

РЕОРГАНИЗАЦИЯ МИТОТИЧЕСКОГО АППАРАТА В КЛЕТКАХ СНО-К1, ОБРАБОТАННЫХ ЭТОПОЗИДОМ, ПРЕДШЕСТВУЕТ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ

© *Е. Е. Балашова,¹ С. С. Рясина, Т. М. Виноградова, В. Б. Быстревская*

Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий, Москва;

¹ электронный адрес: balashlen@mail.ru

Показано, что в культуре клеток СНО-К1 этопозид (1 ч 25 мкМ) вызывает интерфазную задержку, после которой клетки возобновляют митотическое деление и через некоторый промежуток времени подвергаются апоптотической гибели. Накоплению в культуре апоптотических клеток предшествует увеличение числа многополюсных митозов. Наши данные впервые показывают, что в митотических клетках, делящихся в период, предшествующий апоптозу, различается характер иммунофлуоресцентного окрашивания микротрубочек веретена деления антителами к α -тубулину, ацетилированному и тиронизированному α -тубулину. Отдельные части многополюсного митотического веретена могут различаться по наличию антигенных детерминант, доступных для антител против тиронизированного α -тубулина. Эти нарушения митотического аппарата усугубляются непосредственно перед тем, как в культуре возрастает количество клеток, подвергшихся апоптозу. Кроме того, наши данные показали, что некоторые клетки успевают пройти по крайней мере два митотических цикла перед возрастанием числа апоптотических клеток в культуре.

Ключевые слова: этопозид, апоптоз, митоз, тубулин.

Апоптоз, или запрограммированная клеточная гибель, является механизмом, необходимым многоклеточному организму для избавления от ненужных, поврежденных и потенциально опасных клеток. Сегодня многое известно о молекулах, участвующих в регуляции этого процесса, но до сих пор не существует четкого представления обо всей последовательности событий от момента индукции апоптоза до момента гибели клетки (для обзора см.: Blank, Shiloh, 2007; Elmore, 2007).

В последнее время накапливаются данные, которые указывают на возможность вовлечения системы микротрубочек в процесс запуска апоптоза (Ireland, Pittman, 1995; Pittman et al., 1997; Srivastava et al., 1998; Abal et al., 2001; Porter, Lee, 2001; Кисурина-Евгеньева и др., 2006; Moss, Lane, 2006; Moss et al., 2006). В ряде работ показано, что при экспериментальной индукции апоптоза в опухолевых клетках происходит реорганизация интерфазной системы микротрубочек, выражающаяся в усилении полимеризации α -, β - и γ -тубулина (Porter, Lee, 2001) и увеличении числа центров организации микротрубочек (ЦОМТ) (Ireland, Pittman, 1995; Pittman et al., 1997; Porter, Lee, 2001; Yih et al., 2006). Этот процесс наблюдается как при действии на клетку агентов, непосредственно стабилизирующих микротрубочки, таких как таксол (Ireland, Pittman, 1995), так и при воздействии γ -облучения (Porter, Lee, 2001) или ингибитора топоизомеразы II — этопозида (Ireland, Pittman, 1995; Pittman et al., 1997), которые, повреждая ДНК, не влияют прямо на полимеризацию тубулина.

Следует отметить, что данные по реорганизации интерфазной системы микротрубочек получены на лейкомиических клетках, обладающих повышенной чувствитель-

ностью к действию противоопухолевых агентов. Время, которое проходит от момента индукции до апоптотической фрагментации ДНК, в этих клетках не превышает длительности их митотического цикла. Но при индукции апоптоза во многих культивируемых клетках опухолевого и неопухолевого происхождения фрагментация ДНК наступает через промежуток времени, превышающий длительность одного митотического цикла (Lock, Ross, 1990b; Demarcq et al., 1994; Sherwood et al., 1994; Johnson et al., 1999; Sato et al., 2000; Watanabe et al., 2000; Abal et al., 2001; Castedo et al., 2004; Rello-Varona et al., 2006). В этом случае апоптозу предшествует обратимая задержка вступления клеток в митоз, причем митотические клетки, накапливающиеся после выхода из блока, часто имеют многополюсное веретено деления. В настоящее время факт формирования многополюсного веретена — то не многое, что известно о реорганизации системы микротрубочек в митотических клетках, наблюдаемых в период времени между интерфазной задержкой, вызванной воздействием индуцирующего апоптоз агента, и последующей апоптотической гибелью клеток. Полная реконструкция цепи событий, приводящих к индукции апоптоза, невозможна без данных о последовательности изменений в организации аномальных митозов, предшествующих точной гибели.

Таким образом, цель настоящей работы — выяснить, каким образом изменяется организация митотического аппарата клеток, делящихся в период времени между интерфазной задержкой, вызванной воздействием индуцирующего апоптоз агента, и последующей апоптотической гибелью клеток. Для этого в клетках СНО-К1, делящихся в разные сроки после обработки агентом, индуцирующим

апоптоз (этопозидом), мы изучили методом иммунофлуоресцентного окрашивания распределение α -тубулина и посттрансляционных модификаций α -тубулина в составе микротрубочек веретена. Кроме того, чтобы выяснить, какое количество митотических делений после выхода из интерфазного блока проходят клетки, изучаемые в разные сроки после добавления этопозиды, мы проанализировали закономерности разведения метки после насыщения клеточного аналога тимидина — 5-бром-2-дезоксимурином (BrdU).

Материал и методика

Культура клеток. Клетки СНО-К1 (АТСС) выращивали в среде F-12 с добавлением 10%-ной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. Смену среды роста производили каждый день. Для эксперимента клетки высевали на покрытые желатином стекла в 24-луночные планшеты (около 10^5 клеток на лунку). Через 2 сут к клеткам, растущим на стеклах, добавляли раствор этопозиды (Sigma, США) на диметилсульфоксиде (ДМСО; Serva, Германия) в концентрации 25 мкМ (Lock, Ross, 1990a), через 1 ч клетки отмывали и культивировали 2 сут в свежей среде роста.

Для определения митотического индекса клетки фиксировали холодным метанолом непосредственно перед добавлением агента, а также через 1, 2, 8, 14, 18, 24, 30 и 48 ч после добавления агента и окрашивали карболовым фуксином. Контролем служили клетки, обработанные ДМСО в концентрации 0.04 %, соответствующей рабочему раствору этопозиды.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки фиксировали непосредственно перед добавлением агента, а также через 14, 24 и 48 ч после добавления агента. Действие этопозиды было проанализировано в трех параллельных экспериментах.

Выявление апоптотических клеток методом TUNEL (TdT-mediated dUTP nick-end labeling). Чтобы визуализировать апоптотические клетки, концы фрагментированной ДНК метили нуклеотидами, связанными с флуоресцеином (Apoptosis Detection System; Promega, США), по методу, рекомендованному изготовителем. Препараты докрашивали флуоресцентным красителем ДНК DAPI (Sigma, США), заключали в Мовиол и просматривали в фотомикроскопе Opton III.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Клетки фиксировали 10 мин в смеси 4%-ного формальдегида и 1%-ного Тритона X-100, приготовленной на буфере, стабилизирующем микротрубочки (100 мМ PIPES, 1 мМ MgCl₂, 5 мМ EGTA, 33%-ный (в.в.) глицерол, pH 6.8). Клетки инкубировали с одним из следующих моноклональных антител: против α -тубулина (клон В-5-1-2; Sigma, США), ацетилированного α -тубулина (клон 6-11В-1; Sigma, США) или тирозинированного α -тубулина (клон TUB-1A2; Sigma, США). Моноклональные антитела визуализировали с помощью биотинилированных козьих антител к иммуноглобулинам мыши (Amersham, Великобритания) и авидина, конъюгированного с флуорохромом флуоресцеин изотиоцианатом (FITC; Sigma, США). Препараты докрашивали DAPI и заключали в Мовиол. Для исследования препаратов использовали фотомикроскоп Opton III. Полученные изображения обрабатывали в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc.) с использованием функции изменения контраста и резкости изображения.

Мечение митотических хромосом BrdU. Чтобы выяснить, какое количество митотических делений после выхода из интерфазного блока прошли клетки СНО-К1, изучаемые через 14, 24 и 48 ч после добавления этопозиды, мы проанализировали закономерности разведения метки после насыщения ДНК аналогом тимидина 5-бром-2-дезоксимурином (BrdU). Клетки, растущие на стеклах, инкубировали с BrdU (10 мкг/мл; Sigma, США) в течение 14 ч, превышая длительность клеточного цикла клеток СНО-К1 (Кириллова и др., 1989). Затем клетки отмывали в трех сменах среды без BrdU и обрабатывали этопозидом по описанной выше схеме.

Клетки фиксировали 30 мин в 70%-ном этаноле и последовательно обрабатывали в 1.5 М растворе HCl 20 мин при 4 °С, в дистиллированной воде 10 мин и в PBS, содержащем 0.5%-ный Твин 20. После инкубации с казеином (Sigma, США) клетки последовательно инкубировали с антителами против BrdU (клон SB18; Sanbio, Норвегия) и FITC-конъюгированными козьими антителами против IgG мыши. Препараты докрашивали DAPI, заключали в Мовиол и анализировали с помощью флуоресцентного фотомикроскопа Opton III. Полученные изображения обрабатывали в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc.), используя функции изменения контраста и резкости изображения.

Для того чтобы установить, проходят ли клетки СНО-К1 S-период спустя 1 сут после обработки этопозидом, клетки непрерывно инкубировали с BrdU в период с 24 до 48 ч после добавления агента, фиксировали, окрашивали антителами против BrdU и красителем DAPI, как описано выше.

Результаты

Пролиферативная активность и накопление апоптотических клеток в культуре, обработанной этопозидом. Клетки СНО-К1 после обработки этопозидом показали динамику изменения митотического индекса и числа апоптотических клеток, сходную с описанной ранее для клеток СНО (Lock, Ross, 1990a, 1990b). Митотический индекс падал почти в 10 раз в течение 1 ч и более чем в 20 раз в течение 2 ч после добавления этопозиды (рис. 1). Митотический индекс вновь возвращался к исходному уровню через 14 ч после добавления этопозиды (рис. 1). Число апоптотических клеток возрастало примерно в 25 раз через 48 ч после добавления этопозиды (рис. 1).

Анализируя препараты, окрашенные карболовым фуксином, мы не обнаружили по сравнению с контролем возрастания количества патологических митотических фигур в культурах, обработанных этопозидом, как это было описано при действии этопозиды на клетки СНО (Lock, Ross, 1990b). На протяжении всего эксперимента в подавляющем большинстве митотических клеток были видны стандартные по расположению хромосом митотические фигуры. Лишь редкие многополюсные мета-, ана- и телофазы (не более 6 % от числа всех митозов) были видны и в контроле, и в эксперименте. Следует отметить, что при действии этопозиды возрастала доля прометафазных клеток. Через 48 ч после добавления этопозиды такие клетки составляли более половины всех митотических клеток, тогда как в культуре, обработанной ДМСО, их количество составляло не более четверти от числа всех митозов. В большинстве таких клеток при действии этопозиды степень компактизации (спирализации) хромосом со-

ответствовала поздней прометафазе или метафазе, но было невозможно идентифицировать метафазную пластинку, поэтому в дальнейшем такие клетки мы будем называть прометафаза-подобными.

Иммунофлуоресцентное окрашивание митотического веретена. Мы изучили структуру митотического веретена в клетках контрольной культуры и в клетках, делящихся через 14, 24 и 48 ч после добавления этопозид, с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания, используя антитела против α -тубулина, тирозинированного (тир-тубулин) и ацетилированного (ацет-тубулин) α -тубулина.

В контрольной культуре в большинстве митотических клеток окрашивалось стандартное двухполюсное веретено деления при использовании антител как к α -тубулину, так и к модифицированному α -тубулину. Примерно в 5 % митотических клеток, находящихся на стадии метафазы или анафазы, окрашивалось трехполюсное веретено деления, что соответствовало данным, полученным при окрашивании карболовым фуксином. Тем не менее около четверти клеток на стадии профазы и прометафазы содержали три точки или более, которые, по-видимому, соответствуют центриолям (Lange, Gull, 1996), или три центра или более схождения микротрубочек.

В клетках, обработанных этопозидом, характер окрашивания митотического аппарата различался при использовании антител против α -тубулина, тир-тубулина или ацет-тубулина. Иммуноокрашивание для α -тубулина выявило существенное возрастание числа клеток с многополюсной организацией митотического аппарата в культурах, обработанных этопозидом, по сравнению с контролем. Более чем в половине клеток на стадии профазы антитела к α -тубулину окрашивали больше двух точек уже через 14 ч после обработки агентом, а через 48 ч таких клеток было большинство (рис. 2, а, а'), причем количество точек в отдельных клетках достигало 20 (рис. 2, б, б'). Примерно в $\frac{3}{4}$ прометафаза-подобных клеток через 14 ч после обработки этопозидом антитела окрашивали точки рядом с полюсами двухполюсного веретена (рис. 2, в, в'), а через 24 ч в популяции прометафаза-подобных клеток преобладали клетки с многополюсным веретеном (рис. 2, г, г'). Однако через 48 ч в большинстве прометафаза-подобных клеток были видны только множество слабоокрашенных точек и единичные микротрубочки и лишь в некоторых клетках окрашивалось митотическое веретено, как правило двухполюсное. В клетках на стадии метафазы через 14 ч после обработки этопозидом окрашивалось двухполюсное веретено деления, а через 24 и 48 ч после добавления агента примерно в половине клеток с метафазной конфигурацией хромосом антитела к α -тубулину окрашивали точки рядом с одним или с обоими полюсами двухполюсного веретена (рис. 2, д, д'). Через 48 ч после добавления агента в клетках на стадии метафазы резко ослабевала интенсивность окрашивания микротрубочек веретена (рис. 2, е, е'). В большинстве клеток на стадиях анафазы и телофазы на протяжении всего эксперимента окрашивалось двухполюсное веретено деления. В редких клетках на стадии анафазы через 24 или 48 ч после обработки этопозидом антитела окрашивали точки рядом с полюсами двухполюсного веретена (рис. 2, ж, ж'). Число клеток на стадии метафазы и анафазы с трехполюсной структурой веретена было примерно таким же, как в контрольной культуре.

Оказалось неожиданностью, что иммуноокрашивание для тир-тубулина выявило меньшее количество клеток с

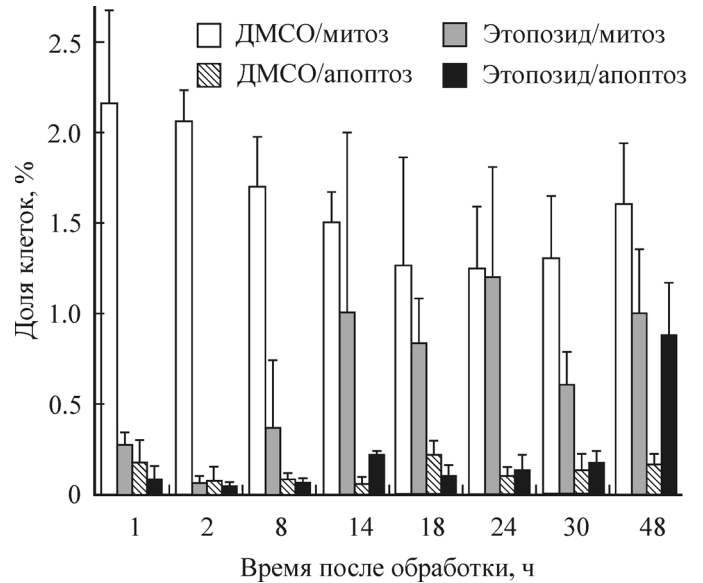


Рис. 1. Изменение митотического индекса (МИ) и апоптотического индекса (АИ) в культуре клеток CHO-K1 в течение 48 ч после обработки этопозидом (1 ч, 25 мкМ) или ДМСО (1 ч, 0.04 %).

МИ и АИ определяли как долю (в %) митотических и соответственно апоптотических клеток от наблюдаемых 2500 клеток при каждом сроке фиксации. Данные представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение по трем параллельным экспериментам.

многополюсной структурой веретена в культурах, обработанных этопозидом, по сравнению с иммуноокрашиванием для α -тубулина. Через 14 ч после добавления этопозида характер окрашивания клеток всех стадий митоза антителами против тир-тубулина не отличался от характера окрашивания клеток тех же стадий митоза в контрольной культуре. Только через 24 ч среди клеток на стадии профазы иммуноокрашивание выявило единичные клетки с более чем двумя центрами схождения микротрубочек. К 48 ч таких клеток было больше половины. Используя антитела для тир-тубулина, мы обнаружили стандартное двухполюсное веретено в половине прометафаза-подобных клеток через 24 ч после обработки этопозидом. Остальные прометафаза-подобные клетки были либо лишены окрашенного веретена, либо демонстрировали дополнительные центры схождения микротрубочек или окрашенные точки (в дополнение к двухполюсному веретену), такие же по морфологии, как при окрашивании ацет-тубулина. Даже через 48 ч в большинстве прометафаза-подобных клеток антитела к тир-тубулину окрашивали два центра схождения микротрубочек (рис. 2, з, з'). Редкие прометафаза-подобные клетки содержали множественные центры схождения микротрубочек (рис. 2, и, и'). Примерно в половине клеток на стадии метафазы через 24 ч после обработки этопозидом мы обнаружили ослабление окрашивания митотического веретена при использовании антител к тир-тубулину. Через 48 ч таких клеток было большинство (рис. 2, к, к'). В клетках на стадиях анафазы и телофазы было найдено двухполюсное веретено деления на протяжении всего эксперимента.

Иммуноокрашивание для ацет-тубулина после обработки этопозидом выявило намного больше клеток с многополюсной организацией митотического аппарата, чем иммуноокрашивание для α -тубулина. Мы не нашли ослабления окрашивания микротрубочек веретена в мета-

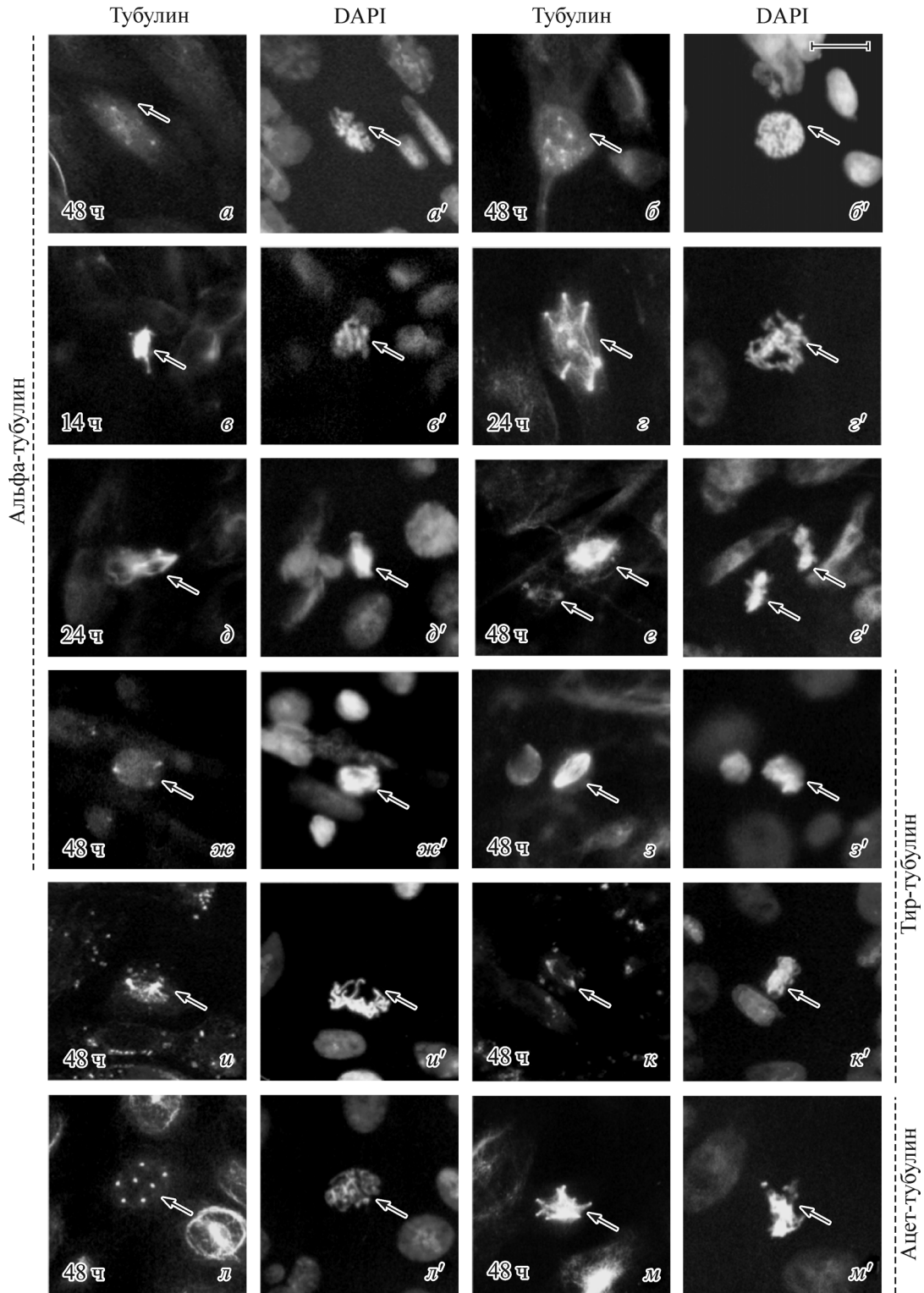


Рис. 2. Митотические клетки в культуре CHO-K1 через 14, 24 и 48 ч после обработки этопозидом (1 ч, 25 мкМ).

Иммунофлуоресцентное мечение антителами к α -тубулину (а—ж), тирозинированному α -тубулину (з—к) или ацетилированному α -тубулину (л, м) и окрашивание ядерным красителем DAPI (а'—м'). Клетки были фиксированы параформальдегидом. Стрелки указывают на митотические клетки. Масштабный отрезок — 20 мкм.

фазных клетках при использовании антител к ацет-тубулину, как это наблюдалось при использовании антител против α -тубулина или тир-тубулина. Через 14 ч после обработки этопозидом, так же как и при окрашивании антителами против α -тубулина, более половины профазных

клеток содержали больше двух окрашенных точек, а через 24 и 48 ч таких клеток было большинство (рис. 2, л, л'). Примерно в половине прометафаза-подобных клеток через 14 ч после обработки этопозидом окрашивалось двухполюсное веретено деления, а остальные клетки со-

держали либо дополнительные точки рядом с полюсами двухполюсного веретена, либо многополюсное веретено. Через 24 и 48 ч клетки с многополюсным веретеном составляли большинство в популяции прометафаза-подобных клеток (рис. 2, *м, м'*). В клетках на стадии метафазы через 14 ч после обработки этопозидом окрашивалось двухполюсное веретено деления. Около половины метафазных клеток, появляющихся через 24 и 48 ч после добавления агента, содержали дополнительные точки рядом с полюсами двухполюсного веретена. В большинстве клеток на стадиях анафазы и телофазы на протяжении всего эксперимента окрашивалось двухполюсное веретено деления. Редкие клетки на стадии анафазы через 24 и 48 ч после обработки этопозидом содержали дополнительные точки рядом с полюсами двухполюсного веретена.

Мечение митотических хромосом BrdU. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к тубулину показало, что структура митотического аппарата различается в клетках, делящихся через 14, 24 и 48 ч после обработки этопозидом. Чтобы выяснить, различаются ли эти клетки по количеству митотических делений, которые они прошли от момента выхода из интерфазной задержки, индуцированной этопозидом, мы проанализировали закономерности разведения метки после насыщения ДНК аналогом тимидина (BrdU) непосредственно перед добавлением этопозидом.

В культурах, фиксированных сразу после 14 ч насыщения BrdU, все найденные на препаратах митотические клетки оказывались мечеными, а среди интерфазных клеток немечеными оставались 1.5—2.0 %. Во всех митотических клетках картина окрашивания хромосом с помощью антител против BrdU совпадала с картиной окрашивания DAPI (рис. 3, *а, а'*).

В культурах, фиксированных через 14 ч после добавления этопозидом, все митозы были мечеными, характер окрашивания хромосом оставался таким же, как в контроле (рис. 3, *б, б'*). В культурах, фиксированных через 24 ч, мечеными по-прежнему оставались все делящиеся клетки, но около половины митозов демонстрировали все хромосомы полностью мечеными, а в остальных все хромосомы окрашивались частично (рис. 3, *в, в'*). Через 48 ч митозы с хромосомами, меченными полностью, были редкостью. В подавляющем большинстве делящихся клеток окрашивалась только часть хромосом (рис. 3, *г, г'*). Кроме того, встречались единичные полностью немеченные митотические клетки (рис. 3, *д, д'*).

Чтобы проверить, проходят ли клетки CHO-K1 S-период спустя 1 сут после обработки этопозидом, культуру инкубировали с BrdU в промежуток времени с 24 до 48 ч после добавления этопозидом, сразу после этого фиксировали и окрашивали антителами к BrdU. Немногим более половины делящихся клеток оставались неокрашенными, а в остальных митотических клетках хромосомы полностью метились BrdU (рис. 3, *е, е'*). Если клетки инкубировали с BrdU в промежуток времени между 14 и 48 ч после обработки этопозидом, после чего сразу фиксировали и окрашивали антителами к BrdU, доля меченых клеток среди всех митотических клеток не возрастала (данные не показаны).

Обсуждение

В последнее время накапливаются различные данные, указывающие на возможность вовлечения системы микротрубочек в процесс запуска апоптоза (Ireland, Pittman,

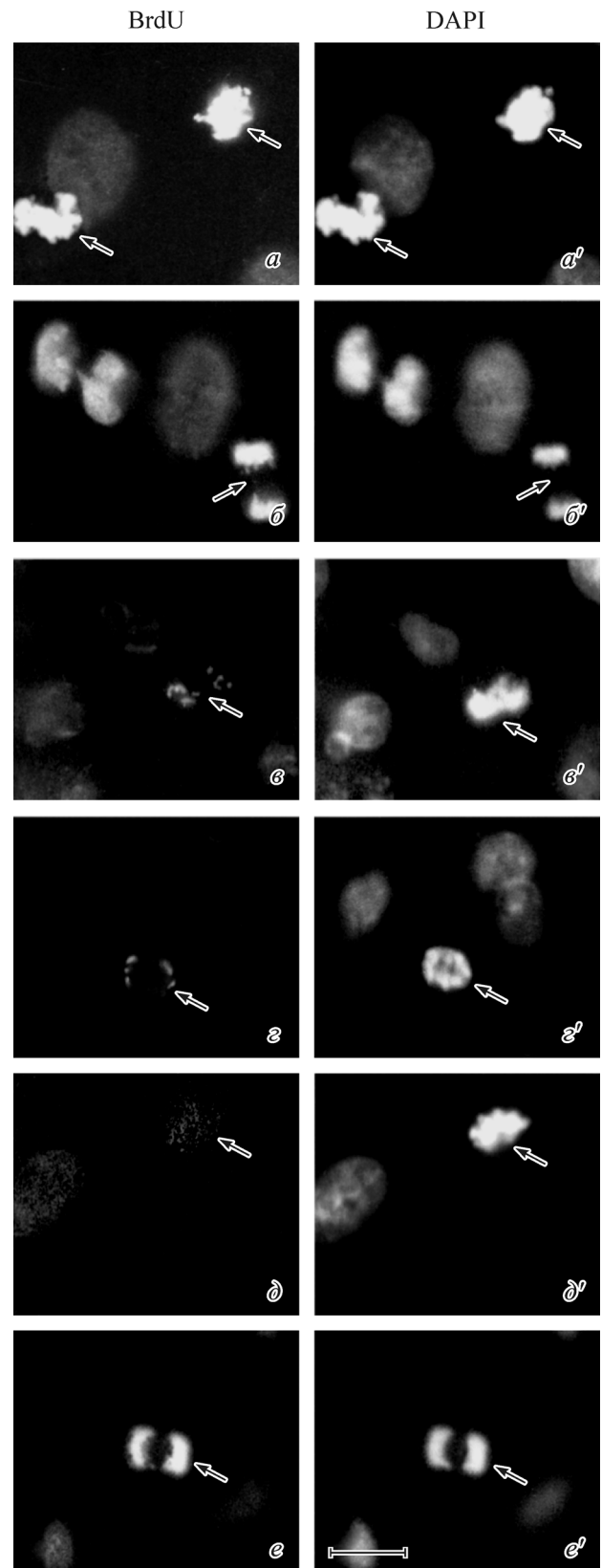


Рис. 3. Митотические клетки CHO-K1, обработанные этопозидом (1 ч, 25 мкМ).

Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к BrdU (*а—е*) и ядерным красителем DAPI (*а'—а'*). Клетки фиксировали сразу через 14 ч инкубации с BrdU (*а'—а'*), через 14 (*б, б'*), 24 (*в—в'*) и 48 (*г, г', д, д'*) ч после добавления этопозидом, а также после непрерывной инкубации с BrdU в период с 24 до 48 ч после обработки этопозидом (*е'—е'*). Стрелки указывают на митотические клетки. Масштабный отрезок — 20 мкм.

1995; Pittman et al., 1997; Srivastava et al., 1998; Abal et al., 2001; Porter, Lee, 2001; Кисурина-Евгеньева и др., 2006; Moss, Lane, 2006; Moss et al., 2006). В данной работе мы изучили систему микротрубочек митотического веретена в клетках СНО-К1, делящихся после обработки индуцирующим апоптоз агентом — этопозидом. Нами показано, что в клетках, делящихся в разное время после выхода из интерфазного блока, вызванного воздействием этопозидом, различается характер иммунофлуоресцентного окрашивания α -тубулина, ацетилированного и тирозинированного α -тубулина в составе микротрубочек веретена деления. Иммуноокрашивание для ацет-тубулина выявило одинаково хорошо окрашенное митотическое веретено на все изученные сроки. По сравнению с контролем иммуноокрашивание для α -тубулина и тир-тубулина, напротив, выявило снижение интенсивности окрашивания микротрубочек веретена в большинстве клеток, делящихся через 48 ч после добавления агента, хотя сразу после выхода из блока окрашивание не отличалось от окрашивания в клетках контрольной культуры. Есть два возможных объяснения этому факту. Во-первых, такое снижение интенсивности окрашивания для тир-тубулина в составе микротрубочек веретена может быть результатом работы фермента карбоксипептидазы, отщепляющей С-концевой тирозин преимущественно от полимеризованного тубулина. *In vivo* показано, что этот фермент способен работать на митотических микротрубочках, время полужизни которых, как считается, не превышает 3 мин (McNally, 1996; Zhai et al., 1996). Во-вторых, снижение интенсивности окрашивания как для тир-тубулина, так и для α -тубулина может происходить вследствие того, что изменяется их взаимодействие с какими-либо микротрубочкоассоциированными белками (MAPs). Известно, что С-концевой домен молекулы α -тубулина является сайтом взаимодействия для таких MAPs, как динеин и кинезин (Wang, Sheetz, 2000). Эти белки-моторы и другие MAPs принимают участие в организации и функционировании двухполюсного веретена деления (Heald, Walczak, 1999; Scholey et al., 2001; Gardner, Odde, 2006). Кроме того, предполагают, что детирозинирование С-конца α -тубулина влияет на связывание микротрубочек с кинезином и динеином.

Полученные нами данные не позволяют судить о том, являются ли различия характера иммунофлуоресцентного окрашивания тубулина в митотических клетках результатом того, что разные клетки СНО-К1 после обработки этопозидом могли пребывать в разном по длительности интерфазном блоке. Анализ митотических клеток после насыщения BrdU позволил предположить, что после выхода из интерфазной задержки за время, предшествующее накоплению в культуре апоптотических клеток (34 ч), некоторые клетки успевают пройти по крайней мере два апоптотических деления. В культуре клеток наблюдалось разведение метки вплоть до полного ее исчезновения. Другие же клетки продолжали все это время находиться в длительном интерфазном блоке, о чем свидетельствует наличие полностью меченных хромосом. Данные по мечению хромосом BrdU хорошо согласуются с нашими результатами по окрашиванию митотических клеток с помощью антител к тубулину. Через 48 ч после обработки этопозидом, когда большинство делящихся клеток содержит только частично меченные хромосомы, большинство клеток разных стадий митоза демонстрирует ослабление окрашивания микротрубочек веретена с помощью антител против α -тубулина и тирозинированного α -тубулина. Редкие митотические клетки через 48 ч после обработки

этопозидом содержат полностью меченные хромосомы; столь же редкие клетки демонстрируют митотический аппарат, не отличимый от контроля при окрашивании антителами против α -тубулина и его посттрансляционных модификаций. К сожалению, мы не можем прямо связать наблюдаемые отклонения в организации митотического веретена с процессом индукции апоптоза, так как нет литературных данных, с которыми можно было бы провести аналогию.

Представляет интерес тот факт, что в клетках, делящихся через 48 ч после обработки индуцирующим апоптоз агентом, при формировании многополюсного митотического веретена отдельные его части могут различаться по наличию антигенных детерминант, доступных для окрашивания с помощью антител. Об этом косвенно свидетельствует тот факт, что в отличие от иммуноокрашивания с помощью моноклональных антител к ацет-тубулину, демонстрирующего многополюсную конфигурацию митотического аппарата в большинстве клеток разных стадий митоза, использование антител к тир-тубулину выявляло двухполюсное веретено деления в большинстве митотических клеток.

Хотелось бы особо подчеркнуть, что, согласно современным представлениям, чаще всего апоптотическая фрагментация ДНК в клетках происходит в следующем после индукции апоптоза митотическом цикле (Demarcq et al., 1994; Sherwood et al., 1994; Pittman et al., 1997; Johnson et al., 1999; Sato, 2000; Abal et al., 2001; Castedo et al., 2004; Rello-Varona et al., 2006). Мы не знаем, на какой стадии клеточного цикла происходит запуск апоптоза, но наши данные впервые говорят о том, что один, а то и два митотических цикла могут отделять апоптотическую гибель клетки от индуцирующего ее воздействия. Анализ митотических клеток после насыщения BrdU непосредственно перед добавлением этопозидом позволил предположить, что после выхода из интерфазной задержки за время, предшествующее накоплению в культуре апоптотических клеток (34 ч), большинство делящихся клеток успевают пройти по крайней мере два митотических цикла. Действительно, эксперименты с мечением хромосом BrdU продемонстрировали явное разведение метки в большинстве митотических клеток, найденных через 48 ч после обработки этопозидом. При этом редкие митотические клетки все же оставались полностью меченными, свидетельствуя о том, что они чрезвычайно долго находились в интерфазном блоке (минимум 34 ч), прежде чем поделиться. В пользу этого говорит и тот факт, что в том случае, если мы насыщали клетки BrdU в период от 14 до 48 ч после обработки этопозидом, то в половине митотических клеток, фиксированных сразу после насыщения, хромосомы не содержали метки.

Таким образом, нами показано, что в клетках СНО-К1, делящихся после выхода из интерфазного блока, вызванного воздействием этопозидом, наблюдается ослабление иммуноокрашивания α -тубулина и тирозинированного α -тубулина, входящих в состав микротрубочек веретена деления. Отдельные части многополюсного митотического веретена могут различаться по наличию антигенных детерминант, доступных для антител против тир-тубулина. Данные нарушения усугубляются непосредственно перед тем, как в культуре возрастает количество клеток, подвергшихся апоптотической гибели. К этому времени клетки успевают пройти по меньшей мере два митотических цикла. Данные, полученные нами и авторами других работ, пока позволяют лишь косвенно связать

наблюдаемые отклонения в организации митотического аппарата клеток непосредственно с процессом индукции апоптоза. Для однозначного установления такой связи необходимы дальнейшие исследования.

Список литературы

- Кисурин-Евгеньева О. П., Брянцева С. А., Стул А. А., Онищенко Г. Е. 2006. Антигубулиновые агенты могут инициировать различные пути апоптоза. *Биофизика*. 51 : 875—879.
- Abal M., Souto A. A., Amat-Guerri F., Acuna A. U., Andreu J. M., Barasoain I. 2001. Centrosome and spindle pole microtubules are main targets of a fluorescent taxoid inducing cell death. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 49 : 1—15.
- Blank M., Shiloh Y. 2007. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle*. 6 : 686—695.
- Castedo M., Perfettini J. L., Roumier T., Andreau K., Melema R., Kroemer G. 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 23 : 2825—2837.
- Demarcq C., Bunch R. T., Creswell D., Eastman A. 1994. The role of cell progression in cisplatin-induced apoptosis in CHO cells. *Cell Growth Differ*. 5 : 983—993.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35 : 495—516.
- Heald R., Walczak C. E. 1999. Microtubule-based motor function in mitosis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 : 268—274.
- Gardner M. K., Odde D. J. 2006. Modeling of chromosome motility during mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18 : 639—647.
- Ireland C. M., Pittman S. M. 1995. Tubulin alterations in taxol-induced apoptosis parallel those observed with other drugs. *Biochem. Pharmacol.* 49 : 1491—1499.
- Johnson P. A., Clements P., Hudson K., Caldecott K. W. 1999. A mitotic spindle requirement for DNA damage-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 59 : 2696—2700.
- Lange B. M., Gull K. 1996. Structure and function of the centriole in animal cells: progress and questions. *Trends Cell Biol.* 6 : 348—352.
- Lock R. B., Ross W. E. 1990a. Inhibition of p34cdc2 kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G2 arrest in CHO cells. *Cancer Res.* 50 : 3761—3766.
- Lock R. B., Ross W. E. 1990b. Possible role for p34cdc2 kinase in etoposide-induced cell death of Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 50 : 3767—3771.
- McNally F. J. 1996. Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle. *Curr. Biol.* 8 : 23—29.
- Moss D. K., Betin V. M., Malesinski S. D., Lane J. D. 2006. A novel role for microtubules in apoptotic chromatin dynamics and cellular fragmentation. *J. Cell Sci.* 119 : 2362—2374.
- Moss D. K., Lane J. D. 2006. Microtubules: forgotten players in the apoptotic execution phase. *Trends Cell Biol.* 16 : 330—338.
- Pittman S., Geyp M., Fraser M., Ellem K., Peaston A., Ireland C. 1997. Multiple centrosomal microtubule organising centres and increased microtubule stability are early features of VP-16-induced apoptosis in CCRF-CEM cells. *Leuk. Res.* 21 : 491—499.
- Porter L. A., Lee J. M. 2001. Alpha-, beta-, and gamma-tubulin polymerization in response to DNA damage. *Exp. Cell Res.* 270 : 151—158.
- Rello-Varona S., Gámez A., Moreno V., Stockert J. C., Cristóbal J., Pacheco M., Cañete M., Juarranz A., Villanueva A. 2006. Metaphase arrest and cell death induced by etoposide on HeLa cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 : 2183—2195.
- Sato N., Mizumoto K., Nakamura M., Ueno H., Minamishima Y. A., Farber J. L., Tanaka M. 2000. A possible role for centrosome overduplication in radiation-induced cell death. *Oncogene*. 19 : 5281—5290.
- Scholey J. M., Rogers G. C., Sharp D. J. 2001. Mitosis, microtubules, and the matrix. *J. Cell Biol.* 154 : 261—266.
- Sherwood S. W., Sheridan J. P., Schimke R. T. 1994. Induction of apoptosis by the anti-tubulin drug colcemid: relationship of mitotic checkpoint control to the induction of apoptosis in HeLa S3 cells. *Exp. Cell Res.* 215 : 373—379.
- Srivastava R. K., Srivastava A. R., Korsmeyer S. J., Nesterova M., Cho-Chung Y. S., Longo D. L. 1998. Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 18 : 3509—3517.
- Wang Z., Sheetz M. P. 2000. The C-terminus of tubulin increases cytoplasmic dynein and kinesin processivity. *Biophys. J.* 78 : 1955—1964.
- Watanabe N., Yamaguchi T., Akimoto Y., Rattner J. B., Hirano H., Nakauchi H. 2000. Induction of M-phase arrest and apoptosis after HIV-1 Vpr expression through uncoupling of nuclear and centrosomal cycle in HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 258 : 261—269.
- Yih L. H., Tseng Y. Y., Wu Y. C., Lee T. C. 2006. Induction of centrosome amplification during arsenite-induced mitotic arrest in CGL-2 cells. *Cancer Res.* 66 : 2098—2106.
- Zhai Y., Kronebusch P. J., Simon P. M., Borisy G. G. 1996. Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *J. Cell Biol.* 135 : 201—214.

Поступила 20 III 2007

THE REORGANIZATION OF THE MITOTIC APPARATUS IN ETOPOSIDE-TREATED CHO-K1 CELLS PRECEDES ACCUMULATION OF THE APOPTOTIC CELLS

E. E. Balashova,¹ S. S. Ryaskina, T. M. Vinogradova, V. B. Bystrevskaya

Cardiology Research Center, Moscow; ¹ e-mail: balashlen@mail.ru

Etoposide (1 h, 25 μ M) causes interphase arrest in CHO-K1 after which cells resume mitotic division and die due to apoptosis after a certain time period. Accumulation of apoptotically dying cells in the culture follows a gradual increase in the number of multipolar mitoses. Our findings provide the first evidence that the pattern of immunostaining for α -tubulin, acetylated α -tubulin and tyrosinated α -tubulin in cells dividing at various periods after etoposide treatment. Moreover, some parts of the multipolar mitotic spindle differ in the presence of antigenic determinants accessible to anti-tyrosinated α -tubulin antibodies. It is noteworthy that these abnormalities are aggravated just before the increase in the number of apoptotically died cells. Our findings also suggest that some cells pass through at least two mitotic cycles prior to a sharp increase in the number of apoptotically died cells in the cell culture.

Key words: etoposide, apoptosis, mitosis, tubulin.