да предположим, че с напредване на зреенето водещата роля се прехвърля към широките отвори във все по-голяма степен. Тази идея се основава на факта, че при фосфорилиране на ламините в овоцити на бодлокожи NPC се отделят от обвивката успоредно с появата на широки отвори (Lenart et al., 2003). Съдбата на NPC в овоцитите от бозайници обаче все още не е изучена; данните за тяхната локализация през различните стадии на деленето се отнасят за митоза на соматични клетки. Този въпрос заслужава особено внимание предвид на цитираните по-горе неотдавнашни съобщения, че нуклеирането на микротубули в близост до кинетохорите става с участието на белтъци от NPC.

В заключение следва да посочим, че специфичните компоненти на цитоскелета и нуклеоскелета на високоорганизираните животински клетки – интермедиерните филаменти, са недостатъчно изучени в овоцитите и овоцит-кумуляните комплекси, особено при бозайници. Досегашните изследвания обаче показват, че е много вероятно тези опорни структури да имат важно значение за овогенезата. От цитоплазмените IF по литературни данни в овоцита присъстват цитокератини и виментин, но данните за техните преобразувания в хода на овоцитното зреене все още са откъслечни и противоречиви. Твърде слабо изследвана е и ядрената ламина; макар че присъствието ѝ в началото на овогенезата е потвърдено, по-нататъшната ѝ съдба е неясна чак до възстановяването ѝ в пронуклеарната зигота. Оскъдни, макар и интригуващи, са и данните за NPC. Тясната структурна и функционална връзка между ядрената ламина и NPC изисква те да бъдат изследвани успоредно, за да се разберат сложните преобразувания на ядрената обвивка по време на овоцитната мейоза.

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ:

Да се изследват чрез имуноцитохимични методи и лазерна сканираща конфокална микроскопия промените в организацията на ядрената ламина и цитоплазмените IF в миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси на различни етапи от зреенето. Чрез успоредни изследвания тези промени да се съпоставят с промените в организацията на микротубулите, микрофиламентите, хроматина и ядрените порови комплекси, за да се разкрият взаимодействията между тези структури в хода на овогенезата.

ЗАДАЧИ:

1. Да се изследва набор от цитокератини и виментин в миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси с различна степен на зрялост чрез имуноцитохимични методи.
2. Да се подложат миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси на екстракция за NM-IF и да се опишат промените в структурата им след химичната дисекция.
3. Да се изследват стадиите и степента на колокализация на белтъците на цитоплазмените IF и актина в различни стадии от зреенето на овоцитите.
4. Да се проследят промените на ядрената ламина в хода на зреенето на миши овоцити и връзката им с едромашабните хроматинови промени чрез имуноцитохимични методи.
5. Да се проследи динамиката на промените в количеството и разпределението на компоненти на комплексите на ядрените пори в различните стадии на овоцитното зреене и да се свържат с промените в ламината чрез имуноцитохимични методи.

6. С цел детайлно изследване на имуноцитохимичните резултати да се визуализира флуоресцентната реакция в оптични срези с дебелина 0,5 μm , които да се използват за прецизно описание на триизмерните цитоскелетни структури чрез възможностите на лазерната сканираща конфокална микроскопия.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

МАТЕРИАЛИ

Опитни животни

Като източник на овоцити бяха използвани предпубертетни (на възраст 4-5 седмици) девствени женски лабораторни мишки от линия BALB/c. Животните бяха осигурявани от вивариума на Медицинския университет – София.

Всички провеждани експерименти бяха съобразени с българското и европейско законодателство относно използването на животни за научни изследвания и предварително одобрявани от Комисията по етика на научните изследвания в Медицинския университет – София.

След хормонална стимулация от яйцепроводите и яйчниците на мишките се получаваха овоцити с различна степен на зрялост и техни комплекси с кумулус, както е описано подробно по-долу.

Реактиви за специфично визуализиране

1. Първо антитяло

Като сонди за откриване на изследваните белтъци бяха използвани следните първи антитела:

– анти-пан-цитокератин, IgG1, клон No. PCK-26, моноклонално мише (Sigma-Aldrich), кат. No. C1801; получено срещу човешки епидермални клетки, разпознава кератини 1, 5, 6, 8 и хомоложни цитокератини от II тип от различни сухоземни гръбначни; разреждаше се 1:300 във физиологичен разтвор, буфериран с фосфат (PBS, рН 7,2) с 0.3% говежди серумен албумин (BSA) и 1% натриев азид като консервиращ агент;

– анти-виментин, IgM, клон No. VIM-13.2, моноклонално мише (Sigma-Aldrich), кат. No. V5255; получено срещу човешки фибробласти, разпознава виментин от различни сухоземни гръбначни; разреждаше се 1:300 в PBS, pH 7,2 с 0.3% BSA и 1% натриев азид.

– анти-ламин В2, поликлонално заешко (Sigma-Aldrich), получено срещу човешки ламин, разпознава ламин от различни бозайници, разреждаше се 1:200 в PBS, pH 7,2 с 0.3% BSA и 1% натриев азид;

– анти-ламин А/С, IgG2а, клон No. 4C11, моноклонално мише (Sigma-Aldrich), кат. No. SAB4200236; получено срещу човешки ламин А, разпознава ламин А/С от различни бозайници, разреждаше се 1:200 в PBS, pH 7,2 с 0.3% BSA и 1% натриев азид;

– анти-нуклеопорин 160, поликлонално заешко (Sigma-Aldrich), кат. No. SAB4500969; получено срещу пептид от човешки нуклеопорин 160 (компонент на комплекса Nup107-160), разпознава нуклеопорин 160 от човек и гризачи, разреждаше се 1:200 в PBS, pH 7,2 с 0.3% BSA и 1% натриев азид;

– анти- α -тубулин, IgG1, клон DM1A, моноклонално мише (Sigma-Aldrich), кат. No. T6199; получено срещу микротубули от кокоши зародиш, разпознава α -тубулин от широк набор еукариоти, разреждаше се 1:1000 в PBS, pH 7,2 с 0.3% BSA и 1% натриев азид;

– анти- α -тубулин, поликлонално заешко (Sigma-Aldrich), кат. No.T3526, получено срещу микротубули от кокоши зародиш, разпознава α -тубулин от човек и кокошка, разреждаше се 1:1000 в PBS, pH 7,2 с 0.3% BSA и 1% натриев азид.

2. Второ антитяло

Реакцията беше визуализирана с помощта на следните втори антитела, конюгирани с флуорохроми:

– поливалентно козе антитяло срещу миши IgG, IgA и IgM, конюгирано с FITC (Sigma-Aldrich), кат. No. F1010; разреждаше се 1:300 в PBS (pH 7,2) с 0.3% BSA и 1% натриев азид. Това антитяло се използваше за детекция на виментин, доколкото първото ни антитяло срещу виментин (VIM-13.2) беше от клас IgM.

– F(ab)₂ фрагмент от афинитетно-изолирано козе антитяло срещу миши IgG (Fab-специфично), конюгирано с FITC (Sigma-Aldrich), кат. No. F8521; разреждаше се 1:300 в PBS pH 7,2 с 0.3% BSA и 1% натриев азид. Това антитяло се използваше за детекция на цитокератини.

– афинитетно-изолирано козе антитяло срещу миши IgG, конюгирано с FITC (Sigma-Aldrich), кат. No. 0257; разреждаше се 1:200 в PBS (pH 7,2) с 0.3% BSA и 1% натриев азид. Това антитяло се използваше за детекция на тубулин, доколкото първото ни антитяло срещу тубулин (DM1A) беше от клас IgG1.

– афинитетно-изолирано козе антитяло срещу заешки IgG, конюгирано с FITC (Sigma-Aldrich), кат. No. F0382; разреждаше се 1:80 в PBS (pH 7,2) с 0.3% BSA и 1% натриев азид. Това антитяло се използваше за детекция на тубулин, доколкото първото ни антитяло срещу тубулин (T3526) беше заешко поликлонално.

– козе антитяло срещу миши IgG (IgG антисерумна фракция), конюгирано с TRITC (Sigma-Aldrich), кат. № T5393; разреждаше се 1:60 в PBS (pH 7,2) с 0.3% BSA и 1% натриев азид. Това антитяло се използваше за детекция на ламин A/C.

– афинитетно-изолирано козе антитяло срещу заешки IgG, конюгирано с TRITC (Sigma-Aldrich), кат. № T 6778; разреждаше се 1:500 в PBS (pH 7,2) с 0.3% BSA и 1% натриев азид. Това антитяло се използваше за детекция в случаите, когато първото антитяло беше получено от заек.

3. Фалоидин

Като специфична сонда за фибриларен актин беше използван фалоидин, конюгиран с TRITC (Sigma-Aldrich, кат. No. P1951). Приготвяше се изходен разтвор с концентрация 20 µg/ml в PBS (pH 7.2) и се съхраняваше замразен на малки порции (по 100 µl) при – 20°C.

Преди работа изходният фалоидинов разтвор се разреждаше с PBS (pH 7,2) с 0.3% BSA до крайна концентрация 1 µg/ml. Понеже се изследваше колокализацията на актина с белтъци на интермедиерните филаменти, за разреждане на фалоидин-TRITC беше използван разтворът, в който беше разреждано конюгираното с FITC второ анти тяло.

4. Hoechst 33258

За визуализация на хроматина се използваше флуорохромът Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich), който специфично се свързва с ДНК. Използваше се разтворен в PBS (pH 7,2) с 0.3% BSA, в който беше разрежено второто анти тяло, до крайна концентрация 10 µg/ml.

МЕТОДИ

Хормонална стимулация на животните за стимулирана овулация и получаване на зрели овоцити

За да се получат голям брой овоцити, мишките се подлагаха на овариална стимулация с 5 IU хормон с фоликуло-стимулиращо действие (Menogon, Ferring) и 48 часа по-късно с 5 IU хормон с лутеинизиращо действие (Pregnyl, Organon). Първият хормон имаше функцията да предизвика възобновяване на мейозата и растеж на голям брой фоликули, а вторият – да подпомогне късните стадии на овоцитното зреене и да предизвика овулация. Животните бяха евтаназирани 16-18 часа след втората хормонална стимулация.

Яйцепроводите бяха отпрепарирани и поставяни в петри с хранителна среда на Leibovitz (Sigma – Aldrich, Германия). Средата Leibovitz съдържаше следните добавки:

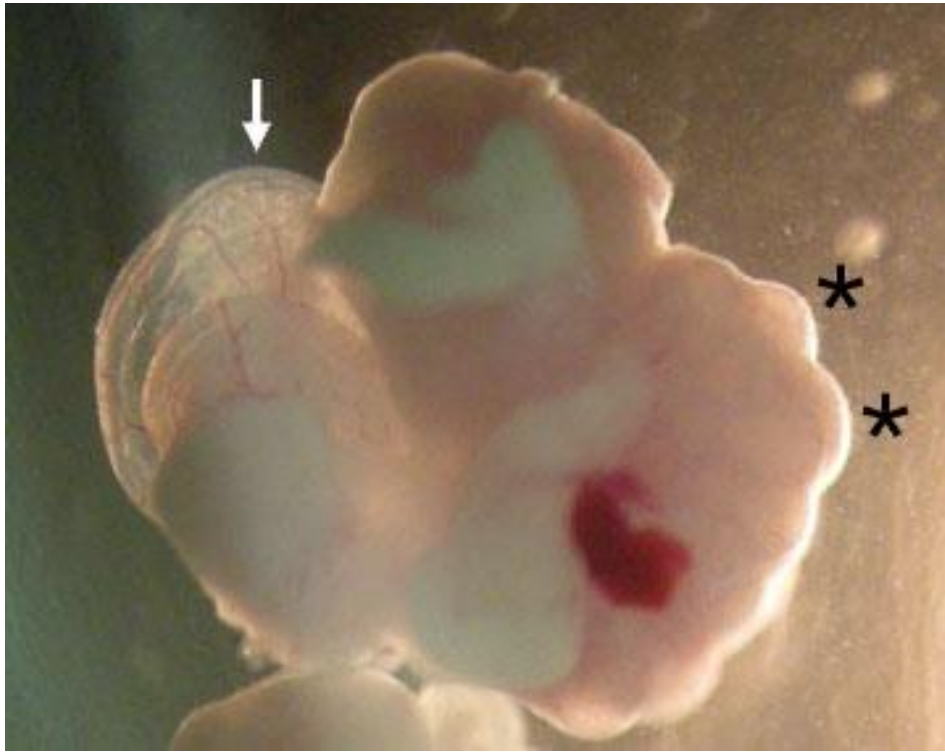
3mg/ml BSA (Sigma – Aldrich, Германия);

2,5mg/ml трансферин (Sigma – Aldrich, Германия);

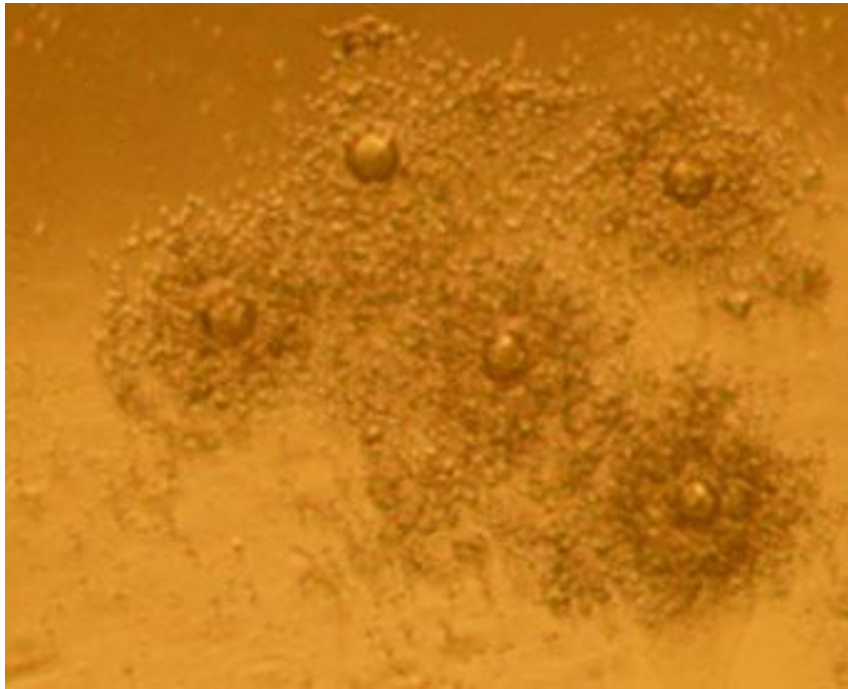
2,5mg/ml инсулин (Sigma – Aldrich, Германия).

Хранителната среда се приготвяше един ден преди използването. След приготвяне се филтруваше стерилно през 0,22µm бактериален филтър (Corning, САЩ) и се оставяше за една нощ в инкубатор Hera cell 150 (Heraeus, Германия) на 5% CO₂ във въздушна смес при 37°C, за да се насити с CO₂. Всички следващи манипулации се извършваха при стерилни условия в ламинарен бокс (Flow laboratories) под стереомикроскопско наблюдение (Zeiss, Германия) върху топла масичка (Labotect) при 37°C, за да се следят процедурите визуално и да се намали във възможно най-голяма степен загубата на овоцити и овоцит-кумулусни комплекси.

Чрез спукване на ампулите на яйцепроводите с бижутерски пинсети бяха получавани зрели овоцити и овоцит-кумулусни комплекси. Клетките после се обработваха както е описано по-долу.



Фиг. 4.1. Отпрепариран миши яйчник (вдясно) и яйцепровод, наблюдавани под стереомикроскоп. В яйчника се очертават фоликули, два от които са означени със звездички. В ампулата на яйцепровода (посочена със стрелка) има голям брой овулирани зрели овоцит-кумулусни комплекси.



Фиг. 4.2. Миши овоцит-кумулусни комплекси, получени след спукване на ампулата на яйцепровода с бижутерска пинсета и наблюдавани под стереомикроскоп.

Дисекция на яйчникови фоликули за получаване на незрели овоцити

За получаване на незрели овоцити и овоцит-кумулусни комплекси бяха използвани яйчниците на мишки, стимулирани или както е описано по-горе, или само с фоликул-стимулиращ хормон - FSH (Serono, Италия), (виж в „In vitro зреене на миши овоцити (In vitro maturation, IVM)“).

Яйчниците се отпрепарираха и поставяха в петри с физиологичен разтвор. С помощта на пинсети се отделяше яйчникът от яйцепровода и околната мастна тъкан и се прехвърляше в ембриологично петри (Corning, САЩ) със среда на Leibovitz. Следващите манипулации се извършваха стерилно в ламинарния бокс под стереомикроскопско наблюдение върху топла масичка (37°C).

Фоликулите се пунктираха с инсулинови игли. Бяха избрани големи антрални фоликули (диаметър около и над 100 μm) с централно разположен овоцит, хомогенни слоеве гранулозни клетки и тънка еднослойна тека. И при

двата типа хормонална стимулация обикновено на мишка имаше около 12 такива фоликула.

Обработка на овоцитите и овоцит-кумуляните комплекси

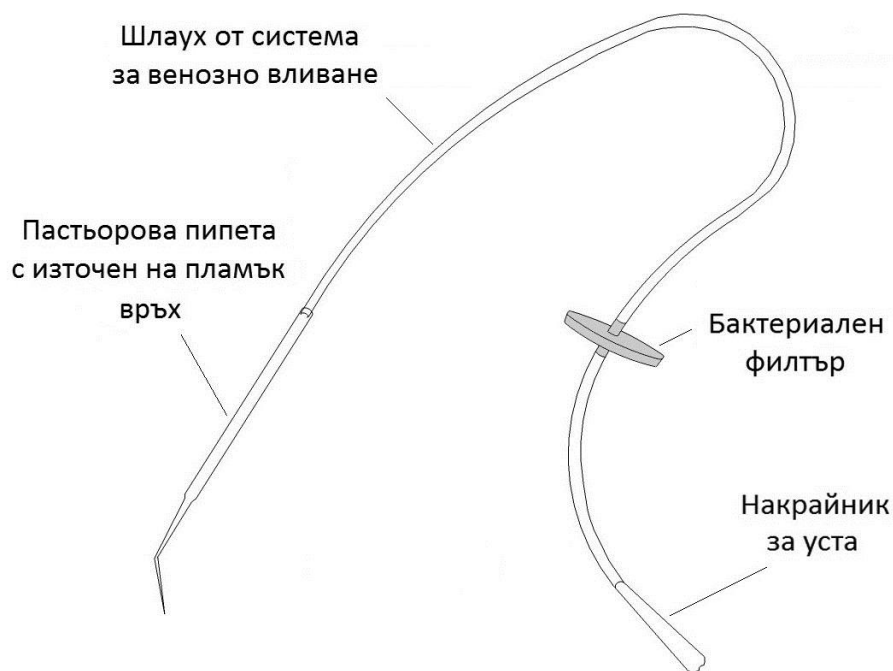
Всички следващи процедури се извършваха стерилно в ламинарния бокс под стереомикроскоп върху топла масичка при 37°C.

Зрелите и незрели овоцити, чието получаване е описано съответно в „Хормонална стимулация на животните за стимулирана овулация и получаване на зрели овоцити” и в „Дисекция на яйчникови фоликули за получаване на незрели овоцити”, се поемаха с източени на пламък стъклени пастъорки, приготвени в момента в лабораторията, и с тяхна помощ се прехвърляха от един разтвор в друг. Този метод, който изискваше значителни мануални умения, позволяваше клетките да се прехвърлят заобиколени от много малък обем течност. Така използваните методики, включващи многократна смяна на разтвори за инкубация, се изпълняваха без съществена контаминация на текущия разтвор с пренесено количество от предходния. Това бе важно, защото изпълнението на цялостния протокол изискваше голям брой прехвърляния на клетки и клетъчни комплекси – за имунофлуоресценция общо 29 пъти, при между 50 и 100 обработвани овоцити за един експеримент.

Използваните за микроскопия овоцити бяха за кратко (5-10 min) обработвани в ембриологично петри с 0.5 mg/ml хиалуронидаза при 37°C за отстраняване на външните слоеве кумулус. Ензимният разтвор се приготвяше, като 50 µl изходен разтвор от 25 mg лиофилизиран ензим / ml среда Leibovitz се разреждаше в 2,45 ml PBS с 0.3% BSA. Така се получаваше крайна концентрация на ензима 0,5 mg/ml.

На описаните етапи от методиката, както и на следващите (до нанасяне в ямки на плака) овоцитите и техните комплекси се преместваха от един разтвор в друг чрез система, контролирана с уста (Фиг. 3.3). Това позволяваше фините манипулации да се извършват с участието и на двете ръце – важно условие да се постигне ефективност при пренос на голям брой клетки (Tkachenko, 2012).

Пробите, предназначени за електрофореза, не бяха обработвани с хиалуронидаза.



Фиг. 4.3. Схема на системата за поемане на овоцити и техни комплекси с кумулус с малък обем разтвор и прехвърлянето им в друг разтвор.

In vitro зреене на миши овоцити (*In vitro maturation, IVM*)

За *in vitro* зреене мишките се стимулираха само с FSH-препарат и се евтаназираха след 40 часа за вадене на овоцитите.

Един ден преди получаването на овоцитите се приготвяше хранителната среда за *in vitro* зреене въз основа на среда α MEM (Sigma – Aldrich, Германия). Добавяха се следните компоненти:

2,2mg/ml Na бикарбонат (Sigma – Aldrich, Германия), 50 μ g/ml аскорбинова киселина (Sigma – Aldrich, Германия);

10 μ g/ml трансферин (Sigma – Aldrich, Германия);

5 μ g/ml инсулин (Sigma – Aldrich, Германия);

5% фетален телешки серум (Sigma – Aldrich, Германия);

10IU/ml пеницилин/0,01mg/ml стрептомицин (Sigma – Aldrich, Германия).

Средата с добавките се филтруваше стерилно през 22 μ m бактериален филтър. Към средата, предназначена за *in vitro* зреене, се добавяше 0,075 IU/ml FSH (Serono, Италия). От получената среда с FSH се приготвяха капки с обем 100 μ l,

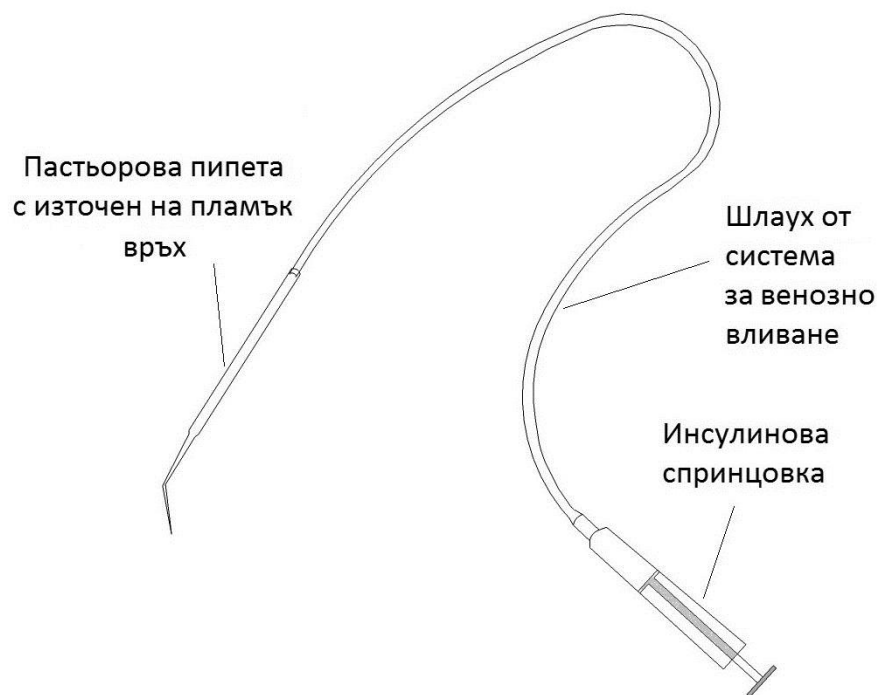
покриваха се с минерално масло (Sigma – Aldrich, Германия) в ембриологични петрити и се оставяха за една нощ в инкубатора, за да се наситят с CO₂. Към друга част от средата, предназначена за миене, не се добавяше FSH. Тя също се оставяше за една нощ в CO₂-инкубатора.

След изваждането на яйчниците от мишките от тях се получаваха овоцити и овоцит-кумулусни комплекси, както е описано по-горе. Добитите овоцити (голи или в комплекс с кумулусни клетки) се преместваха с източена на пламък пастъорка в ембриологични петрити в среда αMEM без FSH. В тази среда овоцитите престояваха половин час в CO₂ инкубатор на 37°C и въздушна смес наситена до 5% с CO₂. След това бяха премествани в капки αMEM с FSH под парафин за зреене и се оставяха за 24 часа в инкубатора.

На следващия ден яйцеклетките се сортираха на такива с и без кумулусни клетки. Кумулусът се отстраняваше с 0,5 mg/ml хиалуронидаза (Sigma – Aldrich, Германия), разтворена в αMEM без FSH. В тази среда овоцитите престояваха 3-5 минути в инкубатора, след което кумулусът се отстраняваше механично с неколkokратно пипетиране през пастъорка с диаметър не по-голям от този на овоцита, под микроскопско наблюдение.

След описаните процедури овоцитите бяха поемани поотделно с източена стъклена пастъорка и премествани в 96-ямкови стерилни плаки със заоблено дъно (Corning) за клетъчно култивиране. Разтворите, в които се инкубираха клетките, се нанасяха в количество по 100 µl на ямка.

След преместването в плаката по-нататъшното прехвърляне на клетките от ямка в ямка беше технически по-лесно, което позволяваше те да се манипулират с една ръка, а другата да държи инсулинова спринцовка, чрез която да се извършва засмукването (Фиг. 3.4). Това беше важно при етапите от фиксацията нататък, когато се работеше с токсични разтвори.



Фиг. 4.4. Схема на система за преместване на овоцитите от капка в капка, контролирана чрез инсулинова спринцовка.

Рутинна светлинна микроскопия

За рутинно светлинно-микроскопско наблюдение овоцитите и овоцит-кумулусните комплекси се пренасяха върху чисти предметни стъкла и се фиксираха чрез накапване на студен метанол върху тях за 5 min. След това се оцветяваха с 5% Giemsa в PBS (pH 7.0) за 40 min при стайна температура. Изплакваха се с дестилирана вода и се изсушаваха на въздух при стайна температура. Наблюдаваха се и се документираха при увеличение $\times 400$ и под имерсия при увеличение $\times 1000$ на микроскоп Axioskop 20 (Zeiss) с фотокамера.

Имунофлуоресценция

Имунофлуоресценцията беше провеждана по Delimitreva et al. (2006) с малки модификации. Овоцитите бяха фиксирани с предварително затоплен до 37°C 2% параформалдехид (Sigma-Aldrich) в PBS (pH 7.2) с 0.02% Triton X-100 (Koch-Light Laboratories) за 1 час. Промиваха се двукратно в PBS (pH 7.2) с 0.3%

BSA за по 10 min и след това в PBS (pH 7.2) с 0.3% BSA и 0.02% натриев азид. В същия разтвор като при последното промиване се оставяха за нощта при 4°C, като плаката се запечатваше с парафилм.

Инкубацията с разтвора на първото антитяло се провеждаше за 45 min при 37°C. След това се промиваше двукратно с PBS (pH 7.2) с 0.3% BSA и 1 µl/ml Tween-20 (Sigma-Aldrich) за по 10 min при 37°C.

Следваше инкубация с разтвора на второто антитяло, Hoechst 33258 и евентуално (при колокализация с актин) фалоидин-TRITC за 45 min при при 37°C на тъмно. Промиваше се трикратно с PBS с 0.3% BSA and 1 µl/ml Tween-20 за по 10 min при 37°C и още веднъж в същия разтвор за 20-30 min при 37°C.

След последното промиване клетките се подготвяха за предстоящото наблюдение. За целта те се импрегнираха за по 10 min, в нарастващи концентрации поливинилов алкохол (Fluka, Германия) – съответно 5, 10, 30 и 50% в PBS (pH 7.2) с 0.3% BSA и 0.02% натриев азид при 37°C. Всички описани стъпки се провеждаха в 96-ямовата плака, като клетките се вземаха с източена пастърка и се прехвърляха в следващия разтвор, предварително накапан в обем 100 µl в чиста ямка.

След това овоцитите се пренасяха в капки 100% поливинилов алкохол върху чисто предметно стъкло и се покриваха с покривно стъкло. Съхраняваха се на тъмно при 4°C до момента на наблюдението. Използваше се епифлуоресцентен микроскоп Axioskop 20 с приставка за флуоресцентна микроскопия и фотокамера (Zeiss) при възбуждащ филтър 560 nm за TRITC, 490 nm за FITC и 365 nm за Hoechst.

Лазерна сканираща конфокална микроскопия

След обработката по гореописаната методика всички проби бяха наблюдавани и документирани чрез епифлуоресценция. Въз основа на резултатите от епифлуоресцентното наблюдение избрани препарати бяха изследвани допълнително чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия. При този метод се сканира светенето на флуорохромите в тънък оптичен срез от обекта. Това позволи изследваните компоненти да бъдат прецизно локализирани в отделни равнини от овоцита или овоцит-кумулусния комплекс и чрез анализ на

результатите за различни слоеве от изследваната структура да се проследи триизмерната ѝ форма. Наличната техника позволи да направим оптични срези с дебелина 0,1 μm . Използваше се микроскоп Axioskop2 mot Plus (Zeiss) с модул за LCM5 Pascal.

Екстракция за NM-IF

Екстракцията за интермедиерни филаменти и ядрен матрикс се провеждаше по Fey et al., (1984a, b). Работеше се в капки на предметни стъкла. Промитите с PBS овоцити и овоцит-кумулусни комплекси се екстрахираха за 10 min при 4°C с цитоскелетен буфер със следния състав:

- 10 mM HEPES pH 6.8 (буферираща среда);
- 100 mM NaCl;
- 300 mM захароза;
- 3 mM MgCl₂;
- 0.5% Triton X-100 (нейонен детергент);
- 1.2 mM PMSF (протеазен инхибитор).

Чрез тази обработка с детергент-съдържащ буфер се лизираха мембраните и се отстраняваха разтворимото клетъчно съдържимо, както и мембранните структури. Буферът е наречен „цитоскелетен“, защото съхранява всички цитоскелетни елементи.

След това овоцитите се поставяха за 10 min при 4°C в екстракционен буфер със следния състав:

- 10 mM HEPES pH 6.8;
- 250 mM (NH₄)₂SO₄ (хаотропен агент);
- 300 mM захароза;
- 3 mM MgCl₂;
- 0.5% Triton X-100;
- 1.2 mM PMSF.

Въпреки голямото сходство в състава с цитоскелетния буфер екстракционният има различно действие поради съдържанието на висока концентрация амониев сулфат. Той прави термодинамично неизгодно съществуването на високо подредени структури като микротубулите и

микрофиламентите. Буферът се нарича „екстракционен”, защото екстрахира тубулина и актина в настоящата методика. IF обаче не се засягат от действието му.

Следваше 20 min инкубация при стайна температура в смилателен буфер:

10 mM HEPES pH 6.8;

50 mM NaCl;

300 mM захароза;

3 mM MgCl₂;

0.5% Triton X-100;

1.2 mM PMSF;

200 µg/ml ДНаза I (Sigma-Aldrich);

100 µg/ml РНаза А (Sigma-Aldrich).

Ключовата съставка на смилателния буфер бяха двата вида нуклеази, добавени с цел да лизират („смелят”) ДНК и РНК и така да разградят хроматина, оставяйки само белтъчния „скелет” на ядрото, т.е. ядрената ламина и ядрения матрикс.

След 20-те минути действие на ензимите към буфера се добавя (NH₄)₂SO₄ до крайна концентрация 250 mM, за да се улесни извличането на лизираните фрагменти ДНК и РНК. Инкубираше се за още 5 min при стайна температура.

Не във всички случаи химичната дисекция се провеждаше докрай. С някои овоцити екстракцията беше спирана след първия или втория етап. Запазването на ДНК даваше възможност хроматинът да се визуализира чрез Hoechst и локализацията му да се съпостави с тази на цитоплазмените IF. Освен това при всеки опит с NMIF-екстракция част от овоцитите бяха оставяни неекстрахирани като контроли.

За рутинна светлинна микроскопия и имунофлуоресценция екстрахираните клетки се промиваха двукратно с PBS, нанасяха се върху стъкла и се обработваха по същия начин, както беше описано за неекстрахираните (вж. по-горе).

PAGE електрофореза

Съдържанието на белтък в пробите за електрофореза се определяше по модифициран метод на Lowry, както е описано от Peterson (1983). От всяка проба

предварително се отделяха равни аликвотни части, които се използваха за измерването заедно с набор от стандартни разтвори на BSA с известна концентрация. От последната фракция аликвотната част се отделяше преди добавянето на нуклеазите, за да се измери съдържанието само на ендогенните белтъци.

Аликвотите се пречистваха от примесите чрез обработка с РНК и трихлороцетна киселина. Всяка от тях първо се довеждаше до обем 0.5 ml и се добавяха 12.5 µl дрождена РНК (Sigma-Aldrich) и 50 µl 72% трихлороцетна киселина с цел да се утаят белтъците. Разбъркваше се и се оставяше на лед за 45 min. След това белтъкът се събираше на дъното на епруветката чрез центрофугиране за 20 min при 2500 g.

Към утайките се прибавяше по 100 µl реактив А, съдържащ 0.025% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.05% калиево-натриев тартарат, 2.5% Na_2CO_3 , 2.5% SDS и 0.2 M NaOH. Държеше се 5 min на кипяща водна баня и още 5 min на стайна температура.

Добавяше се по 50 µl реактив В, т.е. 2N фенолов реактив на Folin, разреден с дестилирана вода 1:6 и се оставяше се на стайна температура за 30 min.

След това на спектрофотометър Spekol (Carl Zeiss Jena) се измерваше поглъщането при 750 nm. От резултатите за разтворите на BSA се съставяше стандартна крива, чрез която се определяше белтъчната концентрация в изследваните разтвори.

Провежданата от нас електрофореза беше SDS-електрофореза по Laemmli, (1970) в редуциращи условия. Използваше се апарат за минигелове на BioRad. Геловите бяха изливани на място непосредствено преди работа. Използваха се добре почистени и обезмаслени стъкла и спейсери със сечение 1 mm.

Към изследваните проби се прибавяше редуциращ пробова (sample) буфер така, че да се доведат до следната крайна концентрация:

62.5 mM Tris-HCl pH 6.8;

2% SDS;

5% 2-меркаптоетанол;

10% глицерол;

0.001% бромфенолово синьо.

Получената смес се поставяше в кипяща водна баня за 1,5 min. След това се нанасяше върху гела така, че количеството белтък на старт да бъде между 1 и 2 μg .

Разделящият (separating) гел беше 12% и се получаваше чрез смесване на следните компоненти:

3.35 ml вода;

2.5 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8;

4 ml разтвор на 30% акриламид и 0.8% бисакриламид;

100 μl 10% SDS;

50 μl прясно приготвен 10% амониев персулфат като катализатор на полимеризацията на акриламида;

5 μl TEMED като инициатор на полимеризацията, добавен непосредствено преди изливането.

Концентриращият (stacking) гел беше 4% и се получаваше чрез смесване на следните компоненти:

3.05 ml вода;

1.25 ml 0.5 M Tris-HCl pH 6.8;

0.65 ml 30% акриламид / 0.8% бисакриламид;

50 μl 10% SDS;

25 μl пресен 10% амониев персулфат;

5 μl TEMED непосредствено преди изливането.

Буферът за електрофореза, с който се пълнеше апарата, беше 25 mM Tris, 192 mM глицин, pH 8.3. Електрофорезата се провеждаше при напрежение 200 V и ток около 40 mA.

Като маркери за молекулна маса се използваша два набора от пречистени белтъци:

1. SDS7 (Sigma-Aldrich) със следните компоненти:

Маркер	Mr
BSA	66 000
яйчен албумин	45 000
глицералдехид-3-фосфат-дехидрогеназа	36 000
карбоанхидраза	29 000

трипсиноген	24 000
трипсинов инхибитор	20 100
α -лакталбумин	14 200.

2. SDS-7B (Sigma-Aldrich) със следните компоненти:

Маркер	Mr
α -2-макроглобулин	180 000
β -галактозидаза	116 000
фруктозо-6-фосфат-киназа	84 000
пируваткиназа	58 000
фумараза	48 500
лактатдехидрогеназа	36 500
триозофосфат-изомераза	26 600.

След електрофорезата гелове бяха оцветявани със сребро по Sasse and Gallagher, (2003). Използването на този високочувствителен метод беше наложително поради малкото количество белтък в пробите. Основните етапи от обработката на гела бяха следните:

- Фиксация за не по-малко от 2 h с 50% (v/v) метанол, 10% (v/v) оцетна киселина (в обем, многократно надхвърлящ обема на гела).

- Допълнителна фиксация непосредствено преди оцветяването за 10 min с 50% (v/v) метанол и 0,5 ml/l 37% формалдехид, добавен непосредствено преди работа.

- Двукратно промиване за по 5 min с дестилирана вода.

- Сенсibiliзация чрез потапяне за 1 min в 0,02% (w/v) воден разтвор на натриев тиосулфат, приготвен същия ден и съхраняван в затворен съд.

- Двукратно изплакване за по 20 sec с вода.

- Оцветяване за 10 min в 0,1% сребърен нитрат, прясно разреден от 20% изходен разтвор.

- Бързо изплакване с дестилирана вода.

- Бързо изплакване с проявителен разтвор – 3% (w/v) Na_2CO_3 , 0,0004% (w/v) натриев тиосулфат и 0,5 ml/l 37% формалдехид, добавен непосредствено преди работа.

- Проявяване в проявителен разтвор със същия състав за няколко минути до поява на ивиците (реакцията се следи чрез внимателно наблюдение).

- Спиране на реакцията с добавяне на 2,3 М лимонена киселина – 5 ml за 100 ml проявителен разтвор.

- Всички тези инкубации се извършваха на стайна температура с внимателно разклащане.

Оцветените гелове се съхраняваха в дестилирана вода до документирането им. Някои от тях бяха запазвани трайно чрез изсушаване. За целта те първо се инкубираха за 30 min в 10% (v/v) етанол, 4% (v/v) глицерол. След това се поставяха между два листа диализна мембрана и се закрепваха върху стъклена плочка до пълното си обезводняване (4 денонощия).

Начин на финансиране и база за осъществяване

Използваните в хода на работата реактиви и животни бяха закупени със средства по следните договори:

- „Оценка на яйчниковия ресурс – анализ на пloidността и състоянието на хроматина при овоцити, изолирани от оперативно отстранена яйчникова тъкан”, финансиран от Медицински университет – София, договор 40/2007.
- „Изследване на хромозомните и цитоскелетни дефекти при овоцити и предимплантационни ембриони като главни причини за ранната ембрионална загуба при бозайниците”, финансиран от от Националния фонд «Научни изследвания» при Министерството на образованието и науката, договор ВУ-Л-311607. Проектът е изпълнен с участието на Германски приматен център, Гьотинген.
- „Ядрен матрикс и интермедиерни филаменти (NM-IF) в миши овоцити и кумулусни клетки”, финансиран от Медицински университет – София, договор 15/2009.
- “Промени в организацията на ядрената ламина и разпределението на ядрените порови комплекси в различни стадии на *in vitro* зрееенето на миши овоцити”, финансиран от Медицински университет – София, договор 36/2012.
- “Изследване на цитокератиновите и виментиновите интермедиерни филаменти при поликистоза на яйчника (POS)”, финансиран от Медицински университет – София, договор 37/2012.

Всички изброени проекти са получили одобрението на Комисията по етика на научните изследвания в Медицинския университет – София.

Всички експерименти, свързани с дисертационния труд, са проведени в Катедрата по биология на Медицинския университет – София. Документирането на резултатите също е извършено в Катедрата с изключение на конфокалното сканиране, което е осъществено в Института по биология и имунология на размножаването към Българската академия на науките.

5. РЕЗУЛТАТИ

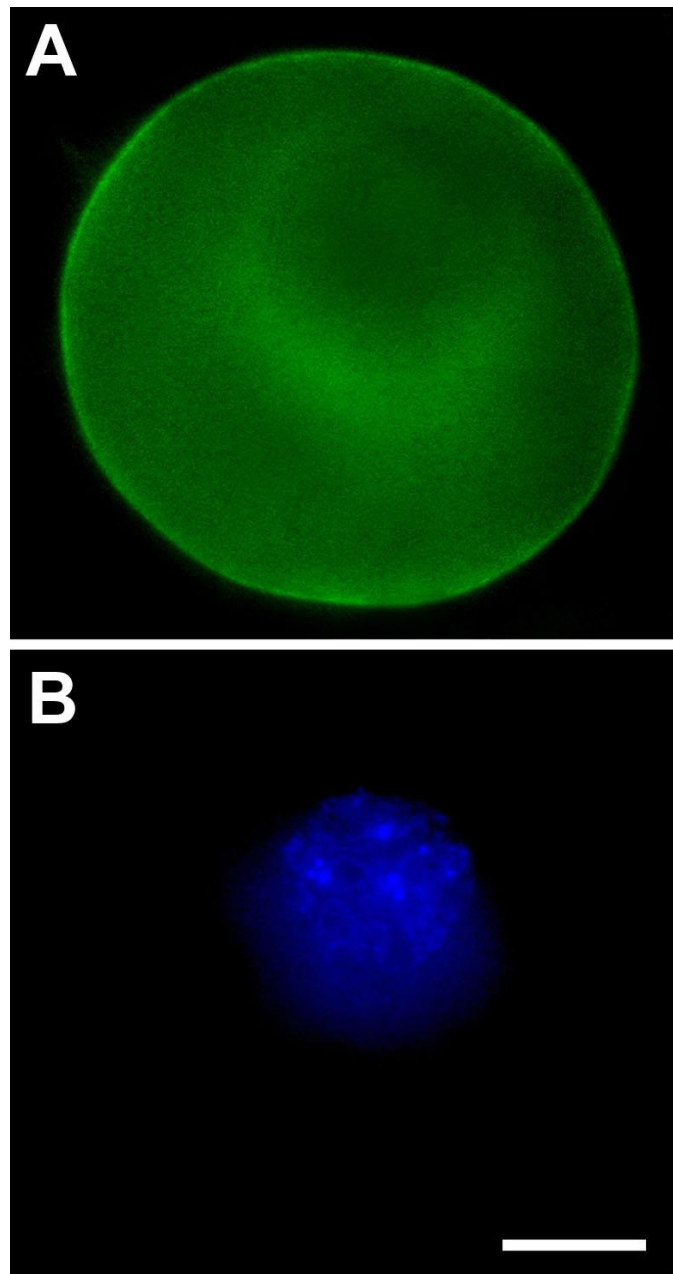
ИЗСЛЕДВАНЕ НА НАЛИЧИЕТО И ВЪТРЕКЛЕТЪЧНОТО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА НАБОР ОТ ЦИТОКЕРАТИНИ И ВИМЕНТИН В МИШИ ОВОЦИТИ И ОВОЦИТ-КУМУЛУСНИ КОМПЛЕКСИ С РАЗЛИЧНА СТЕПЕН НА ЗРЯЛОСТ

Чрез имунофлуоресценция бяха локализирани цитоскелетни белтъци - цитокератини 1, 5, 6 и 8 и виментин, в диференциращи се и зрели миши овоцити. При това беше установено наличието и на двата типа белтъци на цитоплазмените IF. Нещо повече, при всички изследвани клетки цитокератините и виментинът показаха пълна колокализация, поради което по-долу реакцията за двата типа белтъци ще бъде описвана общо.

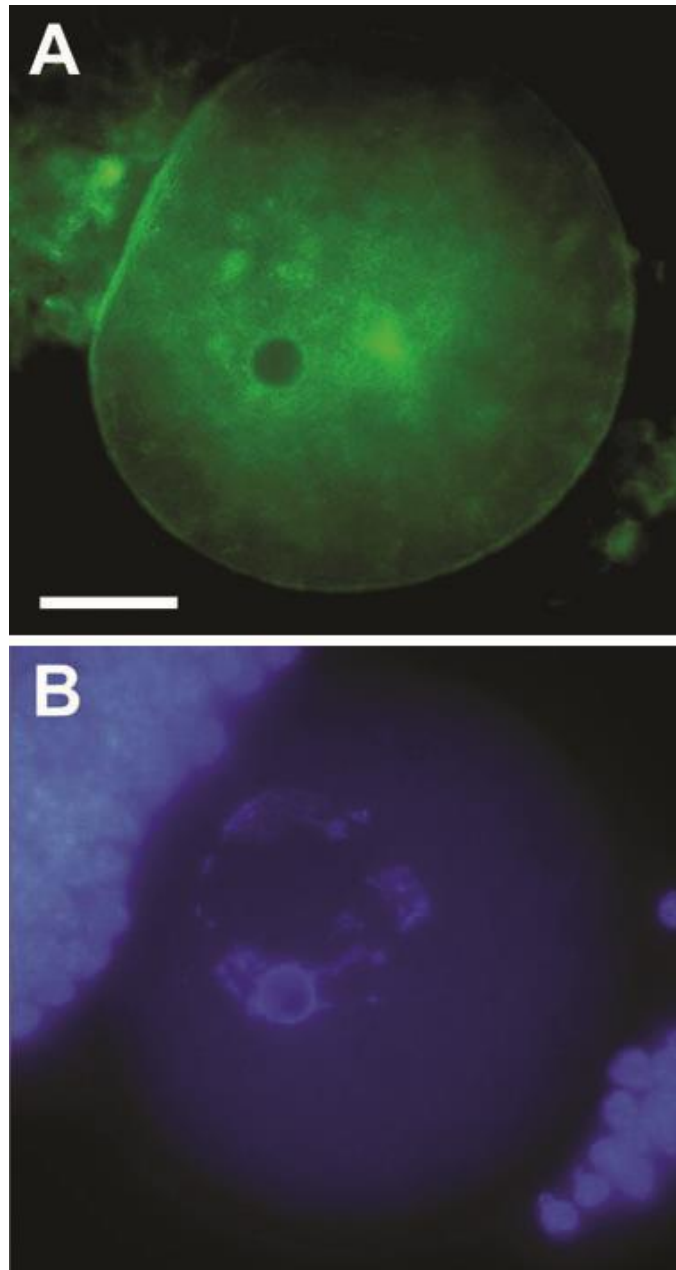
На всички стадии от овогенезата цитоплазмените IF образуваха кортикален слой непосредствено под оолемата. Освен това в незрелите овоцити на стадий профаза I те се откриваха и в областта на герминалния везикул, а по-късно на стадий метафаза I и метафаза II – и около мейотичното вретено.

В незрелите овоцити на стадий GV се наблюдаваше положителна реакция за цитокератини и виментин в два клетъчни компартамента – кортикалния слой непосредствено под оолемата и областта на ядрото. На етап ранен GV асоциираната с ядрото реакция беше ограничена в неговата периферия (Фиг. 5.1). На малко по-късен етап – GV с оформена кариосфера, кондензираният хетерохроматин в нейната периферия също реагираше за белтъците на цитоплазмените IF (Фиг. 5.2).

GV-овоцитите, които не бяха специално обработени за пълно отстраняване на кумулуса, по правило бяха заобиколени от кумулусни клетки, в които също се откриваха изследваните белтъци на цитоплазмените IF (Фиг. 5.2).



Фиг. 5.1. Овоцит на стадий ранен GV, епифлуоресценция. Клетката е обработена за отстраняване на кумулуса. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .

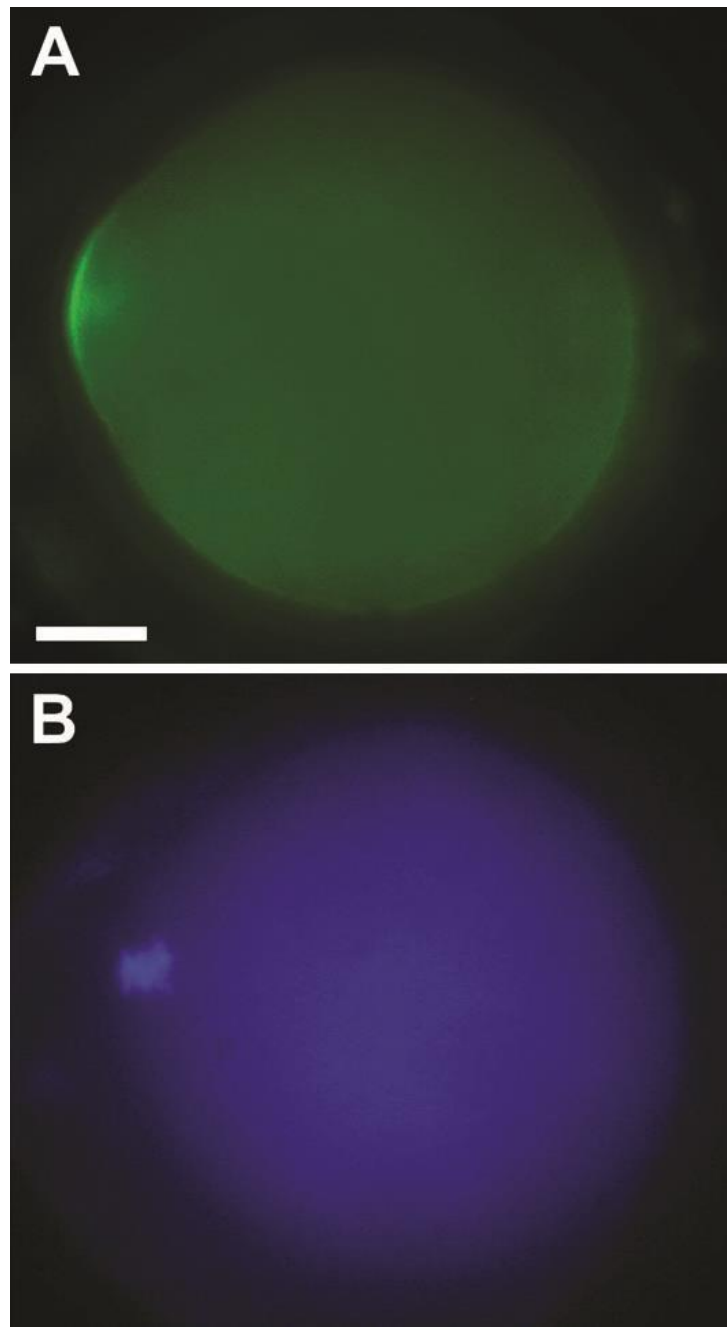


Фиг. 5.2. Овоцит на стадий GV с оформена кариосфера, епифлуоресценция. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .

На стадий метафаза I и метафаза II виментинът и цитокератините като цяло показваха разпределение в кортикалната цитоплазма и мейотичното вретено, т.е. отново свързано с клетъчната периферия, от една страна, и с ядрения материал, от друга. Относителната интензивност на положителната реакция в тези две области обаче бе променена: светенето в кортикалната цитоплазма беше отслабнало, а в близост до метафазната пластинка беше засилено. Единствената кортикална област, където реакцията показваше интензивност, сходна или дори надхвърляща тази при GV-овоцитите, беше шапката, покриваща мейотичното вретено и явно отговаряща на актиновата шапка. Под шапката натрупване на IF се наблюдаваше както свързано със самите хромозоми, така и около мейотичното вретено като цяло, без обаче да се белязват самите нишки (Фиг. 5.3).

Повечето метафазни овоцити при подготовката за микроскопско наблюдение бяха загубили заобикалящите ги кумулусни клетки, така че на тези стадии се наблюдаваха изолирани овоцити и само в редки случаи овоцит-кумулусни комплекси.

По отношение на реакцията за цитоплазмени IF и наличието на обкръжение от кумулусни клетки не се наблюдаваха значими разлики между овоцитите в метафаза I и тези в метафаза II.



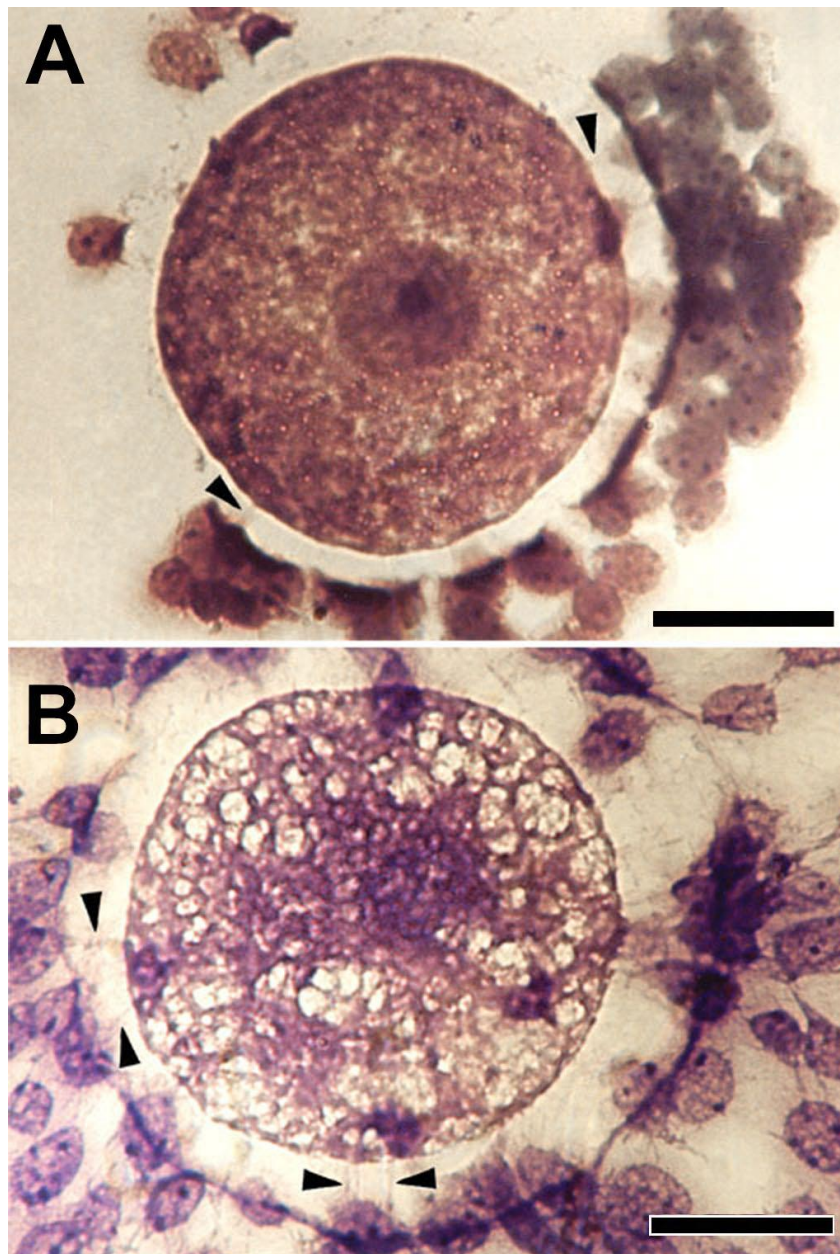
Фиг. 5.3. Овоцит на стадий метафаза I, епифлуоресценция. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. В лявата част на клетката се вижда метафазната пластинка, покрита от силно белязана „шапка”. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА МИШИ ОВОЦИТИ И ОВОЦИТ-КУМУЛУСНИ
КОМПЛЕКСИ СЛЕД ЕКСТРАКЦИЯ ЗА ЯДРЕН МАТРИКС И
ИНТЕРМЕДИЕРНИ ФИЛАМЕНТИ (NM-IF)**

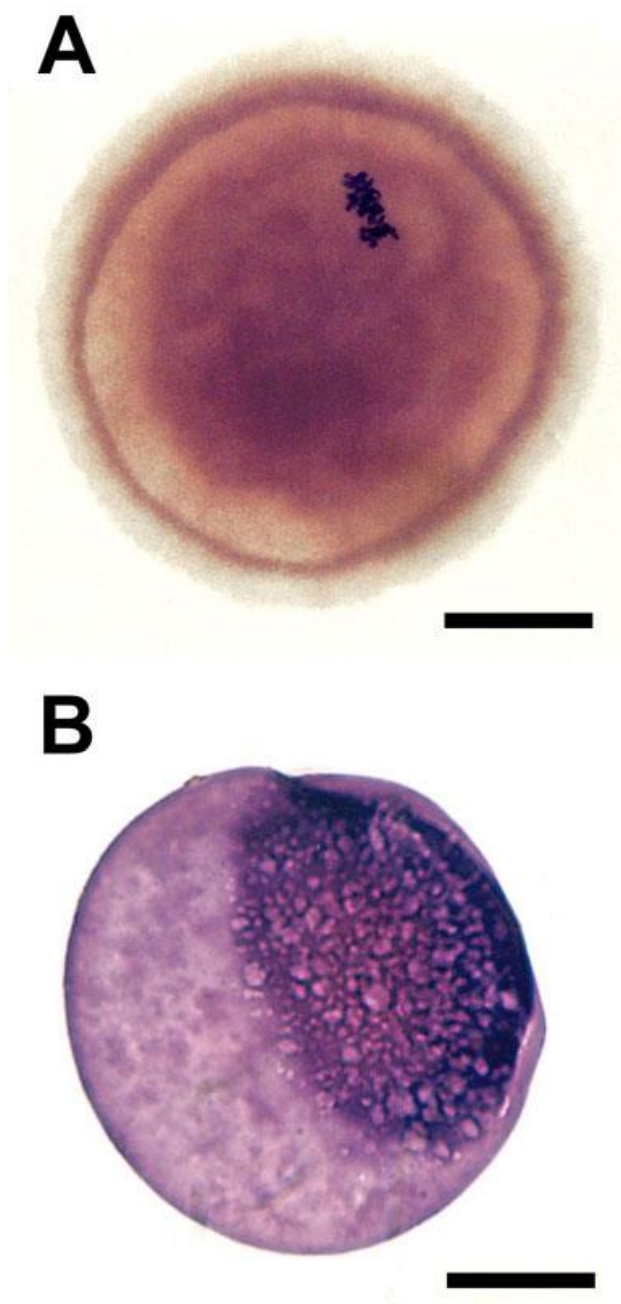
За да се оцени цялостната морфология на овоцитите, подложени на екстракция за NM-IF, беше използвана светлинна микроскопия след оцветяване с Гимза. Тя показва твърде различен ефект на този вид химична дисекция върху незрелите и зрелите овоцити.

Екстрахираните незрели овоцит-кумулусни комплекси на етап GV бяха загубили голяма част от съдържимото си, запазвайки предимно скелетни структури. Въпреки това общият вид на комплекса, положението на овоцитното ядро, zona pellucida, разпределението на кумулусните клетки и техните израстъци през зоната бяха запазени и не се отличаваха съществено от неекстрахираните контроли (Фиг. 5.4).

При овоцитите на етап метафаза I и зрелите овоцити на етап метафаза II екстракцията за NM-IF се отразяваше драстично на видимата структура на клетката. В неекстрахираните контроли цитоплазмата изглеждаше хомогенна, като кондензираните хромозоми бяха разположени в периферията на клетката (Фиг. 5.5A). В екстрахираните метафазни овоцити структурната организация беше напълно унищожена. Не се забелязваха хромозоми, а останките от цитоплазменото съдържимо бяха колабирани до безструктурна маса (Фиг. 5.5B).



Фиг. 5.4. Овоцит-кумулусни комплекси на стадий GV, оцветени с Гимза; отсечките са по 20 μm . **А.** Неекстрахиран контролен комплекс. **В.** Екстрахиран комплекс. С главички на стрелки са означени израстъци на кумулусни клетки.



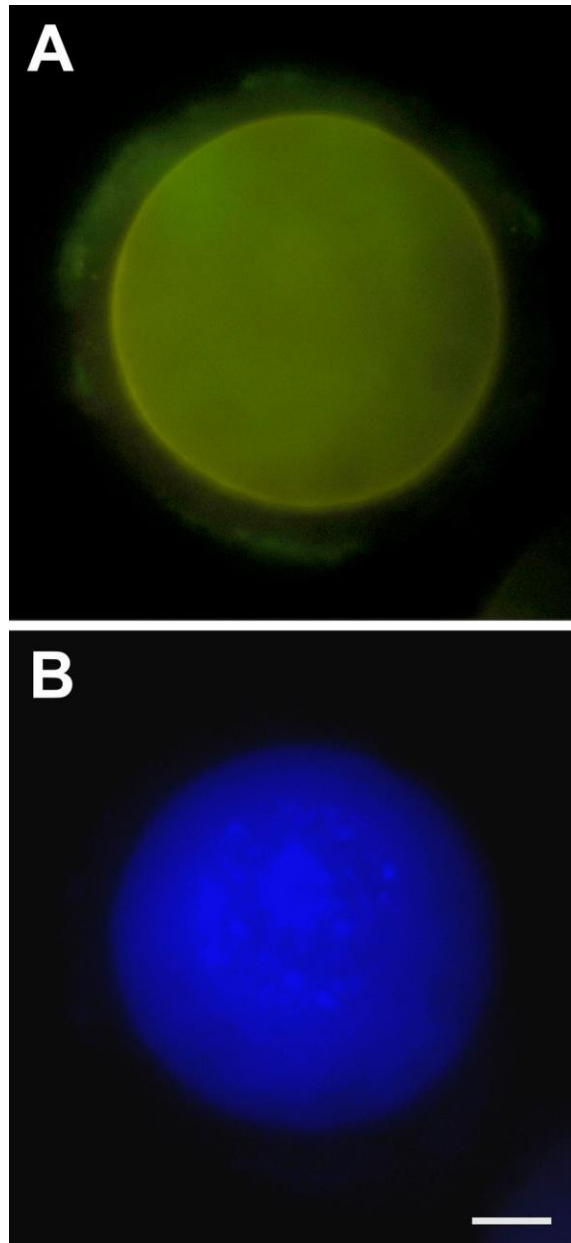
Фиг. 5.5. Зрели овоцити, оцветени с Гимза; отсечките са по 20 μm . **А.** Неекстрахиран контролен овоцит. Добре се вижда пластинката на метафаза II. **В.** Екстрахиран овоцит. Останките от цитоплазмата образуват сфера без видима структура.

Освен чрез рутинна светлинна микроскопия екстрахираните овоцити бяха изследвани и чрез имунофлуоресценция за белтъци на цитоплазмените ИФ. Понеже след пълна екстракция за NM-IF не се наблюдаваха останки от хроматина, бе възприет вариант на екстракцията, при който последният етап

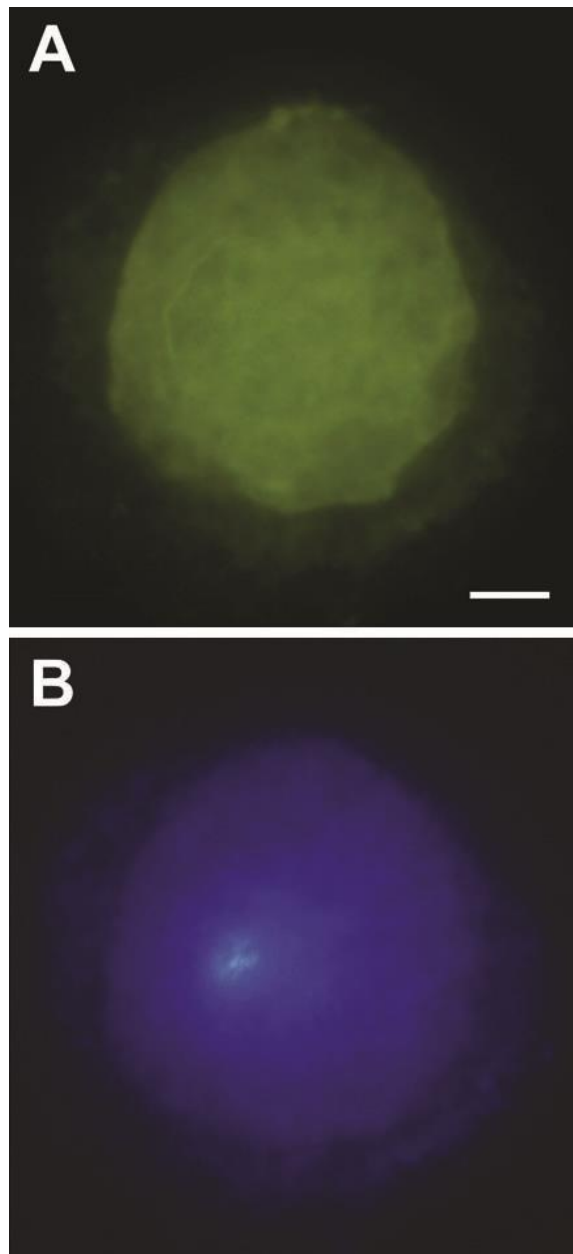
(нуклеазната обработка) се пропускаше. Това позволи съпоставяне на състоянието на IF, визуализирани чрез имунофлуоресцентна реакция, с хроматина или хромозомите, оцветени с Hoechst 33258.

В съгласие с морфологичните данни незрелите екстрахирани овоцити в профаза I (стадий GV) дадоха реакция, идентична с тази в неекстрахираните контроли. Екстракцията за NM-IF не се беше отразила видимо на наличието и вътреклетъчното разпределение на виментина и цитокератините (Фиг. 5.6).

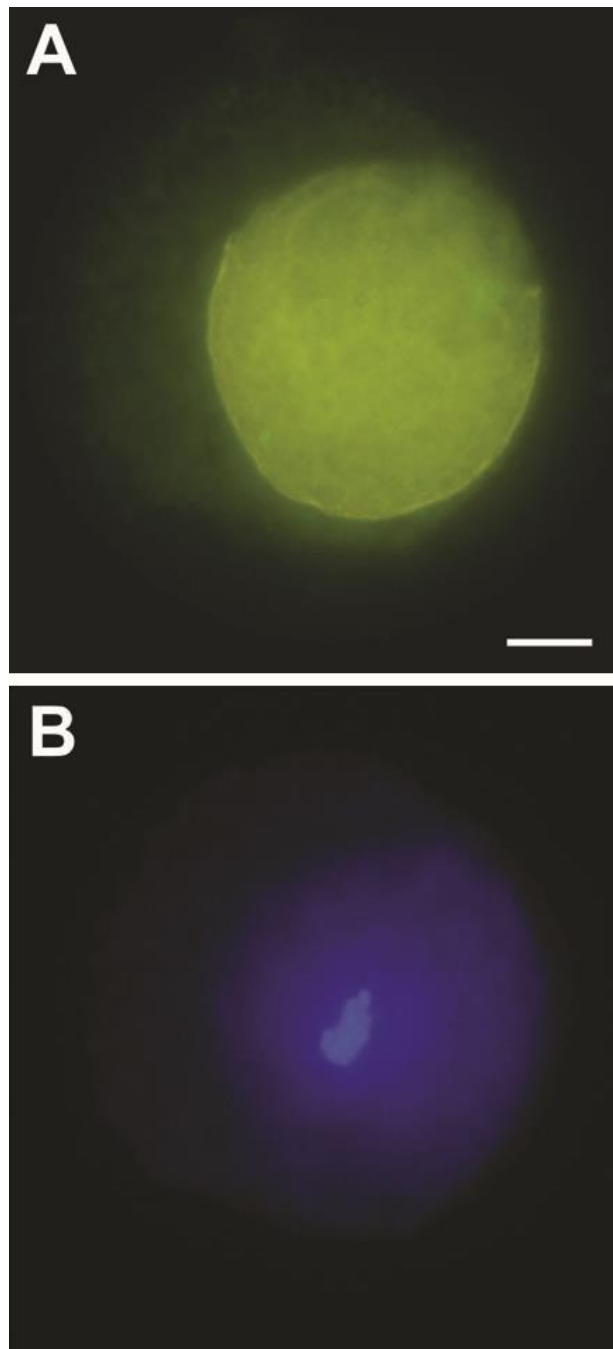
В екстрахираните метафазни овоцити се наблюдаваше (аналогично на светлинно-микроскопските резултати след оцветяване с Гимза) колапс на кортикалния слой от IF и дисоциирането му от zona pellucida. В някои овоцити този слой все още запазваше контакта си със зоната в отделни точки (Фиг. 5.7). В други клетки обаче останките от цитоплазмата, реагиращи за виментин и цитокератини, бяха напълно отделени от зоната и колабирали до кълбовидно образуване без видима структура (Фиг. 5.8). Тези две възможности, изглежда, бяха свързани с индивидуални разлики между овоцитите, а не толкова с тяхната степен на зрялост (метафаза I или II).



Фиг. 5.6. Екстрахиран овоцит на стадий GV с оформена кариосфера, епифлуоресценция. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. Наблюдава се светене в кортикалната област и асоциирано с областта на ядрото, особено кариосферата. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .



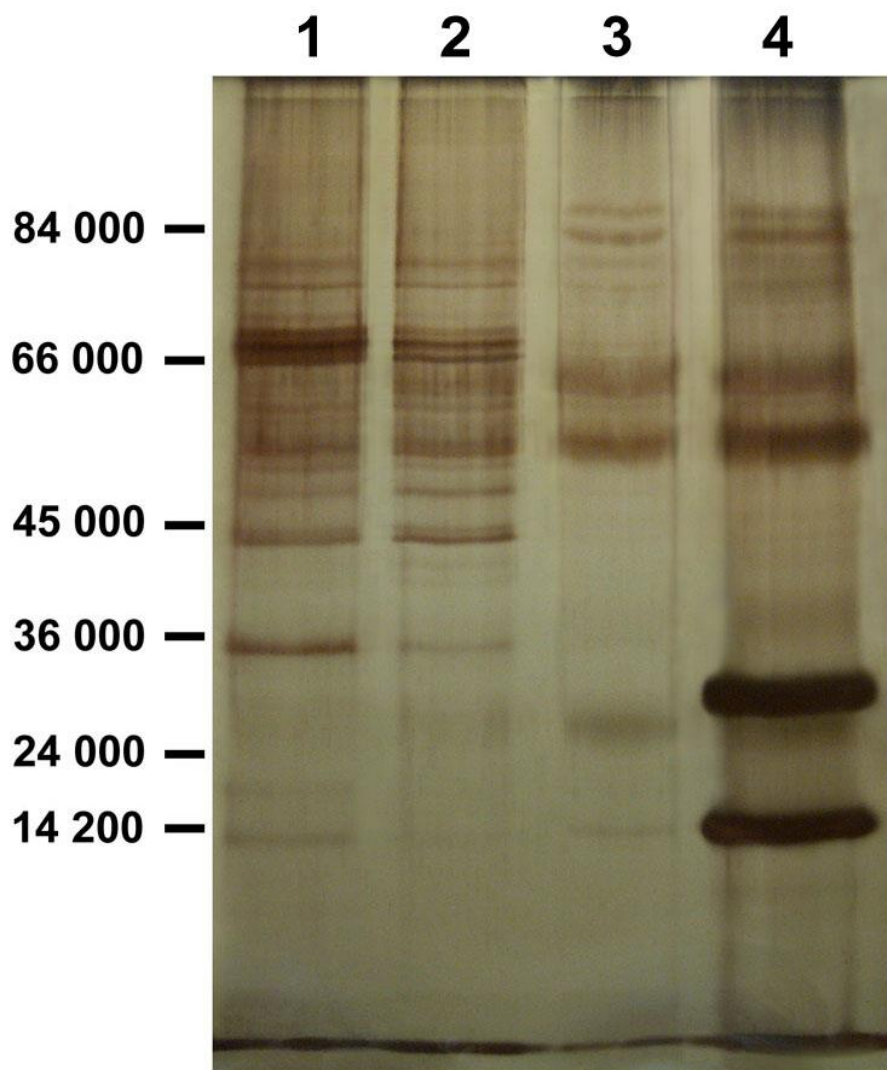
Фиг. 5.7. Екстрахиран овоцит на стадий метафаза I, епифлуоресценция. **А.** Реакция за цитоплазмени IF – наблюдава се частичен колапс. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .



Фиг. 5.8. Екстрахиран овоцит на стадий метафаза II, епифлуоресценция. **А.** Реакция за цитоплазмени IF – наблюдава се пълен колапс. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .

За характеризирание на промените в белтъчния състав, настъпващи след екстракция за NM-IF, беше използвана SDS-електрофореза в полиакриламиден

гел. Чрез този метод бяха изследвани проби от яйчник след пълна (тристъпална) екстракция, след второто и след първото стъпало, както и неекстрахирани контроли. Резултатът показва, че след екстракция за NM-IF се съхраняват само малка част от изходните белтъци и те дават характерен набор от ивици (Фиг. 5.9). При екстрахираните клетки най-добре видимите на гела ивици отговаряха на молекулни маси (M_r) 86 000, 84 000, 64 000, 57 000, 38 000 и 27 000. Само най-изразената от тях ($M_r = 57 000$) беше видима и при неекстрахираните контроли.



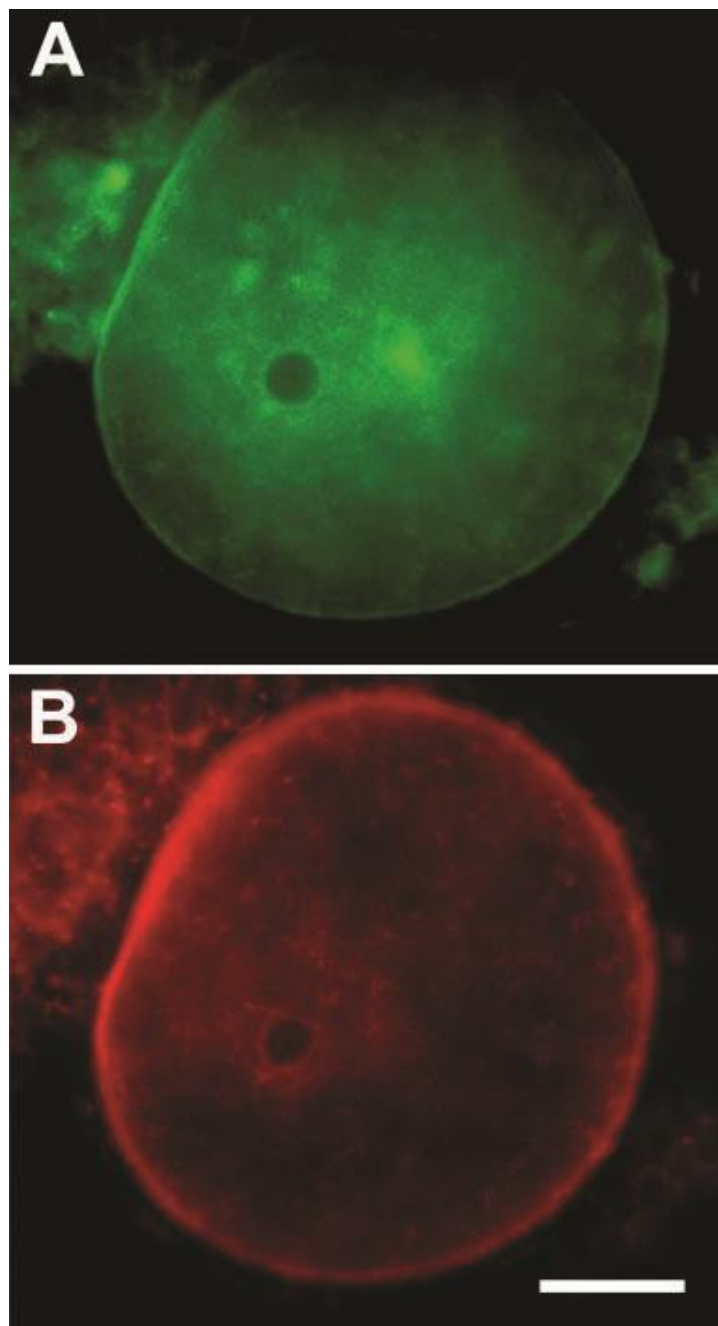
Фиг. 5.9. Белтъци от овоцит-кумулусни комплекси: неекстрахирани (необработени с детергент) контроли (1), след обработка с цитоскелетен буфер (2), с висока йонна сила (3) и с нуклеази (4), след SDS-PAGE електрофореза и оцветяване на гела със сребро. Отляво са означени маркерите за молекулна маса. Двете най-ярки ивици на старт 4 са ДНаза I ($M_r = 31 300$) и РНаза А ($M_r = 13 700$), използвани за разграждане на хроматина при последния етап на екстракцията за NM-IF.

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА КОЛОКАЛИЗАЦИЯТА НА БЕЛТЪЦИТЕ НА
ЦИТОПЛАЗМЕНИТЕ IF И АКТИНА В ОВОЦИТИ С РАЗЛИЧНА СТЕПЕН
НА ЗРЯЛОСТ**

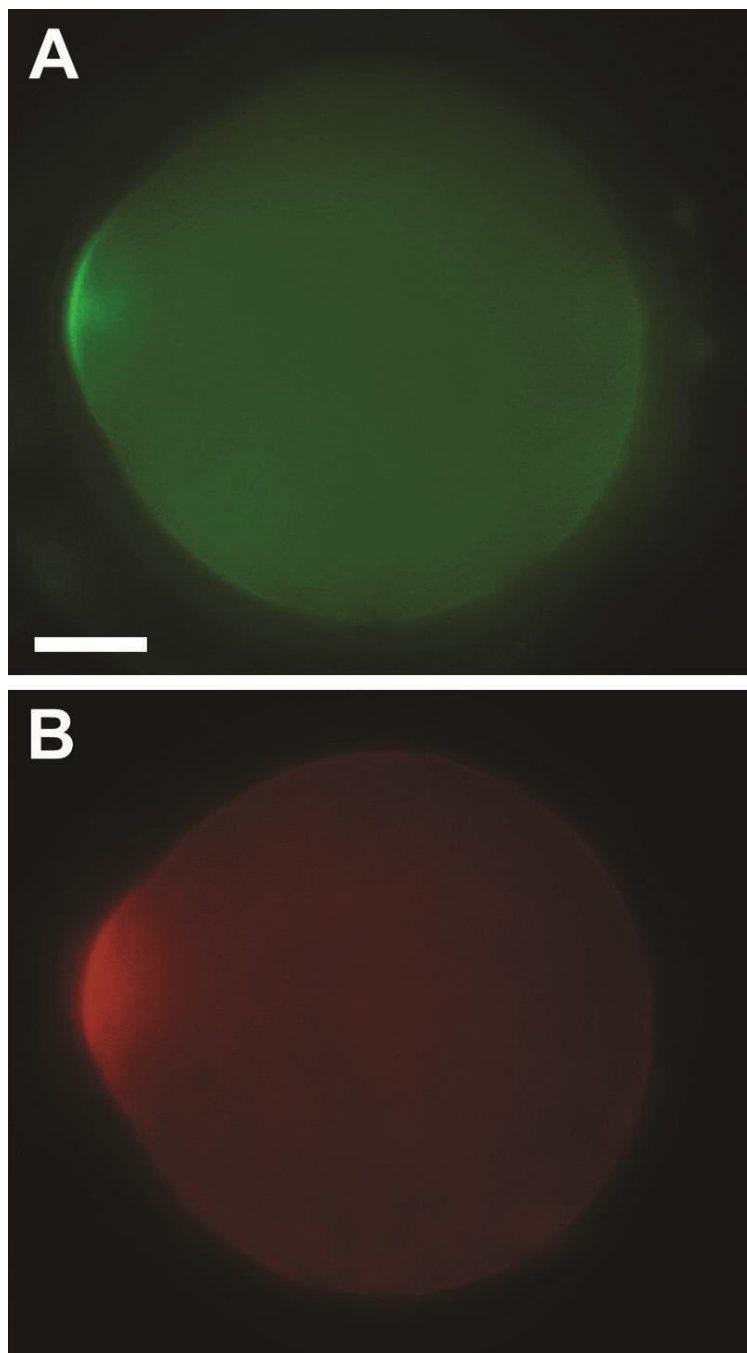
Предвид на положителната реакция за цитоплазмени IF в кортикалната цитоплазма на овоцита и особено в шапката над мейотичното вретено – участъци, известни с добре развития си актинов цитоскелет, бе проведена успоредна локализация на цитокератини и виментин, от една страна, и фибриларен актин, от друга, за да бъде съпоставено вътреклетъчното разпределение на тези цитоскелетни белтъци на различни етапи от овогенезата.

При тези изследвания беше установена значителна, но не пълна колокализация. В кортикалния слой реакцията за двете групи цитоскелетни компоненти беше идентична, но в областта на ядрото и хромозомите се откриваха разлики. При незрелите овоцити на стадий GV белтъците на цитоплазмените IF показваха много по-силна склонност от актина да се асоциират с герминалния везикул (Фиг. 5.10). При метафазните овоцити около мейотичното вретено се наблюдаваше светене както за IF, така и за актин, но само IF се асоциираха с хромозомите от метафазната пластинка; актинът се беше отдръпнал от хромозомите (Фиг. 5.11).

Кумулусните клетки също освен за IF бяха положителни и за фибриларен актин. Разпределението на двата вида цитоскелетни елементи до голяма степен се припокриваше с тази разлика, че реакцията за IF беше по-силна във вътрешността на клетката, а за актин – в периферията (вж. Фиг. 5.10).



Фиг. 5.10. Овоцит на стадий GV (клетката от Фиг. 5.2), епифлуоресценция. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за F-актин. Отсечката е 20 μm .



Фиг. 5.11. Овоцит на стадий метафаза I (клетката от Фиг. 5.3), епифлуоресценция.

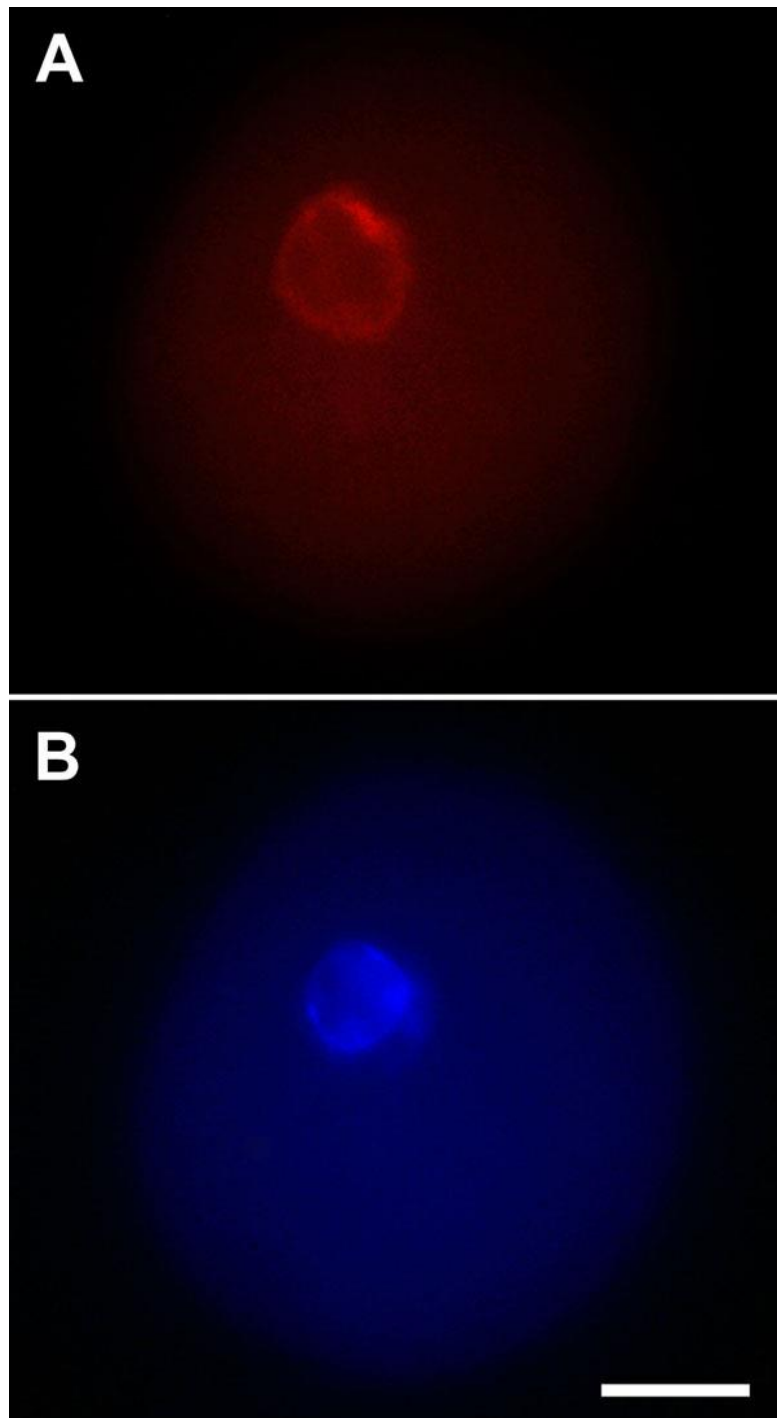
А. Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за F-актин. Отсечката е 20 μm .

***ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛОКАЛИЗАЦИЯТА НА ЛАМИНИ В И А/С И ВРЪЗКАТА
ИМ С ПРОМЕНИТЕ НА ХРОМАТИНА В ОВОЦИТИ С РАЗЛИЧНА СТЕПЕН
НА ЗРЯЛОСТ***

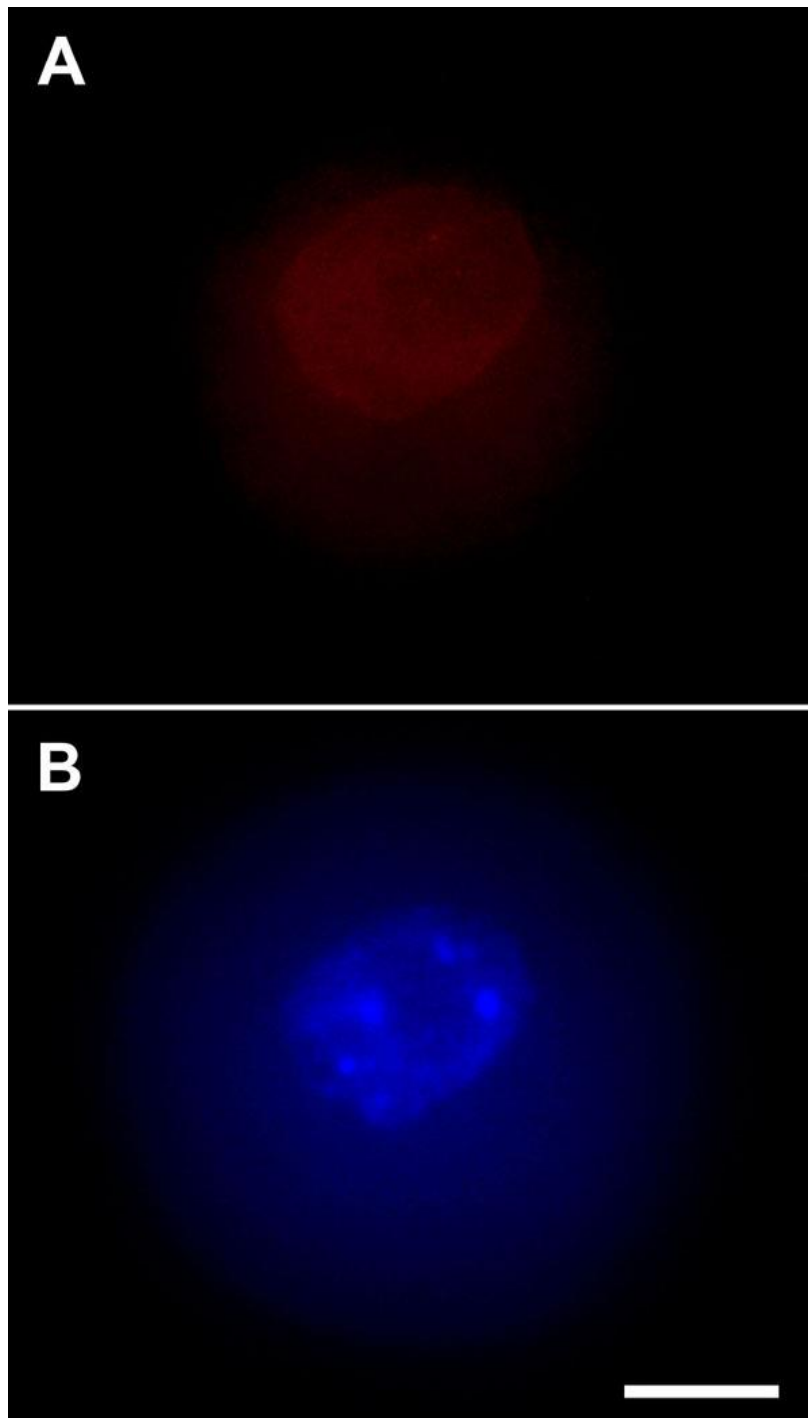
Наблюденията ни върху вътреклетъчната локализация на ламините в незрелите миши овоцити разкриха наличие и на двата типа ламини в профазните овоцити на етап GV. Точната им локализация в ядрото обаче показва разлики при овоцитите в по-ранен и по-късен GV, свързани с разлики в състоянието на хроматина и по-конкретно липсата или наличието на кариосфера.

На етап ранен GV реакцията за ламин В беше положителна в ядрената обвивка (Фиг. 5.12). След оформянето на кариосферата, което беше свързано с преместване към нея на хетерохроматина от периферията на ядрото, малки количества ламин В също навлизаха в ядрото, без обаче да се наблюдава колокализация с кондензираните хроматинови участъци (Фиг. 5.13).

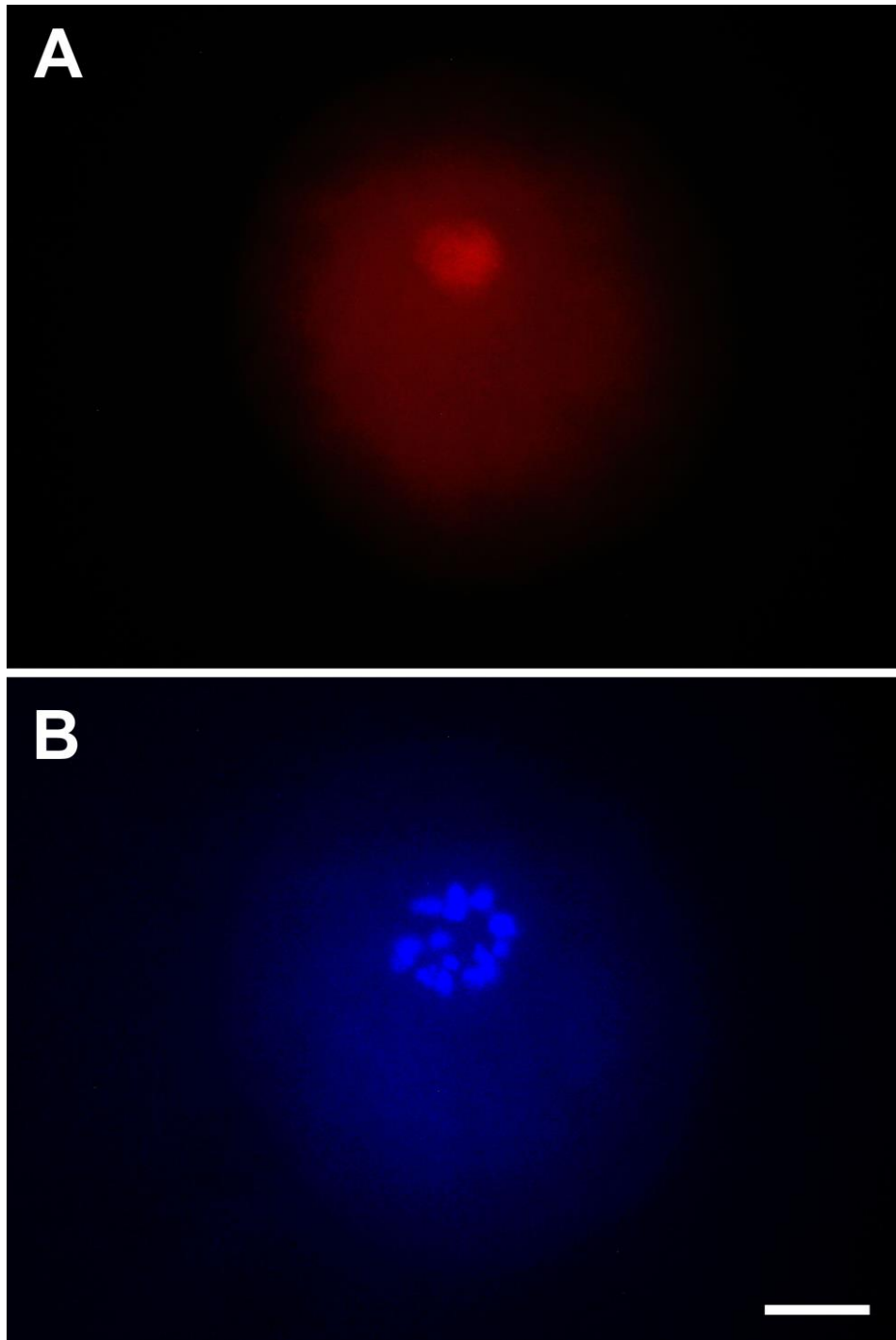
На стадий GVBD ламин В се съсредоточаваше в областта на кариосферата. При това изглеждаше, че светенето обхваща не само хетерохроматина по периферията на кариосферата, а и нейната вътрешност (Фиг. 5.14).



Фиг. 5.12. Овоцит в ранен GV, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин В. Светене се наблюдава в областта на ядрената обвивка. **В.** Реакция за хроматин. Кариосферата още не е изградена. Отсечката е 20 μm .

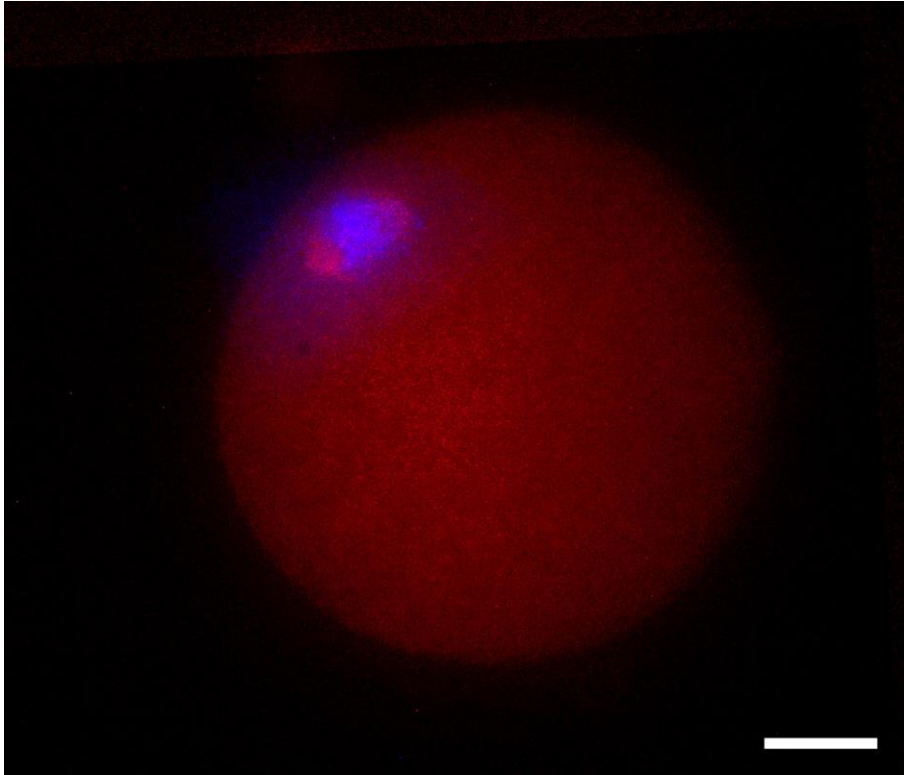


Фиг. 5.13. Овоцит в GV с оформена кариосфера, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин В. **В.** Реакция за хроматин. Вижда се, че положителна за ламин В е ядрената периферия и в по-малка степен вътрешността на ядрото, но не се наблюдава по-силно светене в кариосферата. Отсечката е 20 μm .



Фиг. 5.14. Овоцит в GVBD, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин В. Беязана е кариосферата, включително вътрешността ѝ. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .

По време на метафаза I и метафаза II ламин В колокализираше с тубулиновите нишки на мейотичното вретено. (Фиг. 5.15). Самите хромозоми от метафазната пластинка не даваха положителна реакция.



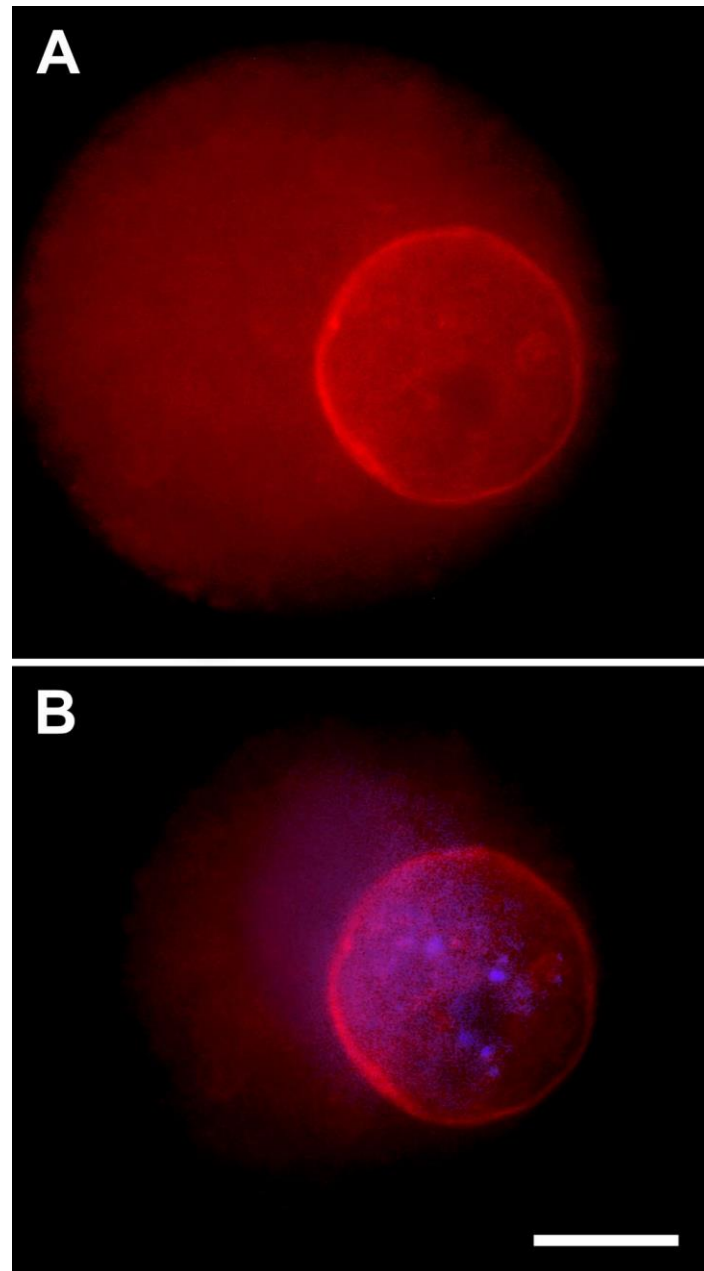
Фиг. 5.15. Овоцит в метафаза I, епифлуоресценция – реакция за ламин В (червено) и хроматин (синьо), комбиниран образ. Мейотичното вретено е положително за ламин В. Отсечката е 20 μm .

Ламин А/С в незрелите профазни овоцити на етап ранен GV (без оформена кариосфера) показва локализация в ядрената обвивка, идентична с тази на ламин В (Фиг. 5.16).

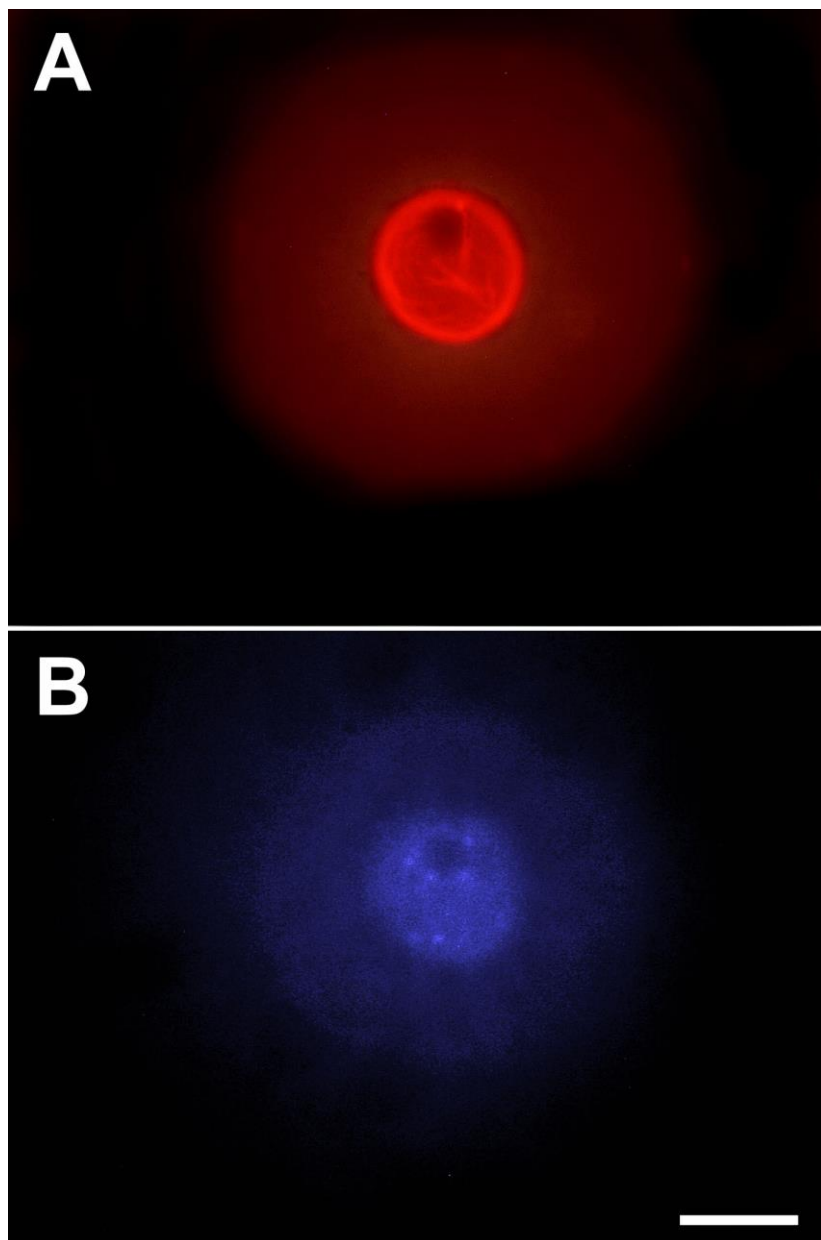
След оформяне на кариосферата обаче резултатите от епифлуоресценцията бяха различни от тези за ламин В. Той се преместваше от ядрената периферия към кариосферата и се свързваше с най-кондензирания хроматин. Така се очертаваха две концентрични сфери, едната от които очертаваше границите на ядрото, а другата – кариосферата (Фиг. 5.17).

По време на GVBD ламин А/С във все по-голяма степен се преместваше по посока на кариосферата. На епифлуоресценция се виждаше ярка реакция за ламин

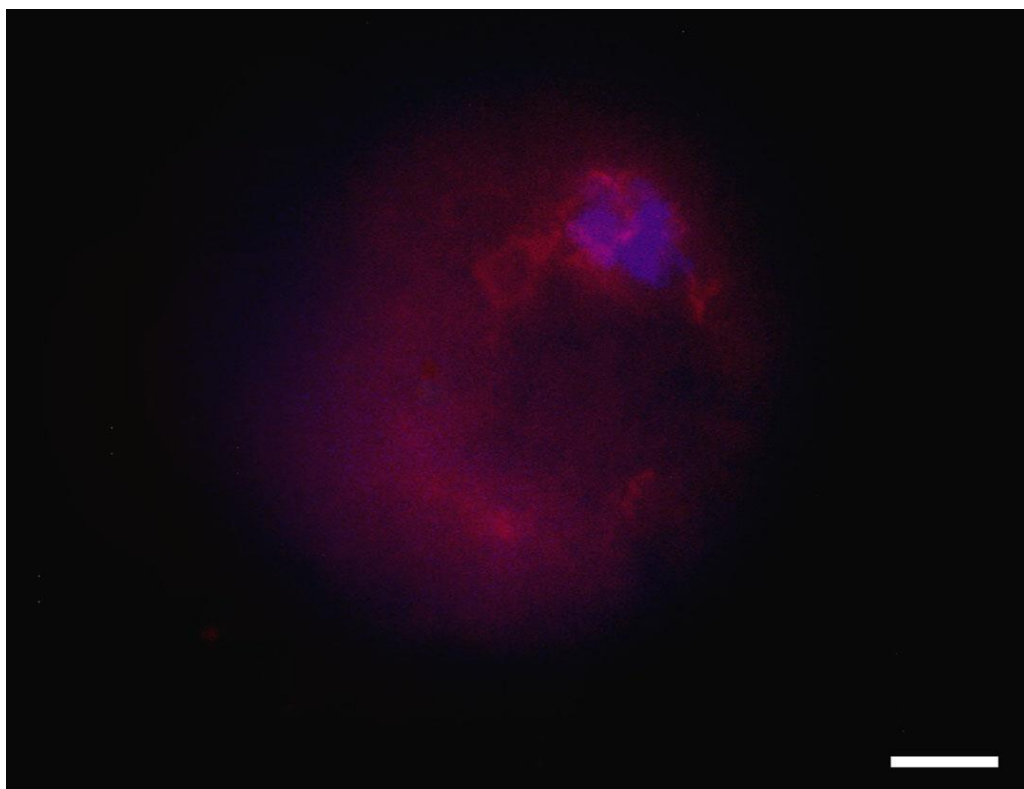
A/C, съответстваща на кариосферния хетерохроматин по периферията на ядърцето. Изглеждаше, че вътрешността на ядърцето не реагира, т.е. ламин A/C не навлизаше в обема на кариосферата (Фиг. 5.18).



Фиг. 5.16. Овоцит в ранен GV, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин A/C. **В.** Реакция за ламин A/C (червено), съпоставена с реакцията за хроматин (синьо). Положителна реакция се наблюдава в областта на ядрената обвивка. В периферията на ядърцето още не се наблюдава компактният пръстен от хетерохроматин, характерен за оформената кариосфера. Отсечката е 20 μm .

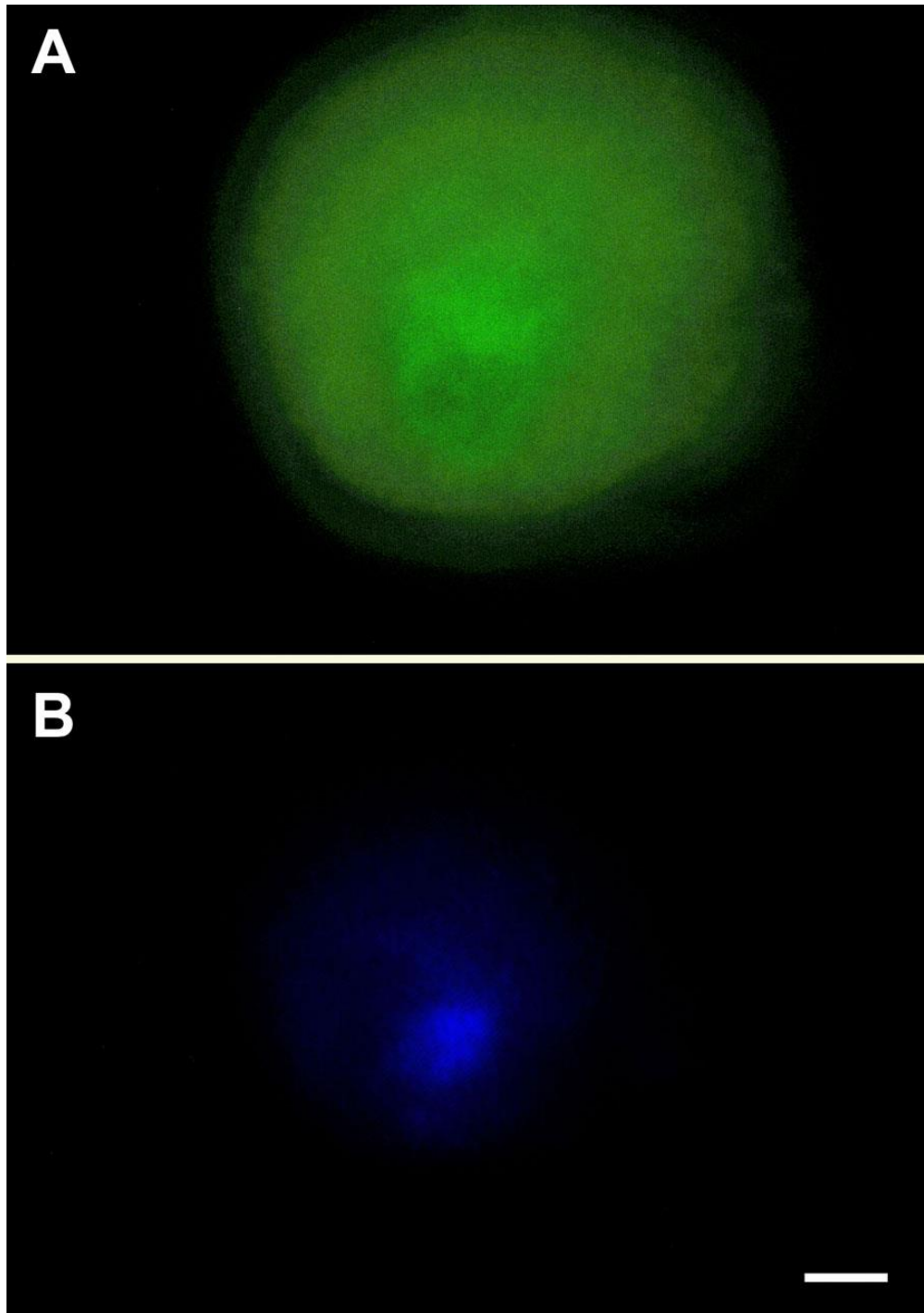


Фиг. 5.17. Овоцит в GV, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин А/С. **В.** Реакция за хроматин. Ламин А/С се открива най-вече в периферията на ядрото, но се наблюдава и свързан с хетерохроматина, който започва да оформя кариосферата. Отсечката е 20 μm .



Фиг. 5.18. Овоцит в GVBD, епифлуоресценция. Реакция за ламин А/С (червено) и хроматин (синьо) – комбиниран образ. Отсечката е 20 μm .

В метафазните овоцити поведението на ламин А/С отново беше различно от това на ламин В. Той се регистрираше около вретеното в доста дифузен ярък слой, без да се асоциира със самите нишки или с хромозомите. В по-малка степен реакция се наблюдаваше и в целия обем на цитоплазмата (Фиг. 5.19).

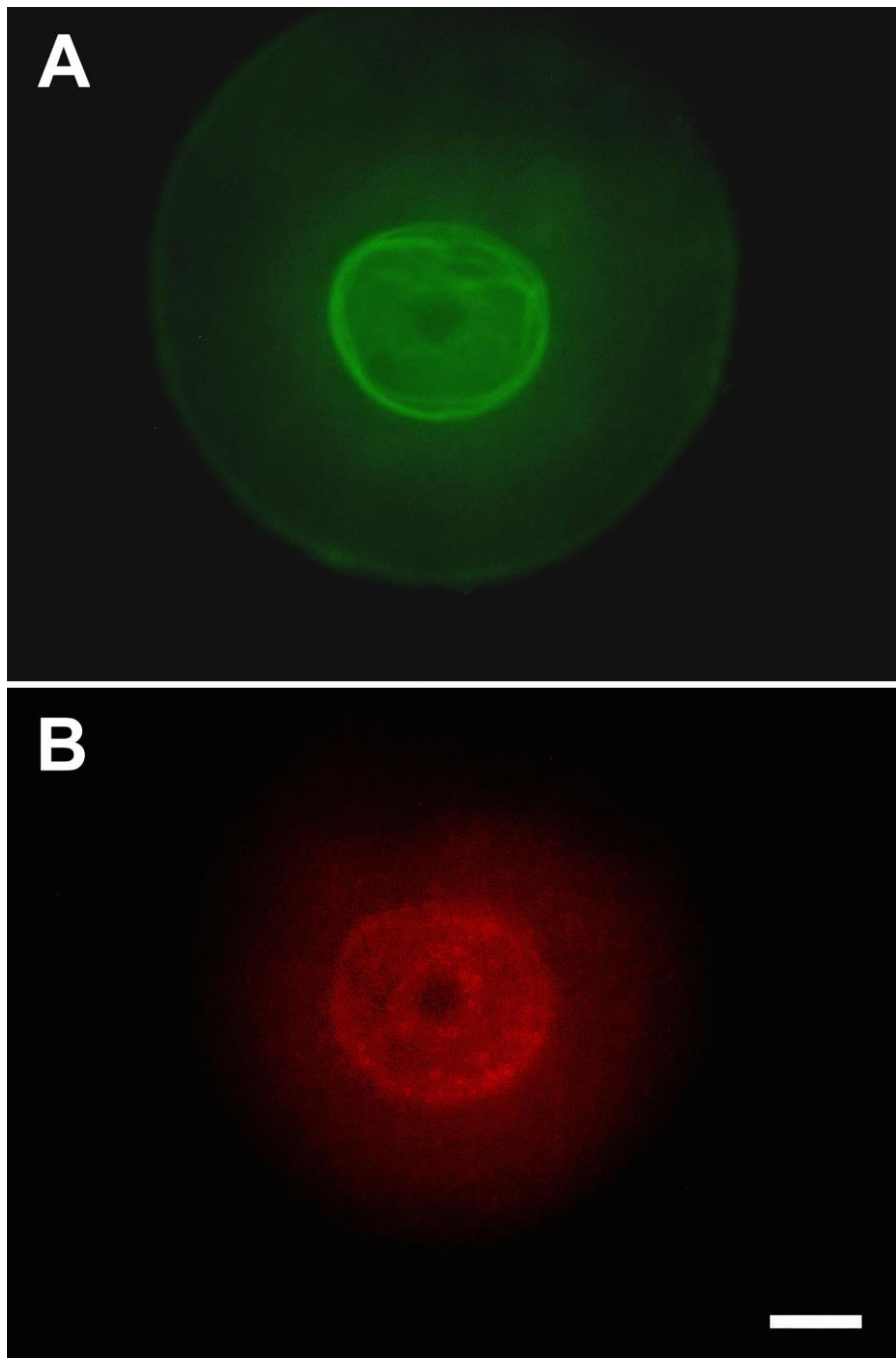


Фиг. 5.19. Овоцит в метафаза I, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин A/C. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .

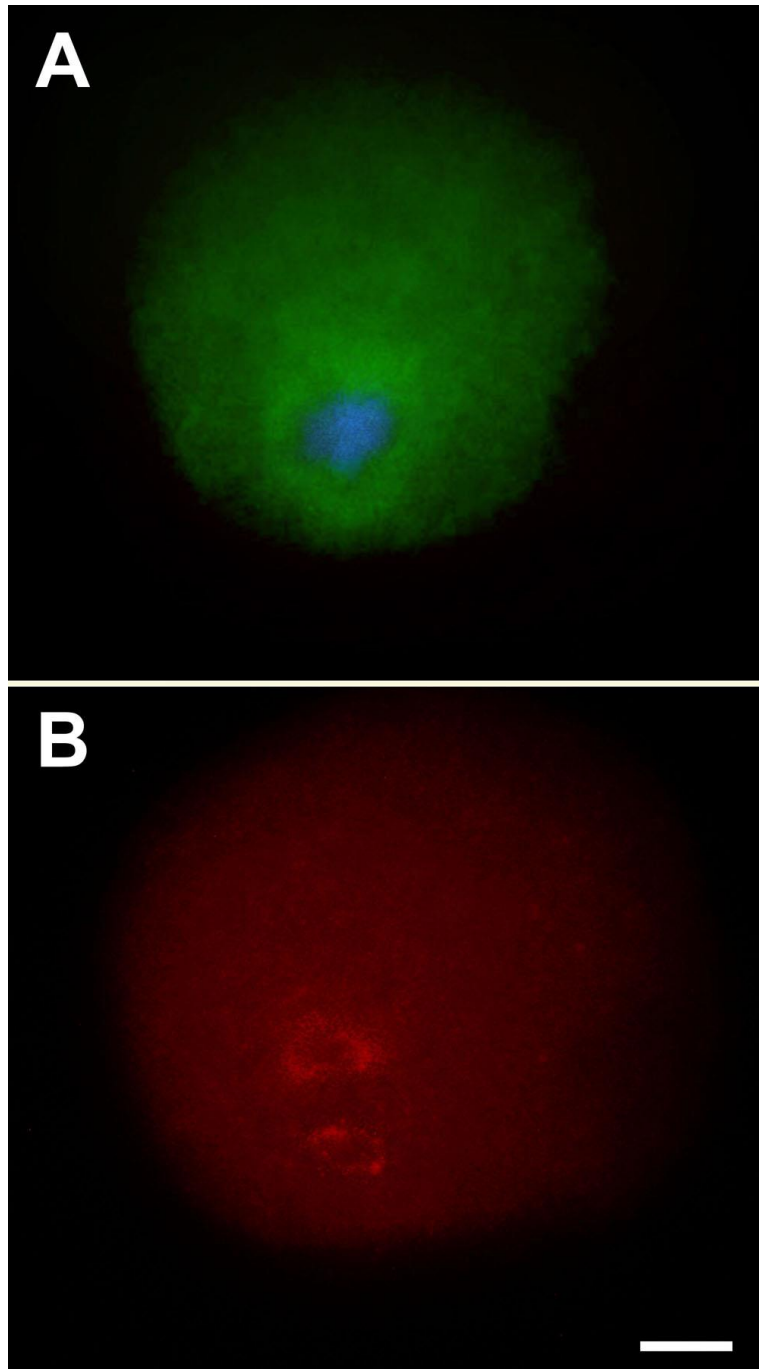
**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛОКАЛИЗАЦИЯТА НА НУКЛЕОПОРИН Nup160 И
ВРЪЗКАТА МУ С ЛАМИНИТЕ В ОВОЦИТИ С РАЗЛИЧНА СТЕПЕН НА
ЗРЯЛОСТ**

За по-пълно изследване на състоянието на ядрената обвивка, в отделен експеримент беше проследено поведението на нуклеопорин Nup160 (компонент на важния надмолекулен комплекс Nup107-160) във връзка с измененията на ядрената ламина по време на зреенето. Установено беше, че кълстери от нуклеопорин по време на оформянето на кариосферата се придвижват заедно с ламин А/С към вътрешните отдели на ядрения регион. При оформена кариосфера нуклеопоринът също се разполагаше в описаните две концентрични сфери – ядрената периферия и кариосферния хетерохроматин (Фиг. 5.20).

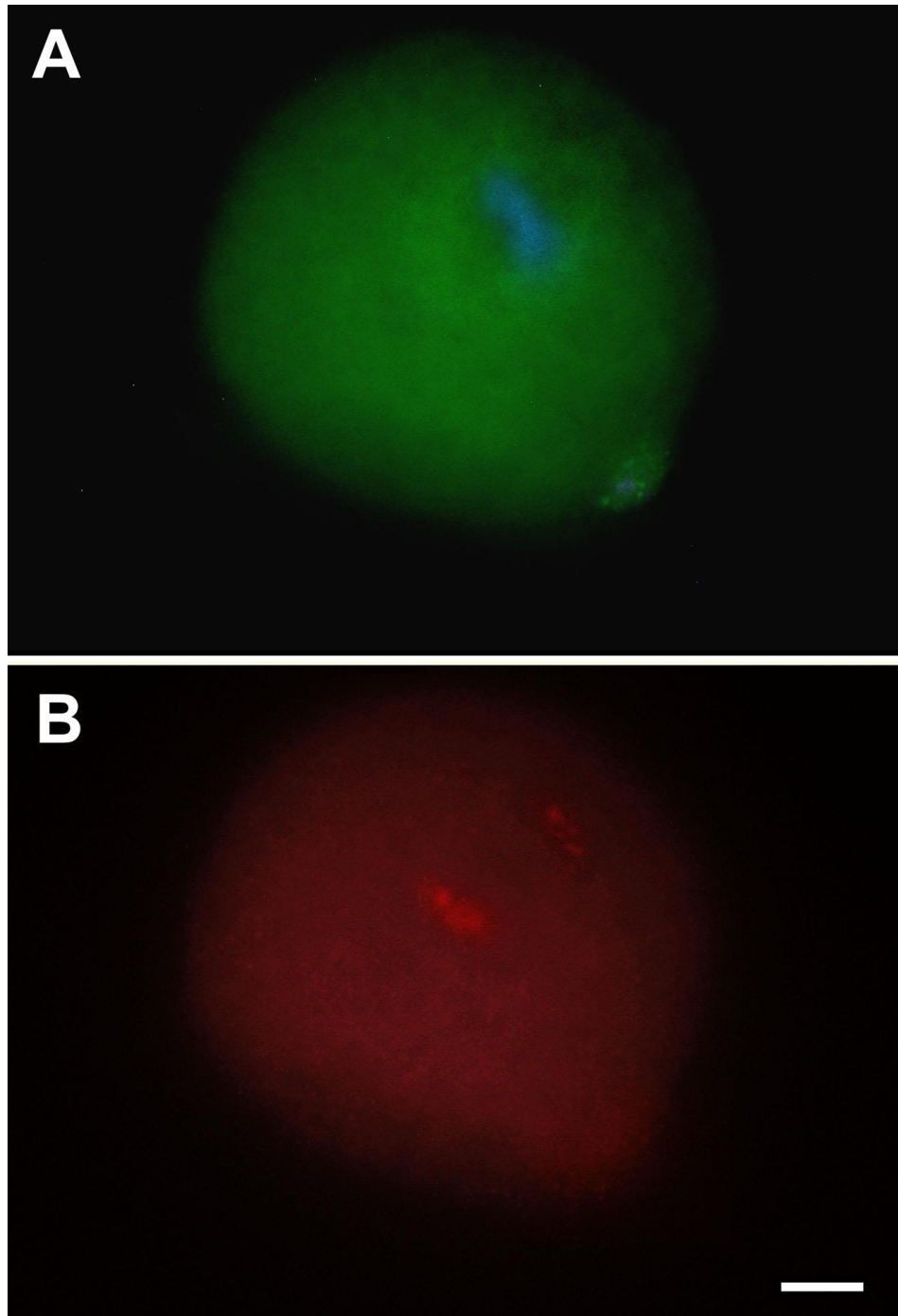
По време на прехода GV – GVBD нуклеопоринът отново колокализираше с ламин А/С. Колокализацията обаче се нарушаваше при прехода към метафаза I. При метафаза I, както и по-късно, при метафаза II, нуклеопоринът се концентрираше в областта на вретеновите полюси (Фиг. 5.21, 5.22). На някои от епифлуоресцентните образи личеше тенденция нуклеопоринът да се разполага в кръгове около полюсите (Фиг. 5.21).



Фиг. 5.20. Овоцит в GV, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин А/С. **В.** Реакция за нуклеопорин Nup160. Отсечката е 20 μm .



Фиг. 5.21. Овоцит в метафаза I, епифлуоресценция. А. Реакция за ламин А/С (зелено) и хроматин (синьо), комбиниран образ. Б. Реакция за Nup160. Нуклеопоринът очертава кръгове, съответстващи на полюсите на мейотичното вретено. Отсечката е 20 μm .



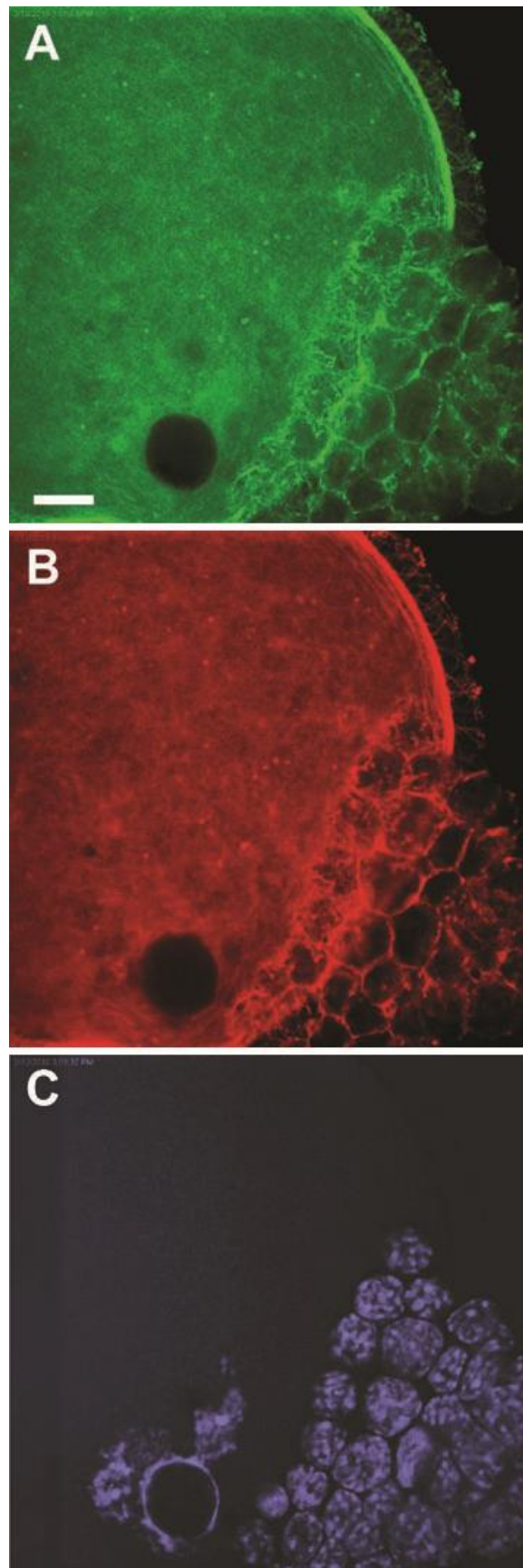
Фиг. 5.22. Овоцит в метафаза II, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин А/С (зелено) и хроматин (синьо), комбиниран образ. **В.** Реакция за Nup160. Нуклеопоринът се локализира в областта на вретеновите полюси. В полярното телце (долу вдясно) се открива слаба дифузна реакция за ламин А/С и не се наблюдава реакция за нуклеопорин. Отсечката е 20 μm .

ПРЕЦИЗИРАНЕ НА ИМУНОЦИТОХИМИЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЧРЕЗ ЛАЗЕРНА СКАНИРАЩА КОНФОКАЛНА МИКРОСКОПИЯ

Част от овоцитите, показали добра епифлуоресцентна реакция, бяха документирани и чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия за прецизиране на данните относно вътреклетъчното разпределение и колокализацията на изследваните компоненти.

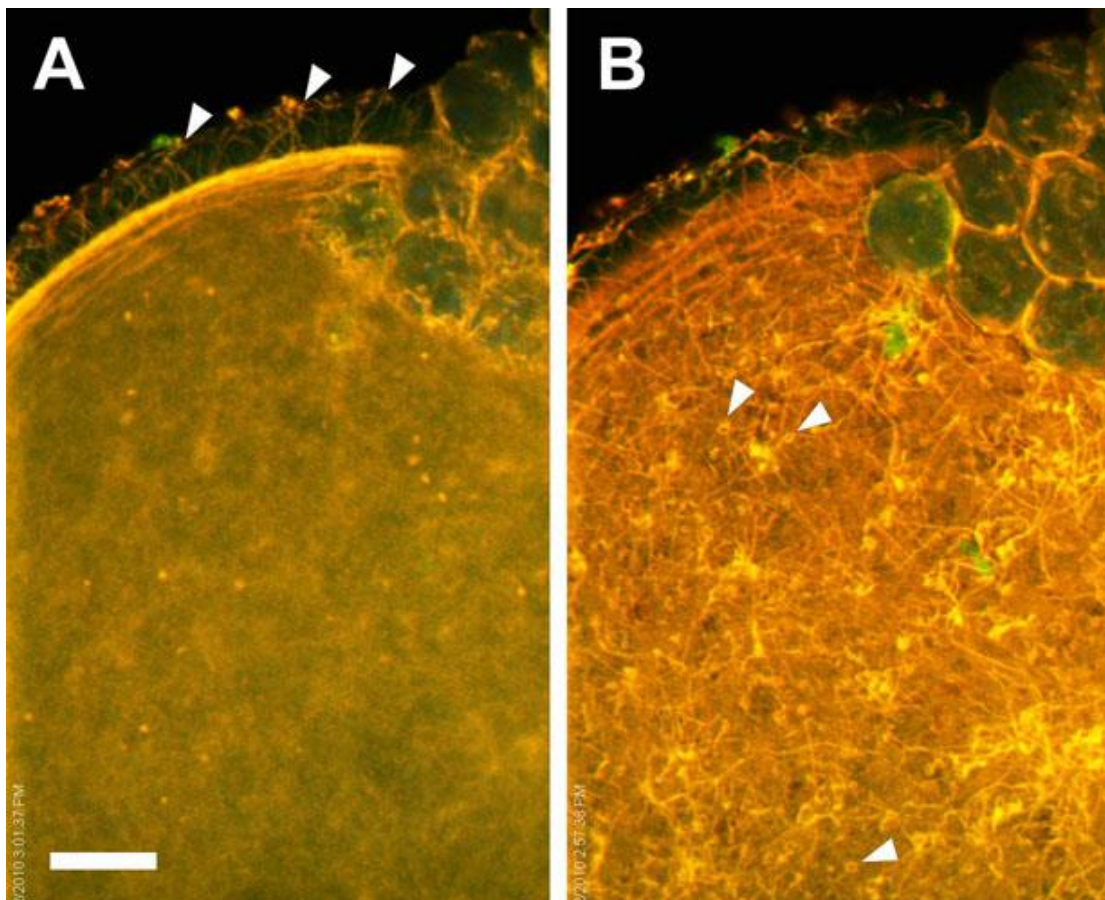
Прецизиране на локализацията на белтъци на цитоплазмените интермедиерни филаменти (цитокератини и виментин) и фибриларния актин

За овоцит-кумулусните комплекси в профaza I беше потвърдена положителната реакция за виментин и цитокератини в кортикалната цитоплазма и областта на ядрото при овоцити на етапи GV и GVBD, както и в свързаните с тях кумулулни клетки (Фиг. 5.23).



Фиг. 5.23. Овоцит на стадий GVBD, лазерна сканираща конфокална микроскопия. А. Реакция за цитоплазмени IF. В. Реакция за F-актин. С. Реакция за хроматин. Отсечката е 5 μm .

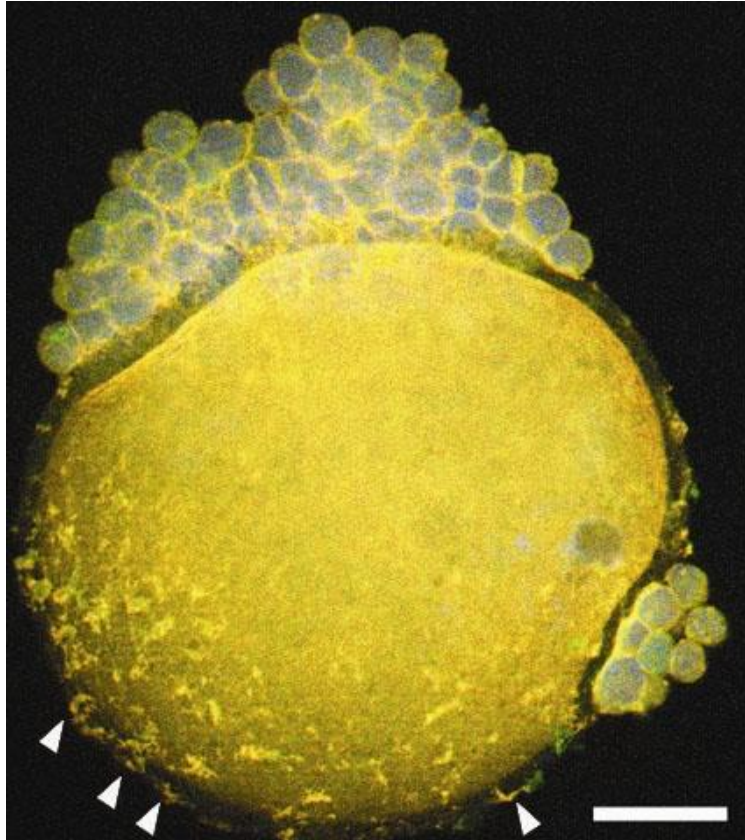
При лазерното конфокално сканиране на овоцит-кумулусни комплекси на стадий GV и GVBD реакцията за IF и актин очертаваше нишковидни структури, пронизващи zona pellucida и съответстващи на израстъците на кумулулните клетки. Те често се наблюдаваха дори когато самите кумулулните клетки се бяха откъснали при подготовката за микроскопското наблюдение. В крайната част на тези израстъци, граничеща с мембраната на овоцита, цитоскелетните компоненти се разширяваха и в напречен срез даваха пръстеновидно светене (Фиг. 5.24).



Фиг. 5.24. Увеличен участък от клетката на Фиг. 5.21, лазерна сканираща конфокална микроскопия, комбинирано оцветяване за IF и актин. **А.** Голям брой кумулулните клетки са се откъснали, но израстъците им, пронизващи зоната, се виждат ясно (означени с главички на стрелки). **В.** Друг фокус на същия участък. Крайните разширения на израстъците в напречен срез дават пръстеновидна реакция (главички на стрелки). Отсечката е 2 μm .

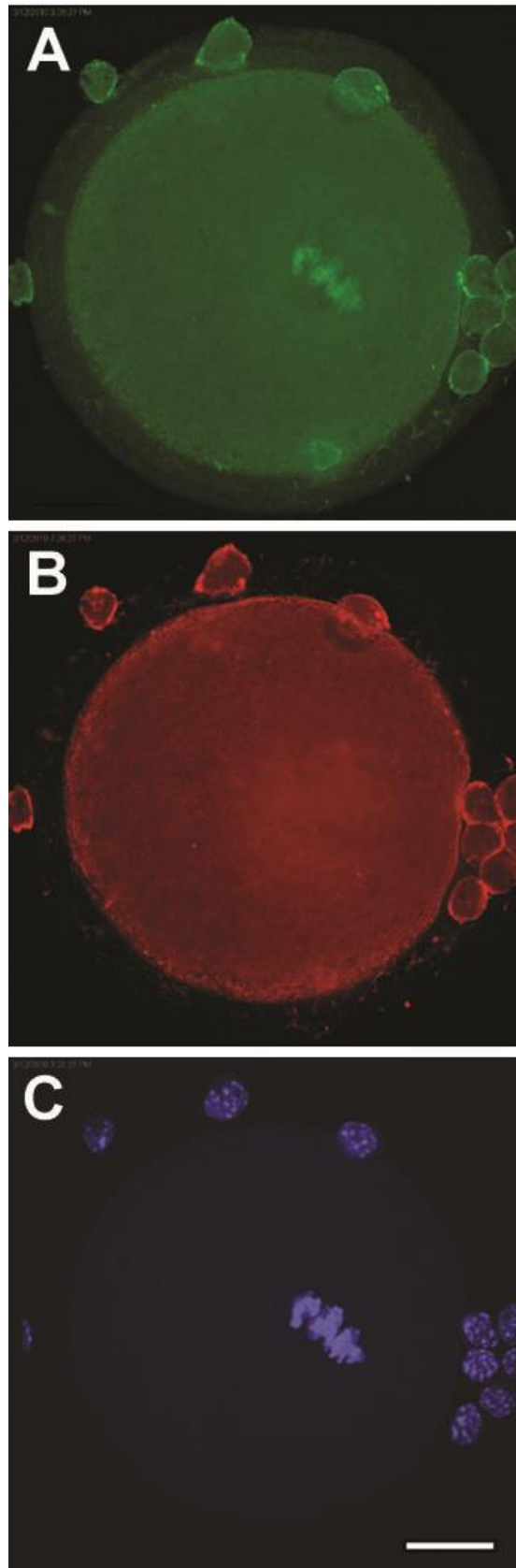
Нерядко по повърхността на zona pellucida можеха да се наблюдават части от израстъците, останали свързани със зоната след откъсването на кумулулната клетка и реагиращи положително за цитокератини, виментин и актин (Фиг. 5.25).

Тази ситуация се наблюдава и на Фиг. 5.6 (от лявата страна на овоцита), но там картината не може да се интерпретира еднозначно поради недостатъчните възможности на епифлуоресценцията като метод.

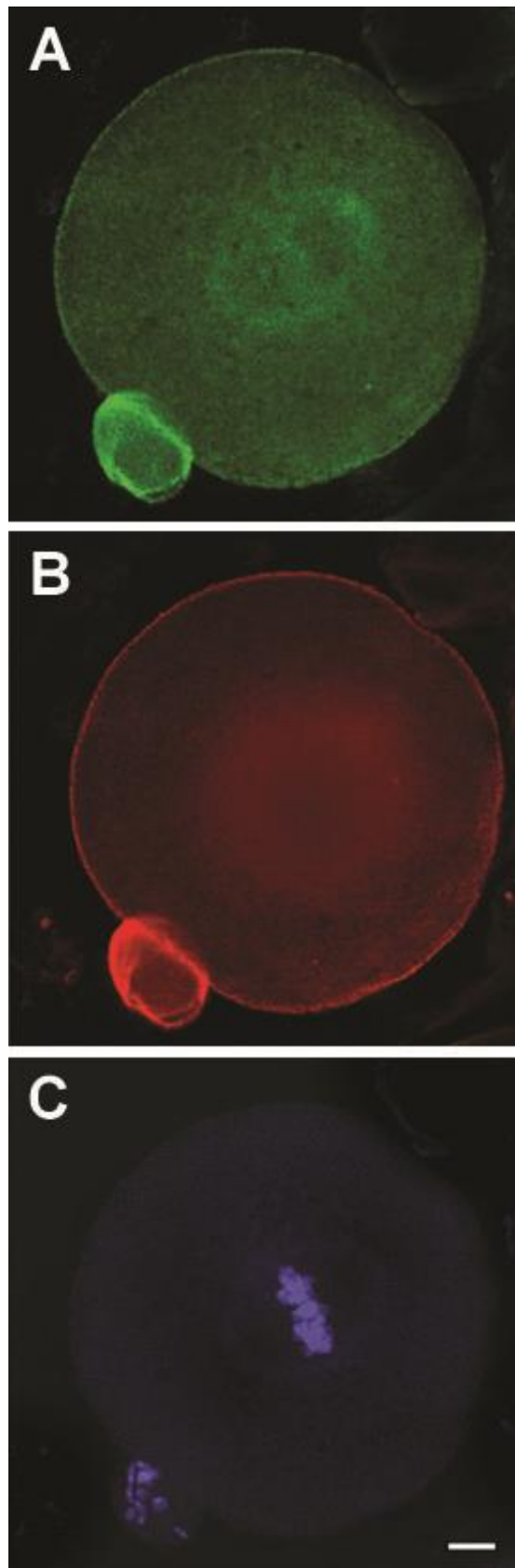


Фиг. 5.25. Овоцит на стадий GV, лазерна сканираща конфокална микроскопия, комбинирано оцветяване за IF (зелено), актин (червено) и хроматин (синьо). С главички на стрелки са означени фрагменти от откъснали се кумулусни клетки, останали свързани с израстъците. Отсечката е 20 μm .

При овоцити в по-късни етапи на зреенето – метафаза I и метафаза II, лазерната сканираща конфокална микроскопия потвърди колокализацията на белтъците на цитоплазмените IF и актина в кортикалния цитоплазмен слой и около мейотичното вретено, както и асоциацията само на белтъците на IF (виментин и цитокератини) с мейотичните хромозоми (Фиг. 5.26, 5.27). Реакцията в кортикалната област беше видимо отслабена спрямо наблюдаваното в GV и GVBD, с изключение на свързаната с вретеното шапка.



Фиг. 5.26. Овоцит на стадий метафаза I, лазерна сканираща конфокална микроскопия. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за F-актин. **С.** Реакция за хроматин. Отделни кумулусни клетки са останали свързани с овоцита. Отсечката е 20 μm .



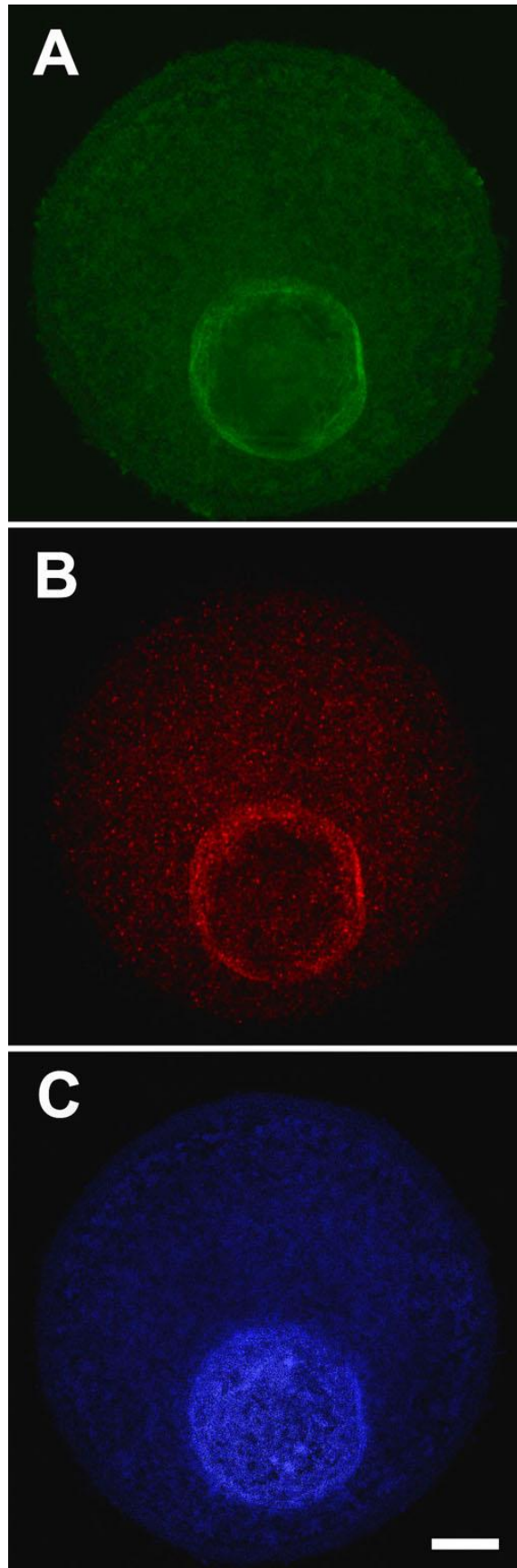
Фиг. 5.27. Овоцит на стадий метафаза II, лазерна сканираща конфокална микроскопия. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за F-актин. **С.** Реакция за хроматин. Полярното телце (долу вляво) показва ярка флуоресцентна реакция за IF и актин в периферията си. Отсечката е 10 μm .

Прецизиране на локализацията на белтъци на ядрените интермедиерни филаменти (ламини), нуклеопорин Nup160 и тубулин

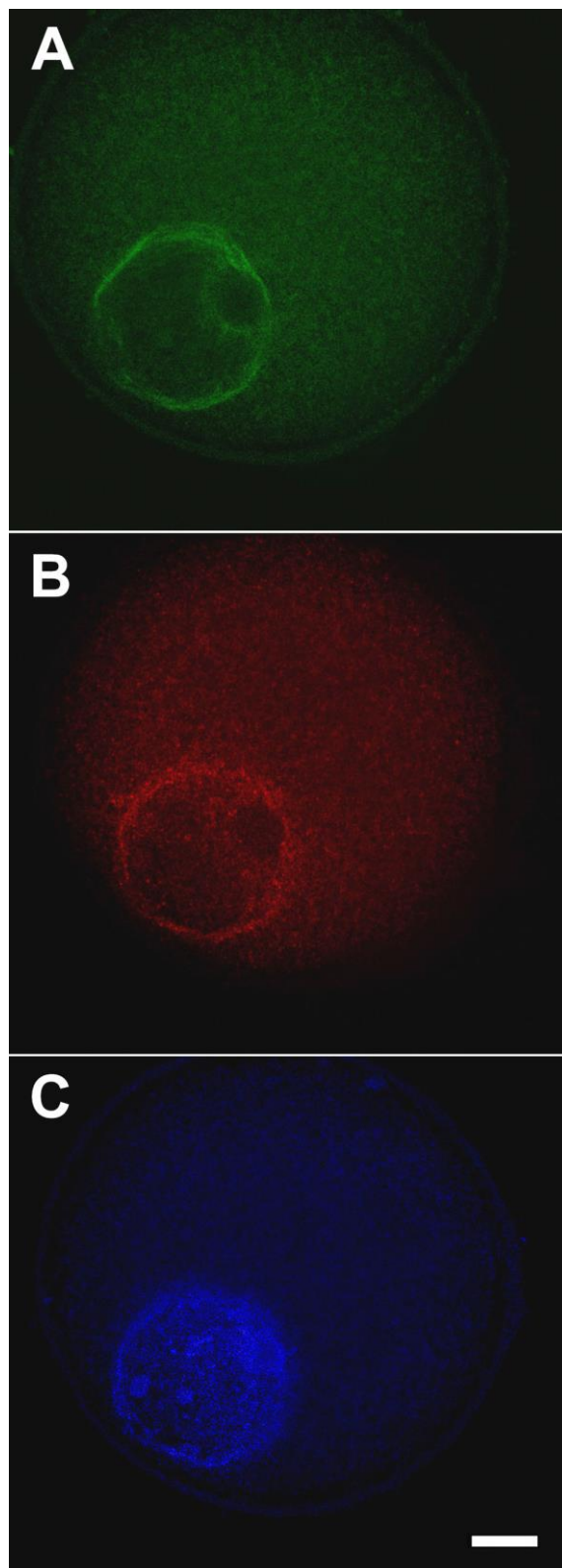
Имунофлуоресцентната реакция за ламини В и А/С и нуклеопорин Nup160 също като тази за цитокератините и виментина беше регистрирана и на тънки оптични срези чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия. Доколкото за два от изследваните белтъци – ламин В и Nup160, епифлуоресцентната локализация бе показала ясна пространствена асоциация с мейотичното вретено през метафаза I и метафаза II (за ламин В – по цялата дължина на вретеновите нишки, а за нуклеопорина – в областта на вретеновите полюси), за прецизиране на колокализацията с вретеното в конфокалното изследване беше включена и паралелна визуализация на α -тубулин чрез второ антитяло, белязано с различен флуорохром.

При незрели профазни овоцити на етап ранен GV (преди оформяне на кариосферата) и трите ядрени белтъка се локализираха свързани с ядрената обвивка. За ламин А/С и Nup160 това е показано на Фиг. 5.28. На този етап не се наблюдаваше реакция за ламини или нуклеопорин във вътрешността на ядрото, а тубулинът се откриваше само в цитоплазмата.

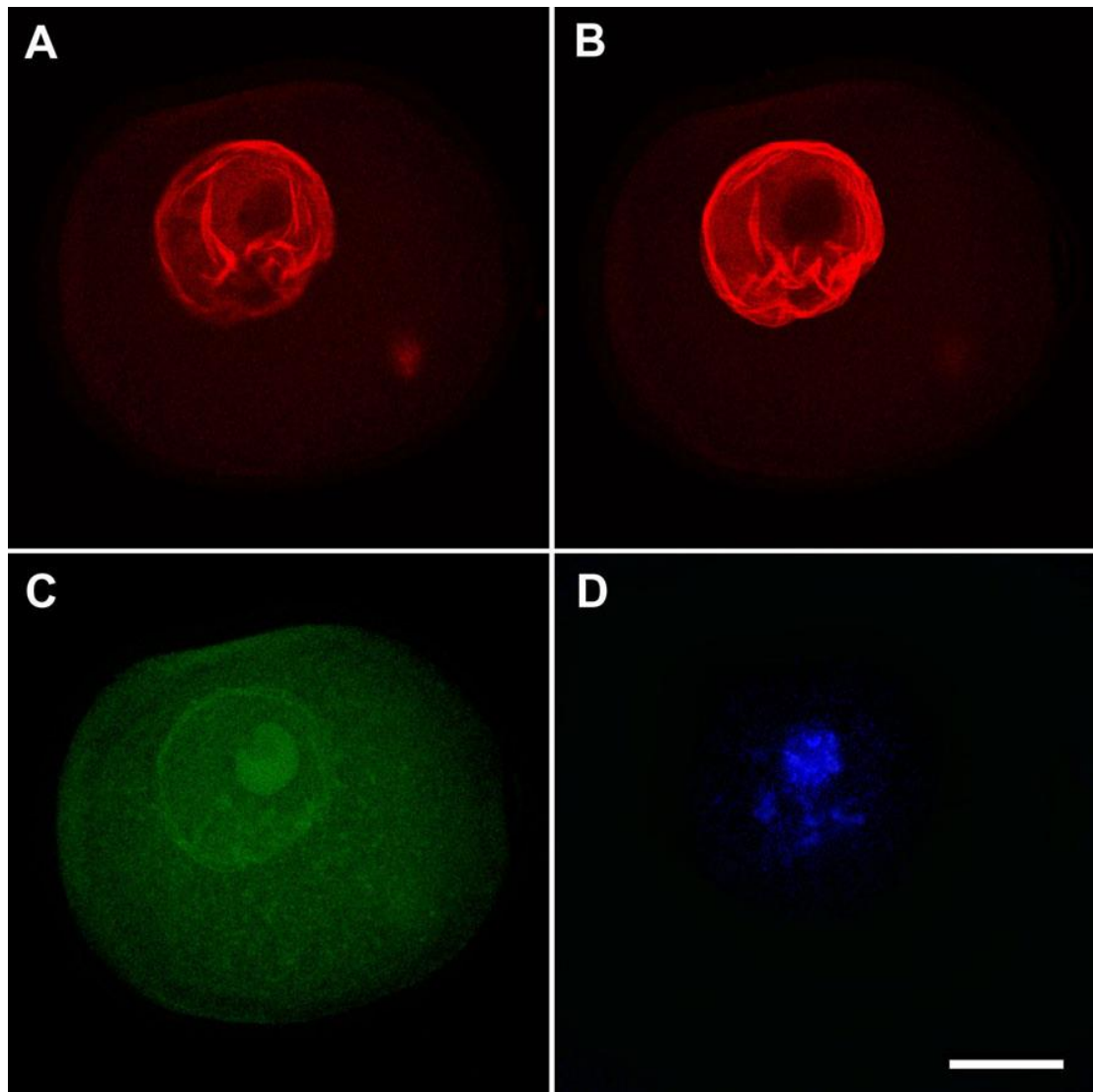
На етап GV с оформена кариосфера се наблюдаваше пълна колокализация на ламин А/С и Nup160. Лазерната сканираща конфокална микроскопия потвърди епифлуоресцентните данни, че двата ядрени белтъка на този етап започват да се откриват освен в ядрената периферия и в областта на кариосферата, свързани с нейния кондензиран хетерохроматин (Фиг. 5.29). По този начин в ядрото на овоцита се очертаваха две концентрични сфери, съответни на ядрената обвивка и на кариосферния хетерохроматин. Цитоплазменият белтък тубулин също се откриваше в ядрото, най-вече свързан с кондензирания хроматин на кариосферата. Ламин В обаче все още се локализираше предимно в ядрената периферия. Малко количество от него навлизаше във вътрешността на ядрото, но не се асоциираше с кариосферата (Фиг. 5.30).



Фиг. 5.28. Овоцит на стадий ранен GV, конфокална микроскопия **А.** Реакция за ламин А/С. **В.** Реакция за Nup160. **С.** Реакция за хроматин. Двата белтъка се откриват свързани с ядрената обвивка. Отсечката е 10 μm .



Фиг. 5.29. Овоцит на стадий GV с оформена кариосфера, конфокална микроскопия. **А.** Реакция за ламин A/C. Вижда се, че ламинът на този етап се свързва с хетерохроматина на кариосферата, но не навлиза във вътрешността ѝ. **В.** Реакция за Nup160 във вид на две концентрични сфери – в периферията на ядрото и асоциирана с кариосферата. **С.** Реакция за хроматин. Отсечката е 10 μm .



Фиг. 5.30. Овоцит на стадий GV с оформена кариосфера, конфокална микроскопия. **А, В.** Реакция за ламин В, два различни оптични среза. Реакцията е главно в ядрената обвивка, която показва признаци на разпад. Малко количество се открива и във вътрешността на ядрото, но не се свързва с кариосферата. Вдясно от ядрото на овоцита се вижда ядро на кумулусна клетка. **С.** Реакция за тубулин във вид на две концентрични сфери – в периферията на ядрото и асоциирана с кариосферата. **Д.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .

С разпадането на ядрената обвивка на етап GVBD разликите в динамиката и локализацията на изследваните белтъци се задълбочаваха. Нуклеопоринът пръв се отделяше изцяло от ядрената обвивка и се наблюдаваше в целия обем на ядрото с изключение на вътрешността на кариосферата (Фиг. 5.31). С

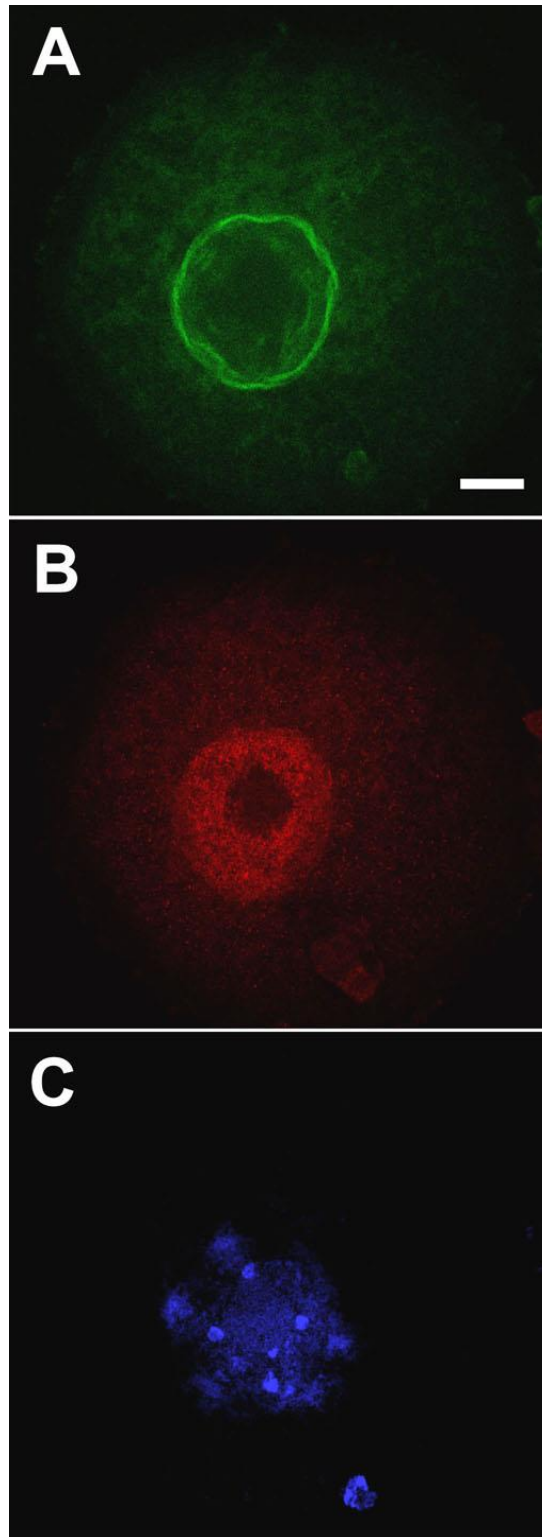
напредването на кондензацията на хроматина ламините постепенно се преместваха към кариосферата. Между двата ламина обаче се наблюдаваше важна разлика: докато ламин А/С оставаше свързан с хетерохроматина на кариосферата и не проникваше във вътрешността ѝ (Фиг. 5.31), ламин В се натрупваше в целия обем, заграден от кариосферата (Фиг. 5.32).

Наблюдението и документирането на метафазни овоцити чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия потвърди и прецизира данните, получени чрез епифлуоресценция. Ламин В отново се откриваше в областта на мейотичното вретено. Ламин А/С се регистрираше в дифузен слой, образуващ „ореол“ около вретеното, а в по-малка степен и в целия обем на овоцитната цитоплазма. Беше потвърдена локализацията на нуклеопорина в областта на вретеновите полюси. За ламин А/С и нуклеопорин Nup160 описаният резултат се вижда на Фиг. 5.33.

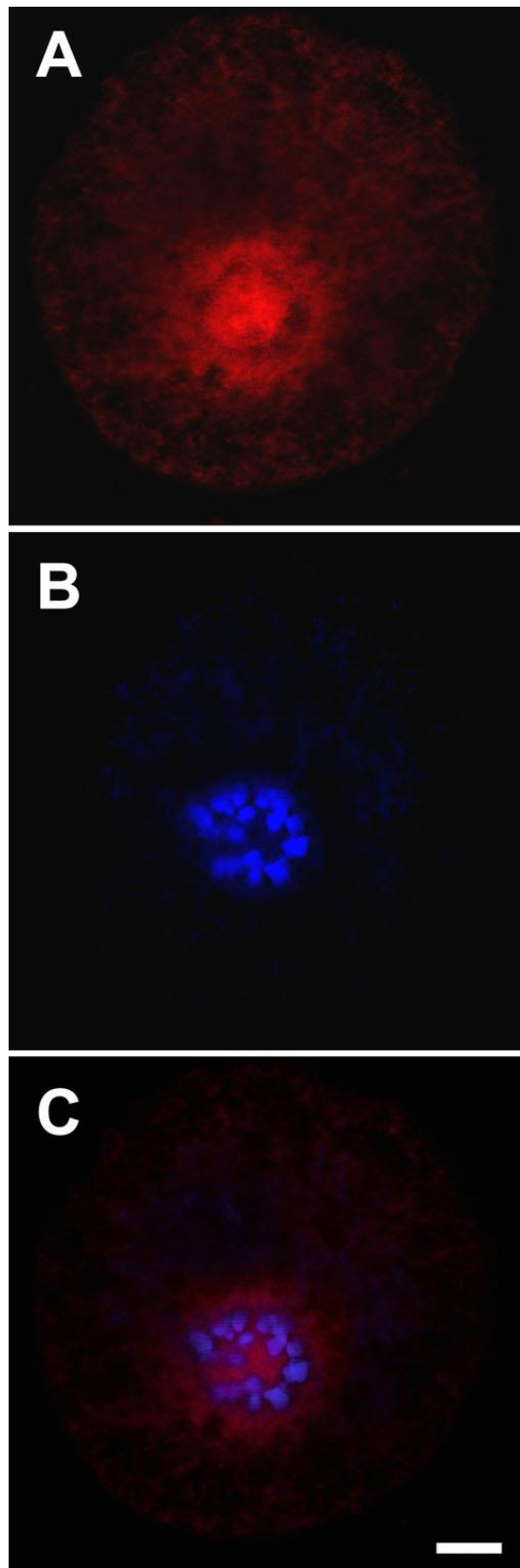
С цел надеждно колокализиране на ламин В и Nup160 с мейотичното вретено всеки от двата белтъка беше визуализиран едновременно с α -тубулин, като бяха използвани втори антители, белязани с различни флуорохроми. За ламин В беше установена пълна колокализация с нишките на мейотичното вретено по цялата им дължина. Докато обаче реакцията за тубулин очертаваше непрекъснати нишки, тази за ламин В разкри фини гранули. Те явно съответстваха на мехурчетата, получени след разпадането на ядрената обвивка (Фиг. 5.34).

Нуклеопорин Nup160 беше концентриран само в полюсите на вретеното и при подходящ ъгъл на наблюдение даваше пръстеновидна реакция (Фиг. 5.35).

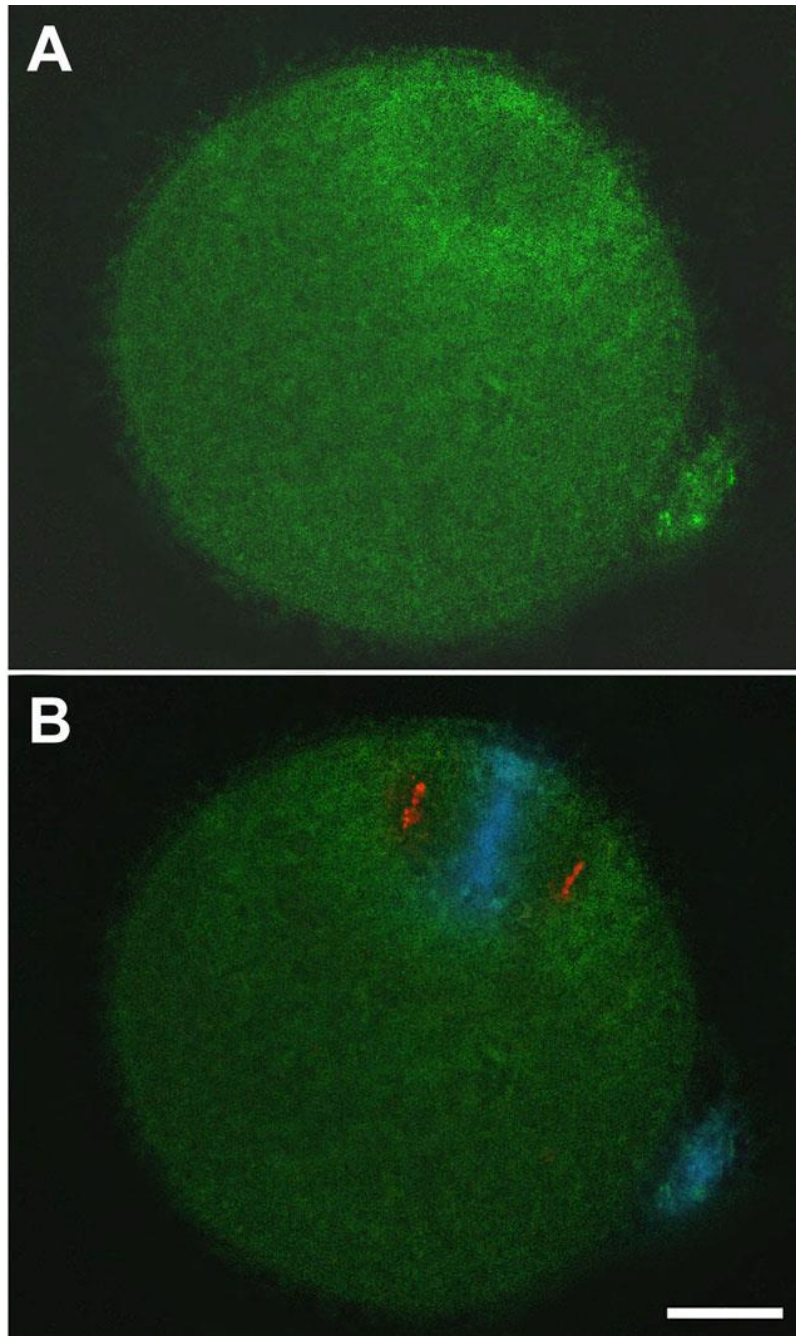
По този начин лазерното конфокално сканиране позволи прецизно определяне на местоположението на изследваните белтъци и тяхната асоциация помежду им и с други клетъчни компоненти на различните етапи от овоцитното зреене.



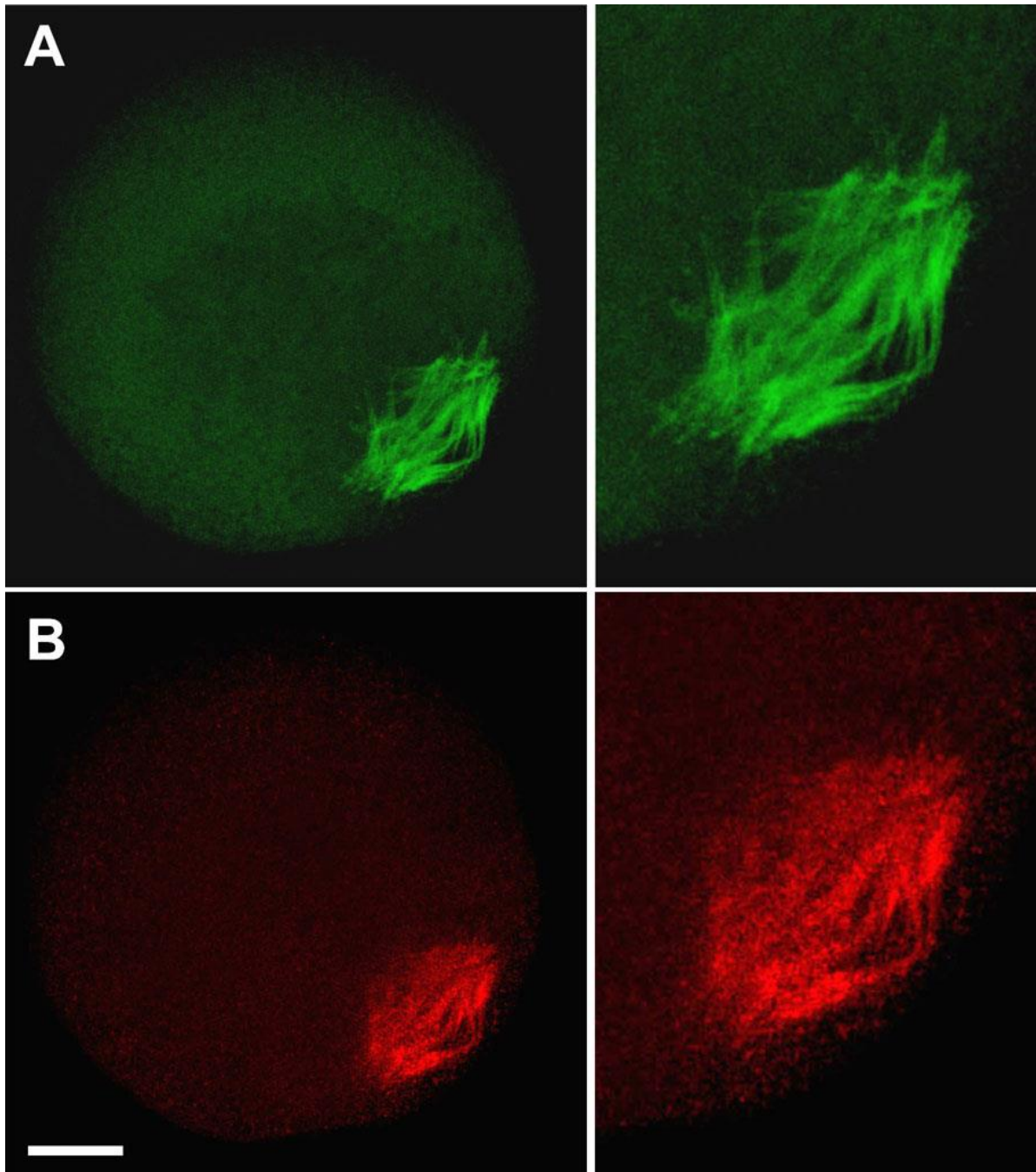
Фиг. 5.31. Овоцит на стадий GVBD, конфокална микроскопия. Оптичният срез е обхванал и ядрото на една кумулусна клетка (в долната част на снимките). **А.** Реакция за ламин A/C. Ядрената периферия още свети ярко, но има видими деформации, показващи разпад на ламината. Наблюдава се и реакция в областта на кариосферния хетерохроматин. **В.** Реакция за Nup160. Вижда се, че той е напуснал ядрената обвивка и се открива изцяло във вътрешността на ядрото. **С.** Реакция за хроматин. Отсечката е 10 μm .



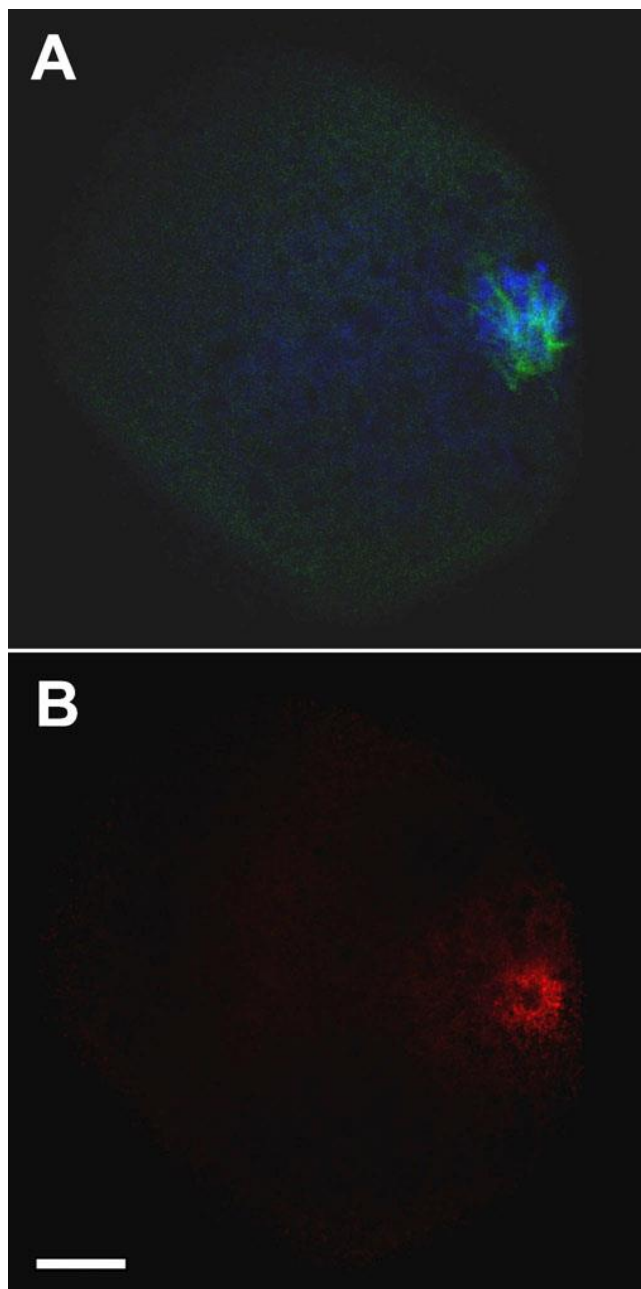
Фиг. 5.32. Овоцит на стадий GVBD, конфокална микроскопия. (Същата клетка при епифлуоресцентно наблюдение е показана на Фиг. 5.14.) **А.** Реакция за ламин В. **В.** Реакция за хроматин. **С.** Комбиниран образ. Вижда се, че ламин В навлиза между подредените в кръг хромозоми, прониква във вътрешността на кариосферата и достига до самия ѝ център. Отсечката е 10 μm .



Фиг. 5.33. Овоцит на стадий метафаза II, конфокална микроскопия. **А.** Реакция за ламин А/С. Ламинът се локализира предимно в дифузна зона около мейотичното вретено и в по-малка степен в обема на цитоплазмата. **В.** Реакция за ламин А/С (зелено), нуклеопорин (червено) и хроматин (синьо), съчетан образ. Нуклеопоринът е съсредоточен в полюсите на вретеното. Отсечката е 20 μm .



Фиг. 5.34. Овоцит на стадий метафаза I, конфокална микроскопия. А. Реакция за α -тубулин. В. Реакция за ламин В. Наблюдава се пълна колокализация между ламин В и тубулина. Отсечката е 20 μm . Вдясно участъкът, съдържащ вретеното, е даден увеличен и се вижда, че ламин В показва зърнисто разпределение.



Фиг. 5.35. Овоцит на стадий метафаза I, конфокална микроскопия. А. Реакция за α -тубулин (зелено) и хроматин (синьо), съчетан образ. В. Реакция за нуклеопорин Nup160. Оптичният срез обхваща едната половина от вретеното с метафазната пластинка и единия полюс. Нуклеопоринът е съсредоточен в областта на полюса, очертавайки пръстен. Отсечката е 20 μm .

6. ОБСЪЖДАНЕ

ЦИТОПЛАЗМЕНИТЕ ИНТЕРМЕДИЕРНИ ФИЛАМЕНТИ В МИШИ ОВОЦИТИ И ОВОЦИТ-КУМУЛУСНИ КОМПЛЕКСИ

Литературните данни за наличието, състава и структурната организация на IF в овоцити и кумулусни клетки от бозайници са все още оскъдни и противоречиви. Това подчертава нуждата от нови изследвания на тези цитоскелетни компоненти. Настоящият труд предоставя резултати в подкрепа на наличието на конвенционални белтъци на цитоплазмените IF в овоцитите от бозайници и тяхната динамика в хода на овогенезата. Макар че експресията на тези белтъци в овоцитите все още се оспорва от някои автори (Wendl et al., 2012), тя всъщност е само един от редицата примери за белтъци, откривани в гаметите, макар да са били смятани за тъканно-специфични компоненти на определен тип диференцирани соматични клетки (Димитрова и Маринова, 2000; Dimitrova and Marinova, 2001).

При настоящото имуноцитохимично изследване на миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси за виментин и набор от цитокератини беше установена пълна колокализация на двата типа белтъци на IF. Поначало те рядко се синтезират в една клетка, доколкото кератините са характерни за епителните тъкани, а виментинът – за мезенхимните. При култивиране на епителни клетки обаче често освен цитокератини започва да се експресира и виментин във връзка с повишените механични изисквания, свързани с растежа в култура. В този случай може да се наблюдава пълна колокализация на виментина и цитокератините, като разпределението на новосинтезирания виментин се насочва от съществуващата кератинова мрежа (Pagan et al., 1996). Настоящото изследване показва, че в подобно положение са и мишите овоцити от стадий GV до края на овогенезата, както и кумулусните клетки.

На всички стадии от овогенезата се установяваше положителна реакция за белтъци на IF в кортикалния слой на овоцитната цитоплазма. Такова съсредоточаване на кератинови филаменти под клетъчната мембрана е описано както в епителни клетки (Windoffer and Leube, 1999), така и в овоцити от земноводни (Clarke and Allan, 2003). Функцията му е да осигури механична

устойчивост на клетъчната периферия. В епителните слоеве това се постига чрез свързване със съседни клетки посредством десмосоми. Както беше посочено по-горе (вж. Фиг. 5.2), свързване със съседни клетки, по-точно с най-близките кумулусни клетки, се наблюдава и при мишите овоцити на етап GV. То е важно с оглед на осигуряването на механична устойчивост на периферията им и предаването на химични вещества и сигнали от кумулусните клетки към овоцита.

С напредване на овоцитното зреене се наблюдаваше отслабване на кортикалната реакция за цитокератини и виментин с изключение на свързаната с мейотичното вретено шапка (Фиг. 5.3). Това понижение на реакцията добре се съгласува със схващането за ролята на IF, влизащи в състава на кортикалния слой, за механичното свързване с кумулусните клетки, доколкото връзките с кумулуса постепенно се прекъсват след разпадането на GV.

Друг компартмент на овоцита, в който се наблюдаваше изразена положителна реакция за цитоплазмени IF, беше обкръжението на ядрения материал – ядрената периферия на етап ранен GV, ядрената периферия и кариосферата на етап GV с оформена кариосфера и мейотичното вретено, включително самата метафазна пластинка, на етапи метафаза I и II. Известно е, че в соматичните клетки цитоплазмените IF също са склонни да образуват перинуклеарна мрежа (Dupin et al., 2011) и да се асоциират както с делителното вретено (Maison et al., 1993), така и със самите митотични хромозоми (Maison et al., 1995). В изследваните от нас миши овоцити с напредването на мейозата успоредно с отслабването на реакцията за IF в кортекса се засилваше реакцията, свързана с мейотичното вретено и хромозомите. Това е израз на асоциирането им с мейотичното вретено и хромозомите и предполага възможна роля на цитоплазмените IF при реорганизацията на мейотичния хроматин след разпадането на GV.

Следва да се отбележи, че на етап GV след оформяне на кариосферата се появяваше реакция за цитокератини и виментин, свързана с кариосферния хетерохроматин, т.е. във вътрешността на ядрото. Това показва, че с напредването на стадия GV и подготовката на прехода към GVBD функцията на NPC се променя съществено. В резултат на това, макар видимата структура на ядрото да е все още запазена, се наблюдава навлизане на цитоплазмени белтъци в неговата вътрешност.

Резултатите от настоящото имуноцитохимично изследване относно разпределението на IF в овоцити на етап GV са в съгласие с тези на Kabashima et al. (2010), които също локализират кератин в кортикалната цитоплазма и в ядрената периферия. За разлика от тези автори обаче получените от нас резултати не показаха усложняване и разрастване на мрежата от IF в овоплазмата по време на овоцитното зреене. Засилване на реакцията се наблюдаваше само в областта на мейотичното вретено и хромозомите, докато в клетъчната периферия се наблюдаваше редукция на кортикалния слой. Можем да предположим, че тази редукция е необходима за придаване на по-голяма динамичност на овоцитния цитоскелет. С други думи, IF също като микротубулите и микрофиламентите в късните етапи на овогенезата търпят преобразувания, които най-вероятно са предпоставка за отделянето на полярните телца и дробенето на зиготата.

В заключение, настоящото имуноцитохимично изследване показва, че конвенционални цитокератини и виментин се съдържат в мишите овоцити в клетъчния кортекс и свързани с ядрото и хромозомите и търпят реорганизация в хода на овогенезата. Те отслабват връзката си с клетъчната периферия и се концентрират около метафазната пластинка, което предполага възможна роля на цитоплазмените IF при реорганизацията на мейотичния хроматин след разпадането на GV.

Макар че експериментите, включени в настоящия труд, бяха ограничени върху овоцити от бозайник (мишка), полезно е да се направи сравнение със съобщенията за локализация на цитокератини при други гръбначни с оглед на разбирането на еволюцията и характеристиките на кератиновия цитоскелет на овоцитите. Съпоставянето на структурни данни между видове с по-далечно родство допринася за изясняване на функционалните особености на изследваната тъкан (Marinova et al., 1989). Понастоящем имуноцитохимични изследвания за цитокератини в овоцитите са проведени върху представители на три класа сухоземни гръбначни – земноводни, влечуги и бозайници. При всички тях е установена локализация в цитоплазмената кора на незрелите овоцити в профаза I, а при *Xenopus* и бозайници се наблюдава реакция и в ядрената периферия (Gard et al., 1997; Maurizii et al., 1997; Kabashima et al., 2010). В това отношение включените в настоящия труд резултати и публикуваните трудове на други автори сочат еволюционно консервативно разпределение на кератина в ранните

овоцити (на етап GV) от различни сухоземни гръбначни въпреки големите разлики в устройството на половата им система и физиологията на размножителните им процеси.

За по-късните стадии на овогенезата обаче няма толкова единодушие на наличните данни. За съжаление тези стадии не са включени в изследването върху овогенеза на влечуго (Maurizii et al., 1997), вероятно поради големите технически трудности, дължащи се на натрупаната жълтъчна маса. За *Xenopus* няколко екипа описват разпад на кератиновия цитоскелет с напредването на овоцитното зреене (Gard et al., 1997; Clarke and Allan, 2003; Kloc et al., 2005). За бозайниците обаче най-подробното публикувано изследване е на Kabashima et al. (2010) върху хамстер. То установява фрагментация на кортикалната реакция за цитокератини след GVBD, което авторите интерпретират като увеличаване на сложността на кератиновата мрежа с възможна роля за запазване на целостта на клетката под механично напрежение след овулацията. Това поставя въпроса дали съществува основна разлика във вътреклетъчното разпределение на цитокератини между овоцитите на земноводни и тези на бозайници. Настоящите резултати показват понижена реакция за кератини в кортикалната цитоплазма на мишите овоцити след прехода към метафаза I. Това е в съгласие с гореспоменатото разпадане на кортикалния кератинов слой в овоцити на *Xenopus*, наблюдавано от различни автори. По този начин включените в настоящия труд данни за пръв път показват, че животните, заемащи най-раздалечени позиции във филогенезата на сухоземните гръбначни (т.е. земноводните и бозайниците), имат общ модел на разпределение на цитокератините в зреещите овоцити от етап GV до метафаза II. Предвид на това е малко вероятно мишите овоцити да показват разпределение, сходно с това при *Xenopus*, а да се различават силно от тези на хамстера, който спада към същия разред бозайници. По-скоро би могло да се предложи друго тълкуване за установената от Kabashima et al., (2010) имуноцитохимична локализация при овоцитите от хамстер.

Запазването на структурата на кератиновия цитоскелет в овоцитите на различни сухоземни гръбначни предполага важни, макар и все още неясни функции. Запазените в овоцита кератини биха могли да бъдат използвани от ранния зародиш. Тази хипотеза е експериментално потвърдена при *Xenopus*, където предотвратяването на синтезата на цитокератини в овоцита води до

неспособност да се образува „компактна” епителна повърхност на бластулата и впоследствие до дефектна гаструлация (Torrey et al., 1992). По-трудно е да се правят предположения за евентуална функция на цитокератините по време на овогенезата. Добре развитият кератинов кортекс на стадий GV при представители на три класа сухоземни гръбначни предполага роля за механичната устойчивост на периферията на профазния овоцит, както и на неговите контакти с околните фоликулни клетки. След възобновяването на мейозата обаче се наблюдава отслабване на реакцията за кератин в кортикалния слой както при *Xenopus*, така и при изследваните от нас миши овоцити. Това вероятно отразява прекъсване на връзките между овоцита и фоликулните клетки и преход към по-динамично състояние на цитоскелета, необходимо за предстоящото отделяне на полярните телца и делене на зиготата. В това отношение следва да се отбележи, че Valentine et al., (2005) изследват механичните свойства на цитоплазмени екстракти от яйца на *Xenopus* и установяват, че цитокератинът не допринася за вискоеластичността. Това е в съответствие с получените от нас чрез химична дисекция данни, че IF в мишите яйца (т.е. на етап метафаза II) са загубили устойчивостта към екстракция, която е присъща на незрелите овоцити на етап GV (тези данни са обсъдени в следващия подраздел).

Установената от нас асоциация на цитокератините с ядрената периферия на овоцитите в GV при мишка също съответства на наблюдавана от други автори локализация в GV-овоцити при *Xenopus* (Gard et al., 1997). Изследване върху екстракти от яйца на *Xenopus* показва, че кератиновите интермедиерни филаменти служат като места за прикрепване на мехурчетата, получени след разпада на ядрената обвивка, а впоследствие улесняват възстановяването ѝ (Zhang et al., 1998). Би могло да се предположи, че взаимодействието с ядрената обвивка е консервативна функция на цитоплазмените IF в овоцита и че наблюдаваната от нас асоциация на техните белтъци с мейотичното вретено и хромозомите на стадии метафаза I и II служи за задържане на компоненти от ядрената обвивка в близост до хромозомите.

NM-IF СТРУКТУРИ В МИШИЯ ОВОЦИТ, РАЗКРИТИ ЧРЕЗ ЕКСТРАКЦИЯ ЗА ЯДРЕН МАТРИКС И ИНТЕРМЕДИЕРНИ ФИЛАМЕНТИ

В хода на работата по настоящия труд за пръв път системно бяха изследвани чрез микроскопски методи и електрофореза овоцити, подложени на екстракция за ядрен матрикс и IF (NM-IF). За характеризиране на морфологията на екстрахираните клетки бе използвана рутинна светлинна микроскопия, за локализиране на белтъците на IF – имунофлуоресценция, а за оценка на белтъчния профил – SDS-електрофореза в полиакриламиден гел.

По литературни данни екстрахиране на женски гамети за NM-IF с последващо микроскопско наблюдение в литературата преди нас е провеждано само върху овоцити от хамстер (Plancha et al., 1989). Тяхното изследване обаче поради методични трудности остава с предварителен характер, без характеризиране на морфологията и без публикувана документация. Единствената ценна информация, предоставена от него за NM-IF структурите, е, че съдържат кератин. С оглед на тези твърде оскъдни данни бе уместно да се осъществи системно изследване на NM-IF в овоцита и свързаните с него в комплекс кумулусни клетки по отношение на морфология, присъствие на белтъци на IF и електрофоретичен белтъчен профил.

В настоящото микроскопско и имуноцитохимично изследване екстрахираните овоцит-кумулусни комплекси на стадий GV съхраняваха общата си морфология и вътреклетъчно разпределение на IF и не се различаваха видимо от неекстрахираните контроли. На този етап те явно притежават добре развити и взаимосвързани скелетни компоненти, позволяващи запазване на основните структурни особености дори и след такава радикална химична дисекция. Важността на междуклетъчните взаимодействия в големите триизмерни клетъчни комплекси, описани от различни изследователи в различни органи (Valkov et al., 1988; Evangelatov et al., 2011), в яйчника се илюстрира най-добре от израстъците, свързващи кумулусните клетки с овоцита на етап GV. След изолиране и екстракция на овоцит-кумулусния комплекс те можеха да се наблюдават през zona pellucida и техният брой и общ вид, както и видът на самата зона, не бяха видимо променени. Положителната реакция за цитокератини и виментин в израстъците и в самите кумулусни клетки, както и в кортикалния слой на овоцита,

показва, че на стадий GV тримерна мрежа от IF чрез междуклетъчните контакти пронизва както овоцита, така и фоликулните клетки и поддържа цялата структура на фоликула стабилна. Тази механична роля на цитоплазмените IF е аналогична на описаната в класическите епителни слоеве от (Fey et al., 1984).

На стадии метафаза I и метафаза II обаче екстракцията за NM-IF причиняваше колапс – концентрация на IF около хромозомите с частично или пълно отделяне на цитоплазмата от zona pellucida. Тази понижена екстракционна устойчивост показва загуба на стабилността на опорните структури, основани на IF, в късните етапи на овогенезата, обратно на съобщението за разрастване на мрежата от IF след разпадането на GV (Kabashima et al., 2010). Това влошаване на механичните свойства най-вероятно е резултат от реорганизация на овоцитния цитоскелет и загуба на външната му опора поради прекъсване на контакта на кортикалния му слой с околните фоликулни клетки. Макар че настоящото изследване за пръв път предоставя данни, че zona pellucida спада към NM-IF структурите, овоцитният цитоскелет на този етап вече не може да я използва за опора, тъй като не е физически свързан с нея. Анализът на резултатите от химичната дисекция показва, че след разпадането на GV тримерната мрежа от IF се преобразува и редуцира, правейки клетката по-динамична, но и по-уязвима на външни въздействия.

Наблюдаваното понижаване на екстракционната устойчивост на IF корелира по време с добре известните цитоскелетни преобразувания в хода на овоцитното зреене. Този процес включва множество фактори като хроматина, кондензин-кохезиновите комплекси, кинетохорите и двигателните белтъци кинезини и хромокинезини – сложен комплекс, податлив на грешки (за обзор вж. Делимитрева, 2010). Предполага се, че проблемното контролиране на женската мейоза е пряко свързано с високата честота на неразделяне на овоцитните хромозоми и неспособността на зрелите овоцити да издържат на замразяване. Понижаването на устойчивостта обикновено се приписва на промени в тубулиновия цитоскелет след разпадането на центрозома. Получените в хода на изследването резултати показват, че е много вероятно и IF да играят роля, като търпят повече или по-малко изразена структурна релаксация с напредване на овоцитното зреене. Тази релаксация може би е предпоставка за мащабните цитоскелетни промени, съпровождащи отделянето на полярното телце и

дробенето на зиготата. Нужни са още изследвания, за да се изясни до каква степен резултатите, получени за подложени на химична дисекция овоцити, отразяват физиологичното състояние на интактните овоцити, но съдейки по известните свойства на NM-IF структурите в епителните слоеве, би могло да се очаква мрежата да възстанови напълно своята устойчивост в 8-клетъчния зародиш след компакцията.

Сравнението на белтъчните профили след SDS-електрофорезата показва, че в овоцит-кумулусните комплекси, както и в другите изследвани тъкани, устойчивите на NM-IF екстракция белтъци са малко на брой и съставят само няколко процента от общото белтъчно съдържание. Ивиците, получени от напълно екстрахирани клетки, не можеха да се проследят при неекстрахираните контроли, явно поради твърде ниското си относително съдържание в неекстрахираните овоцит-кумулусни комплекси. Изключение беше ивица с Mr 57 000, най-изразена в екстрахираните проби и ясно видима и при неекстрахираните контроли. Тя вероятно отговаряше на белтъците на IF, които имат посочената молекулна маса и се съдържат както в овоцитите, така и в кумулусните клетки. Тези резултати показват, че структурната организация на NM-IF в соматичните тъкани и в овоцит-кумулусните комплекси се подчинява на сходни принципи и се опира на устойчивите, лишени от полярност цитоскелетни нишки, обединявани под името IF.

КОЛОКАЛИЗАЦИЯ НА ЦИТОПЛАЗМЕНИТЕ IF С ФИБРИЛАРЕН АКТИН

Установеното при настоящото имуноцитохимично изследване вътреклетъчно разпределение на цитокератините и виментина, съответстващо на области с концентрация на микрофиламенти, наложи провеждане на изследвания за колокализация на двата вида цитоскелетни компоненти чрез едновременното им белязване с два различни флуорохрома.

Литературните данни показват, че цитоплазмените IF могат да се свързват с микрофиламентите посредством съответни асоциирани белтъци, на първо място плектин (Svitkina et al., 1998). Това обаче не значи, че двете цитоскелетни мрежи следват общ план на изграждане в клетката. Напротив, в повечето тъкани припокриването между цитоплазмените IF и фибриларния актин е ограничено

поради склонността на IF да се съсредоточават в централната част на клетката, а микрофиламентите – в периферната (Parikh et al., 2008).

Имуноцитохимичните изследвания с двойно белязване на двете цитоскелетни системи в мишите кумулусни клетки дадоха резултат, подобен на описания за други клетъчни типове, със съсредоточаване на IF във вътрешността на клетката и на актина – в периферията ѝ. В самите овоцити обаче се наблюдаваше почти пълна колокализация на микрофиламентите и цитоплазмените IF. Това навежда на предположението, че в овогенезата на бозайниците се наблюдава тясно взаимодействие между двете цитоскелетни системи, макар че без допълнителни данни може само да се предполага дали мрежата от микрофиламенти осигурява образец, по който се изгражда мрежата от IF, или напротив, цитоплазмените IF стабилизират фибриларния актин. Следва да се отбележи, че резултатите ни за наличието и вътреклетъчното разпределение на фибриларния актин на различните етапи от овоцитното зреене са в съгласие с литературните данни (Lenart et al., 2005; Azoury et al., 2008; Brunet and Verlhac, 2011).

Единственият участък, в който беше установена съществена разлика между разпределението на цитоплазмените IF и това на микрофиламентите, беше ядрената периферия на стадий GV и съответно метафазната пластинка на стадии метафаза I и II. На стадий GV цитокератините и виментинът показваха много по-силна склонност от актина да се съсредоточават в областта на ядрената периферия и по-късно на кариосферата, а в по-късните стадии се асоциираха с мейотичните хромозоми, което за актина не се наблюдаваше. Можем да предположим, че белтъците не само на ядрените IF (ламините), а и на цитоплазмените IF (цитокератини, виментин) са способни да се асоциират с хроматина и да играят роля в неговата реорганизация, докато микрофиламентите не притежават такава функция. По този начин резултатите от настоящото имуноцитохимично изследване подкрепят публикуваните данни на други автори, че белтъците на цитоплазмените IF участват в регулацията на структурните преобразувания и функционалното състояние на хроматина (Traub, 1995; Tolstonog et al., 2002).

ЛОКАЛИЗАЦИЯ НА ЛАМИНИ В И А/С И ВРЪЗКАТА ИМ С ПРОМЕНИТЕ НА ХРОМАТИНА В ОВОЦИТИ С РАЗЛИЧНА СТЕПЕН НА ЗРЯЛОСТ

Локализацията на ламините в хода на овоцитната мейоза е все още недостатъчно изучена и представлява значителен интерес предвид ролята на ядрената ламина като основна опорна структура на ядрото, участваща в регулацията на активността и състоянието на хроматина (Lussi et al., 2011), както и на важността на нейните преобразувания и динамиката на съставните ѝ белтъци в различните фази на митозата на соматичните клетки (Dechat et al., 2010; Olins et al., 2010; Dittmer and Misteli, 2011).

За проследяване на промените във вътреклетъчното разпределение на ламини В и А/С в миши овоцити от стадий GV до метафаза II беше предприето имунофлуоресцентно изследване. При незрелите овоцити на етап ранен GV реакцията за двата типа ламини очертаваше ядрената обвивка както при соматичните клетки и в съгласие с данните на други автори (Schatten et al., 1985; Prather et al., 1989). След това обаче се появяваха важни разлики между овоцитите и соматичните клетки. В GV-овоцитите с оформена кариосфера част от ламините се откриваха около най-кондензирания ѝ хроматин. Така те очертаваха във вътрешността на ядрото втора сфера, даваща положителна реакция. Подобно явление не е описано за ядръцето на соматичните клетки, макар че и в неговата периферия има концентрация на хетерохроматин. Тази разлика показва, че кариосферата, макар че често се нарича „оградено ядръце” (Tan et al., 2009) или „ядръце с очертана граница” (Can et al., 2003), има твърде различна структура и поведение от ядръцето на соматичните клетки.

По време на GVBD се наблюдаваше все по-изразено отделяне на ламините от ядрената периферия и преместването им към кариосферата. При това ламин В се наблюдаваше в нейната вътрешност, докато ламин А/С оставаше свързан с хетерохроматина по повърхността ѝ. Този резултат е интересен, доколкото локализацията на ламините през краткия преходен етап GVBD не е описана от други автори, с изключение на показаното белязване на агрегат с неопределена форма в близост до хромозомите (Prentice-Biensch et al., 2012).

Интерес представляваше също резултатът от имуноцитохимичното изследване с овоцити на стадий метафаза I и метафаза II. Ламините от тип В,

които в соматичните клетки образуват „вретенов матрикс”, в овоцитите също се наблюдаваха свързани с нишките на делителното вретено. Ламините от тип А/С, които в соматичните клетки след прехода към метафаза се отделят от ядрената обвивка и се разпръсват в целия обем на цитоплазмата, при проведените експерименти даваха реакция в цитоплазмата на овоцита като цяло, но освен това забележимо се концентрираха около делителното вретено, без да се свързват със самите му нишки. Тези резултати показват, че ламините по време на мейозата в зреещия миши овоцит показват известно, но не пълно сходство с вътреклетъчното разпределение, описано при митозата.

Следва да се отбележи, че по литературни данни реакцията за двата типа ламини в овоцита изчезва на етап GVBD и се появява отново едва в хода на оплождането на етап пронуклеарна зигота (Prather et al., 1989; Prentice-Biensch et al., 2012). Относно ламин А/С можем да предположим, че разпръсването на реакцията в големия обем на овоплазмата, макар и сходно с наблюдаваното при митозата на соматичните клетки, е било регистрирано като отрицателна реакция. Свързаната с вретеното реакция за ламин В, наблюдавана за пръв път в хода на настоящото изследване, изискваше прецизиране и потвърждение чрез конфокална микроскопия. Във всеки случай би било учудващо, ако двата типа ламини наистина бъдат подложени на разграждане след GVBD, като се има предвид, че при евентуално оплождане те не след дълго отново биха станали необходими за изграждането на ядрената обвивка на двата пронуклеуса.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ НА НУКЛЕОПОРИН Nup160 И ВРЪЗКАТА МУ С ЛАМИНИТЕ В ОВОЦИТИ С РАЗЛИЧНА СТЕПЕН НА ЗРЯЛОСТ

Комплексът NPC, съставен от нуклеопорини, е свързан с ламината и е механична основа за ядрено-цитоплазмения транспорт, също както съставената от ламини ядрена ламина е механична опора на самата ядрена обвивка. Ето защо системното изследване на преобразуванията на ядрените опорни структури през овогенезата изисква изследване не само на ламините, а и на компоненти на NPC. За настоящото изследване бе избран нуклеопорин Nup160, участващ в състава на надмолекулния четвъртичен комплекс Nup107-160 със значими функции в NPC (Orjalo et al., 2006). Неговото наличие и вътреклетъчно разпределение в хода на

овоцитната мейоза, за което не са ни известни литературни данни, беше проследено в зреещи миши овоцити на стадии от GV до метафаза II.

Резултатите от проведените наблюдения показаха на етап GV наличие на Nup160 в ядрената периферия, което бе очаквано и сходно с известното за соматичните клетки. След формирането на кариосферата обаче се наблюдаваше преместване на част от Nup160 към нея, което бе сходно с наблюдаваното за ламините и нямаше аналог с литературните данни за дялящите се соматични клетки. Можем да допуснем, че локализацията в областта на кариосферата вероятно е механизъм за задържане на важни ядрени белтъци в близост до хромозомите, докато ядрената обвивка постепенно се дестабилизира в процеса на подготовка за GVBD.

Интересно е да се съпостави наблюдаваната динамика на Nup160 през по-късните етапи на овоцитната мейоза с описаното от други автори за митозата. През прометафазата в соматичните клетки Nup107-160 първо се концентрира в областта на вретеновите полюси, а после обхваща проксималните нишки на митотичното вретено, като в отделни случаи се разпростира и по цялата дължина на нишките (Orjalo et al., 2006; Güttinger et al., 2009). В изследваните от нас миши метафазни овоцити обаче Nup160 се регистрираше в областта на полюсите на мейотичното вретено както през метафаза I, така и през метафаза II. С други думи, овоцитите, задържани в метафаза I или II на мейозата, по отношение на локализацията на Nup160 наподобяваха соматичните клетки в прометафазата на митозата. Предвид на известната роля на Nup160 за организацията на митотичното вретено (Orjalo et al., 2006) установената от нас разлика вероятно отразява значими особености при сглобяването на вретено и неговата контролна точка в мейотичните овоцити.

ПРЕЦИЗИРАНЕ НА ВЪТРЕКЛЕТЪЧНАТА ЛОКАЛИЗАЦИЯ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ БЕЛТЪЦИ ЧРЕЗ ЛАЗЕРНА СКАНИРАЩА КОНФОКАЛНА МИКРОСКОПИЯ

Цитоплазмени интермедиерни филаменти и фибриларен актин

За да се прецизират резултатите от епифлуоресцентните имуноцитохимични изследвания, част от клетките бяха наблюдавани и документирани и чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия. Получените с този метод резултати се съгласуваха с установеното чрез епифлуоресценция и позволиха да се получи по-точна представа за триизмерното положение на изследваните структури. По този начин бе потвърдено, че наличието на цитокератини, виментин и актин в областта на кариосферата след нейното оформяне е действителна имунофлуоресцентна находка, а не артефакт от наслагването на светене от различни оптични пластове на овоцита при епифлуоресцентно наблюдение. Необходими са мащабни допълнителни изследвания, за да се установи дали проникването на тези цитоскелетни белтъци във вътрешността на ядрото в края на етап GV е резултат от специфичен транспорт от цитоплазмата на ядрото или от общо повишаване на пропускливостта на ядрената обвивка с оглед на предстоящото ѝ разпадане.

Конфокалното сканиране потвърди също така колокализацията на белтъците на цитоплазмените IF с хромозомите на етапи метафаза I и II. Това е довод в полза на хипотезата за роля на тези белтъци в регулацията на състоянието на хроматина (Traub, 1995; Tolstonog et al., 2002). С оглед на това е интересна установената разлика в поведението на фибриларния актин: макар да се откриваше свързан с кариосферния хетерохроматин в късните етапи на GV и GVBD, той се отделяше от хроматина на следващите стадии от мейозата и не се локализираще свързан с хромозомите през метафаза I и II. Това предполага, че роля за мейотичните преобразувания на хроматина след етап GVBD имат само белтъците на IF, но не и актинът.

Още по-интересни данни предостави лазерното конфокално сканиране за разкриване на детайли от овоцит-кумулусните взаимодействия. За овоцит-кумулусните комплекси на стадий GV по-големите възможности на този метод

позволиха не само прецизиране на резултатите от епифлуоресценцията, а и получаване на качествено нови резултати, свързани с взаимодействието между овоцита и микрообкръжението му от кумулусни клетки. Структурната основа на това взаимодействие са израстъците на най-близките кумулусни клетки, които пронизват *zona pellucida* и се свързват с овоцита. Цитоскелетните компоненти на двата вида клетки осигуряват механична опора на връзката между мембраните им. Високата разделителна способност на лазерната сканираща конфокална микроскопия ни позволи да осъществим детайлно наблюдение и документиране на израстъците на кумулусните клетки и по-конкретно на техния цитоскелет.

Имуноцитохимичната реакция за цитокератини, виментин и фибриларен актин в израстъците беше значително по-силна, отколкото в цитоплазмата на кумулусните клетки. Това е в съгласие с литературните данни (Sutovský et al., 1994) и показва съсредоточаване на цитоскелетни структури в израстъка за осъществяване на опорна функция и осигуряване на необходимата механична устойчивост въпреки малкото му сечение.

На нивото на *zona pellucida* реакцията за IF и фибриларен актин в израстъците очертаваше единична линия, което следва да се очаква при визуализиране на снопче цитоскелетни елементи с толкова малък диаметър (под 1 микрометър). Диаметърът обаче се увеличаваше в областта на крайното разширение (*foot process*) на израстъка, така че в напречен срез на това ниво реакцията за IF и актин беше пръстеновидна. Това показва, че в крайното разширение на израстъците на кумулусните клетки опорните цитоскелетни компоненти са съсредоточени периферно, в субплазмалемална позиция, така че да осигуряват необходимата механична здравина, без да пречат на транспорта на вещества от кумулусната клетка към овоцита. Доколкото ни е известно, описаните подробности от строежа на израстъците досега не са публикувани в научната литература. Те обаче представляват интерес с оглед на важността на механичното поддържане на овоцит-кумулусния комплекс, от една страна, и на ефективната комуникация между кумулусните клетки – от друга.

При подготовката на овоцит-кумулусните комплекси за микроскопия в много случаи се откъсваха не само клетките от външните слоеве на кумулуса, а и непосредствено свързаните с овоцита. Техните израстъци обаче се запазваха, често заедно с цитоплазмен фрагмент. Можем да направим извода, че връзките

между кумулусните израстъци и овоцитния кортекс са механично по-устойчиви от връзките, съществуващи между цитоскелетните компоненти в самата цитоплазма на кумулусната клетка. Това ясно показва важното значение на овоцит-кумулусните взаимодействия за диференцирането на незрелите овоцити на стадий GV, възобновяването на мейозата и правилното протичане на следващите етапи от овогенезата.

Ядрени интермедиерни филаменти, нуклеопорин Nup160 и тубулин

Прецизното изследване на вътреклетъчното разпределение на белтъците на ядрените IF (ламините) и свързаните с тях компоненти на NPC също като изследването на цитоплазмените IF изискваше използване на лазерна сканираща конфокална микроскопия. Въпреки че епифлуоресценцията даде общи сведения за локализацията на тези ядрени белтъци и динамиката им на различните етапи от овоцитното зреене, важни детайли останаха неизяснени или непотвърдени. Например при епифлуоресцентното изследване на овоцити в GV изглеждаше, че ламин В присъства във вътрешността на кариосферата, а ламин А/С – само в периферията ѝ, свързана с най-кондензирания хроматин, но тази разлика не можеше да се установи със сигурност. Състоянието на ядрената ламина по време на прехода GV – GVBD също изискваше прецизиране чрез конфокална микроскопия по отношение както на ламин В, така и на ламин А/С. Потвърждение изискваше и епифлуоресцентната находка, че в метафазните овоцити ламин В колокализира с тубулиновите вретенови нишки, а ламин А/С се регистрира в дифузен слой около вретеното, без да следва самите нишки. Освен това резултатът от изследването за нуклеопорин Nup160 не можеше да се приеме като категоричен. Данните, че на етап GV този белтък се свързва с ядрената периферия и кариосферата като две концентрични сфери, а през метафаза I и II се съсредоточава в областта на вретеновите полюси и очертава пръстени, също трябваше да се уточнят чрез конфокална микроскопия.

При незрели овоцити на етап ранен GV наблюдението чрез конфокална микроскопия потвърди локализацията на трите ядрени белтъка в областта на ядрената обвивка, без значими количества във вътрешността на ядрото. Потвърдено беше и преразпределението им към кариосферата на етап GV с

оформена кариосфера – преразпределение, което видимо напредваше с приближаване на прехода към GVBD.

На етап GVBD конфокалното сканиране чрез възможностите си за прецизна локализация позволи да се наблюдава и документира убедително разликата в разпределението на ламини В и А/С, наблюдавана още при епифлуоресцентното изследване, а именно че ламин А/С се открива само свързан с хетерохроматина в периферията на кариосферата, докато ламин В прониква и навътре в целия ѝ обем. За отбелязване е, че сходна с ламин А/С локализация показва и Nup160, както и проникналите на този етап в ядрото цитокератини и виментин. Общо за всички тези белтъци, откривани по повърхността на кариосферата, но не и в нейната вътрешност, е, че са хидрофилни. За разлика от тях ламин В, регистриран и във вътрешността на кариосферата, е мембранно-свързан белтък на всички етапи от клетъчния цикъл, доколкото е ковалентно модифициран – фарнезилиран (Dechat et al., 2010). Въз основа на това можем да допуснем, че във вътрешния обем на кариосферата на етап GVBD се съсредоточават мехурчета, получени от ядрената обвивка при нейния разпад. По този начин може да се обясни защо вътрешността на кариосферата през GVBD е свободна от всички изследвани белтъци, както и от хроматин. Получените данни хвърлят нова светлина върху промените на тази важна, но слабо изследвана структура по време на прехода от ранен GV през GV с кариосфера към GVBD и участието на цитоскелетните елементи в нейните преобразувания.

Конфокалната микроскопия предостави важна информация и за локализацията на изследваните ядрени белтъци през метафаза I и II, когато в овоцита липсва обособено ядро. При това беше потвърдена локализацията на ламин А/С в дифузен ярък слой около мейотичното вретено и в по-малка степен в целия обем на овоплазмата. Това противоречи на съобщенията на други автори (Prather et al., 1989; Prentice-Biensch et al, 2012), че с прехода към метафаза I ламин А/С изчезва, за да се появи отново едва в пронуклеарната зигота. Като се вземе предвид обаче значителната големина на пронуклеусите и относително бързото им образуване при евентуално оплождане на задържания в метафаза II овоцит, изглежда малко вероятно важният структурен компонент ламин А/С наистина да се разгражда при мейотичното зреене и да трябва да се синтезира отново при активирането на овоцита. Получените от нас данни, според които той се

разпръсва в обема на цитоплазмата след GVBD, добре обясняват неговата динамика в хода на овогенезата и с оглед на евентуалното оплождане и отговарят на преобразуванията му при митозата на соматичните клетки. Би могло да се допусне, че дифузната реакция за ламин А/С в цитоплазмата на метафазните овоцити лесно се приема от някои наблюдатели за неспецифичен фон, който не отговаря на действителна локализация на белтъка. Наистина при епифлуоресцентно наблюдение на голяма клетка като овоцита дори минимално количество на флуоресцентния белег в цитоплазмата води до поява на ясно фоново оцветяване на цялата клетка. Това явление обаче се елиминира при наблюдение на тънки оптични срези от клетката чрез конфокална микроскопия, което е едно от важните предимства на метода. Премахването на фоновото оцветяване лесно може да се забележи, като се сравнят образите, документиращи локализацията на един и същ белтък чрез епифлуоресцентна и конфокална микроскопия съответно. При изследването на метафазни овоцити за ламин А/С обаче „фоново” оцветяване на цялата цитоплазма се наблюдаваше и при конфокална микроскопия, което показва, че отразява действително разпределение на белтъка.

Освен в целия обем на цитоплазмата ламин А/С беше видимо концентриран около мейотичното вретено като по-ярък дифузен слой. Би могло да се допусне специфичен механизъм за тази концентрация, но тя може да се обясни и с чисто пасивно натрупване на ламин А/С в участъка около вретеното, свободен от други органели. В по-отдалечените области на овоплазмата разпространението на ламина вероятно е ограничено от това, че част от обема е зает от органели като ендоплазмения ретикулум и митохондриите, които не бяха специално проследявани в настоящото изследване.

За разлика от ламин А/С обаче, ламин В показваше точна, специфична колокализация с нишките на делителното вретено. Този резултат беше потвърден от конфокалното сканиране, като по протежение на белязаните за тубулин нишки се наблюдаваха дребни гранули с положителна реакция за ламин В, явно съответстващи на получените от ядрената обвивка мехурчета. С оглед на данните от последните години, че в метафазните соматични клетки ламин В образува „вретенов матрикс” върху тубулиновото митотично вретено (Tsai et al., 2006; Ma et al., 2009; Civelekoglu-Scholey et al., 2010; Shi et al., 2014), следва да заключим,

че през мейотичната метафаза I и метафаза II той има динамика и роля за организацията на мейотичното вретено, сходна с тази през митотичната метафаза на соматичните клетки. Възниква въпросът защо в малкото изследвания за локализацията на ламин В през овогенезата се съобщава за отрицателна реакция в метафазните овоцити (Prather et al., 1989). Вероятната причина е, че прецизната локализация на мембранно-свързан белтък като ламин В поставя методични трудности, много по-значителни от тези при локализацията на изцяло хидрофилните белтъци. Вероятно по тази причина ламиновият вретенов матрикс в соматичните клетки е описан сравнително неотдавна (Tsai et al., 2006). Трябва да се отбележи също така, че в по-новите изследвания върху ламините в овоцити има склонност да се дава по-подробна информация за динамиката на ламин А/С (Foster et al., 2007) или просто да се проследява само той (Prentice-Biensch et al., 2012). Авторите на последния труд, макар че не поясняват защо са предпочели ламин А/С пред ламин В като показател за етапа на мейотично зреене, посочват, че липидните образувания в цитоплазмата създават методични трудности при локализацията на клетъчни структури в овоцитите. Можем да предположим, че такива проблеми с експерименталната процедура са причина за оскъдните и несистемни данни за ламин В в овоцити спрямо по-подробните описания на локализацията на цитоскелетните белтъци и дори на сродния ламин А/С. В настоящото изследване обаче методичните затруднения бяха преодоляни чрез подходящ протокол за фиксация и прилагане на мануални умения при обработката на клетките. Така динамиката на ламин В бе проследена на всички етапи от GV до метафаза II, включително чрез конфокално сканиране. Едновременно белязване на ламин В и тубулин потвърди колокализацията на тези белтъци и включването на ламин В във „вретенов матрикс“ по време на мейотичната метафаза I и метафаза II аналогично с митотичната метафаза при соматичните клетки. По този начин настоящото изследване допринася за разкриване на все още неясната локализация и организация на овоцитните ламини в дългия интервал между GVBD и оплождането.

Установеното за ламините сходство в динамиката при мейоза и митоза обаче не се наблюдаваше при нуклеопорин Nup160, с изключение на наблюдението, че на етап ранен GV този белтък се локализира в ядрената обвивка, а преди разпадането ѝ, т.е. на етап GVBD, се отделя от нея (всъщност от

трите изследвани ядрени белтъка нуклеопоринът беше първият, който напускаше ядрената периферия при прехода към GVBD). Другите аспекти на вътреклетъчното разпределение на Nup160 в овоцитите обаче бяха различни от литературните данни за дялящи се соматични клетки. Конфокалната микроскопия потвърди епифлуоресцентните данни за колокализация на нуклеопорина с кариосферата след нейното оформяне. На по-късните етапи от зреенето – метафаза I и II, оптичните срези от мейотичното вретено показаха съсредоточаване на Nup160 в областта на неговите полюси и образуване на правилни пръстени. Тази картина при митотичните клетки е характерна не за метафазата, а за прометафазата, докато с прехода към метафаза реакцията първо се разпростира по дължината на вретеновите нишки в (+)-посока, а после изцяло се дисоциира от вретеното (Orjalo et al., 2006; Güttinger et al., 2009). При настоящото изследване върху миши овоцити обаче не бе наблюдавана промяна или изчезване на реакцията за Nup160 в областта на вретеновите полюси дори при зрелите овоцити, задържани в метафаза II. Колокализацията с полюсите на мейотичното вретено беше потвърдена чрез едновременно прилагане на антитела срещу Nup160 и тубулин, визуализация на реакцията чрез втори антитела, белязани с два различни флуорохрома, и документация чрез конфокална микроскопия.

Предвид на общата прилика в хода и механизма на митозата и мейозата и същевременно наличието на определени ключови разлики между двата процеса би могло да се очаква по-голямата част от молекулите-участници в клетъчното делене да имат сходна локализация и динамика в хода на митозата и мейозата, но определени белтъци с важна регулаторна роля да показват разлики в това отношение. Измежду изследваните от нас ядрени белтъци, важни за структурата на ядрената обвивка и функцията на ядрото, два (ламин В и ламин А/С) показаха поведение, сходно с описаното за митозата, докато третият (Nup160) на отделните етапи от мейозата имаше локализация, различна от тази при митозата на соматичните клетки. Това ни позволява да предположим, че Nup160 още от края на профаза I изпълнява роля, специфично свързана с регулацията на мейотичните преобразувания в зреещия овоцит и по-конкретно с изграждането, стабилизацията и динамиката на мейотичното вретено. По този начин съпоставянето на данните за вътреклетъчната организация на различните изследвани белтъци показва, че

разкриването на молекулните механизми на мейотичното зрееене изисква комплексен подход, включващ проследяване на редица компоненти както на ядрото, така и на цитоплазмата.

7. ИЗВОДИ

1. Имуноцитохимичното изследване показва, че конвенционални цитокератини и виментин се съдържат в мишите овоцити в клетъчния кортекс и около ядрото и хромозомите и търпят реорганизация в хода на овогенезата. Те отслабват връзката си с клетъчната периферия и се концентрират около метафазната пластинка. Това предполага възможна роля на цитоплазмените IF при реорганизацията на мейотичния хроматин след разпадането на герминалния везикул.
2. Екстракцията за NM-IF показва първоначална устойчивост на тези цитоскелетни компоненти в GV-овоцитите, която впоследствие се губи, водейки до колапс на IF в екстрахираните метафазни овоцити. Тази структурна релаксация може би е предпоставка за мащабните цитоскелетни промени, съпровождащи отделянето на полярното телце и дробенето на зиготата.
3. Цитоплазмените IF показват значителна колокализация с фибриларния актин, което сочи тясно взаимодействие между двете цитоскелетни системи. Асоциация с хроматина (хромозомите) обаче се наблюдава само за IF, което предполага, че те, а не микрофиламентите, са от значение за мейотичните преобразувания на хроматина.
4. Ядрените IF (ламините) в овоцитите търпят динамика, като цяло сходна с тази при митозата на соматичните клетки, но със специфики, свързани с наличието на уникална структура – кариосферата. Както ламин В, така и ламин А/С се преместват от ядрената обвивка към кариосферата на етап GVBD, като ламин В навлиза и в самата кариосфера. Обобщените данни от изследването на няколко цитоскелетни и ядрени белтъка водят до предположението, че кариосферата е важен структурно-организационен център за предстоящите мейотични събития в края на етап GV и в GVBD. През MI и MII ламин В колокализира с вретеното, а ламин А/С се разполага в дифузен слой около него и в обема на овоплазмата.

5. Нуклеопорин NUP 160 на етап GVBD се придвижва към кариосферата заедно с ламин A/C, а през MI и MII колокализира с вретеното както в делящите се соматични клетки, но за разлика от тях се съсредоточава в полюсите на вретеното във вид на пръстени и запазва това си разположение до края на метафаза II, което вероятно е свързано със специфични особености на регулацията на делителното вретено при мейозата.

6. Чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия върху израстъците на кумулусните клетки на стадий GV беше установено, че те са богати на цитоскелетни компоненти и остават свързани с овоцита дори след откъсване на кумулусните клетки. Следователно връзките между израстъците и овоцита са механично по-устойчиви от връзките между цитоскелетните компоненти в самата цитоплазма на кумулусната клетка, което показва важното значение на овоцит-кумулусните взаимодействия за диференцирането на овоцита. В крайното разширение на израстъка цитоскелетните белтъци се разполагат в периферията, което позволява осигуряване на механична устойчивост без възпрепятстване на преноса на вещества от кумулусните клетки към овоцита.

ПРИНОСИ

Настоящият дисертационен труд има следните приноси:

1. За първи път е изследвано системно поведението на цитокератини и виментин в миши овоцити както и във връзките им с кумулусните клетки. В литературата съществуват някои стари данни по този въпрос за други бозайници, но те са изключително противоречиви и неясни, което вероятно е следствие на използваните стари методи за анализ.
2. За първи път са изследвани промените в ядрената и кортикалната зона на овоцитите след екстракция за NM-IF.
3. За първи път ламините от типове В и А/С са локализирани в овоцити между стадии GV и метафаза II.
4. За първи път е проследена динамиката на нуклеопорин Nup160 в различните стадии на овоцитното зреене.

Приносите са научно-теоретични, като принос № 2 има и методичен аспект.

8. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Ватев И, Живков С. Апарат и система за „ин витро” оплождане на човешки яйцеклетки и тяхното биологично тестване чрез култивиране на миши ембриони. *Акушерство и гинекология* 1986; 4:20-5.
2. Делимитрева С. Мейотично зреене на овоцитите – взаимодействие на хроматина и цитоскелетните елементи. *Акушерство и гинекология* 2010; 5:51-8.
3. Димитрова ДК, Маринова ЦЦ. CD-подобни молекули, общи за човешки сперматозоиди (от фертилни донори и инфертилни пациенти) и Т-лимфоцити. *Андрология* 2000; 9(4):31-5.
4. Маринова Цв, Маркова М, Станиславов Р. Разпределение на виментин в абнормални човешки сперматозоиди и свободни незрели герминативни клетки. *Андрология* 1996; 4(4):18-20.
5. Овчаров В, Такева Цв. *Цитология, обща хистология, обща ембриология*. 6-то изд. София: Арсо; 2009.
6. Панков РГ, Марков ГГ. Цитоскелет – междинни филаменти. *Успехи на молекулярната биология* 1988; 6:32-66.
7. Aebi U, Cohn J, Buhle L, Gerace L. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 1986; 323(6088):560-4.
8. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Chapter 16: The cytoskeleton. In: *Molecular biology of the cell*. 5th edition. New York: Garland Science; 2008.
9. Al-Chalabi A., Miller CC. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays* 2003; 25(4):346-55.
10. Al-Haboubi T, Shumaker DK, Köser J, Wehnert M, Fahrenkrog B. Distinct association of the nuclear pore protein Nup153 with A- and B-type lamins. *Nucleus* 2011; 2(5):500-9.
11. Alvarez GM., Dalvit GC, Achi MV, Miguez MS, Cetica PD. Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus-oocyte complexes subpopulations. *Biocell* 2009; 33(3):167-77.

12. Anderson E, Lee GY. The polycystic ovarian (PCO) condition: apoptosis and epithelialization of the ovarian antral follicles are aspects of cystogenesis in the dehydroepiandrosterone (DHEA)-treated rat model. *Tissue Cell* 1997; 29(2):171-89.
13. Aumüller G, Schulze C, Viebahn C. Intermediate filaments in Sertoli cells. *Micr Res Tech.* 1992; 20(1):50-72.
14. Azoury J, Lee KW, Georget V, Rassinier P, Leader B, Verlhac MH. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Curr Biol.* 2008; 18(19):1514-9.
15. Azoury J, Verlhac MH, Dumont J. Actin filaments: key players in the control of asymmetric divisions in mouse oocytes. *Biol Cell* 2009; 101(2):69-76.
16. Batsios P, Peter T, Baumann O, Stick R, Meyer I, Gräf R. A lamin in lower eukaryotes? *Nucleus* 2012; 3(3):237-43.
17. Bertrand AT, Chikhaoui K, Yaou RB, Bonne G. Clinical and genetic heterogeneity in laminopathies. *Biochem. Soc Trans.* 2011; 39(6):1687-92.
18. Bonnet-Garnier A, Feuerstein P, Chebrou M, Fleurot R, Jan HU, Debey P, Beaujean N. Genome organization and epigenetic marks in mouse germinal vesicle oocytes. *Int J Dev Biol.* 2012; 56(10-12):877-87.
19. Briz MD, Bonet S, Pinart B, Egozcue J, Camps R. Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *J Androl.* 1995; 16(2):175-88.
20. Brunet S, Verlhac MH. Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division. *Hum Reprod Update* 2011; 17(1):68-75.
21. Camozzi D, Capanni C, Cenni V, Mattioli E, Columbaro M, Squarzone S, Lattanzi G. Diverse lamin-dependent mechanisms interact to control chromatin dynamics: Focus on laminopathies. *Nucleus* 2014; 5(5):427-40.
22. Can A, Semiz O, Cinar O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9(12):749-56.
23. Chamcheu JC, Siddiqui IA, Syed DN, Adhami VM, Liovic M, Mukhtar H. Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages. *Arch Biochem Biophys.* 2011; 508(2):123-37.
24. Chang L, Goldman RD. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5(8):601-13.

25. Chatel G, Fahrenkrog B. Nucleoporins: leaving the nuclear pore complex for a successful mitosis. *Cell Signal*. 2011; 23(10):1555-62.
26. *Chipev CC, Yang JM, DiGiovanna JJ, Steinert PM, Marekov L, Compton JG, Bale SJ. Preferential sites in keratin 10 that are mutated in epidermolytic hyperkeratosis. *Am J Hum Genet*. 1994; 54(2):179-90.
27. Choi T, Rulong S, Resau J, Fukasawa K, Matten W, Kuriyama R, Mansour S, Ahn N, Vande Woude GF. Mos/mitogen-activated protein kinase can induce early meiotic phenotypes in the absence of maturation-promoting factor: a novel system for analyzing spindle formation during meiosis I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(10):4730-5.
28. Ciska M, Moreno Díaz de la Espina S. The intriguing plant nuclear lamina. *Front Plant Sci*. 2014; 5:166. doi: 10.3389/fpls.2014.00166.
29. Civelekoglu-Scholey G, Tao L, Brust-Mascher I, Wollman R, Scholey JM. Prometaphase spindle maintenance by an antagonistic motor-dependent force balance made robust by a disassembling lamin-B envelope. *J Cell Biol*. 2010; 188(1):49-68.
30. Clarke EJ, Allan VJ. Cytokeratin intermediate filament organisation and dynamics in the vegetal cortex of living *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003; 56(1):13-26.
31. Colucci-Guyon E, Portier M-M, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell* 1994; 79(4):679-94.
32. Colucci-Guyon E, Gimenez Y, Ribotta M, Maurice T, Babinet C, Privat A. Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin. *Glia* 1999; 25(1):33-43.
33. Correia K, Chu D, Chou Y-H, Goldman RD, Matsudaira P. Integrating the actin and vimentin cytoskeletons: adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J Cell Biol*. 1999; 146(4): 831-42.
34. Czernobilsky B, Moll R, Levy R, Franke WW. Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. *Eur J Cell Biol*. 1985; 37:175-90.
35. De La Fuente R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev. Biol*. 2006; 292(1):1-12.

36. De La Fuente R, Viveiros MM, Burns KH, Adashi EY, Matzuk MM, Eppig JJ. Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev Biol.* 2004; 275(2):447-58.
37. Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, Goldman RD. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* 2008; 22(7):832-53.
38. Dechat T, Adam SA, Taimen P, Shimi T, Goldman RD. Nuclear lamins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(11):a000547. doi: 10.1101/cshperspect.a000547.
39. *Delimitreva S, Zhivkova R, Isachenko E, Umland N, Nayudu PL. Meiotic abnormalities in in vitro-matured marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) oocytes: development of a non-human primate model to investigate causal factors. *Hum Reprod.* 2006; 21(1):240-7.
40. *Delimitreva SM, Zhivkova RS, Vatev IT, Toncheva DI. Chromosomal disorders, nuclear and cell destruction in cleaving human embryos. *Int J Dev Biol.* 2005; 49(4):409-16.
41. *Dimitrova DK, Marinova TsTs. CD-8 like molecules on human spermatozoa. *Folia Biologica (Praha)* 2001; 47(5):176-9.
42. Dittmer TA, Misteli T. The lamin protein family. *Genome Biol.* 2011; 12(5):222.
43. Dumont J, Desai A. Acentrosomal spindle assembly and chromosome segregation during oocyte meiosis. *Trends Cell Biol.* 2012; 22(5):241-9.
44. Dupin I, Sakamoto Y, Etienne-Manneville S. Cytoplasmic intermediate filaments mediate actin-driven positioning of the nucleus. *J Cell Sci.* 2011; 124(Pt 6):865-72.
45. Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Landa F, Aumailley M, Delouvee A, Koteliansky V, Babinet C, Krieg T. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci.* 1998; 111(Pt 13):1897-907.
46. Erber A, Riemer D, Hofemeister H, Bovenschulte M, Stick R, Panopoulou G, Lehrach H, Weber K. Characterization of the *Hydra* lamin and its gene: a molecular phylogeny of metazoan lamins. *J Mol Evol.* 1999; 49(2):260-71.

47. Erber A, Riemer D, Bovenschulte M, Weber K. Molecular phylogeny of metazoan intermediate filament proteins. *J Mol Evol.* 1998; 47(6):751-62.
48. *Evangelatov A, Skrobanska R, Kyumurkov A, Pankov R. Three-dimensional environment stimulates RhoA Activation in fibroblast cells. *CR Acad Bulg Sci.* 2011; 64(4):553-8.
49. Fey EG, Wan KM, Penman S. Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three-dimensional organization and protein composition. *J Cell Biol.* 1984a; 98(6):1973-84.
50. Fey EG, Capco DG, Krochmalnic G, Penman S. Epithelial structure revealed by chemical dissection and unembedded electron microscopy. *J Cell Biol.* 1984b; 99(1 Pt 2): 203s-8s.
51. Foster HA, Stokes P, Forsey K, Leese HJ, Bridger JM. Lamins A and C are present in the nuclei of early porcine embryos, with lamin A being distributed in large intranuclear foci. *Chromosome Res.* 2007; 15(2):163-74.
52. Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 1998; 279(5350):514-9.
53. Fuchs E, Yang Y. Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell* 1999; 98(5): 547-50.
54. Gall L, De Smedt V, Ruffini S. Co-expression of cytokeratins and vimentin in sheep cumulus-oocyte complexes. Alteration of intermediate filament distribution by acrylamide. *Devel Growth Differ.* 1992; 34(5):579-87.
55. Gallicano GI, Larabell CA, McGaughey RW, Capco DC. Novel cytoskeletal elements in mammalian eggs are composed of a unique arrangement of intermediate filaments. *Mech Devel.* 1994; 45(3):211-26.
56. Gallicano GI, Kouklis P, Bauer C, Yin M, Vasioukhin V, Degenstein L, Fuchs E. Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *J Cell Biol.* 1998; 143(7):2009-22.
57. Gard DL, Cha BJ, King E. The organization and animal-vegetal asymmetry of cytokeratin filaments in stage VI *Xenopus* oocytes is dependent upon F-actin and microtubules. *Dev Biol.* 1997; 184(1):95-114.
58. Geisler N, Schünemann J, Weber K, M. Häner M, Aebi U. Assembly and architecture of invertebrate cytoplasmic intermediate filaments reconcile features

- of vertebrate cytoplasmic and nuclear lamin-type intermediate filaments. *J Mol Biol.* 1998; 282(3):607-17.
59. Gerace L, Huber MD. Nuclear lamina at the crossroads of the cytoplasm and nucleus. *J Struct Biol.* 2012; 177(1):24-31.
 60. Goldfarb LG, Vicart P, Goebel HH, Dalakas MC. Desmin myopathy. *Brain* 2004; 127(Pt 4):723-34.
 61. Gruenbaum Y, Aebi U. Intermediate filaments: a dynamic network that controls cell mechanics. *F1000Prime Rep.* 2014; 6: 54. doi: 10.12703/P6-54.
 62. Guo M, Ehrlicher AJ, Mahammad S, Fabich H, Jensen MH, Moore JR, Fredberg JJ, Goldman RD, Weitz DA. The role of vimentin intermediate filaments in cortical and cytoplasmic mechanics. *Biophys J.* 2013; 105(7):1562-8.
 63. Gurland G, Gundersen GG. Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. *J Cell Biol.* 1995; 131(5):1275-90.
 64. Güttinger S, Laurell E, Kutay U. Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10(3):178-91.
 65. Hall VJ, Cooney MA, Shanahan P, Tecirlioglu RT, Ruddock NT, French AJ. Nuclear lamin antigen and messenger RNA expression in bovine in vitro produced and nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev.* 2005; 72(4):471-82.
 66. Henrion D, Terzi F, Matrougui K, Duriez M, Boulanger CM, Colucci-Guyon E, Babinet C, Briand P, Friedlander G, Poitevin P, Levy BI. Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest.* 1997; 100(11):2909-14.
 67. Herrmann H, Häner M, Brettel M, Ku N-O, Aebi U. Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins. *J Mol Biol.* 1999; 286(5):1403-20.
 68. Herrmann H, Aebi U. Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 1998; 8(2):177-85.
 69. Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 2000; 12(1):79-90.
 70. Hitt AL, Luna EJ. Membrane interactions with the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 1994; 6(1):120-30.

71. Houseweart MK, Cleveland DW. Intermediate filaments and their associated proteins: multiple dynamic personalities. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10(1):93-101.
72. Hyman AA, Karsenti E. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell* 1996; 84(3):401-10.
73. Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil.* 1986; 78(2):615-25.
74. Imamoto N, Funakoshi T. Nuclear pore dynamics during the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol.* 2012; 24(4):453-9.
75. Inagaki M, Matsuoka Y, Tsujimira K, Ando S, Tokui T, Takahashi T, Inagaki N. Dynamic property of intermediate filaments: regulation by phosphorylation. *Bioessays* 1996; 18(6):481-7.
76. Inoue A, Aoki F. Role of the nucleoplasmin 2 C-terminal domain in the formation of nucleolus-like bodies in mouse oocytes. *FASEB J.* 2010; 24(2):485-94.
77. *Jang S-I, Steinert PM, Markova NG. Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J Biol Chem.* 1996; 271(39):24105-14.
78. Johnson AB, Brenner M. Alexander's disease: clinical, pathologic, and genetic features. *J Child Neurol.* 2003; 18(9):625-32.
79. Kabashima K, Matsuzaki M, Suzuki H. Intermediate filament keratin dynamics during oocyte maturation requires maturation/M-phase promoting factor and mitogen-activated protein kinase activities in the hamster. *Reprod Domest Anim.* 2010; 45(5):e184-8.
80. Kadam KM, D'Souza SJ, Bandivdekar AH, Natraj U. Identification and characterization of oviductal glycoprotein-binding protein partner on gametes: epitopic similarity to non-muscle myosin IIA, MYH 9. *Mol Hum Reprod.* 2006; 12(4):275-82.
81. Kelly RD, Alberio R, Campbell KH. A-type lamin dynamics in bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Reprod Fertil Dev.* 2010; 22(6):956-65.
82. Ketema M, Sonnenberg A. Nesprin-3: a versatile connector between the nucleus and the cytoskeleton. *Biochem Soc Trans.* 2011; 39(6):1719-24.

83. Kim Y, Sharov AA, McDole K, Cheng M, Hao H, Fan CM, Gaiano N, Ko MS, Zheng Y. Mouse B-type lamins are required for proper organogenesis but not by embryonic stem cells. *Science* 2011; 334(6063):1706-10.
84. Kloc M, Wilk K, Vargas D, Shirato Y, Bilinski S, Etkin LD. Potential structural role of non-coding and coding RNAs in the organization of the cytoskeleton at the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development* 2005; 132(15):3445-57.
85. Kreitzer G, Liao G, Gundersen GG. Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules *in vivo via* a kinesin-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 1999; 10(4):1105-18.
86. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-5.
87. Lammerding J, Schulze PC, Takahashi T, Kozlov S, Sullivan T, Kamm RD, Stewart CL, Lee RT. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest.* 2004; 113(3):370-8.
88. Lénárt P, Bacher CP, Daigle N, Hand AR, Eils R, Terasaki M, Ellenberg J. A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature* 2005; 436(7052):812-8.
89. Lénárt P, Rabut G, Daigle N, Hand AR, Terasaki M, Ellenberg J. Nuclear envelope breakdown in starfish oocytes proceeds by partial NPC disassembly followed by a rapidly spreading fenestration of nuclear membranes. *J Cell Biol.* 2003; 160(7):1055-68.
90. Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 1996; 17(4):607-15.
91. Loïdice I, Alves A, Rabut G, Van Overbeek M, Ellenberg J, Sibarita JB, Doye V. The entire Nup107-160 complex, including three new members, is targeted as one entity to kinetochores in mitosis. *Mol Biol Cell* 2004; 15(7):3333-44.
92. Luciano AM, Franciosi F, Dieci C, Lodde V. Changes in large-scale chromatin structure and function during oogenesis: a journey in company with follicular cells. *Anim Reprod Sci.* 2014; 149(1-2):3-10.
93. Lussi YC, Hügi I, Laurell E, Kutay U, Fahrenkrog B. The nucleoporin Nup88 is interacting with nuclear lamin A. *Mol Biol Cell* 2011; 22(7):1080-90.

94. Ma JY, Li M, Luo YB, Song S, Tian D, Yang J, Zhang B, Hou Y, Schatten H, Liu Z, Q.Y. Sun QY. Maternal factors required for oocyte developmental competence in mice: transcriptome analysis of non-surrounded nucleolus (NSN) and surrounded nucleolus (SN) oocytes. *Cell Cycle* 2013; 12(12):1928-38.
95. Ma L, Tsai MY, Wang S, Lu B, Chen R, Iii JR, Zhu X, Zheng Y. Requirement for Nudel and dynein for assembly of the lamin B spindle matrix. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(3):247-56.
96. Maison C, Pyrpasopoulou A, Georgatos SD. Vimentin-associated mitotic vesicles interact with chromosomes in a lamin B- and phosphorylation-dependent manner. *EMBO J.* 1995; 14(14):3311-24.
97. Maison C, Horstmann H, Georgatos SD. Regulated docking of nuclear membrane vesicles to vimentin filaments during mitosis. *J Cell Biol.* 1993; 123(6 Pt 1):1491-505.
98. Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol Reprod.* 2005; 72(1):2-13.
99. *Marinova Tz, Kosev K, Takacs L. Morphological heterogeneity of reptilian thymic epithelial cells, *Verh Anat Ges.* 1989; 82(Suppl. 164): 731-2.
100. Maro B, Johnson MH, Pickering SJ, Flach G. Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J Embryol Exp Morphol.* 1984; 81:211-37.
101. Maurizii MG, Saverino O, Taddei C. Cytokeratin cytoskeleton in the differentiating ovarian follicle of the lizard *Podarcis sicula* Raf. *Mol Reprod Dev.* 1997; 48(4):536-42.
102. McLean WHI, Rugg EL, Lunny DP, Morley SM, Lane EB, Swensson O, Dopping-Hepenstal PJC, Griffiths WAD, Eady RAJ, Higgins C, Navsaria HA, Leigh IM, Strachan T, Kunkeler L, Munro CS. Keratin 16 and keratin 17 mutations cause pachyonychia congenita. *Nat Genet.* 1995; 9(3): 273-8.
103. Mendez MG, Restle D, Janmey PA. Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress. *Biophys J.* 2014; 107(2): 314-23.
104. Méndez-López I, Worman HJ. Inner nuclear membrane proteins: impact on human disease. *Chromosoma* 2012; 121(2):153-67.
105. Mishra RK, Chakraborty P, Arnaoutov A, Fontoura BM, Dasso M. The Nup107-160 complex and gamma-TuRC regulate microtubule polymerization at kinetochores. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(2):164-9.

106. Mittelbronn M, Sullivan T, Stewart CL, Bornemann A. Myonuclear degeneration in LMNA null mice. *Brain Pathol.* 2008; 18(3):338-43.
107. Moll R. Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. In: Herrmann H., Harris JR, editors. *Subcellular Biochemistry*. Vol. 31. Intermediate filaments. New York: Plenum Press; 1998. p. 205-262.
108. Mottier-Pavie V, Cenci G, Verni F, Gatti M, Bonaccorsi S. Phenotypic analysis of *misato* function reveals roles of noncentrosomal microtubules in *Drosophila* spindle formation. *J Cell Sci.* 2011; 124(Pt 5):706-17.
109. Müller M., Bhattacharya SS, Moore T, Prescott Q, Wedig T, Herrmann H, Magin TM. Dominant cataract formation in association with a vimentin assembly disrupting mutation. *Hum Mol Genet.* 2009; 18(6):1052-7.
110. Nakano H, Wang W, Hashizume C, Funasaka T, Sato H, Wong RW. Unexpected role of nucleoporins in coordination of cell cycle progression. *Cell Cycle* 2011; 10(3):425-33.
111. Nigg EA, Čajánek L, Arquint C. The centrosome duplication cycle in health and disease. *FEBS Lett.* 2014; 588(15):2366-72.
112. Nyboe Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, Ferraretti AP, Kupka MS, de Mouzon J, Nygren KG; European IVF-monitoring (EIM) Consortium, for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod.* 2009; 24(6):1267-87.
113. Oakley BR. Gamma-tubulin: the microtubule organizer? *Trends Cell Biol.* 1992; 2(1):1-5.
114. Odgren PR, Harvie LW, Fey EG. Phylogenetic occurrence of coiled coil proteins: implications for tissue structure in Metazoa via a coiled coil tissue matrix. *Prot Struct Funct Genet.* 1996; 24(4):467-84.
115. 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; 56(5):495-501.
116. Olins AL, Rhodes G, Welch DB, Zwerger M, Olins DE. Lamin B receptor: multi-tasking at the nuclear envelope. *Nucleus* 2010; 1(1):53-70.

117. Orjalo AV, Arnaoutov A, Shen Z, Boyarchuk Y, Zeitlin SG, Fontoura B, Briggs S, Dasso M, Forbes DJ. The Nup107-160 nucleoporin complex is required for correct bipolar spindle assembly. *Mol Biol Cell* 2006; 17(9):3806-18.
118. Ou Y, Rattner JB. The centrosome in higher organisms: structure, composition, and duplication. *Int Rev Cytol.* 2004; 238:119-82.
119. Padiath QS, Saigoh K, Schiffmann R, Asahara H, Yamada T, Koepfen A, Hogan K, Ptáček LJ, Fu YH. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nat Genet.* 2006; 38(10):1114-23.
120. Pagan R, Martín I, Alonso A, Llobera M, Vilaró S. Vimentin filaments follow the preexisting cytokeratin network during epithelial-mesenchymal transition of cultured neonatal rat hepatocytes. *Exp Cell Res.* 1996; 222(2):333-44.
121. Parikh N, Nagarajan P, Sei-ichi M, Sinha S, Garrett-Sinha LA (2008). Isolation and characterization of an immortalized oral keratinocyte cell line of mouse origin. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(11):1091-100.
122. Payne C, Rawe V, Ramalho-Santos J, Simerly C, Schatten G. Preferentially localized dynein and perinuclear dynactin associate with nuclear pore complex proteins to mediate genomic union during mammalian fertilization. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 23):4727-38.
123. Pekny M, Leveén P, Pekna M, Eliasson C, Berthold C-H, Westermarck B, Betsholtz C. Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *EMBO J.* 1995; 14(8):1590-8.
124. Peter A, Stick R. Evolution of the lamin protein family: what introns can tell. *Nucleus* 2012; 3(1):44-59.
125. Peterson GL. Determination of total protein. *Methods in Enzymology*, Vol. 91. Academic Press, Inc.; 1983. p. 95-119.
126. Plancha CE, Carmo-Fonseca M, David-Ferreira JF. Cytokeratin filaments are present in golden hamster oocytes and early embryos. *Differentiation* 1989; 42(1):1-9.
127. Plancha CE. Cytokeratin dynamics during oocyte maturation in the hamster requires reaching of metaphase I. *Differentiation* 1996; 60(2): 87-98.

128. Prather RS, Sims MM, Maul GG, First NL, Schatten G. Nuclear lamin antigens are developmentally regulated during porcine and bovine embryogenesis. *Biol Reprod.* 1989; 41(1):123-32.
129. Prentice-Biensch JR, Singh J, Alfoteisy B, Anzar M. A simple and high-throughput method to assess maturation status of bovine oocytes: comparison of anti-lamin A/C-DAPI with an aceto-orcein staining technique. *Theriogenology* 2012; 78(7):1633-38.
130. Prokocimer M, Davidovich M, Nissim-Rafinia M, Wiesel-Motiuk N, Bar DZ, Barkan R, Meshorer E, Gruenbaum Y. Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities. *Cell Mol Med.* 2009; 13(6):1059-85.
131. Rieder CL. Kinetochore fiber formation in animal somatic cells: dueling mechanisms come to a draw. *Chromosoma* 2005; 114(5):310-8.
132. Rogel MR, Soni PN, Troken JR, Sitikov A, Trejo HE, Ridge KM. *FASEB J.* 2011; 25(11):3873-83.
133. Rusan NM, Fagerstrom CJ, Yvon AM, Wadsworth P. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol Biol Cell* 2001; 12(4):971-80.
134. Santini D, Ceccarelli C, Mazzoleni G, Pasquinelli G, Jasonni VM, Martinelli GN. Demonstration of cytokeratin intermediate filaments in oocytes of the developing and adult human ovary. *Histochemistry* 1993; 99(4):311-9.
135. Sasse J, Gallagher SR. Staining proteins in gells. *Curr Protoc Mol Biol.* 2003; 10:10.6.1-10.6.27.
136. Schatten G, Maul GG, Schatten H, Chaly N, Simerly C, Balczon R, Brown DL. Nuclear lamins and peripheral nuclear antigens during fertilization and embryogenesis in mice and sea urchins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(14):4727-31.
137. Shi C, Channels WE, Zheng Y, Iglesias PA. A computational model for the formation of lamin-B mitotic spindle envelope and matrix. *Interface Focus.* 2014; 4(3):20130063. doi: 10.1098/rsfs.2013.0063.
138. Simon DN, Wilson KL. The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12(11): 695-708.

139. Singh S, Gupta PD. Intermediate filaments - Heterogenous expression pattern and modulation: Can their role in structure and function of the cell be ascertained? *Biol Cell* 1994; 82(1):1-10.
140. Stewart CL, Kozlov S, Fong LG, Young SG. Mouse models of the laminopathies. *Exp Cell Res*. 2007; 313(10):2144-56.
141. Stick R, Angres B, Lehner CF, Nigg FA. The fates of chicken nuclear lamin proteins during mitosis: evidence for a reversible redistribution of lamin B2 between inner nuclear membrane and elements of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 1988; 107(2):397-406.
142. Strelkov SV, Herrmann H, Aebi U. Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 2003; 25(3):243-51.
143. Strnad P, Paschke S, Jang KH, Ku NO. Keratins: markers and modulators of liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012; 28(3):209-16.
144. Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, Stewart CL, Burke B. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol*. 1999; 147(5):913-9.
145. Sutovsky P, Flechon JE, Pavlok A. Microfilaments, microtubules and intermediate filaments fulfil differential roles during gonadotropin-induced expansion of bovine cumulus oophorus. *Reprod Nutr Dev*. 1994; 34(5):415-25.
146. Suzuki H, Jeong BS, Yang X. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod*. 2000; 63(3):723-9.
147. Svitkina TM, Verkhovskiy AB, Borisy GB. Plectin sidearms mediate interactions of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *Biol Bull*. 1998; 194(3):409-10.
148. Tan JH, Wang HL, Sun XS, Liu Y, Sui HS, Zhang J. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15(1):1-9.
149. Terzi F, Henrion D, Colucci-Guyon E, Federici P, Babinet C, Levy BI, Briand P, Friedlander G. Reduction of renal mass is lethal in mice lacking vimentin. Role of endothelin-nitric oxide imbalance. *J Clin Invest*. 1997; 100(6):1520-8.

150. Thornell L-E, Carlsson L, Li Z, Mericskay M, Paulin D. Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29(8):2107-24.
151. Tkachenko O. *In vitro* oocyte maturation and embryo production in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften. Freie Universität Berlin. 2012.
152. Toda M, Miura M, Asou H, Sugiyama I, Kawase T, Uyemura K. Suppression of glial tumor growth by expression of glial fibrillary acidic protein. *Neurochem Res.* 1999; 24(2):339-43.
153. Tolstonog GV, Sabasch M, Traub P. Cytoplasmic intermediate filaments are stably associated with nuclear matrices and potentially modulate their DNA-binding function. *DNA Cell Biol.* 2002; 21(3):213-39.
154. Torpey N, Wylie CC, Heasman J. Function of maternal cyokeratin in *Xenopus* development. *Nature* 1992; 357(6377):413-5.
155. Traub P. Intermediate filaments and gene regulation. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1995; 27(4):377-400.
156. Tsai MY, Wang S, Heidinger JM, Shumaker DK, Adam SA, Goldman RD, Zheng Y. A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly. *Science* 2006; 311(5769):1887-93.
157. Tseng LC, Chen RH. Temporal control of nuclear envelope assembly by phosphorylation of lamin B receptor. *Mol Biol Cell* 2011; 22(18):3306-17.
158. Valentine MT, Perlman ZE, Mitchison TJ, Weitz DA. Mechanical properties of *Xenopus* egg cytoplasmic extracts. *Biophys J* 2005; 88(1):680-9.
159. *Valkov I, Marinova T, Davidoff M, Takács L. Structural and histochemical features of cortical thymic epithelial cells in mice with chemically-induced lymphoid leukemia. *Thymus* 1988; 12(1):39-50.
160. Valojerdi MR, Salehnia M. Developmental potential and ultrastructural injuries of metaphase II (MII) mouse oocytes after slow freezing or vitrification. *J Assist Reprod Genet.* 2005; 22(3):119-27.
161. Van der Ven PF, Jap PH, Barth PG, Sengers RC, Ramaekers FC, Stadhouders AM. Abnormal expression of intermediate filament proteins in X-linked myotubular myopathy is not reproduced in vitro. *Neuromusc Disord.* 1995; 5(4):267-75.

162. *Vatev I, Zhivkov S. Fertilization *in vitro* of eggs from Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). Compt Rend Bulg Acad Sci. 1980; 33:289-91.
163. Vergnes L, Péterfy M, Bergo MO, Young SG, Reue K. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(28):10428-33.
164. Verlhac MH, Lefebvre C, Guillaud P, Rassinier P, Maro B. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. Curr Biol. 2000; 10(20):1303-6.
165. Verstraeten VL, Broers JL, Ramaekers FC, van Steensel MA. The nuclear envelope, a key structure in cellular integrity and gene expression. Curr Med Chem. 2007; 14(11):1231-48.
166. von Moeller F, Barendziak T, Apte K, Goldberg MW, Stick R. Molecular characterization of *Xenopus* lamin LIV reveals differences in the lamin composition of sperms in amphibians and mammals. Nucleus 2010; 1(1):85-95.
167. Weber KL, Bement WM. F-actin serves as a template for cytokeratin organization in cell free extracts. J Cell Sci. 2002; 115(Pt 7):1373-82.
168. Wei X, Xiangwei F, Guangbin Z, Jing X, Liang W, Ming D, Dianshuai Y, Mingxing Y, Jianhui T, Shien Z. Cytokeratin distribution and expression during the maturation of mouse germinal vesicle oocytes after vitrification. Cryobiology 2013; 66(3):261-6.
169. Wendl J, Ebach K, Rodler D, Kenngott RA. Immunocytochemical localization of cytoplasmic and nuclear intermediate filaments in the bovine ovary during folliculogenesis. Anat Histol Embryol. 2012; 41(3): 190-201.
170. Wickramasinghe D, Ebert KM, Albertini DF. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. Dev Biol. 1991; 143(1):162-72.
171. Windoffer R, Leube RE. Detection of cytokeratin dynamics by time-lapse fluorescence microscopy in living cells. J Cell Sci. 1999; 112(Pt 24):4521-34.
172. Wu AL, Wang J, Zheleznyak A, Brown EJ. Ubiquitin-related proteins regulate interaction of vimentin intermediate filaments with the plasma membrane. Mol Cell 1999; 4(4):619-25.
173. Zhang B, Chen Y, Han Z, Ris H, Zhai Z. The role of keratin filaments during nuclear envelope reassembly in *Xenopus* egg extracts. FEBS Lett. 1998; 428(1-2):52-6.

174. *Zhivkova RS, Delimitreva SM, Toncheva DI, Vatev IT. Analysis of human unfertilized oocytes and pronuclear zygotes – correlation between chromosome/chromatin status and patient-related factors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007; 130(1):73-83.
175. *Zhivkova RS. Ploidity and chromatin status of human oocytes after failed in vitro fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 109(2):185-9.
176. Zhu Q, Couillard-Despres S, Julien JP. Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Exp Neurol.* 1997; 148(1):299-316.
177. Zhu ZY, Chen DY, Li JS, Lian L, Lei L, Han ZM, Sun QY. Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biol Reprod.* 2003; 68(3):943-6.

Със знак * в списъка на латиница са отбелязани публикациите на български автори.