

Исследование динамики формирования и механизмов регуляции сборки-разборки ядерных и цитоплазматических пор в раннем эмбриогенезе *Drosophila melanogaster*.

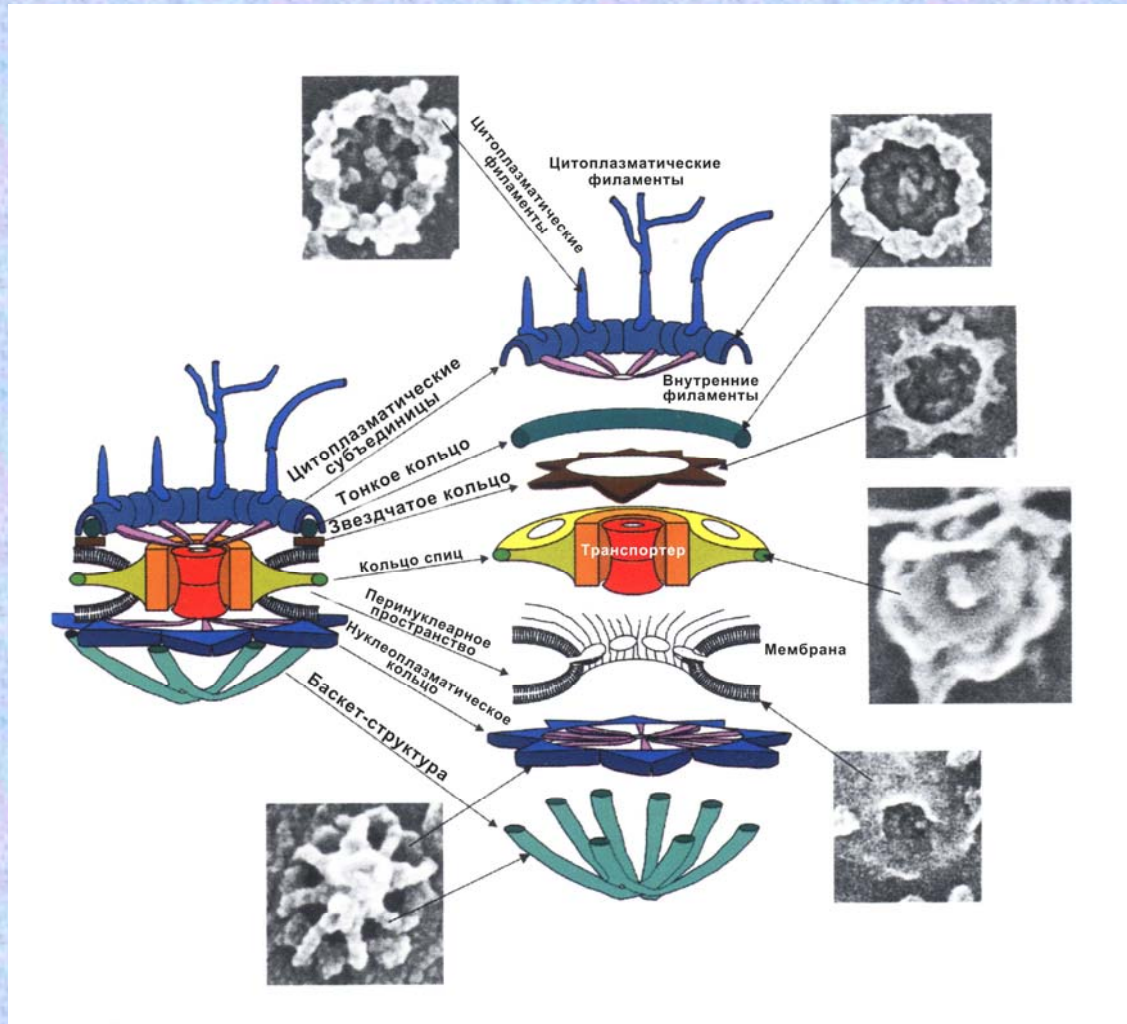
Губанова Наталья Владимировна

руководитель Киселева Елена Владимировна



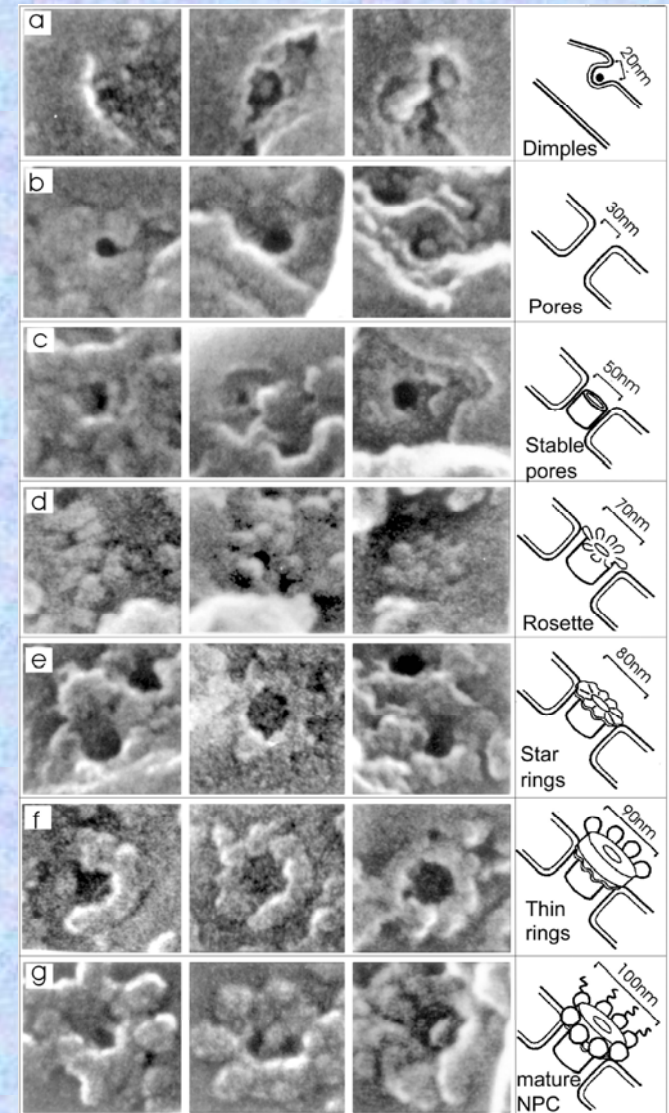
Лаборатория морфологии и функций клеточных структур

Структурная организация ядерных пор



(Allen et al., 2000)

Последовательные этапы сборки ядерных пор *in vitro* и *in vivo*



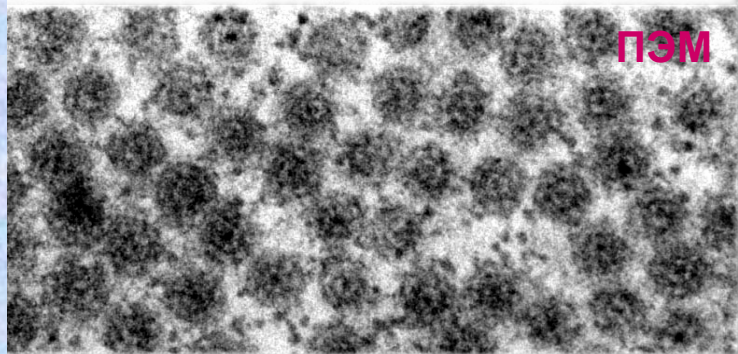
(Goldberg et al., 1997; Kiseleva et al., 2001)

Цитоплазматические и ядерные поры проявляют сходство и различие в строении

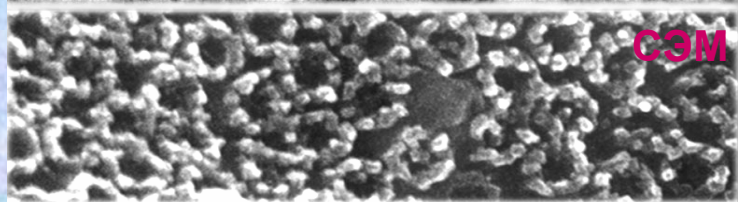
Ядерные поры в ядерной оболочке ооцита лягушки

Цитоплазматические поры (стрелки) в пористых пластинках ооцита лягушки

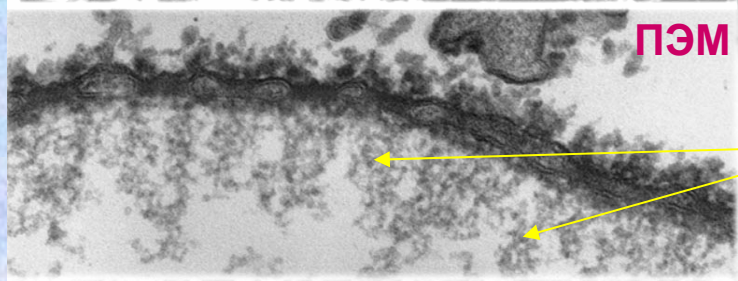
Поперечный срез



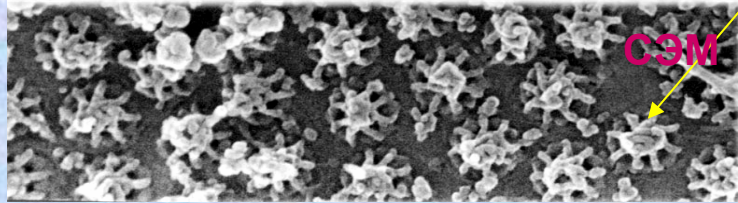
Со стороны цитоплазмы



Продольный срез



Со стороны ядра



Баскет структуры



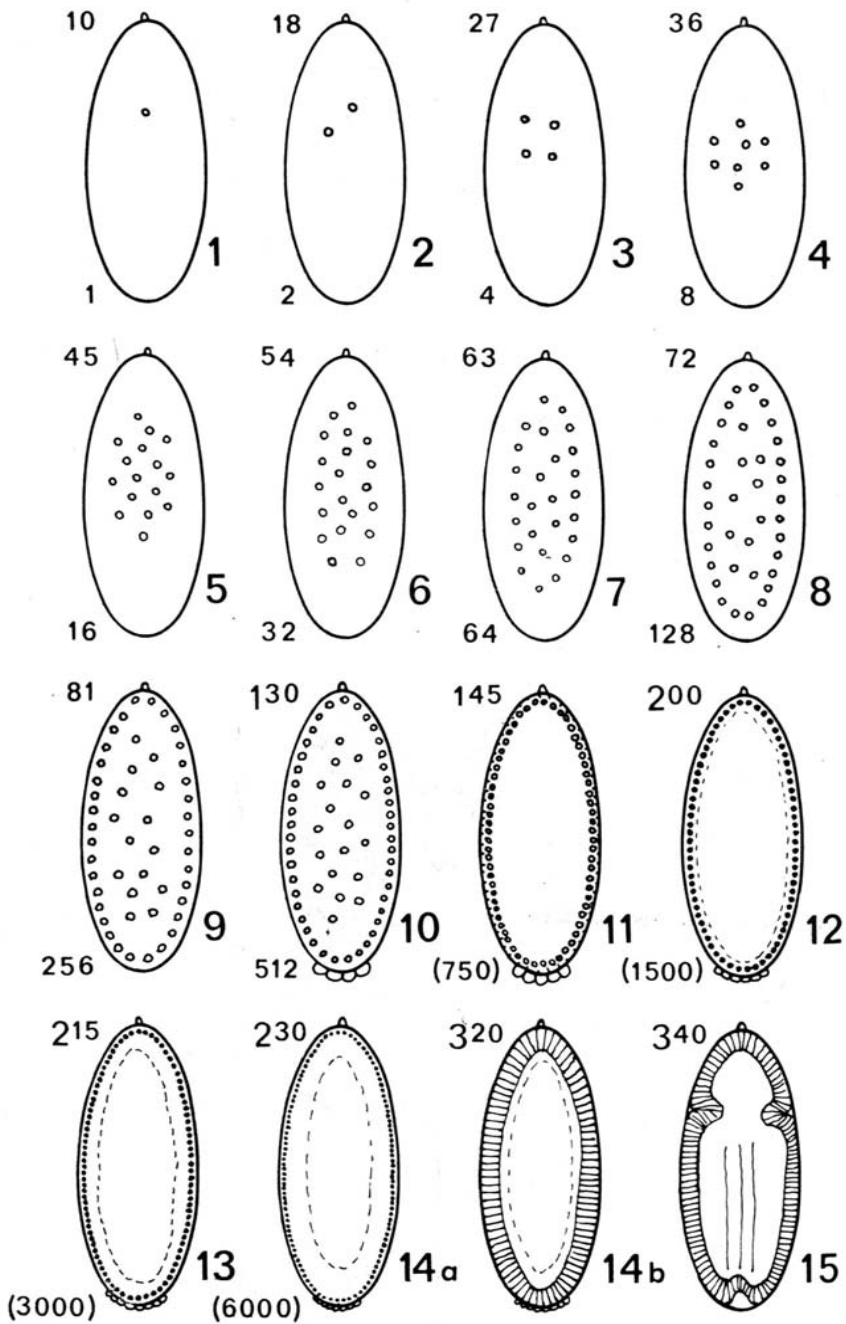


Схема развития эмбриона
Drosophila melanogaster на
 стадии синцитиальной
 бластодермы
 (от момента
 оплодотворения до
 бластулы – 2,5 часа)

Цель: изучить регуляцию митотической реорганизации ядерных и цитоплазматических пор и их возможное функциональное взаимодействие в эмбрионах дрозофилы на стадии синцитиальной бластодермы

Задачи :

1. Провести электронно-микроскопический анализ ультраструктурной динамики ядерной оболочки и пористых пластинок на разных стадиях митоза синцитиальных эмбрионов *Drosophila melanogaster* линии Canton S
2. С помощью морфометрического анализа оценить количество ядерных и цитоплазматических пор на разных стадиях синцитиального развития дрозофилы.
3. Провести количественную оценку уровня отдельных нуклеопоринов на разных стадиях синцитиальной бластодермы.
4. Изучить распределение нуклеопоринов в мембранной, ядерной и цитоплазматической фракциях синцитиальных эмбрионов дрозофилы.

5. Определить, как влияет на разборку ядерных и цитоплазматических пор инактивация митотической киназы cdk1, вызываемая:
 - инъекцией циклогексимида в синцитиальные эмбрионы *Drosophila melanogaster* линии Canton S;
 - низким уровнем циклинов в png мутантах *Drosophila melanogaster* линия png¹⁷²;
 - нарушением функций cdk1 в термочувствительных мутантах *Drosophila melanogaster* линии cdk1^{ts} (A171T).

6. Исследовать влияние ингибирования фосфатаз PP1 и PP2 (субстрат специфичных антагонистов митотической киназы cdk1), на процесс сборки ядерных и цитоплазматических пор в синцитиальных эмбрионах *Drosophila melanogaster* линия Canton S.

7. Определить влияние малой ГТФ-азы Ran на процесс сборки ядерных и цитоплазматических пор.

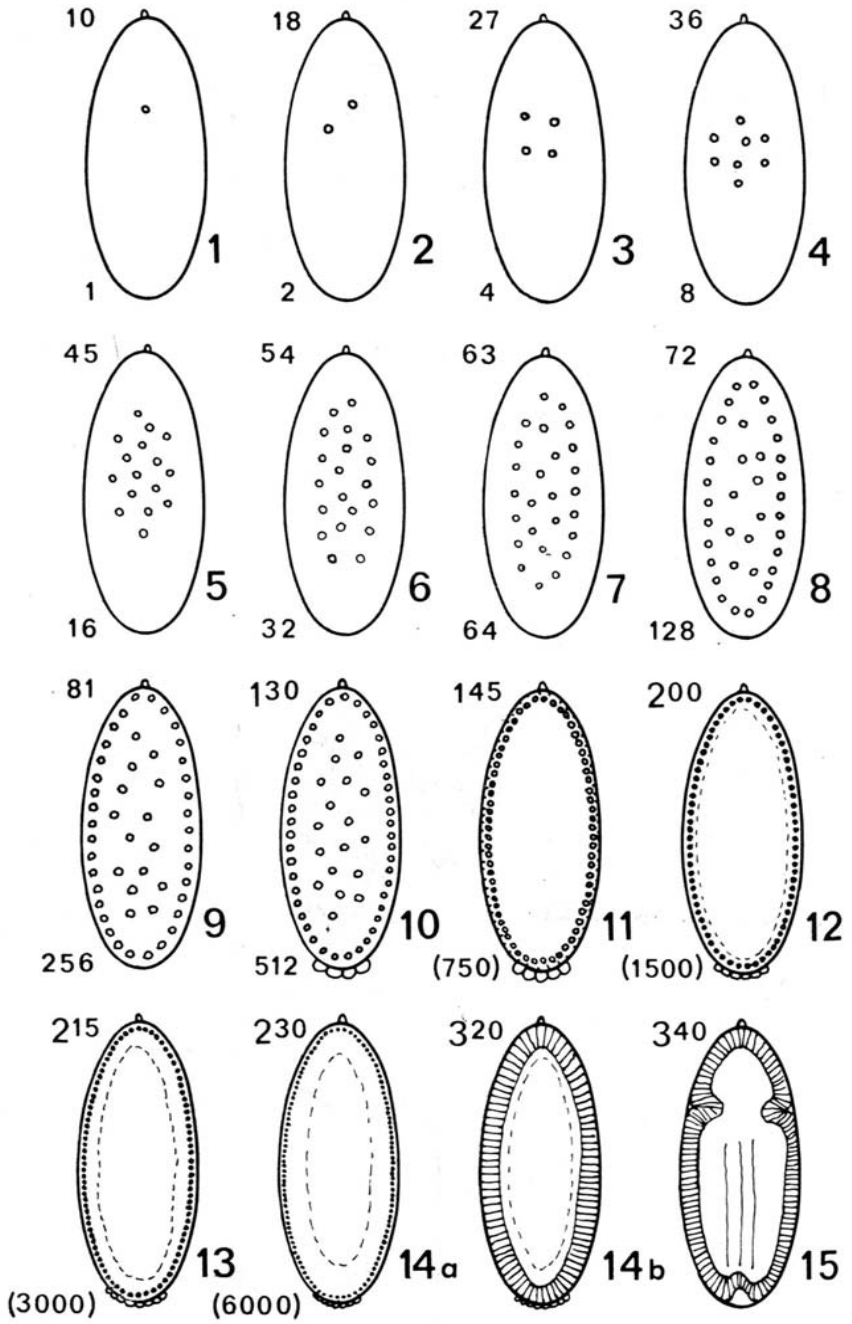
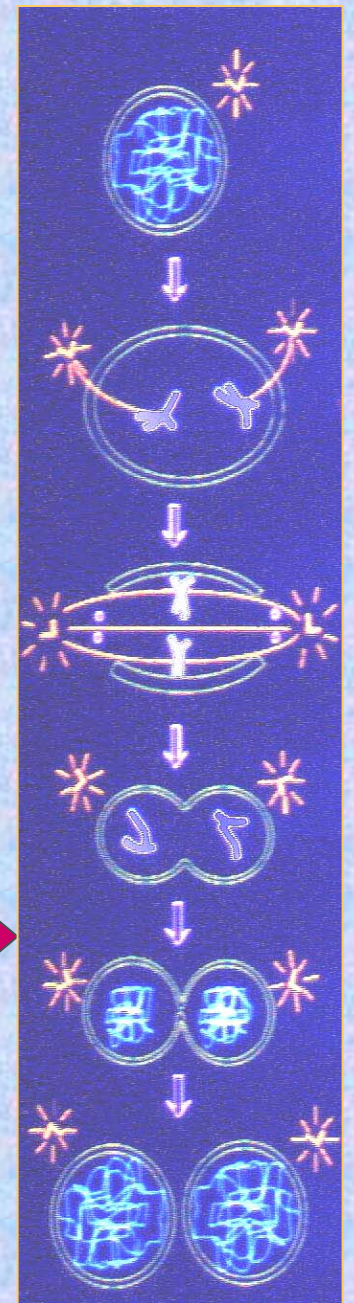


Схема развития эмбриона *Drosophila melanogaster* на стадии синцитиальной бластодермы (от момента оплодотворения до бластулы – 2,5 часа)



Схема полужакрытого митоза бластодермальных ядер в синцитиальных эмбрионах дрозофилы

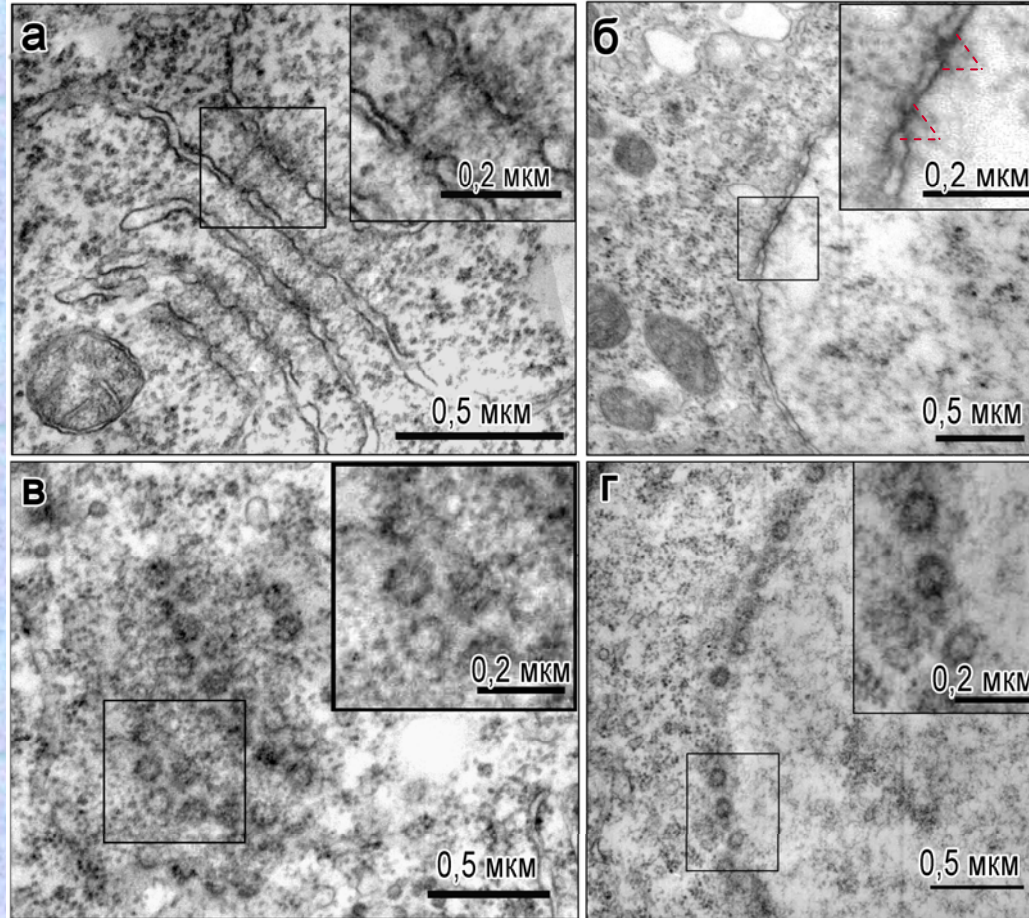


(Foe, Alberts, 1983)

Ультраструктура цитоплазматических и ядерных пор в синцитиальных эмбрионах дрозофилы

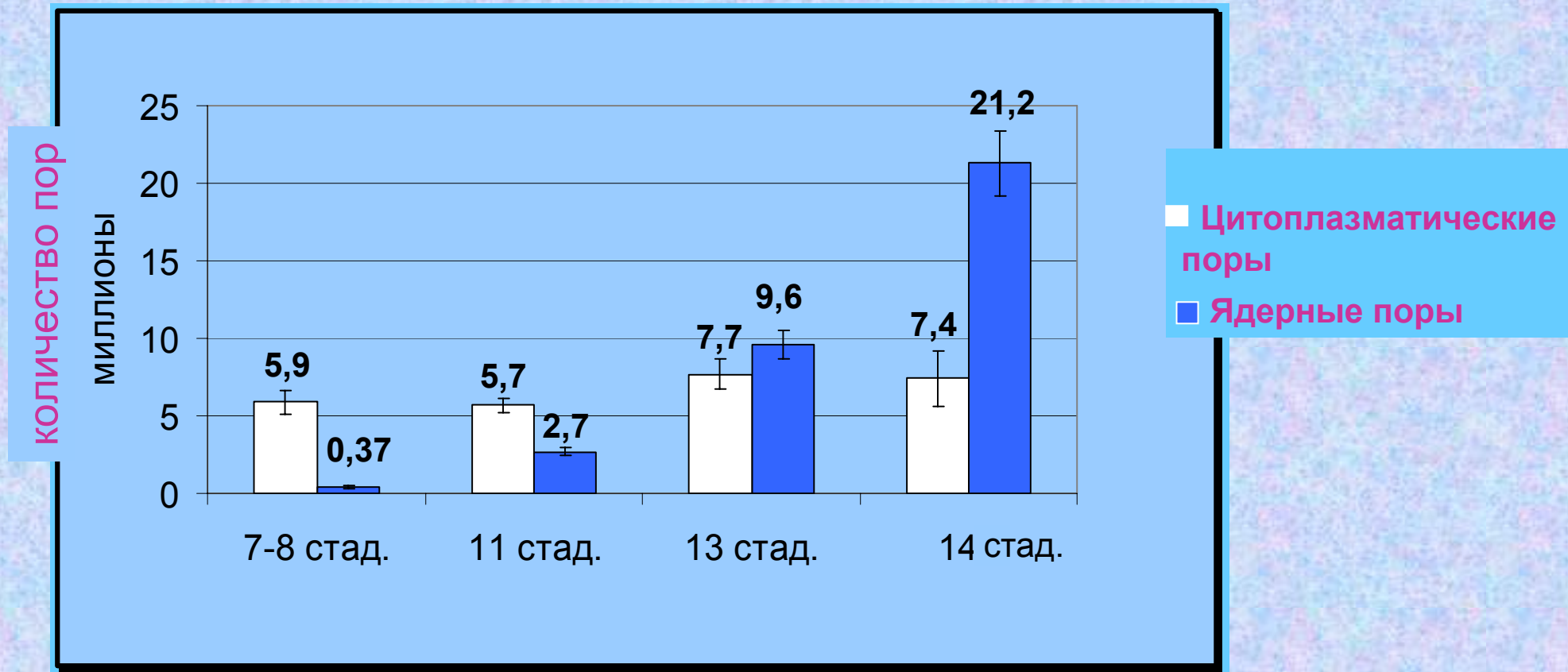
Пористые пластинки, содержащие цитоплазматические поры

Ядерная оболочка с ядерными порами



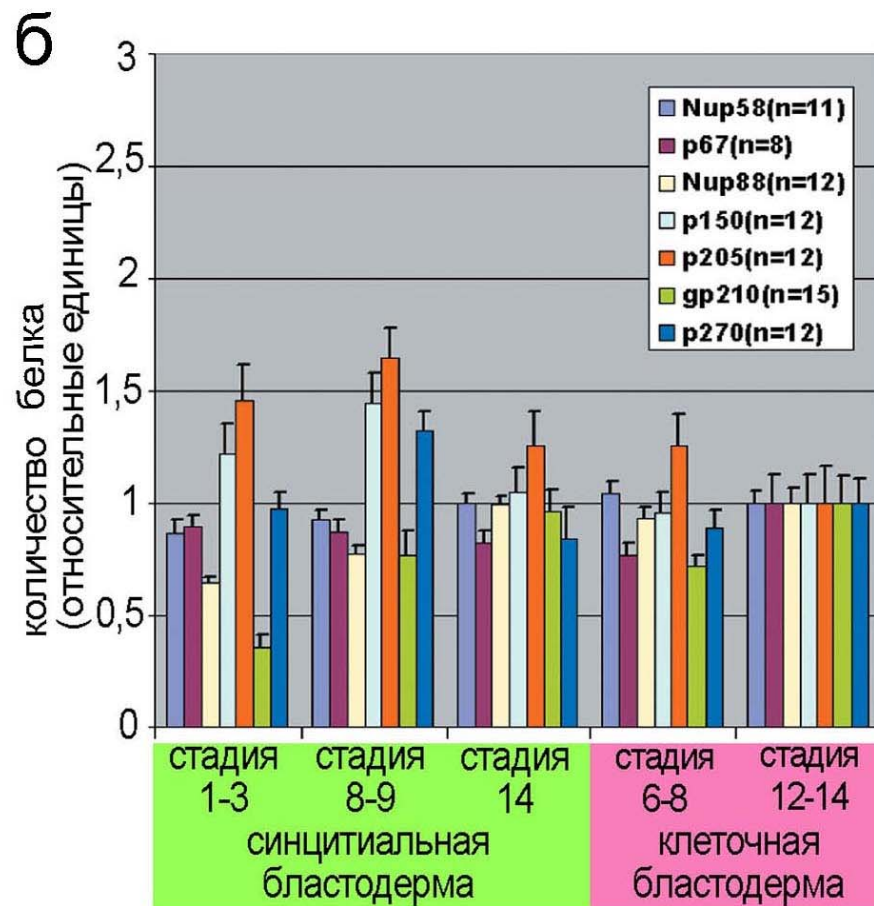
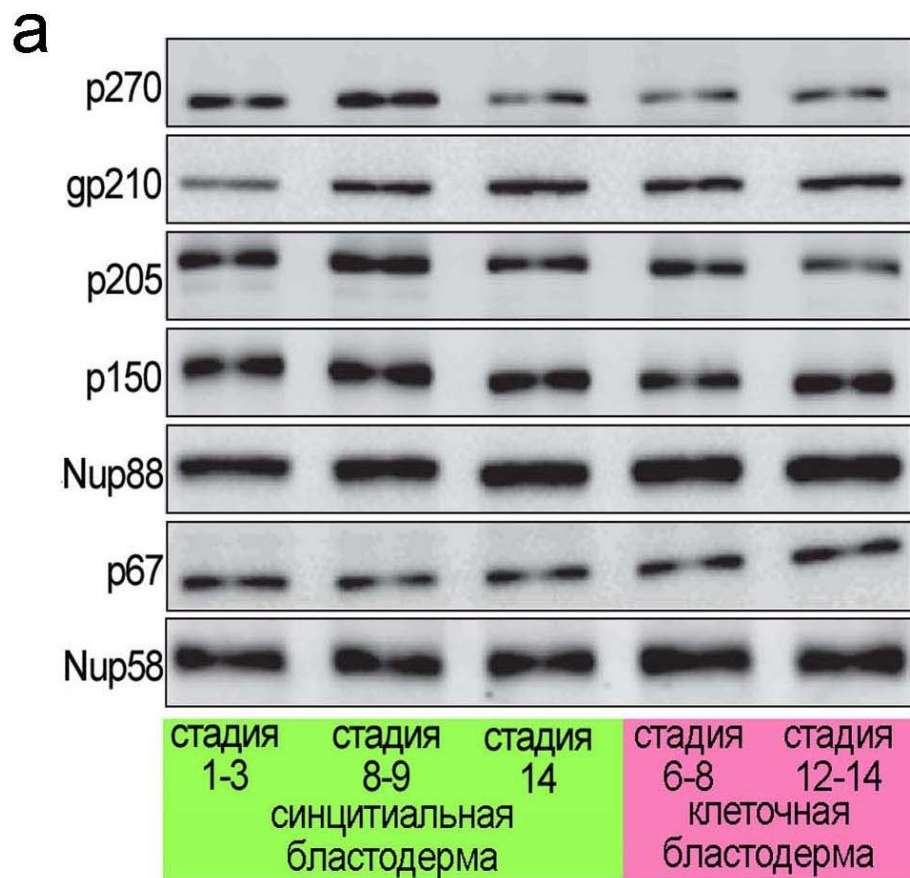
Ядерные поры имеют ассиметричные периферические отделы, а периферические отделы цитоплазматических пор сходны по морфологии

Количественная динамика ядерных и цитоплазматических пор в эмбрионах на разных стадиях синцитиального развития *D. melanogaster* (Canton S)



Нуклеопорины, запасенные в цитоплазматических порах, не могут обеспечить достаточный запас белков, необходимый для сборки новых пор в делящихся ядрах.

Относительное количество семи нуклеопоринов в эмбрионах дрозофилы на разных стадиях эмбрионального развития

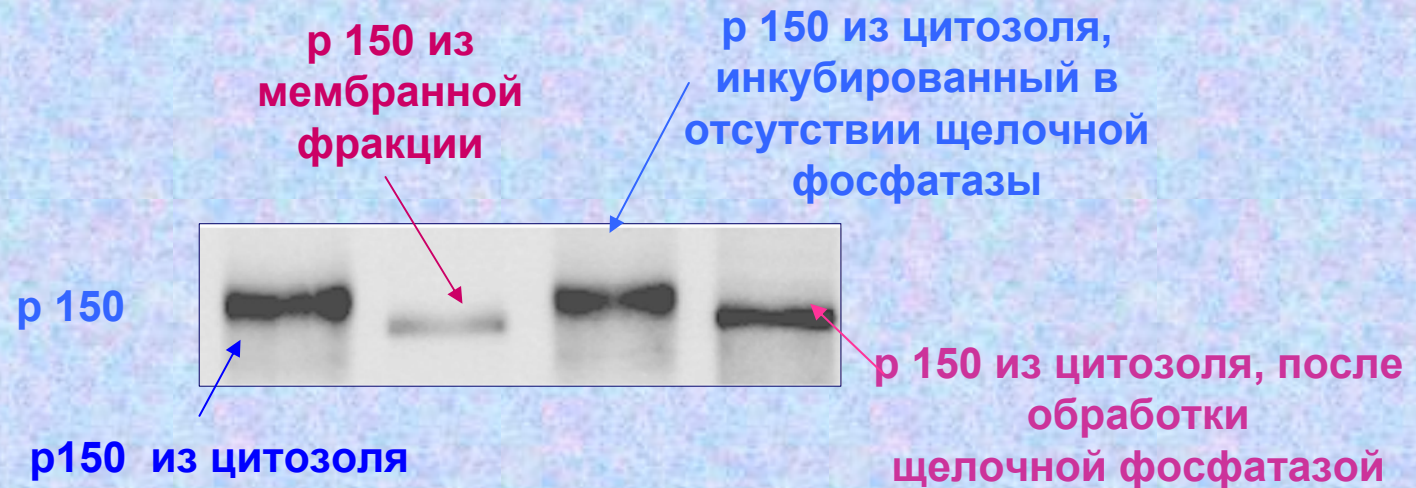
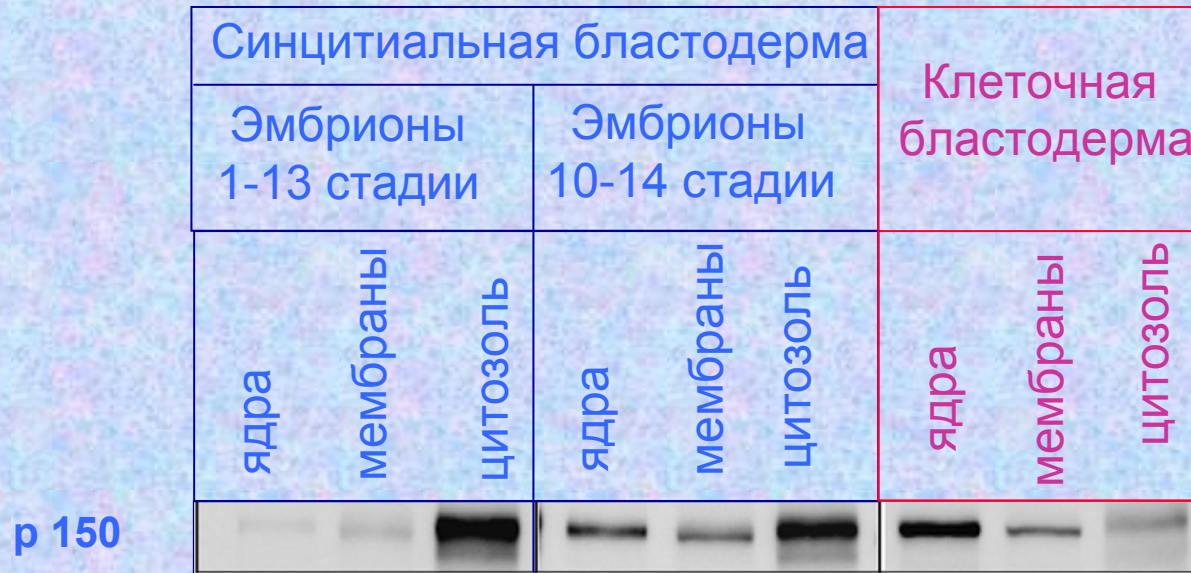


Относительное количество нуклеопоринов в эмбрионе не изменяется в процессе эмбрионального развития

		Синцитиальная бластодерма						Клеточная бластодерма			Распределение нуклеопоринов по ядерной, мембранной и цитоплазматической фракциям, выделенным из синцитиальных и бластодермальных эмбрионов
		Эмбрионы 1-13 стадии			Эмбрионы 10-14 стадии						
		ядра	мембраны	цитозоль	ядра	мембраны	цитозоль	ядра	мембраны	цитозоль	
											Gp210 (ЭПР/ядра)
											гистон H3 (ядра/цитозоль)
											альфа-тубулин(цитозоль)
нуклеопорины											p270
											p205
											p150
											Nup88
											p67
											Nup58

В синцитиальном эмбрионе основное количество нуклеопоринов находится в цитозоле

Электрофоретическая подвижность белка р150 из цитозоля снижена и восстанавливается после обработки щелочной фосфатазой



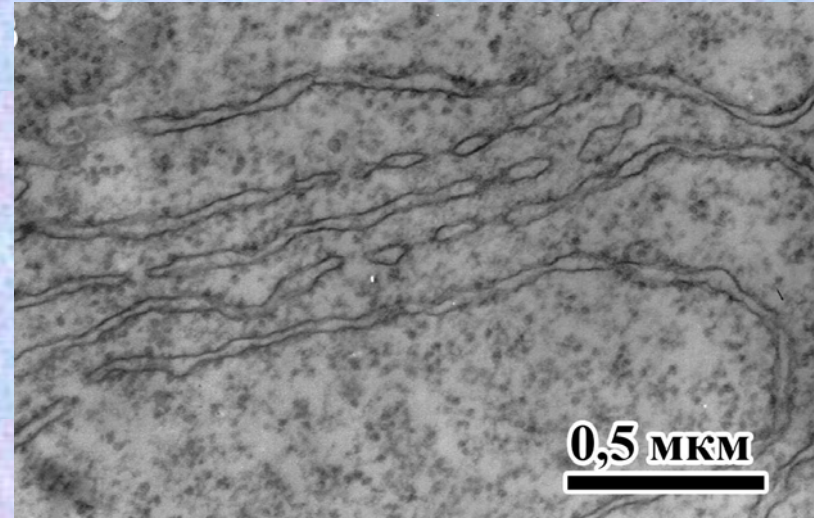
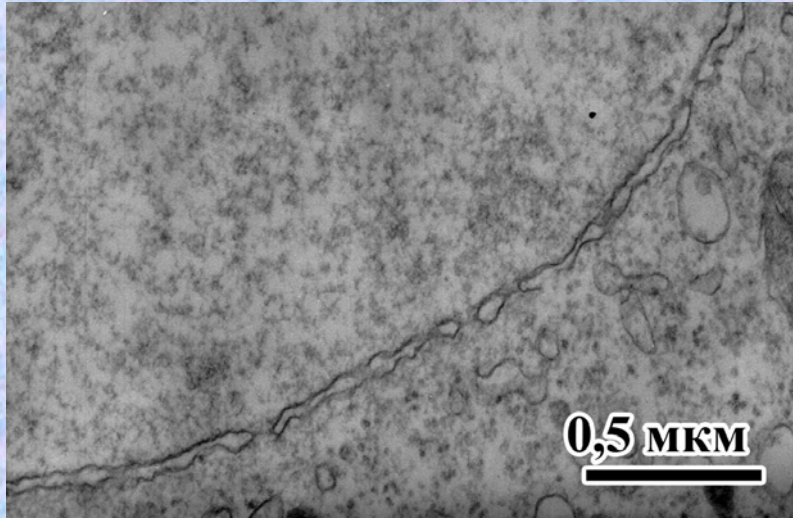
Можно предположить, что нуклеопорины в цитозоле синцитиального эмбриона фосфорилированы

Морфология ядерной оболочки бластодермальных ядер и пористых пластинок, расположенных рядом с ними, на стадии профазы и метафазы

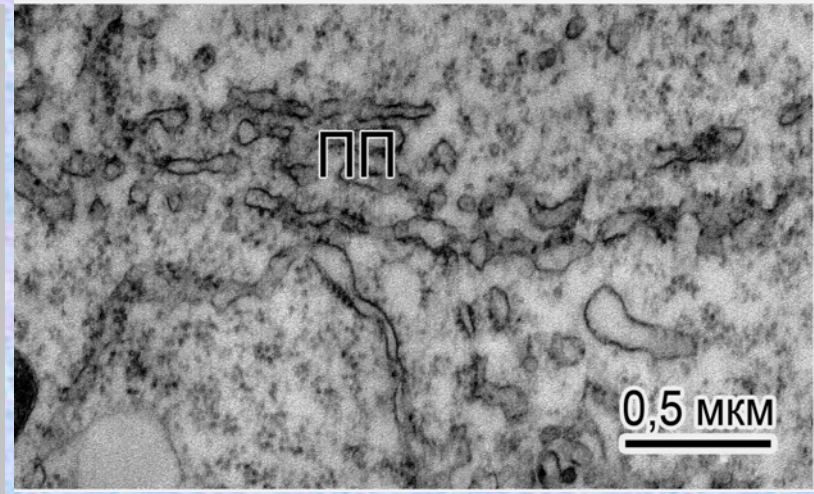
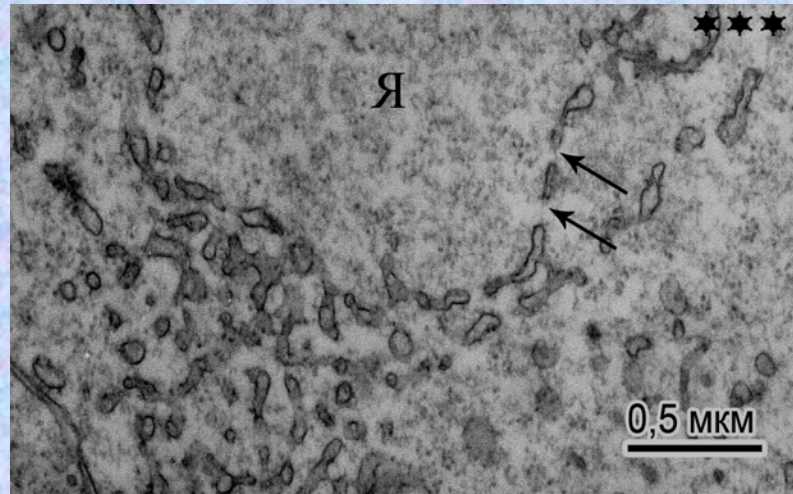
Ядерная оболочка

Пористые пластинки

Профаза

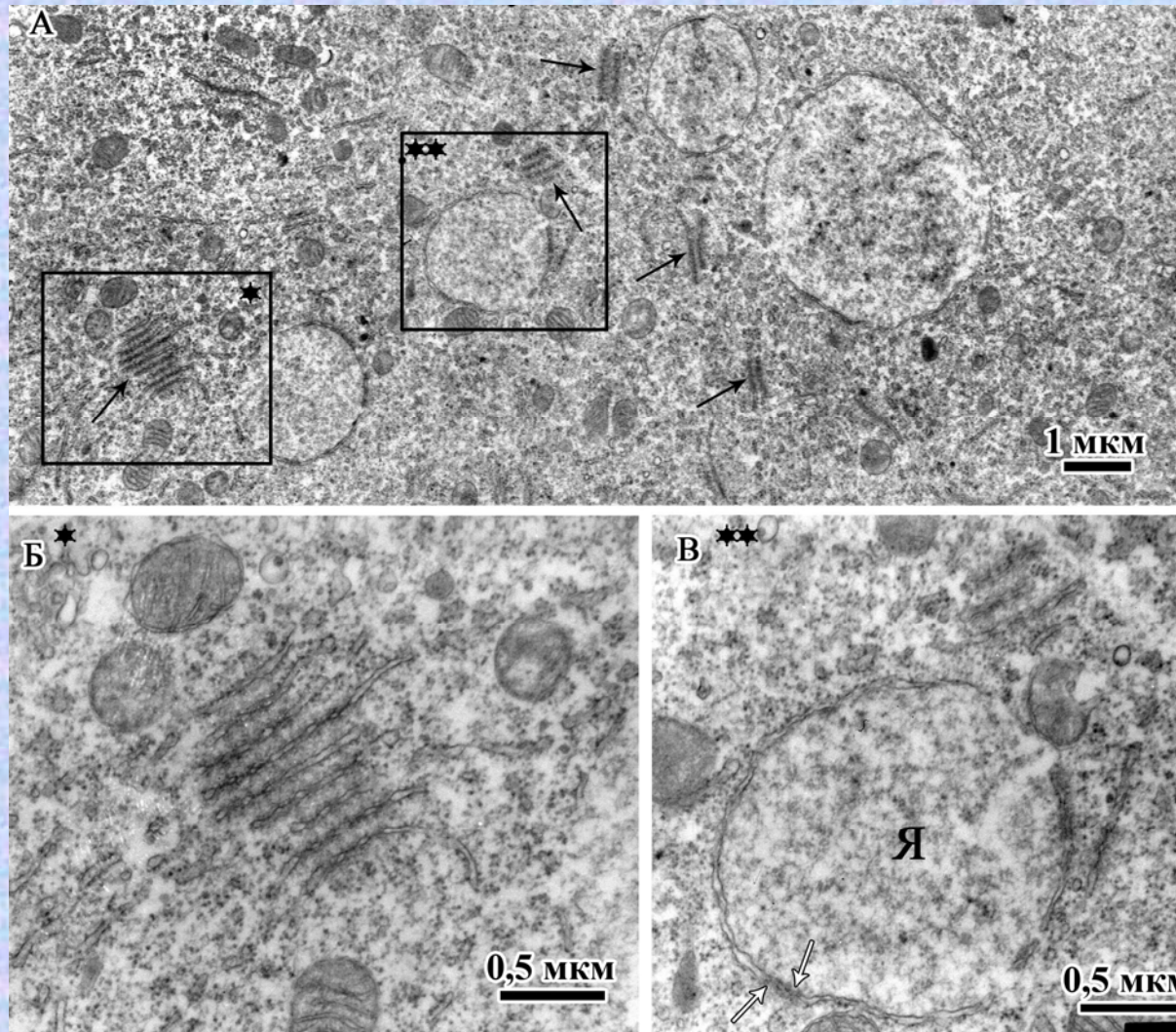


Метафаза



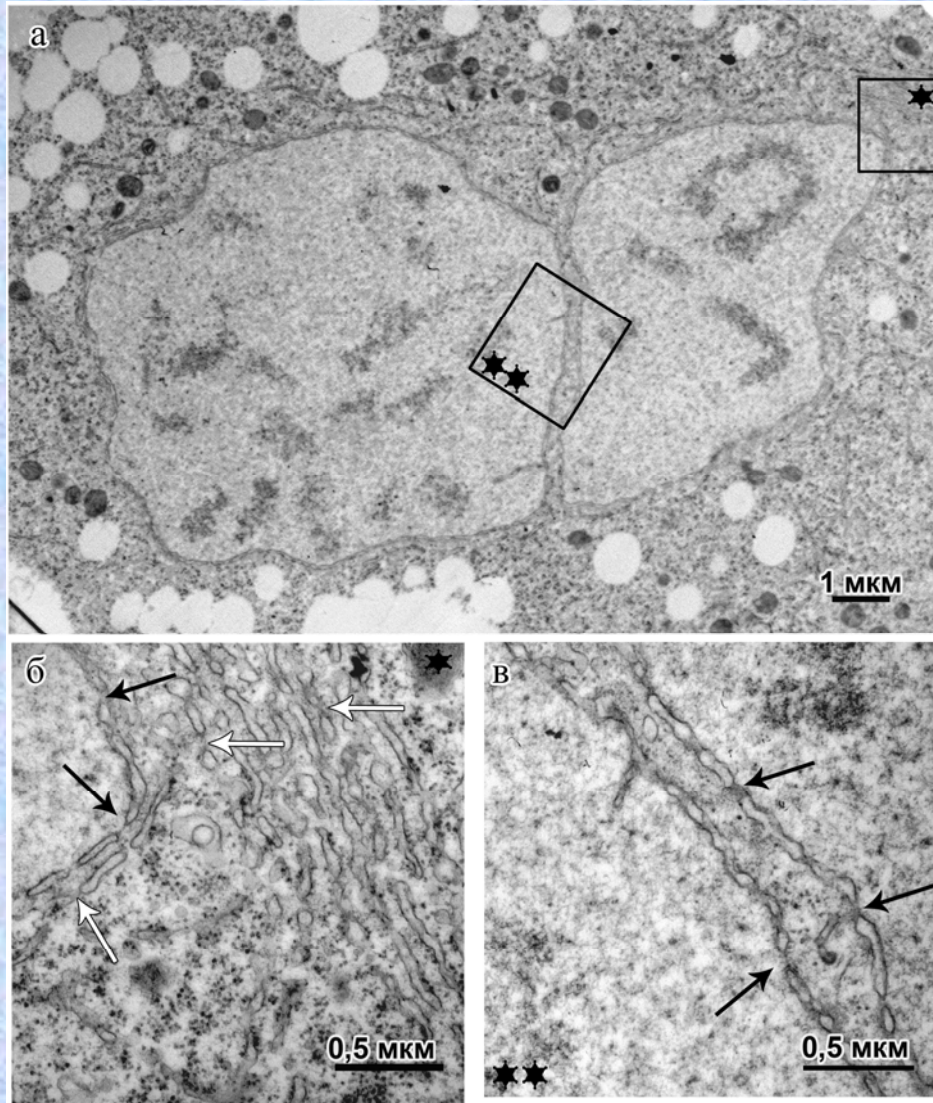
Ядерные и цитоплазматические поры синхронно разбираются в процессе митоза

Морфология ядерной оболочки бластодермальных ядер и пористых пластинок, расположенных рядом с ними, на стадии телофазы



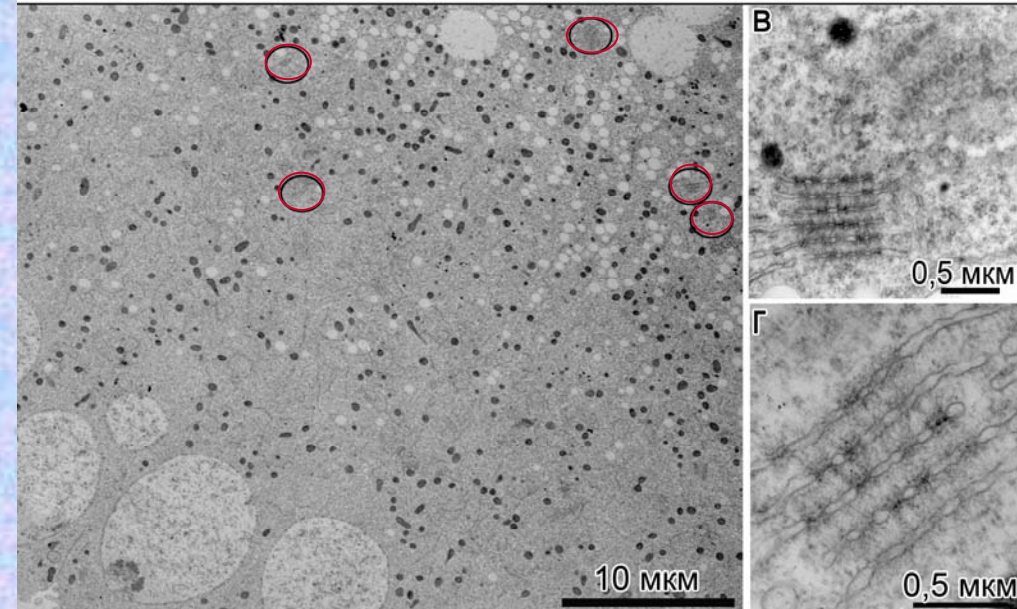
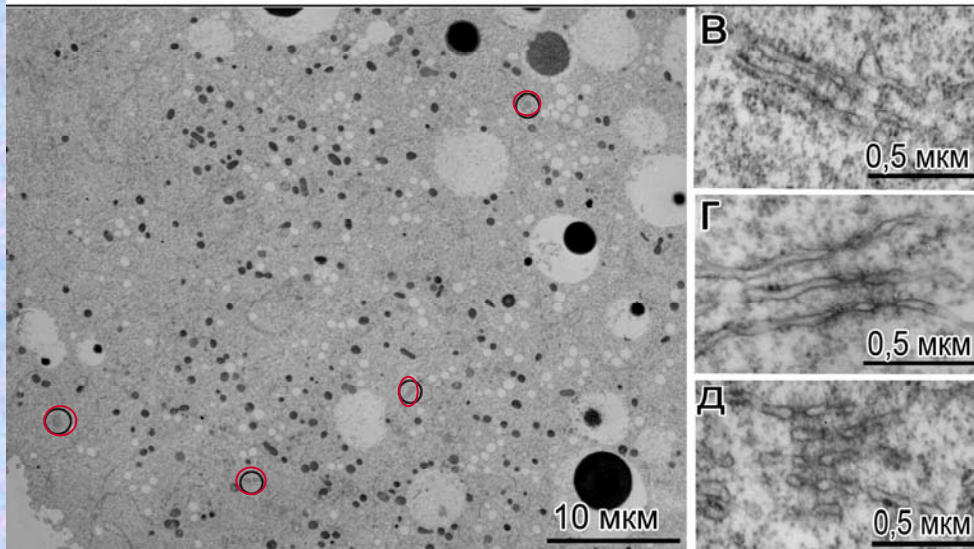
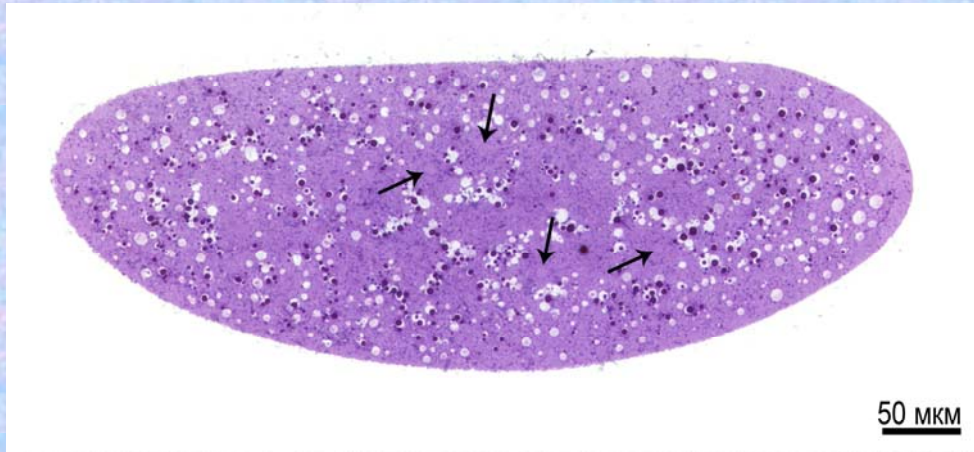
Ядерные и цитоплазматические поры синхронно собираются на стадии телофазы

Морфология оболочки желточных ядер и расположенных вблизи них пористых пластинок на стадии метафазы



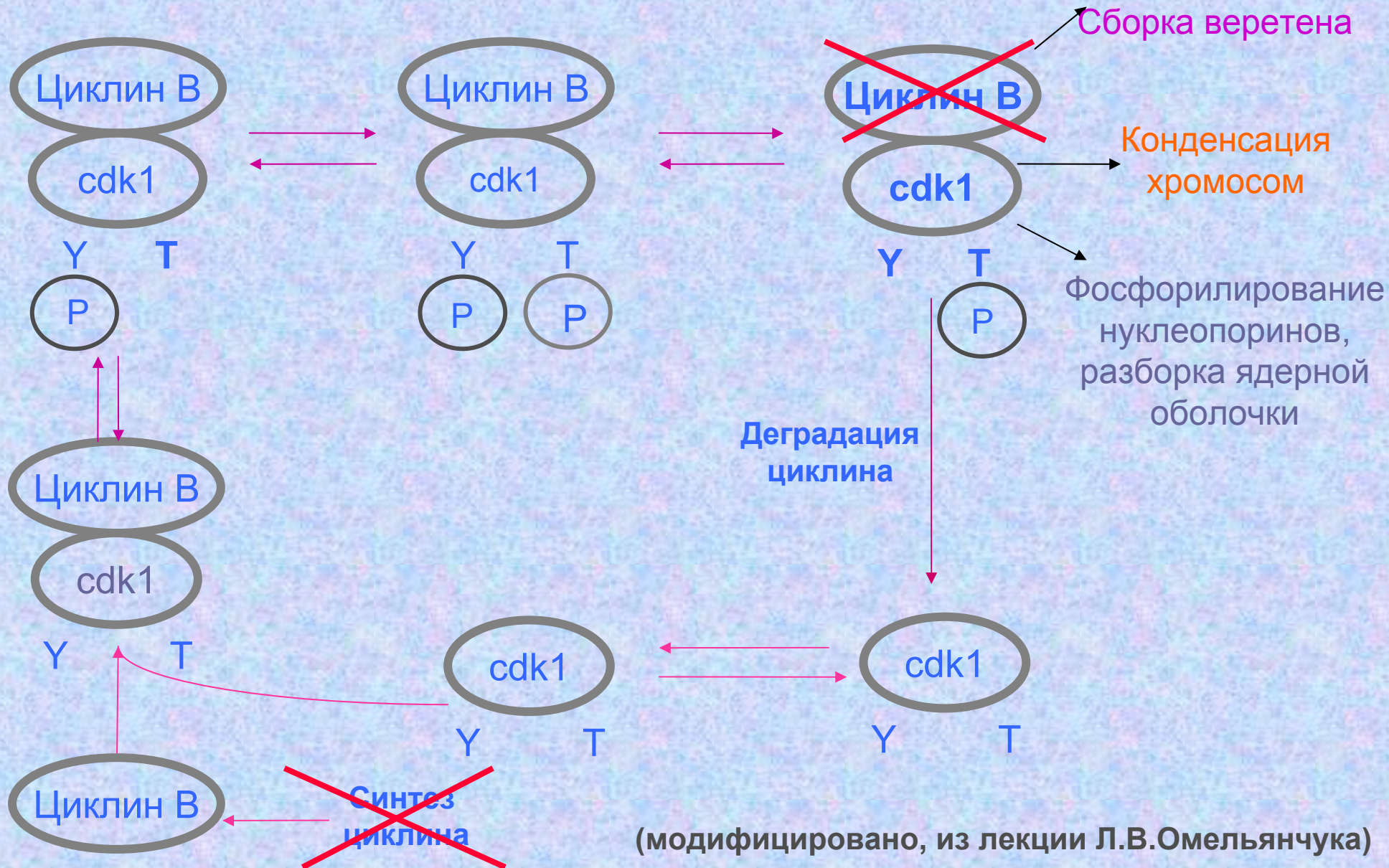
Поры в оболочке желточных ядер и цитоплазматические поры в центре эмбриона, частично разбираются в метафазе

Морфология пористых пластинок и их расположение в эмбрионе на разных стадиях синцитиального развития



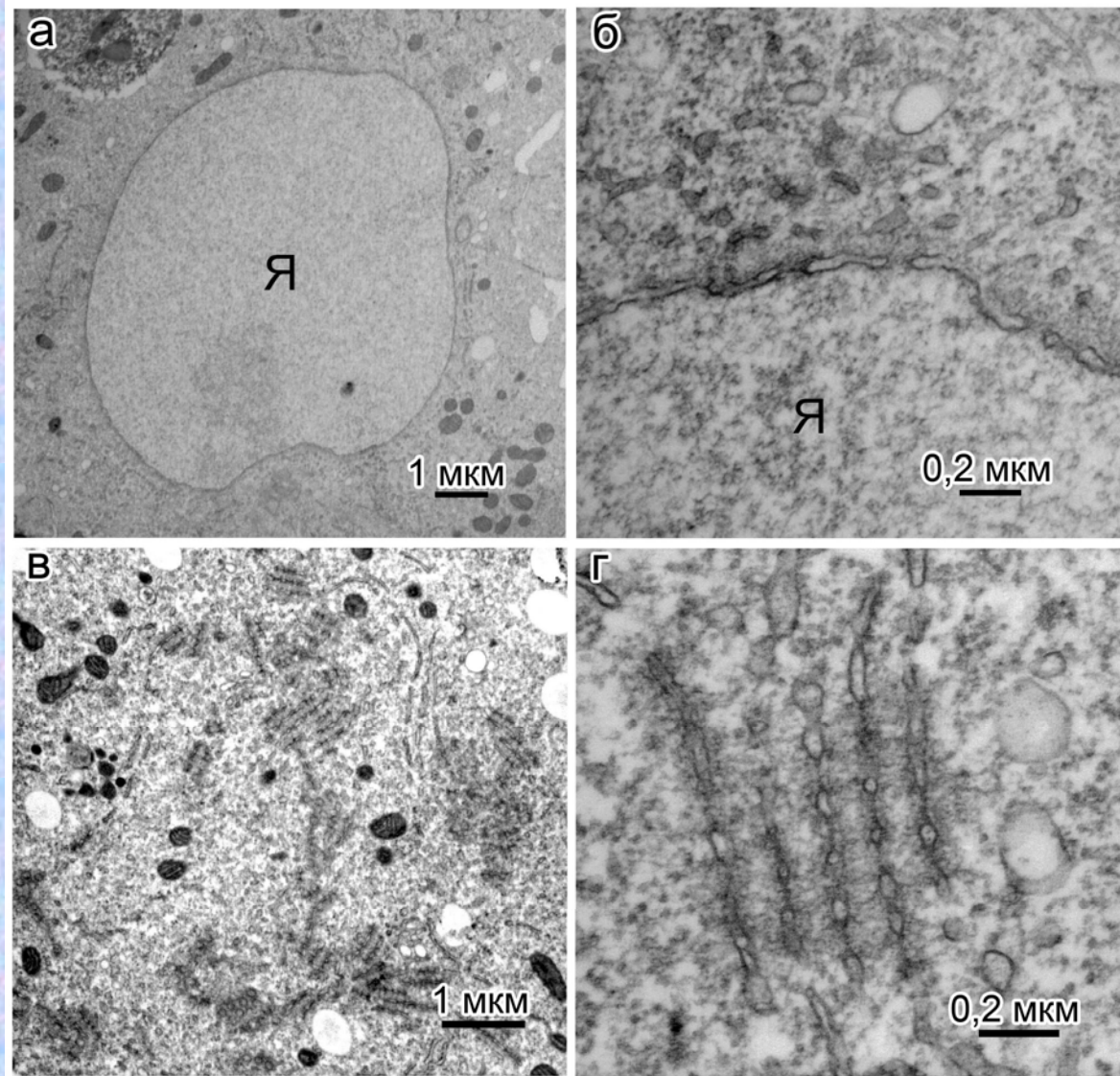
В процессе синцитиального развития происходит увеличение размеров пористых пластинок и изменение их локализации

Циклин зависимая регуляция активности митотической киназы cdk1



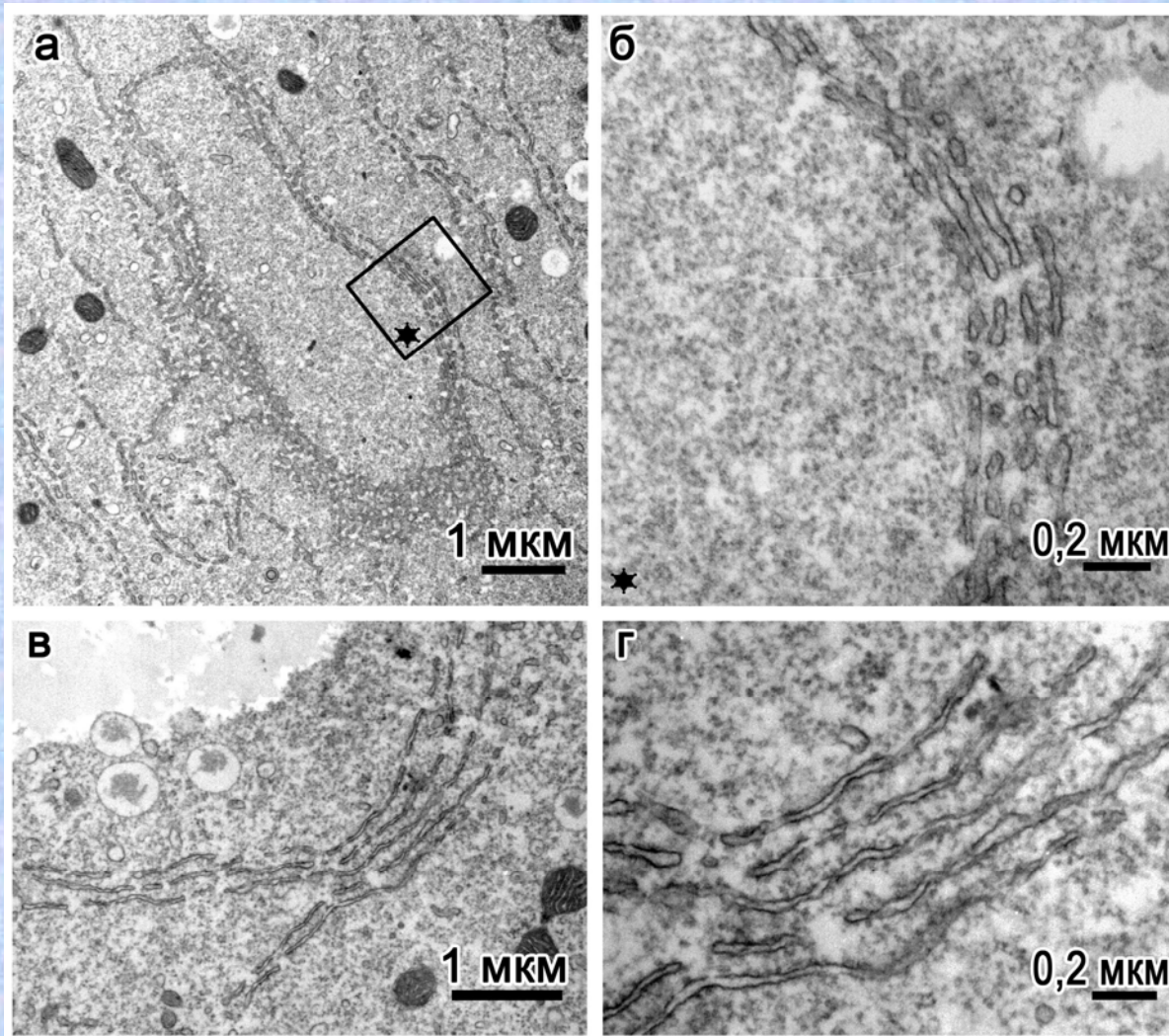
(модифицировано, из лекции Л.В.Омельянчука)

Влияние инактивации *cdk1*, вызываемой инъекцией циклогексимида, на разборку ядерных и цитоплазматических пор



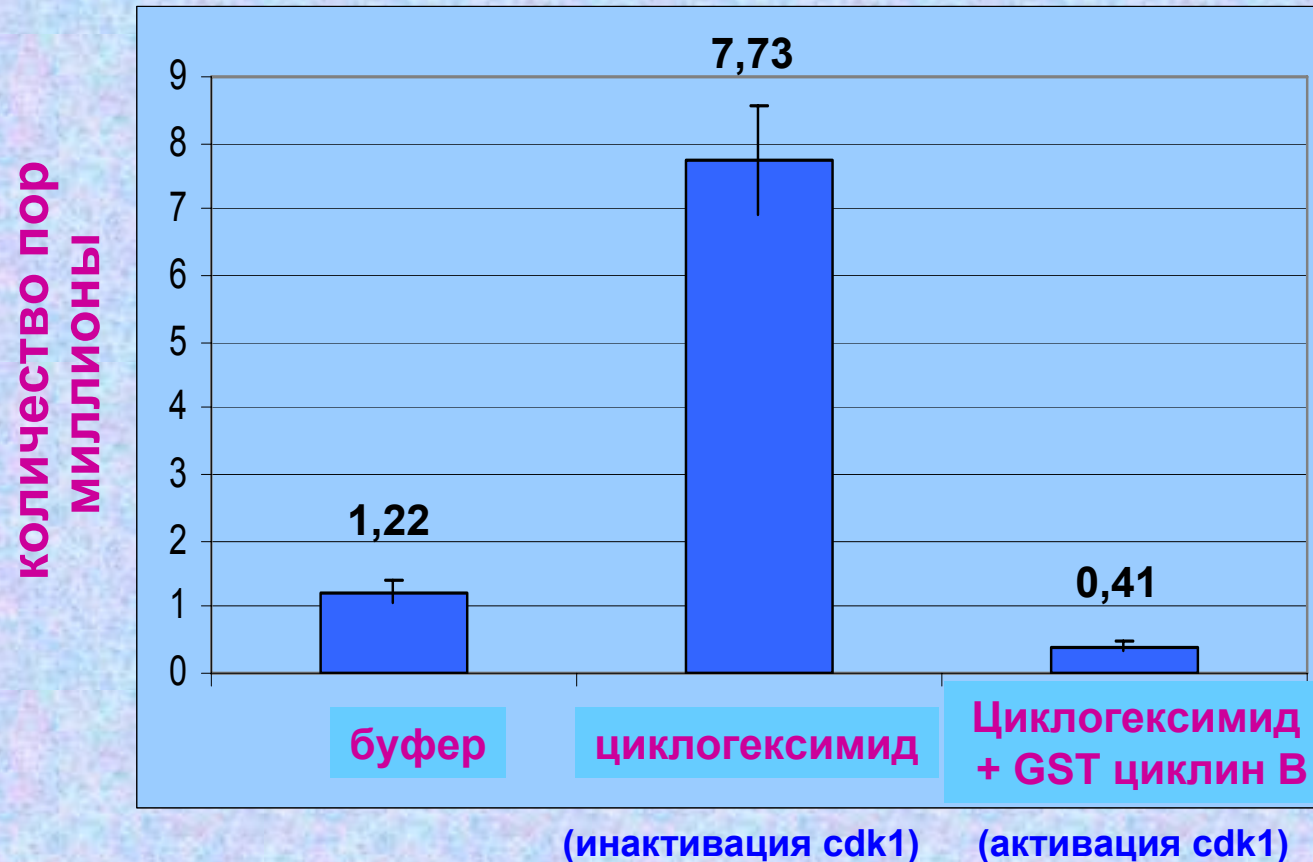
Инъекция циклогесимида в синцитиальные эмбрионы дрозофилы ингибирует разборку ядерных и цитоплазматических пор

Восстановление активности *cdk1*, при одновременной инъекции циклогексимида и недеградируемой формы циклина В (GST циклин В), на разборку ядерных и цитоплазматических пор



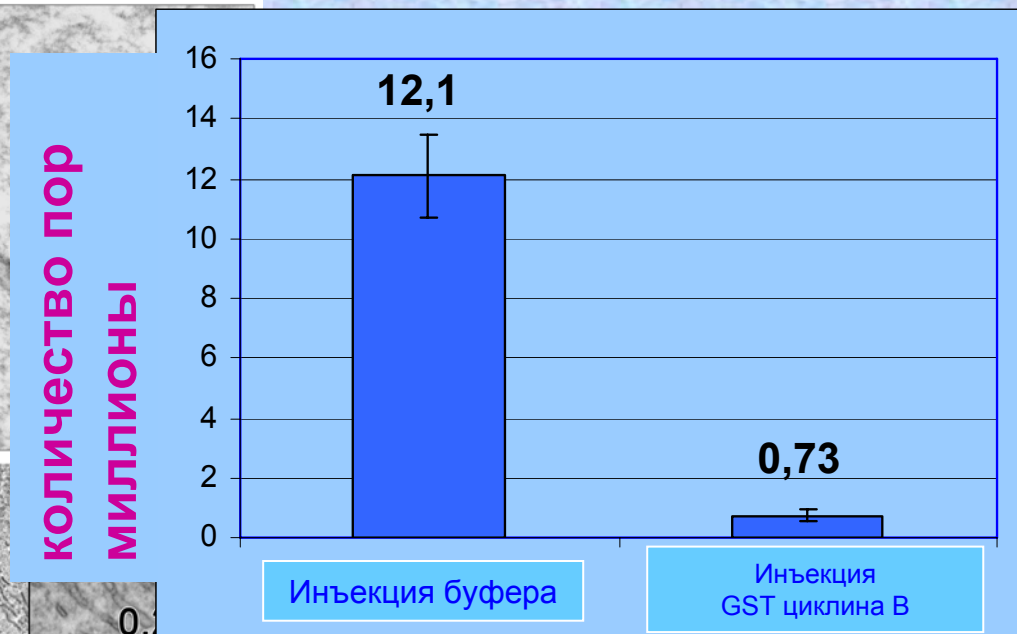
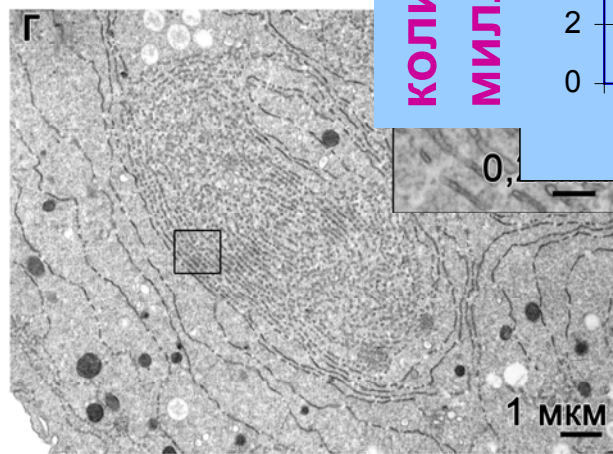
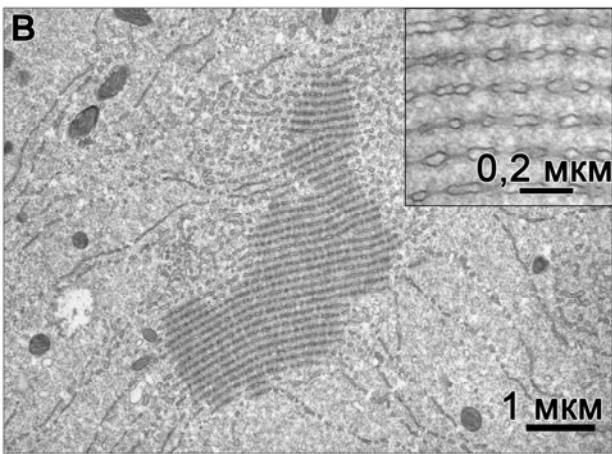
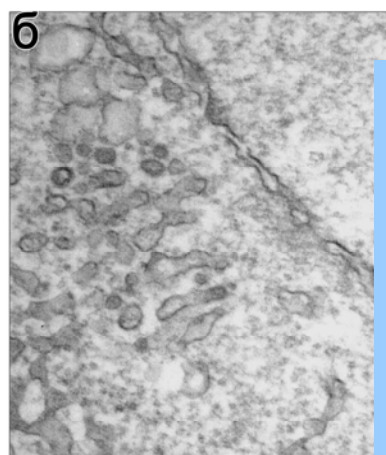
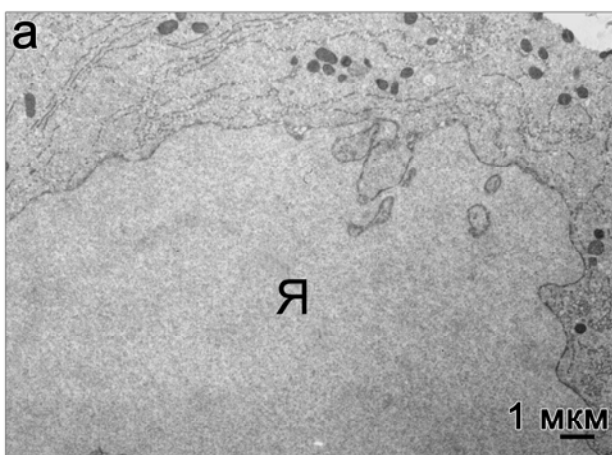
Цитоплазматические поры разбираются при одновременной инъекции циклогексимида и недеградируемой формы циклина В (GST циклин В)

Влияние инактивации и активации cdk1 на сборку цитоплазматических пор в синцитиальных эмбрионах дрозофилы



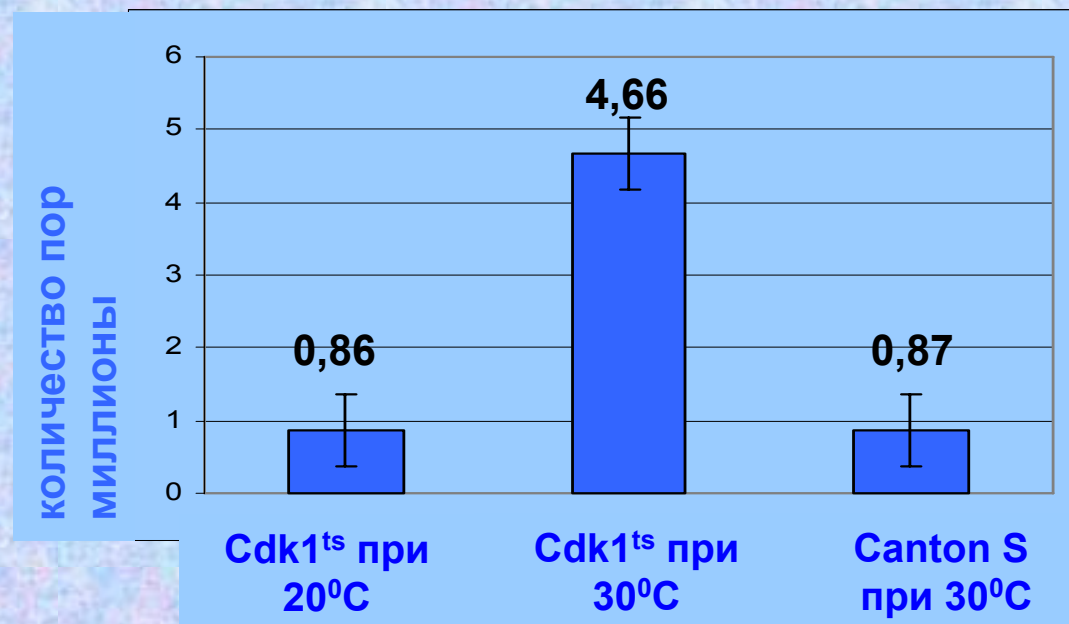
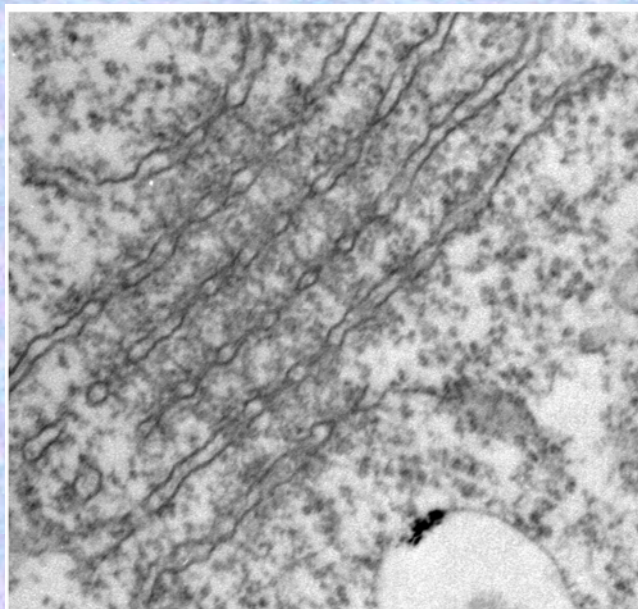
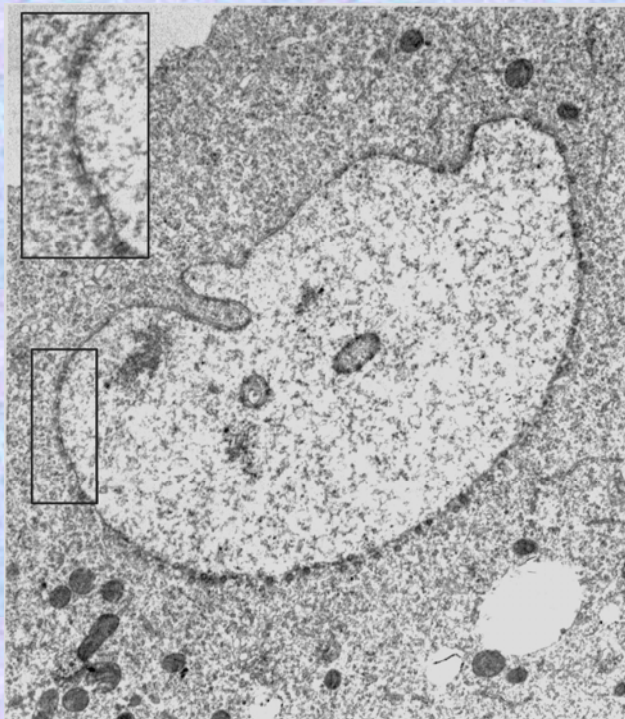
Инъекция циклогексимида в синцитиальные эмбрионы вызывает увеличение количества цитоплазматических пор

Влияние снижения уровня митотических циклинов в *png* мутантах на сборку ядерных и цитоплазматических пор



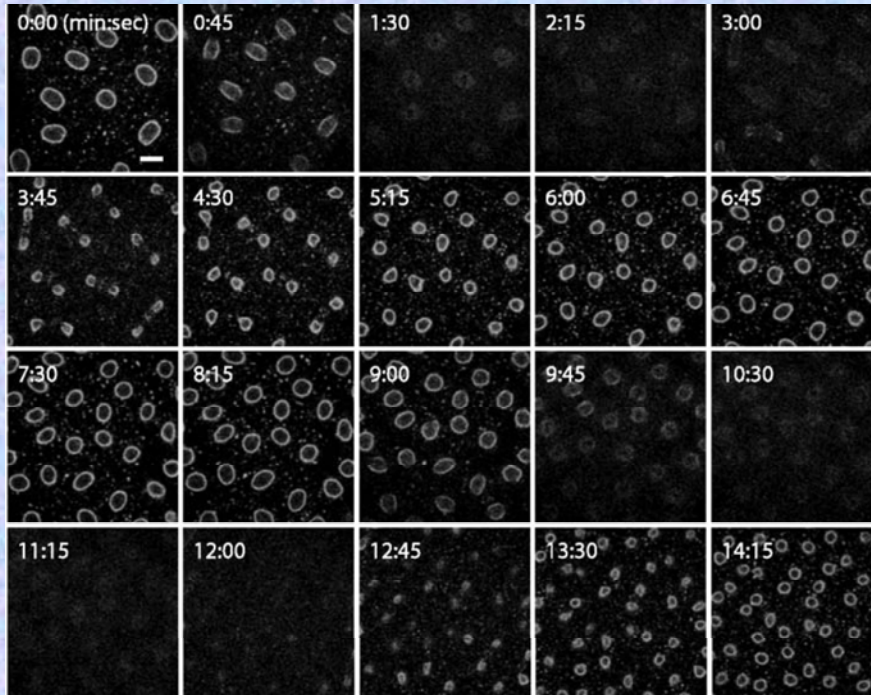
В эмбрионах *png* мутантов, собираются гигантские стопки пористых пластинок. Инъекция GST-циклина В вызывает разборку ядерных и цитоплазматических пор.

Влияние инактивации *cdk1* в термочувствительных мутантах *cdk1^{ts}*



Инактивация *cdk1* в термочувствительных мутантах *cdk1^{ts}* вызывает сборку ядерных и цитоплазматических пор

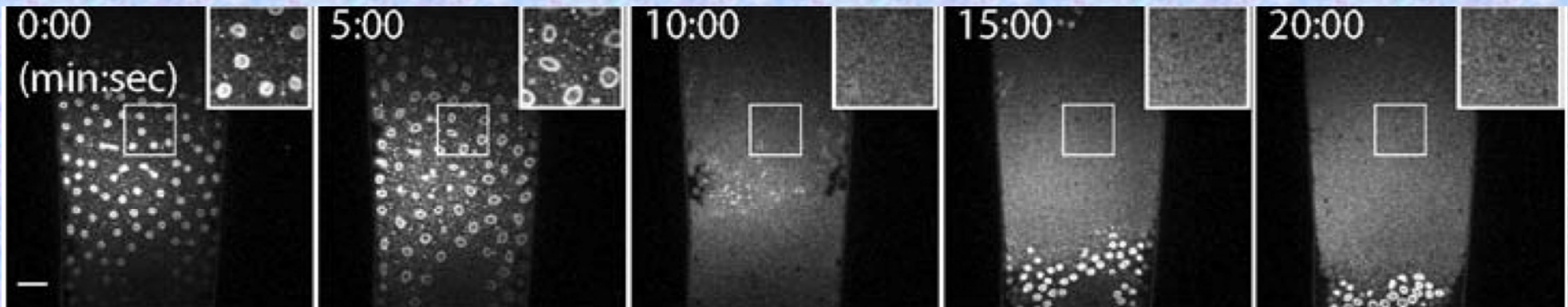
Инъекция ооадаевой кислоты - специфического ингибитора фосфатаз PP1 и PP2A - блокирует сборку ядерных и цитоплазматических пор



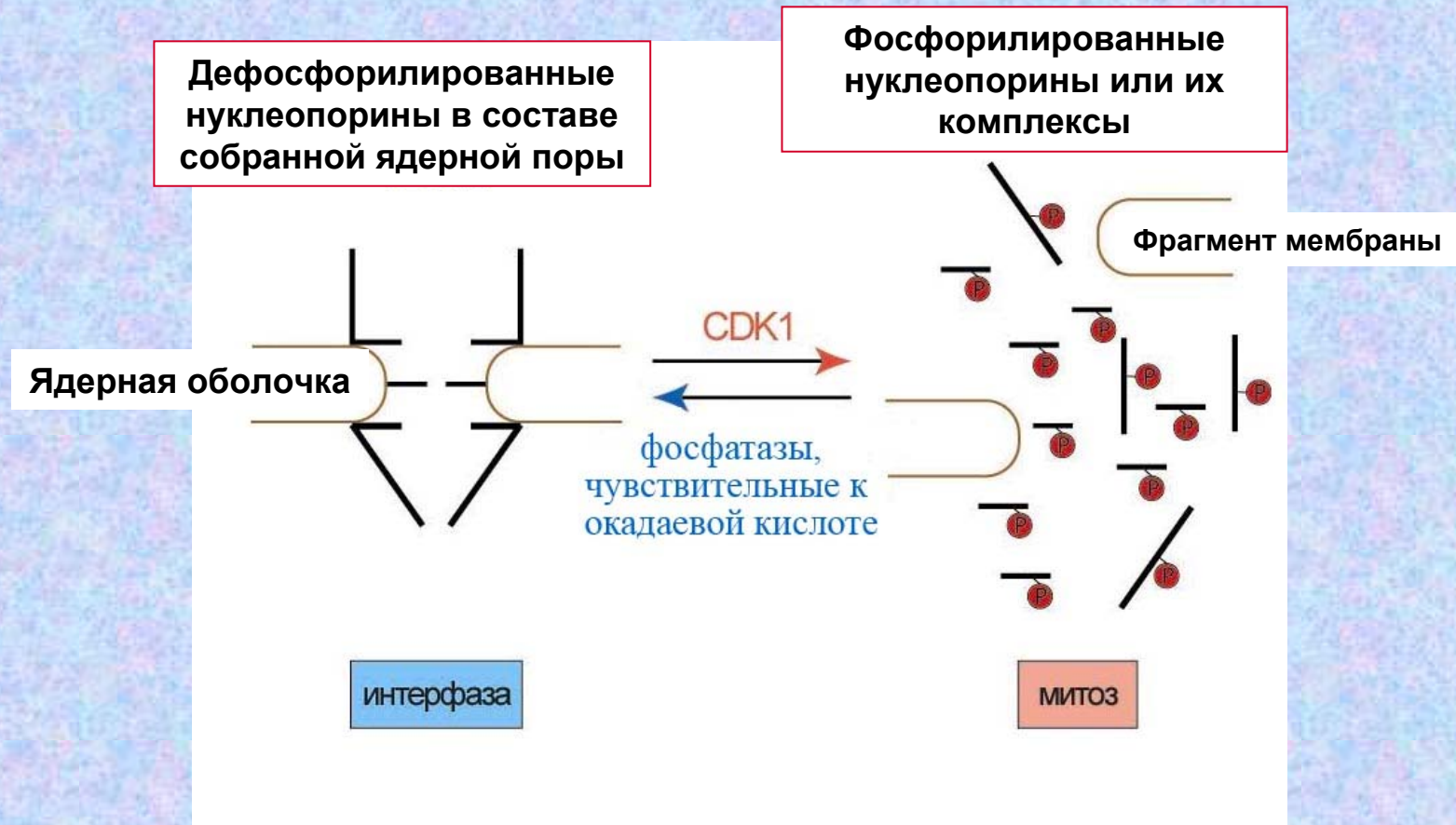
Сборка/разборка ядерных и цитоплазматических пор в эмбрионе на стадии синцитиальной бластодермы (окраска пор с помощью WGA-FITC)

Прижизненная конфокальная микроскопия

Снимки эмбриона после инъекции ооадаевой кислоты и WGA



Модель регуляции митотической реорганизации ядерных и цитоплазматических пор в синцитиальных эмбрионах дрозофилы

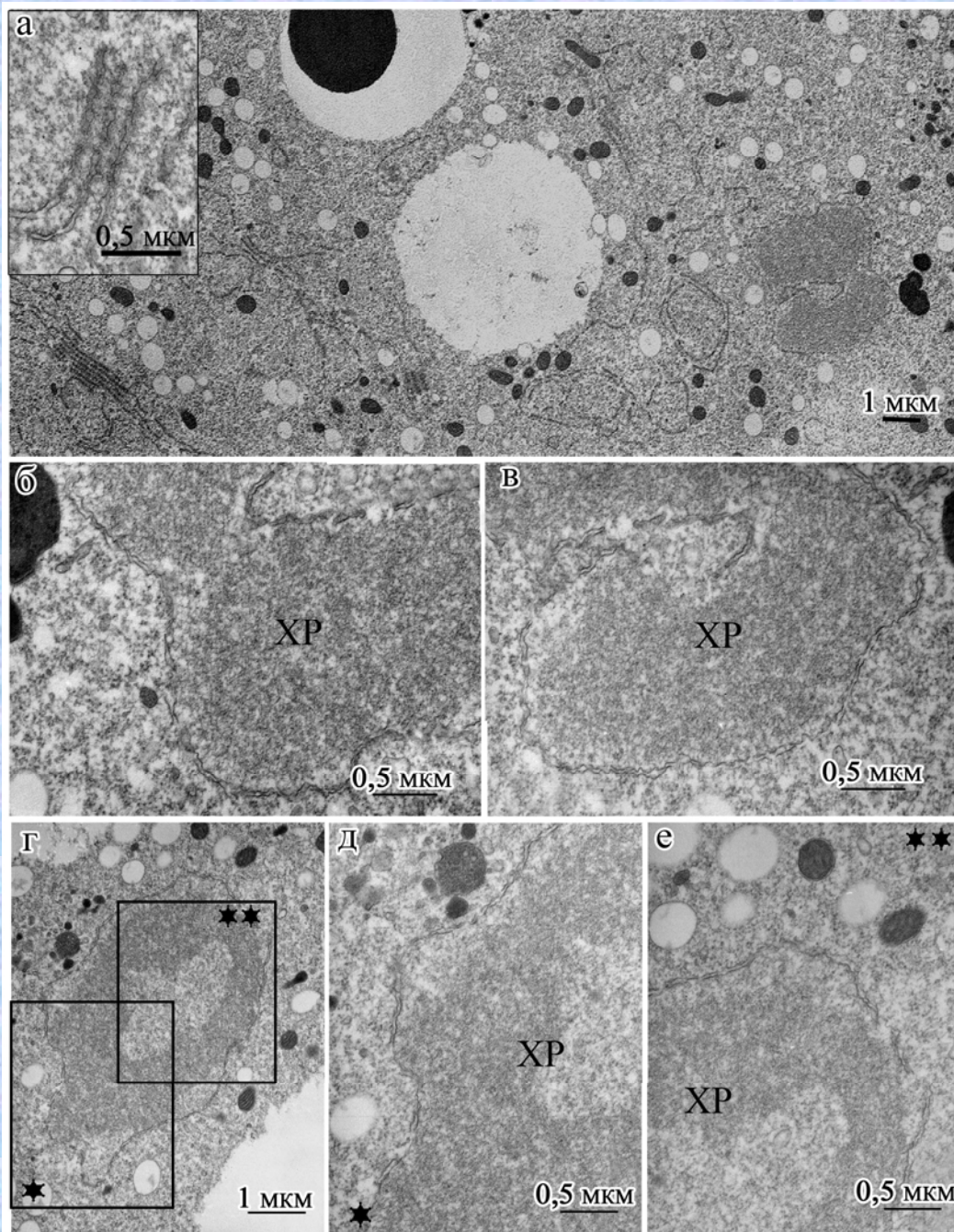


Сборка/разборка ядерных, а также цитоплазматических пор, в синцитиальных эмбрионах дрозофилы регулируется динамическим равновесием между действием митотической киназы *cdk1* и действием фосфатаз, чувствительных к окадаевой кислоте.

Влияние малой ГТФ-азы Ran на сборку ядерных и цитоплазматических пор в синцитиальных эмбрионах дрозофилы

В опытах *in vitro*, показано, что Ran-ГТФ необходим для сборки ядерных пор (Hughes et al., 1998)

Инъекция мутантной формы малой ГТФ-азы Ran (RanT24N) с последующей инъекцией циклогексимида, не влияет на сборку цитоплазматических пор, но ингибирует формирование ядерной оболочки и сборку ядерных пор



Выводы

1. Впервые установлено, что цитоплазматические поры в синцитиальных эмбрионах дрозофилы содержат лишь небольшую часть нуклеопоринов, и не играют существенной роли в сборке ядерных пор. При этом основная часть белков пор присутствует в растворенном виде в цитозоле.
2. Обнаружено, что митотическая киназа cdk1 и циклин B регулируют процесс разборки ядерных и цитоплазматических пор в синцитиальных эмбрионах дрозофилы.
3. Установлено, что сборка ядерных и цитоплазматических пор регулируется фосфатазами и ингибируется оадаевой кислотой, блокирующей действие этих ферментов. Предложена модель митотической реорганизации ядерных и цитоплазматических пор в синцитиальных эмбрионах дрозофилы.
4. Показано, что активность cdk1 снижена в центральной области синцитиальных эмбрионов, что, возможно, вызывает полиплоидизацию желточных ядер.
5. Продемонстрировано, что малая ГТФ-аза Ran участвует в формировании ядерной оболочки и ядерных пор и не оказывает влияние на сборку цитоплазматических пор. Это предполагает существование отличий в механизмах формирования этих структур.

Благодарность

Автор выражает благодарность
научному руководителю работы Е.В.Киселевой,
а также Е.А.Онищенко за проведенные
молекулярно-биологические исследования
и выполнение микроинъекций в эмбрионы дрозофилы.