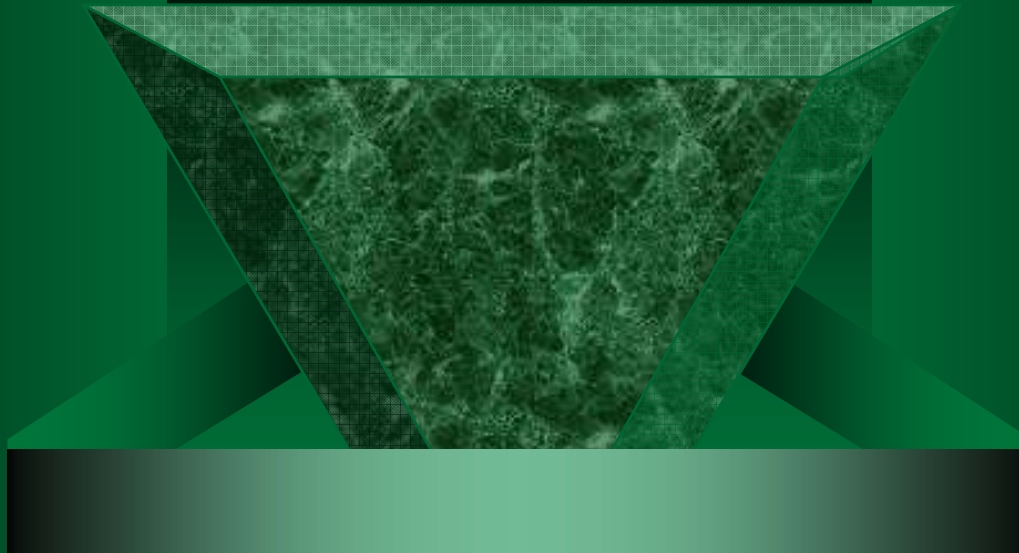


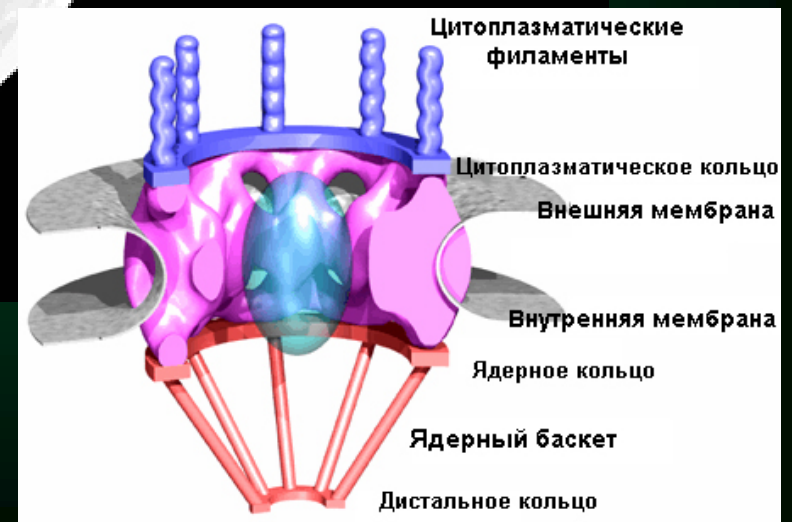
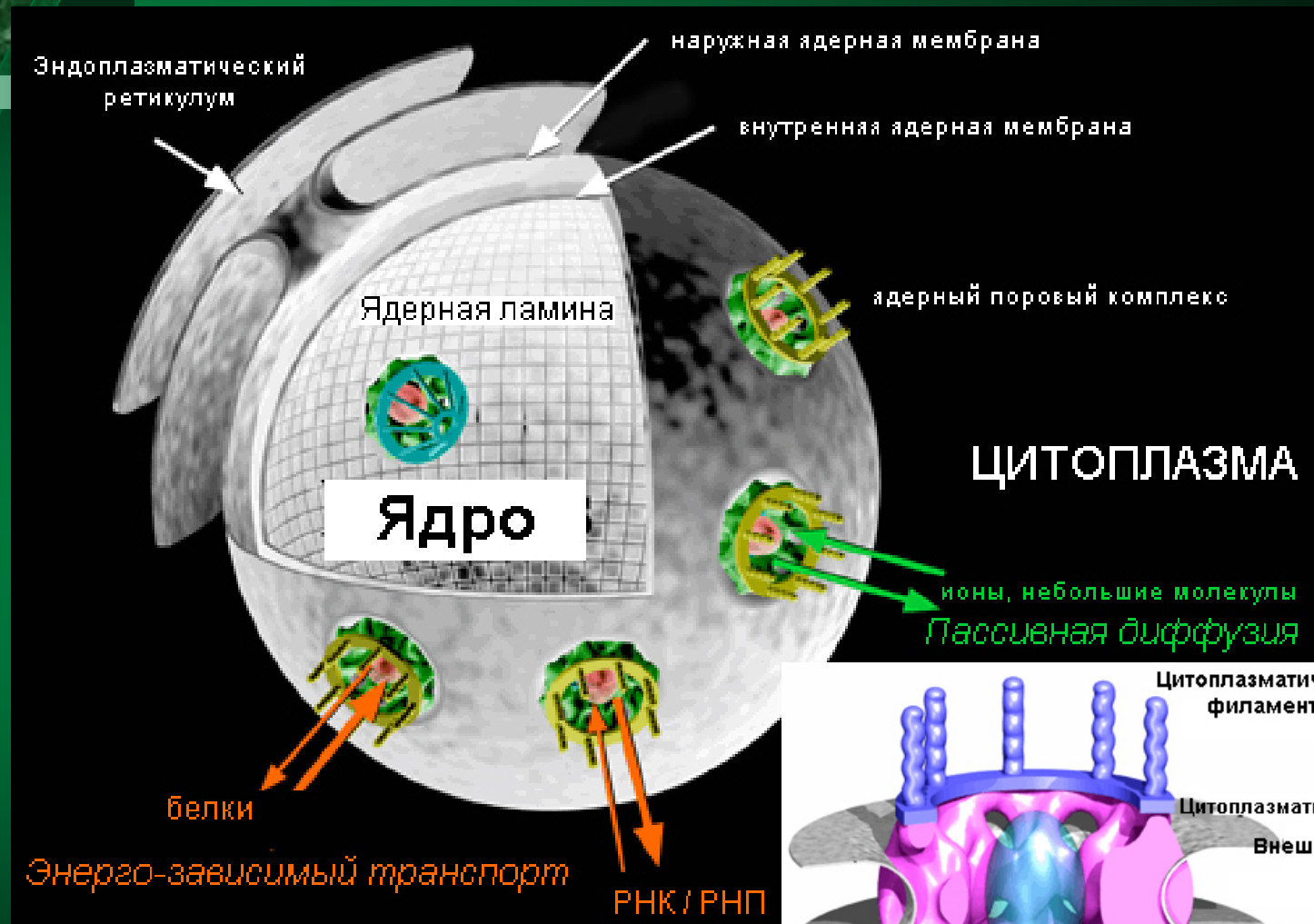


*Электронно-микроскопическое
исследование сборки ядерной оболочки
и ядерных поровых комплексов
в растущих ооцитах амфибий*

Морозова Ксения Николаевна

Лаборатория морфологии и функции клеточных структур
Научный руководитель: к.б.н. Киселева Е.В.

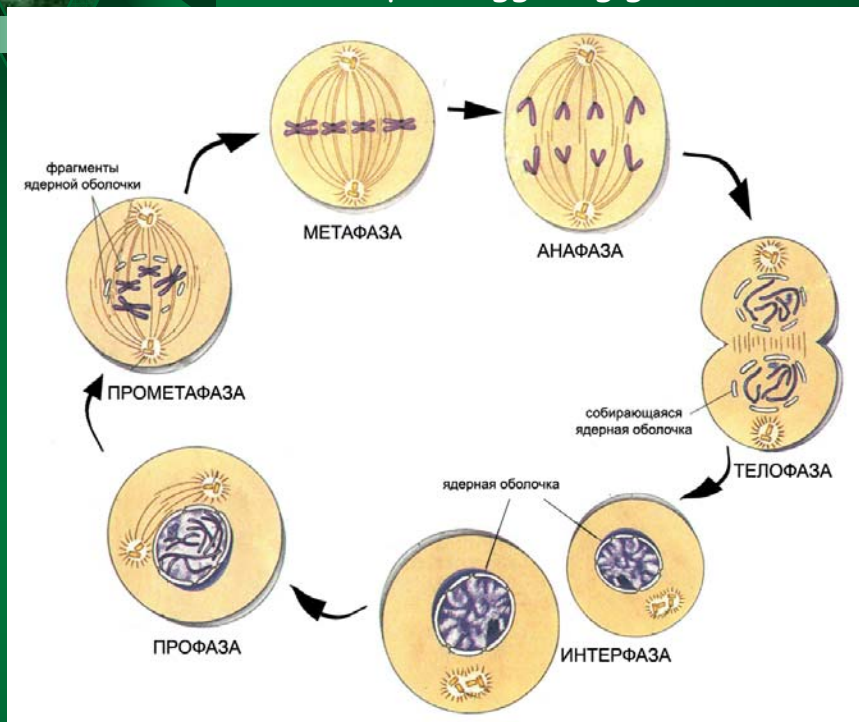
Организация ядерной оболочки и ядерных поровых комплексов



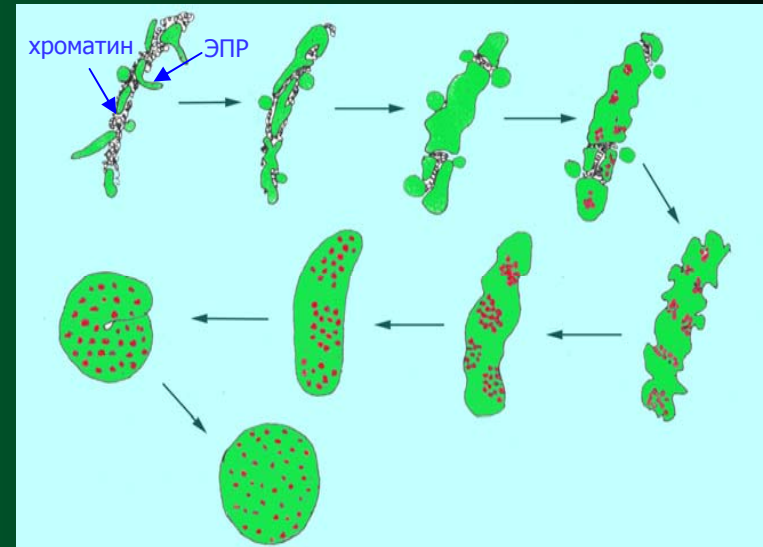
(Aebi et al., 2002)

Особенности поведения ядерной оболочки в делящихся клетках

Схема митоза (<http://taggart.glg.msu.edu/>)

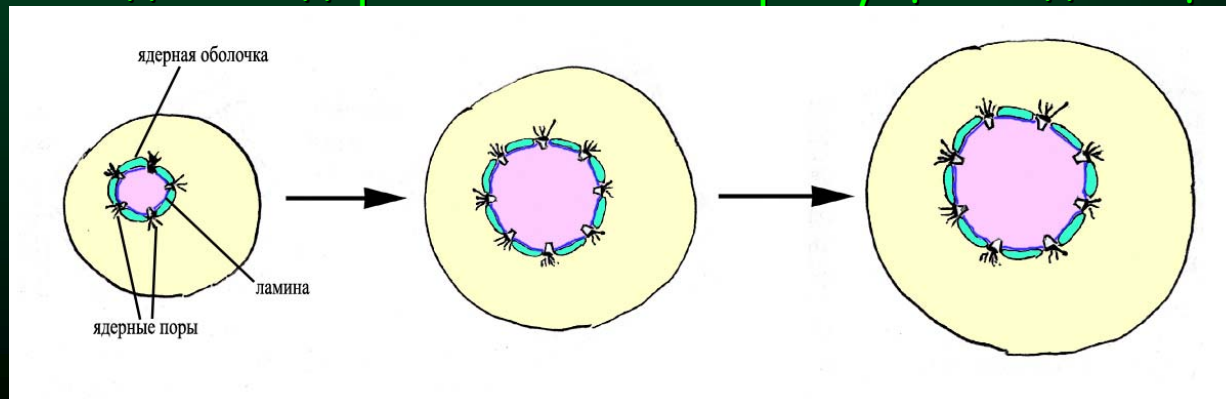


Сборка ядерной оболочки *in vitro*

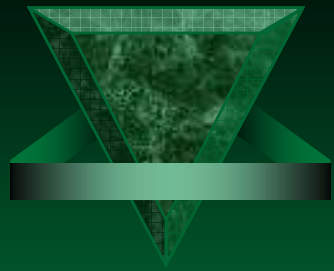


Особенности поведения ядерной оболочки в растущих неделящихся клетках

?



?



Цель исследования:

Выяснить механизм сборки ядерной оболочки и ядерных поровых комплексов в растущих ооцитах амфибий и определить возможное участие внутриклеточных структур в этом процессе.



Задачи:

- ✓ 1. Сравнить ультраструктурную организацию ооцитов амфибий на разных стадиях их развития.
- ✓ 2. Провести морфологический и морфометрический анализ динамики мембран ЭПР в растущем ооците.
- ✓ 3. Оценить возможное участие пористых пластинок, содержащих цитоплазматические поры, в процессе формирования ядерной оболочки.
- ✓ 4. Проанализировать ультраструктурную динамику ядерной оболочки и ядерных пор в процессе роста ядра ооцита, в частности, определить, изменяется ли плотность распределения ядерных пор в ядерной оболочке на разных стадиях оогенеза.
- ✓ 5. Исследовать влияние инъекции антител к нуклеопорину p62, входящему в состав центрального отдела ядерного порового комплекса, на формирование ядерной оболочки и ядерных пор в ооцитах амфибий.
- ✓ 6. Сравнить механизм сборки ядерной оболочки в ооцитах амфибий и в митотически делящихся клетках синцитиальных эмбрионов дрозофилы на стадии интерфазы. На основании полученных данных создать модель формирования ядерной оболочки в растущих неделящихся клетках.
- ✓ 7. Определить локализацию внутриядерного актина и его взаимодействие с ядерной оболочкой.

Объекты исследования:

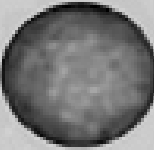
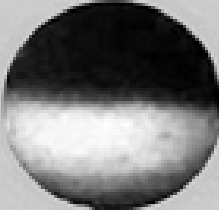
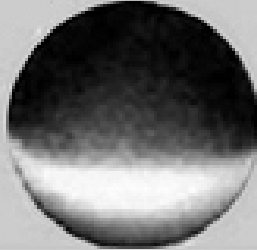
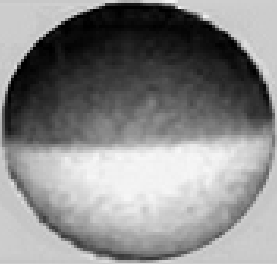


Xenopus laevis

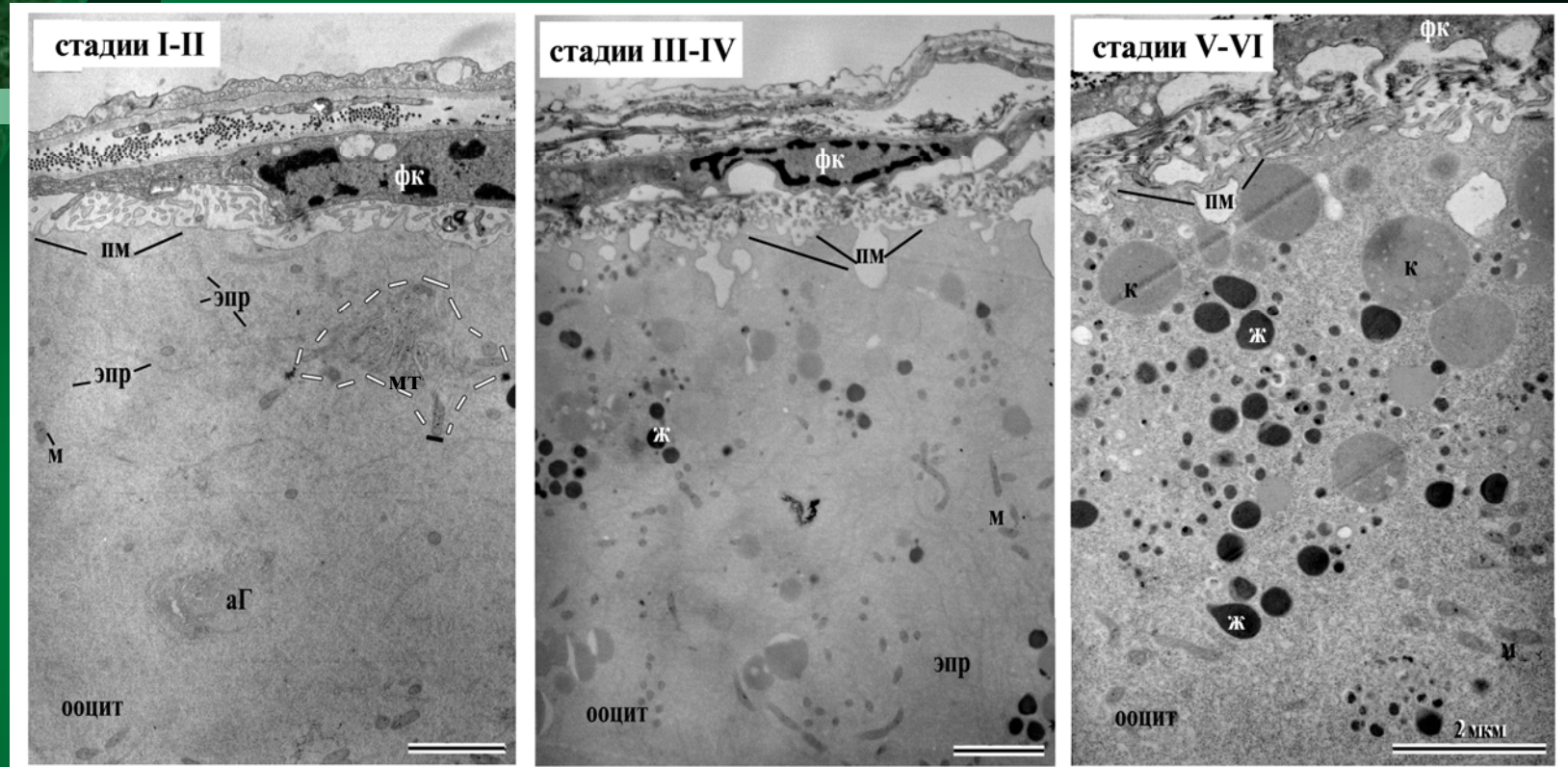


Rana temporaria

Соотношение между стадией развития ооцита, его размером и диаметром ядра.

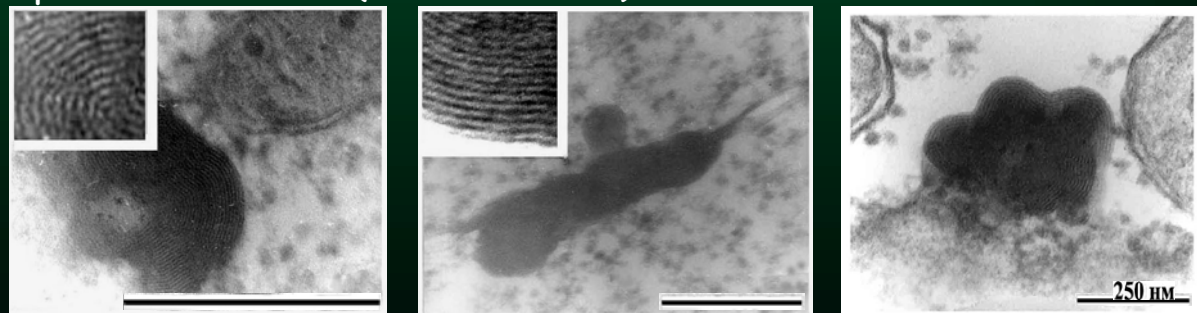
Стадия оогенеза	I	II	III	IV	V	VI
Стадия мейоза I	зиготена	пахитена	диплотена		диакинез	
						
Диаметр ооцита	150-300 μ	300-450 μ	450-600 μ	600-1000 μ	1000-1100 μ	1100-1300 μ
Диаметр ядра	100-150 μ	150-200 μ	200-300 μ	300-400 μ	400-500 μ	500-600 μ

Ультраструктурная организация развивающихся ооцитов амфибий



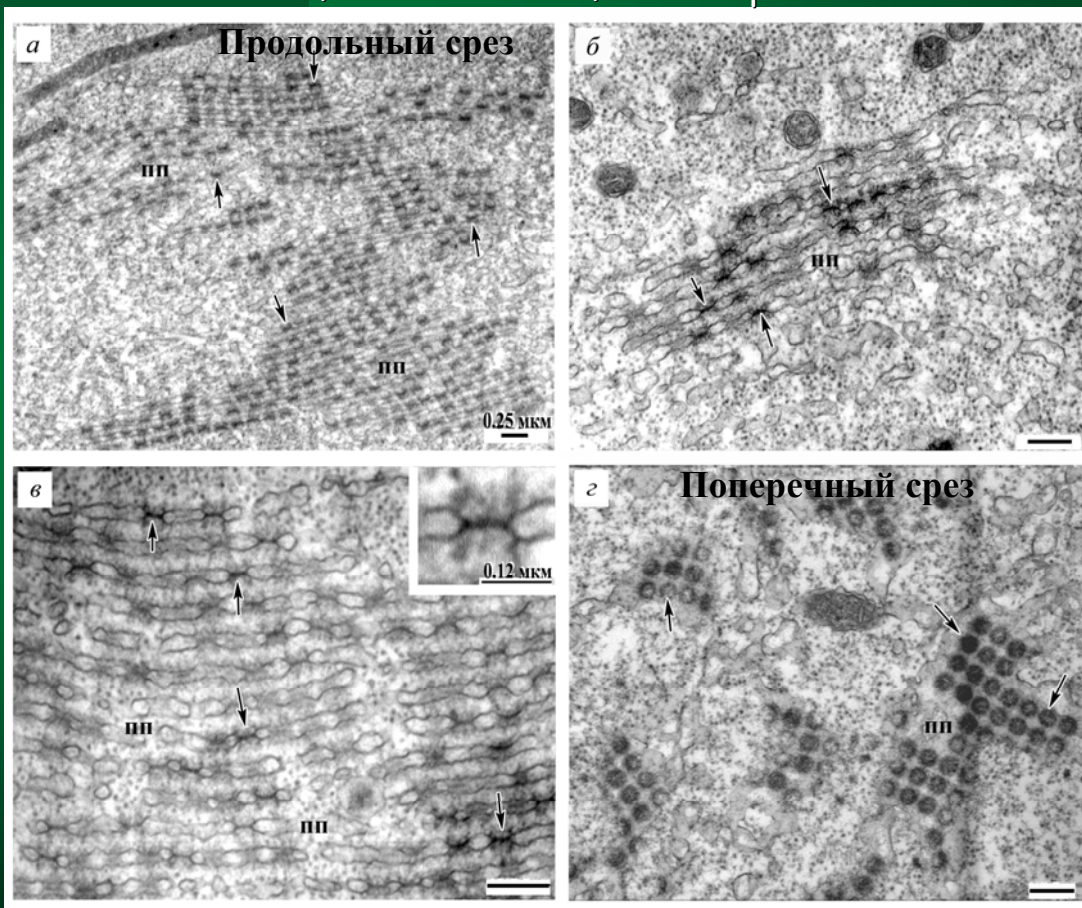
аГ – аппарат Гольджи, ж – желточные гранулы, к – кортикальные гранулы, мт – митохондриальное поле, фк – фолликулярные клетки

Впервые в цитоплазме ранних ооцитов (I-III стадии) выявлены миелоноподобные структуры

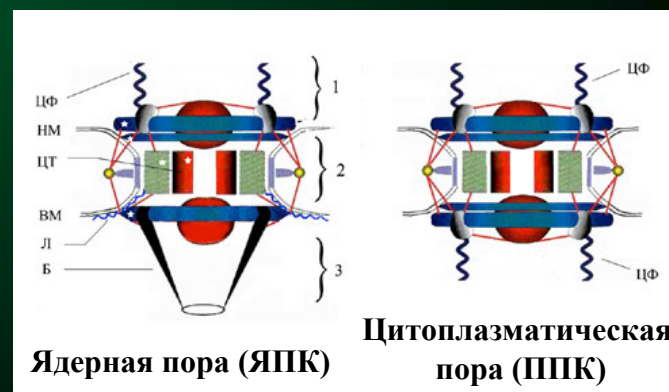
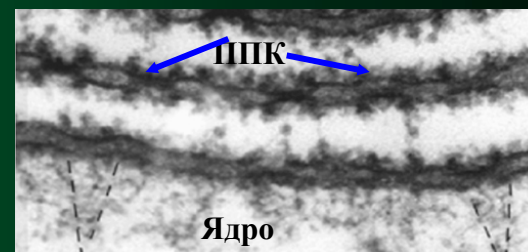
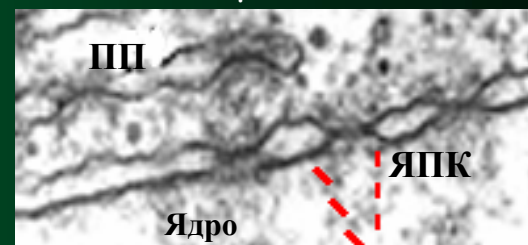


Пористые пластинки - органеллы активно растущих и быстро делящихся клеток, содержащие пороподобные комплексы

Ультраструктура пористых пластинок в цитоплазме ооцитов амфибий



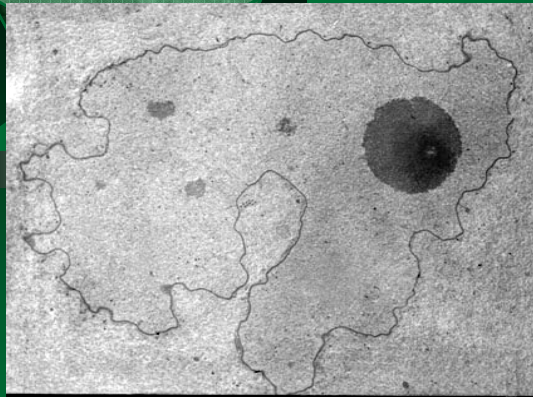
Строение ядерных пор и пороподобных комплексов пористых пластинок



ЦФ - цитоплазматические фибриллы; НМ - наружная мембрана; ВМ - внутренняя мембрана; ЦТ - центральный транспортер; Л - ламина; Б - баскет.

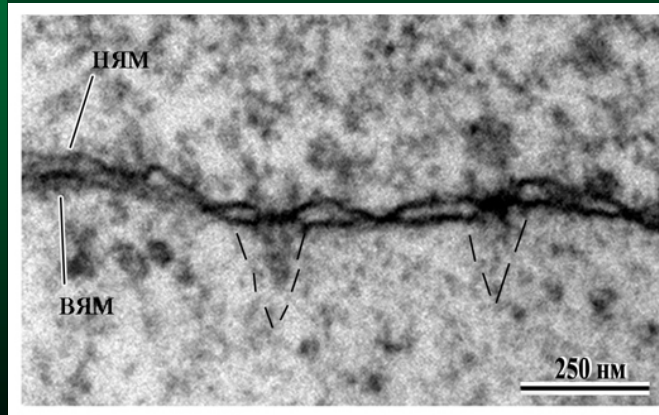
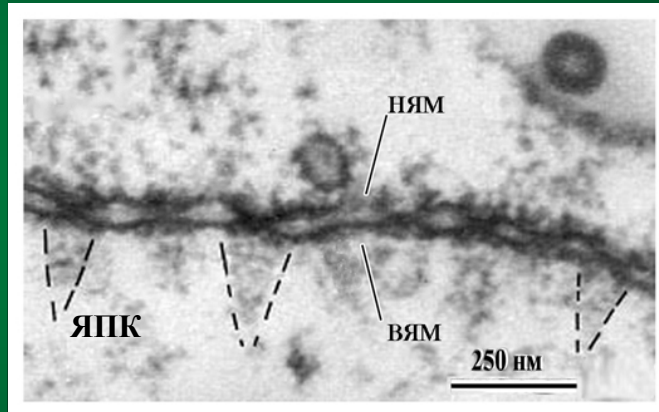
Поперечный срез

Общий вид ядра ооцита

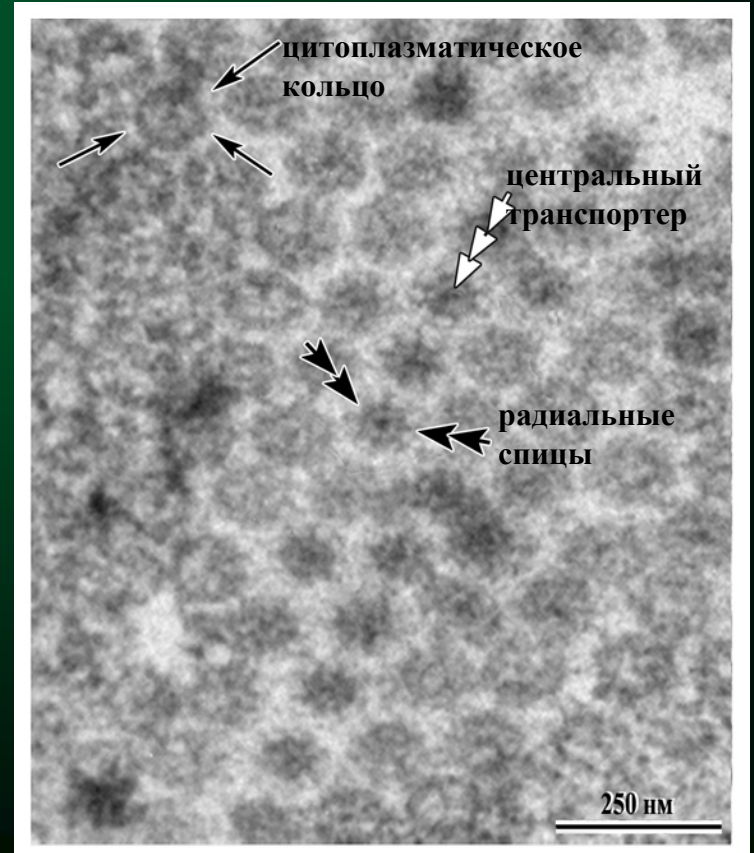


Ультраструктура ядерной оболочки и ядерных поровых комплексов ооцитов амфибий

Ядерные поры на продольном срезе

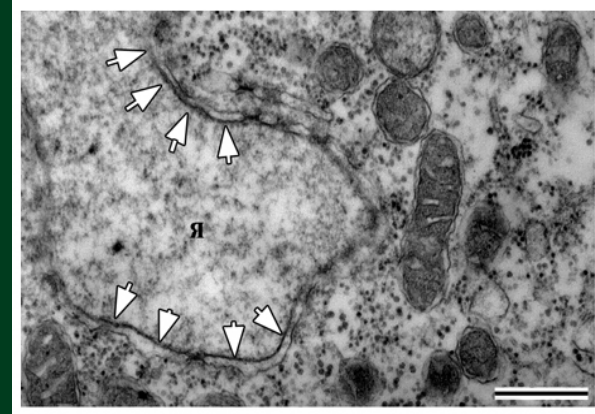
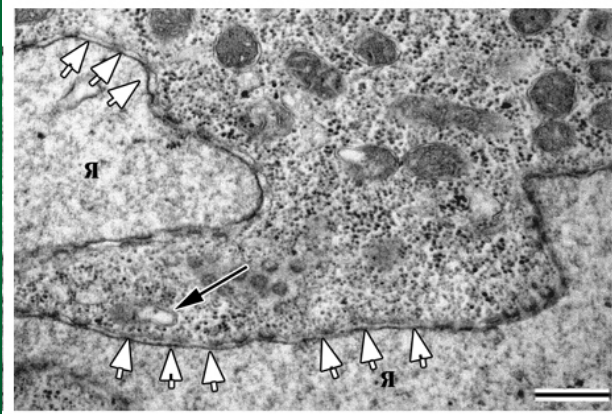
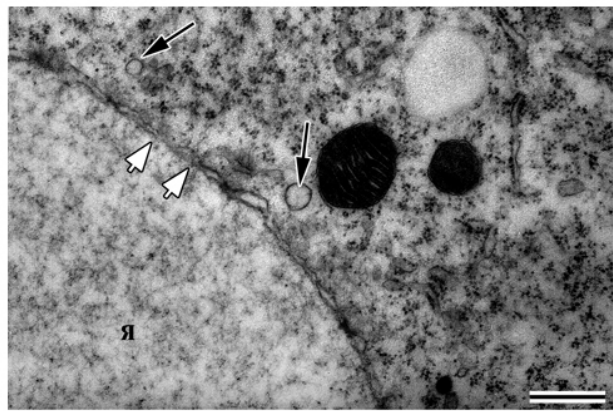


Ядерные поры на поперечном срезе

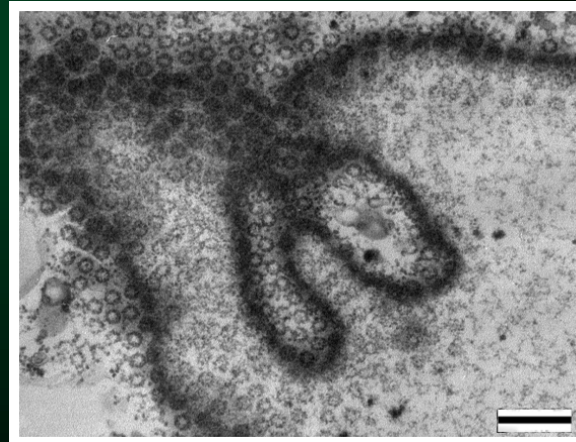
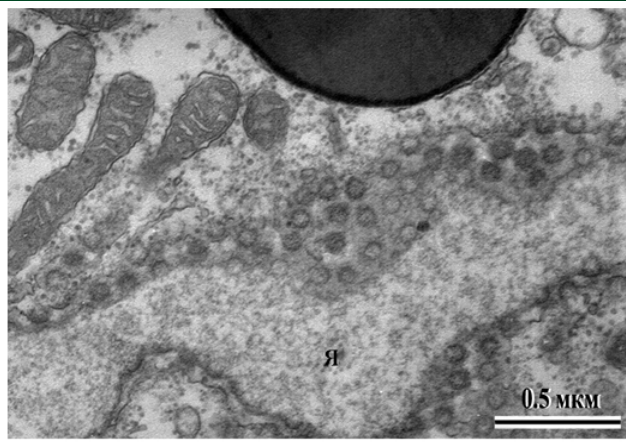
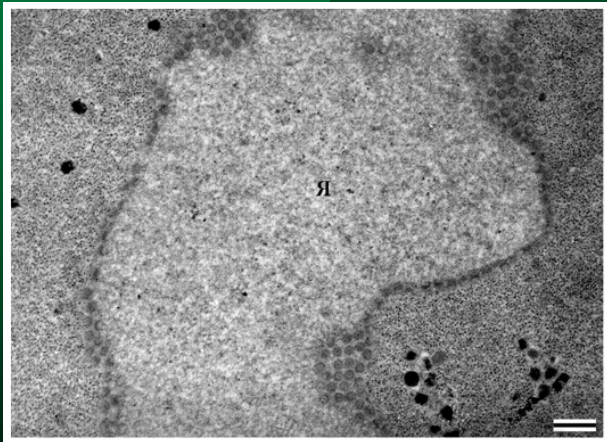


В процессе развития ооцитов амфибий меняется плотность распределения пор в ядерной оболочке

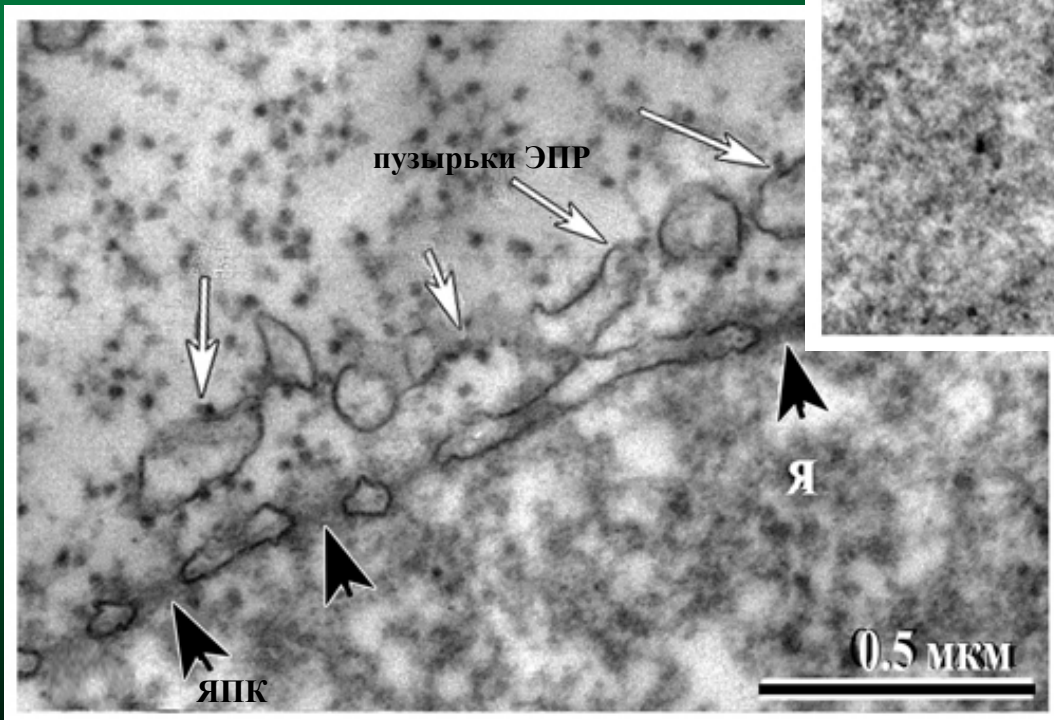
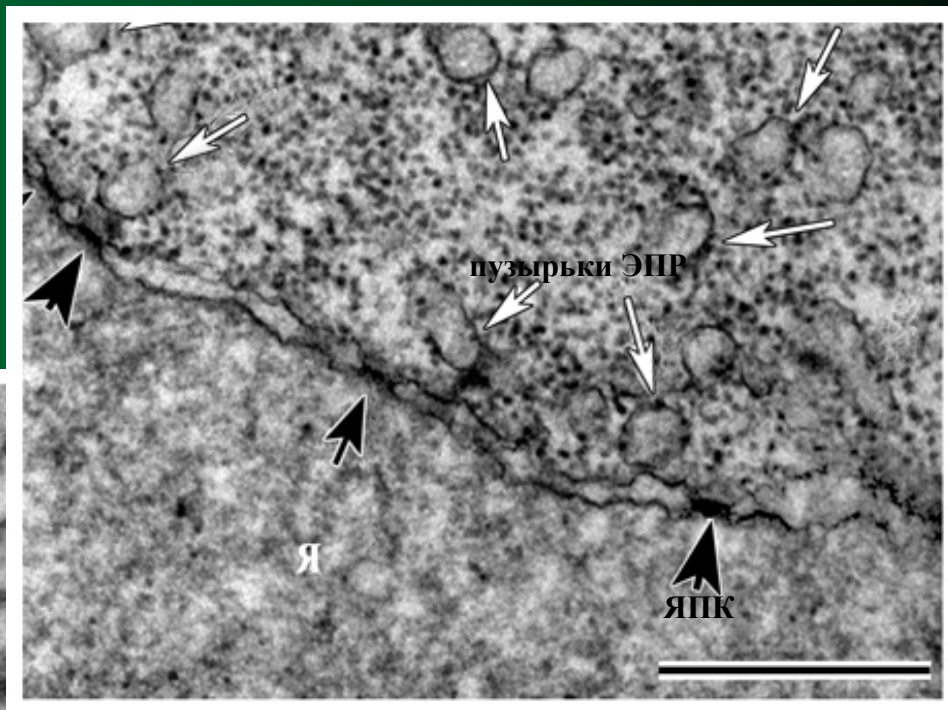
Фрагмент растущей ядерной оболочки ооцита (стадии II-III оогенеза)



Фрагмент зрелой ядерной оболочки ооцита (стадии V-VI оогенеза)

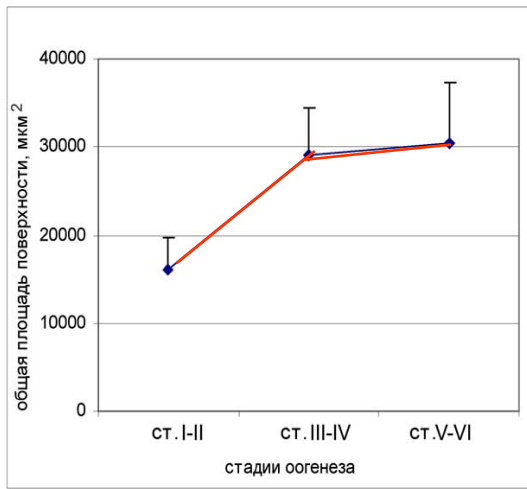


На III-IV стадиях развития многочисленные пузырьки ЭПР контактируют и сливаются с наружной ядерной мембраной ооцита. Вблизи мест слияния наблюдаются фрагменты ядерной оболочки, не имеющие пор.

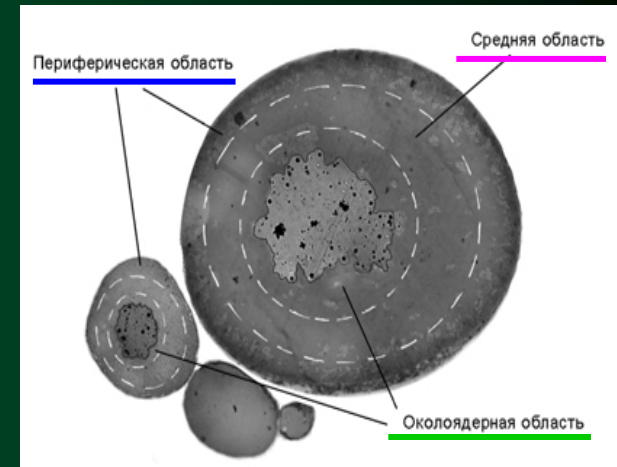
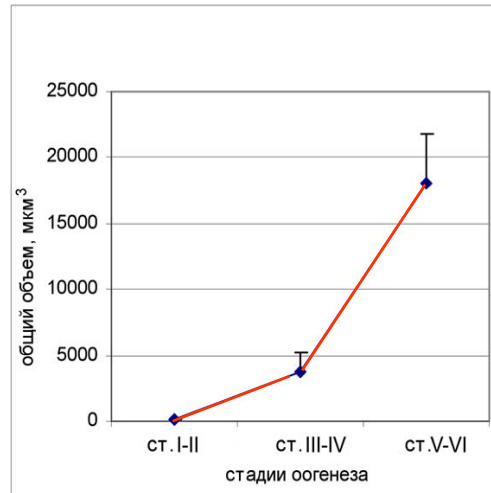


Изменение относительной площади поверхности мембран ЭПР и относительного объема ЭПР на разных стадиях роста ооцита в различных областях цитоплазмы

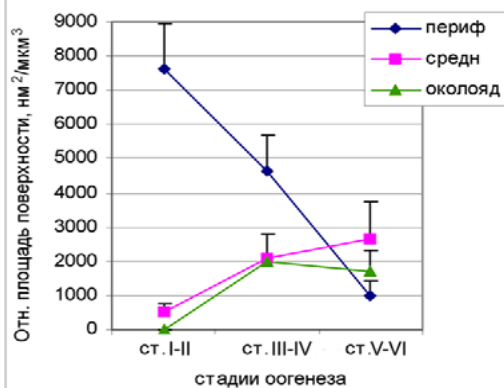
а Общая площадь мембран ЭПР



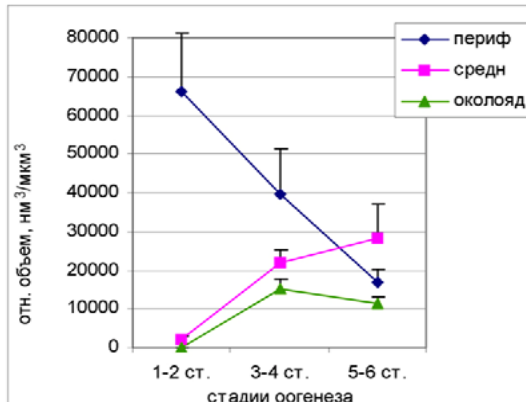
б Общий объем ЭПР



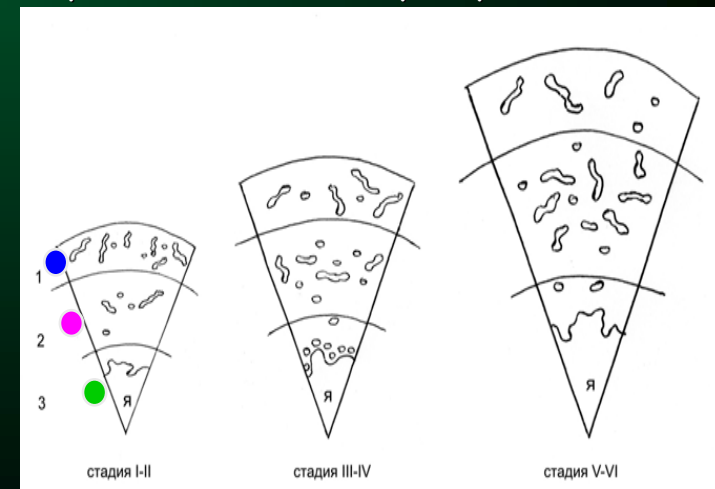
а Относительная площадь мембран ЭПР^б



Относительный объем ЭПР

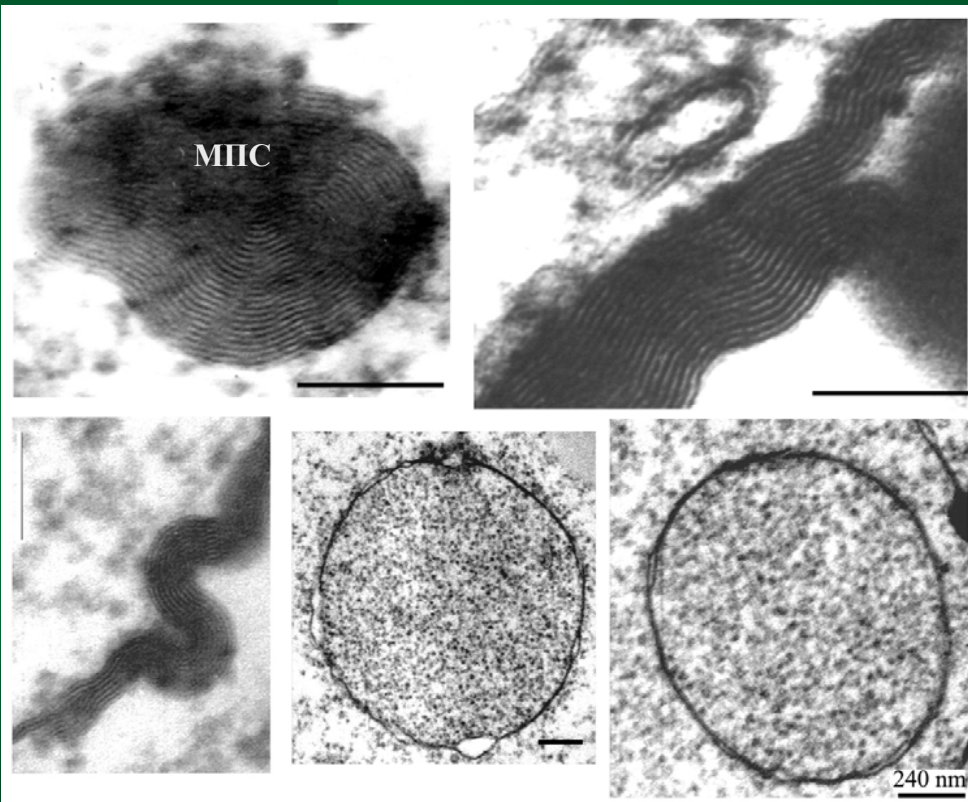


Реорганизация ЭПР в растущих ооцитах

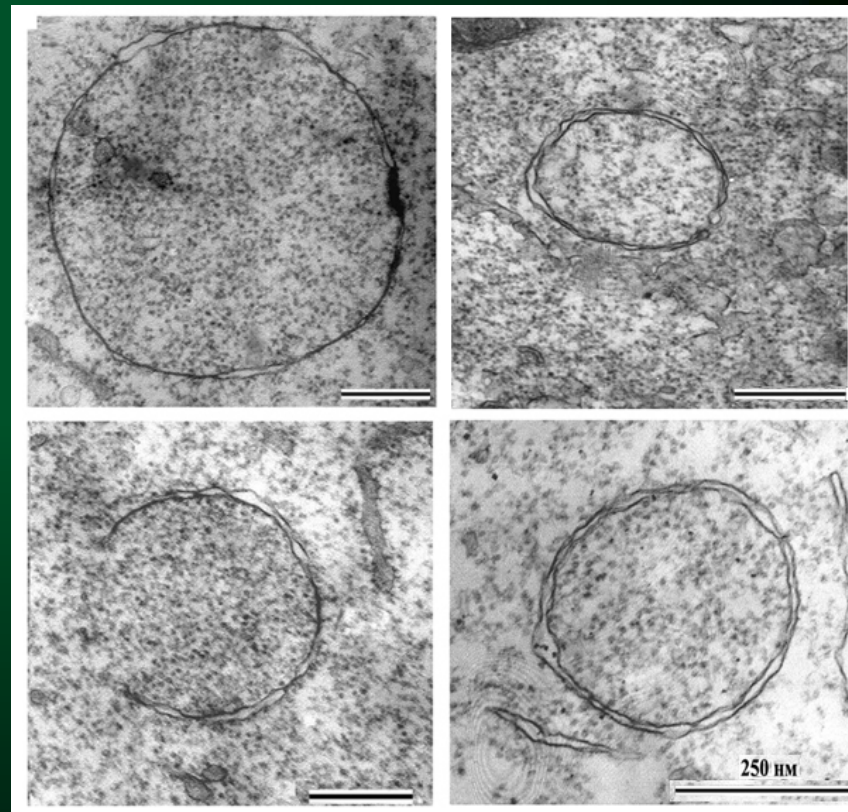


Миелино-подобные структуры (МПС), обнаруженные в ооцитах на ранних стадиях развития, могут разворачиваться в двухслойные мембраны ЭПР.

Последовательные стадии разворачивания МПС

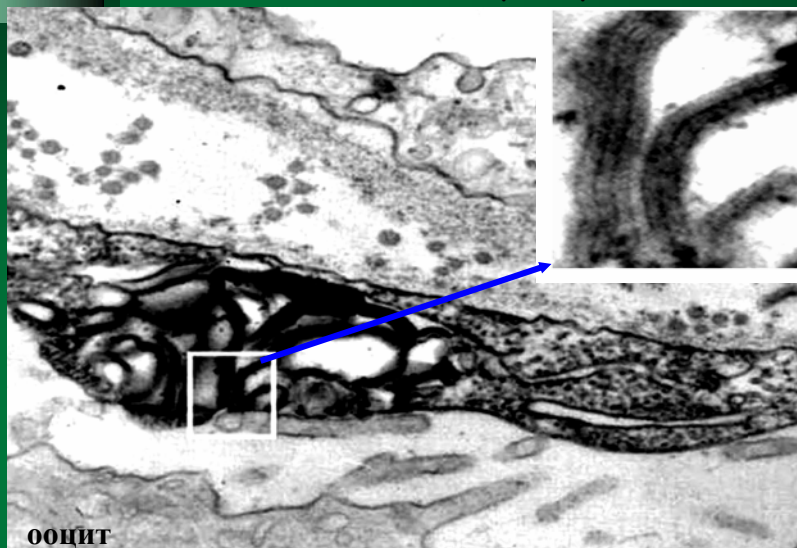


Декомпактизованные МПС

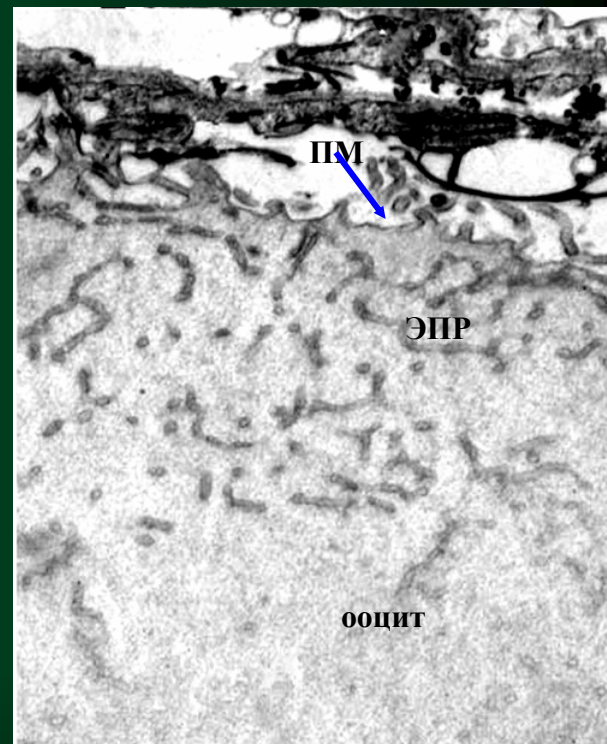


Накопление мембран ЭПР в области контакта миелиноподобных структур с плазматической мембраной ооцита (на I стадии оогенеза)

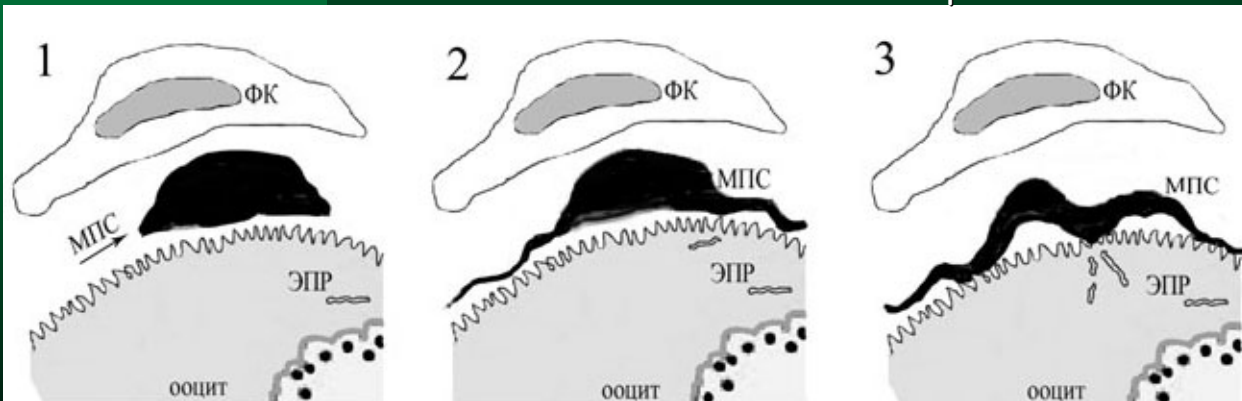
МПС в межклеточном пространстве



Мембраны ЭПР вблизи контакта МПС с плазматической мембраной ооцита



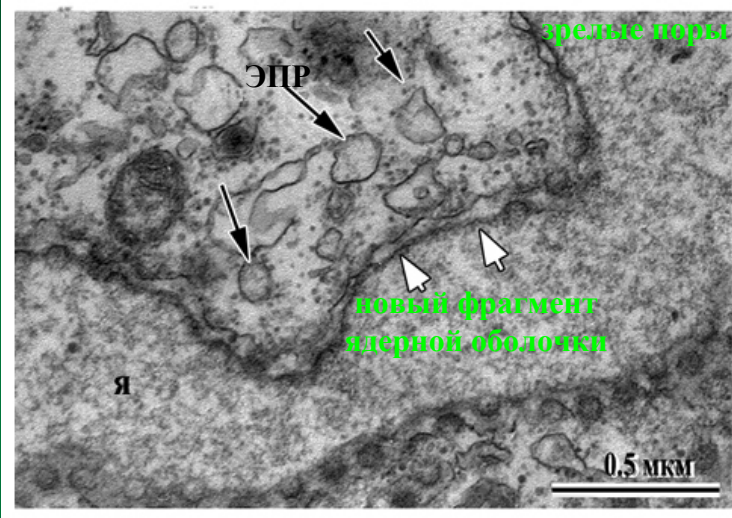
Схематическое изображение накопления ЭПР в области контакта МПС с плазматической мембраной ооцита



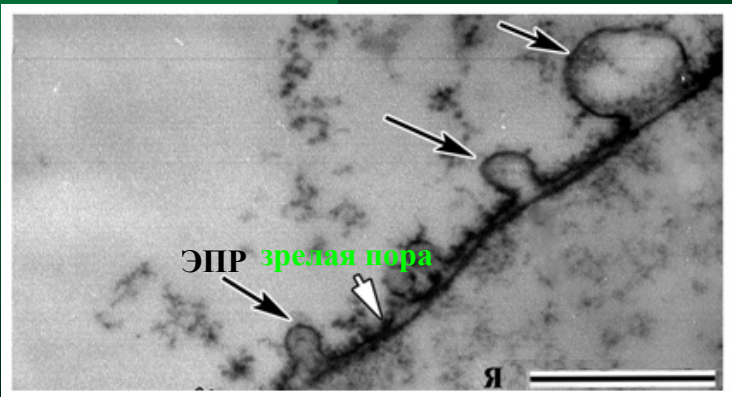
фк – фолликулярные клетки

Пузырьки ЭПР, сливаясь с наружной мембраной ядра, формируют ее новый участок, в котором затем наблюдаются собирающиеся ядерные поры.

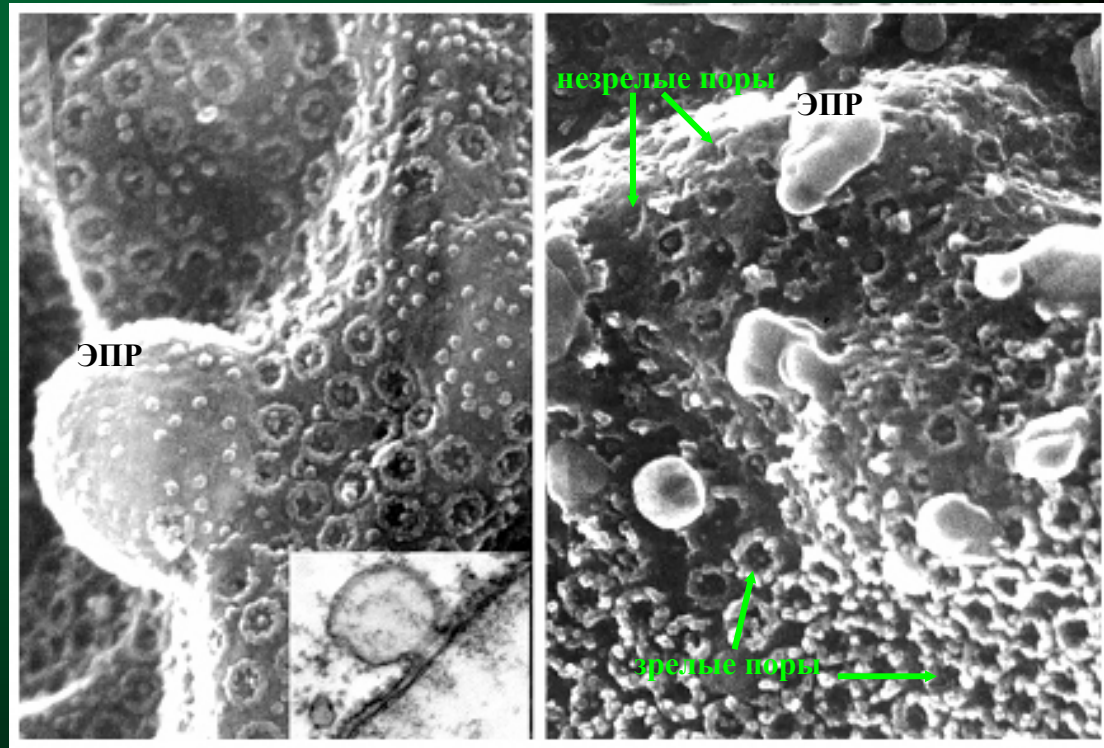
Ядерная оболочка в просвечивающем ЭМ



Ядерная оболочка изолированного ядра



Ядерная оболочка со стороны цитоплазмы в сканирующем ЭМ



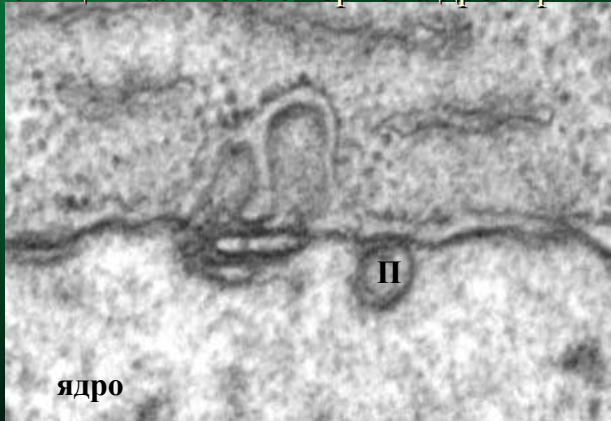
(СЭМ фотографии предоставлены Киселевой Е.В.)

В растущих ядрах ооцитов, как и в интерфазных ядрах дрозифилы, может происходить перемещение мембран ЭПР через ядерные поры внутрь ядра



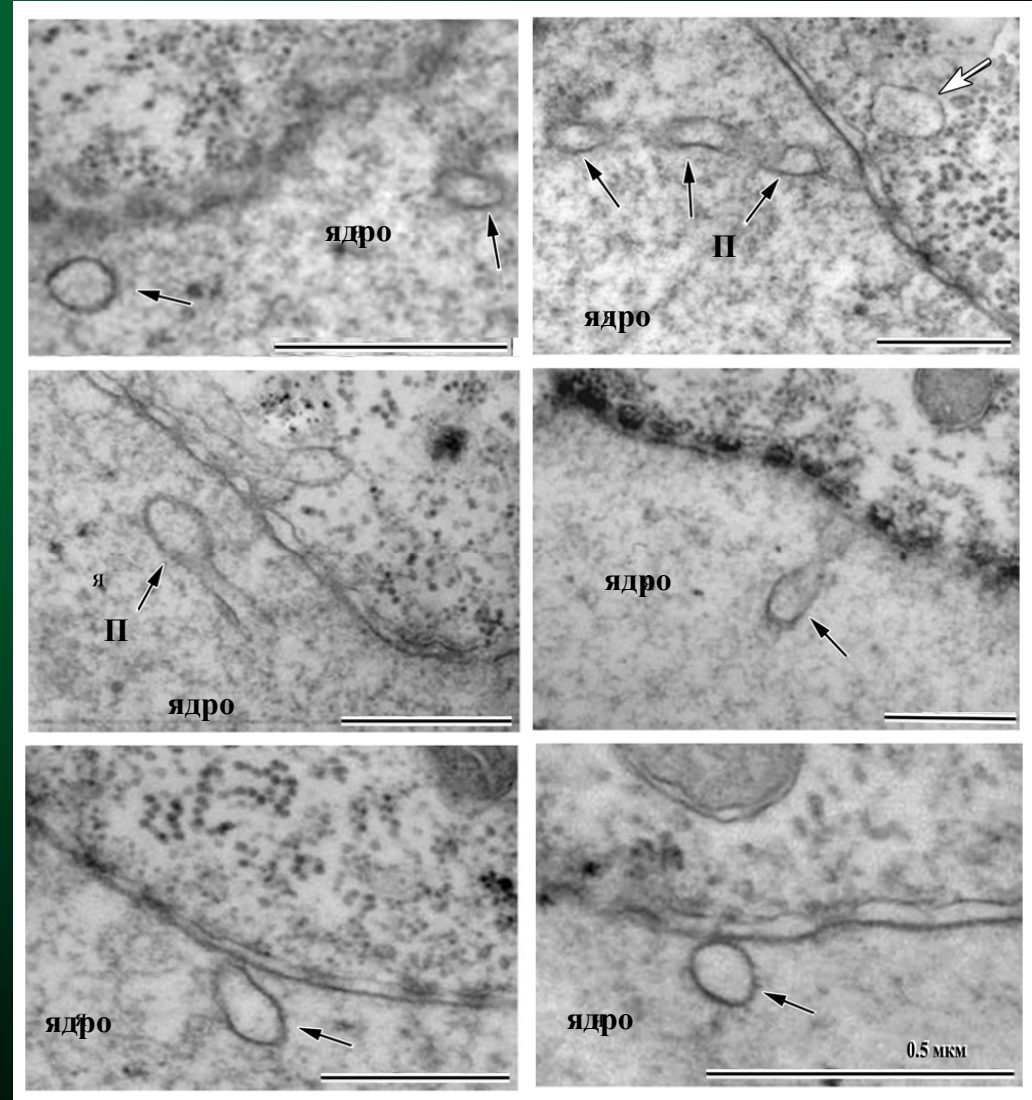
(Киселева Е.В.)

Фрагмент интерфазного ядра синцитиального эмбриона дрозифилы

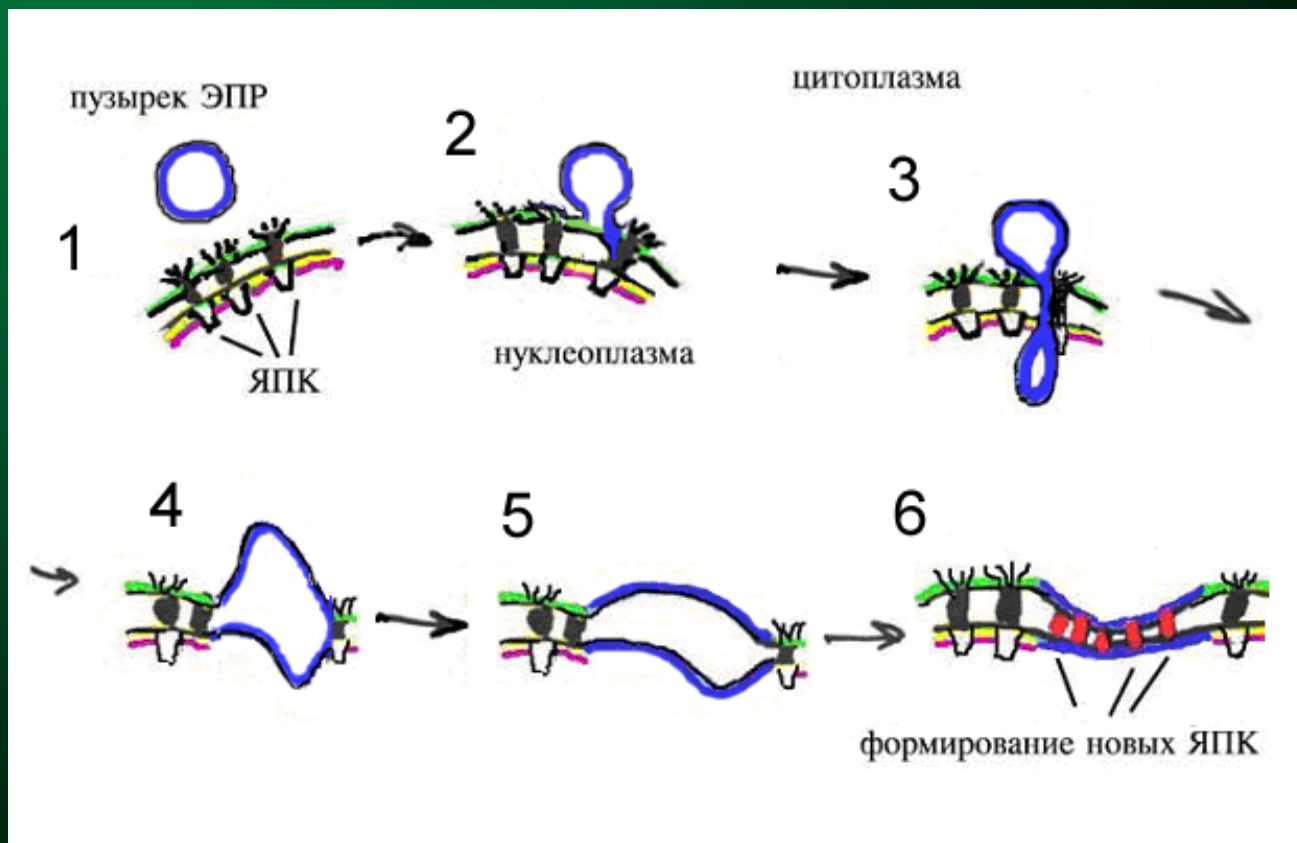


(эмбрионы предоставлены Губановой Н.В.)

Пузырьковидные структуры внутри ядер ооцитов амфибий

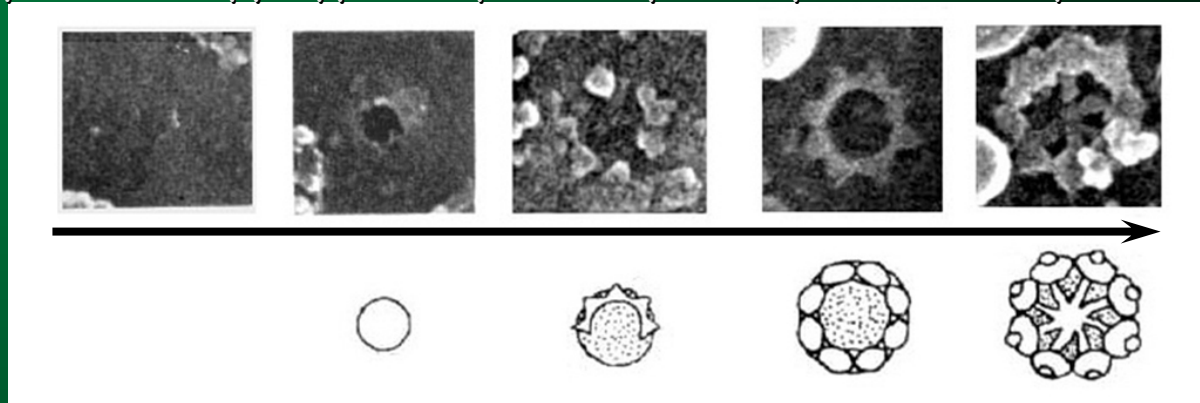


Модель формирования новых фрагментов ядерной оболочки в растущих неделящихся клетках



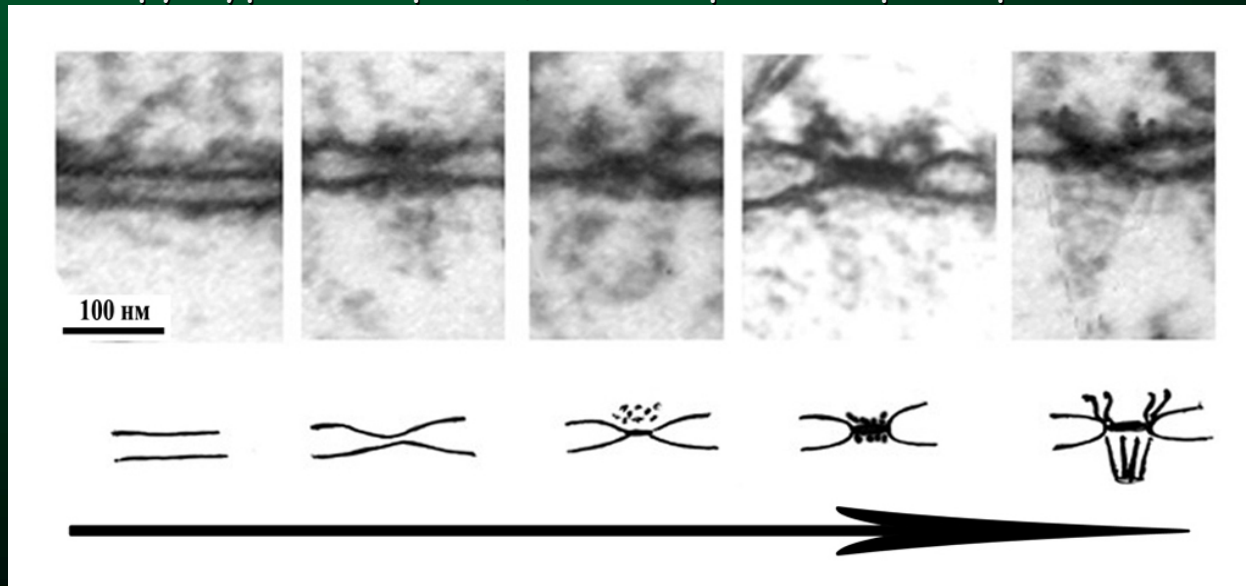
Сборка ядерных поровых комплексов в ооцитах ксенопуса происходит через формирование промежуточных структур.

Промежуточные структуры ядерных пор, собирающихся в условиях *in vitro*

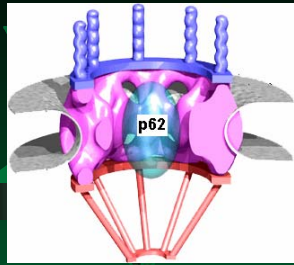


сканирующая ЭМ (Goldberg MW., 1997)

Промежуточные структуры собирающихся ядерных пор на срезах ооцитов ксенопуса

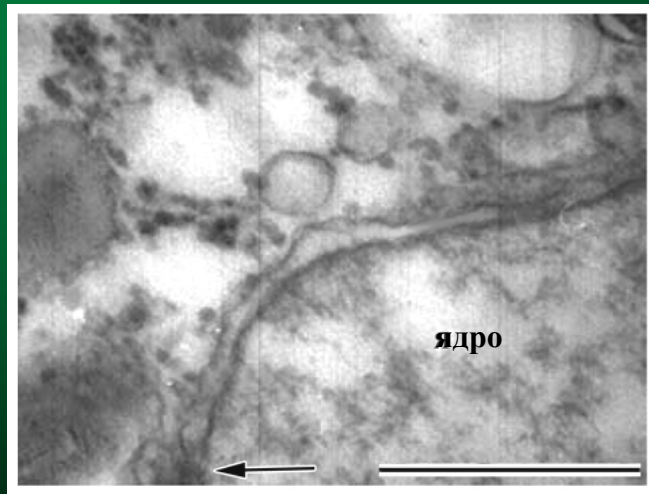
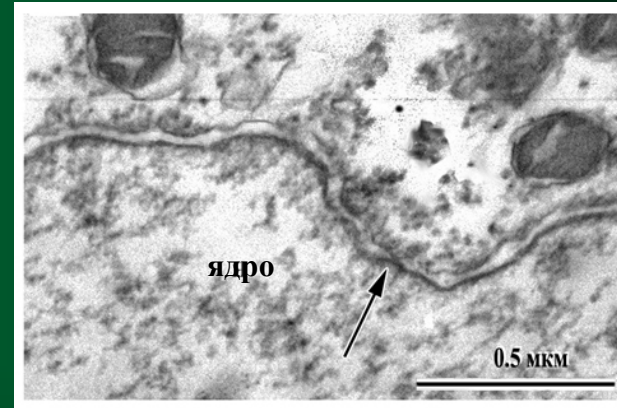
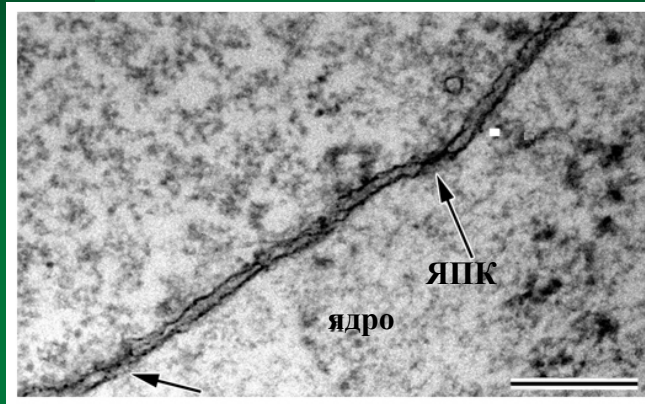


In vivo, просвечивающая ЭМ

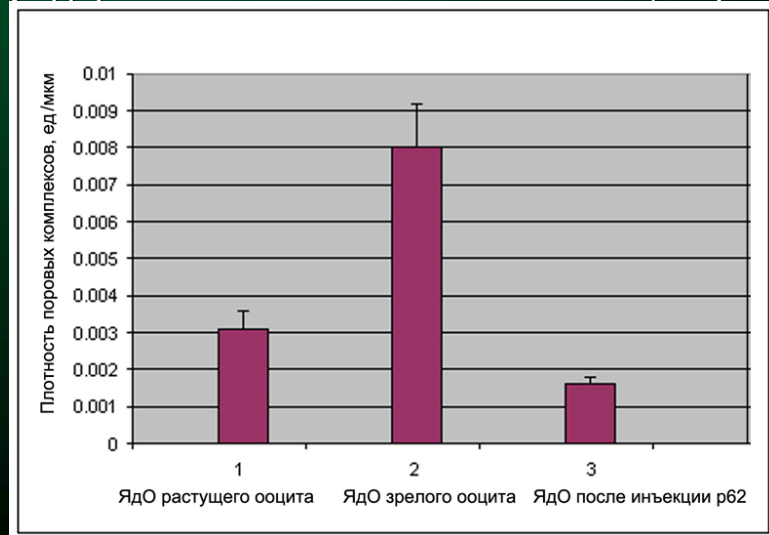


Нуклеопорин р62 вовлечен в начальные этапы формирования ядерных поровых комплексов

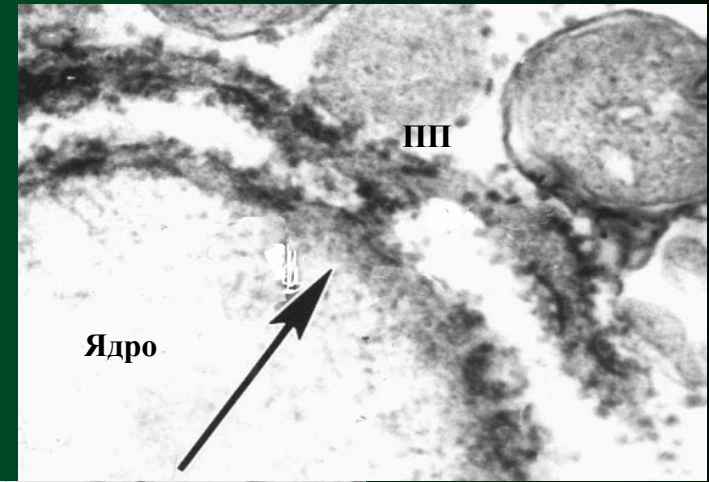
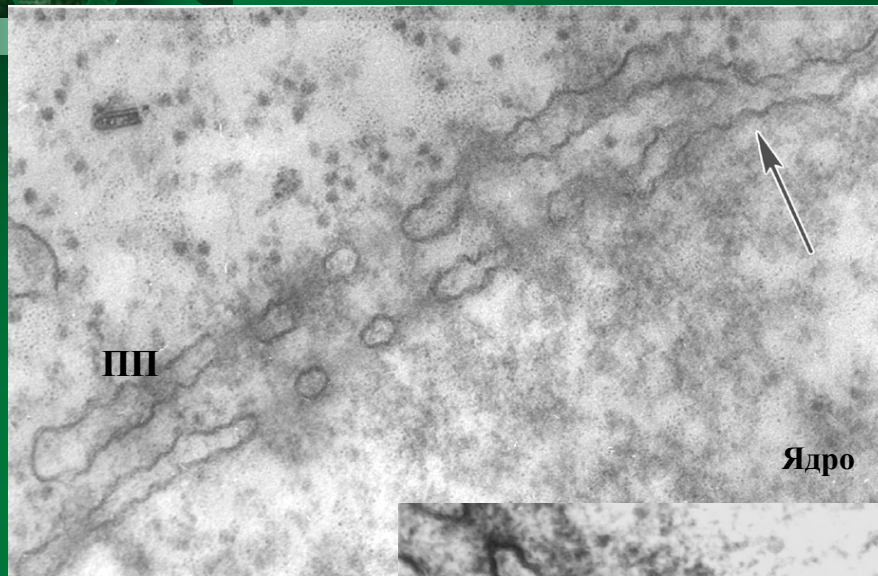
Фрагменты ядерной оболочки ооцитов без пор после инъекции антител к р62 в ооцит



Плотность распределения пор в растущей (1), зрелой (2) ядерной оболочке и после инъекции р62 (3)



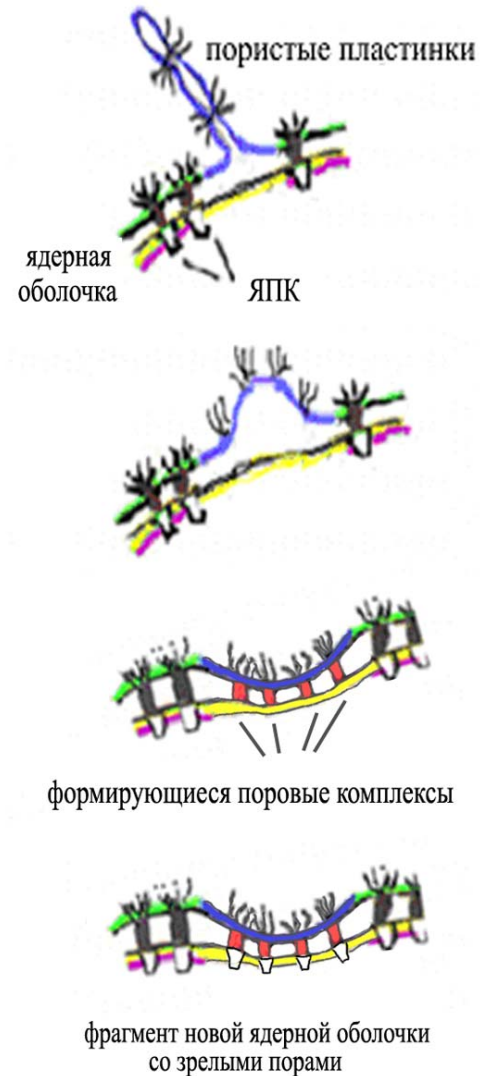
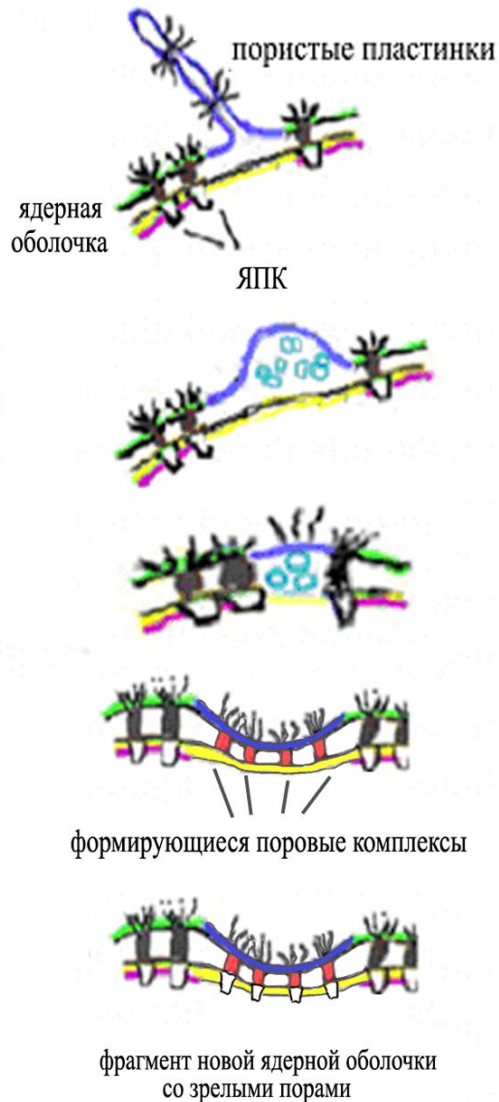
Слияние пористых пластинок с наружной ядерной мембраной ооцитов амфибий



Стрелки отмечают участки слияния пористых пластинок с наружной мембраной ядра

Два варианта возможного использования пороподобных комплексов для формирования ядерных пор

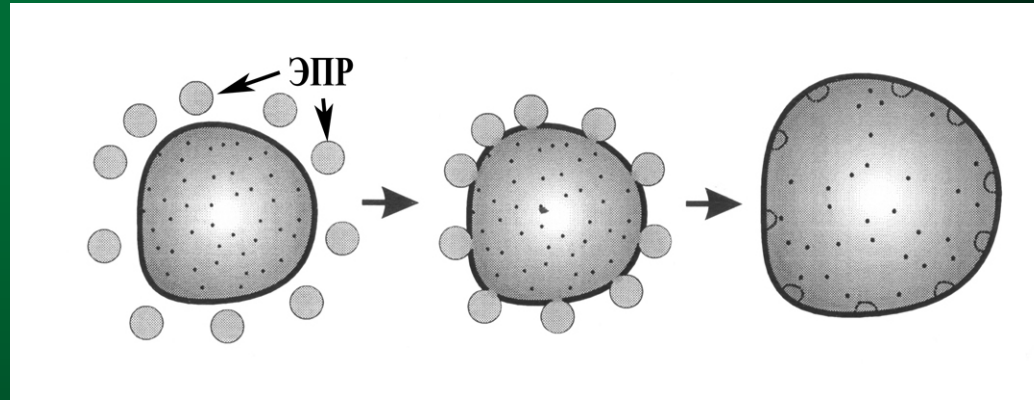
Пороподобные комплексы разбираются на отдельные нуклеопорины, которые встраиваются в собирающуюся ядерную пору



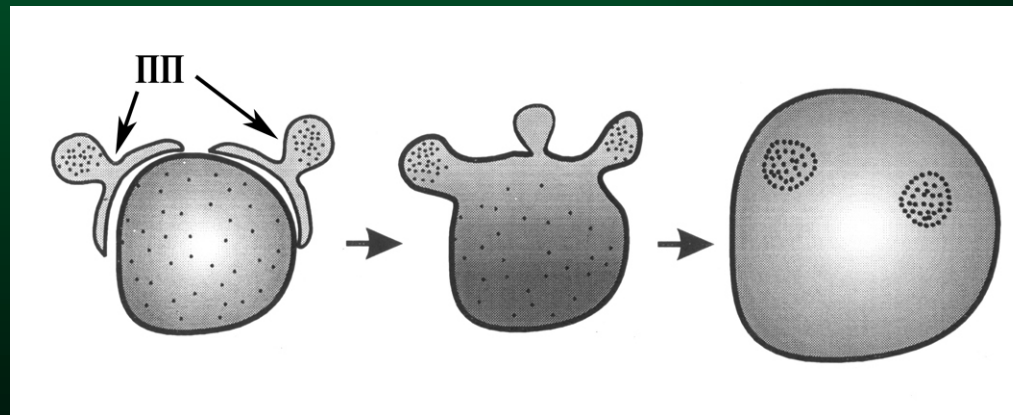
Пороподобный комплекс разделяется на два симметричных отдела, каждый из которых дает центральный и цитоплазматический компонент новой ядерной поры.

Участие цитоплазматических органелл в сборке новых фрагментов ядерной оболочки в ооцитах амфибий

Сборка ядерной оболочки с участием мембран ЭПР



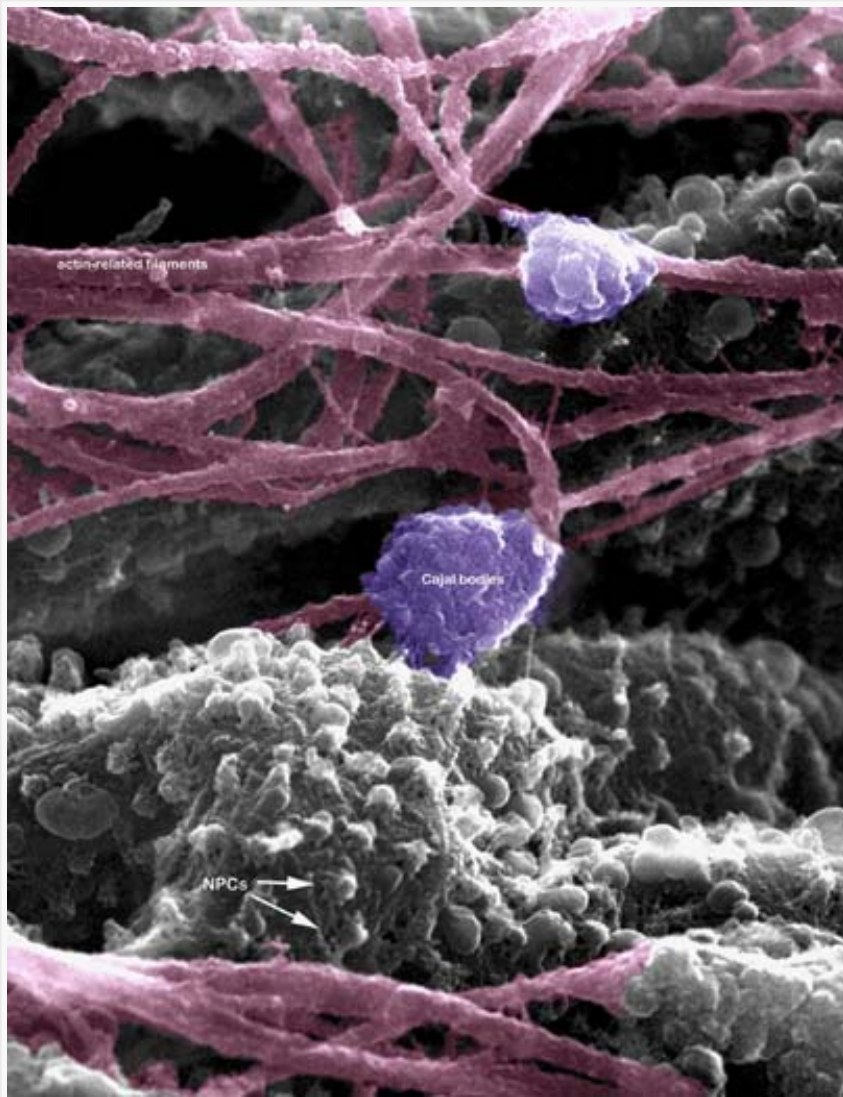
Сборка ядерной оболочки с участием пористых пластинок



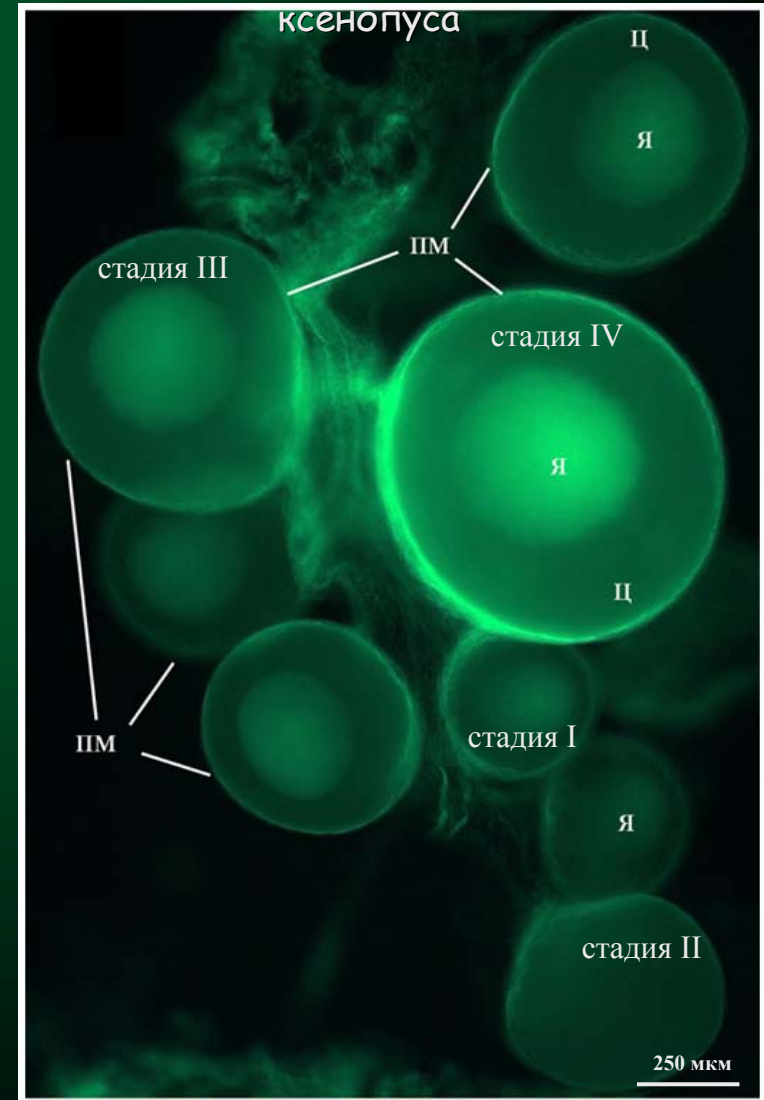
Визуализация актина внутри ядер ооцитов ксенопуса

Актин-содержащие филаменты внутри ядра ооцита ксенопуса (сканирующая ЭМ, Киселева Е.В.)

При окраске фаллоидином филаментный актин выявляется в большом количестве в ядре ооцитов

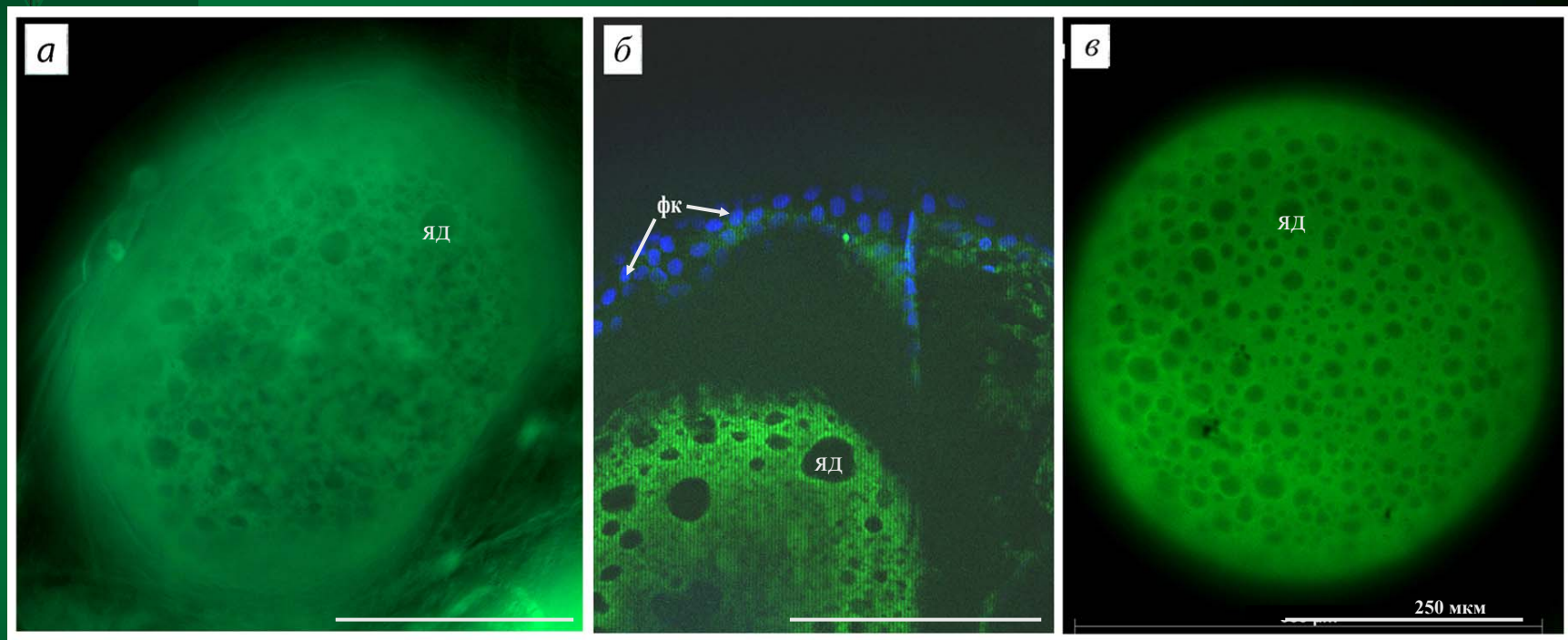


Актин-содержащие филаменты окрашены розовым цветом



ПМ – плазматическая мембрана ооцита; я – ядро, ц – цитоплазма

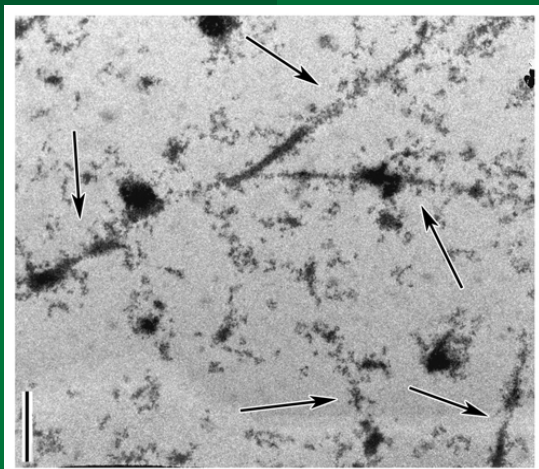
Актин внутри ядер ооцитов распределен по всей нуклеоплазме, окружая многочисленные ядрышки



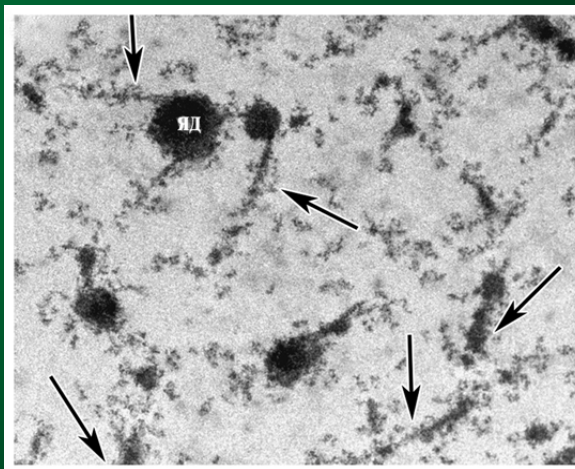
фк - фолликулярные клетки; яд - ядрышки

Актин-содержащие внутриядерные филаменты, выявляемые с помощью специфической фиксации в ядрах ооцитов

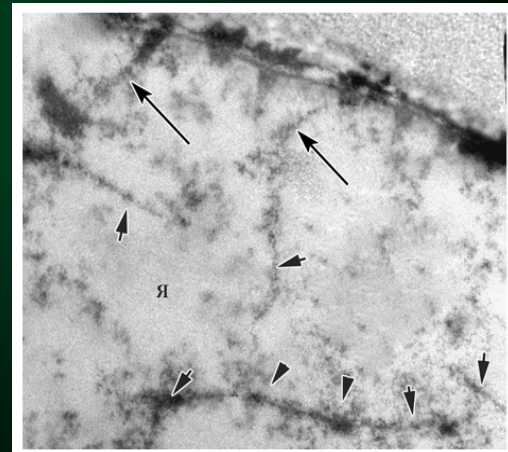
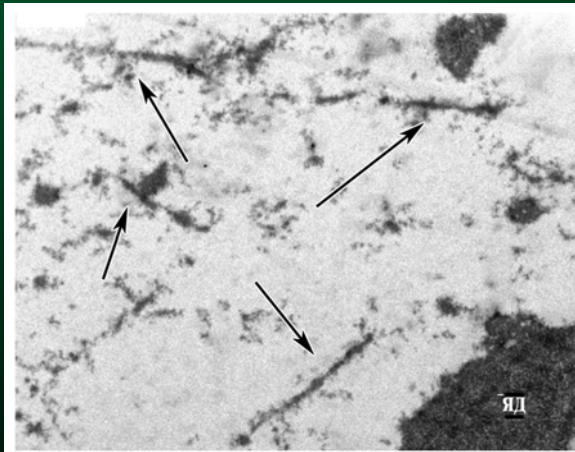
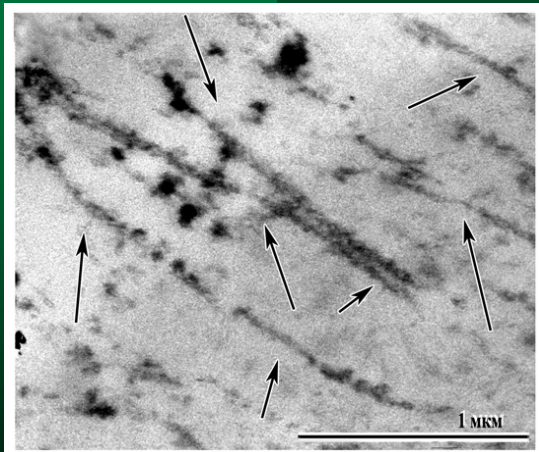
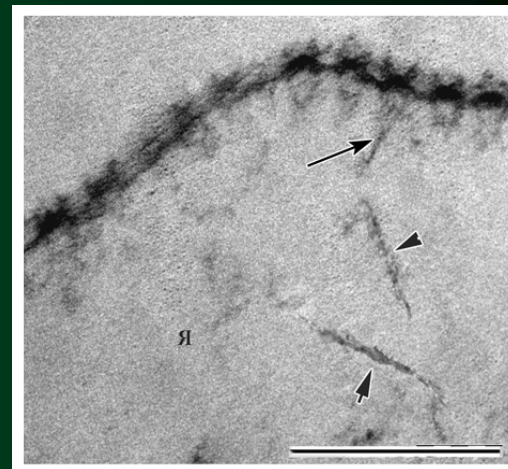
актин-содержащие филаменты
встречаются во всей нуклеоплазме



... вблизи ядрышек



.... в контакте с баскет-
структурами ядерных пор



ВЫВОДЫ:

- Увеличение площади поверхности и объема мембран ЭТР в окооядерной области на 3-й стадии оогенеза может быть обусловлено сборкой новых фрагментов растущей ядерной оболочки.
- Пористые пластинки, входящие в состав ЭТР и содержащие цитоплазматические поры, могут сливаться с наружной мембраной ядра и служить источником мембран и нуклеопоринов для собирающейся ядерной оболочки и ядерных пор.
- В цитоплазме ранних ооцитов амфибий впервые выявлены миелиноподобные структуры, которые могут выполнять роль депо мембран для ЭТР на стадиях интенсивного роста и развития ооцита.
- Сборка ядерных поровых комплексов в ооцитах амфибий происходит через формирование промежуточных структур поры. Блокирование встраивания нуклеопорина p62 в ядерную пору нарушает начальные этапы ее сборки.
- Предложена модель сборки ядерной оболочки в растущих ооцитах амфибий, согласно которой, пузырек ЭТР сливается с наружной ядерной мембраной и частично перемещается через мембранный компонент ядерной поры внутрь ядра. Затем два фрагмента мембраны пузырька сближаются и формируют новый участок ядерной оболочки, в котором иницируется сборка ядерных пор.
- Электронно-микроскопический анализ выявил в ядрах ооцитов ксенопуса актин-содержащие филаменты, контактирующие с ядрышками и ядерными поровыми комплексами. Деполимеризация этих филаментов нарушает морфологию ядра. Предполагается, что данные филаменты могут быть вовлечены во внутриядерный и ядерно-цитоплазматический транспорт, а также в сборку новых фрагментов ядерной оболочки.

Список публикаций:

1. **Семакова К.Н.**, Киселева Е.В. Структурная динамика и взаимосвязь ядерной оболочки и эндоплазматического ретикулума в растущих ооцитах амфибий. Материалы XLI Международной научной студенческой конференции. Новосибирск, 2003. С. 37.
2. **Semakova K.**, Kiseleva E. A new source of membranes in amphibian oocytes. The Third International scientific conference "Actual problems of contemporary biology and biotechnology" Astana, Kazakhstan. 2003. Abstract book. P. 190-191.
3. **Семакова К.Н.**, Киселева Е.В. Миелиноподобные структуры – возможный источник мембран в растущих ооцитах амфибий. Сборник тезисов 7-й Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Россия, Пущино. 2003. С. 41-42.
4. Киселева Е.В., **Семакова К.Н.** Тайны внутриклеточного зодчества. Химия и жизнь. 2003. № 10 : 14-15.
5. **Семакова К.Н.**, Киселева Е.В. Динамика эндоплазматического ретикулума и ядерной оболочки в мейозе у амфибий. Международный Симпозиум по проблемам Мейоза. Санкт-Петербург, 2003. Цитология. 2003. 45(9) : 923.
6. **Семакова К.Н.**, Киселева Е.В.. Миелино-подобные структуры как возможный источник гладкого эндоплазматического ретикулума в ранних ооцитах амфибий. Цитология. 2003. 45(8) : 246-257.
7. **Morozova K.**, Kiseleva E. Cytoplasmic annulate lamellae are specific organelles of actively growing and rapidly dividing cells. Materials of Russian-Chinese Symposium "Life Science". Puschino, Russia, 2004. P. 122.
8. **Morozova K.**, Kiseleva E. New model of nuclear envelope assembly using endoplasmic reticulum vesicles. 8th Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy (8APEM) Kanazawa, Japan. 2004. P. 76.
9. **Морозова К.Н.**, Аллен Т.Д., Киселева Е.В. Исследование механизмов формирования внутренней ядерной мембраны в растущих ооцитах амфибий. III съезд ВОГиС Генетика в XXI: современное состояние и перспективы развития. 2004. Т. II С. 263.
10. **Морозова К.Н.**, Киселева Е.В. Возможная функция окончательных мембран в опухолевых и активно делящихся клетках. Международная научная конференция «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология». Минск, Беларусь, 2004. С. 92-93.
11. **Morozova K.N.**, Kiseleva E.V. Striking myelin-like structures unwrapping in *Xenopus* oocytes: a source of membranes or the store of their excess? 7th Multinational Congress on Microscopy. Portorož, Slovenia, 2005. Abstract book. P. 27.
12. Kiseleva, E, **Morozova, K.**, Goldberg, M.W., Rutherford, S., Allen, T.D. New mechanism of nuclear envelope and nuclear pore assembly in growing nuclei. Abstract Book of the EMBO/FEBS Conference on Nuclear Structure and Dynamics. La Grande Motte, France, 2005. P-081
13. **Морозова К.Н.**, Губанова Н.В., Киселева Е.В.. Структурная организация и возможная функциональная роль пористых пластинок, содержащих цитоплазматические поры. Цитология. 2005. 47 (8) : 667-678.
14. Киселева Е.В., **Морозова К.Н.**, Голдберг М.В., Разерфорд С., Аллен Т.Д.. Новый механизм сборки ядерной оболочки и ядерных поровых комплексов в растущих неделящихся ядрах. Материалы XV Всероссийского Совещания «Структура и функции клеточного ядра». Санкт-Петербург. Цитология. 2005. 47(9) : 814.
15. **Morozova K.N.**, Kiseleva E.V. Defects in nucleo-cytoplasmic transport and nuclear pore complexes assembly caused by *imtin* depletion of *p62* nucleoporin. Matherials of 16th International Microscopy Congress. Sapporo, Japan, 2006. P. 369.
16. **Морозова К.Н.**, Киселева Е.В.. Морфометрический анализ динамики эндоплазматического ретикулума в растущих ооцитах амфибий. Цитология. 2006. 48(12) (принята в печать).
17. Губанова Н.В., **Морозова К.Н.**, Киселева Е.В.. Структурная организация, функция и динамика ядерных пор. Цитология. 2006 (принята в печать).