ОСОБЕННОСТИ СБОРКИ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ В ПРОЦЕССЕ МИТОЗА В РАННИХ ЭМБРИОНАХ DROSOPHILA MELANOGASTER

А.А. Струнов¹, Е.А. Онищенко², Е.В. Киселева¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: elka@bionet.nsc.ru; ² Лаборатория молекулярной и клеточной биологии, Калифорнийский университет, Беркли, Калифорния, США

В настоящей работе проведено ультраструктурное исследование ядерной оболочки делящихся ядер эмбрионов дрозофилы на стадии синцитиальной бластодермы. Ранее было показано, что митоз в ранних эмбрионах Drosophila melanogaster является полузакрытым и ядерная оболочка разбирается полностью только на полюсах веретена деления, а в остальных участках формируется двойная (spindle) оболочка (Stafstrom, Staehelin, 1984). Нами установлено, что на стадии метафазы ядерная оболочка разбирается полностью на пузырьки/везикулы и короткие мембраны, формирующие широкий слой вокруг нуклеоплазмы. Сборка ядерной оболочки дочерних ядер начинается на стадии поздней анафазы и сопровождается формированием протяженных стопок мембран шероховатого эндоплазматического ретикулума при участии компонентов предшествующей оболочки. Везикулы и стопки двухслойных мембран располагаются сначала радиально по периферии ядра, а затем перемещаются в нуклеоплазму и тесно контактируют с компактизованными хромосомами. Впервые обнаружено, что новые фрагменты ядерной оболочки могут формироваться с участием везикул и двухслойных мембран вокруг индивидуальных хромосом. Предполагается, что этот процесс наряду с действием других факторов способствует декомпактизации хромосом подобно тому, как это наблюдалось в условиях in vitro. На стадии телофазы происходит полная декомпактизация хромосом, слияние окружающих их мембранных фрагментов и формирование целостных ядерных оболочек вокруг нуклеоплазмы каждого из дочерних ядер.

Ключевые слова: ядерная оболочка, эмбрионы дрозофилы, синцитиальная бластодерма, митоз, хромосомы, электронная микроскопия.

Введение

Ядерная оболочка (ЯдО) выполняет барьерную функцию, пространственно отделяя аппараты транскрипции и репликации от аппарата трансляции (Губанова, Киселева, 2007). Морфологически она представляет собой две концентрические мембраны (наружную и внутреннюю), ограничивающие перинуклеарное пространство, связанное с полостью эндоплазматического ретикулума (ЭПР). У высших эукариот внутренняя ядерная мембрана контактирует с ламиной, образующей вместе с ядерным матриксом каркас ядра. В ЯдО встроены ядерные поровые комплексы (ЯПК), обеспечивающие

связь между ядром и цитоплазмой. Ионы и мелкие макромолекулы размером менее 9 нм могут диффундировать через ассоциированные с ЯПК мелкие каналы, в то время как молекулы весом больше 40 кДа и некоторые более легкие кариофильные белки транспортируются через центральный канал ядерной поры при помощи активных механизмов, требующих потребления энергии. Интегральные белки LAP1, LAP2 и LBR обеспечивают связь внутренней ядерной мембраны с ламиной (Grant et al., 1997).

Одной из основных особенностей ЯдО высших эукариот является ее динамичность, проявляющаяся в клеточном цикле. В начале митоза, на стадии профазы, ядерная мембрана

распадается на пузырьки, а большинство белков ЯПК и ламины переходят в растворимую форму в виде мономеров или небольших комплексов (Grant et al., 1997; Marshal et al., 1997). В конце митоза, на стадии телофазы, ЯдО восстанавливается вновь. Процессами разрушения и сборки ЯдО управляет сложная последовательность реакций фосфорилирования-дефосфорилирования, главными эффекторами которой являются белки семейства циклин-зависимых киназ (Wurzenberger, Gerlich, 2011). Разборка ЯдО начинается в конце профазы-начале прометафазы и заканчивается высвобождением цитозоль-мембранных пузырьков. Весь этот процесс можно разделить на три перекрывающихся во времени разборки: ЯПК, ламины и ядерной мембраны. Разборка ЯПК предположительно происходит вследствие фосфорилирования некоторых его белков (gp210, Nup358 и некоторых других нуклеопоринов) (Marshal et al., 1997). Ламина деполимеризуется под действием прямого фосфорилирования киназой cdk1 ламинов A, B и C в нескольких сайтах. При этом ламины А и С почти полностью переводятся в растворимую мономерную или димерную форму, а ламин В остается в мембранно-связанном состоянии с трансмембранным белком LBR (Marshal et al., 1997; Chu et al., 1998). Разборка ядерной мембраны, судя по всему, не зависит напрямую от cdk1, а вызывается какими-то другими, пока не известными киназами (Gallant et al., 1995). Процесс разборки ЯдО начинается в профазе митоза с ЯПК. В первую очередь исчезают периферические структуры ЯПК, а затем уже электронно-плотная центральная часть, представляющая транспортер. В конечном итоге в мембране остается пустое отверстие (Zatsepina et al., 1977; Kiseleva *et al.*, 2000). За разборкой ядерных пор следует процесс разрушения ядерной мембраны, для которого предполагаются три возможных механизма (Marshal et al., 1997).

Согласно данным, полученным в экспериментах по сборке ЯдО *in vitro* с использованием экстрактов из ооцитов амфибий (Lohka, Masin, 1983), формирование ЯдО включает три последовательных процесса: восстановление ядерной мембраны, сборку ЯПК и восстановление ламины (Marshal *et al.*, 1997; Goldberg *et al.*, 1997). Прикрепление различных мембранных пузырьков к хроматину и слияние их друг с другом

приводит к образованию мембранных островков, в которых начинают формироваться ЯПК. Этот процесс идет параллельно со слиянием с островками новых пузырьков и образованием целостной ядерной мембраны. Показано, что прикрепление пузырьков к хроматину происходит без потребления энергии, и необходимы только белки, связанные с хроматином и с этими пузырьками. В этом процессе трансмембранные белки либо непосредственно связываются с хроматином, либо посредником между ними выступают белки ламины (Hetzer, Wente, 2009). В отличие от предыдущего этапа слияние пузырьков – энергозависимый процесс, требующий наличия цитозоля. Показано, что слияние ингибируется добавлением ГТФуS, алкилирующего агента NEM и хелаторов ионов кальция и цинка ВАРТА. Предполагается, что слияние пузырьков при формировании ядерных мембран во многом идентично слиянию пузырьков (ЭПР). Так, например, на дрожжах было показано, что тот и другой процессы ингибируются ГТФуS, NEM и отсутствием АТФ (Marshal et al., 1997). Сборка ЯПК идет через промежуточные формы (интермедиаты) (Goldberg et al., 1997). Предполагается, что ламина собирается уже после того, как восстановилась ядерная мембрана. Процесс сборки ламины требует наличия активного транспорта через мембранный компонент уже сформировавшихся ЯПК (Weise et al., 1997).

Ранее было высказано предположение (Stafstrom et al., 1984) о том, что из-за быстрого протекания клеточного цикла (9–10 мин) митоз в ранних эмбрионах дрозофилы не открытый, как у большинства высших эукариот, а полузакрытый, т. е. в митозе ЯдО разрушается только с полюсов веретена деления и остается целой по бокам веретена деления. ЯПК на этой стадии полностью разбираются, оставляя в двойной ядерной мембране лишь бесформенные отверстия. При исследовании эмбрионов дрозофилы с использованием флюоресцентной микроскопии было описано формирование в митозе так называемой «оболочки веретена», которая располагалась над ЯдО и, возможно, состояла из мембранных пузырьков, высвободившихся в результате частичной разборки ЯдО (Paddy et al., 1996). Ранее нами была исследована сборка-разборка ЯПК в ядрах, изолированных из эмбрионов дрозофилы на стадии синцитиальной бластодермы с использованием высокоразрешающей сканирующей электронной микроскопии (Kiseleva *et al.*, 2001).

В настоящей работе проведен детальный ультраструктурный анализ динамики ЯдО в митозе в эмбрионах *Drosophila melanogaster* на стадии синцитиальной бластодермы, позволивший выявить новые особенности сборки оболочек дочерних ядер на стадии анафазы.

Материалы и методы

В работе использовали лабораторную линию мух *D. melanogaster* Canton S из коллекции лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН.

Получение ранних эмбрионов дрозофил

200–300 мух в возрасте 2–7 дней помещались в цилиндрический коллектор, который сверху накрывался чашкой Петри с кормом. Коллектор помещался в термостат с температурой 25 °С, и чашки менялись с периодичностью – 1 час. При таком способе получения ранних эмбрионов большинство свежеснесенных яиц находилось на стадии 1–5 делений дробления.

Микроинъекции в ранние эмбрионы

Ранние эмбрионы очищали от хориона и покрывали фторуглеродным маслом для предотвращения высыхания. Для остановки сборки ядерной оболочки на стадии метафазы агглютинин из проростков пшеницы (WGA производства Sigma, CIIIA), 1%-й раствор в фосфатном буфере, рН 7,2, в объеме 0,5 нл, инъецировали в цитоплазму эмбрионов под инвертированным микроскопом (Carl Zeiss) с помощью микроманипулятора. После проведения инъекций стекло с эмбрионами помещалось во влажную камеру в термостат на 25 °C, где эмбрионы инкубировали от 30 мин до 1 часа. Контролем служили эмбрионы после инъекции такого же объема 1%-го раствора BSA (Sigma, CIIIA) на том же буфере.

Фиксация и заливка эмбрионов для ультраструктурного анализа

Очищенные от хориона эмбрионы накапливали на поверхности дистиллированной воды,

а затем переносили в 2 мл фиксатора. Для его приготовления к 1 мл 15%-го глутарового альдегида (Fluka, Швейцария) на 0,1М Nа-какодилатном буфере (Fluka, Швейцария), pH = 7,2, добавляли 1 мл гептана, и эту смесь интенсивно встряхивали 3-5 мин. Инъецированные эмбрионы промывали гептаном для удаления масла, а затем переносили в фиксатор. Далее нормальные и инъецированные эмбрионы встряхивали в течение 5 мин и переносили на 2,5 ч в 2,5%-й глутаровый альдегид на 0,05 М Na-какодилатном буфере (буфер A). Во время фиксации вителлиновую оболочку убирали при помощи тонкого пинцета. Фиксированные эмбрионы отмывали в 3 сменах буфера А и дофиксировали в течение 1 ч в 1%-м растворе OsO_4 (ОАО Аурат, Россия) на том же буфере. После контрастирования в 1%-м водном растворе уранилацетата (Serva, Германия) в течение 8 ч при 4°С эмбрионы быстро промывали в воде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, затем в ацетоне и заключали в эпон 812 (Serva, Германия) по стандартному протоколу. Полутонкие срезы случайно ориентированных эмбрионов окрашивали метиленовым синим, анализировали в световом микроскопе, а затем получали ультратонкие срезы, которые исследовали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100SX (JEOL, Япония).

Результаты и обсуждение

Анализ ультраструктурной организации ядерной оболочки проводился в интерфазе, когда происходит рост ядра, в прометафазе, когда начинаются процессы разборки ЯПК и ядерной оболочки, в метафазе, соответствующей полному разрушению ЯдО, и телофазе, когда ЯдО вновь восстанавливается. Рис. 1, а демонстрирует типичную картину интерфазного ядра, имеющего округлую форму и деконденсированный хроматин. Оболочка ядра содержит электронно-плотные 110 нм ЯПК, имеющие типичную форму и распределенные в виде отдельных пор, а также их кластеров (Kiseleva et al., 2000).

Ядерная оболочка на стадии прометафазы (рис. 1, б) образует инвагинации с широкими отверстиями в области формирования микротрубочек веретена деления, а ее мембраны

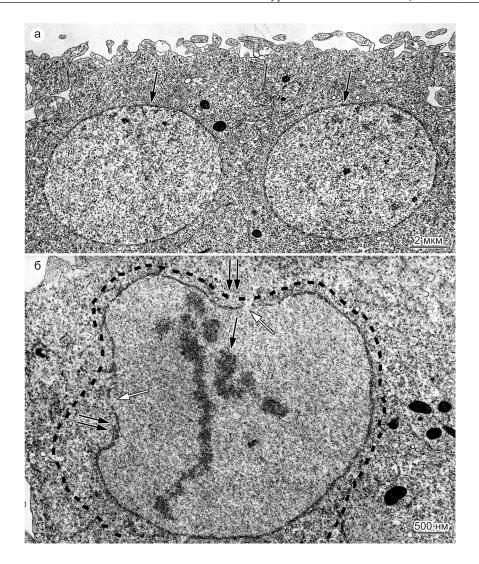


Рис. 1. Ультраструктура ядер из синцитиальных эмбрионов *D. melanogaster* на разных стадиях клеточного цикла.

а – интерфазное ядро (стрелки указывают на кластеры ядерных пор); б – ядро на стадии профазы, содержащее компактные хромосомы (черная стрелка) и ядерную оболочку с разобранными порами (белые стрелки) и инвагинациями в области проникновения микротрубочек веретена деления в нуклеоплазму (двойные стрелки). Ядро окружено слоем коротких пузырьков и цистерн (обозначено пунктиром).

приобретают прерывистый характер вследствие разборки ядерных пор. Это в определенной степени напоминает поведение ядерной оболочки в прометафазе открытого митоза (Zatsepina et al., 1977). Существенное отличие состоит в том, что ядро в ранних эмбрионах дрозофилы уже на стадии прометафазы окружается большим количеством коротких цистерн и пузырьков ЭПР, образующих четко выраженную прослойку в виде «шубы» вокруг ядра, свободную от митохондрий и жировых гранул (рис. 1, б). Толщина этой зоны составляет 0,5–2 мкм.

Очевидно, что такое количество мембран не могло образоваться в результате фрагментарного разрушения ядерной оболочки, и, скорее всего, они транспортируются из окружающей цитоплазмы. Наше исследование показало, что размер «шубы» вокруг каждого ядра имеет тенденцию уменьшаться с увеличением количества ядер в эмбрионе.

В метафазе митоза хроматин конденсируется и приобретает вид метафазных пластинок, ориентированных по-разному внутри эмбриона (рис. 2, а). Ядерная мембрана полностью раз-

рушается и уже ничем не отличается от мембранных цистерн и пузырьков, составляющих «шубу». Мембраны, окружающие метафазное ядро, представляют собой смесь пузырьков ЭПР и стопок прерывистых мембран. Стопки располагаются преимущественно в центральных участках бывшей ядерной оболочки, в то время как пузырьки занимают зоны полюсов веретена. Толщина «шубы» на стадии метафазы достигает максимальной величины и составля-

ет до 5–6 мкм в участках, близких к полюсам веретена деления. Размер метафазной «шубы» уменьшается при переходе к более поздним циклам. Метафазные хромосомы располагаются в середине нуклеоплазмы и окружены большим количеством мелких пузырьков, а также контактирующих с ними микротрубочек (рис. 2, б).

При переходе к анафазе характер строения околоядерной зоны изменяется. Ядро удлиняется в направлении расходящихся дочерних

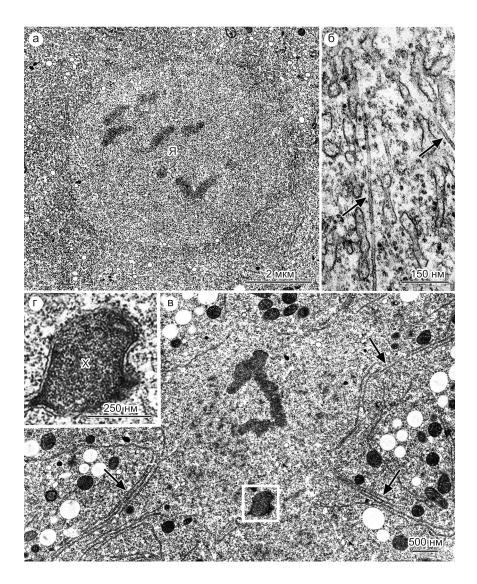


Рис. 2. Тонкое строение ядер из синцитиальных эмбрионов *D. melanogaster* на стадиях метафазы и анафазы.

а – общий вид метафазного ядра и околоядерной зоны на малом увеличении. Нуклеоплазма окружена широким слоем, состоящим из пузырьков и скоплений коротких мембран; б – фрагмент того же ядра на большом увеличении. В нуклеоплазме видны пузырьки и микротрубочки; в – ядро на стадии поздней анафазы. По краям нуклеоплазмы располагаются протяженные пучки длинных мембран шероховатого эндоплазматического ретикулума (стрелки); г – увеличенный фрагмент того же ядра. На периферии компактной хромосомы видны фрагменты формирующейся *de novo* ядерной оболочки. Я – ядро; X – хроматин.

хромосом, а «шуба» сильно истончается, особенно в центральной части ядра на стадии поздней анафазы (рис. 2, в). Наиболее интересным представляется формирование на этом этапе стопок длинных мембран шероховатого эндоплазматического ретикулума, располагающихся по периферии нуклеоплазмы, радиально по отношению к центру ядра. Они часто контактируют с компактными хромосомами, на поверхности которых обнаруживаются двухслойные мембранные фрагменты, отличающиеся по строению от центросом и сходные с ЯдО (рис. 2, г). Вблизи хромосом на этой стадии уже не наблюдается микротрубочек, а наружная мембрана формирующейся вокруг них ЯдО содержит большое количество рибосом. Можно предположить, что фрагменты новой ЯдО формируются в результате слияния наблюдаемых вблизи хромосом мембранных компонентов ЭПР и пузырьков. Впоследствии стопки мембран изменяют направление и располагаются по периметру нуклеоплазмы (рис. 3, а), а число хромосом, окруженных мембранами, увеличивается (рис. 3, б-г). Наблюдаются частичная деконденсация хромосом, а также появление пузырьков внутри хромосом (рис. 3, г).

На стадии телофазы происходит быстрая деконденсация хроматина дочерних ядер, и вокруг них, вероятно, за счет слияния мембранных фрагментов и пузырьков, формируется сплошная ЯдО, в которую затем встраиваются ЯПК (рис. 4, а). Интересно отметить, что пузырьки встречаются как снаружи, так и внутри ядра в контакте с внутренней мембраной ЯдО. Сначала число зрелых пор в оболочке невелико, однако наблюдаются ядра с большим количеством пор, очевидно, на более поздней стадии телофазы (рис. 4, б, в). Следует отметить присутствие в оболочке ядер не полностью сформированных ядерных пор (рис. 4, б, в), сходных с теми, что были описаны ранее в опытах in vitro (Goldberg et al., 1997). Слой пузырьков вокруг ЯдО дочерних ядер существенно уменьшается, и вблизи ядра появляются митохондрии и жировые гранулы. Ядро начинает активно расти, и параллельно должна увеличиваться площадь поверхности оболочки дочерних ядер. Согласно ранее проведенным исследованиям, это происходит за счет слияния пузырьков из околоядерной зоны с наружной мембраной ядра (Kiseleva *et al.*, 2001).

Согласно данным, полученным из экспериментов in vitro с использованием грубых экстрактов из ооцитов Xenopus laevis, WGA в концентрации 200-500 мкг/мл вызывает полное блокирование сборки ЯПК (Wiese et al., 1997). В наших исследованиях мы использовали эту концентрацию для того, чтобы проверить, будет ли блокироваться сборка ЯдО и ядерных пор. Ультраструктурный анализ ранних эмбрионов D. melanogaster показал, что после введения WGA в них происходит остановка деления ядер в месте инъекции. В контроле, после инъекции BSA, все остается без существенных изменений, и наблюдаются как равномерно расположенные по периферии соматические ядра, так и центральные желточные ядра. Электронно-микроскопическое исследование 30 эмбрионов, инъецированных WGA, показало, что митоз во всех эмбрионах останавливается приблизительно на стадии метафазы, о чем свидетельствует наличие конденсированного хроматина внутри ядер и пучков микротрубочек (рис. 5, a). «Шубы» вокруг ядер были сильно увеличены в отличие от таковых в метафазе в нормальных эмбрионах и представляли зоны диаметром до 30 мкм, свободные от митохондрий и жировых гранул. На большом увеличении видно, что эти зоны так же, как и на стадии метафазы в нормальных эмбрионах, заполнены пузырьками и стопками прерывистых мембран (рис. 5, б). Иногда стопки мембран напоминали по организации окончатые мембраны, часто встречающиеся в цитоплазме эмбрионов на стадии синцитиальной бластодермы (Губанова, Киселева, 2008), однако поровые комплексы в них не наблюдались. Принимая во внимание, что как минимум 1/3-я часть митотического цикла приходится на интерфазу (когда поры собраны), можно заключить, что WGA как in vitro, так и in vivo препятствует сборке пор, но, судя по всему, не влияет на их разборку.

Таким образом, наши исследования показали, что отличительной особенностью полузакрытого митоза является то, что ядерная оболочка распадается на большое количество мембран и пузырьков, которые формируют широкий слой вокруг ядра в метафазе, соответствующий, вероятно, «оболочке веретена» (spindle envelope), описанной ранее (Paddy et al., 1996). При проведении более детального ультраструктурного исследования раннего развития дрозофилы (авторами предыдущих работ были изучены только последние митотические циклы (12–14) перед формированием клеток) мы установили, что морфология ядерной мембраны и прилежащей к ядру цитоплазмы может

значительно варьировать в процессе полузакрытого митоза. В первых синцитиальных циклах деления (1–7), когда ядер в эмбрионе еще мало, оболочка веретена, по нашим данным, представляет собой четко очерченную зону вокруг ядра, заполненную большим количеством цистерн ЭПР, которой мы присвоили название «шуба». Диаметр «шубы» в районе центросом

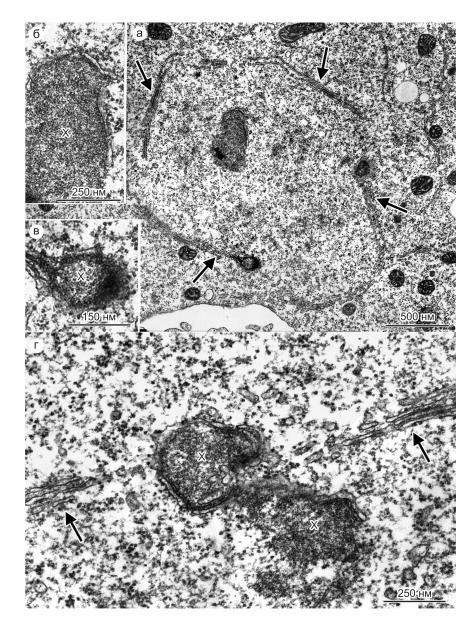


Рис. 3. Особенности организации ядер из синцитиальных эмбрионов *D. melanogaster* на стадии поздней анафазы.

а – пучки длинных и коротких линейно расположенных мембран лежат по периметру нуклеоплазмы и часто контактируют с компактными хромосомами (стрелки); б, в – фрагменты того же ядра на большом увеличении. На поверхности хромосом видны фрагменты формирующейся ядерной оболочки; г – контакт двух хромосом, содержащих фрагменты формирующейся ядерной оболочки. Два пучка мембран гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума располагаются вблизи хромосом. X – хроматин.

может достигать 5–6 мкм. В то же время при переходе к более поздним циклам мы наблюдаем истончение «шубы» и плавный переход к ранее описанной морфологии полузакрытого митоза с формированием оболочки веретена. Полузакрытый митоз был обнаружен также в некоторых других типах митотически активных клеток у дрозофилы, таких, как фолликулярные клетки яичников, стволовые клетки, клетки мозга (Stafstrom *et al.*, 1984). Это свидетельствует о том, что у дрозофилы такой тип митоза не является уникальным для состояния синцития.

Возможно, распространенность полузакрытого митоза не ограничивается только дрозофилой, поскольку подобный митоз наблюдался также при ультраструктурном анализе эмбрионов *Heteropeza pygmaea* (Fux, 1974).

Обнаруженный нами постепенный переход между разными формами полузакрытого митоза позволяет предположить, что все его известные морфологические варианты являются, вероятно, одним типом процесса перестройки ЯдО, в ходе которого ядро окружается морфологически различимой прослойкой цитоплазмы,

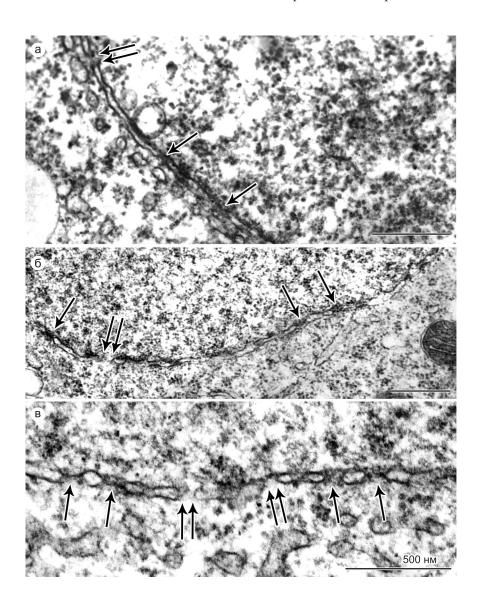


Рис. 4. Ультраструктура ядер из синцитиальных эмбрионов *D. melanogaster* на стадии телофазы.

а — фрагмент оболочки ядра на стадии ранней телофазы содержит интермедиаты пор (двойные стрелки) и небольшое количество полностью собранных пор (стрелки). Пузырьки присутствуют как внутри, так и снаружи ядерной оболочки; б, в — фрагменты оболочки ядер на стадии средней телофазы на малом и большом увеличении соответственно. Количество зрелых пор в ядерной оболочке увеличено по сравнению с ядром на верхнем рисунке.

несущей какую-то функцию. Эта функция может быть связана как с особенностями тех клеток, в которых наблюдается такой митоз (многоядерность, быстрота протекания митоза), так и с особенностями регуляции митоза у дрозофилы (и, возможно, других насекомых) (Gallant et al., 1995). Одной из качественных характеристик в строении околоядерной зоны является ее четкая структурированность. Из этой зоны исключаются все крупные клеточные органеллы, такие, как митохондрии и жировые гранулы, и накапливаются мембраны ЭПР. Чет-

кую компартментализацию цитоплазмы около ядра подчеркивают также наши эксперименты с микроинъекцией WGA, при которых деление останавливалось в метафазе, и ядра были окружены «шубой» толщиной до 15 мкм (или диаметром до 30 мкм). При суммировании наших результатов и ранее полученных данных, можно сформулировать две точки зрения относительно функциональной роли оболочки веретена (околоядерной зоны).

Оболочка веретена представляет собой ЯдО, которая не успевает разобраться по причине

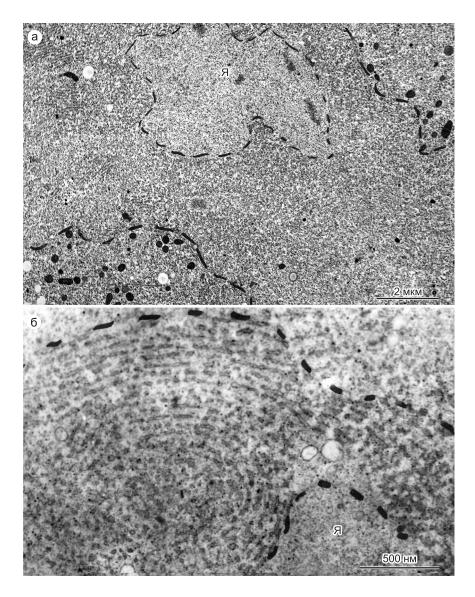


Рис. 5. Ультраструктура ядер и околоядерной цитоплазмы в синцитиальных эмбрионах *D. melanogaster* после инъекции WGA.

а – общий вид ядра и окружающей цитоплазмы (ядро и граница околоядерной зоны, состоящей из пузырьков и коротких мембран, обведены пунктиром); б – фрагмент околоядерной зоны на большом увеличении. Видно концентрическое расположение коротких мембран в околоядерной зоне. Я – ядро.

быстрого митоза и вследствие этого не имеет какой-либо определенной функции (Harel et al., 1989). Оболочка выполняет какую-то определенную функцию в митозе (или имеет несколько функций) (Stafstrom et al., 1984; Harel et al., 1989).

Первая точка зрения вряд ли имеет под собой основания, о чем свидетельствуют как наши наблюдения, так и данные других авторов. Во-первых, оболочку веретена наблюдают не только в ранних эмбрионах, где митоз очень быстрый, но и в тканях дрозофилы более поздних стадий развития, таких, как эпителий, нервная ткань и т. д., где скорость митоза намного ниже (Stafstrom et al., 1984, Lenz-Bohme et al., 1997). Во-вторых, наши эксперименты с остановкой митоза WGA и наблюдения нормального митоза на ранних циклах указывают на то, что происходит скорее накопление мембран вокруг ядра, нежели их рассредоточение. Более того, эти мембраны, возможно, имеют специфический состав, так как их количество вокруг метафазных ядер уменьшается с ростом числа ядер. Мы полагаем, что одна из возможных функций оболочки веретена заключается в регуляции обмена ионов Са²⁺ вблизи ядра. Концентрация Са²⁺ является важным фактором, влияющим на скорость протекания митоза (Izant, 1983). Возможная функция цистерн ЭПР, окружающих ядро, как регуляторов обмена этого катиона исследовалась при помощи гистохимических методов (Stafstrom et al., 1984), но четко эту функцию показать не удалось.

Следующей возможной функцией перинуклеарного пространства является депонирование белков ЯдО, необходимых для быстрого ее формирования в конце митоза. Иммуногистохимические исследования свидетельствуют о том, что, по крайней мере, некоторые белки ЯдО способны концентрироваться в околоядерной зоне, соответствующей оболочке веретена, в то время как другие из нее исключаются. Это было показано для отефина – интегрального белка внутренней ядерной мембраны, gp210 -N-гликозилированного интегрального белка ЯПК и одного из белков ламины. При изучении локализации отефина концентрация его около ядра была показана во всех фазах митоза (Harel et al., 1989). Исследования in vivo с инъекцией меченых Fab-фрагментов антител к ламине дали промежуточный результат: ламина оставалась связанной с оболочкой ядра вплоть до метафазы, а затем диспергировалась (Paddy *et al.*, 1996). В то же время изучение локализации интегрального белка ЯПК gp188 (аналог gp210 у дрозофилы) показало, что к метафазе он равномерно распределяется по цитоплазме (Harel *et al.*, 1989).

На основании этих данных можно предположить, что около ядра концентрируются мембраны, содержащие специфический набор белков, необходимых при сборке ЯдО. Одна из возможностей их использования может быть связана с недавно обнаруженным у ранних эмбрионов дрозофилы новым механизмом формирования ЯПК, при котором множество мелких пузырьков ЭПР сливаются в телофазе с ЯдО и индуцируют при этом формирование пор вдоль линии слияния (Kiseleva *et al.*, 2000).

Интересно отметить, что остановка митоза при инъекции WGA происходит в метафазе. Если следовать тому, что WGA блокирует сборку ЯПК, то он должен оказывать влияние на тот период митоза, когда необходимы функциональные ЯПК, т. е. как минимум в телофазе. Именно такие результаты были получены при микроинъекции WGA в культуру эпителиальных клеток (Yoneda et al., 1987; Benavente et al., 1989). Однако, согласно нашим данным, митоз после введения WGA останавливался на стадии метафазы.

Возможное объяснение всех этих противоречий состоит в том, что белки ЯПК у дрозофилы, кроме участия в ядерно-цитоплазматическом транспорте, могут дополнительно оказывать влияние на цитоплазматический клеточный цикл. Альтернативная возможность заключается в том, что, кроме нуклеопоринов, у дрозофилы существуют какие-то дополнительные белки-мишени, связанные с регуляцией клеточного цикла. Эти регуляторы (с которыми может взаимодействовать WGA), возможно, либо прямо, либо опосредованно изменяют организацию цитоскелета и таким образом оказывают влияние на структуру околоядерной зоны цитоплазмы. Для проверки этих гипотез необходимы дополнительные эксперименты с другими ингибиторами сборки ЯПК, такими, как антитела к различным нуклеопоринам.

Таким образом, нами было проведено комплексное исследование динамической пере-

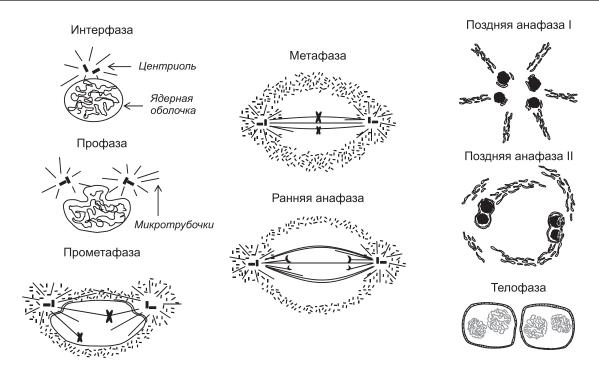


Рис. 6. Схема реорганизации ядерной оболочки на разных стадиях митоза в синцитиальных эмбрионах *D. melanogaster*.

Интерфаза: ядро имеет округлую форму, и ядерная оболочка содержит зрелые поровые комплексы; профаза: ядерная оболочка деформируется в области расположения центриолей, ядерные поры начинают разбираться; прометафаза: хромосомы компактизуются, ядерная оболочка начинает распадаться в области полюсов веретена деления на пузырьки и короткие мембраны, формирующие дополнительный слой вокруг нераспавшихся участков оболочки ядра. Ядерные поры полностью разобраны, и пучки микротрубочек, контактирующих с хромосомами, выявляются в нуклеоплазме; метафаза: ядерная оболочка распадается полностью, формируя широкий слой мембран и пузырьков вокруг нуклеоплазмы; ранняя анафаза: хромосомы начинают перемещаться к полюсам веретена деления, слой мембранных и пузырьковидных компонентов вокруг нуклеоплазмы уменьшается; поздняя анафаза I: по периферии нуклеоплазмы собираются пучки мембран, располагающиеся радиально по отношению к центру ядра, микротрубочки исчезают и начинается формирование новых фрагментов ЯдО вокруг индивидуальных хромосом; поздняя анафаза II: пучки мембран меняют направление и располагаются по периметру нуклеоплазмы, наблюдается частичная деконденсация хромосом, окруженных двойными мембранами и пузырьками; телофаза: фрагменты новой ЯдО сливаются, формируется целостная оболочка ядра, в которой начинают собираться ядерные поры, и видно большое количество интермедиатов пор. К концу телофазы процесс сборки зрелой ядерной оболочки завершается и начинается рост ядер.

стройки ЯдО и окружающей ядро цитоплазмы в процессе быстрого митотического деления у ранних эмбрионов дрозофилы, позволившее представить более детальную схему митоза в ранних эмбрионах дрозофилы (рис. 6). Впервые подробно исследованы этапы сборки ЯдО на стадии поздней анафазы митоза и продемонстрировано формирование новых ее фрагментов вокруг индивидуальных хромосом. Полученные новые данные важны для понимания механизмов динамики и функции ядра и ЯдО в митозе.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ: 10-04-01426 и 10-04-01469 и гранта Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (6.12).

Литература

Губанова Н.В., Киселева Е.В. Структурная организация и функция ядерной оболочки // Цитология. 2007. Т. 49. № 4. С. 257–269.

Губанова Н.В., Киселева Е.В. Особенности дина-

- мики пористых пластинок в синцитиальных эмбрионах дрозофилы // Цитология. 2008. Т. 50. N 8. С. 681–691.
- Benavente R., Scheer U., Chaly N. Nucleoplasmic sorting of macromolecules following mitosis: fate of nuclear constituents after inhibition of pore complex function // Eur. J. Cell Biol. 1989. V. 50. P. 209–219.
- Chu A., Roozbeh R., Stochaj U. Velcro in the nuclear envelope: LBR and LAPs // FEBS. 1998. V. 441. P. 165–169.
- Fux T. Chromosome elimination in *Heteropeza pyg-maea*. II. Ultrastructure of spindle apparatus // Chromosoma. 1974. V. 49. P. 157–160.
- Gallant P., Fry A.M., Nigg A.E. Protein kinases in the control of mitosis: focus on nucleocytoplasmic traffic // J. Cell Sci. Suppl. 1995. V. 19. P. 21–28.
- Goldberg M.W., Weise C., Allen T.D., Wilson K. Dimples, pores, star-rings and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structural intermediates in nuclear pore complex assembly // J. Cell Sci. 1997. V. 110. P. 409–420.
- Grant T.M., Wilson K.L. Nuclear assembly // Annu. Rev. Dev. Biol. 1997. V. 13. P. 669–695.
- Harel A., Zlotkin E., Nainudel-Epzteyn S. et al. Persistence of major nuclear envelope antigens in an envelope-like structure during mitosis in *Drosophila melanogaster* embryos // J. Cell Sci. 1989. V. 94. P. 463–470.
- Hetzer M.W., Wente S.R. Border control at the nucleus: biogenesis and organization of the nuclear membrane and pore complexes // Dev. Cell. 2009. V. 5. P. 606–616.
- Izant J.G. The role of calcium ions during mitosis: calcium participates in the anaphase trigger // Chromosoma. 1983. V. 88. P. 1–10.
- Kiseleva E., Goldberg M.W., Cronshaw J., Allen T.D. The nuclear pore complex: structure, function, and dynamics // Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 2000. V. 10. N 1. P. 101–112.
- Kiseleva E., Rutherford S., Cotter L.M. *et al.* Steps of nuclear pore complex disassembly and reassembly during mitosis in early Drosophila embryos // J. Cell

- Sci. 2001. V. 114. P. 3607-3618.
- Lenz-Bohme B., Wismar J., Fuchs S. *et al.* Insertional mutation of the Drosophila nuclear lamin *Dm0* gene results in defective nuclear envelopes, clastering of nuclear pore complexes and accumulation of annulate lamellae // J. Cell Biol. 1997. V. 137. P. 1001–1016.
- Lohka L.J., Masui J. Formation *in vitro* of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components // Science. 1983. V. 220. P. 719–721.
- Marshal I.C.B., Wilson K.L. Nuclear envelope assembly after mitosis // Trends Cell Biol. 1997. V. 7. P. 20–29.
- Paddy M.R., Saumweber H., Agard D.A., Sedat J.W. Time-resolved? *In vitro* studies of mitotic spindle formation and nuclear lamina breakdown in Drosophila early embryos // J. Cell Sci. 1996. V. 109. P. 595–607.
- Stafstrom J.P., Stahelin L.A. Are annulate lamellae in the Drosophila embryo the result of overproduction of nuclear pore components // J. Cell Biol. 1984. V. 98. P. 699–708.
- Stafstrom J.P., Staehelin L.A. Dynamics of the nuclear envelope and of the nuclear pore complexes during mitosis in the Drosophila embryo // Eur. J. Cell Biol. 1984. V. 34. P. 179–189.
- Wiese C., Goldberg M.W., Allen T.D., Wilson K.L. Nuclear envelope assembly in Xenopus extracts visualized by scanning EM reveals a transportdependent envelope smoothing event // J. Cell Sci. 1997. V. 110. P. 1489–1502.
- Wurzenberger C, Gerlich D.W. Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2011. V. 12. N 8. P. 469–482.
- Yoneda Y., Imamoto-Sonobe N., Yamizumi M., Uchida T. Reversible inhibition of protein import into the nucleus by wheat germ agglutinin injected into cultured cells // Exp. Cell Res. 1987. V. 173. P. 586–595.
- Zatsepina O.V., Polyakov V.Y., Chentsov Y.S. Some structural aspects of the fate of the nuclear envelope during mitosis // Cytobiology. 1977. V. 16. P. 130–144.

A FEATURE OF NUCLEAR ENVELOPE FORMATION DURING MITOSIS IN EARLY DROSOPHILA MELANOGASTER EMBRYOS

A.A. Strunov¹, E.A. Onischenko², E.V. Kiseleva¹

 ¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: elka@bionet.nsc.ru
² Division of Cell and Developmental Biology, University of California, Berkeley, CA 94720

Summary

The ultrastructure of the nuclear envelope of dividing nuclei in Drosophila embryos at the syncytial blastoderm stage has been studied. It was previously shown that mitosis in early Drosophila embryos is semi-closed and the nuclear envelope completely disassembled only at the spindle poles, whereas a double (spindle) envelope formed in other areas (Stafstrom, Staehelin, 1984). We have found that the nuclear envelope completely disassembles into vesicles and short membranes at the metaphase stage to form a thick layer around the nucleoplasm. The nuclear envelope assembly around daughter nuclei starts at the late anaphase stage. It is accompanied by prior formation of long stacks of rough endoplasmic reticulum membranes, involving components of the old envelope. First, the vesicles and stacks of bilayer membranes are radially located at the nucleoplasm periphery and then move to the nucleoplasm, where they come to a close contact with condensed chromosomes. It is shown that new fragments of the nuclear envelope can form around individual chromosomes with participation of vesicles and bilayer membranes. It is assumed that the vesicles and membranes together with some other factors contribute to chromosome decondensation, as was previously demonstrated *in vitro*. During the telophase, chromosomes decondense completely, nuclear envelope fragments fuse, and whole nuclear envelopes form around each daughter nucleus.

Key words: nuclear envelope, drosophila embryos, syncytial blastoderm, electron microscopy, mitosis, chromosomes.