





Исследование изменений механических свойств ядерной оболочки в связи с репликацией ДНК

Распорова Александрина Кирилловна, 10 класс

Специализированный учебно-научный центр (факультет) — школа-интернат имени А.Н. Колмогорова Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Москва, Россия

Научный руководитель: н.с. научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, кандидат биологических наук, Курчашова Светлана Юрьевна

Ядерная оболочка и ядерная ламина

- ЯО структура, характерная для эукариот и разграничивающая нуклеоплазму и цитоплазму.
- С внутренней ядерной мембраной связана ядерная ламина
- Ламина сеть промежуточных филаментов V типа
- Регулирует важные клеточные события (в т.ч. репликация ДНК и клеточное деление)

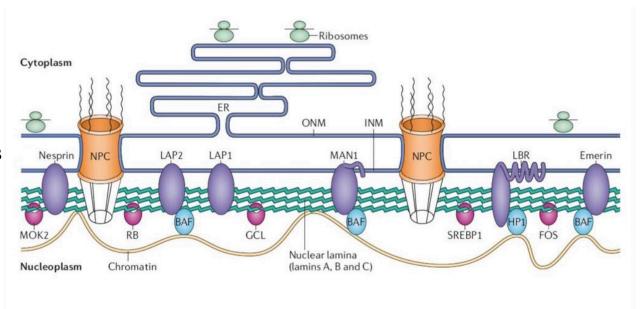
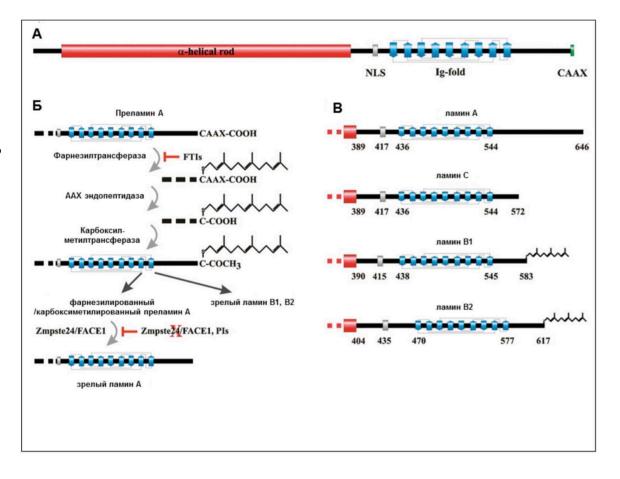


Рис.1 Схема строения ядерной оболочки

Разновидности и строение ламинов

- Типичное строение из 3 частей: альфаспираль, N- и C-концевой домены
- Различия между ламинами по С-концевому домену
- Ламины типа A (A и C) и ламины типа B (B1, B2, B3)
- В ламине данные белки образуют так называемые микродомены, в состав которых, как правило, входит только один из них (A, B или C)

Рис.2 Строение ламинов и схема их созревания. (а) – общая схема строения; (б) – схема созревания ламинов; (в) – сравнительная схема строения разных типов ламинов *Zhironkina et al.*, 2015



Формирование ядерных почек

- Часть ядерной оболочки, свободной от ламинов ядерная почка
- Появляются вследствие увеличения площади ядерной оболочки

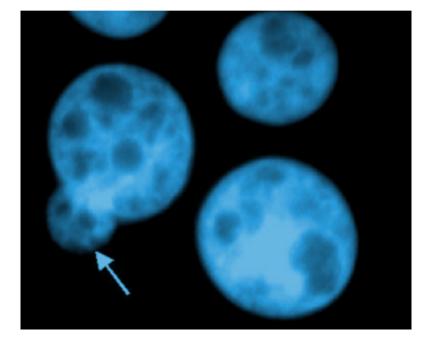
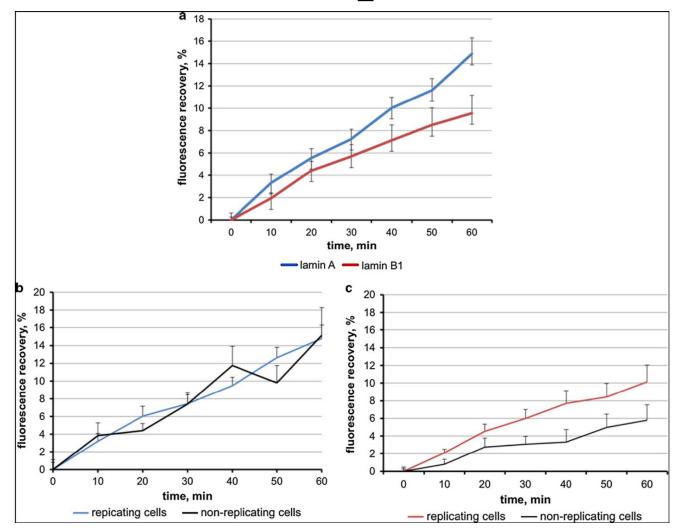


Рис.5 Образование почки после гипотонического и изотонического воздействия на клетки

Ламины и репликация



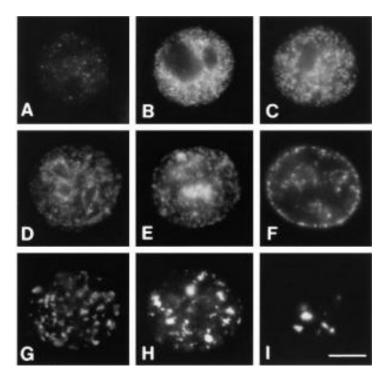


Рис.4 Паттерны репликации ДНК в ядре (S-фаза клеточного цикла) *Hozak et al., 1993*

Рис.3 динамика роста ламинов Zhironkina et al., 2016

Актуальность, цели и задачи

- Цель: исследовать изменения механических свойств ядерной оболочки в связи с репликацией ДНК
- **Актуальность:** Несмотря на долгую историю исследования ламины, до сих пор не установлены механизмы её функционирования, обеспечивающие её многозадачность. Исследование путей регуляции роста ядерной ламины является перспективный направлением для поиска путей предотвращения, лечения и профилактики ламинопатий.

• Задачи:

- 1. Исследовать взаимосвязь между возможностью образования ядерных почек и стадией клеточного цикла
- 2. Исследовать белковый состав ядерной оболочки в области почки

Материалы и методы

- В работе использовались контрольные и экспериментальные группы клеток СПЭВ и HeLa
- Выявление сайтов репликации при помощи этинилдезоксиуридина (EdU)
- Детекция ламинов производилась при помощи иммуноцитохимического анализа

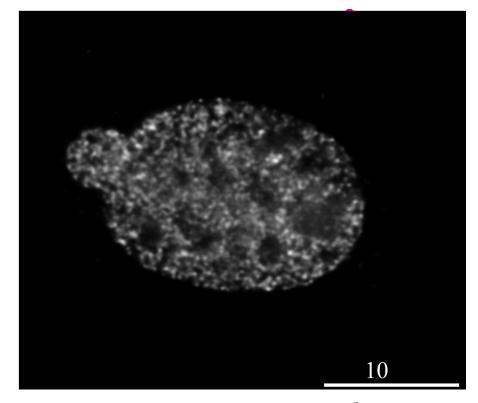


Рис.6 Клетка СПЭВ с EdU. Масштабный отрезок – 10 µm

Результаты

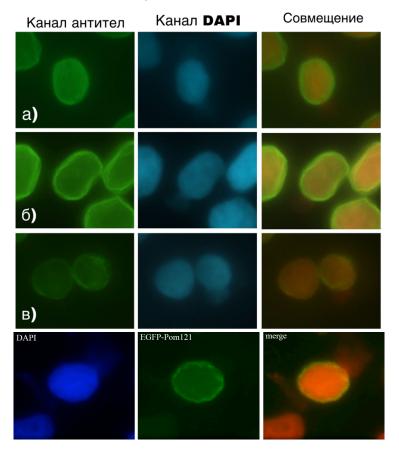
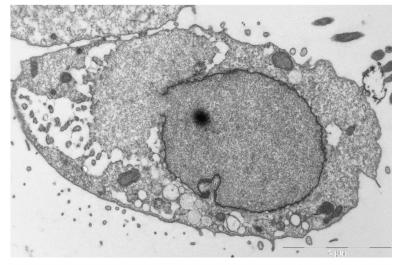


Рис.7 Клетки культуры HeLa после 5 минут гипотонического воздействия. (а)—ламин A, (б)—ламин B1, (в)—ламин C. Нижняя панель соответствует белку POM121.

- Почки обнаружены в 3% клеток экспериментальной группы
- 70% клеток с почками включали EdU, который был добавлен до гипотонического воздействия, т.е. большинство таких клеток находились в S-фазе клеточного цикла
- Через 5 минут после начала гипотонического воздействия ламины типа А, В и белок РОМ121 (нуклеопорин) в зоне почки не были обнаружены
- В зоне почки выявляется хроматин

В "почке" существуют области, где контакты между хроматином и ядерной оболочкой отсутствуют





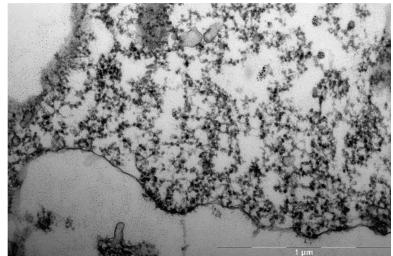


Рис.8 СПЭВ, 30 минут гипотонии (15% раствор Хэнкса)

Результаты

- После часа гипотонического и 2-х часов изотонического воздействий в почке были обнаружены ламины А и С
- Ламины В1 и В2, а также ядерные поры обнаружены не были

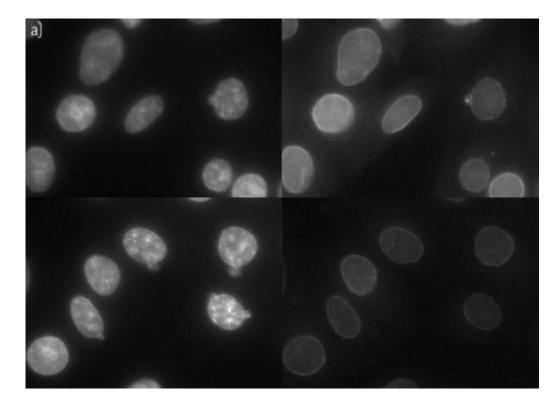


Рис.9 Клеточная культура HeLa после 1 часа гипотонии и 2 часов изотонии. Верхняя панель соответствует ламину С, нижняя – ламину В2.

Заключение и выводы

- 1) Образование ядерных почек происходит преимущественно в синтетическом периоде (S-фазе клеточного цикла)
- 2) Образование ядерных почек после гипотонического воздействия коррелирует с изменениями в локальном составе белков ядерной оболочки
- 3) На модели участка ядерной оболочки, свободного от ламины, показано, что образование контактов между хроматином и ядерной оболочкой возможно без участия ламина В

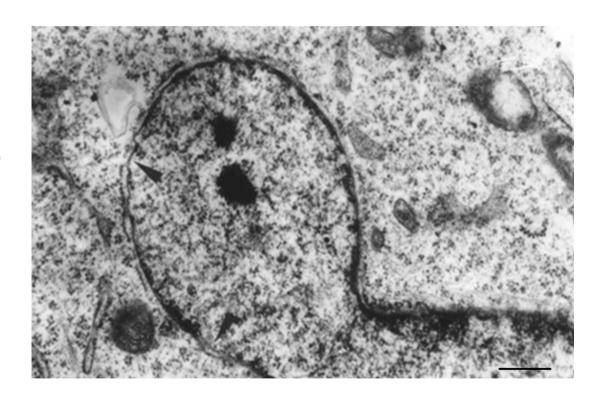


Рис.10 Ядерная почка после 2 часов изотонии. Масштабный отрезок – 0,5 µm *Zhironkina et al., 2016*

Спасибо за внимание!