ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ ПОРИСТЫХ ПЛАСТИНОК В СИНЦИТИАЛЬНЫХ ЭМБРИОНАХ ДРОЗОФИЛЫ

© *Н. В. Губанова,*[1] *Е. В. Киселева*[2]

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; электронный адрес:
[1] *nat@bionet.nsc.ru;* [2] *elka@bionet.nsc.ru*

Митотические события в эукариотической клетке контролируются семейством эволюционно-консервативных циклинзависимых киназ cdk (cyclin-dependent kinases), которые осуществляют фосфорилирование различных клеточных белков, что приводит к структурной реорганизации всей клетки. Наши недавние исследования на синцитиальных эмбрионах дрозофилы показали, что изменение активности cdk1, определяющие сборку/разборку пор ядерной оболочки, влияет также и на строение цитоплазматических пор в составе пористых пластинок. В настоящей работе проведен сравнительный электронно-микроскопический анализ динамики этих цитоплазматических органелл в процессе митоза и на разных стадиях развития синцитиального эмбриона дрозофилы. На основании полученных данных сделано предположение о том, что распределение пористых пластинок, содержащих зрелые цитоплазматические поры, по цитоплазме эмбриона отражает снижение активности митотической киназы cdk1 в определенных районах эмбриона в процессе митоза и синцитиального развития.

Ключевые слова: циклинзависимая киназа, цитоплазматические поры, пористые пластинки, ядерные поры, митоз, синцитиальные эмбрионы дрозофилы, митоз, cdk1.

Принятые сокращения: ПП — пористые пластинки, ЭПР — эндоплазматический ретикулум, ЯдО — ядерная оболочка, ЯПК — ядерные поровые комплексы.

Ядерные поровые комплексы (ЯПК) — сложные структуры, пронизывающие ядерную оболочку и обеспечивающие транспорт молекул между ядром и цитоплазмой (см. обзор: Губанова и др., 2006). ЯПК консервативны у всех высших эукариот и состоят из множественных повторов примерно 30 различных белков, называемых нуклеопоринами (Cronshaw et al., 2002). Помимо ЯПК в цитоплазме ряда клеток, таких как ооциты, ранние эмбрионы насекомых, некоторые типы раковых клеток, наблюдаются пористые пластинки (ПП) — специфические цистерны эндоплазматического ретикулума (ЭПР), которые содержат пороподобные комплексы или цитоплазматические поры, имеющие сходные с ядерными порами морфологию и белковый состав (Морозова и др., 2005). В ходе открытого митоза ядерные, а также цитоплазматические поры синхронно разбираются на субкомплексы нуклеопоринов, которые переходят в растворенном состоянии в цитоплазму клетки, тогда как связанные с ядерными мембранами нуклеопорины распределяются в мембраны ЭПР (Ellenberg et al., 1997). В конце митоза ядерные поры собираются через промежуточные структуры в формирующейся ядерной оболочке дочерних клеток (Kiseleva et al., 2001). Основываясь на сходстве структурной организации ядерных и цитоплазматических пор, можно предполагать, что последовательные этапы их формирования сходны.

Митотические события в эукариотической клетке контролируются рядом факторов, в число которых входит циклинзависимая серин/треониновая митотическая киназа cdk1, инициирующая фосфорилирование белков. Эта киназа активируется при взаимодействии с циклинами, которые синтезируются перед вступлением клетки в митоз. В конце митоза происходит деградация циклинов на микротрубочках веретена деления, что приводит к локальной инактивации cdk1, дефосфорилированию белков и переходу клетки в состояние интерфазы (Murray, Hunt, 1993). Наши недавние исследования показали, что в синцитиальных эмбрионах дрозофилы изменение активности cdk1 влияет на сборку/разборку ядерных и цитоплазматических пор (Onischenko et al., 2005).

Контроль митотических циклов в синцитиальных эмбрионах дрозофилы имеет свою специфику. После оплодотворения в эмбрионе происходит 13 митозов, соответствующих циклам деления ядер, в результате которых в одной клетке, которую представляет эмбрион, количество ядер возрастает от 2 до 6000 за 2.5 ч (Foe, Alberts, 1983). Показано, что митотические циклины A и B, связывающиеся с cdk1, в интерфазе деградируют не полностью и на протяжении первых (1—7-го) циклов деления ядер их концентрация остается достаточно высокой в течение всего клеточного цикла (Edgar et al., 1994). С этим коррелирует высокая скорость ядерных делений, которые происходят каждые 9 мин. Начиная с 8-го цикла регистрируются прогрессивное снижение уровня циклинов в интерфазе и как следствие — снижение активности cdk1 (Edgar et al., 1994). После 9-го цикла дробления в центре эмбриона формируется область с более низкой концентрацией митотических циклинов (Raff et al., 1990; Maldonado-Codina, Glover, 1992; Su et al., 1998), где формируется около 100

полиплоидных ядер, называемых желточными, поскольку здесь локализуются основные запасы желтка. На периферии эмбриона, куда мигрируют продолжающие активно делиться остальные (бластодермальные) ядра, концентрация циклинов A и B остается достаточно высокой (Raff et al., 1990; Maldonado-Codina, Glover, 1992; Su et al., 1998). Таким образом, синцитиальные эмбрионы дрозофилы представляют собой уникальную модель для изучения динамики различных органелл в течение клеточного цикла, поскольку в этой клетке происходят активные митозы и присутствуют как делящиеся, так и неделящиеся (полиплоидные) ядра.

Задачей настоящей работы являлось выяснение возможной корреляции между полученными ранее биохимическими данными о распределении активности cdk1 в эмбрионе дрозофилы (Edgar et al., 1994; Su et al., 1998) и сборкой/разборкой цитоплазматических и ядерных пор. Проведенные электронно-микроскопические исследования показали, что на поздних стадиях развития синцитиального эмбриона в центральных районах цитоплазмы в ходе митоза ЯПК и ЦП разбираются лишь частично, здесь же наблюдается накопление ПП. Согласно данным биохимических исследований, центральная область эмбриона характеризуется более низким уровнем активности cdk1 по сравнению с периферией эмбриона, в которой наблюдается полная разборка пор в ПП и ядерной оболочке бластодермальных ядер в начале митоза. В телофазе ПП появляются около веретена деления бластодермальных ядер, где происходят деградация циклина B и инактивация cdk1. Полученные данные свидетельствуют о том, что распределение ПП коррелирует с инактивацией митотической киназы cdk1 в ходе митоза и в процессе развития синцитиального эмбриона дрозофилы.

Материал и методика

Условия содержания мух. В работе использовали *Drosophila melanogaster*, линия Canton S, из коллекции проф. И. К. Захарова (Институт цитологии и генетики СО РАН). Мух содержали в коллекторе на стандартном корме при 22 °C. Перед отбором эмбрионов мух выдерживали 1 ч на свежем корме, после чего в коллекторе устанавливали свежую чашку Петри с кормом, что обеспечивало синхронную откладку яиц. Эмбрионы анализировали на четырех циклах деления ядер (7—8, 11, 12 и 13-м циклах). Для получения эмбрионов на 7—8-м циклах деления ядер отбор производили через 1 ч, для 11—12-го — через 1.5 ч, для 13-го цикла — через 2.0—2.5 ч после помещения свежей чашки с кормом в коллектор с мухами.

Электронная микроскопия. Эмбрионы освобождали от хориона вручную с использованием скотча, фиксировали в 2.5%-ном растворе глутаральдегида на 0.1 М натрий-какодилатном буферном растворе и дофиксировали в 1%-ном растворе тетраоксида осмия на том же буферном растворе согласно ранее описанному методу (Zalokar, Erk, 1977). Затем эмбрионы дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и в ацетоне, после чего заключали в эпоксидную смолу Agar100, ориентировали горизонтально и полимеризовали при 60 °C. Срезы толщиной 50—80 нм, полученные на ультрамикротоме Ultracut (Reichert, Австрия), переносили на медные сеточки и контрастировали растворами уранил-ацетата и цитрата свинца. Препараты исследовали в электронном микроскопе LEO 910 (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Относительную оценку площади ядерной оболочки желточных ядер производили с использованием программы Bio Vision.

Для электронно-микроскопического анализа использовали горизонтально расположенные эмбрионы, с поверхности каждого из которых срезали фрагмент толщиной примерно 60 мкм, а затем получали полутонкие и ультратонкие срезы. В результате этого всегда исследовали экваториальную область эмбрионов, что обеспечивало более высокую точность сравнительного анализа разных образцов. После окраски полутонких срезов 1%-ным раствором толуидинового синего с добавлением 1%-ного раствора тетрагидробората натрия, препараты анализировали с помощью светового микроскопа для определения стадии клеточного цикла и цикла развития синцитиального эмбриона.

Оценку стадии клеточного цикла производили согласно ранее описанным морфологическим критериям (Stafstrom, Staehelin, 1984). Эмбрионы на стадии интерфазы характеризовались круглыми ядрами диаметром 5—7 мкм с деконденсированным хроматином; на стадии профазы ядра имели диаметр 8—9 мкм и содержали глыбки конденсированного хроматина; стадия метафазы характеризовалась экваториальной локализацией компактных хромосом и разобранной ядерной оболочкой; на стадии телофазы наблюдался конденсированный хроматин, расположенный в районе формирующихся дочерних ядер.

Цикл развития синцитиального эмбриона определяли по количеству ядер, приходящихся на экваториальный срез клетки. На 7—8-м циклах синцитиального развития число ядер на срез составляет 4—8, для 11-го цикла — 20—25, для 12-го цикла — 40—50 ядер. На 13-м цикле деления, характеризующемся появлением небольших инвагинаций плазматической мембраны, на экваториальный срез приходится 80—100 ядер (Stafstrom, Staehelin, 1984).

Для более точного сравнительного анализа динамики изучаемых структур в синцитиальном эмбрионе его цитоплазму условно разделяли на периферическую и центральную области. За периферическую область эмбриона принимали участок цитоплазмы шириной 30 мкм, расположенную непосредственно под плазматической мембраной на экваториальном срезе эмбриона (см. выше), а за центральную часть эмбриона принимали участок среза, оставшийся после исключения периферической области.

Результаты

При сравнительном анализе структурной организации периферической и центральной областей синцитиального эмбриона дрозофилы установлено, что на ранних (до 9-го) циклах синцитиального развития ядра расположены в центральной области эмбриона, элементы ЭПР, митохондрии, липидные капли и желточные гранулы гомогенно распределены по цитоплазме эмбриона. После 9-го цикла синцитиальной бластодермы цитоплазма имеет более гетерогенное строение. Бластодермальные ядра, элементы ЭПР, митохондрии, аппарат Гольджи и т. д. расположены в периферической области эмбриона толщиной около 30 мкм, в то время как запасающие вещества в виде липидных капель и желточных гранул аккумулируются в центральной области эмбриона, где наблюдаются в небольшом количестве пузырьки и мембраны ЭПР, а также прекратившие деление желточные ядра. Эти наблюдения

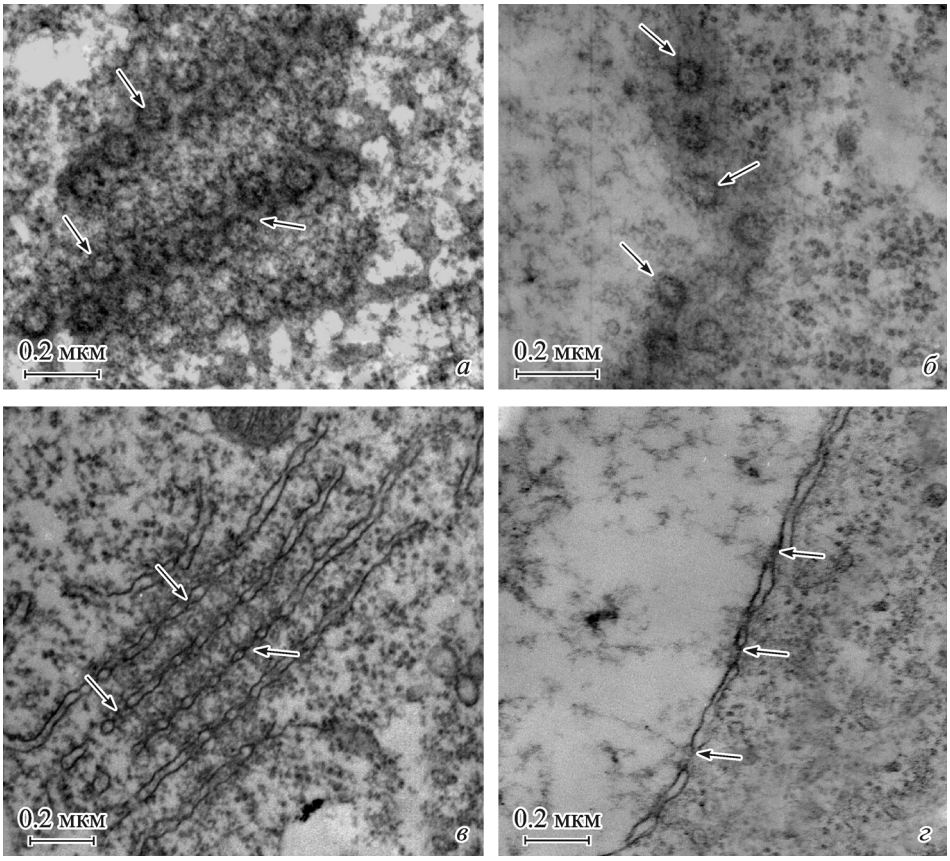

Рис. 1. Ультраструктура ядерных и цитоплазматических пор в синцитиальных эмбрионах дрозофилы на стадии интерфазы.

а — общий вид стопки пористых пластинок на поперечном срезе; *б* — фрагмент ядерной оболочки на поперечном срезе; *в* — пористая пластинка на гексагональном срезе; *г* — гексагональный срез ядерной оболочки.

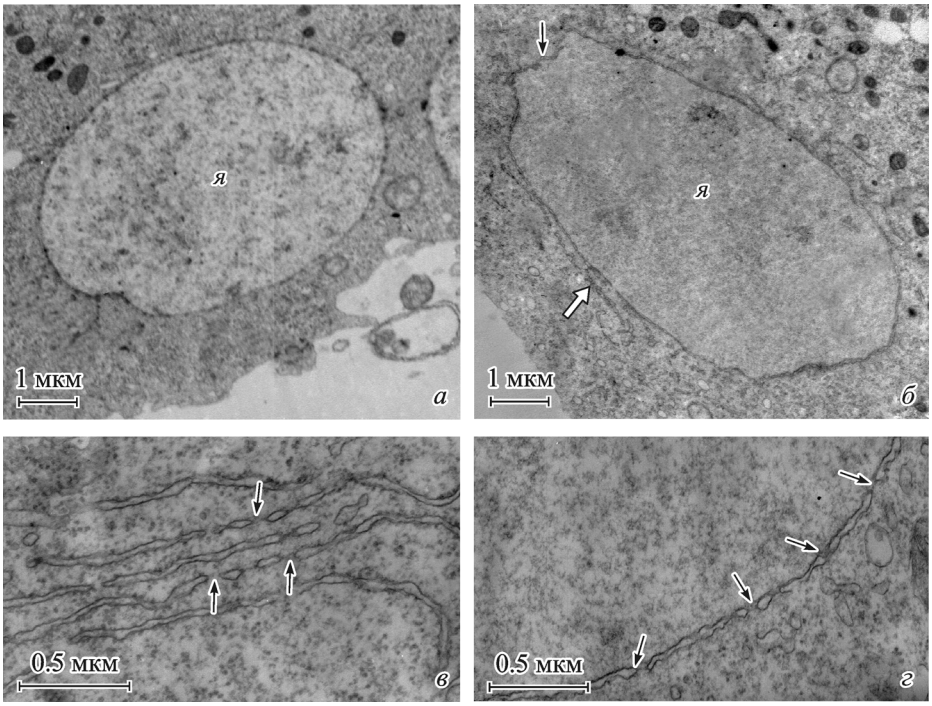

Рис. 2. Ультраструктура бластодермальных ядер и пористых пластинок в профазе митоза.

а — предпрофазное ядро; *б* — ультраструктура ядра в профазе, *черная стрелка* указывает на разбирающуюся ядерную оболочку на полюсе веретена деления, *белая стрелка* — на вторую ядерную оболочку в экваториальной области ядра; *в* — вид пористых пластинок в профазе; *г* — фрагмент ядерной оболочки профазного ядра, демонстрирующий частичную разборку ЯПК. *я* — ядро.

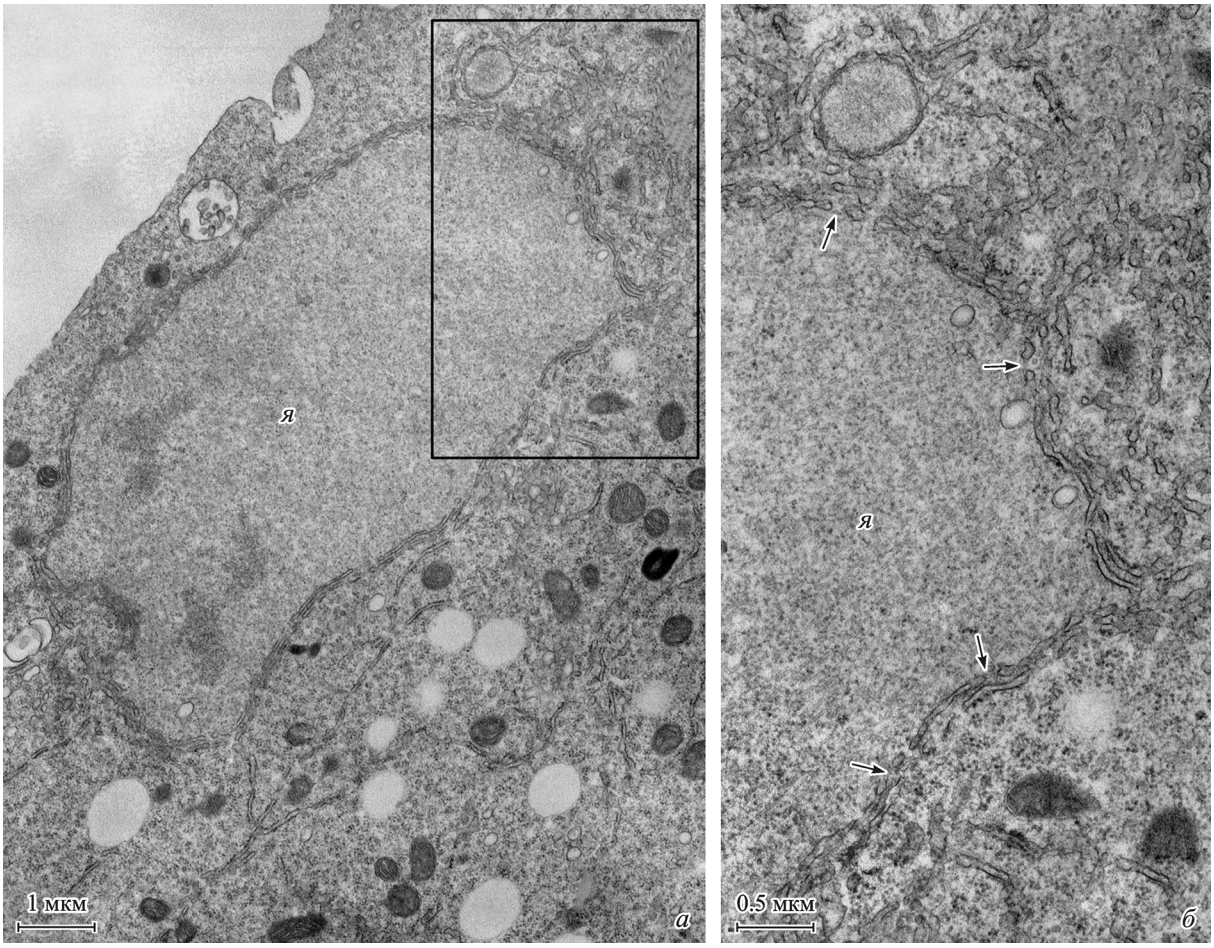

Рис. 3. Строение бластодермального ядра и ядерной оболочки в прометафазе.

а — общий вид бластодермального ядра на стадии прометафазы; *б* — фрагмент ядерной оболочки того же ядра при большем увеличении, видна многослойная оболочка. Электронно-прозрачные отверстия на месте бывших пор отмечены *стрелками. я* — ядро.

согласуются с ранее опубликованными данными (Stafstrom, Staehelin, 1984).

Известно, что в делящихся ядрах синцитиальных эмбрионов дрозофилы митоз идет по полузакрытому типу, при котором ядерная оболочка разбирается на полюсах веретена деления, сохраняя относительную целостность в экваториальной области (Stafstrom, Staehelin, 1984). Наши электронно-микроскопические исследования показали, что ЯПК в делящихся ядрах (рис. 1, *а*) и цитоплазматические поры в ПП (рис. 1, *б*) на стадии интерфазы митоза имеют одинаковую ультраструктурную организацию и выглядят на поперечных срезах в виде кольцевых структур диаметром около 0.12 мкм. В порах хорошо различим центральный отдел в виде массивной электронно-плотной структуры (рис. 1, *в*, *г*).

В ранней профазе митоза ядерная оболочка бластодермальных ядер образует вогнутости (рис. 2, *а*) в местах локализации центросом. Затем наблюдается разборка ЯдО на полюсах веретена деления, тогда как в экваториальной области ядра образуется вторая оболочка, состоящая из мембранных пузырьков и цистерн ЭПР (рис. 2, *б*). Цитоплазматические (рис. 2, *в*) и ядерные (рис. 2, *г*) поры на этой стадии утрачивают центральный массивный электронно-плотный компонент, вследствие чего они содержат только тонкие пластинки в просвете канала поры. Можно предположить, что в этот период еще сохраняются мембранно-связанные компоненты центрального отдела поры.

В прометафазе ядерная оболочка полностью разбирается на мембранные везикулы и цистерны (рис. 3, *а*), которые остаются вблизи ядра и формируют слои из мембранных пузырьков по контуру ядерной оболочки (рис. 3, *б*). Ядерных и цитоплазматических пор практически не наблюдается как в мембранах ядерной оболочки, так и в ПП.

На стадии метафазы (рис. 4, *а*, *г*) на полюсах веретена образуются скопления мембранных пузырьков, тогда как в остальной части ядерного контура сохраняется линейное расположение мембранных структур (рис. 4, *б*, *в*). Ядерная оболочка содержит вместо пор электронно-прозрачные отверстия (рис. 4, *б*, *в*), цитоплазматические поры в ПП, расположенных вблизи бластодермальных ядер, также разобраны (рис. 4, *д*, *е*), хотя и сохраняют слоистое строение. На месте бывших пор сохраняются электронно-прозрачные отверстия, имеющие размер, соответствующий диаметру цитоплазматической поры (около 0.12 мкм).

На стадии телофазы начинается сборка ядерной оболочки, а также ядерных и цитоплазматических пор. На рис. 5, *а* представлены ядра на стадии телофазы, ядерная оболочка которых еще не восстановила свою целостность полностью, однако в ней уже начинают формироваться

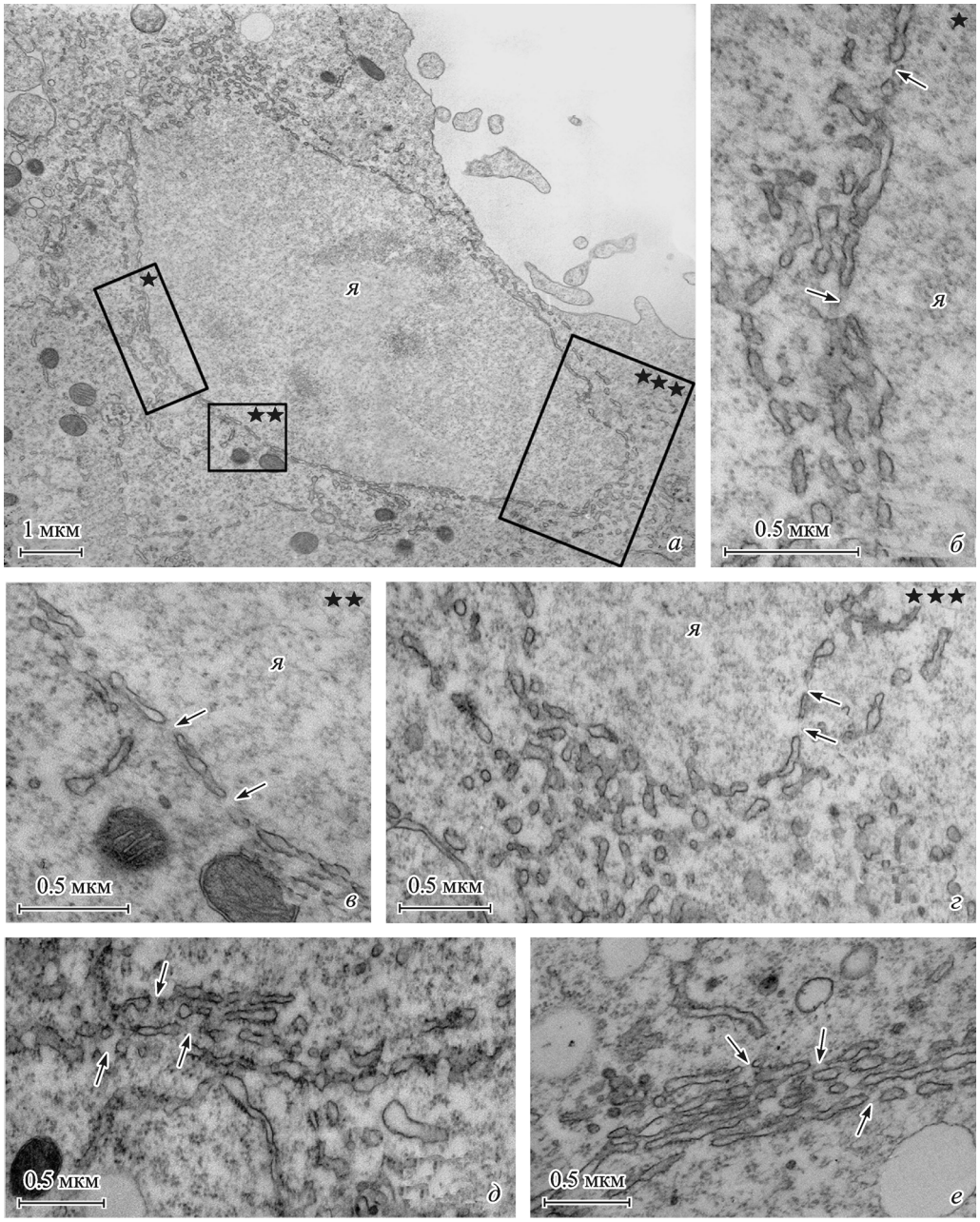

Рис. 4. Ультраструктура ядерной оболочки бластодермального ядра и пористых пластинок на стадии метафазы.

а — общий вид бластодермального ядра в метафазе. *б—г* — фрагменты ядерной оболочки того же ядра при большем увеличении: ядерные поровые комплексы отсутствуют; электронно-прозрачные отверстия на месте бывших пор отмечены *стрелками*; идентичные фрагменты цитоплазмы, демонстрирующиеся при малом и большом увеличениях, отмечены соответствующим числом *звездочек. д, е* — ультраструктура пористых пластинок на стадии метафазы. Цитоплазматические поры отсутствуют. *я* — ядро.

ЯПК (рис. 5, *б*, *в*). В окружающей цитоплазме в это время наблюдаются ПП с хорошо различимыми цитоплазматическими порами (рис. 5, *а*, *б*). Следует отметить, что ПП локализуются с той стороны ядра, где еще сохраняется разрыв в ЯдО, т. е. в области веретена деления. После восстановления целостности ЯдО на стадии ранней интерфазы (рис. 6, *а*, *б*) в ней через промежуточные структуры продолжают собираться ЯПК (рис. 6, *в*, *г*).

Отметим, что ядра на стадии ранней интерфазы все еще имеют неправильную форму (рис. 6, *а*, *б*) и рядом с ЯдО наблюдаются единичные ПП с небольшим количеством цитоплазматических пор (рис. 6, *в*, *г*). Сборка новых ЯПК продолжается путем формирования сначала электронно-плотного компонента центрального отдела поры, что соответствует встраиванию в ЯПК транспортера, а затем компонентов периферических отделов поры (Kiseleva et al., 2001). На стадии поздней интерфазы ПП не наблюдались вблизи бластодермальных ядер. Описанная динамик ЯПК и цитоплазматических пор в области активно делящихся ядер в ходе митоза является общей для 7—8, 11, 12 и 13-го циклов развития синцитиального эмбриона.

Для центрально расположенных желточных ядер и локализующихся вблизи них ПП митотические изменения представляют более сложный процесс по сравнению с митозом бластодермальных ядер. С 9-го по 11-й цикл синцитиальной бластодермы митотическая реорганиза-

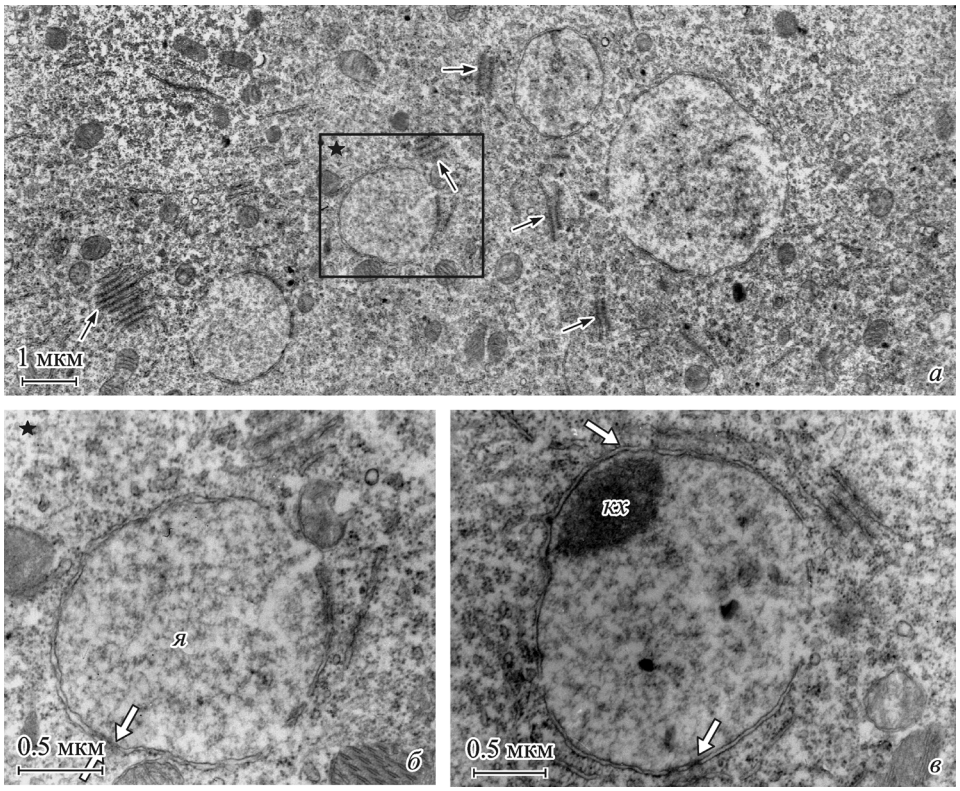

Рис. 5. Бластодермальные ядра и пористые пластинки в телофазе.

а — общий вид группы ядер и пористых пластинок (отмечены *черными стрелками*) в телофазе. *б, в* — вид ядер в телофазе и пористых пластинок около них; ядерные поры (отмечены *белыми стрелками*) распределены в ядерной оболочке неравномерно, стопки пористых пластинок (отмечены *черными стрелками*) расположены с той стороны ядра, где ядерная оболочка не сформирована. *кх* — компактный хроматин, *я* — ядро, *звездочки* — то же, что и на рис. 4.

ция ЯдО желточных ядер в центре и бластодермальных на периферии не различается, так как на этом этапе развития желточные ядра все еще продолжают делиться. Существенные различия появляются начиная с 12-го цикла дробления (рис. 7, *а*), когда желточные ядра становятся полиплоидными. В этот период на стадии интерфазы рядом с желточными ядрами всегда наблюдаются ПП, расположенные параллельно ядерной оболочке и в непосредственной близости от нее (рис. 7, *а*, *в*). Следует отметить, что внутри желточных ядер также обнаруживаются ПП, состоящие чаще всего из одной пластинки (рис. 7, *б*).

Когда бластодермальные ядра находятся на стадии профазы, ЯдО желточных ядер и ПП около них не меняют своей организации. В то же время на стадии метафазы бластодермальных ядер в ЯдО желточных ядер и расположенных рядом с ними ПП наблюдается частичная разборка ядерных и цитоплазматических пор (рис. 8). Следует, однако, отметить, что хотя некоторые из цитоплазматических пор в ПП, расположенных около желточных ядер, полностью разбираются, большинство из них сохраняет фрагменты центрального отдела в виде тонкой электронно-плотной пластинки в просвете канала поры (рис. 8, *б*). Полной разборки всех ЯПК и цитоплазматических пор в центральной области эмбриона не наблюдается, хотя компактизация/декомпактизация хроматина в желточных ядрах происходит так же, как и в бластодермальных ядрах. Сборка ядерных пор в оболочке желточных ядер и цитоплазматических пор в расположенных рядом с ними ПП происходит с небольшим запаздыванием по отношению к порам на периферии эмбриона.

Для сравнительного анализа были выбраны эмбрионы на двух стадиях синцитиальной бластодермы — 7—8-м и 12—13-м циклах деления ядер, поскольку в первом случае эмбрионы содержали только делящиеся ядра, а во втором — как делящиеся (бластодермальные), так и неделящиеся полиплоидные (желточные) ядра. При этом сравнивались эмбрионы, содержащие ядра на стадии интерфазы. Обнаружено, что морфология ПП и их распределение по цитоплазме синция на анализируемых стадиях различаются. на 7—8-м циклах развития ПП распределены равномерно по цитоплазме эмбриона и состоят из 2—3 параллельных парных мембран с небольшим количеством цитоплазматических пор (рис. 9). Как правило, ПП удалены от поверхности интерфазных ядер и встречаются вблизи них на стадии телофазы и ранней интерфазы (см. выше).

На 12—13-м циклах дробления ПП представлены более крупными, чем на 7—8-м циклах дробления, агрегатами и состоят из 4—5 слоев мембран. При этом на периферии эмбриона, около бластодермальных ядер, ПП встречаются в виде единичных структур, содержащих от 1 до 5 пор, и только на стадии ранней интерфазы (рис. 6). Наиболее многочисленные ПП регистрируются на границе между периферической и центральной областями эмбриона (рис. 10). Центр эмбриона на этой стадии развития заполнен желточными гранулами, но в участках цитоплазмы, свободных от них, часто присутствуют ПП крупного размера, располагающиеся рядом с ядерной оболочкой желточных ядер (рис. 10, *г*). На поздних циклах развития синцитиального эмбриона кроме увеличения размеров

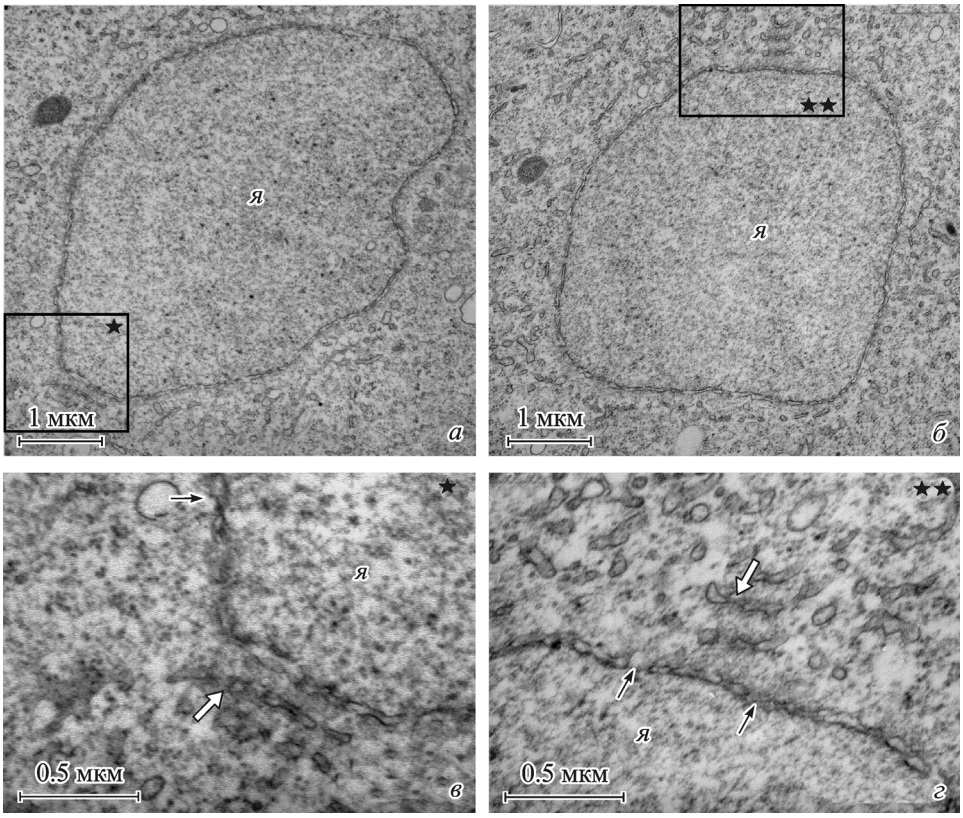

Рис. 6. Ультраструктурная организация ядерной оболочки бластодермальных ядер на стадии ранней интерфазы.

а, *б* — общий вид бластодермальных ядер в ранней интерфазе. *в*, *г* — фрагменты ядерных оболочек и расположенных вблизи них пористых пластинок; ядерные поры (отмечены *черными стрелками*) и цитоплазматические поры (отмечены *белыми стрелками*) не содержат электронно-плотного компонента центрального отдела поры. Идентичные фрагменты цитоплазмы при малом и большом увеличениях отмечены соответствующим числом *звездочек*. *я* — ядро.

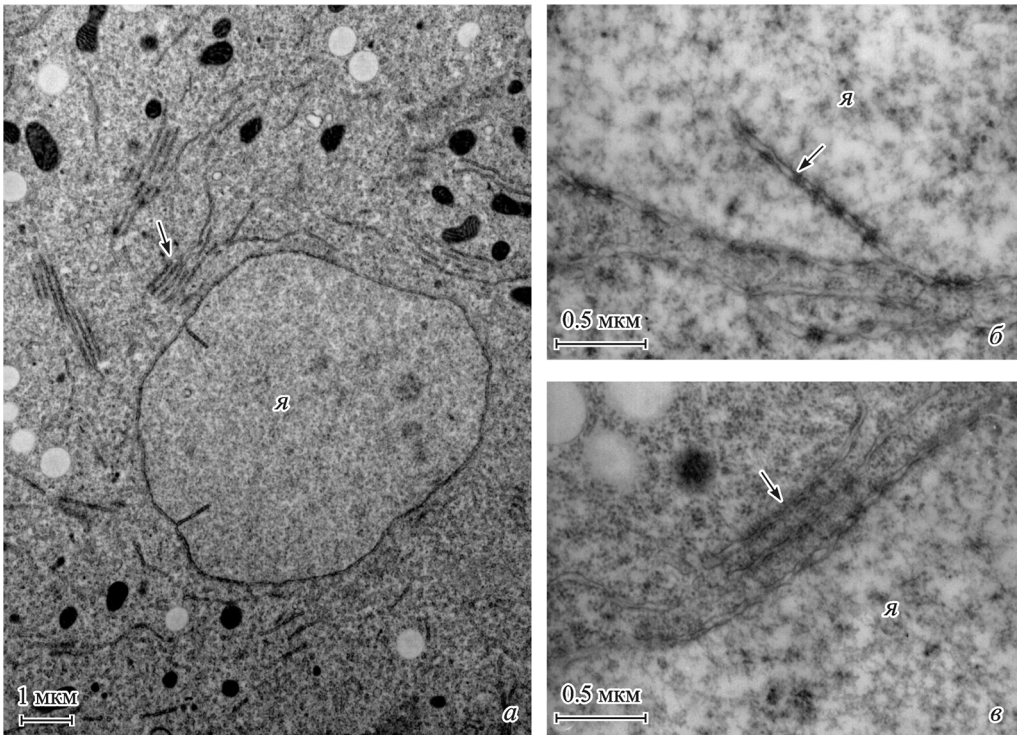

Рис. 7. Ультраструктура желточного ядра и пористых пластинок в центре синцитиального эмбриона.

а — общий вид желточного ядра на 12-м цикле дробления; *б* — пористые пластинки внутри желточного ядра; *в* — пористые пластинки, расположенные вблизи ядерной оболочки желточного ядра. *я* — ядро.

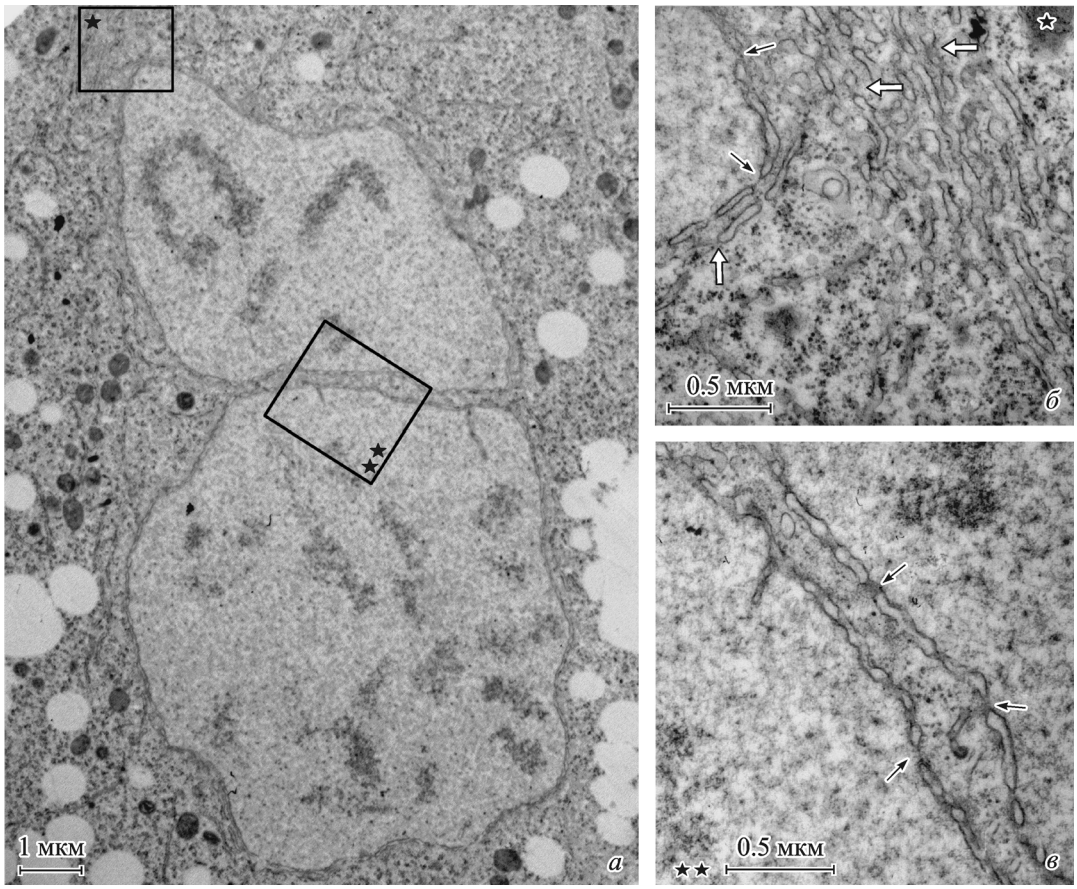

Рис. 8. Морфология желточного ядра на 13-м цикле дробления бластодермальных ядер, находящихся на стадии метафазы.

а — общий вид желточного ядра в метафазном синцитии; *б* — фрагмент ядерной оболочки и расположенных вблизи нее пористых пластинок, ядерные (*черные стрелки*) и цитоплазматические (*белые стрелки*) поры разобраны не полностью; *в* — фрагмент ядерной оболочки с хорошо различимыми ядерными порами (*черные стрелки*). *Звездочки* — то же, что и на рис. 4, 5.

стопок ПП наблюдается также увеличение размеров желточных ядер. По нашим предварительным морфометрическим данным (не приведены), с 11-го по 14-й цикл дробления объем желточных ядер возрастает примерно в 3 раза, а площадь поверхности их ЯдО в результате множественных инвагинаций увеличивается примерно в 8 раз.

Обсуждение

В опубликованных ранее исследованиях синцитиальных эмбрионов дрозофилы основное внимание уделялось синхронности сборки и разборки ядерных и цитоплазматических пор в ходе митоза (Stafstrom, Staehelin, 1984). В настоящей работе было впервые проанализировано распределение по цитоплазме эмбриона как зрелых, так и собирающихся цитоплазматических пор в составе ПП и показано, что оно существенно изменяется в зависимости от стадии митоза и цикла развития синцитиального эмбриона.

Исследование митотической реорганизации бластодермальных ядер и окружающей их цитоплазмы показало, что сборка ПП происходит в районе веретена деления бластодермальных ядер на стадии телофазы. В биохимической работе Эдгара с соавторами (Edgar et al., 1994), посвященной исследованию регуляции клеточного цикла в синцитиальных эмбрионах дрозофилы, было высказано предположение о том, что локальная инактивация cdk1 в конце митоза обусловлена деградацией циклина B на микротрубочках веретена деления. Дальнейшие исследования подтвердили это предположение и показали, что инактивация cdk1 регистрируется на полюсах веретена деления и в экваториальной области делящихся ядер на стадии телофазы (Su et al., 1998). Ранее нами было установлено, что инактивация cdk1 в синцитиальных эмбрионах дрозофилы приводит к сборке цитоплазматических пор и ЯПК, для формирования которых необходимы дефосфорилированные нуклеопорины, присутствующие в цитозоле эмбриона в большом избытке (Onischenko et al., 2004, 2005). На стадии телофазы и ранней интерфазы белковые фосфатазы дефосфорилируют нуклеопорины в цитозоле и создают условия для их встраивания в ядерные и цитоплазматические поры, что и регистрировалось нами при изучении срезов синцитиальных эмбрионов дрозофилы. На стадии поздней интерфазы нами не было обнаружено ПП около активно делящихся бластодермальных пор. По-видимому, это связано с локализацией в этой области транскриптов циклина B (Raff et al., 1990), что обусловливает локальный синтез циклинов и активацию cdk1 еще до митотической реорганизации ядер, вызывая разборку цитоплазматических пор и исчезновение ПП.

Согласно результатам настоящего исследования, ЯПК в желточных ядрах и цитоплазматические поры в ПП, расположенных в центральной области синцитиального эмбриона, разбираются в ходе митоза (12—13-й цик-

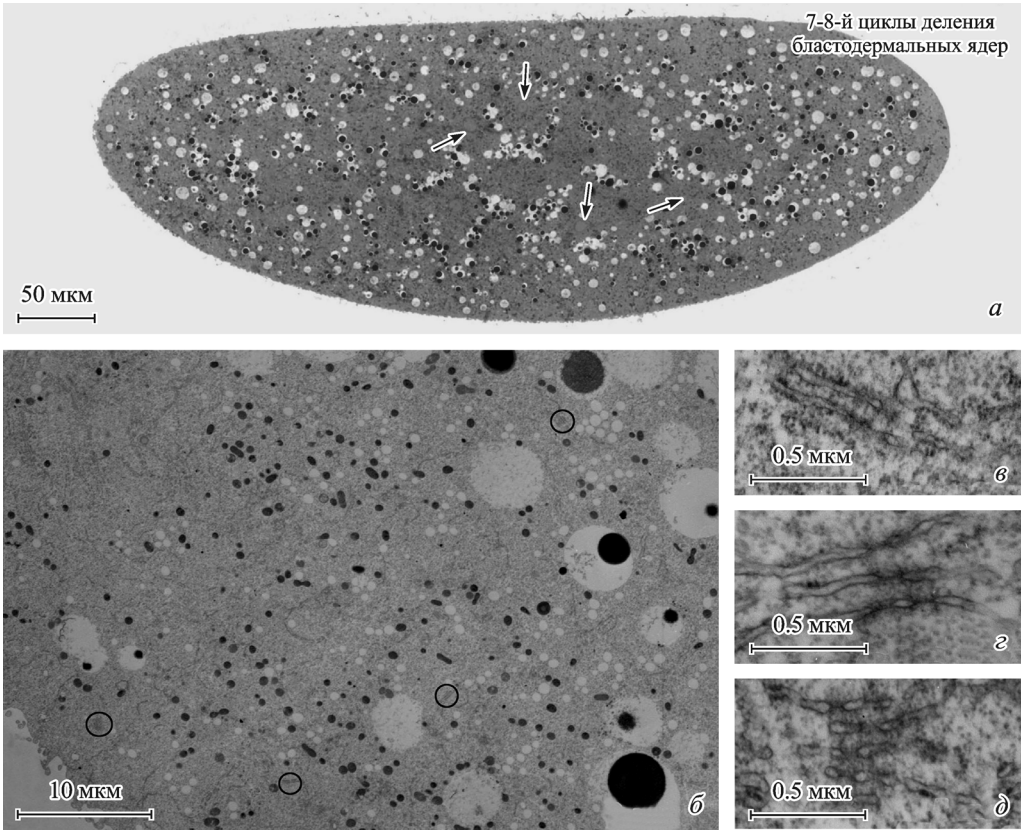

Рис. 9. Морфология и характер распределения пористых пластинок по цитоплазме эмбриона на 7—8-м циклах дробления ядер в эмбрионе дрозофилы.

а — общий вид синцитиального эмбриона на этой стадии развития на полутонком срезе (ядра обозначены *стрелками*); *б* — фрагмент эмбриона, включающий в себя часть периферической и центральной областей цитоплазмы (участки расположения пористых пластинок обведены *сферическим контуром*); *в—д* — морфология пористых пластинок в эмбрионе на 7—8-м циклах дробления при большем увеличении.

лы деления ядер) не полностью. Нарушение в делении желточных ядер связывают с формированием у них монополярного веретена с короткими астральными микротрубочками (Callaini, Dallai, 1991; Riparbelli, Callaini, 2003). Известно, что микротрубочки веретена, взаимодействуя с ядерной оболочкой, обеспечивают ее разрыв и перемещение ее фрагментов вдоль микротрубочек (см. обзор: Губанова, Киселева, 2007). По-видимому, этот этап необходим для полной разборки ядерной оболочки и, вероятно, ядерных пор, что наблюдается при нормальном митозе.

Мы предполагаем, что нарушения в делении желточных ядер и неполная разборка ЯПК и цитоплазматических пор связаны со сниженной активностью cdk1 в области желточных ядер, обусловленной низкой концентрацией митотических циклинов A и B в этом районе, что было показано ранее (Maldonado-Codina, Glover, 1992).

Исследование распределения ПП по цитоплазме интерфазных синцитиальных эмбрионов показало, что в эмбрионах на ранних (7—8-м) циклах деления ядер присутствуют ПП небольшого размера, гомогенно распределенные по цитоплазме эмбриона. В этот период активность cdk1 в интерфазе, согласно биохимическим данным, снижается незначительно, так как уровень митотических циклинов в эмбрионе остается достаточно высоким на протяжении всего клеточного цикла (Edgar et al., 1994). Поскольку показано, что на этих циклах развития синцитиального эмбриона циклины равномерно распределены по цитоплазме синцития (Maldonado-Codina, Glover, 1992), это, вероятно, отражается на характере распределения и морфологии ПП, а также обусловливает быстрое деление ядер. На более поздних (12—13-м) циклах дробления, когда происходит разделение ядер на желточные и бластодермальные, распределение ПП становится более гетерогенным. Они представлены крупными стопками в центральной области эмбриона, где располагаются желточные ядра, мелкими в средней области цитоплазмы, а в районе бластодермальных ядер регистрируются в редких случаях. Подобный характер распределения ПП по цитоплазме синцития может быть связан с существованием градиента активности cdk1, обусловленного локальным синтезом и(или) деградацией митотических циклинов на разных стадиях синцитиального развития эмбриона (Maldonado-Codina, Glover, 1992).

Еще одним существенным фактором, необходимым для сборки цитоплазматических пор, является наличие достаточного количества нуклеопоринов в цитоплазме клетки. Как было продемонстрировано нами ранее, основной запас нуклеопоринов материнского происхождения уже находится в цитозоле синцития на ранних (7—8-м) циклах развития эмбриона (Onischenko et al., 2004), однако их распределение по цитоплазме синцития остается пока не исследованным. Можно предположить, что локальная сборка крупных ПП в центральной области синцитиального эмбриона обусловлена двумя факторами: либо сниженной концентрацией здесь митотических циклинов (см. выше), либо повышенной концентрацией нуклеопоринов в этом участке цитоплазмы. Хотя последнее предположение нельзя исключить, против него имеется

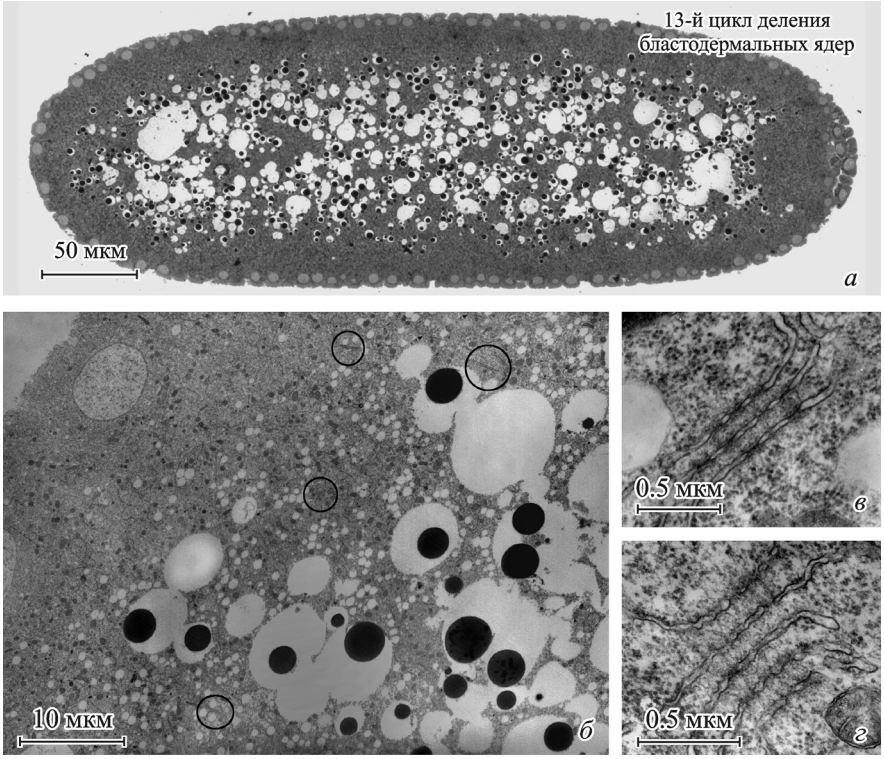

Рис. 10. Морфология и характер распределения пористых пластинок по цитоплазме эмбриона на 13-м цикле дробления ядер в эмбрионе дрозофилы.

а — общий вид синцитиального эмбриона на этой стадии развития на полутонком срезе; *б* — фрагмент эмбриона, включающий в себя часть периферической и центральной областей цитоплазмы (пористые пластинки обведены *сферическим контуром*); *в* — пористые пластинки из промежуточной зоны цитоплазмы эмбриона; *г* — пористые пластинки из центральной области цитоплазмы эмбриона.

одно существенное возражение. По нашим наблюдениям, ПП расположены рядом с желточными ядрами в небольших островках цитоплазмы, окруженных со всех сторон желтком. Как уже упоминалось выше, наши предварительные морфометрические исследования показали, что внутри такого островка площадь поверхности ядерной оболочки желточных ядер увеличивается примерно в 8 раз. Общая площадь поверхности ядерной оболочки бластодермальных ядер за этот период также увеличивается в 8 раз, т. е. существенное увеличение количества ЯПК должно вызывать снижение концентрации нуклеопоринов в окружающей цитоплазме вблизи как желточных, так и бластодермальных ядер. Однако если около бластодермальных ядер ПП почти отсутствуют, вблизи желточных ядер они встречаются в большом количестве. Это свидетельствует о том, что локальная сборка крупных ПП в центральной области синцитиального эмбриона обусловлена сниженной концентрацией здесь митотических циклинов и, следовательно, низкой активностью cdk1.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что распределение ПП по цитоплазме эмбриона дрозофилы изменяется в ходе митоза и в процессе развития синцитиального эмбриона. Сопоставление полученных данных с распределением митотических факторов по цитоплазме синцитиальных эмбрионов, описанным в литературе (Raff et al., 1990; Maldonado-Codina, Glover, 1992; Edgar et al., 1994; Su et al., 1998), показало, что сборка/разборка ПП согласуется с инактивацией/активацией cdk1 в этих областях эмбриона соответственно. Совокупность полученных в настоящей работе данных и результатов ранее проведенных исследований позволяет предполагать, что в клетках с высокой концентрацией растворенных нуклеопоринов в цитозоле ПП могут использоваться в качестве дополнительного цитоплазматического маркера инактивации митотической киназы cdk1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00416-а), гранта для молодых ученых им. акад. Лаврентьева СО РАН (проект 106) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

Губанова Н. В., Киселева Е. В. 2007. Структурная организация и функция ядерной оболочки. Цитология. 49 (4) : 257—269.

Губанова Н. В., Морозова К. Н., Киселева Е. В. 2006. Структурная организация и функция ядерных пор. Цитология. 48 (11) : 887—899.

Морозова К. Н., Губанова Н. В., Киселева Е. В. 2005. Структурная организация и возможная функциональная роль пористых пластинок, содержащих цитоплазматические поры. Цитология. 47 (8) : 667—678.

Callaini G., Dallai R. 1991. Abnormal behavior of the yolk centrosomes during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. Exp. Cell Res. 192 : 16—21.

Cronshaw J. M., Krutchinsky A. N., Zhang W., Chait B. T., Matunis M. J. 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. J. Cell Biol. 158 : 915—927.

Edgar B. A., Sprenger F., Duronio R. J., Leopold P., O'Farrell P. H. 1994. Distinct molecular mechanism regulate cell cycle timing at successive stages of *Drosophila* embryogenesis. Genes Develop. 8 : 440—452.

Ellenberg J., *Siggia E. D.*, *Moreira J. E.*, *Smith C. L.*, *Presley J. F.*, *Worman H. J.*, *Lippincott-Schwartz J. 1997.* Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. J. Cell Biol. 138 : 1193—1206.

Foe V. E., *Alberts B. M. 1983.* Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. J. Cell Sci. 61 : 31—70.

Kiseleva E., *Rutherford S.*, *Cotter L. M.*, *Allen T. D.*, *Goldberg M. W. 2001.* Steps of nuclear pore complex disassembly and reassembly during mitosis in early *Drosophila* embryos. J. Cell Sci. 114 : 3607—3618.

Maldonado-Codina G., *Glover D. M. 1992.* Cyclins A and B associate with chromatin and the polar regions of spindles, respectively, and do not undergo complete degradation at anaphase in syncytial *Drosophila* embryos. J. Cell Biol. 116 : 967—976.

Murray A., *Hunt T. 1993.* The cell cycle an introduction. New York; Oxford: Oxford Univ. Press. 374 p.

Onischenko E. A., *Gubanova N. V.*, *Kiseleva E. V.*, *Hallberg E. 2005.* Cdk1 and okadaic acid-sensitive phosphatases control assembly of nuclear pore complexes in *Drosophila* embryos. Mol. Biol. Cell. 16 : 5152—5162.

Onischenko E. A., *Gubanova N. V.*, *Kieselbach T.*, *Kiseleva E. V.*, *Hallberg E. 2004.* Annulate lamellae play only a minor role in the storage of excess nucleoporins in *Drosophila* embryos. Traffic. 5 : 152—164.

Raff J. W., *Whitfield W. G.*, *Glover D. M. 1990.* Two distinct mechanisms localise cyclin B transcripts in syncytial *Drosophila* embryos. Development. 110 : 1249—1261.

Riparbelli M. G., *Callaini G. 2003.* Assembly of yolk spindles in the early *Drosophila* embryo. Mech. Develop. 120 : 441—454.

Stafstrom J. P., *Staehelin L. A. 1984.* Dynamics of the nuclear envelope and of nuclear pore complexes during mitosis in the *Drosophila* embryo. Eur. J. Cell. Biol. 34 : 179—189.

Su T. T., *Campbell S. D.*, *O'Farrell P. H. 1998.* The cell cycle program in germ cells of the *Drosophila* embryo. Develop. Biol. 196 : 160—171.

Zalokar M., *Erk I. 1977.* Phase-partition fixation and staining of *Drosophila* eggs. Stain Technol. 52 : 89—95.

Поступила 16 II 2008

DYNAMICS OF THE ANNULATE LAMELLAE IN *DROSOPHILA* SYNCYTIAL EMBRYOS

N. V. Gubanova,[1] *E. V. Kiseleva*[2]

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk;
[1] e-mail: nat@bionet.nsc.ru; [2] elka@bionet.nsc.ru

In eukaryotic cells, mitotic events are controlled by evolutionarily conserved cyclin-dependent kinases (cdk): these kinases phosphorylate cell proteins, which causes structural reorganization of the entire cell. Our recent studies of *Drosophila* syncytial embryos have demonstrated that cdk1 activity is a key factor that controls nuclear pore complex assembly/disassembly and affects the structure of cytoplasmic pores in the annulate. In this paper, we report a comparative analysis of these cytoplasmic organelles throughout the cell-cycle and throughout the development of *Drosophila* syncytial embryos. Based on the results obtained, it was presupposed that distribution of annulate lamellae containing cytoplasmic pores could reflect the inactivation of the mitotic kinase cdk1 in *Drosophila* syncytial embryos.

Key words: annulate lamellae, cell cycle, cyclin-dependent kinase, cdk, cytoplasmic pores, nuclear pores, mitosis, syncytial embryos, *Drosophila*.