

ФОТОРЕПОРТАЖ Е. КИСЕЛЕВОЙ

ВОЛШЕБНЫЕ КАРТИНЫ МИКРОКОСМА

«Осторожно, вход воспрещен»

Ядро с ядерными поровыми комплексами изолировано из клетки дрожжей по методу, разработанному автором на основе метода Миллера. Снимок впервые демонстрирует высокое сходство в организации ядерных пор низших и высших эукариот, которые служат своеобразной «таможней», поскольку только ионы и небольшие (около 9 нм) молекулы могут свободно диффундировать через пору, а остальным молекулам для транспорта требуется наличие в их составе «пропусков» — специфических сигнальных последовательностей

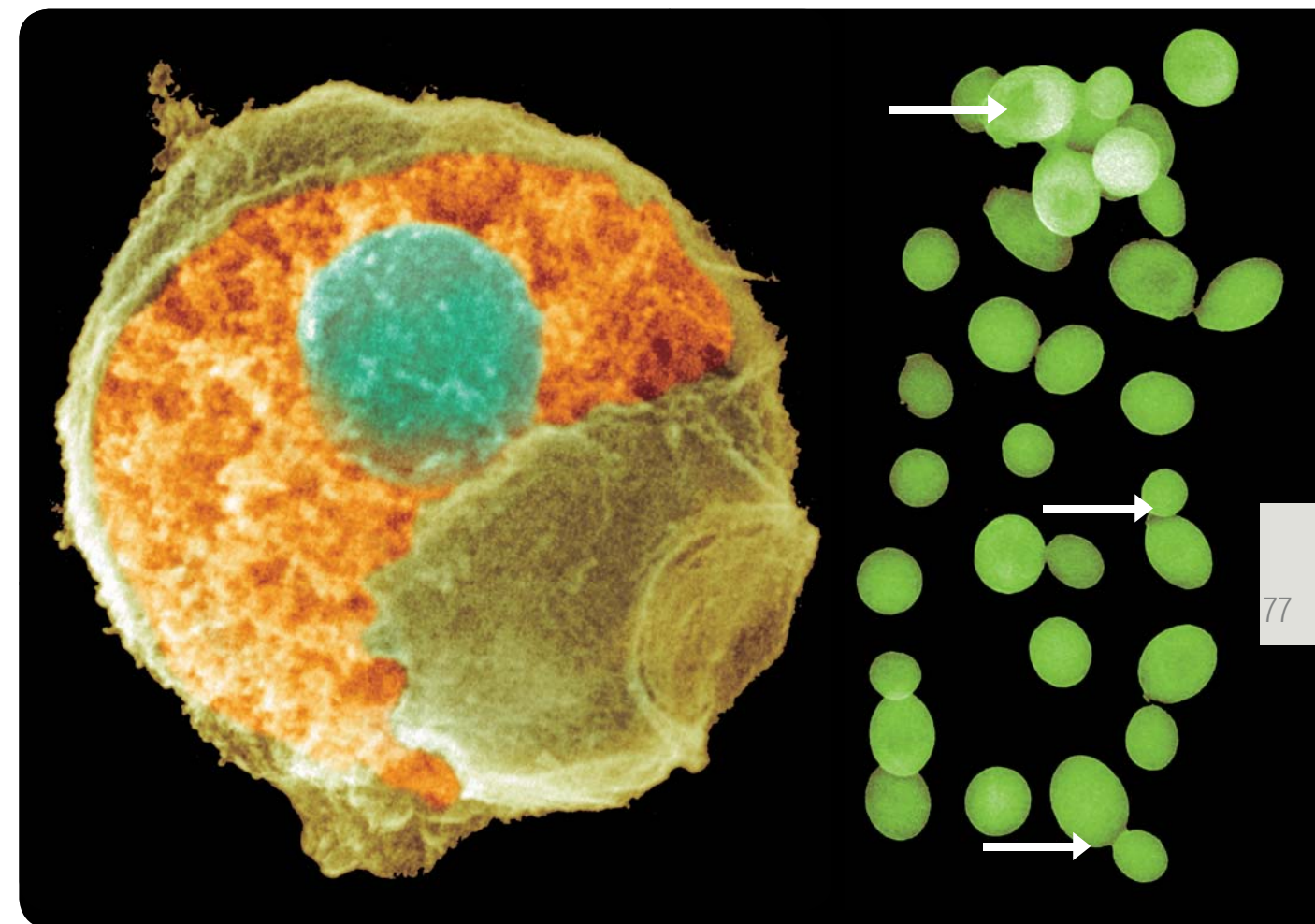
Электронная микроскопия дает ученым возможность заглянуть внутрь клетки, которую можно представить в виде Вселенной в миниатюре. И наши познания о ней также не имеют конца, как и познания о Космосе. Тем сильнее наше стремление заглянуть глубже и познать больше. С помощью современных оптических микроскопов ученые могут видеть только такие крупные компоненты клетки, как митохондрии и ядро. Но когда на помощь приходит сканирующая электронная и атомно-силовая микроскопия, то пытливого глазу исследователя становятся доступны объекты размером в несколько нанометров

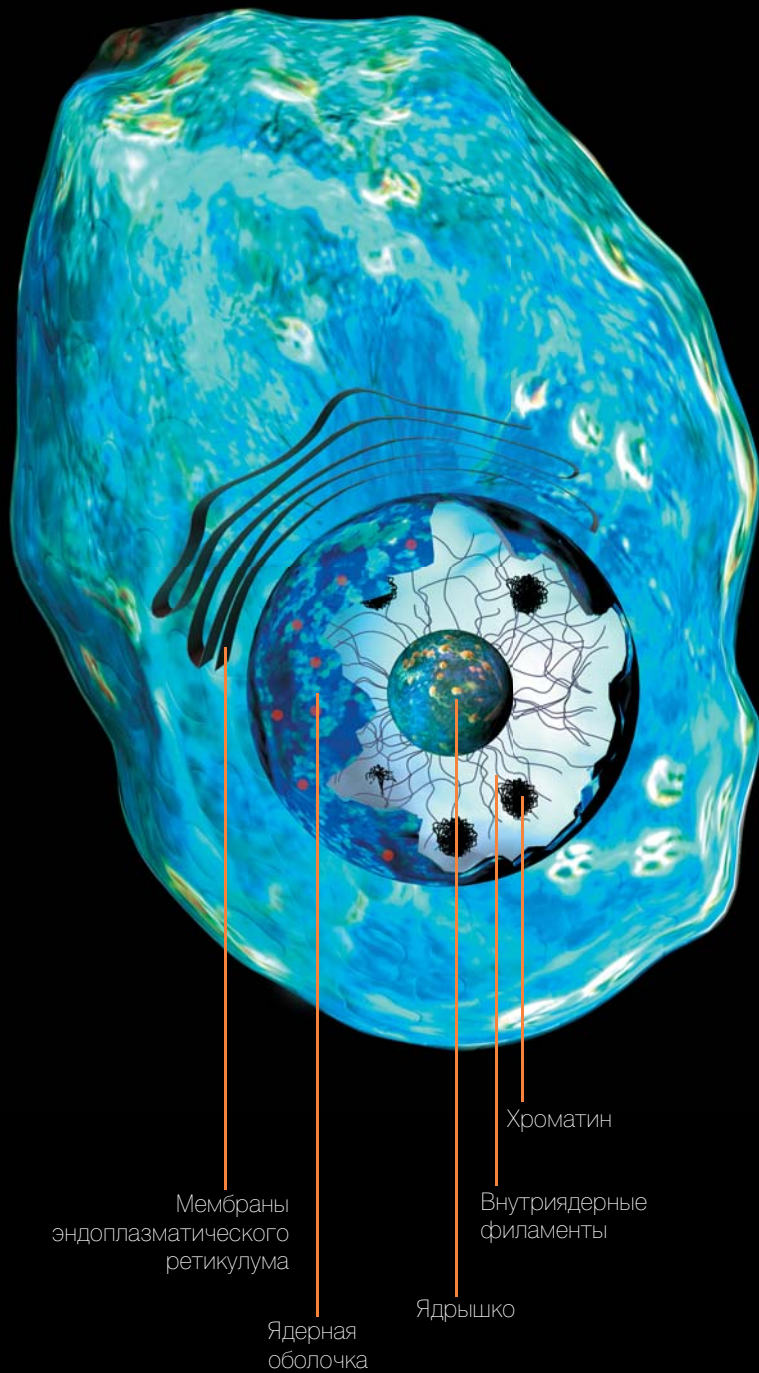
КИСЕЛЕВА Елена Владимировна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории морфологии и функции клеточных структур Института цитологии и генетики СО РАН. Сфера научных интересов: организация, функция и динамика внутриклеточных структур. Автор около 200 научных работ



Дрожжевая клетка с удаленным фрагментом клеточной оболочки. Видно округлое ядро и цитоплазматические структуры

Дрожжевые клетки под световым микроскопом. Стрелками показаны почкующиеся дрожжи





Гипотетическая схема строения клеточного ядра

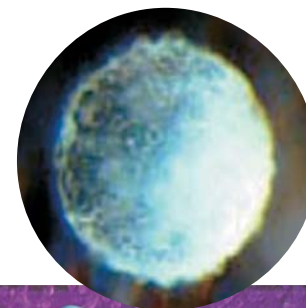
В настоящее время электронная микроскопия (ЭМ) нашла широкое применение в микробиологии, вирусологии, биохимии, онкологии, медицинской генетике и иммунологии. Благодаря ЭМ раскрыта субмикроскопическая структура клеток, открыт ряд неизвестных ранее клеточных органелл, таких как лизосомы, рибосомы, эндоплазматический ретикулум, микротрубочки, цитоскелет и прочие структуры, специфичные для разных видов клеток. Электронная микроскопия позволила понять многие тонкие механизмы развития болезней, в том числе на ранних этапах их возникновения, еще до появления четкой клинической симптоматики.

К сожалению, просвечивающая электронная микроскопия ограничена в своих возможностях по исследованию и диагностике поверхности клеточных структур, и лет пятнадцать назад вопрос о том, как заглянуть внутрь ядра и получить трехмерное изображение внутриядерных и околоядерных структур, был неразрешим. Дело в том, что тонкие срезы ткани, которые изучаются под микроскопами, являются двумерными срезами и не позволяют судить о трехмерной структуре клеточных компонентов. Трехмерное изображение можно получить после реконструкции сотен серийных срезов, но это длительный и трудоемкий процесс.

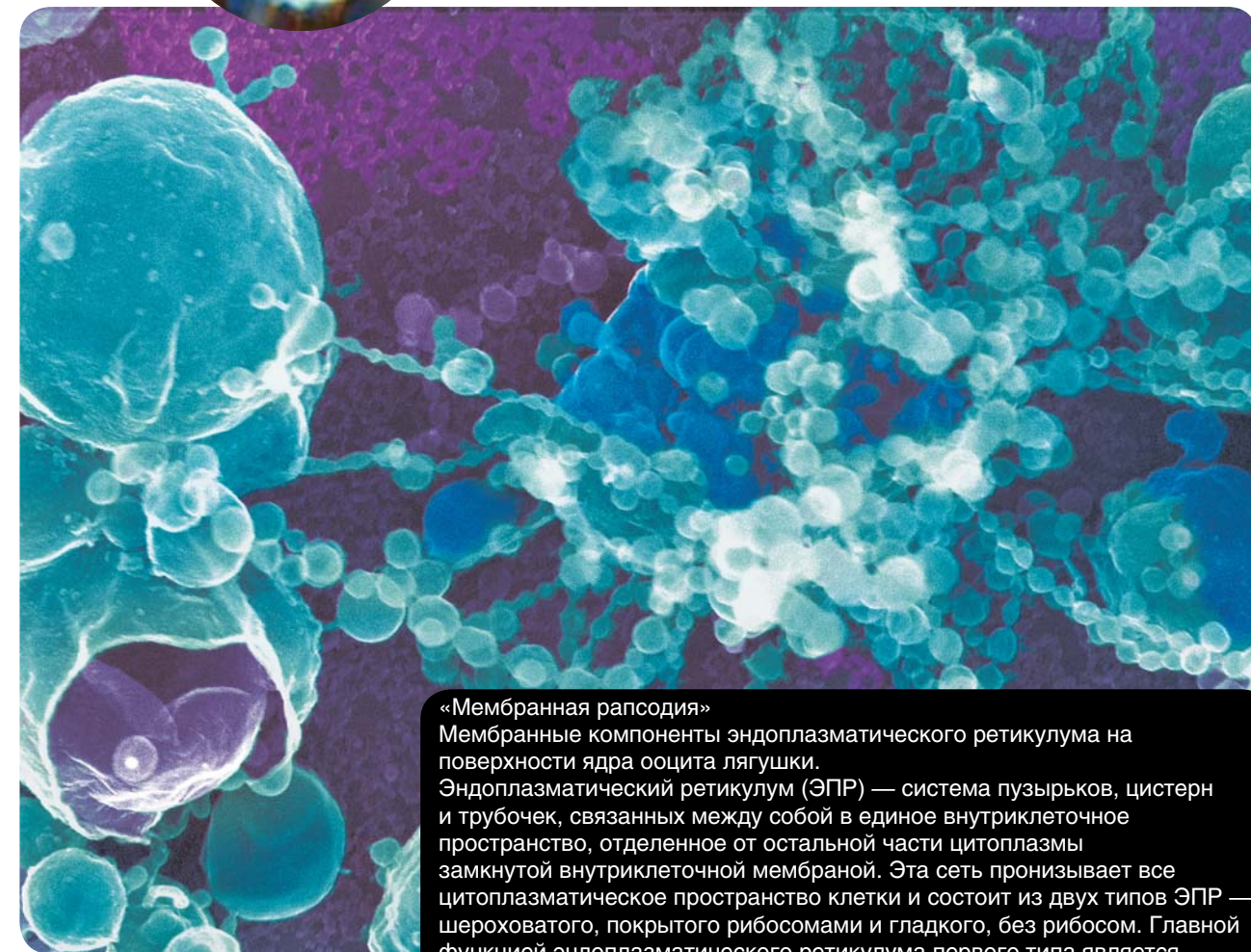
В настоящее время разработаны более прямые методы получения трехмерного изображения. Один из них состоит в изучении образца в *сканирующем электронном микроскопе (СЭМ)*, который обычно меньше и проще, чем *просвечивающий электронный микроскоп*.

Для получения изображения в просвечивающем электронном микроскопе используют электроны, проходящие через образец, а в сканирующем электронном микроскопе регистрируются электроны, рассеиваемые или излучаемые

Ядро, выделенное вручную из ооцитов* лягушки

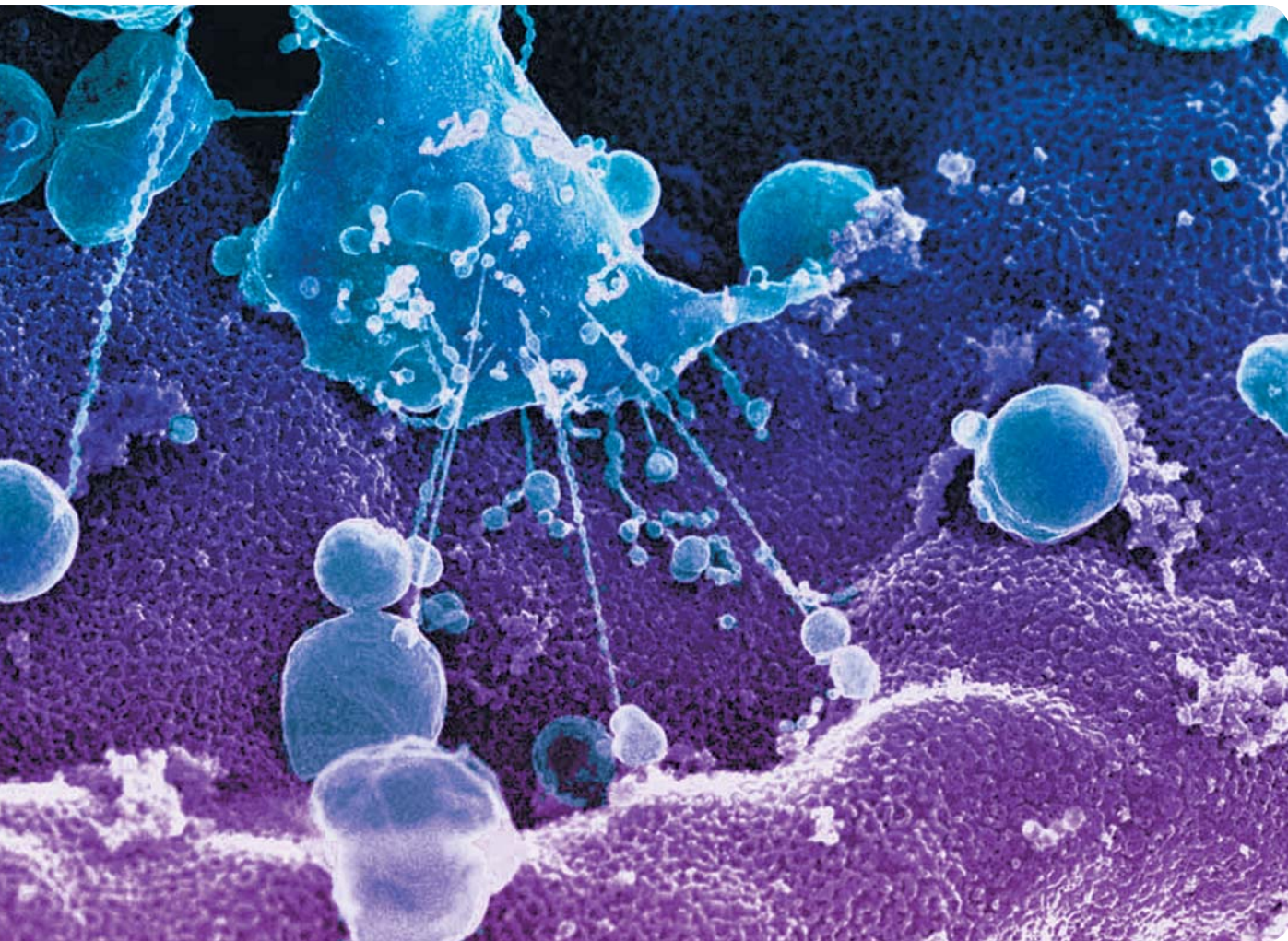


Ооциты лягушки на разных стадиях развития



«Мембранная рапсодия»
Мембранные компоненты эндоплазматического ретикулума на поверхности ядра ооцита лягушки. Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) — система пузырьков, цистерн и трубочек, связанных между собой в единое внутриклеточное пространство, отделенное от остальной части цитоплазмы замкнутой внутриклеточной мембраной. Эта сеть пронизывает все цитоплазматическое пространство клетки и состоит из двух типов ЭПР — шероховатого, покрытого рибосомами и гладкого, без рибосом. Главной функцией эндоплазматического ретикулума первого типа является биосинтез (с помощью рибосом), модификация и транспортировка белков. ЭПР второго типа обеспечивает синтез липидов и полисахаридов. Мембраны ЭПР тесно взаимодействуют с различными органеллами клетки, а также с ее плазматической мембраной и ядерной оболочкой, в формировании которой при делении и росте клеток они принимают активное участие

* *Ооцитом* называется женская половая клетка в период ее роста в яичнике

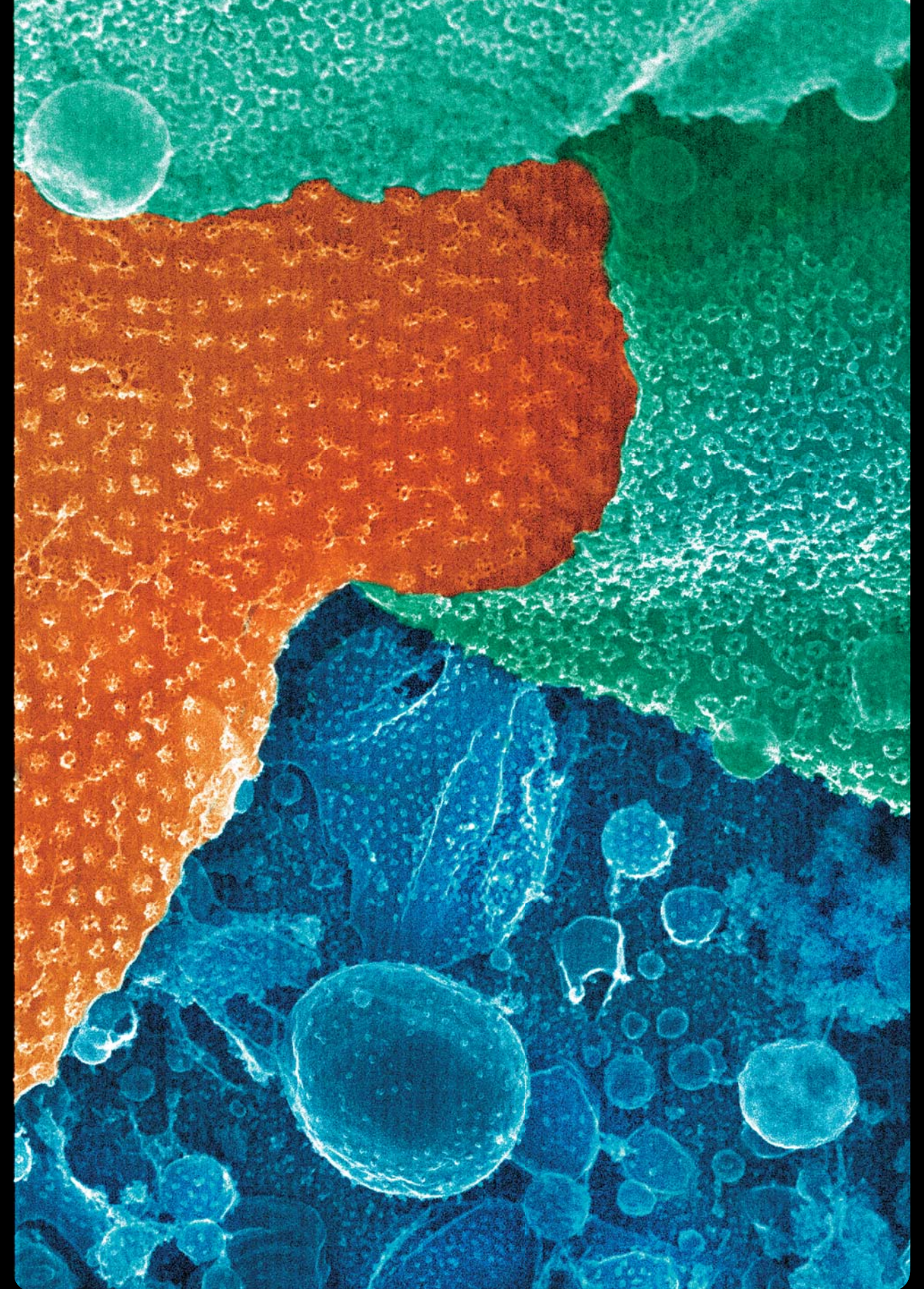


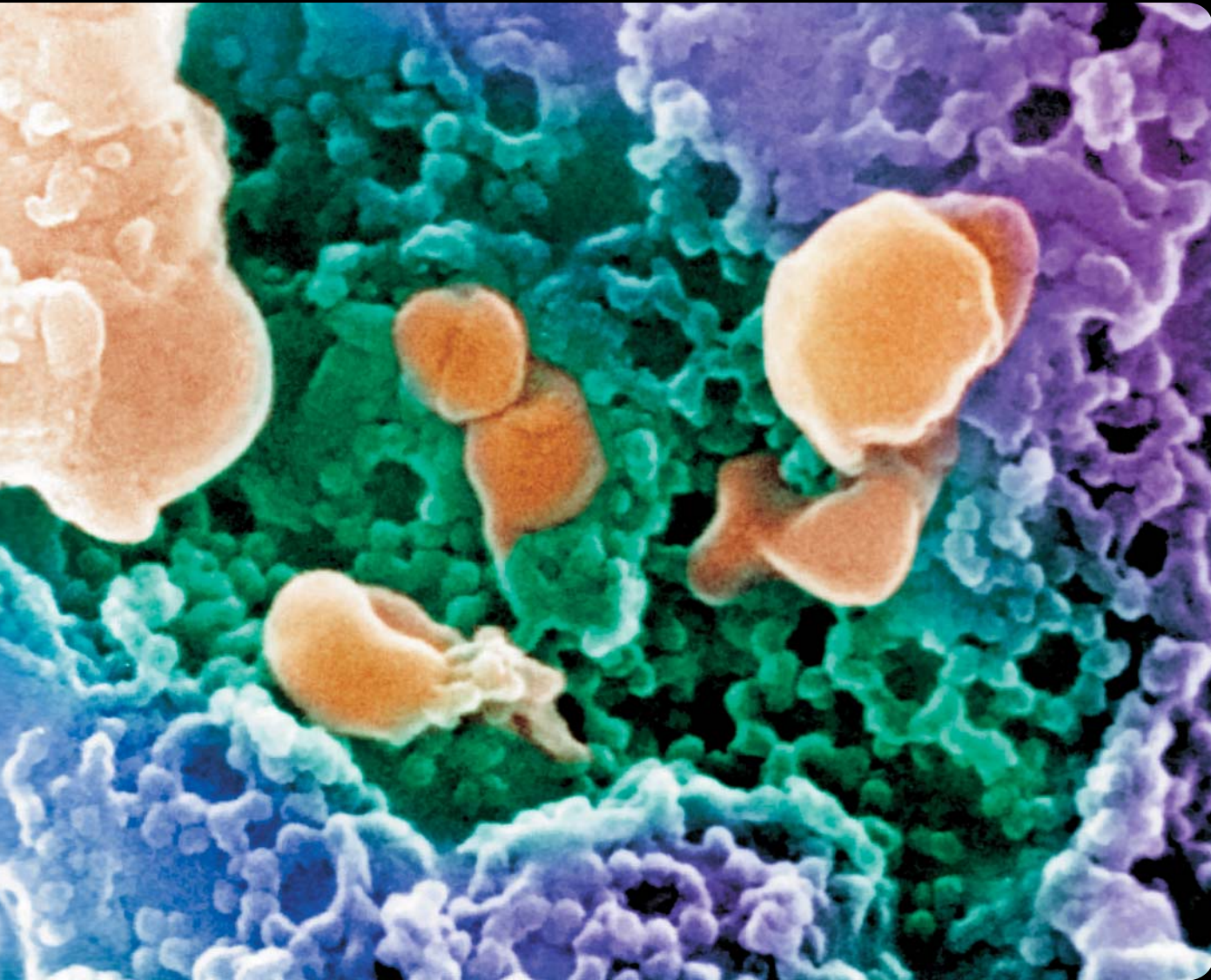
▲ «Синий спрут»

Мембранные компоненты эндоплазматического ретикулума на поверхности ядра, изолированного из ооцита лягушки. Мембранные компоненты ЭПР (цистерны, пузырьки, трубочки) принимают активное участие в сборке новых фрагментов ядерной оболочки растущих неделящихся ядер. Мембраны ЭПР сливаются с наружной мембраной ядра, затем часть мембран ЭПР перемещается на внутреннюю мембрану и сближается с наружными мембранами, формируя новый участок ядерной оболочки

▶ «Очевидное невероятное»

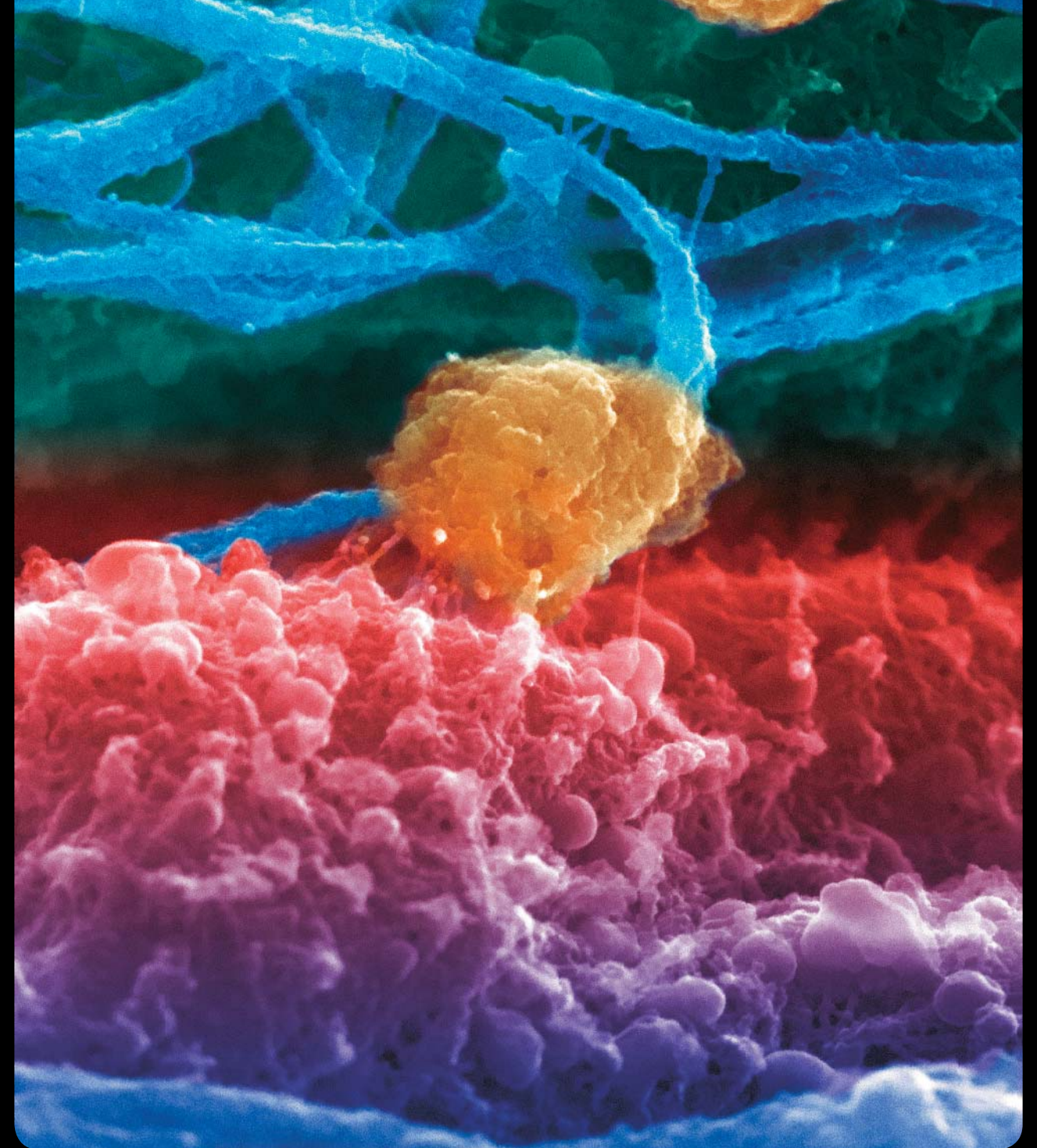
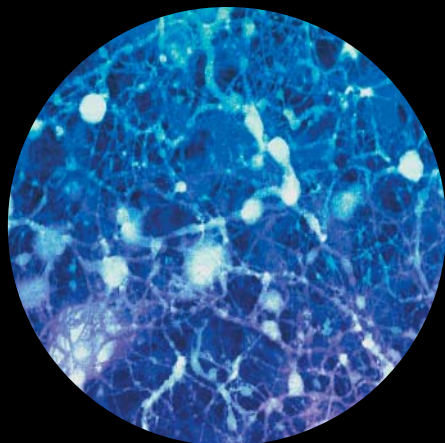
Снимок ядерной оболочки ооцита лягушки. Одновременно можно видеть строение наружной (окрашена в зеленый цвет) и внутренней (окрашена в коричневый цвет) мембран ядерной оболочки, благодаря тому что фрагмент ядерной оболочки отогнули с помощью стеклянных иголок. Цитоплазматическую поверхность наружной мембраны можно видеть в верхней и правой части снимка, а внутреннюю поверхность внутренней мембраны — в нижней. Ядерная оболочка — это самый сложный мембранный компонент, вернее сказать, мембранный комплекс эукариотической клетки. Она разграничивает внутриклеточное пространство на два крупных компартмента — ядро и цитоплазму, а также разделяет процессы репликации ДНК, транскрипции и процессинга РНК от процессов трансляции и упаковки белков. Ядерная оболочка состоит из наружной и внутренней мембран, разделенных сорокнанометровым перинуклеарным пространством и контактирующих между собой в области ядерных поровых комплексов. К внутренней мембране ядерной оболочки тесно прилегает ламина-сеть промежуточных филаментов, образованных белком ламином, которая обеспечивает сферическую форму ядра и закрепляет ядерные поры в оболочке ядра





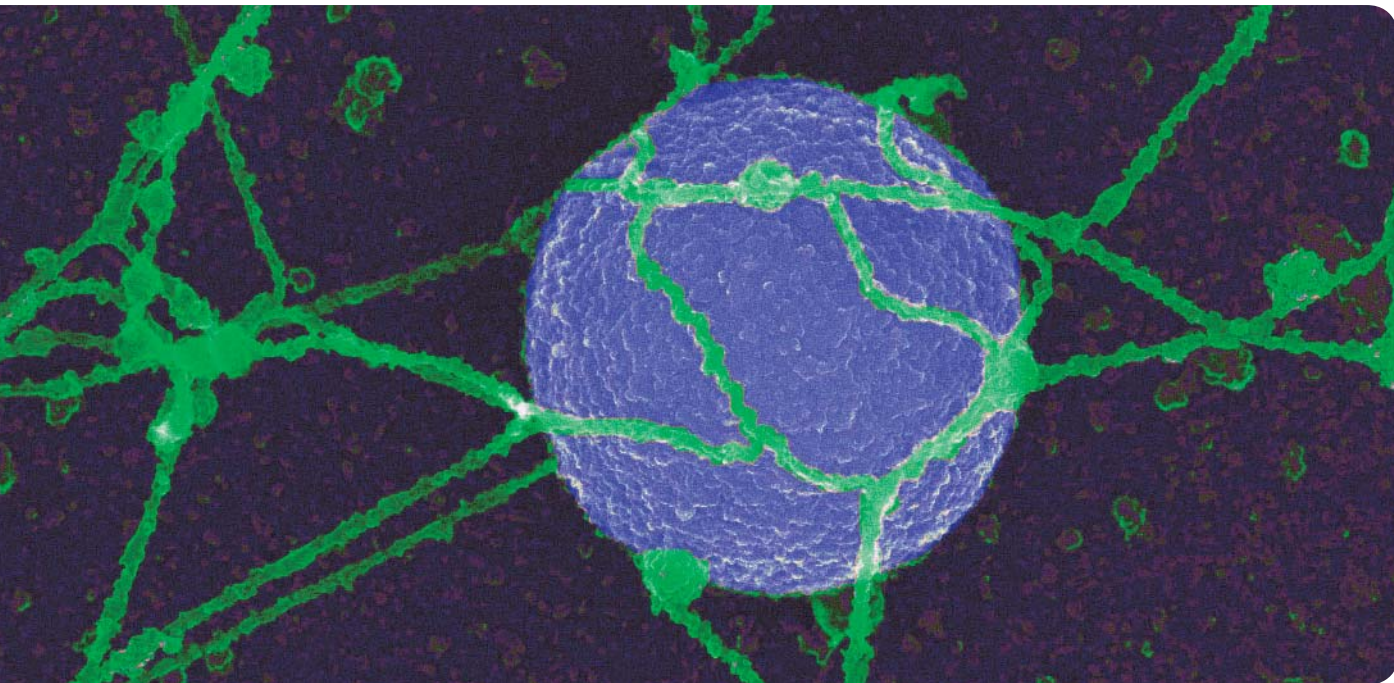
▲ Цитоплазматическая поверхность ядерной оболочки интерфазного ядра, выделенного из ранних эмбрионов дрозофилы. Видны ядерные поры и пузырьки эндоплазматического ретикулума

◀ Фрагмент содержимого ядра (нуклеоида) ооцита лягушки. Ядро выделили из ооцита, затем осторожно убрали ядерную оболочку и получили желеобразный шарик — нуклеоид, который сохраняет форму на короткое время, затем превращается в уплотненный сгусток. Можно различить сеть внутриядерных филаментов и сферические тельца



«Внутриядерные рельсы»
 Актинсодержащие филаменты внутриядерного матрикса ооцита лягушки. После выделения ядра из ооцита лягушки осторожно стеклянной иглой отвернули фрагмент ядерной оболочки и заглянули внутрь, сохранив контакты внутренней мембраны ядерной оболочки с внутриядерным содержимым. До сих пор идут споры о том, что обеспечивает распределение и организацию клеточных компонентов (хромосом, ядрышка, сферических телец, рибонуклеопротеидных (РНП) частиц)

внутри ядра. Отметим, что в отличие от цитоплазмы все внутриядерные компоненты не имеют оболочек, тем не менее многие процессы внутри ядра — компартиментализованы, т. е. происходят, например, только в ядрышке или в определенных сферических тельцах. А хромосомы вообще занимают строго определенные области внутри ядра — так называемые «хромосомные территории». Предполагается, что ведущую роль в этом процессе выполняют ядерная оболочка и внутриядерный матрикс



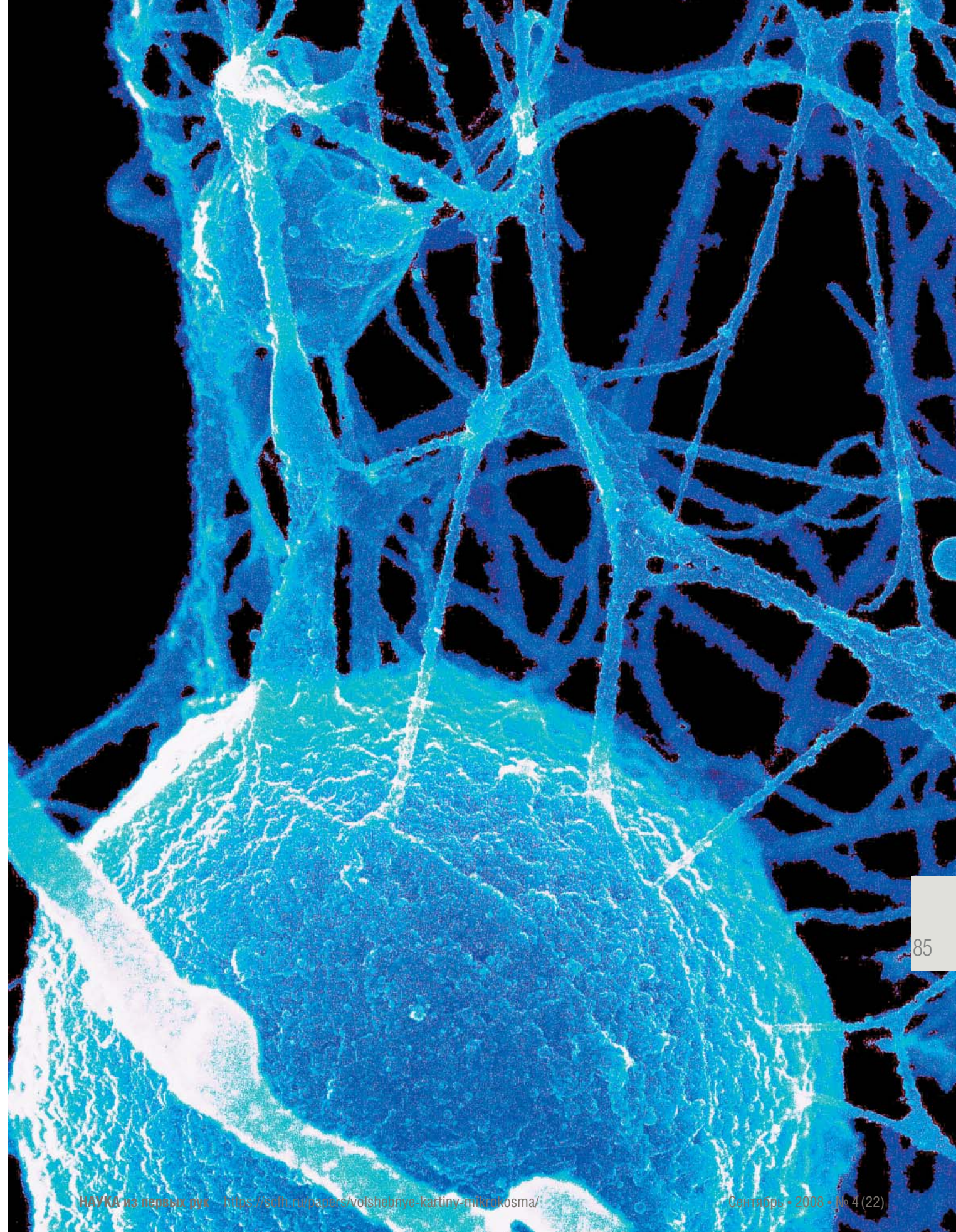
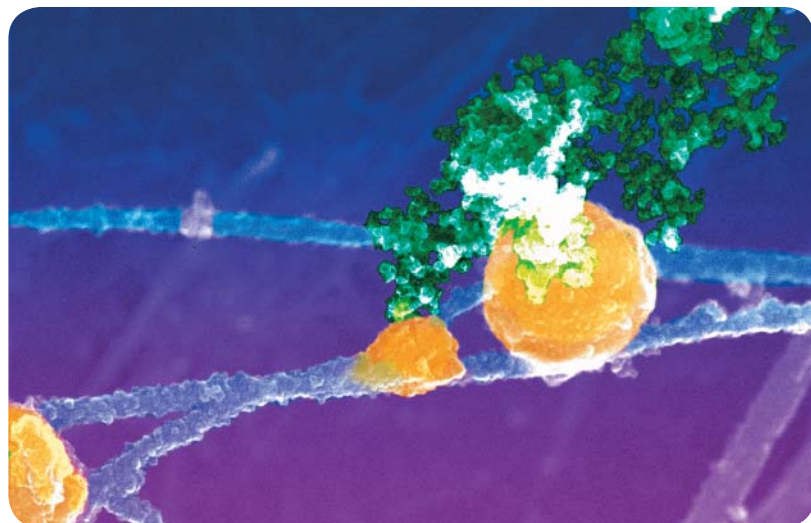
поверхностью образца. Для изучения в СЭМ образец должен быть зафиксирован, высушен и покрыт тонкой пленкой тяжелого металла. Затем образец сканируется узким пучком электронов. Отраженные и рассеянные при облучении образца электроны попадают в детектор, анализирующий полученную информацию, которая затем преобразуется в увеличенное изображение на экране.

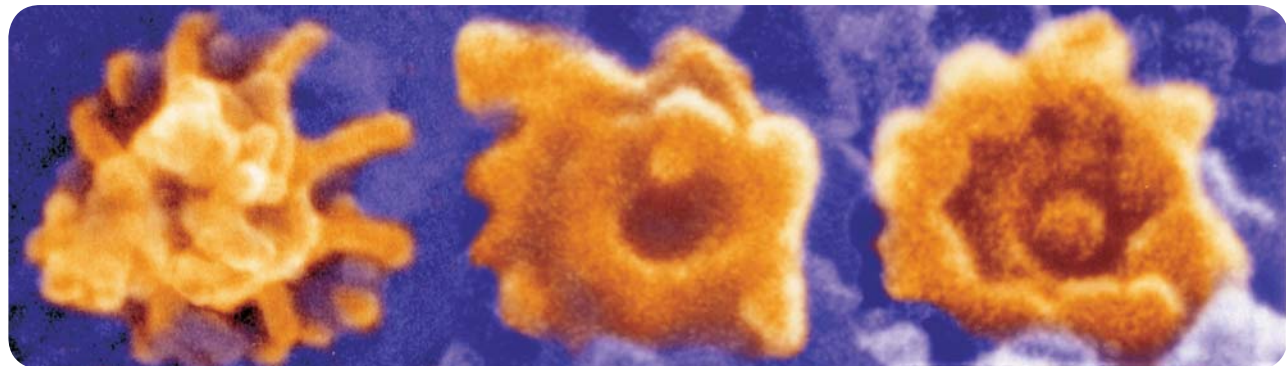
Метод сканирующей электронной микроскопии обеспечивает значительную глубину фокусировки. Более того, поскольку масштабы рассеивания электронов определяются углом поверхности по отношению к сканирующему лучу, то на изображении возникают чередующиеся светлые и темные участки, создающие впечатление трехмерности. А с появлением *высокоразрешающего сканирующего автоэмиссионного электрон-*

▲
«Неизвестная планета»
Сферическое тельце Кохала,
содержащее белки для сплайсинга
(удаление интронов из молекулы)
РНК, подвешенное
на внутриядерных
актинсодержащих нитях

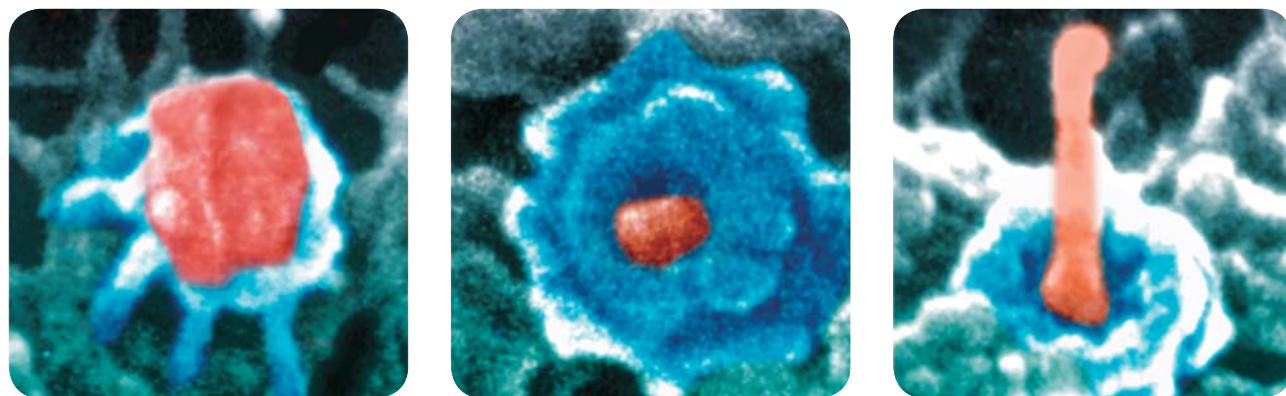
◀ Контакт хроматина (окрашен
зеленым) с актинсодержащими
филаментами и тельцем Кохала

Ядрышко, подвешенное
на актинсодержащих нитях
внутри ядра ▶





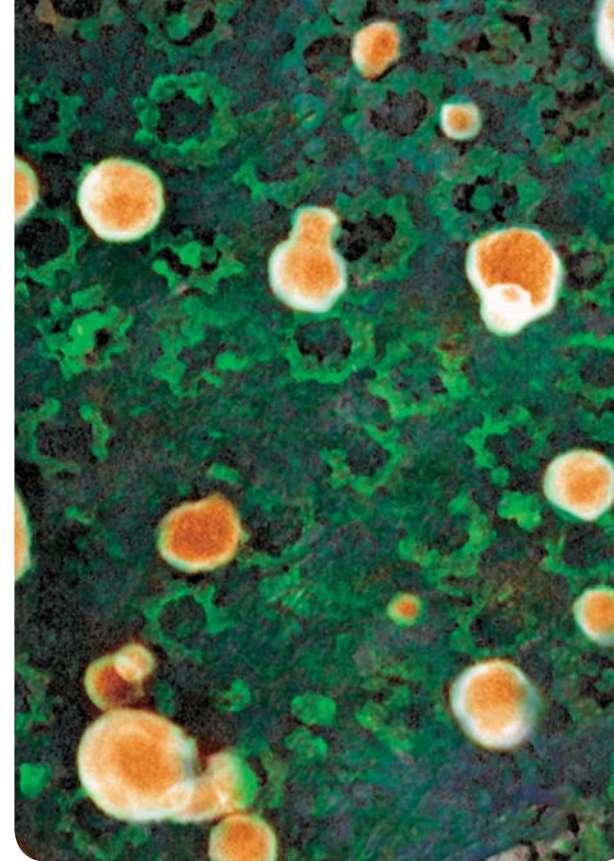
Три отдела неактивной ядерной поры на большом увеличении. Слева направо: внутриядерный, центральный и цитоплазматический компартменты



Активно функционирующая пора. Видно, как рибонуклеопротеидная фибрилла (РНП фибрилла) проходит через различные компартменты ядерной поры. Слева направо показано, как РНП частица сначала закоревается на верхушке бастета внутриядерного компартмента и начинает разворачиваться в фибриллу, так как размер канала ядерной поры меньше размера частицы. Затем мы видим фибриллу (окрашено темнокрасным) в канале центрального компартмента поры. И, наконец, — фибриллу РНП, выходящую из поры в цитоплазму



Схематическое изображение того, что видно на верхних снимках — представлены три стадии прохождения РНП фибриллы через разные отделы ядерной поры. Представленные снимки демонстрируют высокую сложность организации ядерной поры — этой миниатюрной космической станции, находящейся в глубинах живой клетки



Сборка ядерных поровых комплексов в участках сплавления пузырьков ЭПР с наружной ядерной мембраной

В процессе транскрипции на ДНК, молекула мРНК сразу упаковывается с белками (их около двадцати, они закручивают нить мРНК и покрывают ее защитной оболочкой) в РНП фибриллу (нитьку диаметром 10—20 нм), а затем в компактную РНП частицу (диаметром от 30 до 50 нм). Это с одной стороны защищает молекулу РНК от разрушения, а с другой обеспечивает ее эффективное перемещение внутри ядра. Внутреннее пространство ядра достаточно плотно заполнено различными структурами и молекулами. И в этом «столпотворении» мРНК частица должна переместиться к ядерной поро, заякориться на ней и транспортироваться через центральный канал поры в цитоплазму, где на ней должен начаться процесс трансляции — синтеза белка. РНК-связанные белки играют большую роль в транспорте мРНК. Как показали наши исследования, часть белков удаляется с РНП частицы, когда пора находится в бастет структуре, а некоторые белки перемещаются с мРНК в цитоплазму и участвуют в процессе трансляции. Удаление части белков приводит к тому, что РНП частица разворачивается в более узкую РНП фибриллу, что обеспечивает ей эффективный транспорт через центральный канал поры, диаметр которого при этом расширяется до 25 нанометров

Все представленные в этой публикации снимки получены с использованием высокоразрешающего сканирующего электронного микроскопа фирмы Hitachi, на котором работала автор в Институте раковых исследований им. Паттерсона в г. Манчестер (Англия) в рамках совместного российско-английского проекта по исследованию структурной организации ядерной оболочки растущих неделящихся ядер, таких как ооциты амфибий и интерфазных ядер ранних эмбрионов дрозофилы

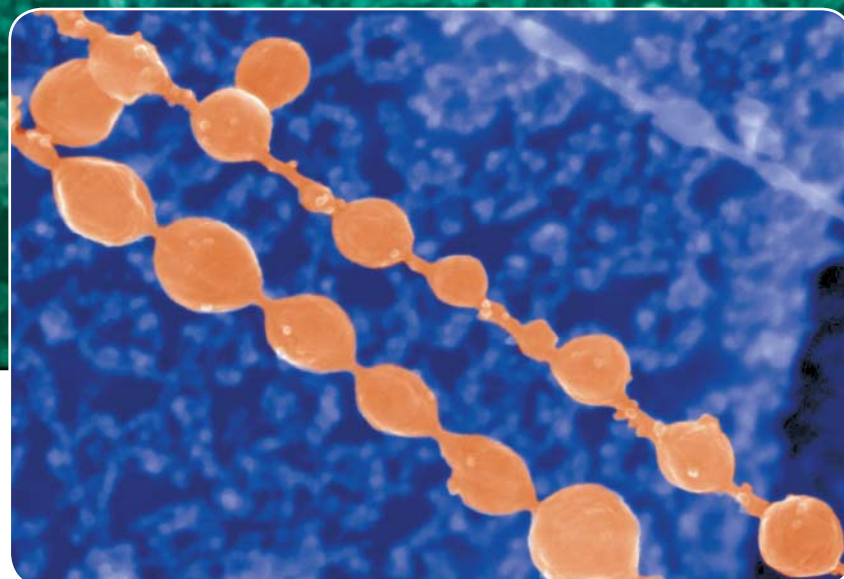
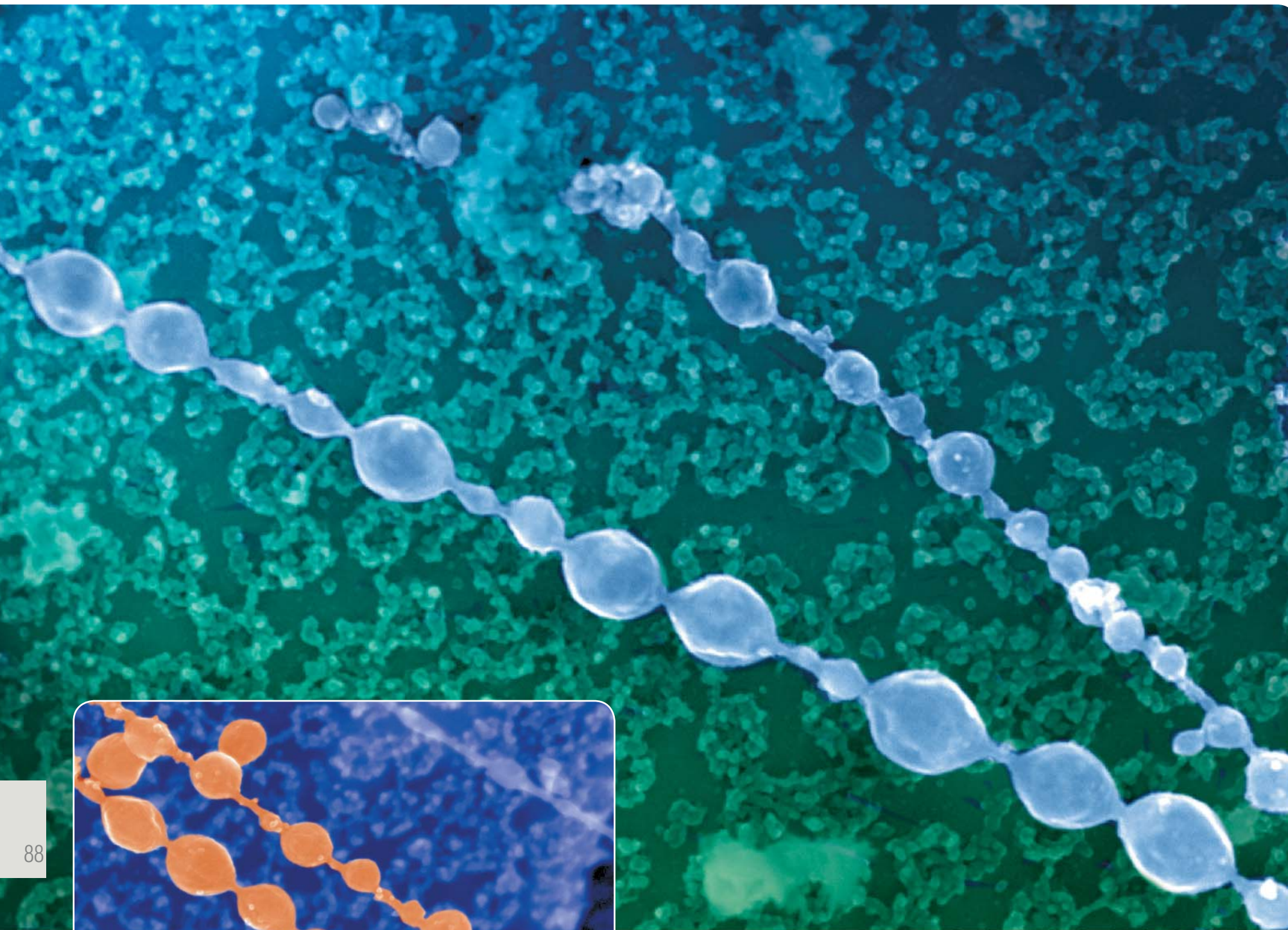
ного микроскопа (Field Emission in Lenz, фирмы Hitachi) ученым удалось получить уникальные трехмерные снимки цитоплазматической и внутриядерной поверхности ядерной оболочки, изучить тонкое строение ядерных поровых комплексов и заглянуть внутрь ядра.

В России первый подобный сканирующий микроскоп был приобретен в апреле 2008 г. Институтом биомедицинской химии РАН (Москва). К сожалению, институты Сибирского отделения РАН такого микроскопа для биологических исследований пока не имеют, несмотря на то что в группе Е. В. Киселевой разработаны методы для изучения биологических образцов в SEM, позволившие получить большое количество новых уникальных данных о строении и динамике структур наноразмеров, таких как ядерные поры (диаметр 100 нм), филаменты внутриядерного матрикса (диаметр 12 нм) и др.

Можно надеяться, что подобный микроскоп появится вскоре и в центре коллективного пользования Института цитологии и генетики СО РАН, что обеспечит дальнейший прогресс в изучении организации различных компонентов клеточного микрокосмоса.

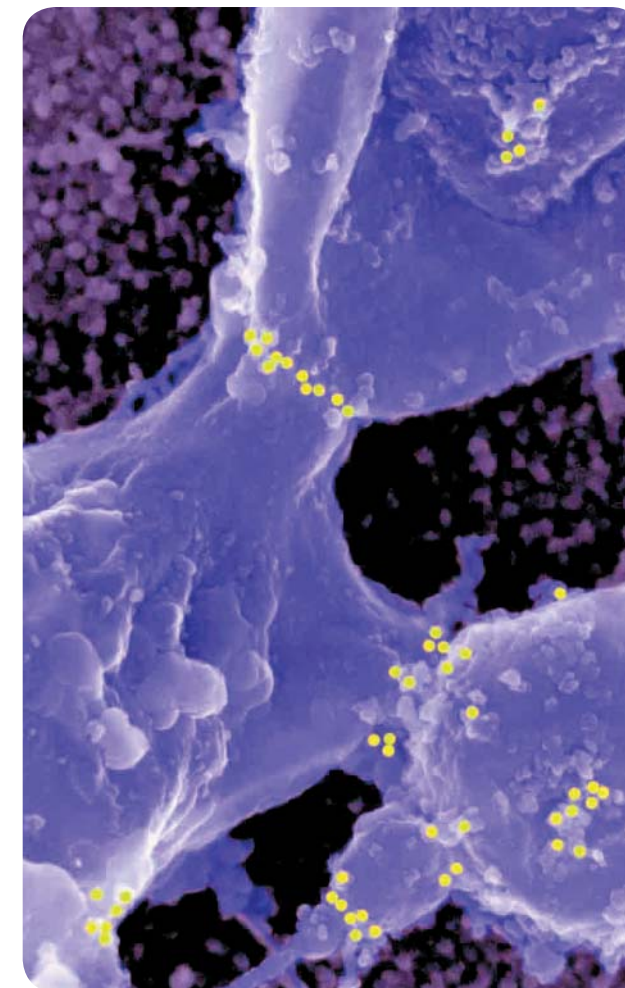
Все демонстрируемые снимки получены с использованием высокоразрешающего сканирующего электронного микроскопа, который использовался во время кратковременных командировок ведущего научного сотрудника Е. В. Киселевой в Институт раковых исследований им. Паттерсона, в г. Манчестер Англия. Полученные на этом микроскопе снимки внутриклеточных структур по темам совместных исследований с английскими учеными опубликованы на обложках и разворотах таких журналов, как Nature Cell Biol., Nature Review Mol. Cell Biol., J. Cell Sci., J. Mol. Biol.

И у наших читателей сейчас появилась уникальная возможность заглянуть в волшебный мир клетки.



Цепочка мелких пузырьков ЭПР, в сплавлении которых, возможно, принимает участие ретикулон 4, на цитоплазматической поверхности ядерной оболочки ооцита лягушки

Все исследования, проведенные Е. В. Киселевой, выполнены при поддержке гранта РФФИ (07-04-00416) и Английского фонда Wellcome Trust



«Место встречи изменить нельзя»
 Локализация белка ретикулона в участках слияния пузырьков эндоплазматического ретикулума. Белки ретикулонны обнаружены во всех эукариотах и являются интегральными мембранными белками, т. е. встроены в клеточные мембраны. Известны четыре гена, кодирующИХ ретикулонны 1, 2, 3 и 4. В 2006 г. американскими исследователями было установлено, что белок ретикулон 4 (NogoA в другой транскрипции) может изменять кривизну мембран ЭПР в условиях *in vitro* (в пробирке) и превращать его компоненты в микротрубочки. Мы впервые продемонстрировали в условиях *in vivo*, что этот белок локализуется в участках сплавления компонентов (пузырьков) ЭПР друг с другом, а также в участках сплавления компонентов ЭПР с наружной мембраной ядерной оболочки. Это предполагает важную роль ретикулона 4 в сборке новых фрагментов ядерной оболочки. Эти данные опубликованы нами в 2007 г. в J. Struct. Biol. Поскольку этот белок принимает участие в развитии болезни Альцгеймера (показано, что он ингибирует рост аксонов в нервных клетках), то исследование функций этого белка представляет большой научный интерес