

ÇİFT KABUKLU YUMUŞAKÇALARIN OOSİTLERİNDE CAJAL CİSİM BENZERİ YAPILARIN MEVCUDİYETİNE DAİR İLK BULGU

FIRST EVIDENCE OF THE OCCURRENCE OF THE CAJAL BODY-LIKE STRUCTURES IN BIVALVE OOCYTES

Nadim YILMAZER

Doç. Dr., Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Tekirdağ/TÜRKİYE, ORCID: 0000-0002-9935-9608

ÖZET

1903 yılında Santiago Ramón y Cajal tarafından keşfedilen Cajal cisimleri en çok araştırılmış nükleer cisimlerdir. Bugüne kadar böcek, balık, kurbağa, kuş, memeli, bitki ve maya gibi birçok ökaryotik canlıdan bildirilmiştir. Bu çalışmada elektron mikroskobu ile *Donax trunculus*'un gelişmekte olan oositlerinin germinal vesikülünde, bugüne kadar araştırılan çift kabukluların hiç birinin oositinde görülmemiş ve bildirilmemiş olan Cajal cisim benzeri yapılar görülmüştür. Sayıları ve büyüklükleri farklı türlerde ve hücre tiplerinde değişik olan Cajal cisimleri somatik hücrelerde 0.1-1 µm çapında ve 2-10 tane iken, oosit Cajal cisimleri her çekirdekte 50-100 tane kadar olup, çapları 1 ile 30 µm arasında olabilmektedir. Bu çalışma ile *Donax trunculus* oositindeki Cajal cisim benzeri yapıların sayısı 6-12 ve büyüklükleri 0.8-1.2 µm olarak bulunmuştur. Bu bakımdan *Donax trunculus*'un Cajal cisim benzeri yapıları somatik hücrelerdeki Cajal cisimlere benzemektedir. *Donax trunculus* Cajal cisimlerinin yapı ve fonksiyonunu araştıran hücre biyologları ve moleküler biyologlar için iyi bir model canlı olabilir.

Anahtar kelimeler: *Donax trunculus*, Cajal cisim, Oosit, Elektron mikroskobu

465

ABSTRACT

Discovered by Santiago Ramón y Cajal in 1903, Cajal bodies are the most studied nuclear bodies. To date, they have been reported from many eukaryotic organisms such as insects, fish, frogs, birds, mammals, plants and yeast. In this study, Cajal body-like structures were observed in the germinal vesicle of the developing oocytes of *Donax trunculus* by electron microscopy, which have not been seen or reported in the oocytes of any of the bivalves investigated to date. Cajal bodies, the number and size of which vary depending on cell type and species, are 0.1-1 µm in diameter and 2-10 in somatic cells, while oocyte Cajal bodies are 50-100 in each nucleus and their diameter can range between 1 and 30 µm. In this study, the number and size of Cajal body-like structures in the oocytes of *Donax trunculus* was found to be 6-12 and 0.8-1.2 µm, respectively. In this respect, Cajal body-like structures of *Donax trunculus* resemble Cajal bodies in somatic cells. *Donax trunculus* may be a good model organism for cell biologists and molecular biologists who study the structure and function of Cajal bodies.

Key words: *Donax trunculus*, Cajal body, Oocyte, Electron microscopy

1. GİRİŞ

Hücre çekirdeği, genel olarak çekirdek cisimleri (nükleer cisimler) olarak adlandırılan pek çok altorganeller içerir. Bu altorganeller içinde en çok araştırılmış olanı Cajal cisimleridir (Nunes ve Moretti, 2017). Cajal cisimleri ilk defa 1903 yılında İspanyol patolog, histolog ve sinirbilimci Santiago Ramon y Cajal tarafından tanımlanmıştır. Cajal, indirgenmiş gümüş nitrat yöntemi kullanarak tavşan, köpek ve insan beyin dokusunda yaptığı incelemelerde sinir hücrelerinin nükleoplazmasında yaklaşık 0.5 µm çapında küresel arjirofilik yapılar tespit etmiş ve bunlara "aksesuar cisim" adını vermiştir

(Lafarga ve ark., 2009; Lafarga ve ark., 2017). Daha sonraları yapılan elektron mikroskobu çalışmalarında bu yapıların 400-600 Å çapında sarmal ipliklerden ibaret olduğu anlaşıncıca “sarmal cisim” olarak anılmaya başlamıştır (Lafarga ve Hervas, 1983). 1999 yılında Amerikalı hücre biyoloğu Joseph G. Gall bu önemli nükleer cisimlerin Santiago Ramon y Cajal’a atfen “Cajal cisim” olarak adlandırılmasını önermiştir (Gall, 2000).

Zarsız yapılar olan Cajal cisimlerin bugüne kadar pek çok ökaryotik canlıda hem somatik hücrelerde hem de oositlerde var olduğu ortaya konmuştur (Cioce ve Lamond, 2005; Ding ve Lozano-Durán, 2020). Cajal cisimler transkripsiyon, RNA kırılması, telomerlerin korunma ve onarımı ile ribozom biyogenezi gibi olaylarda görev alan küçük nükleer RNAların (snRNA) ve küçük nükleolar RNAların (snRNA) oluştuğu ve olgunlaştığı yerlerdir. Ayrıca, hücre döngüsü, DNA tamiri, büyüme ve gelişmeyi etkiledikleri bildirilmiştir (Arias Escayola ve Neugebauer, 2018; Ding ve Lozano-Durán, 2020; Love ve ark., 2017). Bu işlevlerin yanında Cajal cisimler aralarında mesafe bulunan kromozomlar arasındaki etkileşimlere de aracılık eder (Neugebauer, 2017).

Bu makale, bir çift kabuklu yumuşakça olan *Donax trunculus*'un ovaryum histolojisinin ve oogenez sürecinin araştırıldığı tez çalışmasında (Yılmaz, 2005) gelişmekte olan oositlerde görülen Cajal cisim benzeri yapıları bilim dünyasına sunmayı amaçlamaktadır.

2. MATERYAL VE METOT

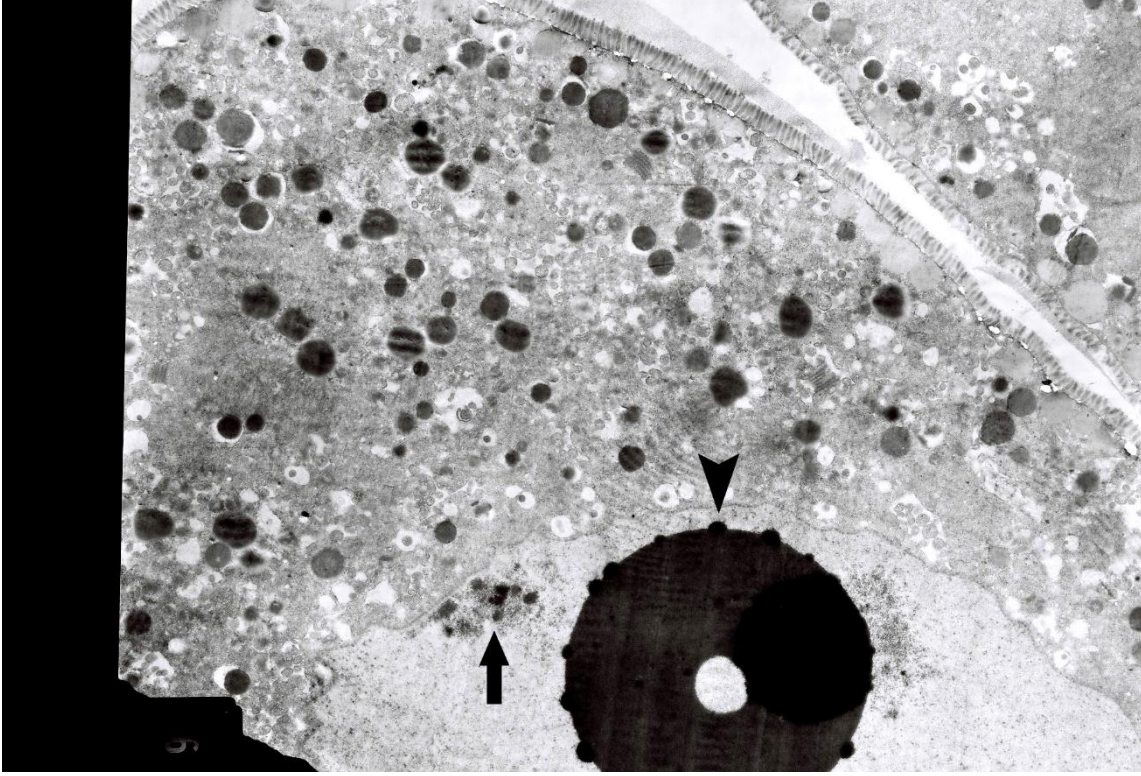
Yerel olarak kum şırlanı, deniz fasulyesi ya da tellina olarak bilinen ve ülkemizde Marmara Denizi ve batı Karadeniz sahillerinde yayılım gösteren (Çolakoğlu ve Arık Çolakoğlu, 2013) *Donax trunculus* örnekleri İstanbul'un Şile ilçesinde faaliyet gösteren bir su ürünleri işletme tesisinden temin edildi. Üreme zamanının yılın mart ve temmuz ayları arasında olduğu (Deval, 2009; Zeichen ve ark., 2002) bilindiğinden mayıs ayında toplanan örnekler kullanıldı. Dişilerin mavi renkli ovaryuma sahip olmaları nedeniyle cinsiyet tayini makroskobik olarak kolaylıkla yapıldı. Uzunluğu 30 mm civarında olan bireylerin kapama kasları kesilerek kabukları açıldı ve rastgele 10 dişi seçildi. Her birinin ovaryumu çevresindeki dokulardan bir makas ile kesilerek ayrıldı.

Elektron mikroskobu çalışmaları için 1-2 mm³ büyüklükte kesilen ovaryum parçaları 10 saat süreyle, buzdolabında (+4°C) 0.2 M sodyum kakodilat tamponunda (pH 7.2) hazırlanan %2'lik glutaraldehitte tespit edildi. Aynı tampon kullanılarak hazırlanan %1'lik osmiyum tetraoksitte bir saat süreyle postfiksasyon yapıldı. Postfiksasyonu takiben parçalar yükselen alkol serilerinden ve propilen oksitten geçirilerek Epon 812'ye gömüldü ve polimerizasyon için 60 °C'de 48 saat tutuldu (Valdez-Ramirez ve ark., 2002). Epon bloklardan Reichert OM U3 ultramikrotomunda cam bıçaklar ile yaklaşık 60-70 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Bakır gridlere alınan ince kesitler %5'lik uranil asetat (Watson, 1958) ve kurşun sitrat (Reynolds, 1963) ile boyandı ve Jeol Jem 1011 elektron mikroskobunda incelendi.

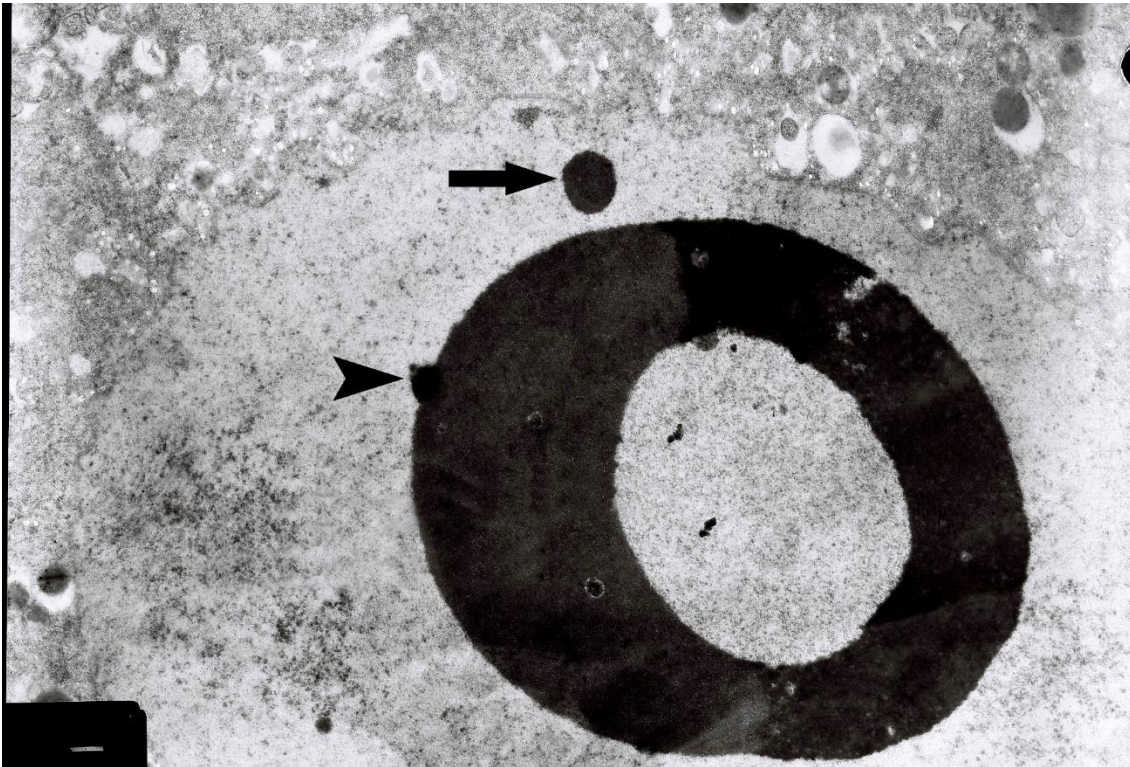
3. BULGULAR

Gelişmekte olan oositler sitoplazmanın görünüşü, germinal vesikülün varlığı, yumurta sarısı granüllerinin varlığı ve bileşimi, yumurta örtüsünün oluşumu gibi ölçütlere göre previtellogenik oositler, erken-orta-geç vitellogenik oositler ve olgun oositler olarak beş evreye ayrıldı.

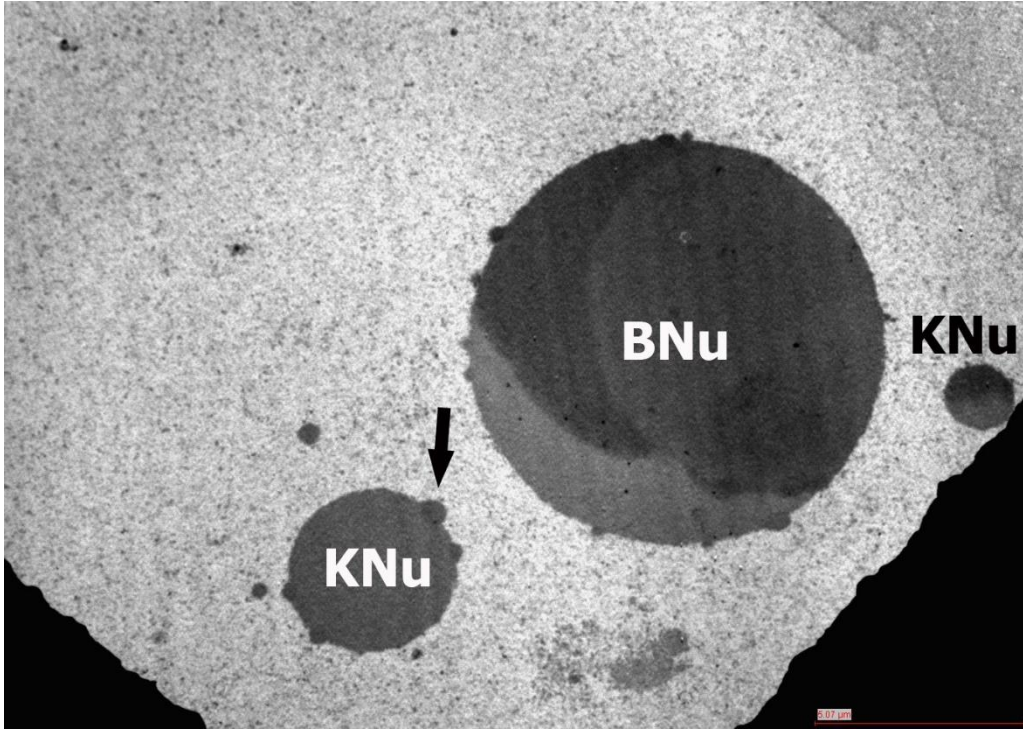
Bunlardan orta vitellogenik oositlerde çekirdekçik yüzeyinde ve nükleoplazmada çekirdekçik ile çekirdek zarı arasında sayıları oldukça fazla olan Cajal cisim benzeri yapılara rastlandı. Çekirdekçik yüzeyinde olanları çekirdekçiğe adeta tomurcuklanma görünümü vermekteydi. Sayıları 6-12 kadar olabilen ve çekirdekçikle aynı elektron yoğunluğa sahip Cajal cisim benzeri yapıların büyüklükleri 0.8 μm ile 1.2 μm arasında değişmekteydi (Şekil 1 ve 2). Çekirdekçik genelde bir tane olmakla birlikte, bazı oositlerde buna ilave olarak bir veya iki tane de küçük çekirdekçik bulunmaktaydı. Bu küçük çekirdekçiklerden bazıları da Cajal cisim benzeri yapılarla ilişkiliydi (Şekil 3).



Şekil 1. Nükleolar halka oluşturan çekirdekçiğe bitişik Cajal cisim benzeri yapılar (ok başı) ve çekirdek zarına yakın madde birikimi (ok). x5500



Şekil 2. Nükleoplazmada (ok) ve çekirdekçiğe bitişik (ok başı) bulunan değişik büyüklükteki Cajal cisim benzeri yapılar. x7250



Şekil 3. Bir büyük (BNu) ve iki küçük (KNu) çekirdekçiğe sahip orta vitellogenik oositte küçük çekirdek ile de ilişkili Cajal cisim benzeri yapılar (ok). x5000

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Santiago Ramon y Cajal'ın tavşan, köpek ve insanda yaptığı çalışmayı takiben Cajal cisimler ve/veya Cajal cisim benzeri yapılar bugüne kadar zebra balığı *Danio rerio* (Arias Escayola ve Neugebauer, 2018), *Xenopus tropicalis* ve *X. laevis* türü kurbağalar (Nizami ve Gall, 2012), güvercin *Columba livia* (Khodyuchenko ve ark., 2012), fare *Mus musculus* (Bogolyubova, 2017), sıçan *Rattus norvegicus domestica* (Pena ve ark., 2001), meyve sineği *Drosophila melanogaster* (Liu ve ark., 2006), hemipter böcekler *Notostira elongata*, *Capsodes gothicus* ve *Velia caprai* (Bogolyubov ve ark., 2007), akrep sineği *Panorpa communis* (Batalova ve ark., 2005), kızböceği *Cordulia aenea* (Halkka, 1981), arı *Vespa germanica* (Jaglarz ve ark., 2005), çekirge *Acheta domesticus* (Stepanova ve ark., 2007), un kurdu *Tenebrio molitor* (Bogolyubov ve Parfenov, 2001), tütün *Nicotiana tabacum* ve fare kulağı teresi *Arabidopsis thaliana* (Boudonck ve ark., 1999), bezelye *Pisum sativum* (Long ve ark., 2004) ve maya *Saccharomyces cerevisiae* gibi (Verheggen ve ark., 2002) birçok ökaryotik canlıdan bildirilmiştir. Çift kabuklu yumuşakçalarda ilk olarak bu çalışmada *Donax trunculus*'un gelişmekte olan oositlerinde tespit edilmiştir. Aslında çift kabuklularda oogenez elektron mikroskobu düzeyinde 15 kadar türde araştırılmıştır (Yılmaz, 2005), ancak bu çalışmaların hiçbirinde Cajal cisimlere ve/veya Cajal cisim benzeri yapılara rastlanmamıştır. Bu durum, Cajal cisimlerin hücre döngüsünün evrelerine göre sayılarının az veya çok olmasına (Boudonck ve ark., 1998) bağlı olabilir.

Coilin, Cajal cisimlerin ana iskelet proteindir (Love ve ark., 2017). Coiline karşı oluşturulan insan otoimmün antikorları ile Cajal cisimler diğer nükleer cisimlerden ayırt edilebilmektedir (Trinkle-Mulcahy ve Sleeman, 2017). Coilin özellikle memelilerde Cajal cisimlerin belirteçidir (Morris, 2008), ancak sekansı canlılar aleminde çok iyi korunmamış olduğu için memeliler dışındaki canlılarda Cajal cisim belirteci olarak kullanılması doğru sonuçlar vermemektedir (Gall, 2003). Bu nedenle, immunohistokimya yöntemi kullanılmayan veya kullanıldığında antikorların bağlanmadığı

çalışmalarda Cajal cisimlere “Cajal cisim benzeri yapılar” denmektedir. Bu çalışmada da immunohistokimya yöntemi kullanılmadığı için *Donax trunculus*'un gelişmekte olan oositlerinin çekirdeklerinde görülen nükleer cisimler Cajal cisim benzeri yapılar olarak adlandırılmıştır.

Dinamik yapılar olan Cajal cisimlerin sayısı ve büyüklüğü canlı türüne, hücre tipine, hücre döngüsü evrelerine, gelişim ve farklılaşma derecesine, metabolik aktiviteye ve transkripsiyon/translasyon hızına göre değişir (Ding ve Lozano-Durán, 2020; Lafarga ve ark., 2017; Nunes ve Moretti, 2017). Örneğin, Cajal cisimleri hücre bölünmesi sırasında çekirdekçik ile birlikte kaybolur, bölünmeyi takiben tekrar oluşur (Cioce ve Lamond, 2005). Sıçanlarda küçük nöronlarda bir Cajal cisim bulunurken, orta büyüklükteki nöronlarda iki, büyük nöronlarda ise üç Cajal cisim bulunur. İnsanlarda ise küçük nöronlar üç, büyük nöronlar 13 kadar Cajal cisim içerir (Lafarga ve ark., 2017). Zebra balığında döllenmiş oositte yaklaşık 30 kadar Cajal cisim mevcut iken, hücre farklılaşması ilerledikçe bu sayı ikiye düşer. *Xenopus laevis* oositleri ise 50-100 kadar Cajal cisim içerir (Arias Escayola ve Neugebauer, 2018). *Donax trunculus*'un oositlerinde ise kesit düzleminden dolayı 6-12 kadar Cajal cisim benzeri yapıya rastlanmıştır, ancak çekirdeğin tamamı düşünüldüğünde bu sayı muhtemelen çok daha fazladır. Çekirdekçikten daha küçük olan Cajal cisimleri (Gall, 2003) somatik hücrelerde 0.1-1 µm çapındadır, oosit Cajal cisimlerinin çapları ise 1 ile 30 µm arasında olabilmektedir (Batalova ve ark., 2005; Bellini, 2000). Oysa, *Donax trunculus* oositi Cajal cisimleri büyüklük bakımından somatik hücrelerdeki Cajal cisimlere benzemektedir.

Cajal cisimleri hareketli yapılardır. Yeni transkribe edilmiş snRNAlar sitoplazmaya geçer ve burada kendilerine özgü proteinlere (Sm proteinleri) bağlandıktan sonra tekrar çekirdeğe geri dönerler. Bu snRNP parçacıkları çekirdekte Cajal cisimlerinde biriktirilir (Cioce ve Lamond, 2005). Ayrıca, bazı Cajal cisimleri belirli noktalarda, özellikle histon ve snRNA gen lokuslarında kromozomlara bağlanırlar (Gall, 2003). Bunun gereği olarak Cajal cisimleri çekirdekçik ve diğer çekirdek kısımları arasında taşınır durur. Bu durumdaki Cajal cisimleri nükleoplazma içinde serbestçe hareket eder (Morris, 2008; Platini ve ark., 2000). *Donax trunculus* oositlerinde çekirdek içinde çekirdek zarına yakın madde birikimi (Şekil 1) Cajal cisimlerinde biriktirilecek ve olgunlaştırılacak snRNP parçacıkları olabilir.

Sonuç olarak, *Donax trunculus* gelişmekte olan oositlerinde Cajal cisim benzeri yapılara sahip olması nedeniyle Cajal cisimlerin yapı ve fonksiyonunu araştıran hücre biyologları ve moleküler biyologlar için iyi bir model canlı olabilir.

Teşekkür

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-66/23072002 no'lu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKÇA

Arias Escayola, D. ve Neugebauer, K.M. (2018). Dynamics and function of nuclear bodies during embryogenesis. *Biochemistry*, 57(17), 2462-2469.

Batalova, F.M., Stepanova, I.S., Skovorodkin, I.N., Bogolyubov, D.S. ve Parfenov, V.N. (2005). Identification and dynamics of Cajal bodies in relation to karyosphere formation in scorpionfly oocytes. *Chromosoma*, 113(8), 428-439.

Bellini, M. (2000). Coilin, more than a molecular marker of the Cajal (coiled) body. *BioEssays*, 22, 861-867.

Bogolyubov, D. ve Parfenov, V. (2001). Immunogold localization of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing factors in *Tenebrio molitor* oocyte nuclei with special emphasis on karyosphere development. *Tissue Cell*, 33, 549e61.

Bogolyubov, D.S., Batalova, F.M. ve Ogorzałek, A. (2007). Localization of interchromatin granule cluster and Cajal body components in oocyte nuclear bodies of the hemipterans. *Tissue Cell*, 39(5), 353-364.

- Bogolyubova, I.O. (2017). Heterogeneity of coilin-containing nuclear domains in early mouse embryos. *Cell Tiss Biol*, 11, 293-299.
- Boudonck, K., Dolan, L. ve Shaw, P.J. (1998). Coiled body numbers in the *Arabidopsis* root epidermis are regulated by cell type, developmental stage and cell cycle parameters. *Journal of Cell Science*, 111, 3687-3694.
- Boudonck, K., Dolan, L. ve Shaw, P.J. (1999). The movement of coiled bodies visualized in living plant cells by the green fluorescent protein. *Mol Biol Cell*, 10, 2297-2307.
- Cioce, M. ve Lamond, A.I. (2005). Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 105-131.
- Çolakoğlu, S. ve Arık Çolakoğlu, F. (2013). Çift kabuklu yumuşakçaların ekonomik açıdan durumu. *Gıda Dergisi*, 73-78.
- Deval, M.C. (2009). Growth and reproduction of the wedge clam (*Donax trunculus*) in the Sea of Marmara, Turkey. *Journal of Applied Ichthyology*, 25, 551-558.
- Ding, Y. ve Lozano-Durán, R. (2020). The Cajal Body in Plant-Virus Interactions. *Viruses*, 12(2), 250.
- Gall, J.G. (2000). Cajal bodies: the first 100 years. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 273-300.
- Gall, J.G. (2003). The centennial of the Cajal body. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(12), 975-980.
- Halkka, L. (1981). Ultrastructural changes and kinetic relationships of the secondary nucleolus and nuclear bodies in previtellogenic oocytes of the dragonfly *Cordulia aenea*. *Hereditas*, 95, 259-268.
- Jaglarz, M.K., Bilinski, S.M. ve Kloc, M. (2005). Assembly and breakdown of Cajal bodies in accessory nuclei of Hymenoptera. *Differentiation*, 73(2-3), 99-108.
- Khodyuchenko, T., Gaginskaya, E. ve Krasikova, A. (2012) Noncanonical Cajal bodies form in the nucleus of late stage avian oocytes lacking functional nucleolus. *Histochem Cell Biol*, 138, 57-73.
- Lafarga, M. ve Hervas, J.P. (1983). Light and electron microscopic characterization of the “accessory body” of Cajal in the neuronal nucleus. *Ramon y Cajal's Contribution to the Neurosciences* içinde (91-100), S Grisolia, C Guerri, F Samson, S Norton ve F Reinoso-Suárez (Editörler). Amsterdam/Lausanne/New York: Elsevier.
- Lafarga, M., Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O. ve Berciano, M.T. (2009). Cajal's contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus. *Chromosoma*, 118(4), 437-443.
- Lafarga, M., Tapia, O., Romero, A.M. ve Berciano, M.T. (2017). Cajal bodies in neurons. *RNA Biology*, 14(6), 712-725.
- Liu, J.L., Murphy, C., Buszczak, M., Clatterbuck, S., Goodman, R. ve Gall, J.G. (2006). The *Drosophila melanogaster* Cajal body. *J Cell Biol*, 172(6), 875-884.
- Long, H., Sun, H., Zeng, X., Hao, S. ve Jiao, M. (2004). Identification and characterization of coiled body-like structures in pea (*Pisum sativum* L.). *Cell Biology International*, 28, 825-828.
- Love, A.J., Yub, C., Petukhovaa, N.V., Kalininac, N.O., Chenb, J. ve Talianskya, M.E. (2017). Cajal bodies and their role in plant stress and disease responses. *RNA Biology*, 14(6), 779-790.
- Morris, G.E. (2008). The Cajal body. *Biochim Biophys Acta*, 1783(11), 2108-2115.
- Neugebauer, K.M. (2017). Special focus on the Cajal Body. *RNA Biology*, 14(6), 669-670.
- Nizami, Z.F. ve Gall, J.G. (2012). Pearls are novel Cajal body-like structures in the *Xenopus* germinal vesicle that are dependent on RNA pol III transcription. *Chromosome Res*, 20(8), 953-969.
- Nunes, V.S. ve Moretti, N.S. (2017). Nuclear subcompartments: an overview. *Cell Biology International*, 41(1), 2-7.

- Pena, E., Berciano, M.T., Fernandez, R., Ojeda, J.L. ve Lafarga, M. (2001). Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J Comp Neurol*, 430(2), 250-263.
- Platani, M., Goldberg, I., Swedlow, J.R. ve Lamond, A.I. (2000). In vivo analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. *J Cell Biol*, 151, 1561-1574.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, 17, 208-212.
- Stepanova, I.S., Bogolyubov, D.S., Skovorodkin, I.N. ve Parfenov, V.N. (2007). Cajal bodies and interchromatin granule clusters in cricket oocytes: composition, dynamics and interactions. *Cell Biol Int*, 31(3):203-214.
- Trinkle-Mulcahy, L. ve Sleeman, J.E. (2017). The Cajal body and the nucleolus: “In a relationship” or “It’s complicated”? *RNA Biology*, 14(6), 739-751.
- Valdez-Ramirez, M.E., Donval, A. ve Le Pennec, M. (2002). Ultrastructural and histochemical criteria for determining normality in mature oocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 21(2), 707-714.
- Verheggen, C., Lafontaine, D.L., Samarsky, D., Mouaikel, J., Blanchard, J.M., Bordonne, R. ve Bertrand, E. (2002). Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *EMBO J*, 21, 2736-2745.
- Watson, M.L. (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol*, 4, 475-478.
- Yilmazer, N. (2005). *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) Ovaryunun Morfolojisi ve Oogenezinin İnce Yapısı. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, 125.
- Zeichen, M.M., Agnesi, S., Mariani, A., Maccaroni, A. ve Ardizzone, G.D. (2002). Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae) in the South Adriatic Coast (Italy). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 54, 971-982.