

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ POM152 И POM34 ЯДЕРНЫХ ПОР ДРОЖЖЕЙ, НАРУШАЕТ ПРОЦЕСС СБОРКИ ПОР И УВЕЛИЧИВАЕТ ИХ ВНУТРЕННИЙ ДИАМЕТР

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: strunov@bionet.nsc.ru; elena_kiseleva@ngs.ru;

² Лаборатория молекулярной и клеточной биологии, Калифорнийский университет, Беркли, Калифорния, США

Центральный компартмент ядерной поры, обеспечивающей ядерно-цитоплазматический транспорт молекул, содержит в своем составе трансмембранные белки, закрепляющие пору в ядерной оболочке. В работе проведены морфологический и морфометрический анализы организации ядерных поровых комплексов в ядерной оболочке дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, мутантных по трансмембранным белкам Pom152 и Pom34. Показано, что при подавлении экспрессии генов *POM152* или *POM34* происходит нарушение процесса сборки ядерных пор, что ведет к уменьшению их количества в ядерной оболочке. Согласно данным электронно-микроскопического анализа, нарушение экспрессии гена *POM152* сопровождается также увеличением внутреннего диаметра ЯПК, чего не наблюдается в клетках, мутантных по белку Pom34. Обсуждается взаимодействие трансмембранных белков с другими белками ядерной поры, а также их роль в обновлении пор в процессе деления дрожжевой клетки.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, электронная микроскопия, ядерные поры, нуклеопорины, ультраструктура.

Введение

Отличительной чертой эукариотической клетки является ядро, ограниченное оболочкой, состоящей из наружной и внутренней мембран (Adelberg, 1971; Губанова, Киселева, 2007; Hetzer, 2010). Обмен макромолекулами между ядром и цитоплазмой происходит через специальные транспортные каналы – ядерные поровые комплексы (ЯПК), представляющие собой сложную, состоящую из множества белков структуру (Kiseleva *et al.*, 2004; Губанова и др., 2006). ЯПК встроены в ядерную оболочку в участках слияния внутренней и внешней мембран и представляют собой один из самых больших комплексов в эукариотических клетках с молекулярной массой > 50 МДа (Hetzer *et al.*, 2005; Tran, Wente, 2006). Высшие и низшие эукариоты имеют сходные по строению ядерные

поры, однако внешний диаметр пор у низших, например дрожжей, меньше (~ 100 нм), чем у высших эукариот (~ 120 нм) (Kiseleva *et al.*, 2004). Кроме того, ядерная оболочка у низших эукариот не имеет ламины, закрепляющей поры в оболочке ядра, поэтому ядерные поры у этих организмов могут перемещаться вдоль ядерной оболочки (Belgareh, Doye, 1997). ЯПК имеют симметричную октагональную организацию во фронтальной плоскости и содержат три основных компартмента: центральный и два асимметричных периферических – цитоплазматический и внутриядерный.

Ядерная пора имеет в своей структуре около 1 тыс. белков у высших и около 500 белков у низших эукариот (Alber *et al.*, 2002). В их состав как у высших, так и у низших эукариот входят 30 отличающихся друг от друга белков – нуклеопоринов (nuclear proteins – Nups). Нуклео-

порины представлены 8, 16 или 32 копиями на каждую пору (рис. 1) (Rout *et al.*, 2000; Cronshaw *et al.*, 2002; Alber *et al.*, 2007a, b).

Цитоплазматический компартмент поры находится немного над и непосредственно в плоскости наружной ядерной мембраны. В нем различают тонкое и звездчатое горизонтальные кольца, а также 8 цитоплазматических фибрилл, которые прикреплены к субъединицам, расположенным на тонком кольце (рис. 2). Центральный компартмент является самой массивной частью ЯПК, состоящей из кольца спиц, внутреннего и трансмембранного колец, и пронизывает ядерную оболочку в том ее участке, где соединяются наружная и внутренняя мембраны. Внутриядерный компартмент расположен под и непосредственно в плоскости внутренней мем-

браны ядра и включает в себя внутриядерное кольцо с 8 отходящими филаментами, которые формируют basket-структуру (рис. 2).

Сборка ядерных поровых комплексов в клетках эукариот регистрируется на двух стадиях клеточного цикла. Во-первых, она происходит в период восстановления ядерной оболочки в конце открытого митоза, когда с деконденсирующимся хроматином контактируют пузырьки гладкого и шероховатого ЭПР, в составе мембран которых присутствуют субкомплексы нуклеопоринов (Kiseleva *et al.*, 2001; Antonin *et al.*, 2008). На начальном этапе с хроматином связываются мембраны, содержащие субкомплекс белков Nup107-160. Затем идет присоединение к хроматину мембранных пузырьков, содержащих трансмембранные нуклеопорины Pom121 и

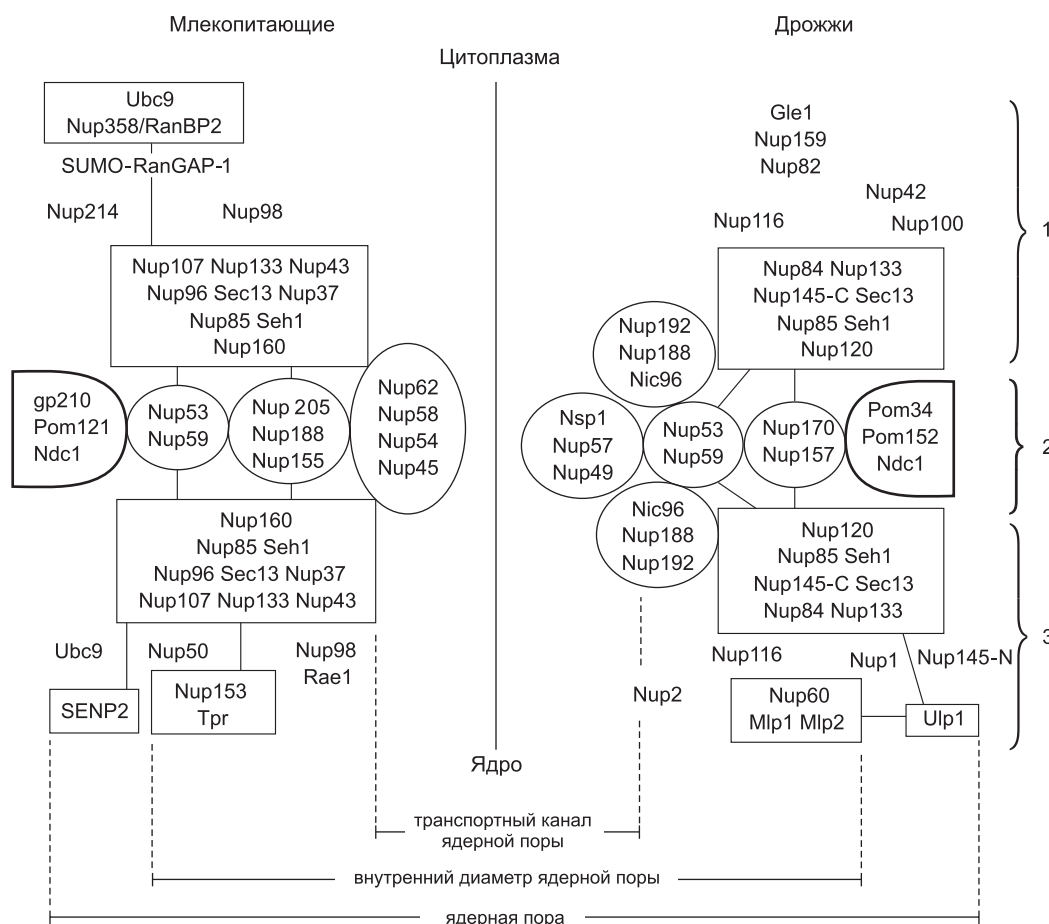


Рис. 1. Расположение белков-нуклеопоринов в разных участках ядерных пор у высших (слева) и низших (справа) эукариот.

1 – цитоплазматический компартмент поры, 2 – центральный компартмент поры, 3 – внутриядерный компартмент поры (модифицировано из: Rout *et al.*, 2000).

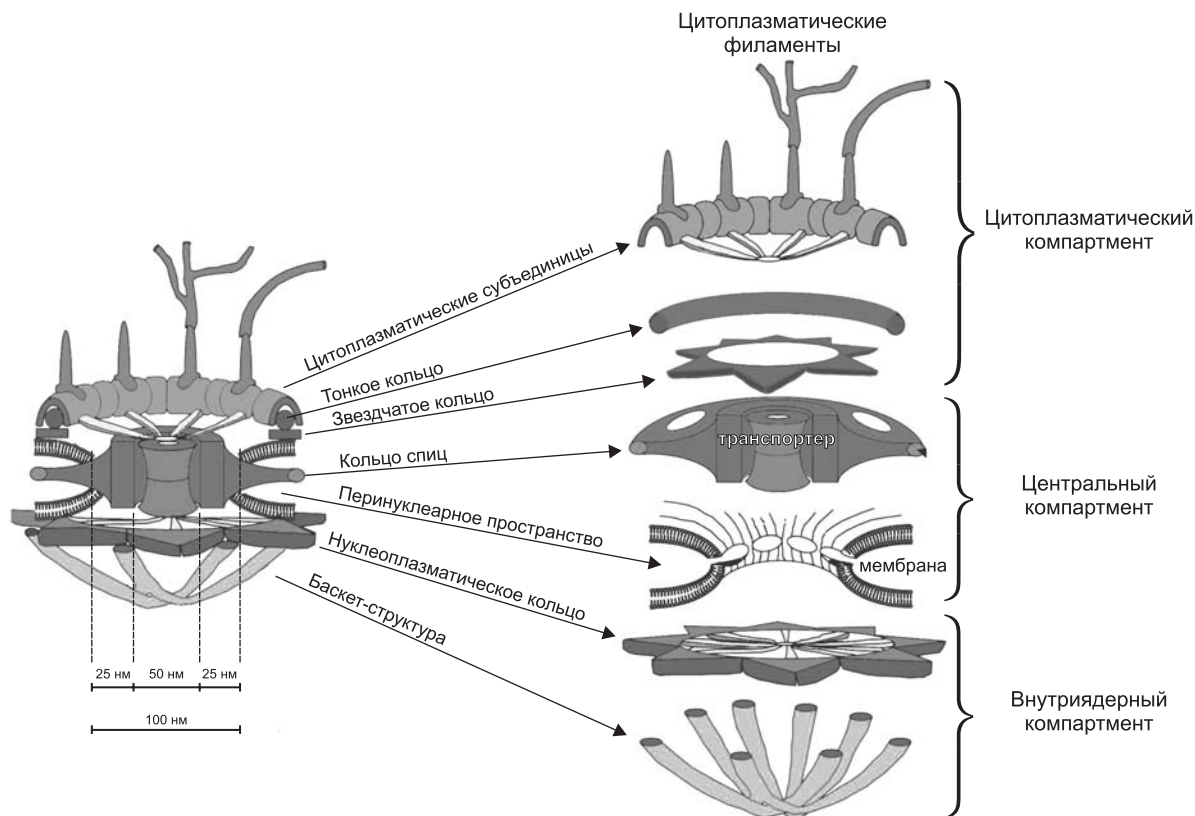


Рис. 2. Схема структурной организации индивидуальных компартментов ядерной поры (модифицировано из: Allen *et al.*, 2000).

Ndc1, которые, в свою очередь, объединяются с белками Nup155 и Nup53. После этого последовательно собираются центральные, затем периферические компартменты и, наконец, формируется функционально активная пора (Goldberg *et al.*, 1997; Kiseleva *et al.*, 2001; Antonin *et al.*, 2008). Помимо митоза сборка ядерных пор происходит также в период интерфазы, когда дочерние ядра растут, их оболочка увеличивается в размере. При этом дополнительные ядерные поры должны собираться в новых фрагментах оболочки ядра и закрепляться в ней (D'Angelo, Hetzer, 2006). До сих пор не ясно, каким образом и в какой последовательности индивидуальные компоненты ЯПК при этом формируются в ядерной оболочке. Многие одноклеточные, в том числе и дрожжи, делятся путем закрытого митоза без разрушения оболочки ядра. Предполагается, что сборка новых ядерных пор в этих клетках должна происходить так же, как и в растущих интерфазных ядрах, хотя прямых доказательств этого пока не получено.

Трансмембранные белки и белки центрального канала поры играют большую роль в закреплении поры в ядерной оболочке и транспорте молекул через ЯПК (Antonin *et al.*, 2008). В дрожжевых клетках три трансмембранных белка (Ndc1, Pom152 и Pom34) и четыре нуклеопорина центрального канала поры (Nup59, Nup53, Nup157 и Nup170) входят в состав центрального компартмента ЯПК дрожжей (рис. 1) (Alber, 2007a). Белки Pom152 и Pom34 взаимодействуют с другими нуклеопоринами центрального канала поры через белок Ndc1 (Onischenko *et al.*, 2009). Ndc1 является жизненно важным белком, благодаря которому происходит правильная сборка ядерных пор в процессе их обновления (Stavgu *et al.*, 2006). Этот белок трижды пересекает ядерную мембрану, образуя три белковых петли, лежащие в перинуклеарном пространстве, и две петли, выходящие в цитозоль. Шесть трансмембранных сегментов позволяют Ndc1 формировать множество контактов с другими нуклеопоринами (Stavgu *et al.*, 2006). Белки Pom152 и

Pom34 взаимодействуют с другими нуклеопоринами центрального канала поры через белок Ndc1 (Onischenko *et al.*, 2009). Белок Pom152 расположен в основном в перинуклеарном пространстве, за исключением единственного трансмембранного сегмента, закрепляющего белок в ядерной оболочке (Tchereregine *et al.*, 1999). Именно этим сегментом Pom152 напрямую связан с Ndc1. У белка Pom34 N- и C-концы направлены в цитозоль, что способствует его взаимодействию с белками центрального канала поры (Miao *et al.*, 2006), а трансмембранные сегменты Pom34 обеспечивают его связь с Pom152 и через него с Ndc1. Высказано предположение, что Pom152 и Pom34 отвечают за поддержание нормальной структуры ЯПК и функционирование поры при транспорте молекул между ядром и цитоплазмой (Miao *et al.*, 2006). Теми же авторами показано, что одиночные делеции генов *POM152* и *POM34*, а также делеция их обоих не приводят к снижению жизнеспособности клеток дрожжей и не сказываются на структуре ЯПК.

Несмотря на то что к настоящему времени получена детальная информация о составе белков ядерных пор эукариот, функциональная значимость многих из них, в частности белков центрального компартмента ЯПК, для сборки новых пор, особенно на стадии интерфазы, пока не выяснена. Одним из подходов к изучению данного вопроса является исследование морфологии и динамики ядерных пор в клетках дрожжей, мутантных по генам, кодирующим эти белки. Электронная микроскопия позволяет фиксировать различные нарушения в структурной организации ядерных пор, происходящие при ингибировании экспрессии генов, кодирующих белки ЯПК (Madrid *et al.*, 2006), что обеспечивает получение новых данных о функциональной роли этих белков. Ранее было показано, что сокращение количества растворимых белков ЯПК Nup53 и Nup59 не вызывает изменения морфологии ядерных пор у дрожжей и не влияет на выживаемость дрожжей. При полном отсутствии белка Nup59 происходит расширение внутреннего диаметра пор и наблюдаются большие разрывы в оболочке ядра. Отсутствие белка Nup53 никак не сказывается на жизнеспособности клеток (Onischenko *et al.*, 2009). В то же время уменьшение количества трансмембранных белков Pom152 или Pom34 в клетках дрожжей, несущих делеции по генам

NUP53 и *NUP59*, приводило к снижению жизнеспособности дрожжевых клеток (Onischenko *et al.*, 2009). Таким образом, совместный вклад трансмембранных белков Pom152 и Pom34 и белка центрального канала поры Nup59 имеет большое значение для организации структуры и сборки ЯПК.

Целью настоящей работы было исследовать функциональную роль трансмембранных белков Pom152 и Pom34 в организации центрального компартмента ЯПК. Для этого был проведен сравнительный электронно-микроскопический анализ структурной организации и динамики ядерных пор до и после подавления экспрессии генов, кодирующих эти белки, в клетках двух мутантных линий *S. cerevisiae* с делецией генов *NUP53* и *NUP59*.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были использованы мутантные линии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* kw2 (*nup53Δ nup59Δ GAL-pom152*) и kw4 (*nup53Δ nup59Δ GAL-pom34*) из коллекции Калифорнийского университета, Беркли, США (схемы получения этих мутантных линий описаны в статье А.С. Мадрид с соавт. (Madrid *et al.*, 2006)). В обеих линиях полностью отсутствовали белки Nup53 и Nup59 центрального канала поры и под контролем галактозного промотора осуществлялась экспрессия генов, кодирующих трансмембранные белки Pom152 (линия kw2) и Pom34 (линия kw4). На селективной среде с галактозой эти гены экспрессировались, в то время как на среде без галактозы происходило подавление их экспрессии.

Клетки дрожжей культивировали и наращивали в жидкой стандартной среде с использованием агара и дрожжевого экстракта. После вакуумной фильтрации через фильтр Milipore клетки дрожжей переносили в специальные камеры и резко замораживали под высоким давлением (устройство EM PACT2, Leica, Австрия). Затем замороженные образцы помещали в жидкий азот и переносили в камеру для замораживания-замещения (устройство AFS2, Leica, Австрия), где их фиксировали смесью 0,2 %-го тетраоксида осмия (OsO₄) и 0,05 %-го уранилацетата. После этого образцы пропитывали и заливали в смолу (Epon812).

Ультратонкие срезы 60 нм толщиной получали на ультратоме Leica Ultracut (Австрия). Затем срезы помещали на сеточки с формварной пленкой и контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Объект исследовали на электронном микроскопе JEM 100-SX (Jeol, Япония) при напряжении 60 кВ.

Для каждой линии клеток, содержащихся при пермиссивных (на среде с галактозой) или непермиссивных условиях, было проанализировано по 50 ядерных пор (всего исследовано 200 ЯПК), у которых измерялся внутренний диаметр поры (расстояние между мембранами ядерной оболочки). Для электронно-микроскопического исследования выбирались срезы клеток, имеющие достоверно не отличающуюся длину ядерной оболочки, составляющую около 5 мкм, что позволяло более точно проводить морфологический анализ. Обработку полученных данных проводили с помощью стандартных статистических методов (Васильева, 2007).

Результаты

Для электронно-микроскопического анализа было выбрано два критерия, по которым оценивалась морфология ядерных пор в оболочке ядра исследуемых мутантных линий: размер (линейный диаметр) внутреннего диаметра ЯПК и их количество на срезе ядерной оболочки, проходящем через середину ядра (см. Материалы и методы).

В наших предыдущих публикациях, а также работах других авторов было показано, что внешний диаметр ядерной поры дрожжей в нормальных клетках составляет около 100 нм, а внутренний диаметр – 60 нм (Rout, 2000; Kiseleva *et al.*, 2004). В настоящей работе исследована ультраструктура ядерных пор в двух мутантных линиях, kw2 и kw4, в которых ингибируется экспрессия генов *POM152* и *POM34* соответственно. Параллельно подсчитывали количество пор в ядерной оболочке. Проведенный электронно-микроскопический анализ срезов ядерной оболочки в клетках мутантной линии kw2 при ее содержании на селективной среде с галактозой (нормальная экспрессия гена *POM152* – контроль) показал, что в среднем внутренний диаметр поры в оболочке ядра составляет $59,3 \pm 0,9$ нм, что согласуется с раз-

мером пор нормальных линий дрожжей. При инкубации клеток на неселективной среде без галактозы (эксперимент) происходило увеличение размера ядерных пор, среднее значение которых составило $90,4 \pm 2,3$ нм (рис. 3, а, б; рис. 4, а). Количество ЯПК на срезе ядерной оболочки клеток дрожжей, содержащихся на среде с галактозой, составило $2,9 \pm 0,2$, а при инкубации клеток на среде без галактозы их количество уменьшилось более чем в два раза и составило $1,2 \pm 0,1$ (рис. 5, а).

Для мутантной линии kw4 при содержании ее на селективной среде с галактозой (контроль, нормальная экспрессия гена *POM34*) внутренний диаметр пор в среднем составил $67,7 \pm 2,0$ нм. При содержании клеток в отсутствии галактозы было выявлено лишь небольшое увеличение размеров ядерных пор, среднее значение кото-

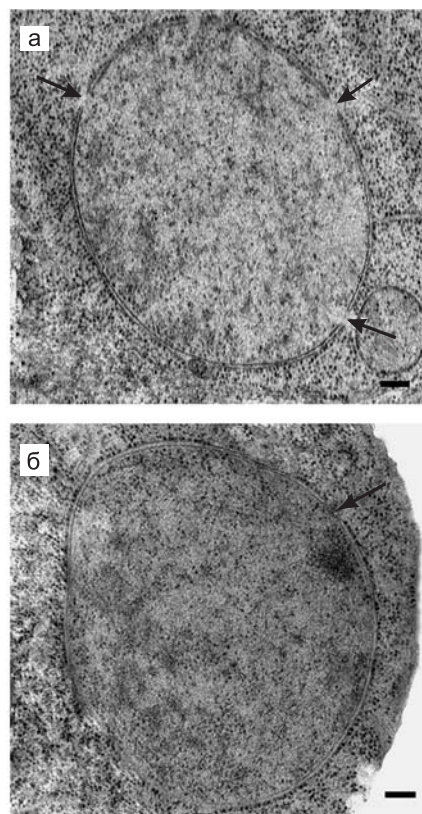


Рис. 3. Ультраструктурная организация ядерной оболочки и ядерных пор *Saccharomyces cerevisiae* до и после ингибирования экспрессии *POM152*.

а, б – ядро дрожжевой клетки до ингибирования экспрессии *POM152* (а) и после него (б). Стрелками обозначены ядерные поровые комплексы. Масштаб: 100 нм.

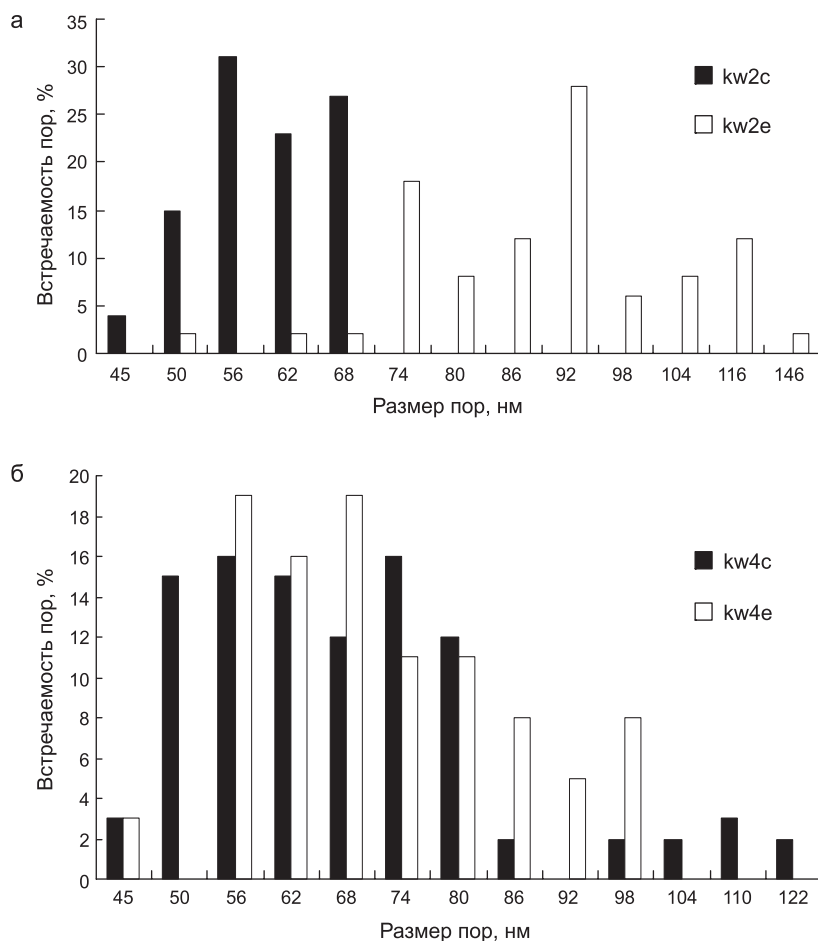


Рис. 4. Частота встречаемости ядерных пор с разным внутренним диаметром в ядерной оболочке на срезах дрожжевых клеток с разной экспрессией генов, кодирующих трансмембранные белки.

а – частота встречаемости ЯПК в оболочке ядра линии kw2a (клетки с нормальной экспрессией *POM152*) и kw2b (клетки с подавленной экспрессией *POM152*); б – частота встречаемости ЯПК в оболочке ядра линии kw4a (контрольная линия с нормальной экспрессией *POM34*) и kw4b (линия с подавленной экспрессией *POM34*).

рых составило $71,3 \pm 2,2$ нм, что достоверно не отличалось от контроля (рис. 4, б; 6, а, б). Следует отметить, что так же, как и для линии kw2, в клетках линии kw4 было зарегистрировано двукратное уменьшение количества ЯПК на срез ядерной оболочки при выращивании дрожжей в отсутствии галактозы в среде. У клеток, выращенных на селективной среде, это значение составило $3,8 \pm 0,3$, а на неселективной среде оно имело значение $1,4 \pm 0,1$ (рис. 5, б). Таким образом, в обеих линиях существенное сокращение количества одного из исследуемых трансмембранных белков приводило к уменьшению количества ЯПК в оболочке ядра, однако только в линии kw2 наблюдалось увеличение размера пор в ядерной оболочке.

Обсуждение

Согласно результатам наших исследований было установлено, что трансмембранные белки Pom152 и Pom34, несмотря на структурное сходство, имеют разную значимость для организации ядерной поры. Ранее было показано, что вместе с белками центрального канала поры, Nup53 и Nup59, они напрямую связаны с Ndc1 и отвечают за его взаимодействие с другими белками ЯПК и закрепление в поре (Onischenko *et al.*, 2009). Комплекс, образованный этими пятью белками, формирует трансмембранный слой ЯПК и прилегающий к нему слой, окружающий центральный канал поры, через который осуществляется ядерно-цитоплазма-

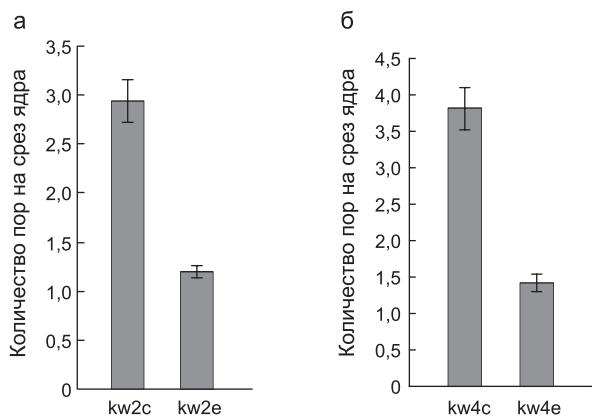


Рис. 5. Количество пор в ядерной оболочке на срезах дрожжевых клеток из линий с разной экспрессией генов, кодирующих трансмембранные белки.

а – количество пор в оболочке ядра на срезе клеток дрожжей линии kw2a (контрольная линия с нормальной экспрессией *POM152*) и kw2b (линия с подавленной экспрессией *POM152*); б – количество пор в оболочке ядра на срезе клеток дрожжей линии kw4a (контрольная линия с нормальной экспрессией *POM34*) и kw4b (линия с подавленной экспрессией *POM34*).

тический транспорт молекул. Таким образом, трансмембранные белки Pom152 и Pom34 в комплексе с белками центрального канала, Nup59 и Nup53, выполняют жизненно важные функции, связанные с обеспечением корректной структурной организации ЯПК. В исследуемых нами линиях kw2 и kw4 полностью отсутствовали белки Nup53 и Nup59, и на неселективной среде без галактозы значительно ингибировалась экспрессия либо гена *POM152*, либо гена *POM34*. Ранее было показано, что при делеции генов *NUP53*, *NUP59* и одного из генов, кодирующих трансмембранные белки Pom152 или Pom34, локализация Ndc1 нарушается (Miao *et al.*, 2006). Белок Ndc1 распределяется на мембранных структурах вне ядерной оболочки, что, вероятно, приводит к гибели клеток. Белки центрального канала поры, Nup59 и Nup53, очень схожи между собой по биохимическим и физическим параметрам, но функционально имеют большое различие (Onischenko *et al.*, 2009). Nup59 вместе с трансмембранными белками отвечает за закрепление Ndc1 в ЯПК, а Nup53 при этом, вероятно, никаких жизненно важных функций не несет (Miao *et al.*, 2006). Теми же авторами установлено, что выживаемость клеток дрожжей, несущих делеции по генам *NUP53*

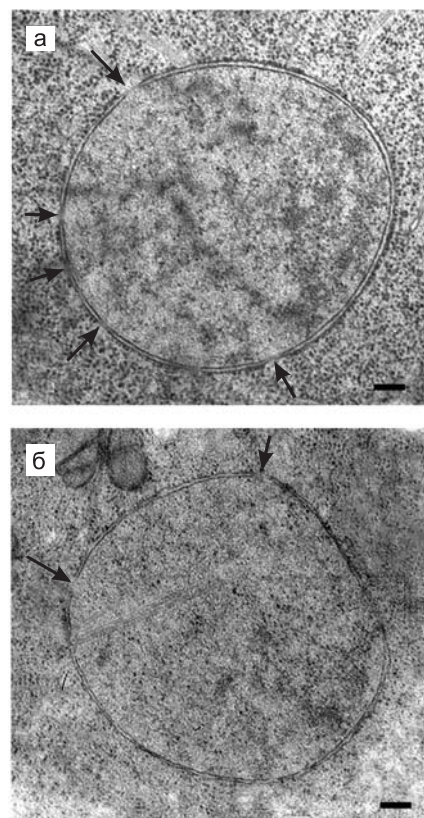


Рис. 6. Ультраструктурная организация ядерной оболочки и ядерных пор *Saccharomyces cerevisiae* до и после ингибирования экспрессии *POM34*.

а, б – ядро дрожжевой клетки до (а) и после (б) ингибирования экспрессии *POM34*. Стрелками обозначены ядерные поровые комплексы. Масштаб: 100 нм.

и *NUP59*, при существенном сокращении количества трансмембранных белков Pom152 или Pom34 резко снижается, но не происходит гибели клеток. Согласно результатам наших исследований, ингибирование экспрессии генов *POM152* или *POM34* в исследуемых мутантных линиях вызывало уменьшение количества ЯПК на срез ядерной оболочки, но только в линии kw2 наблюдалось увеличение диаметра поры. Можно предполагать, что уменьшение количества ЯПК в ядерной оболочке происходит в результате разрушения вышеописанного комплекса из 5 белков, необходимого для правильной сборки ядерных пор. Поскольку Nup53 и Nup59 в этих линиях полностью отсутствовали, а один из трансмембранных белков был представлен лишь в малом количестве, корректного связывания нуклеопоринов и трансмембранных

белков с Ndc1 в образующихся *de novo* ЯПК не происходило. Наши исследования согласуются с аналогичными данными, полученными с помощью флуоресцентной микроскопии (Onischenko *et al.*, 2009). В этой же работе было установлено, что новосинтезированные белки периферического компартмента поры не способны встроиться в ЯПК и остаются в цитоплазме, т. е. процесс сборки ядерных пор *de novo* при подавлении экспрессии *POM34* не может быть запущен, что и приводит к сокращению их количества.

Сходная ситуация наблюдалась нами при подавлении экспрессии *POM152*, однако в этом случае происходило увеличение диаметра пор. Ранее было показано, что трансмембранные белки Pom152 и Pom34 образуют между собой очень прочное кольцообразное соединение, которое через короткий трансмембранный домен нуклеопорина Pom152 связано с Ndc1 (Alber *et al.*, 2007b). Можно предполагать, что при подавлении экспрессии *POM152* происходит существенное изменение локализации Ndc1, поскольку домен, обеспечивающий контакт трансмембранных белков с Ndc1, отсутствует. Потеря связи трансмембранных белков с Ndc1 приводит, вероятно, к потере белков центрального компартмента ядерной поры, что способствует расширению диаметра формирующихся ядерных пор. При анализе ЯПК на срезах клеток линии kw2 в электронном микроскопе было отмечено, что все поры не имеют электронно-плотного материала в центре (рис. 3, а), что свидетельствует об отсутствии белков центрального канала поры. Следует отметить, что это было характерно для линии с делецией по генам *NUP53* и *NUP59* с нормальной экспрессией *POM152* и с подавленной экспрессией этого гена. Измеренный диаметр поры клеток дрожжей, выращенных на селективной среде с галактозой, составлял $59,3 \pm 0,9$ нм и увеличивался до $90,4 \pm 2,3$ нм при сокращении количества белка Pom152 при содержании клеток на среде без галактозы. Мы предполагаем, что в данном случае помимо нарушения взаимодействий между белками центрального компартмента ядерной поры изменялось расположение Ndc1 в мембране ядерной оболочки, что, по-видимому, вызывало увеличение диаметра пор.

Исследованная линия kw4 также содержала делеции по генам *NUP53* и *NUP59*, поэтому при ее анализе в электронном микроскопе, как и в линии kw2, мы наблюдали исчезновение электронно-плотного материала на месте центрального канала. Размер поры составлял при этом $67,7 \pm 2,0$ нм. При подавлении экспрессии *POM34* нами не было отмечено увеличение размера пор, поскольку Pom152 присутствовал при этом в нормальном количестве и сохранялась взаимосвязь с белком Ndc1. Небольшую долю расширенных пор можно объяснить тем, что при подавлении экспрессии *POM34* происходило частичное ослабление взаимодействия Pom152 с Ndc1, что приводило к изменению расположения Ndc1 и увеличению диаметра ЯПК (Onischenko *et al.*, 2009). Необходимо отметить, что диаметр центрального канала поры, включая внешний слой формирующих его белков, составляет около 60 нм (рис. 4) (Rout *et al.*, 2000; Alber *et al.*, 2007a), что сходно с диаметром ЯПК в клетках, в которых Pom152 и Pom34 присутствуют в достаточном количестве. Трансмембранный слой белков имеет размер около 20 нм, и при ингибировании экспрессии *POM152* происходит увеличение внутреннего диаметра ЯПК на 20–30 нм (рис. 7). Наши морфометрические данные полностью согласуются с данными, приведенными в статьях других авторов (Rout *et al.*, 2000; Alber *et al.*, 2007a).

Заключение

Проведенные нами морфологические и морфометрические исследования структурной организации и количества ядерных пор в оболочке ядра двух мутантных линий дрожжей показали, что трансмембранные белки ЯПК, Pom152 и Pom34, выполняют как сходные, так и отличающиеся друг от друга функции в клетке. Оба белка отвечают за поддержание нормальной структуры ЯПК и за их правильную сборку в процессе деления дрожжевой клетки. Согласно ранее проведенным исследованиям, полное отсутствие синтеза одного из этих белков и делеция по гену *NUP59* блокируют формирование новых ЯПК, и клетки, как правило, гибнут (Marelli *et al.*, 1998; Miao *et al.*, 2006). При снижении количества белков Pom152 или Pom34, что имело место в наших исследованиях, проис-

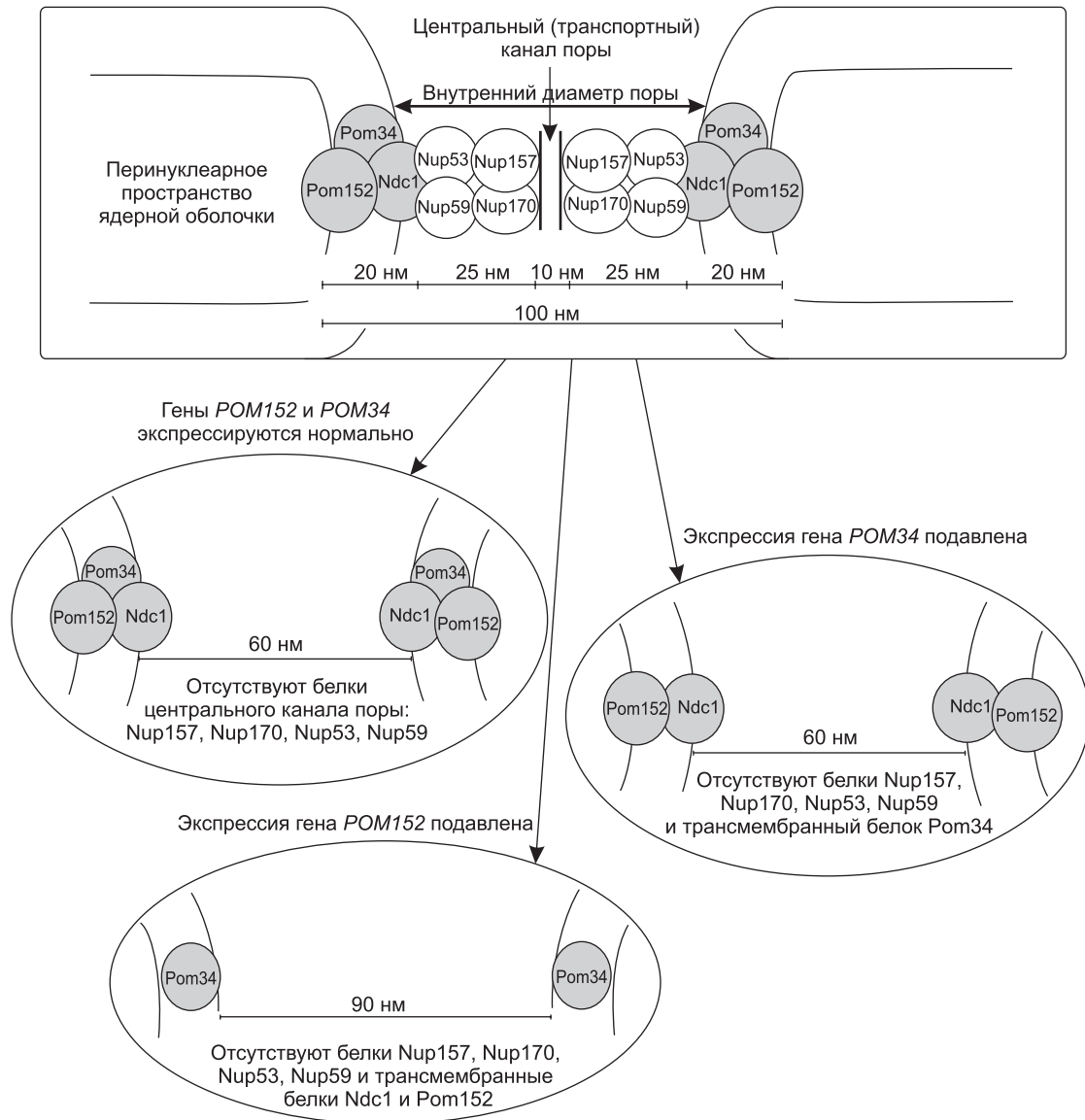


Рис. 7. Схема изменений внутреннего диаметра ЯПК при подавлении экспрессии генов, кодирующих белки центрального компартмента поры.

ходит сокращение числа образованных ЯПК более чем в два раза. Pom152 играет очень важную роль в связывании и закреплении основного трансмембранного белка Ndc1 в центральном компартменте ЯПК, поскольку взаимодействие нуклеопоринов с Ndc1 осуществляется посредством короткого трансмембранного домена Pom152. Белок Pom34 при этом можно рассматривать в качестве «усиливающего» это взаимодействие фактора, подавление экспрессии которого не оказывает существенного влияния на жизнедеятельность клеток дрожжей. Таким образом, трансмембранные белки, формирую-

щие внешний слой центрального компартмента ядерной поры дрожжей, выполняют разную функциональную роль в закреплении белков, которые организуют внутренний центральный канал, выполняющий жизненно важную функцию ядерно-цитоплазматического транспорта в клетке. Кроме того, эти белки необходимы для формирования ядерных пор *de novo* при делении дрожжевой клетки. Увеличение размеров пор связано с делецией двух генов, *POM152* и *NUP59*, что согласуется с данными, полученными ранее в работе Onischenko с соавт. (2009). В то же время выяснение вопроса о взаимодей-

ствии этих белков и механизме их участия в процессе формирования функционально активной поры требует дальнейшего исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 10-04-01426 и гранта МКБ РАН.

Литература

- Васильева Л.А. Статистические методы в биологии, медицине и сельском хозяйстве. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2007. 127 с.
- Губанова Н.В., Морозова К.Н., Киселева Е.В. Структурная организация, функция и динамика ядерных пор // Цитология. 2006. Т. 48. № 11. С. 887–899.
- Губанова Н.В., Киселева Е.В. Структурная организация и функция ядерной оболочки // Цитология. 2007. Т. 49. № 4. С. 257–269.
- Adelberg E.A. Organization and control in prokaryotic and eukaryotic cells // *Yale J. Biol. Med.* 1971. V. 43. № 6. P. 416–417.
- Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L. M. *et al.* Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex // *J. Cell Biol.* 2002. V. 158. P. 915–927.
- Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L.M. *et al.* Determining the architectures of macromolecular assemblies // *Nature*. 2007a. V. 450. P. 683–694.
- Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L. M. *et al.* The molecular architecture of the nuclear pore complex // *Nature*. 2007b. V. 450. P. 695–701.
- Allen T.D., Cronshaw J.W., Bagley S. *et al.* The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm // *J. Cell Sci.* 2000. V. 113. P. 1651–1659.
- Antonin W., Ellenberg J., Dultz E. Nuclear pore complex assembly through the cell cycle: regulation and membrane organization // *FEBS Lett.* 2008. V. 582. P. 2004–2016.
- Belgareh N., Doye V. Dynamics of nuclear pore distribution in nucleoporin mutant cells // *J. Cell Biol.* 1997. V. 136. № 4. P. 747–759.
- Cronshaw J.M., Krutchinsky A.N., Zhang W. *et al.* Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex // *J. Cell Biol.* 2002. V. 158. P. 915–927.
- D'Angelo M.A., Hetzer M.W. The role of the nuclear envelope in cellular organization // *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. V. 63. P. 316–332.
- Goldberg M.W., Wies C., Allen T.D., Wilson K.L. Dimples, pores, star-rings, and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structural intermediates nuclear pore assembly // *J. Cell. Sci.* 1997. V. 110. P. 409–420.
- Hetzer M.W. The nuclear envelope // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. V. 2. P. 1–16.
- Hetzer M.W., Walther T.C., Mattaj I.W. Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005. V. 21. P. 347–380.
- Kiseleva E., Allen T. D., Rutherford S. *et al.* Yeast nuclear pore complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 145. № 3. P. 272–288.
- 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.
- Madrid A.S., Mancuso J., Cande W.Z., Weis K. The role of the integral membrane nucleoporins Ndc1p and Pom152p in nuclear pore complex assembly and function // *J. Cell Biol.* 2006. V. 173. P. 361–371.
- Marelli M., Aitchison J.D., Wozniak R.W. Specific binding of the karyopherin Kap121p to a subunit of the nuclear pore complex containing Nup53p, Nup59p, and Nup170p // *J. Cell Biol.* 1998. V. 143. P. 1813–1830.
- Miao M., Ryan K.J., Wentz S.R. The integral membrane protein Pom34p functionally links nucleoporin subcomplexes // *Genetics*. 2006. V. 172. P. 1441–1457.
- Onischenko E., Stanton L.H., Madrid A.S. *et al.* Role of the Ndc1 interaction network in yeast nuclear pore complex assembly and maintenance // *J. Cell Biol.* 2009. V. 185. № 3. P. 475–491.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. P. 208–212.
- Rout M.P., Aitchison J.D., Supranto A. *et al.* The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism // *J. Cell Biol.* 2000. V. 148. P. 635–651.
- Stavru F., Hulsmann B.B., Spang A. *et al.* NDC1: a crucial membrane-integral nucleoporin of metazoan nuclear pore complexes // *J. Cell Biol.* 2006. V. 173. P. 509–519.
- Tcheperegine S.E., Marelli M., Wozniak R.W. Topology and functional domains of the yeast pore membrane protein Pom152p // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 5252–5258.
- Tran E.J., Wentz S.R. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge // *Cell*. 2006. V. 125. P. 1041–1053.

**INHIBITION OF POM152 AND POM34 EXPRESSION IN BUDDING YEAST
ARRESTS THE ASSEMBLY OF THE NUCLEAR PORE COMPLEX
AND INCREASES ITS INNER DIAMETER**

A.A. Strunov¹, E.A. Onishchenko², E.V. Kiseleva¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: strunov@bionet.nsc.ru; elena_kiseleva@ngs.ru;

² Division of Cell and Developmental Biology, University of California, Berkeley, USA

Summary

The central compartment of the nuclear pore complex (NPC), allowing the nuclear-cytoplasmic transport of molecules, consists of transmembrane proteins, which anchor the pore in the nuclear envelope. Morphological and morphometric analyses of nuclear pore organization in *Saccharomyces cerevisiae* with mutations in the *POM152* and *POM34* genes have been performed. The absence of Pom152 or Pom34 initiates the disruption of nuclear pore complex assembly. As a result, their quantity in the nuclear envelope decreases. Electron microscopic examination shows that the inhibition of *POM152* expression is also accompanied by an increase in NPC inner diameter, not observed in mutant cells with Pom34 depletion. Interactions of transmembrane proteins with the other nucleoporins and their role in pore reconstruction during cell division are discussed.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, electron microscopy, nuclear pores, nucleoporins, ultrastructure.