

## ИЗМЕНЕНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ ЯДРА И ЦИТОПЛАЗМЫ ООЦИТОВ КСЕНОПУСА ПОСЛЕ РАЗРУШЕНИЯ АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ ЛАТРУНКУЛИНОМ

© К. Н. Морозова,<sup>1</sup> Е. В. Киселева<sup>2</sup>

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;  
электронный адрес: <sup>1</sup> morozko@bionet.nsc.ru; <sup>2</sup> elka@bionet.nsc.ru

Сочетание методов флуоресцентной и электронной микроскопии позволило выявить внутри ядра ооцитов ксенопуса актинсодержащие филаменты, контактирующие с ядрышками, сферическими тельцами и ядерными поровыми комплексами. Установлено, что при инкубации ооцитов с латрункулином, деполимеризующим филаментный актин, происходит везикуляция мембранных структур в цитоплазме клетки, а также нарушается морфология ядра и целостность ядерной оболочки. Полученные данные свидетельствуют о том, что актинсодержащие филаменты являются важными компонентами клетки, вовлеченными в поддержание структурной организации и перемещение внутриклеточных компонентов в растущих ооцитах ксенопуса.

Ключевые слова: актин, латрункулин, ядро, ядерный матрикс, внутриядерные филаменты, ультраструктура.

Одним из важных компонентов клеток высших эукариот является цитоскелет, состоящий из микротрубочек, промежуточных филаментов и актиновых микрофиламентов (Минин, Кулик, 2004). Все они представляют собой полимерные фибриллы, построенные из глобулярных белков и взаимодействующие между собой и с другими клеточными структурами, что обеспечивает механическую прочность, эластичность и целостность клетки. Расположение и транспорт органелл, мембранных везикул, надмолекулярных комплексов и отдельных молекул осуществляется посредством их взаимодействия с микротрубочками и актиновыми филаментами. Согласно современным представлениям, транспорт органелл в живых клетках происходит в две стадии: на большие расстояния они доставляются по микротрубочкам, а их локальное перемещение происходит благодаря актиновым филаментам (Rodionov et al., 1998; Rogers, Gelfand, 2000). Актиновый цитоскелет представляет собой довольно сложную систему филаментов диаметром около 7—8 нм, соединенных между собой в виде двойной спирали и образующих как параллельные пучки, так и трехмерные сети (Минин, Кулик, 2004).

Согласно последним цитологическим и молекулярно-биологическим данным, в клетках многих организмов помимо цитоплазматического актина присутствует внутриядерный актин (Amankwah, De Boni, 1994; Parfenov et al., 1995; Sameshima et al., 2001; Bettinger et al., 2004; Hu et al., 2004; Kiseleva et al., 2004; Kukalev et al., 2005; Pederson, Aebi, 2005). Как предполагают в последнее время, актин является одним из компонентов ядерного матрикса, основными составляющими которого служат ламина и ламинсвязывающие белки (Parfenov et al., 1995; Sameshima et al., 2001; Pederson, Aebi, 2005). В настоящее время активно обсуждаются функции внутриядерного актина,

такие как участие в реконструкции хроматина, регуляции транскрипции, транспорте молекул между ядром и цитоплазмой и их перемещении внутри ядра. Однако вопрос о том, в какой форме представлен актин внутри ядра и какова его функциональная роль во внутриядерных процессах, остается во многом слабо изученным. Возникает также вопрос о взаимодействии цитоплазматического и внутриядерного актина, которое может обеспечить существование клетки как единого целого.

В нашей недавней работе при изучении внутреннего содержимого изолированных ядер ооцитов ксенопуса с использованием сканирующей электронной микроскопии была обнаружена сеть филаментов, контактирующих с ядерными поровыми комплексами и направленных внутрь ядра (Kiseleva et al., 2004). Было показано, что эти филаменты метятся антителами к актину и разрушаются под действием латрункулина, который, как известно, препятствует полимеризации актиновых филаментов (Furster et al., 2005).

Основная цель настоящей работы состояла в том, чтобы выявить наличие актинсодержащих филаментов в нативных целых ооцитах ксенопуса с помощью флуоресцентной и просвечивающей электронной микроскопии, а также оценить эффект деполимеризующего актина латрункулина на структуру цитоплазматических и ядерных компонентов клетки.

### Материал и методика

Объектом исследования служили ооциты шпорцевых лягушек *Xenopus laevis*. Лягушек содержали в профильтрованной и аэрированной воде при комнатной температуре. Животных усыпляли хлороформом, яичники с ооци-

тами выделяли из вскрытой брюшины и переносили в раствор Рингера для амфибий: 17 мМ NaCl, 5 мМ KCl и 1 мМ CaCl<sub>2</sub> (Macgregor, Varley, 1983). Ооциты на разных стадиях развития (стадии I—VI оогенеза) идентифицировали по размерам и пигментированности согласно классификации Дьюри (Duryee, 1950; Dumont, 1972). Изолированные ядра выделяли по методике, разработанной Киселевой и соавторами (Kiseleva et al., 2004).

Фиксация и окраска ооцитов для флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Выделенные из яичников ооциты отмывали свежеприготовленным раствором фосфатного буфера, фиксировали и окрашивали по модифицированной методике (Guild et al., 1997; Gard, 1999): ооциты и(или) изолированные ядра фиксировали 4%-ным параформальдегидом, затем дофиксировали 4%-ным параформальдегидом, содержащим 0.1%-ный Triton X-100 (раствор А), и окрашивали раствором А, содержащим дополнительно 1 мкМ FITC-фаллоидин, в темной камере без доступа света. Затем образцы отмывали и выкладывали на стекло в 50%-ном глицерине на фосфатном буфере. Флуоресценцию FITC анализировали с помощью люминесцентного микроскопа Axioskop-2 Plus (Zeiss, ФРГ) и конфокального микроскопа LSM 510 (Zeiss, ФРГ).

Инкубация ооцитов с латрункулином. Для разрушения актиновых филаментов ооциты инкубировали с деполимеризующим агентом латрункулином А. Латрункулин растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 250 мкг/мл и хранили при -20 °С, а перед использованием разводили до концентрации 1, 3 или 5 мкг/мл раствором Рингера. В качестве контроля использовали 0.4%-ный ДМСО в растворе Рингера. Инкубацию ооцитов проводили в растворе Рингера в эппендорфах объемом 1.5 мл в течение ночи при 4 °С при постоянном перемешивании. Затем образцы отмывали раствором Рингера и фиксировали для электронно-микроскопического исследования.

Фиксация и заливка ооцитов для электронно-микроскопического анализа. Для электронно-микроскопического анализа ооциты фиксировали 2.5%-ным раствором глутаральдегида в 0.1 М HEPES-буфере (рН 7.4) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем дофиксировали в 1%-ном растворе тетраоксида осмия на буфере HEPES в течение 1 ч при 4 °С. После фиксации образцы отмывали в 3 сменах дистиллированной воды и дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне. Дегидратированные образцы пропитывали смесью эпоксидной смолы Агар-100 с ацетоном, затем заливали в чистую смолу и полимеризовали в термостате при 60 °С в течение 2 сут (Уикли, 1975; Морозова, Киселева, 2006).

Для визуализации внутриядерных актиновых филаментов в просвечивающем электронном микроскопе использовали метод фиксации ооцитов, предложенный Парфеновым и соавторами (Parfenov et al., 1995). Ультратонкие срезы толщиной около 50—70 нм получали с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме Ultracut (Reichert, Австрия) и контрастировали растворами уранил-ацетата и цитрата свинца. Окрашенные ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе LEO 910 (Zeiss, ФРГ) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

В работе использовали следующие реактивы: фосфатный буфер, параформальдегид и глутаральдегид (Sigma, США); фаллоидин, конъюгированный с FITC (Molecular Probes, Eugene OR, США); латрункулин А (Calbiochem,

США); HEPES (Fluka, Германия); тетраоксид осмия («Аурат», Россия); Агар-100 (Agar Scientific, Англия); уранилацетат и цитрат свинца (Serva, Германия).

## Результаты

Выявление внутриядерных актинсодержащих филаментов с помощью флуоресцентной и просвечивающей электронной микроскопии. Для выявления внутриядерного актина методом флуоресцентной микроскопии использовали конъюгированный с FITC фаллоидин, специфически связывающийся с филаментным актином. На рис. 1, а—в представлены цветные фотографии нескольких ооцитов на разных стадиях развития. Меченный флуоресцентным фаллоидином актин окрашивается зеленым цветом. При малом увеличении отчетливо видно, что актин в большом количестве присутствует на периферии клетки — это так называемый кортикальный актин, подстилающий плазматическую мембрану ооцита. В цитоплазме актин представлен незначительно, однако очень яркое свечение наблюдается в области ядра.

Снимки ооцитов, сделанные при большем увеличении (рис. 1, г, д), демонстрируют интенсивную окраску ядер ооцитов, что свидетельствует о присутствии значительного количества актина внутри ядра. На рис. 1, д представлено изолированное ядро ооцита ксенопуса, также интенсивно окрашенное. На основании того, что ядра интенсивно окрашивались фаллоидином, известным маркером полимеризованного актина, нами было сделано предположение о том, что актин в ядрах ооцитов должен быть представлен предпочтительно в филаментной форме. При этом внутриядерный актин равномерно заполняет всю нуклеоплазму, окружая многочисленные внутриядерные включения. Размер этих включений (5—10 мкм), их сферическая форма, а также их многочисленность позволяют предполагать, что они, скорее всего, представляют собой сферические тельца или ядрышки, поскольку известно, что в процессе оогенеза ксенопуса идет усиленная амплификация и транскрипция ДНК и в ядре образуются сотни ядрышек (Roger et al., 2002; Gall, 2006).

Поскольку флуоресцентный анализ не позволил проанализировать с высокой точностью структурную организацию и распределение актина в ядре, а также его взаимоотношение с внутриядерными структурами, нами было проведено более детальное исследование внутриядерного содержимого с использованием электронной микроскопии. Для этого была использована фиксация, описанная в работе Парфенова с коллегами (Parfenov et al., 1995), которая специфически выявляла актиновые микрофиламенты в ооцитах травяной лягушки. Данная методика позволила нам визуализировать актиновые филаменты внутри ядер ооцитов ксенопуса и изучить их морфологию (рис. 2).

Электронно-микроскопический анализ показал, что в ядре ооцитов ксенопуса присутствуют актинсодержащие филаменты, представляющие собой вытянутые прямые нити толщиной до 0.05 мкм и длиной до нескольких микрометров (рис. 2). К сожалению, на уровне просвечивающей электронной микроскопии на срезах было невозможно определить точную длину данных филаментов. Установлено, что актинсодержащие филаменты встречаются во всех районах нуклеоплазмы и часто располагаются вблизи ядрышек (рис. 2, в, г). Филаменты могут быть ориентированы параллельно или собираться в пучки, образуя



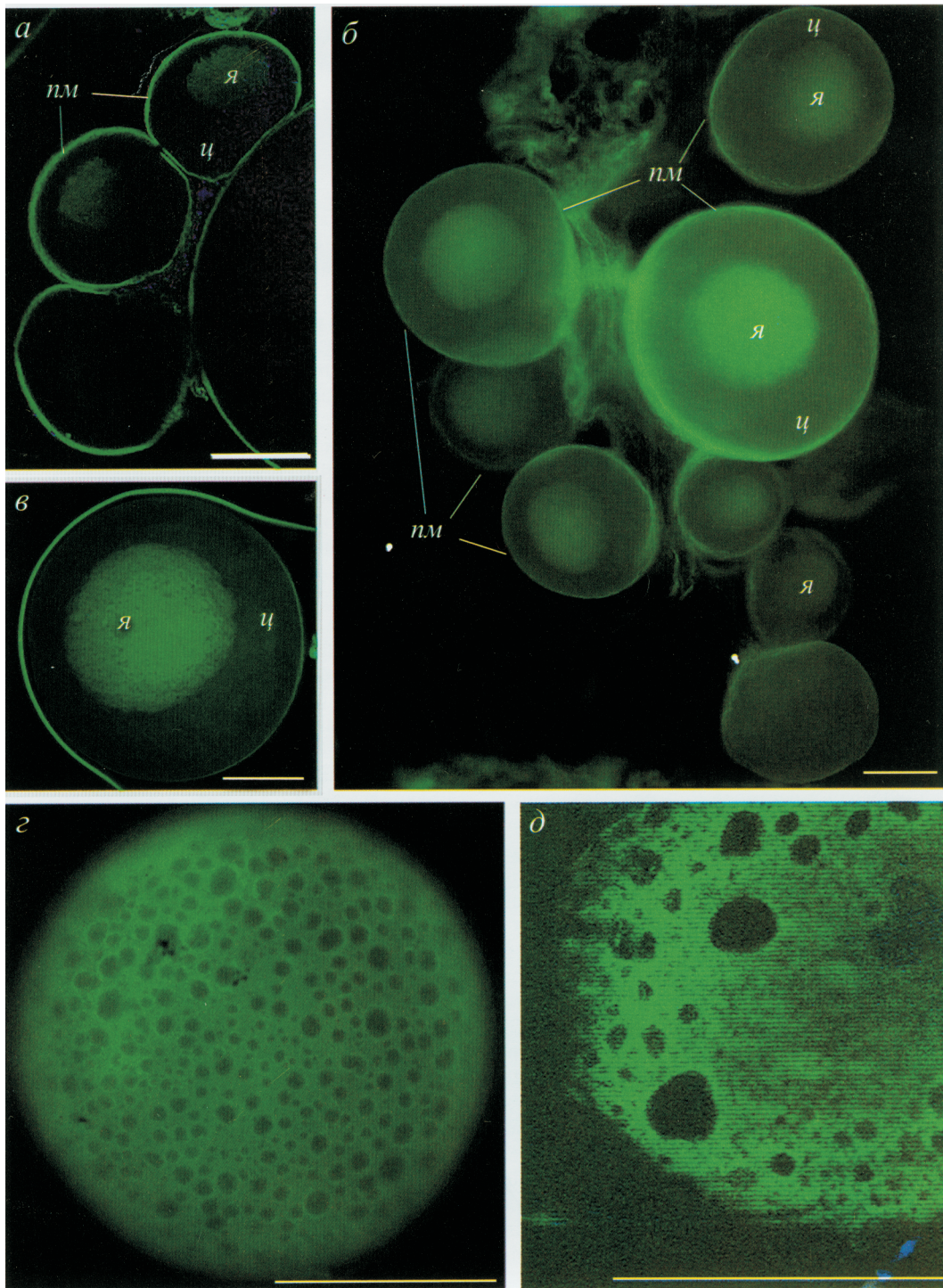


Рис. 1. Ооциты ксенопуса, окрашенные FITC-фаллоидином, выявляющим филаментный актин (зеленая окраска).

*а–в* — снимки ооцитов ксенопуса на разных стадиях развития, полученные в флуоресцентном микроскопе; актин выявляется на периферии клетки (кортикальный актин), в незначительной степени в цитоплазме и в большом количестве внутри ядра. *г, д* — ядра ооцитов ксенопуса на оптических срезах, полученных в конфокальном микроскопе: *г* — изолированное ядро ооцита ксенопуса, *д* — фрагмент ядра целого ооцита при большом увеличении; внутри ядер идентифицируются неокрашенные включения округлой формы, соответствующие, вероятно, ядрышкам или сферическим тельцам. *п.м.* — плазматическая мембрана ооцита, *ц* — цитоплазма, *я* — ядро. Масштабные отрезки — 250 мкм.

сеть, пронизывающую внутриядерное пространство в различных направлениях. При большом увеличении можно видеть, что данные фибриллы формируют мелкие, регулярно повторяющиеся изгибы с периодичностью 40–50 нм, на основании чего можно предполагать, что филаменты спирально закручены (рис. 2, *е, ж*). Иногда

можно наблюдать микрофиламенты, контактирующие с ядерной оболочкой, при этом микрофиламенты и их пучки часто располагаются перпендикулярно ядерной оболочке (рис. 3).

Просвечивающая электронная микроскопия позволила также установить, что актинсодержащие филаменты



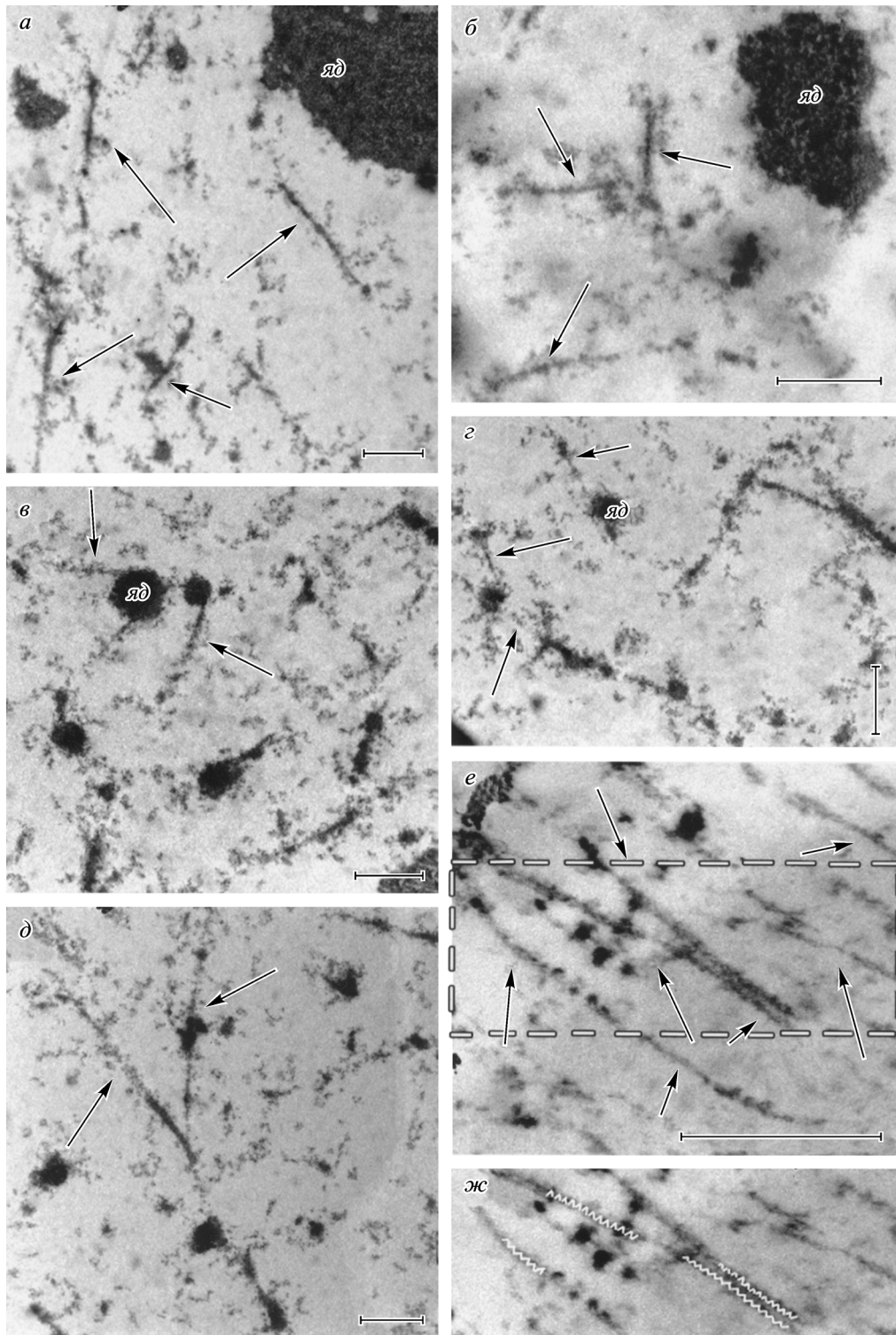


Рис. 2. Морфологические особенности и распределение актинсодержащих филаментов в центральных областях нуклеоплазмы ооцитов ксенопуса, представленные на уровне просвечивающей электронной микроскопии.

Использована специфическая фиксация, выявляющая актиновые филаменты. *а, б* — внутриядерные филаменты (отмечены *стрелками*) имеют разную направленность; *в, з* — внутриядерные филаменты вблизи ядрышек (*яд*); *д* — контактирующие между собой филаменты; *е* — актинсодержащие филаменты при большом увеличении; *жс* — фрагмент того же рисунка, на котором *зигзагообразными линиями* отмечена спиральная скрученность филаментов. Масштабные отрезки — 1 мкм.



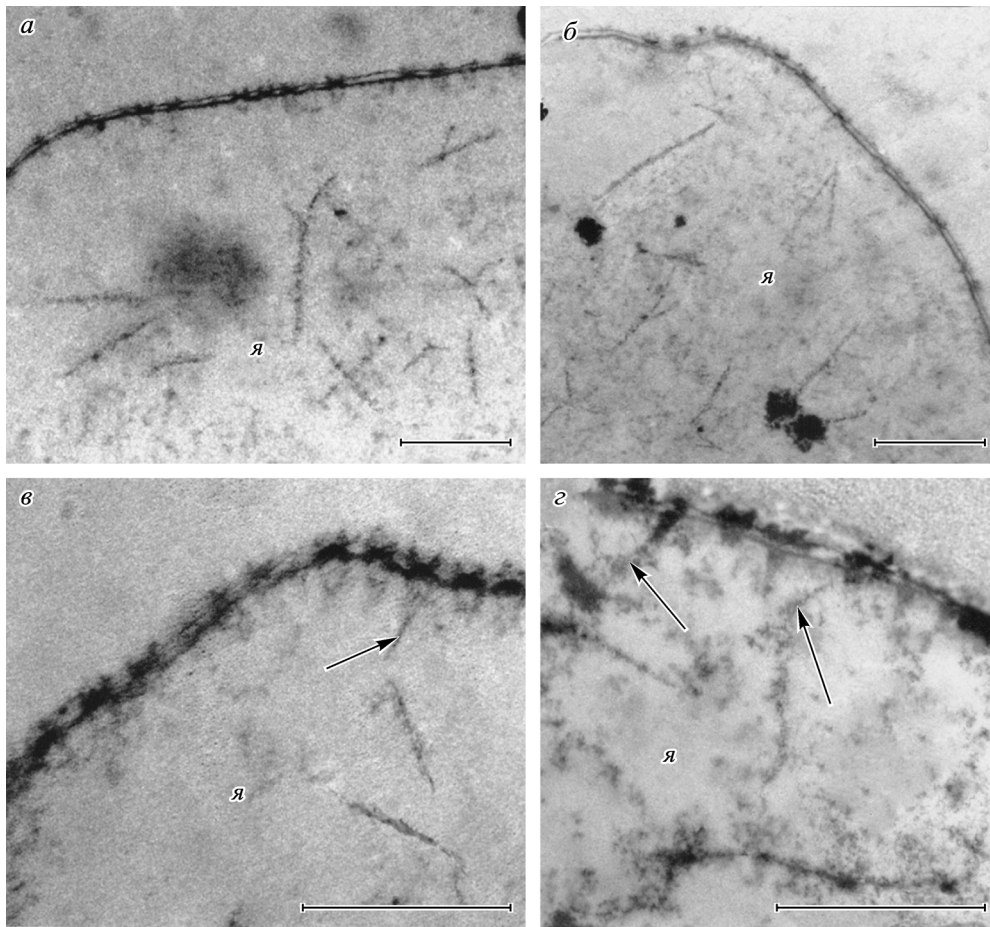


Рис. 3. Внутриядерные актинсодержащие филаменты в периферических областях нуклеоплазмы ооцитов ксенопуса.

*a, б* — филаменты имеют разную направленность по отношению к ядерной оболочке; *в, г* — филаменты (стрелки), контактирующие с верхушками basket-структур ядерных поровых комплексов. *я* — ядро; цитоплазма клетки выглядит пустой, так как ооциты зафиксированы с использованием фиксации, выявляющей филаментный актин и не сохраняющей цитоплазматических компонентов (см. раздел «Материал и методика»). Масштабные отрезки — 0,5 мкм.

контактируют с внутриядерными верхушками ядерных пор, так называемыми basket-структурами (рис. 3). Более подробная информация об организации внутриядерных актинсодержащих филаментов была получена нами ранее при исследовании содержимого изолированных ядер ооцитов ксенопуса с использованием высокоразрешающей сканирующей электронной микроскопии (Kiseleva et al., 2004).

Исследование влияния латрункулина, разрушающего филаментный актин, на ультраструктуру ооцита. С целью выяснения функциональной роли актинсодержащих филаментов в ядрах ооцитов амфибий и филаментного актина в цитоплазме была поставлена задача сравнить морфологию ядра и цитоплазмы целого ооцита до и после воздействия агента, разрушающего актин. В качестве такого агента был выбран латрункулин, деполимеризующий филаментный актин. Мы инкубировали нативные целые ооциты ксенопуса с раствором латрункулина в ДМСО в трех разных концентрациях, после чего образцы фиксировали, заключали в эпоксидную смолу по стандартной методике и анализировали в электронном микроскопе. Результаты данного эксперимента представлены на рис. 4—6.

Прежде всего мы проверили, не влияет ли инкубация ооцитов с 0,4%-ным раствором ДМСО на их ультраструктуру.

В контрольных экспериментах были зафиксированы ооциты без инкубации (рис. 4, *a—в*) и ооциты после инкубации с ДМСО (рис. 4, *г—е*). Как видно на рисунке, существенных нарушений в морфологии ооцита после инкубации с ДМСО нет, цитоплазма и нуклеоплазма имеют типичное строение, т. е. инкубация ооцитов в растворе ДМСО не изменяла структурную организацию ядра и цитоплазмы.

При инкубации ооцитов с латрункулином в низкой концентрации (1 мкг/мл) в цитоплазме клеток идентифицируются все типичные органеллы: хорошо заметны желточные и кортикальные гранулы, эндоплазматический ретикулум и митохондрии (рис. 5, *a—в*). Незначительные изменения регистрируются в цитоплазме, где появляются мембранные структуры неправильной формы (рис. 5, *б*), и в ядре, где отмечаются небольшие светлые пятна — неокрашенные участки нуклеоплазмы (рис. 5, *в*). Однако ядерная оболочка имеет при этом типичный вид, и в ней легко различимы ядерные поровые комплексы (рис. 5, *в*).

При повышении концентрации латрункулина в растворе до 3 мкг/мл в ооците происходят более существенные изменения (рис. 5, *г—ж*). Содержимое цитоплазмы становится более гетерогенным, заметно уменьшается количество желточных гранул, митохондрий и длинных цистерн эндоплазматического ретикулума. Наблюдается по-

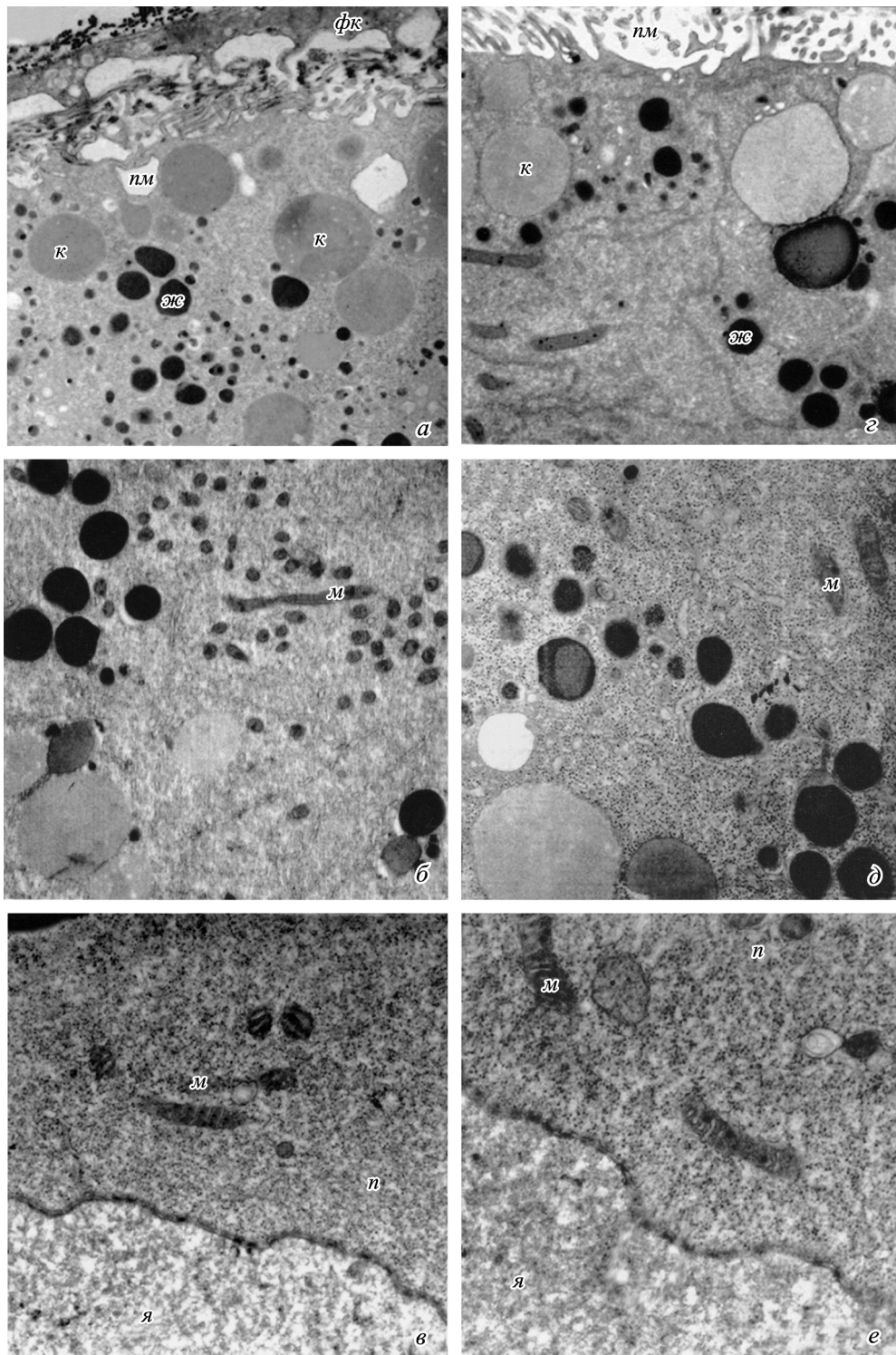


Рис. 4. Морфология ооцитов ксенопуса до (а—в) и после (з—е) их инкубации в растворе 0,4%-ного диметилсульфоксида. Контроль к опыту с латрункулином (см. раздел «Материал и методика» и рис. 5, 6). а, з — периферические; б, д — средние; в, е — околоядерные области цитоплазмы ооцита; видно, что структурная организация цитоплазматических органелл, ядра и ядерной оболочки в ооцитах не нарушается после их инкубации с диметилсульфоксидом. жс — желточные гранулы, к — кортикальные гранулы, м — митохондрии, пм — плазматическая мембран, фк — фолликулярные клетки, ц — цитоплазма, я — ядро, Масштабные отрезки — 1 мкм.



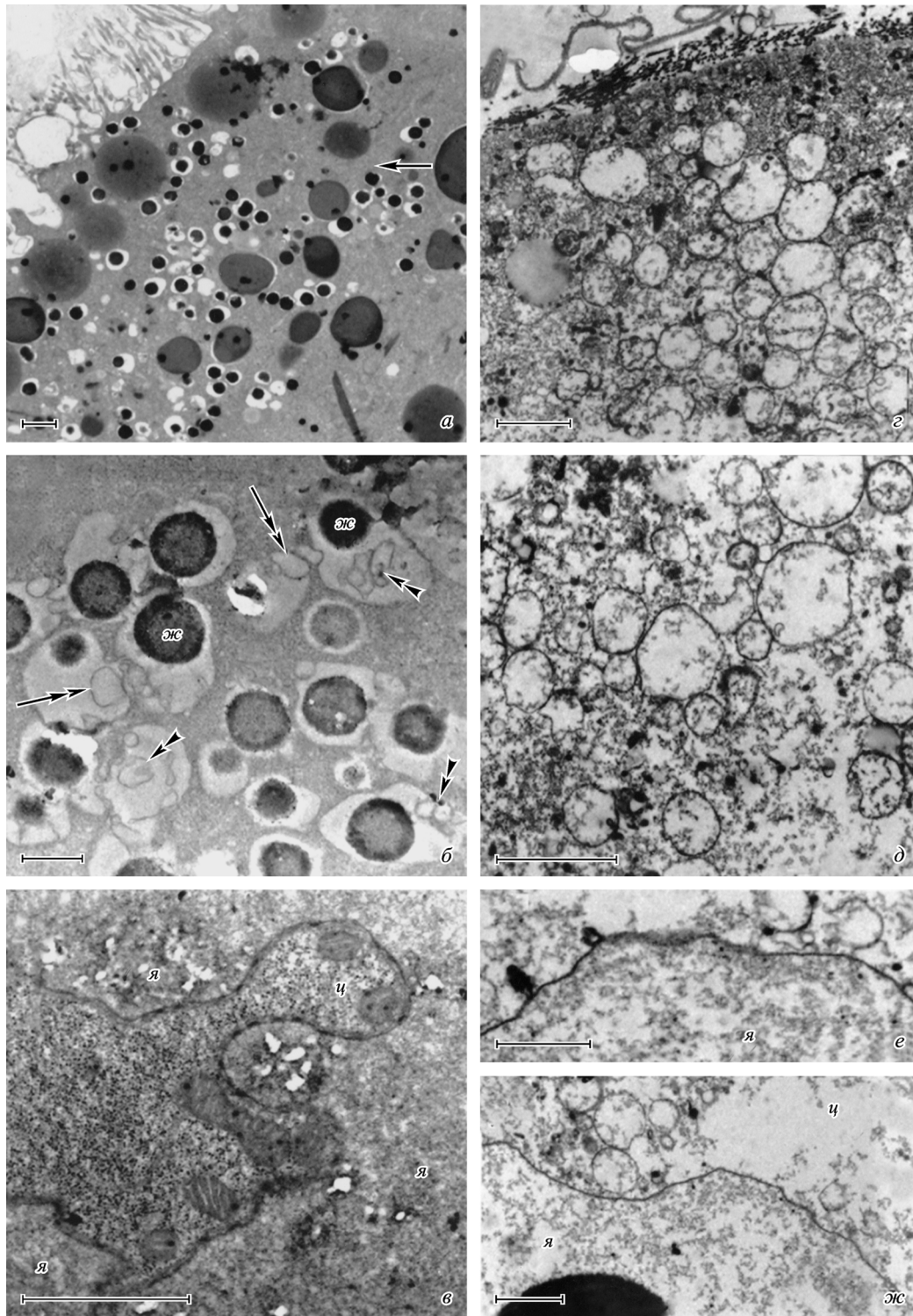


Рис. 5. Ультраструктура ооцитов ксенопуса после их инкубации с латрункулином в концентрациях 1 (а—в) и 3 (г—ж) мг/мл. а, г — периферические; б, д — средние; в, е, ж — околоядерные области цитоплазмы ооцита; фото б демонстрирует скопление мембранных структур неправильной формы (указаны двойными головками стрелок) вблизи желточных гранул; в — в ядре появляются пустые участки, не заполненные хроматином; г, д — в цитоплазме присутствуют мелкие и крупные электронно-прозрачные мембранные пузыри; г—ж — при увеличении концентрации латрункулина до 3 мкг/мл ядерная оболочка сохраняется, однако наблюдается разреженность нуклеоплазмы и цитоплазмы и усиливается везикуляция мембранных структур во всех областях цитоплазмы; обозначения те же, что и на рис. 2, 4. Масштабные отрезки — 2 мкм.



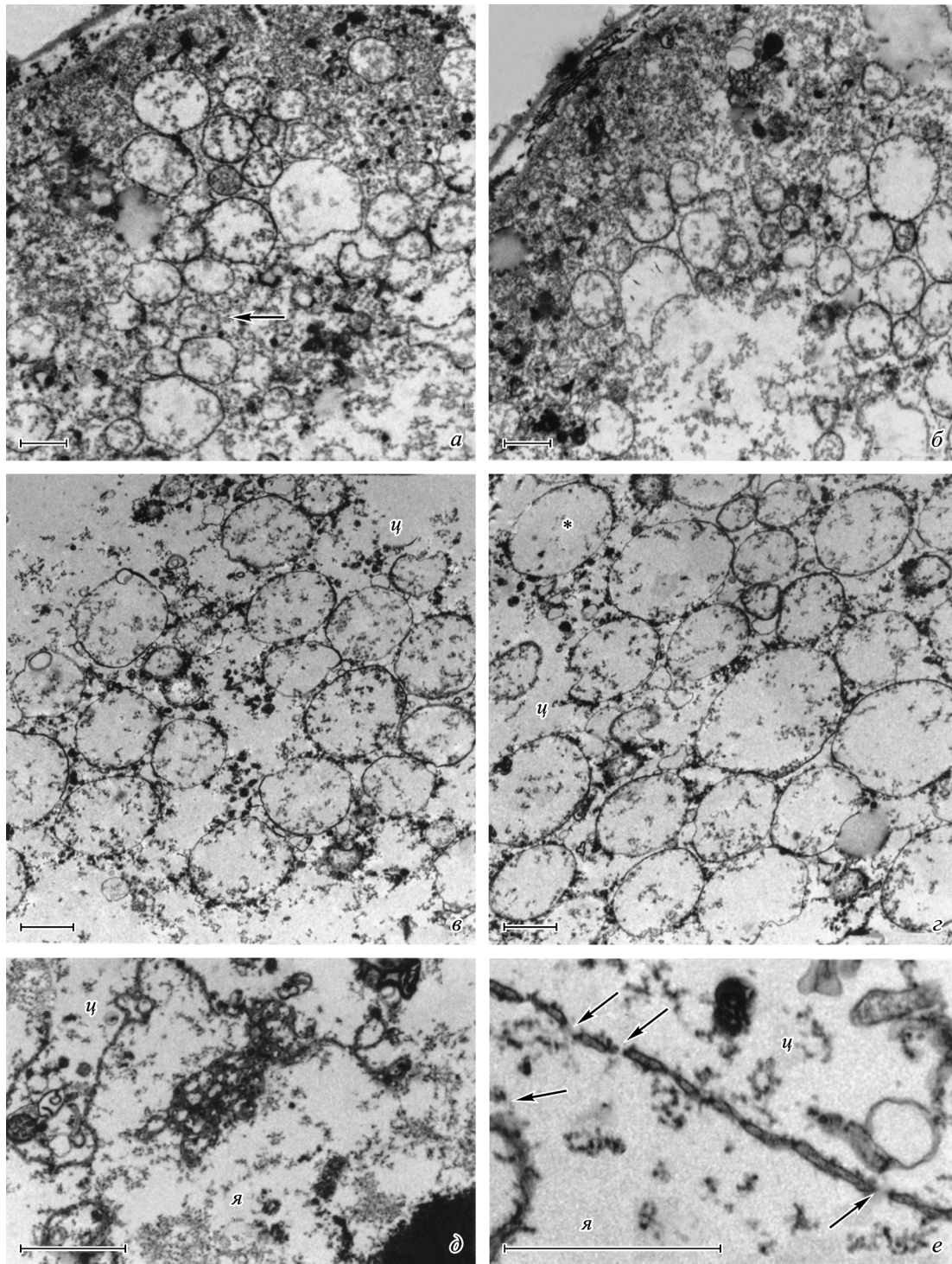


Рис. 6. Ультраструктура ооцитов ксенопуса после их инкубации с латрункулином в концентрации 5 мкг/мл.

*a, б* — периферические; *в, г* — средние области цитоплазмы ооцита; *д* — ядро ооцита ксенопуса; *е* — фрагмент ядерной оболочки; видно, что количество мембранных пузырей в цитоплазме увеличивается по сравнению с тем, что регистрируется при более низкой концентрации латрункулина (см. рис. 5); наблюдается существенное снижение плотности как ядра, так и цитоплазмы, а также нарушается целостность ядерной оболочки (*головками стрелок* отмечены разрывы в ядерной оболочке). Обозначения те же, что и на рис. 4. Масштабные отрезки — 1 мкм.

явление крупных округлых электронно-прозрачных вакуолей, окруженных однослойной мембраной. Подобные мембранные «пузыри» образуют агрегаты по всей цитоплазме, от плазматической мембраны до ядерной оболочки (рис. 5, *г—е*). Ядерная оболочка сохраняет свою целостность и непрерывность, однако нуклеоплазма становится

сильно разреженной. По-прежнему можно различить ядрышки и сферические тельца в ядре и ядерные поры в ядерной оболочке (рис. 5, *е, ж*), но в целом содержимое ядра выглядит сильно разреженным.

При инъекции латрункулина в более высокой концентрации (5 мкг/мл) электронная плотность цитоплазмы



еще больше уменьшается, органеллы и рибосомы практически исчезают, увеличивается число агрегатов крупных мембранных пузырей с электронно-прозрачным содержимым (рис. 6). Нуклеоплазма также выглядит практически пустой, обедненной какими-либо структурами. Ядерная оболочка по-прежнему остается непрерывной, можно различить двойную мембрану в ее составе, однако ядерные поровые комплексы во многих местах отсутствуют и в некоторых участках вместо пор наблюдаются разрывы в оболочке.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что деполимеризация актина при инкубации ооцитов с латрункулином приводит к нарушению организации не только цитоплазмы ооцита, но и в значительной степени его ядра. Нарушения актинового цитоскелета изменяют форму и структуру всех мембранных компонентов клетки, вызывают их массовое слияние и формирование мембранных агрегатов. Деполимеризация актинсодержащих филаментов в ядре приводит к нарушению упорядоченности внутриядерных структур, а также появлению дефектов в ядерной оболочке и ядерных поровых комплексах.

### Обсуждение

Известно, что в большинстве эукариотических клеток актин находится преимущественно в цитоплазме, а в ядре присутствие актина до сих пор дискутируется (Pederson, Aebi, 2002; Gall, 2006). Благодаря исследованиям последних лет актин был найден в ядре многих типов клеток (Pederson, Aebi, 2002; Bettinger et al., 2004). Каким же образом актин оказывается в ядре и почему он выявляется в ядрах не всех типов клеток? Мономерный актин достаточно мал, чтобы свободно диффундировать через ядерные поры в ядро, но, как было обнаружено совсем недавно, в большинстве клеток свободному поступлению актина в ядро препятствует его активный экспорт, опосредованный экспортином-6 (Schuh, Ellenberg, 2006). Экспортин-6 специфически выводит актин из соматических ядер, поэтому в них поддерживается низкая его концентрация, а высокая концентрация актина в ядрах ооцитов ксенопуса (4–6 мг/мл) объясняется отсутствием в этих ядрах экспортина-6 (Bohnsack et al., 2006).

Вопрос о том, в какой форме представлен актин внутри ядра и какова его функция, является одним из актуальных в настоящее время. Было высказано предположение о том, что актиновые полимеры в ядре могут отличаться от цитоплазматических (Hofmann, Lanerolle, 2006). Недавно для изолированных ядер ооцитов ксенопуса была предложена модель организации внутриядерного актина в виде губкообразной сети, состоящей из филаментного актина (Bohnsack et al., 2006). Внутриядерный скелет был обнаружен также в гигантских полиплоидных ядрах слюнной железы дрозофилы (Schun, Ellenberg, 2006). В ооцитах морской звезды была описана сокращающаяся внутриядерная актинсодержащая сеть, которая опосредовала движение хромосом в сторону экваториальной части веретена в метафазе первого деления мейоза (Lenart et al., 2005). Интересно, что при деполимеризации актина хромосомы в таких ооцитах теряли связь с системой микротрубочек веретена деления, в результате чего образовывалась анеуплоидная клетка.

Ранее в наших исследованиях изолированных ядер ксенопуса с использованием сканирующей электронной микроскопии актин был выявлен в составе внутриядерных филаментов (Kiseleva et al., 2004). Эти филаменты

диаметром от 12 до 100 нм прикреплялись к ядерным поровым комплексам и пронизывали все внутриядерное пространство. Сходные по морфологии фибриллы, отходящие от basket-структуры ядерных пор, были обнаружены при изучении срезов изолированных ядер ооцитов ксенопуса, зафиксированных в буфере с повышенным содержанием ионов магния, стабилизирующих актиновые филаменты (Arlucea et al., 1998).

В настоящей работе с использованием конфокальной и просвечивающей электронной микроскопии продемонстрировано наличие актина и актинсодержащих филаментов в ядрах целых ооцитов ксенопуса. Данные филаменты имеют вид спирально скрученных фибрилл толщиной около 0.05 мкм и длиной до нескольких микрометров, пронизывающих все внутриядерное пространство и контактирующих с ядрышками, сферическими тельцами и ядерными поровыми комплексами. Эти результаты согласуются с данными наших предыдущих исследований, полученными на уровне сканирующей электронной микроскопии. Полученные нами электронно-микроскопические данные подтверждаются результатами биохимических исследований, продемонстрировавшими присутствие 4–6 мг/мл актина в ядре ооцитов ксенопуса (Clark, Rosenbaum, 1979; Pederson, Aebi, 2002). Следует отметить, что актинсодержащие структуры уже были ранее описаны при использовании просвечивающей электронной микроскопии в ядрах ооцитов другого вида амфибий — травяной лягушки (Парфенов, Галактионов, 1987; Parfenov et al., 1995).

Наши исследования показали, что воздействие на ооцит латрункулина — агента, разрушающего актиновые филаменты, приводит к значительным нарушениям как в цитоплазме, так и в ядре. Известно, что на молекулярном уровне действие латрункулина основано на формировании комплексов с мономерами глобулярного G-актина, это не дает им возможности полимеризоваться в сеть филаментов фибриллярного F-актина, а также приводит к деполимеризации уже имеющегося F-актина (Furstner et al., 2005).

Согласно нашим данным, после инкубации ооцитов с латрункулином снижается плотность цитоплазмы клеток, исчезают типичные цистерны и пузырьки эндоплазматического ретикулума и в цитоплазме появляются мембранные пузыри разного размера. Поскольку было установлено, что актиновый цитоскелет необходим для нормальной организации, распределения и локального перемещения эндоплазматического ретикулума в цитоплазме клеток (Fehrenbacher et al., 2002; Poteryaev et al., 2005), можно предположить, что изменение морфологии эндоплазматического ретикулума в ооцитах амфибий происходит за счет разрушения актинового цитоскелета. Это подтверждается данными других работ, выявившими везикуляцию клеточных мембран, их агрегацию, скопление или слияние при нарушении функционирования актина в результате различных воздействий (Lamaze et al., 1997; Bernstein et al., 1998), в частности под действием электрического тока (Simon, Pon, 1996). В норме филаментный актин формирует локальный структурный барьер, препятствующий свободному и хаотичному слиянию мембран, а различные агенты, изменяющие организацию актинового цитоскелета, могут либо ингибировать, либо стимулировать процессы слияния мембран (Aunis, 1998; Lang et al., 2000; Jahraus et al., 2001; Gupton et al., 2006). Мы полагаем, что наблюдаемое в наших исследованиях появление в цитоплазме ооцита мембранных пузырей после обработки ооцитов латрункулином может объясняться именно тем,

что латрункулин разрушает актиновый скелет, приводя к беспорядочному сплавлению мембран и формированию их агрегатов в цитоплазме. В ходе проведенных исследований мы также установили, что обработка клеток латрункулином приводит к серьезным изменениям морфологии ядра и ядерной оболочки, что также косвенно подтверждает наличие внутриядерного актина.

Таким образом, наши данные в совокупности с результатами других исследований свидетельствуют о том, что нарушение нормального функционирования актиновых филаментов приводит к изменению внутриклеточного распределения и формы мембранных органелл, в частности ядерной оболочки.

Какова же все-таки функция актина внутри ядра?

Недавние исследования продемонстрировали присутствие актина в районах транскрипции. Установлено, что актин связывается с большой субъединицей РНК-полимеразы I, II и III (Percipalle et al., 2002; Hofmann et al., 2004; Hu et al., 2004; Philimonenko et al., 2004). Участие актинсодержащих филаментов в транспорте РНК-частиц к тельцам Кахала, содержащим набор сплайсосомных белков, обсуждалось в нашей предыдущей работе, в которой была продемонстрирована непосредственная связь между этими структурами (Kiseleva, 2004). Помимо возможного отношения к регуляции транскрипции актину в ядре приписывается также участие в реорганизации хроматина у про- и эукариот. Так, например, блокирование подобного актину белка MreB у *E. coli* приводит к нарушению сегрегации хромосом (Pederson, Aebi, 2002; Kruse et al., 2006). Недавнее исследование линии мутантных по актину клеток млекопитающих позволило показать участие актин-миозинового комплекса во внутриядерном перемещении генетического материала (Chuang et al., 2006). Авторы показали, что инактивированные хромосомные районы интерфазных клеток млекопитающих, расположенные обычно на периферии интерфазного ядра вблизи ядерной оболочки, после активации актин-миозинового комплекса перемещались внутрь ядра. Был сделан вывод о том, что для перемещения хромосомных доменов необходимо взаимодействие между полимеризованным актином и ядерным миозином в ядре. Согласно модели, предложенной Хофманном с коллегами (Hofmann et al., 2004), ядерный миозин связывается одним концом с ДНК, а другим — с актином. Сформированный комплекс перемещается вдоль актиновых филаментов к менее плотным участкам эухроматина, где и происходит транскрипция. Таким образом, внутриядерный актин может принимать опосредованное участие в обеспечении транскрипции.

Наиболее убедительным, на наш взгляд, кажется предположение о функции актиновых филаментов во внутриядерном транспорте и ядерно-цитоплазматическом экспорте молекул (Kimura et al., 2000; Percipalle et al., 2002, 2003; Bettinger et al., 2004). Было показано, что перемещение ретровирусной РНК и клеточных белков, а также такого крупного материала, как капсиды вируса герпес или хромосомные локусы, ингибируется препаратами, деполимеризующими актин (Forest et al., 2005; Chuang et al., 2006).

Проведенный нами электронно-микроскопический анализ выявил присутствие актинсодержащих филаментов на периферии ядра, вблизи ядерной оболочки, иногда в контакте с basket-структурами ядерных поровых комплексов, а также в центре ядра в непосредственной близости с ядрышками. Тесный контакт внутриядерных актинсодержащих филаментов с ядрышковым материалом и с ядерными порами в совокупности с биохимическими

данными позволяет предполагать существование внутриядерного актинового каркаса, динамически взаимодействующего с компонентами ядра и участвующего в перемещении материала, в частности РНК-частиц, внутри ядра и, возможно, в ядерно-цитоплазматическом транспорте молекул. Возможная роль внутриядерного актина в переносе РНК-комплексов и белков уже обсуждалась ранее в литературе (Gounon, Karsenti, 1981; Reddy, Busch, 1983; Парфенов Галактионов, 1987; Politz, Pederson, 2000; Hofmann et al., 2001; Kukalev et al., 2005), однако лишь недавние исследования, четко продемонстрировавшие связь актинсодержащих микрофиламентов с basket-структурой ядерных поровых комплексов (Kiseleva et al., 2004), подтвердили эту гипотезу. Можно предполагать, что, соединяя внутриядерные структуры напрямую с ядерными порами, актиновые филаменты могут обеспечивать путь для направленного транспорта материала внутри ядра и его быстрого экспорта в цитоплазму.

Существует мнение о том, что взаимосвязь между клеточными органеллами может осуществляться как посредством ядерно-цитоплазматического транспорта через ядерные поры, так и на уровне взаимодействия внутриядерного и цитоплазматического актина через специальные белки — несприны, расположенные на мембранах ядерной оболочки. Поскольку ядерная оболочка, с одной стороны, тесно связана с такими компонентами ядерного матрикса, как ламина (Goldberg et al., 1998) и актинсодержащие филаменты (Kiseleva et al., 2004), а с другой — с цитоскелетом (Chen et al., 2006; Haque et al., 2006), также содержащим актин, можно предположить, что взаимодействие внутриядерного и цитоплазматического актина может выполнять важную роль в ядерно-цитоплазматическом транспорте молекул. Такое предположение согласуется с недавними исследованиями, показавшими, что транспорт частиц герпеса как в цитоплазме, так и в ядре зараженной клетки блокируется латрункулином, разрушающим актин (Forest et al., 2005).

Поскольку последовательные этапы формирования ядерной оболочки зависят от ядерно-цитоплазматического транспорта молекул (Goldberg et al., 1997; Wiese et al., 1997; Cohen et al., 2003), актинсодержащие филаменты могут быть непосредственными участниками ее сборки. В пользу этого свидетельствуют результаты недавних исследований, показавших, что в интерфазных ядрах дрожжей, в которых идет активная достройка ядерной оболочки, хроматин активно отодвигается от образующихся пор внутрь ядра с участием внутриядерных филаментов (Ishii, 2002). Показано также, что при блокировании белка 4.1 (хроматинмодифицирующего фактора), связывающегося с актином, нарушается сборка ядерной оболочки *in vitro* в экстракте, выделенном из ооцитов ксенопуса (Krauss et al., 2003; Bettinger et al., 2004), т. е. внутриядерный актин в совокупности с белком 4.1, по-видимому, действительно выполняет важную регуляторную функцию в процессе формирования ядерной оболочки.

Можно предположить, что актин в ядре формирует сеть актинсодержащих филаментов, которые, вероятно, стабилизируют ядро ооцитов ксенопуса, обеспечивая каркас для этого гигантского ядра, что необходимо для поддержания его огромного объема. Это предположение высказывалось и другими исследователями (Bohnsack et al., 2006), которые продемонстрировали, что ядро, из которого актин был выведен с помощью экспортина-6, теряло свою желеобразную структуру и сплющивалось при выделении его из клетки.



И наконец, сеть из фибриллярного актина, способная формировать тяжи через все ядро, возможно, необходима для обеспечения внутриядерного транспорта, что существенно для крупных ядер, в которых перемещение материала посредством диффузии, как в случае мелких ядер соматических клеток, затруднено. В таком большом объеме (объем ядра ооцита примерно в 25 000 раз больше ядра типичной соматической клетки) для быстрого перемещения различных молекул, полимераз, хромосомных районов и прочего внутриядерного материала требуется направленный транспорт, что и обеспечивается присутствием актинсодержащих тяжей. Можно заключить, что обнаружение актинсодержащих филаментов в ядрах ооцитов и исследование их морфологических и динамических характеристик открывают новые перспективы для изучения возможной роли внутриядерного актина в функционировании внутриядерных структур, а также взаимодействия ядерного матрикса и цитоскелета.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-48261-а и 07-04-00416-а) и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### Список литературы

- Минин А. А., Кулик А. В. 2004. Внутриклеточный транспорт. Принципы регуляции. Успехи биол. хим. 44 : 225—262.
- Морозова К. Н., Киселева Е. В. 2006. Морфометрический анализ динамики эндоплазматического ретикула в растущих ооцитах амфибий. Цитология. 48 (12) : 980—990.
- Парфенов В. Н., Галактионов К. И. 1987. Внутриядерные актиновые микрофиламенты в ооцитах травяной лягушки. Цитология. 29 (12) : 142—149.
- Уикли Б. 1975. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир. 324 с.
- Amankwah K. S., De Boni U. 1994. Ultrastructural localization of filamentous actin within neuronal interphase nuclei *in situ*. Exp. Cell Res. 210 : 315—325.
- Arlucea J., Andrade R., Alonso R., Arechaga J. 1998. The nuclear basket of the nuclear pore complex is part of a higher-order filamentous network that is related to chromatin. J. Struct. Biol. 1 : 51—58.
- Aunis D. 1998. Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. Int. Rev. Cytol. 181 : 213—320.
- Bernstein B. W., DeWit M., Bamberg J. R. 1998. Actin disassembles reversibly during electrically induced recycling of synaptic vesicles in cultured neurons. Brain Res. Mol. Brain Res. 53 : 236—251.
- Bettinger B. T., Gilbert D. M., Amberg D. C. 2004. Actin up in the nucleus. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5 : 410—415.
- Bohnsack M. T., Stüven T., Kuhn C., Cordes V. C., Gölich D. 2006. A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. Nat. Cell Biol. 8 : 257—263.
- Chen I. H., Huber M., Guan T., Bubeck A., Gerace L. 2006. Nuclear envelope transmembrane proteins (NETs) that are up-regulated during myogenesis. BMC Cell Biol. 7 : 38—55.
- Chuang C. H., Carpenter A. E., Fuchsova B., Johnson T., de Lanerolle P., Belmont A. S. 2006. Long-range directional movement of an interphase chromosome site. Curr. Biol. 16 : 825—831.
- Clark T. G., Rosenbaum J. L. 1979. An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. Cell. 18 : 1101—1108.
- Cohen M., Feinstein N., Wilson K. L., Gruenbaum Y. 2003. Nuclear pore protein gp210 is essential for viability in HeLa cells and *Caenorhabditis elegans*. Mol. Cell. Biol. 14 : 4230—4237.
- Dumont J. N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. J. Morphol. 136 : 153—179.
- Duryee W. 1950. Chromosomal physiology in relation to nuclear structure. Ann. N. Y. Acad. Sci. 50 : 920—924.
- Fehrenbacher K. L., Davis D., Wu M., Boldogh I., Pon L. A. 2002. Endoplasmic reticulum dynamics, inheritance, and cytoskeletal interactions in budding yeast. Mol. Biol. Cell. 13 : 854—865.
- Forest T., Barnard S., Baines J. D. 2005. Active intranuclear movement of herpesvirus capsids. Nat. Cell Biol. 7 : 429—431.
- Furstner A., Kirk D., Fenster M. D., Aissa C., De Souza D., Muller O. 2005. Diverted total synthesis: preparation of a focused library of latrunculin analogues and evaluation of their actin-binding properties. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 102 : 8103—8108.
- Gall G. G. 2006. Exporting actin. Nat. Cell Biol. 8 : 205—207.
- Gard D. L. 1999. Confocal microscopy and 3-D reconstruction of the cytoskeleton of *Xenopus* oocytes. Microsc. Res. Tech. 44 : 388—414.
- Goldberg M., Lu H., Stuurman N., Ashery-Padan R., Weiss A. M., Yu J., Bhattacharyya D., Fisher P. A., Gruenbaum Y., Wolfner M. F. 1998. Interactions among *Drosophila* nuclear envelope proteins lamin, otefin, and YA. Mol. Cell Biol. 18 : 4315—4323.
- Goldberg M. W., Weise P., Allen T. D., Wilson K. 1997. Dimples, pores, star-ring and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structure intermediates in nuclear pore complex assembly. J. Cell Sci. 110 : 409—420.
- Gounon P., Karsenti E. 1981. Involvement of contractile proteins in the changes in consistency of oocyte nucleoplasm of the newt *Pleurodeles waltlii*. J. Cell Biol. 88 : 410—421.
- Guild G. M., Connelly P. S., Shaw M. K., Tilney L. G. 1997. Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping. J. Cell Biol. 138 : 783—797.
- Gupton S. L., Collings D. A., Allen N. S. 2006. Endoplasmic reticulum targeted GFP reveals ER organization in tobacco NT-1 cells during cell division. Plant Physiol. Biochem. 44 : 95—105.
- Haque F., Lloyd D. J., Smallwood D. T., Dent C. L., Shanahan C. M., Fry A. M., Trembath R. C., Shackleton S. 2006. SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. Mol. Cell Biol. 26 : 3738—3751.
- Hofmann W. A., Lanerolle P. 2006. Nuclear actin: to polymerize or not to polymerize. J. Cell Biol. 172 : 127—135.
- Hofmann W., Reichart B., Ewald A., Muller E., Schmitt I., Staber R. H., Lottspeich F., Jockusch B. M., Scheer U., Hauber J., Dabauvalle M. C. 2001. Cofactor requirements for export of Rev response element (RRE) and constitutive transport element (CTE) — containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. J. Cell Biol. 152 : 895—910.
- Hofmann W. A., Stojiljkovic L., Fuchsova B., Vargas G. M., Mavrommatis E., Philimonenko V., Kysela K., Goodrich J. A., Lesnard J. L., Hope T. J., Hozak P., de Lanerolle P. 2004. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. Nat. Cell Biol. 6 : 1094—1101.
- Hu P., Wu S., Hernandez N. 2004. A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. Genes Develop. 15 : 3010—3015.
- Ishii K., Arib G., Lin C., Van Houwe G., Laemmli U. K. 2002. Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. Cell. 109 : 551—562.
- Jahraus A., Egeber M., Hinner B., Habermann A., Sackman E., Pralle A., Faulstich H., Rybin V., Defacque H., Griffiths G. 2001. ATP-dependent membrane assembly of F-actin facilitates membrane fusion. Mol. Biol. Cell. 12 : 155—170.
- Kimura T., Hashimoto I., Yamamoto A., Nishikawa M., Fujisawa J. I. 2000. Rev-dependent association of the intron-containing HIV-1 gag mRNA with the nuclear actin bundles and the inhibition of its nucleocytoplasmic transport by latrunculin-B. Genes Cells. 5 : 289—307.
- Kiseleva E., Drummond S. P., Goldberg M. W., Rutherford S. A., Allen T. D., Wilson K. L. 2004. Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. J. Cell. Sci. 117 : 2481—2490.

- Krauss S. W., Chen C., Penman S., Heald R. 2003. Nuclear actin and protein 4.1: essential interactions during nuclear assembly *in vitro*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 10 752—10 757.
- Kruse T., Blagoe B., Lobner-Olesen A., Wachi M., Sasaki K., Iwai N., Mann M., Gerdes K. 2006. Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in *Escherichia coli*. Genes Develop. 20 : 113—124.
- Kukalev A., Nord Y., Palmberg C., Bergman T., Percipalle P. 2005. Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. Nat. Struct. Mol. Biol. 12 : 238—244.
- Lamaze P., Fujimoto L. M., Yin H. L., Schmid S. L. 1997. The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. J. Biol. Chem. 272 : 20 332—20 335.
- Lang T., Wacker I., Wunderlich I., Rohrbach A., Giese S., Soldati T., Almers W. 2000. Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. Biophys. J. 78 : 2863—2877.
- Lenart P., Bacher C. P., Daigle N., Hand A. R., Eils R., Terasaki M., Ellenberg J. 2005. A contractile nuclear actin network drives chromosome congression.
- Macgregor H. C., Varley J. 1983. Working with animal chromosomes. New York: Wiley-Intersci. Press. 250 p.
- Parfenov V. N., Davis D. S., Pochukalina G. N., Sample C. E., Bugaeva E. A., Murti K. G. 1995. Nuclear actin filaments and their topological changes in frog oocytes. Exp. Cell Res. 217 : 385—394.
- Pederson T., Aebi U. 2002. Actin in the nucleus: what form and what for? J. Struct. Biol. 140 : 3—9.
- Pederson T., Aebi U. 2005. Nuclear actin extends, with no contraction in sight. Mol. Biol. Cell. 16 : 5055—5060.
- Percipalle P., Jonsson A., Nashchekin D., Karlsson C., Bergman T., Guialis A., Daneholt B. 2002. Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. Nucl. Acids Res. 30 : 1725—1734.
- Philimonenko V. V., Zhao J., Iben S., Dingova H., Kysela K., Kahle M., Zentgraf H., Hofmann W. A., de Lanerolle P., Hozak P., Grummt I. 2004. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. Nat. Cell Biol. 6 : 1165—1172.
- Politz J. P., Pederson T. 2000. Review: movement of mRNA from transcription site to nuclear pores. J. Struct. Biol. 129 : 252—257.
- Poteryaev D., Squirrell J. M., Campbell J. M., White J. G., Spang A. 2005. Involvement of the actin cytoskeleton and homotypic membrane fusion in ER dynamics in *Caenorhabditis elegans*. Mol. Biol. Cell. 16 : 2139—2153.
- Reddy R., Busch H. 1983. Small nuclear RNAs and RNA processing. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 30 : 127—162.
- Rodionov V., Hope A., Svitkina T., Borisy G. 1998. Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores. Curr. Biol. 8 : 165—168.
- Roger B., Moisand A., Amalric F., Bouvet P. 2002. The rDNA transcription during *Xenopus laevis* oogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 117 : 243—255.
- Rogers S. L., Gelfand V. I. 2000. Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton. Curr. Opin. Cell Biol. 12 : 57—62.
- Sameshima M., Kishi Y., Osumi M., Minamikawa-Tachino R., Mahadeo D., Cotter D. A. 2001. The formation of actin rods composed of actin tubules in *Dictyostelium discoideum* spores. J. Struct. Biol. 136 : 7—19.
- Schuh M., Ellenberg J. 2006. Nuclear actin: a lack of export allows formation of filaments. J. Curr. Biol. 16 : 321—323.
- Simon V. R., Pon L. A. 1996. Actin-based organelle movement. Experientia. 52 : 1117—1122.
- Wiese P., Goldberg M. W., Allen T. D., Wilson K. L. 1997. Nuclear envelope assembly in *Xenopus* extracts visualized by scanning EM reveals a transport-dependent «envelope smoothing» event. J. Cell Sci. 110 : 1489—1502.

Поступила 9 VIII 2007

#### CHANGES IN *XENOPUS* OOCYTE NUCLEUS AND CYTOPLASM ORGANIZATION AFTER ACTIN FILAMENTS DEPOLYMERIZATION BY LATRUNCULIN

K. N. Morozova,<sup>1</sup> E. V. Kiseleva<sup>2</sup>

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk;  
e-mail: <sup>1</sup>morozko@bionet.nsc.ru; <sup>2</sup>elka@bionet.nsc.ru

Actin-containing filaments have been visualized inside the *Xenopus* oocyte nuclei due to combination of fluorescence and transmission electron microscopy. It has been shown that these filaments contact with nucleoli, spherical bodies and nuclear pore complexes. The incubation of oocytes with actin-depolymerizing latrunculin causes membrane vesiculation in the cytoplasm, and disruption of the nucleoplasm and nuclear envelope integrity. We suppose that actin-containing filaments belong to crucial cell components which are involved in coordination of nuclear-cytoplasmic interactions as well as distribution and transport of intranuclear components in growing *Xenopus* oocytes.

Key words: actin, latrunculin, nucleus, nuclear matrix, intranuclear filaments, ultrastructure.