

ОРГАНИЗАЦИЯ ПОЛЮСОВ МИТОТИЧЕСКОГО АППАРАТА В КЛЕТКАХ СНО-K1, ОБРАБОТАННЫХ ЭТОПОЗИДОМ

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

Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий, Москва;

¹ электронный адрес: balashlen@mail.ru

Изучена организация полюсов митотического веретена в клетках СНО-K1, делящихся в разные сроки после воздействия этопозидов (1 ч, 25 мкМ), а именно: 1) распределение γ -тубулина в митотических клетках методом иммунофлуоресцентного окрашивания, 2) уровень посттрансляционных модификаций α -тубулина в составе микротрубочек митотического аппарата методом иммуноэлектронной микроскопии, 3) ультраструктура полюсов митотического аппарата методом стандартной электронной микроскопии. Через 48 ч после воздействия этопозидов наблюдали нарушения ультраструктуры полюсов митотического веретена в клетках как с двухполюсным, так и с многополюсным митотическим аппаратом. Повышенное число центриолей неравномерно распределилось между полюсами митотического веретена. Некоторые центриоли не принимали явного участия в организации митотического веретена и различались по числу отходящих от них микротрубочек, большинство центриолей было лишено фибриллярного гало. Иммуноэлектронная микроскопия показала разницу в окрашивании полюсов многополюсного веретена деления в пределах одной клетки с помощью антител к тирозинированному α -тубулину, в то время как окрашивание клеток антителами к ацетилированному α -тубулину такой разницы не выявило. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к γ -тубулину также указывало на различия в организации полюсов одного и того же веретена деления. Наши данные впервые показали, что характер иммуноокрашивания и ультраструктура полюсов митотического веретена могут различаться в клетках, делящихся в разные сроки после воздействия этопозидов.

Ключевые слова: митоз, тубулин, этопозид.

Основная задача митоза — равномерное распределение генетического материала между дочерними клетками. С этой целью формируется митотический аппарат, состоящий из центросомы и митотических микротрубочек, который служит для расхождения материнских хромосом в двух противоположных направлениях (Gadde, Heald, 2004).

При различных патологических процессах, таких как воспаление, вирусная инфекция и опухолевый рост, наблюдаются нарушения митотического аппарата, которые приводят к генетической нестабильности и анеуплоидии клеток (Illidge et al., 2000; Duensing, Münger, 2002; Bharadwaj, Yu, 2004; Pan et al., 2004). Большинство клеток, полученных от такого aberrантного митоза, должно элиминироваться апоптозом. Действительно, запуск программы апоптоза в культивируемых клетках связан с накоплением в культуре аномальных (многополюсных) митозов (Johnson et al., 1999; Watanabe et al., 2000; Abal et al., 2001; Rello-Varona et al., 2006; Yih et al., 2006; Dodson et al., 2007). Однако последовательность событий, связывающих нарушения митотического аппарата и последующую апоптотическую гибель клеток, пока до конца не выяснена (для обзора см.: Castedo et al., 2004; Mansilla et al., 2006); и недостающие данные, судя по всему, следует искать именно в структурных аномалиях митотического аппарата клеток, делящихся в период, предшествующий апоптозу.

Одной из распространенных аномалий митотического аппарата клеток является нарушение в строении и функции центросомы (Онищенко, 1993; Wang, 2004). Известно, что накоплению многополюсных митозов при запуске апоптоза в культивируемых клетках предшествует ее амплификация (Pittman et al., 1997; Yih et al., 2006; Dodson et al., 2007). Наблюдается увеличение размера центросомы, количества белков перицентриолярного матрикса, таких как перичентрин и γ -тубулин, и увеличение числа центросом в клетке (Watanabe et al., 2000; Yin et al., 2006). Существуют также косвенные данные, позволяющие предполагать ультраструктурные изменения в организации полюсов митотического веретена, вызванные агентом, индуцирующим апоптоз. С одной стороны, рентгеновское облучение клеток млекопитающих приводит к задержке вступления в митоз и провоцирует возрастание числа многополюсных митозов (Levis, Marin, 1963). При этом увеличение числа полюсов сопровождается нарушением внутренней организации центросомы, а именно распадом диплосом и обособлением фибриллярного материала от центриолей (Sato et al., 1983). С другой стороны, появление многополюсных митозов и сверхдубликация центросомы после γ -облучения предшествуют апоптотической гибели клеток остеосаркомы (Sato et al., 2000). Однако вопрос о том, какие именно нарушения в организации полюсов митотического веретена предшествуют апоптотической гибели клеток, остается открытым.

Ранее нами было показано (Балашова и др., 2007), что обработка этопозидом (ингибитором топоизомеразы II) вызывает в клетках китайского хомячка СНО-К1 апоптотическую гибель, которой предшествует постепенное нарастание числа многополюсных митозов. В клетках, делящихся в разные сроки после воздействия агента, различается характер иммунофлуоресцентного окрашивания микротрубочек веретена антителами против α -тубулина и его посттрансляционных модификаций. Более того, отдельные части многополюсного митотического веретена могут различаться по наличию антигенных детерминант, доступных для антител против посттрансляционных модификаций α -тубулина. Последний факт позволяет предполагать различия во вкладе отдельных полюсов в организацию митотического веретена клеток, делящихся в период, предшествующий апоптотической гибели, установить которые можно с помощью дополнительного ультраструктурного анализа.

Таким образом, цель настоящей работы — выяснить, какие структурные изменения наблюдаются в организации полюсов митотического аппарата клеток, делящихся в период, предшествующий апоптозу. Для этого мы изучили в клетках СНО-К1, делящихся в разные сроки после воздействия индуцирующего апоптоз агента — этопозидом: 1) распределение γ -тубулина методом иммунофлуоресцентного окрашивания, 2) ультраструктуру полюсов митотического аппарата методом стандартной электронной микроскопии и 3) уровень посттрансляционных модификаций α -тубулина в составе микротрубочек митотического аппарата методом иммуноэлектронной микроскопии.

Материал и методика

Клетки. 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 этопозидом (Sigma, США) на диметилсульфоксиде (ДМСО; Serva, Германия) в концентрации 25 мкМ (Lock, Ross, 1990), через 1 ч клетки отмывали и культивировали 2 сут в свежей среде роста.

Для иммунофлуоресцентной и электронной микроскопии клетки фиксировали непосредственно перед добавлением агента, а также через 14, 24 и 48 ч после его добавления. Контролем служили клетки, обработанные ДМСО в концентрации 0.04 %, соответствующей рабочей концентрации этопозидом.

Действие этопозидом было проанализировано в трех параллельных экспериментах.

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 $MgCl_2$, 5 мМ EGTA, 33%-ный (в.в.) глицерол, pH 6.8). Клетки инкубировали с моноклональными антителами против γ -тубулина (GTU-88; Sigma, США). Моноклональные антитела визуализировали с помощью биотинилированных козьих антител к иммуноглобулинам мыши (Amersham, Великобритания) и авидина, конъюгированного с флуорохромом флуоресцин изотиоци-

анатом (FITC; Sigma, США). Препараты докрашивали флуоресцентным красителем ДНК DAPI (Sigma, США) и заключали в Мовиол. Для исследования препаратов использовали фотомикроскоп Opton III. Полученные изображения обрабатывали в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc.), используя функции изменения контраста и резкости изображения.

Часть препаратов через 48 ч после обработки этопозидом фиксировали холодным метанолом и последовательно обрабатывали антителами против γ -тубулина, козьими антителами против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с флуорохромом FITC и DAPI. Далее с ними поступали так же, как описано выше.

Стандартная электронная микроскопия. Стандартная электронная микроскопия была проведена, как описано ранее (Bystrevskaya et al., 1997). Все исследованные митотические клетки были изучены на серийных ультратонких срезах золотисто-желтого цвета. После окрашивания 0.2%-ным водным раствором цитрата свинца срезы исследовали с помощью электронного микроскопа JEM-100 CX. Полученные изображения обрабатывали в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc.), используя функции изменения контраста и резкости изображения.

Чтобы оценить число микротрубочек в периферической области, был проведен подсчет числа микротрубочек, пересекающих окружность радиусом в 0.4 мкм с центром в середине цилиндра материнской или одиночной центриоли.

Иммуноэлектронная микроскопия. Чтобы сравнить уровень посттрансляционных модификаций α -тубулина в отдельных участках митотического веретена клеток, обработанных этопозидом, использовали собственную модификацию (Vinogradova et al., 2005) известного метода иммунопероксидазной микроскопии (Calargo-Gillan et al., 1983; Bre et al., 1987). Клетки, растущие на стеклах, фиксировали 0.25%-ным глутаральдегидом на PIPES-буфере (80 мМ K-PIPES, 5 мМ EGTA, 1 мМ $MgCl_2$, pH 6.8), обрабатывали 0.5%-ным Тритоном X-100 на том же буфере, последовательно отмывали PIPES-буфером и PBS, помещали в раствор борогидрида натрия (1 мг/мл) на PBS для удаления свободных альдегидных групп. Препараты инкубировали с моноклональными антителами против ацетилизированного (клон 6-11B-1; Sigma, США) или тиронизированного (клон TUB-1A2; Sigma, США) γ -тубулина. Моноклональные антитела визуализировали с помощью биотинилированных козьих антител к иммуноглобулинам мыши (Amersham, Великобритания), комплекса авидин—биотин, конъюгированного с пероксидазой хрена (ABC-kit, Vector, США), и раствора диаминобензидина (Sigma, США) на Tris-HCl (0.06 М, pH 7.6). Препараты дофиксировали 1%-ным глутаральдегидом и 1%-ным OsO_4 (оба на PBS) и заключали в Эпон 812.

С помощью фазово-контрастной микроскопии выбирали клетки разных стадий митоза в контрольной культуре СНО-К1 и в культуре, фиксированной через 48 ч после добавления этопозидом, срезы готовили с помощью алмазного ножа на ультратоме LKB-5. Все исследованные клетки были изучены на серийных ультратонких срезах светло-серого цвета. Срезы исследовали с помощью электронного микроскопа JEM-100 CX. Полученные изображения обрабатывали в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc.). Использовали функции изменения контраста и резкости изображения.

Результаты

Характер иммунофлуоресцентного окрашивания γ -тубулина. Чтобы охарактеризовать особенности распределения γ -тубулина в клетках, делящихся через 14, 24 и 48 ч после воздействия этопозидом, было выполнено иммунофлуоресцентное окрашивание клеток СНО-К1, фиксированных параформальдегидом или метанолом.

В контрольной культуре в большинстве митотических клеток всех стадий антитела окрашивали по две точки, что соответствовало описанным ранее данным для клеток млекопитающих (Joshi et al., 1992). Окрашивание не зависело от способа фиксации. Около четверти клеток на стадии профазы и прометафазы и редкие клетки на стадии метафазы и анафазы содержали три точки или более.

При анализе препаратов, фиксированных параформальдегидом через 14 ч после обработки этопозидом, в большинстве клеток на стадиях профазы, прометафазы и метафазы, так же как и в контроле, было обнаружено по две точки. Клетки с тремя точками и более были редкостью. Вызывает интерес тот факт, что через 24 и 48 ч после добавления этопозидом наблюдалось ослабление интенсивности иммуноокрашивания γ -тубулина. На этот срок подавляющее большинство профазных (рис. 1, а, а'), прометафазных (рис. 1, б, б') и метафазных (рис. 1, в, в') клеток было неокрашенным, лишь в редких клетках можно было увидеть от 2 до 6 точек, разбросанных по цитоплазме. В анафазных и телофазных клетках окрашивание

ослабевало по сравнению с контрольной культурой уже через 14 ч после обработки этопозидом. Но если через 14 и 24 ч еще встречались клетки с двумя слабо окрашенными точками, то через 48 ч в анафазных и телофазных клетках окрашивание точек отсутствовало.

При метанольной фиксации были изучены клетки через 48 ч после обработки этопозидом, которые показали такую же интенсивность иммуноокрашивания γ -тубулина, как и клетки контрольной культуры, но отличались от них по количеству окрашенных точек (рис. 1, з, з' — профаза, д, д' — прометафаза, е, е' — метафаза). В большинстве клеток, находящихся на стадиях профазы и прометафазы, и примерно в половине клеток на стадии метафазы окрашивалось множество точек (до 20), разбросанных по цитоплазме (профаза и прометафаза) либо собранных в два скопления (прометафаза и метафаза). В клетках на стадии метафазы скопления находились по разные стороны от метафазной пластинки. В большинстве клеток на стадиях анафазы и телофазы окрашивалось 2, изредка 3 точки или два скопления точек по разные стороны от хромосом.

Ультраструктура митотических клеток. Чтобы выяснить, приводит ли обработка этопозидом к изменению организации полюсов митотического веретена, был проведен сравнительный электронно-микроскопический анализ митотических клеток в контрольной культуре СНО-К1 и в культурах, фиксированных через 14 и 48 ч после обработки этопозидом.

В контрольной культуре было изучено 12 клеток (3 профазы, 3 прометафазы, 3 метафазы, 2 анафазы и 1 тело-

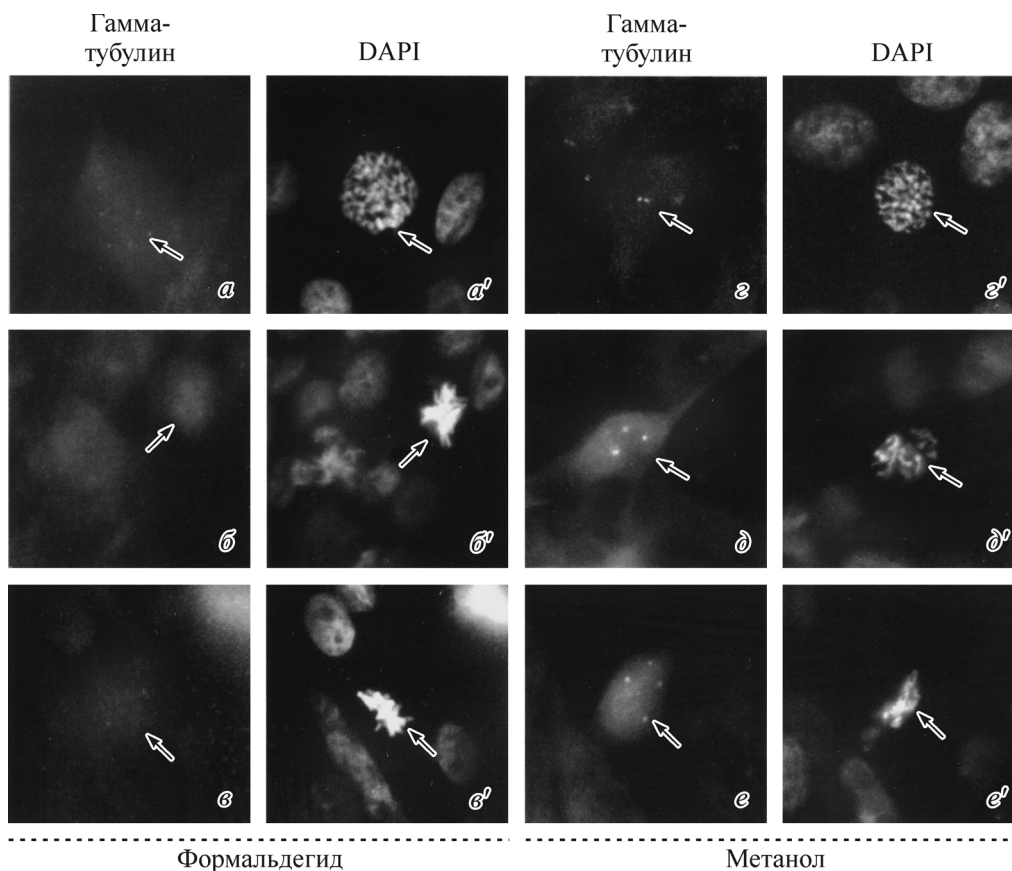


Рис. 1. Митотические клетки в культуре СНО-К1 через 48 ч после обработки этопозидом (1 ч, 25 мкМ). Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к γ -тубулину (а—е), а затем ядерным красителем DAPI (а'—е').

Клетки фиксированы формальдегидом (а—в) или метанолом (з—е). Стрелки указывают на митотические клетки. Масштабный отрезок — 20 мкм.

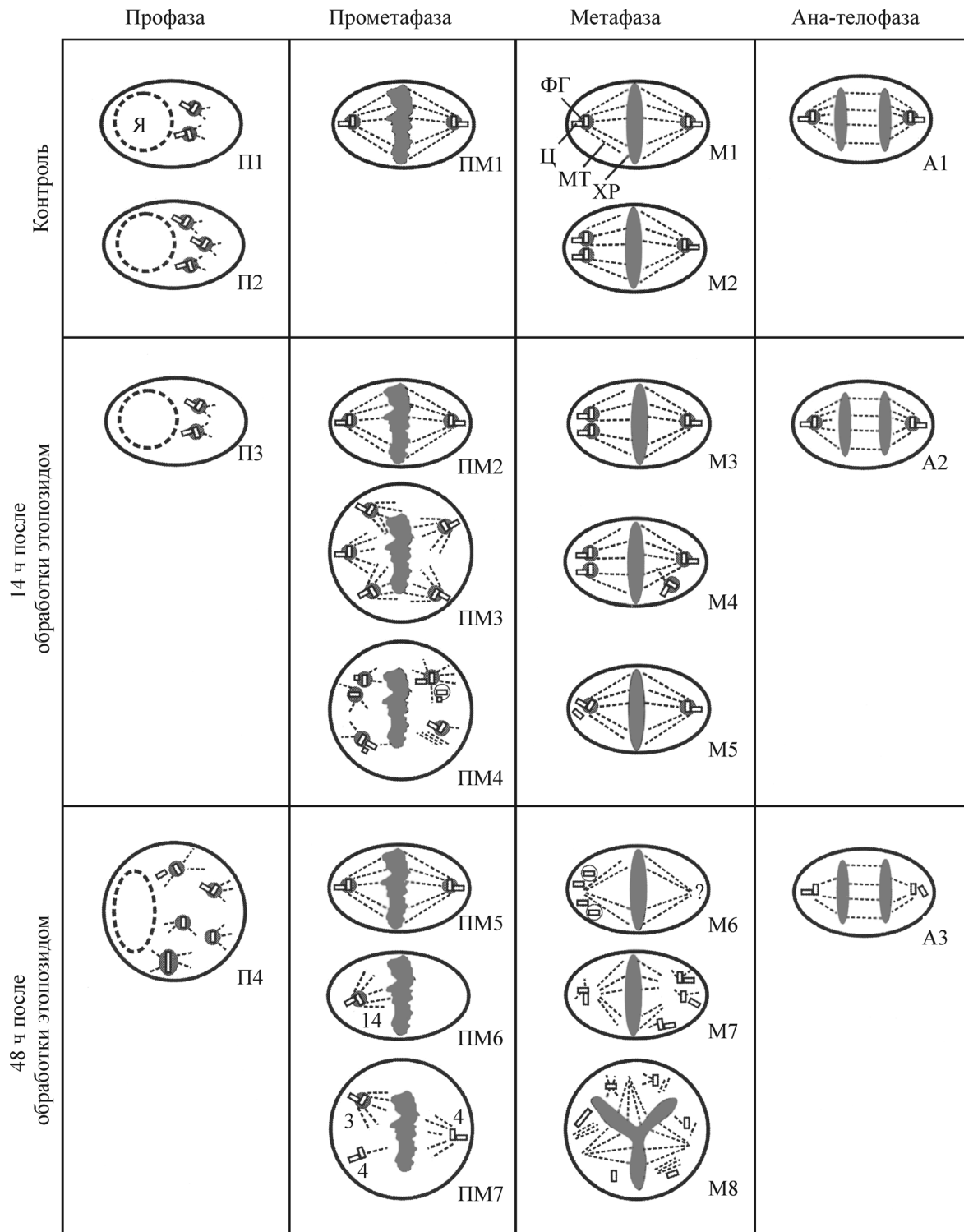


Рис. 2. Схема организации митотического аппарата клеток CHO-K1 в контрольной культуре, через 14 и 48 ч после обработки этопозидом (1 ч, 25 мкМ).

П — профаза, ПМ — прометафаза, М — метафаза, А — ана-телофаза, МТ — микротрубочки, ФГ — фибриллярное гало, ХР — хромосомы, Ц — центриоль, Я — ядро.

фаза). Во всех клетках в геометрическом центре схождения митотических микротрубочек располагалась пара центриолей, образующих диплосому. В 10 клетках, среди которых были клетки всех стадий митоза, было найдено по две диплосомы (рис. 2, П1, ПМ1, М1, А1). В одной

профазной и в одной метафазной клетках было найдено больше двух диплосом (рис. 2, П2, М2).

В культуре, фиксированной через 14 ч после обработки этопозидом, было изучено 10 клеток (2 профазы, 3 прометафазы, 3 метафазы, 1 анафаза и 1 телофаза). Про-

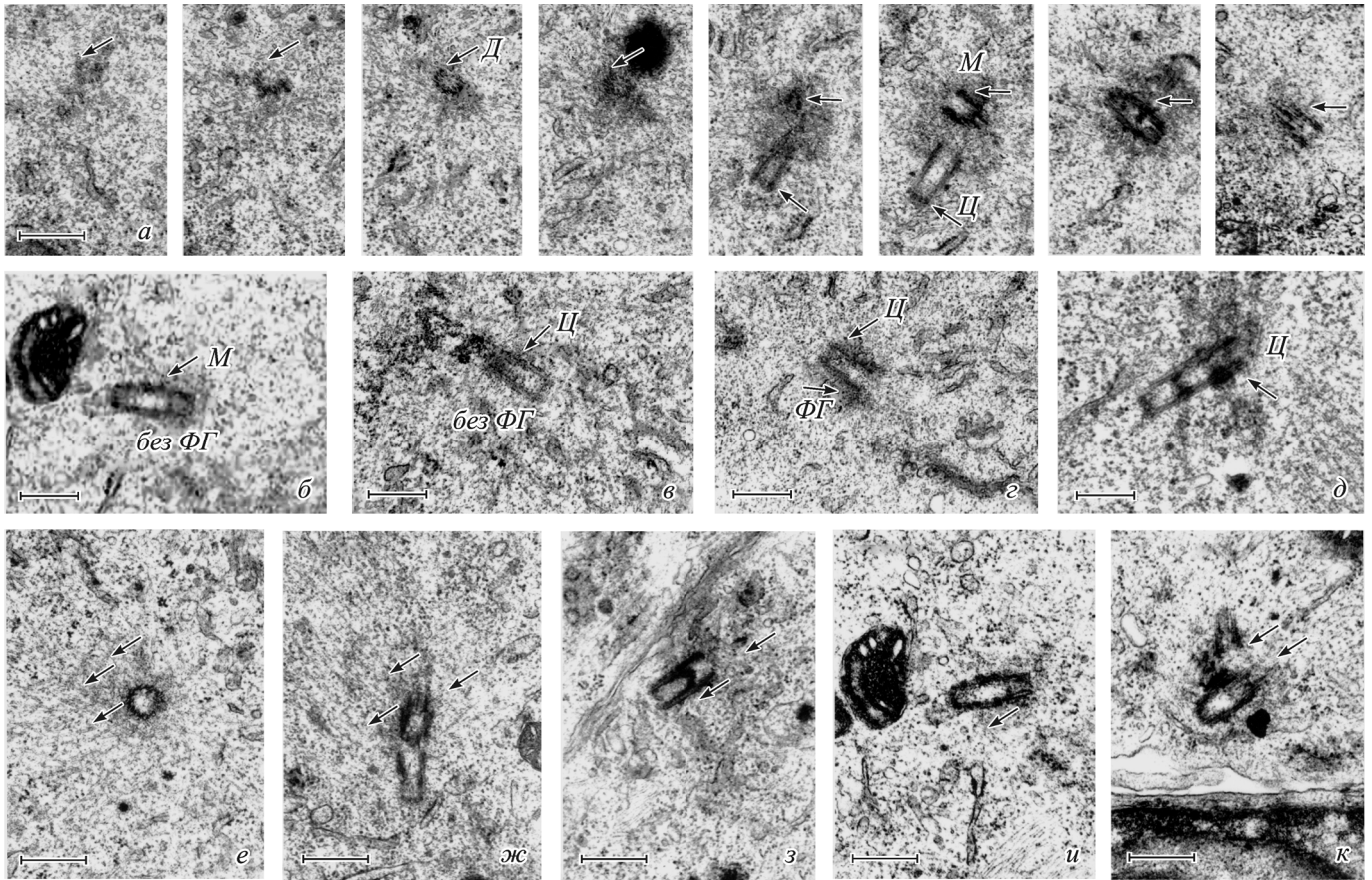


Рис. 3. Ультраструктурная организация полюсов митотического веретена в клетках CHO-K1 контрольной культуры или делящихся через 14 (а) и 48 (б) ч после обработки этопозидом (25 мкМ, 1 ч).

а — диплосома прометафазной клетки, в которой дочерняя центриоль короче материнской, и одиночная центриоль; б — материнская центриоль без фибриллярного гало в прометафазной клетке; в — одиночная центриоль без фибриллярного гало в метафазной клетке; г — одиночная центриоль, окруженная фибриллярным гало, в метафазной клетке; д — центриоль аномальной длины в метафазной клетке. Подсчет числа микротрубочек (МТ) в перичентриольной области (см. раздел «Материал и методика»): е — 50—60 МТ вокруг материнской центриоли в полюсе контрольной метафазы; ж — 13—20 и з — 50—60 МТ вокруг материнской центриоли в полюсе прометафазы через 48 ч после добавления этопозиды; и — 5—7 и к — 13—14 МТ вокруг диплосомы метафазной клетки через 48 ч после добавления этопозиды. Д — диплосома, М — материнская центриоль, Ц — одиночная центриоль, ФГ — фибриллярное гало. Масштабный отрезок — 0,4 мкм.

фазные, ана- и телофазные клетки не отличались по структуре полюсов от контрольных клеток тех же стадий митоза (рис. 2, П3, А2). По одной клетке на стадиях прометафазы и метафазы не отличались по структуре полюсов от контрольных клеток (рис. 2, ПМ2, М3), тогда как остальные 4 клетки отличались от контроля либо по числу диплосом (рис. 2, ПМ3, М4), либо по структуре центриолей (рис. 2, ПМ4, М5). В таких клетках помимо стандартных диплосом были найдены одиночные центриоли (рис. 2, ПМ4, М5; 3, а) и необычные диплосомы, в которых дочерняя центриоль была короче материнской (рис. 2, ПМ4; 3, а).

В культуре, фиксированной через 48 ч после обработки этопозидом, было изучено 9 клеток (1 профазы, 3 прометафазы, 3 метафазы и 2 телофазы). В двух клетках (прометафаза и телофаза) структура полюсов была такой же, как и в контрольных клетках тех же стадий митоза (рис. 2, ПМ5, А3). Одна из прометафазных клеток отличалась от контроля только по числу найденных в ней диплосом (рис. 2, ПМ6). Все остальные изученные клетки отличались от контроля по числу центриолей, а также по их структуре и микроокружению (рис. 2, П4, ПМ7, М6—8). В этих клетках были найдены диплосомы, в которых ма-

теринская центриоль была лишена фибриллярного гало (рис. 2, ПМ7, М7; 3, б), а также одиночные центриоли, окруженные или не окруженные фибриллярным гало (рис. 3, в, г), длина которых варьировала от 0,4 до 0,8 мкм (рис. 2, П4, М6, М8; 3, д). Вызывает интерес тот факт, что клетки, делящиеся через 48 ч после обработки этопозидом, отличались от контроля по частоте встречаемости микротрубочек в перичентриольном районе (см. таблицу). В 6 прометафазных и метафазных клетках контрольной культуры было найдено примерно по 60 микротрубочек вокруг материнской центриоли в каждом из полюсов митотического веретена (изучено 12 полюсов; рис. 3, е). В 4 из 6 прометафазных и метафазных клеток, изученных через 48 ч после обработки этопозидом, все или часть полюсов отличались по числу микротрубочек от контроля, причем в 3 клетках полюса одной клетки отличались по числу микротрубочек друг от друга. Так, в прометафазной клетке, содержащей 11 полюсов (рис. 2, ПМ7), в 7 полюсах вокруг материнской центриоли было найдено от 50 до 60 микротрубочек (рис. 3, ж), а в остальных 4 полюсах — от 13 до 20 микротрубочек (рис. 3, з). Во всех изученных метафазных клетках (рис. 2, М6—8) число перичентриольных микротрубочек в каждом полюсе верете-

Оценка числа микротрубочек (МТ) в перичентриолярной области прометафазных и метафазных клеток СНО-К1, делящихся в контрольной культуре и через 48 ч после обработки этопозидом

Вариант опыта	Доля centrosom с указанным количеством перичентриолярных МТ (% от общего числа изученных centrosom)				
	$n < 10$	$n = 10-20$	$n = 20-30$	$n = 30-50$	$n > 50$
Контроль (6 клеток, 12 centrosom)	0	0	0	0	100
Через 48 ч (6 клеток, 38 centrosom)	13.2	18.3	8	0	60.5

Примечание. n соответствует числу МТ, пересекающих окружность радиусом в 0.4 мкм с центром в середине цилиндра материнской или одиночной центриоли.

на варьировало от 6 до 30. В одной из метафазных клеток с 4 диплосомами (рис. 2, М7) вокруг одной из диплосом было найдено 7 микротрубочек (рис. 3, *и*), тогда как число микротрубочек вокруг материнской центриоли каждой из 3 остальных диплосом колебалось от 13 до 14 (рис. 3, *к*). В другой метафазной клетке, содержащей 6 одиночных центриолей (рис. 2, М8), число микротрубочек вокруг каждой из 3 центриолей колебалось от 25 до 30, а вокруг 3 остальных центриолей — от 6 до 13.

Электронно-микроскопическое распределение тирозинированного и ацетилированного α -тубулина. С помощью иммунопероксидазного окрашивания сравнили на электронно-микроскопическом уровне содержание тирозинированного α -тубулина (тир-тубулина) и ацетилированного α -тубулина (ацет-тубулина) в центриолярных и перичентриолярных микротрубочках делящихся клеток культуры СНО-К1, не обработанной этопозидом (контроль), и через 48 ч после обработки агентом.

С использованием окрашивания антителами к тир-тубулину в контрольной культуре было изучено 8 митотических клеток (1 профаза, 2 прометафазы, 3 метафазы, 1 анафаза и 1 телофаза). В клетках всех стадий митоза микротрубочки как перичентриолярной области, так и центриолярного цилиндра были интенсивно окрашены (рис. 4, *а* — профаза, *б* — анафаза). Отдельные полюса веретена не отличались друг от друга по интенсивности окрашивания (рис. 4, *в*, *г* — прометафаза).

С использованием антител к тир-тубулину в культуре, обработанной этопозидом, было изучено 7 митотических клеток (2 профазы, 3 прометафазы, 1 метафаза и 1 телофаза). Интенсивность окрашивания перичентриолярных и центриолярных микротрубочек различалась в клетках разных стадий митоза. В профазных клетках микротрубочки были окрашены намного слабее, чем в профазных клетках контрольной культуры (рис. 4, ср. *а* и *д*). Интенсивность окрашивания микротрубочек в прометафазных клетках варьировала в широких пределах (рис. 4, *е*, *ж*). Однако в метафазных (рис. 4, *з*) и телофазных (рис. 4, *и*) клетках перичентриолярные и центриолярные микротрубочки были окрашены так же слабо, как в профазе. Интенсивность окрашивания перичентриолярных микротрубочек в разных полюсах одного веретена различалась в 2 из 3 изученных прометафазных клеток (рис. 4, *к*, *л*). В этих прометафазных клетках было найдено по 4 диплосомы. В каждой клетке микротрубочки, окружающие материнскую центриоль одной из диплосом, были окрашены интенсивнее (рис. 4, *к*), чем микротрубочки, окружающие материнские центриоли остальных 3 диплосом (рис. 4, *л*). Центриоли в пределах одной клетки всегда

были окрашены одинаково. Одиночных центриолей в исследованных клетках не обнаружено.

С использованием окрашивания антителами к ацет-тубулину в контрольной культуре было изучено 9 клеток (1 профаза, 3 прометафазы, 2 метафазы, 2 анафазы и 1 телофаза). Клетки разных стадий митоза различались по интенсивности окрашивания перичентриолярных микротрубочек и микротрубочек центриолярного цилиндра, которая постепенно нарастала от профазы к мета-анафазе (рис. 4, *м* — профаза, *н* — прометафаза, *о* — метафаза, *п* — анафаза). Интенсивность окрашивания центриолярных микротрубочек, как правило, соответствовала интенсивности окрашивания микротрубочек, расположенных вокруг этой центриоли.

С использованием антител к ацет-тубулину в культуре, обработанной этопозидом, было изучено 14 клеток (4 профазы, 4 прометафазы, 4 метафазы, 1 анафаза и 1 телофаза). Интенсивность окрашивания микротрубочек центриолярного цилиндра не изменялась в зависимости от стадии митоза. Интенсивность окрашивания перичентриолярных микротрубочек нарастала от профазы к анафазе (рис. 4, *р* — профаза, *х* — анафаза), так же как и в клетках контрольной культуры. Но на стадиях метафазы и прометафазы были обнаружены как клетки со слабо окрашенными перичентриолярными микротрубочками (рис. 4, *с* — прометафаза, *у* — метафаза), так и с сильно окрашенными (рис. 4, *т* — прометафаза, *ф* — метафаза). Интенсивность окрашивания перичентриолярных и центриолярных микротрубочек в разных полюсах одного веретена была одинаковой (рис. 4, *ц*, *ч*). Обнаруженные одиночные центриоли не отличались по интенсивности окрашивания антителами к ацет-тубулину от центриолей, образующих диплосому в тех же клетках.

Обсуждение

Ранее нами было показано (Балашова и др., 2007), что обработка этопозидом вызывает в клетках СНО-К1 апоптотическую гибель, которой предшествует постепенное нарастание числа аномальных (многополюсных) митозов. В настоящей работе мы исследовали вызванные этопозидом нарушения полюсов аномального митотического аппарата. Электронно-микроскопический анализ клеток показал, что в контрольной культуре наблюдаемая нами картина иммунопероксидазного окрашивания полюсов соответствует существующим представлениям о наличии тирозинированного α -тубулина в микротрубочках веретена деления вблизи centrosомы на всех стадиях митоза (Gundersen, Bulinski, 1986; Wolf, Spanel-Borowski, 1995).

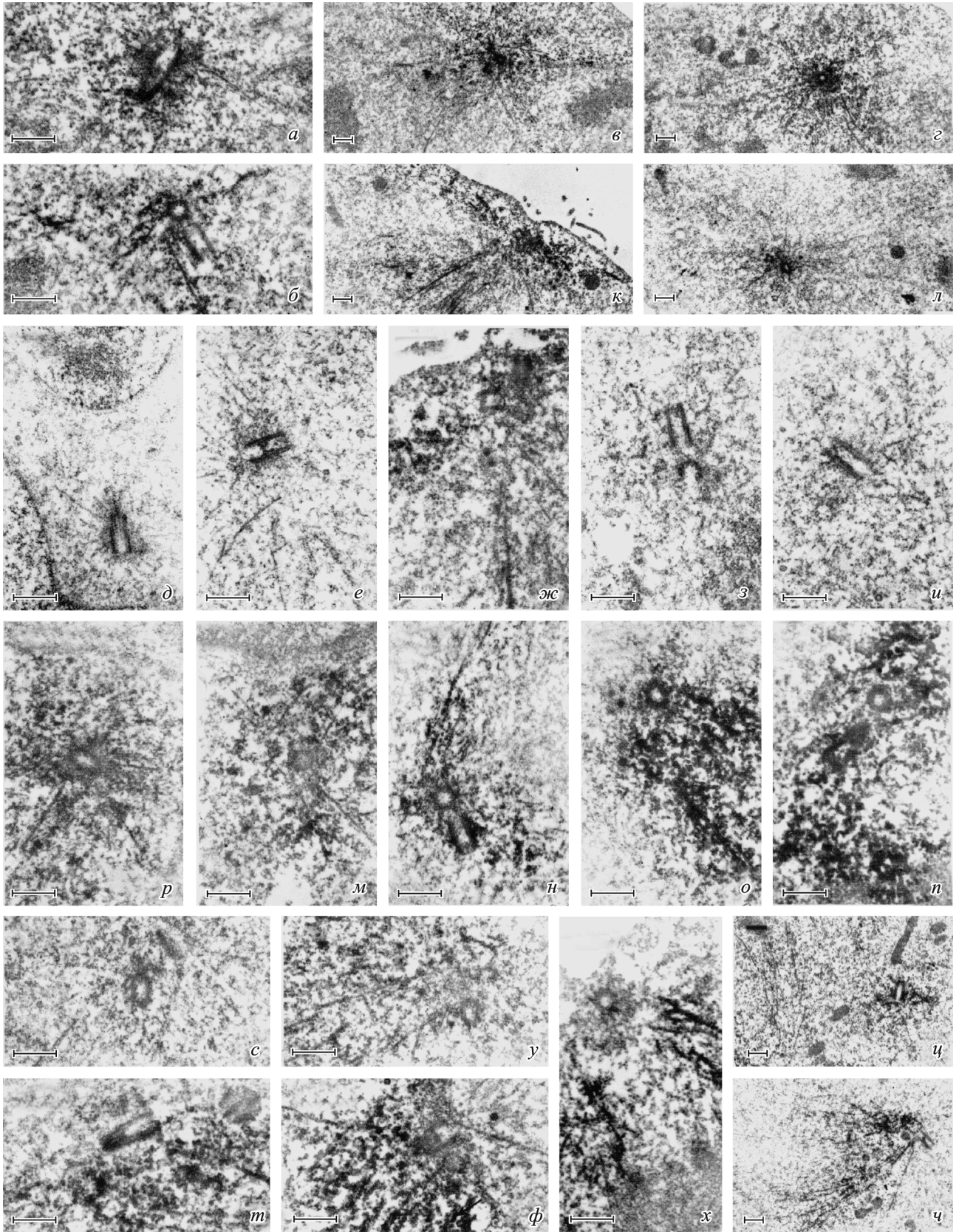


Рис. 4. Электронно-микроскопическое распределение тирозинированного (тир) и ацелированного (ацет) α -тубулина в микротрубочках перичентриолярной области и центриолей в митотических клетках контрольной культуры СНО-К1 и через 48 ч после обработки этопозидом (25 мкМ, 1 ч).

Тир-тубулин, контроль: *а* — профаза; *б* — анафаза; *в*, *г* — прометафаза; через 48 ч: *д* — профаза; *е*, *ж*, *к*, *л* — прометафаза; *з* — метафаза; *и* — телофаза. Ацет-тубулин, контроль: *м* — профаза, *н* — прометафаза, *о* — метафаза, *п* — анафаза; через 48 ч: *р* — профаза; *с*, *т*, *у*, *ч* — прометафаза; *у*, *ф* — метафаза; *х* — анафаза. Масштабный отрезок — 0,4 мкм.

Выявленное нами ослабление окрашивания тир-тубулина в митотическом аппарате клеток в момент, предшествующий их апоптотической гибели, является фактом новым. Более того, установлено, что в некоторых клетках на стадии прометафазы ослабление окрашивания микротрубочек наблюдается только у части полюсов многополюсного веретена. Исходя из того, что процесс синтеза и последующего созревания микротрубочек сопровождается снижением в них уровня тирозинированного тубулина (Schulze et al., 1987; Wehland, Weber, 1987), зафиксированное нами явление указывает на существующую аномалию в формировании микротрубочек веретена деления в клетках в предапоптотический период. Возможная причина подобного явления может лежать в работе специфичных ферментов, участвующих в модифицировании α -тубулина, а именно в активации карбоксипептидазы (ТСП), приводящей к дегидрогенированию α -тубулина и(или) инактивации лигазы (ТТЛ) — фермента, осуществляющего обратную ТСП-реакцию. Потеря активности фермента ТТЛ, приводящая к ослаблению иммунофлуоресцентного окрашивания, ранее была описана для опухолевых клеток (Lafanecchere et al., 1998). Однако для установления связи между усилением дегидрогенирования фибрилл микротрубочек в предапоптотический период и их конкретной причиной необходимы дальнейшие исследования.

На различия в организации полюсов одного митотического веретена указывают также данные иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью антител к γ -тубулину. Через 48 ч после обработки этопозидом окрашивание клеток, фиксированных параформальдегидом, выявило лишь незначительное увеличение числа клеток с множественными полюсами. Среди подавляющего большинства клеток с трудно различимым окрашиванием полюсов встречались клетки, в которых отчетливо определялись две точки и более. Однако в случае метанольной фиксации наблюдалось ожидаемое увеличение числа клеток с множественными полюсами. Таким образом, после фиксации параформальдегидом различалась доступность антигенных детерминант для антител. Аналогичное наблюдение было сделано Ватанобе и соавторами (Watanabe et al., 2000) при индукции апоптоза в клетках HeLa с помощью вирусного белка Vpr (HIV-1) и Абал и соавторами (Abal et al., 2001) при индукции апоптоза в ряде клеточных линий с помощью препарата — аналога таксола. Формировались многополюсные митотические фигуры с окрашиванием антителами к γ -тубулину только двух полюсов. Комаровой и соавторами (Komarova et al., 1997) также было показано, что только два полюса веретена деления окрашиваются антителами к γ -тубулину в трехполюсных митозах, возникающих спонтанно в культурах клеток млекопитающих. Возможно, речь идет о двух популяциях γ -тубулина, предположительно содержащихся в центросоме (Khodjakov, Rieder, 1999; Schiebel, 2000; Wiese, Zheng, 2006) и различающихся стабильностью и ассоциацией с центриолю или перичентриольным матриксом (Khodjakov, Rieder, 1999). Подобный факт существования гетерогенности популяции γ -тубулина получил еще одно подтверждение в нашей работе.

При электронно-микроскопическом анализе показано, что в клетках СНО-К1, делящихся после интерфазного блока, вызванного обработкой этопозидом, наблюдаются нарушения в ультраструктуре полюсов как двухполюсного, так и многополюсного митотических аппаратов. Нарушения носят нарастающий характер к моменту начала апоптотической гибели клеток в культуре. Увеличение

числа центриолей не зависит от числа полюсов веретена деления. В многополюсных митотических аппаратах центриоли неравномерно распределяются между полюсами, которые могут совсем не содержать или содержать несколько одиночных центриолей или диплосом. Кроме того, некоторые центриоли могут не принимать явного участия в организации митотического веретена и отличаться по числу отходящих от них микротрубочек как от центриолей в клетках контрольной культуры, так и между собой в пределах одной клетки. Большинство центриолей было лишено фибриллярного гало. Наши данные хорошо согласуются с более ранними наблюдениями, указывающими на то, что задержка G_2 , вызванная длительным действием этопозидом (около 50 ч) на клетки СНО (Balczonek et al., 1995), или блок G_2 после действия облучения на клетки HeLa (Watanabe et al., 2000) не приводит к аномальной сверхдубликации центросомы. Остается предположить, что нарушение внутренней структуры центросомы и формирование многополюсного веретена, характерное для клеток, делящихся через 48 ч после обработки этопозидом, скорее, отражают какие-то этапы в процессе запуска апоптоза. Подобные нарушения структуры митотической центросомы характерны для опухолевых клеток (Lingle et al., 1998) и рассматриваются как механизм повышения уровня анеуплоидии в ходе опухолевой трансформации (Brinkley, Goepfert, 1998; Lingle et al., 1998; Brinkley, 2001; Wang et al., 2004; Saunders, 2005).

Вызывает интерес следующий факт. Иммунофлуоресцентное окрашивание (Балашова и др., 2007) и электронно-микроскопический анализ клеток СНО-К1 через 48 ч после обработки этопозидом выявили большое количество многополюсных митотических фигур с повышенным содержанием центриолей в клетках на стадиях профазы, прометафазы и метафазы, но не на стадиях анафазы и телофазы. Вероятно, дополнительные полюса либо разрушаются перед началом анафазы, либо сливаются, формируя двухполюсное веретено деления. Аналогичный процесс был описан в делящихся клетках нейробластомы, в которых на стадии прометафазы каждого деления формировалось многополюсное веретено, а перед началом анафазы оно становилось двухполюсным (Ring et al., 1982). В последнее время подобная модель предлагается для объяснения контроля центросомной амплификации, имеющей место при опухолевой трансформации (Brinkley, 2001; Quintyne et al., 2005).

Таким образом, наши результаты показали отклонения в организации полюсов митотического аппарата клеток СНО-К1, делящихся в период, который предшествует апоптозу, вызванному обработкой этопозидом. Нарушения носят нарастающий характер к моменту начала апоптотической гибели клеток в культуре. Дальнейшие исследования смогут соотнести установленные нами и авторами других работ отклонения в организации полюсов митотического аппарата непосредственно с процессом апоптотической гибели клетки.

Список литературы

- Балашова Е. Е., Ряскина С. С., Виноградова Т. М., Быстревская В. Б. 2008. Реорганизация митотического аппарата в клетках СНО-К1, обработанных этопозидом, предшествует апоптотической гибели. Цитология. 50 (5) : 413—419.
- Онищенко Г. Е. 1993. Центриольный и центросомный циклы при дифференцировке и патологии. М.: Наука. 255 с.

- 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.
- Balczonek R., Bao L., Zimmer W. E., Brown K., Zinkowski R. P., Brinkley B. R. 1995. Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested CHO cells. *J. Cell Biol.* 130 : 105—115.
- Bharadwaj R., Yu H. 2004. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene*. 23 : 2016—2027.
- Bre M.-H., Kreis T. E., Karsenti E. 1987. Control of microtubules nucleation and stability in MDCK cells: the occurrence of noncentrosomal, stable detyrosinated microtubules. *J. Cell Biol.* 105 : 1283—1296.
- Brinkley B. R. 2001. Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol.* 11 : 18—21.
- Brinkley B. R., Goepfert T. M. 1998. Supernumerary centrosomes and cancer: Bovert's hypothesis resurrected. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 41 : 281—288.
- Bystrevskaya V. B., Lobova T. V., Smirnov V. N., Makarova N. E., Kushch A. A. 1997. Centrosome injury in cells infected with HCMV. *J. Struct. Biol.* 120 : 52—60.
- Calarco-Gillan P. D., Siebert M. C., Hubble R., Mitchison T., Kirschner M. 1983. Centrosome development in early mouse embryos as defined by an autoantibody against pericentriolar material. *Cell*. 35 : 621—629.
- Castedo M., Perfettini J. L., Roumier T., Andreau K., Medema R., Kroemer G. 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 23 : 2825—2837.
- Dodson H., Wheatley S. P., Morrison C. G. 2007. Involvement of centrosome amplification in radiation-induced mitotic catastrophe. *Cell Cycle*. 6 : 364—370.
- Duensing S., Münger K. 2002. Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene*. 21 : 6241—6248.
- Gadde S., Heald R. 2004. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr. Biol.* 14 : R797—R805.
- Gundersen G. G., Bulinski J. C. 1984. Distinct population of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently *in vivo*. *Cell*. 38 : 779—789.
- Illidge T. M., Cragg M. S., Fringes B., Olive P., Erenpreisa J. A. 2000. Polyploid giant cells provide a survival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage. *Cell Biol. Int.* 24 : 621—633.
- Johnson P. A., Clement P., Hudson K., Caldecott K. W. 1999. A mitotic spindle requirement for DNA damage-induced apoptosis in CHO cells. *Cancer Res.* 59 : 2696—2700.
- Joshi H. C., Palacios M. J., McNamara L., Cleveland D. W. 1992. γ -tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature*. 356 : 80—83.
- Khodjakov A., Rieder C. L. 1999. The sudden recruitment of γ -tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *J. Cell Biol.* 146 : 585—596.
- Komarova Yu. A., Ryabov E. V., Alieva I. B., Uzbekov R. E., Uzbekova S. V., Vorobjev I. A. 1997. Polyclonal antibodies against human gamma-tubulin stain centrioles in mammalian cells from different tissues. *Membr. Cell Biol.* 10 : 503—513.
- Lafanechere L., Courtoy-Cahen C., Kawakami T., Jacrot M., Rudiger M., Wehland J., Job D., Margolis R. L. 1998. Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J. Cell Sci.* 111 : 171—181.
- Levis A. G., Marin G. 1963. Induction of multipolar spindle by X-radiation in mammalian cells *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 31 : 448—451.
- Lingle W. L., Lutz W. H., Ingle J. N., Maihle N. J., Salisbury J. L. 1998. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implication for genomic stability and cell polarity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 95 : 2950—2955.
- Lock R. B., Ross W. E. 1990. Inhibition of p34cdc2 kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G2 arrest in CHO cells. *Cancer Res.* 50 : 3761—3766.
- Mansilla S., Bataller M., Portugal J. 2006. Mitotic catastrophe as a consequence of chemotherapy. *Anticancer Agents Med. Chem.* 6 : 589—602.
- Pan H., Zhou F., Gao S. J. 2004. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induction of chromosome instability in primary human endothelial cells. *Cancer Res.* 64 : 4064—4068.
- Pittman S., Geyp M., Fraser M., Ellem K., Peaston A., Ireland C. 1997. Multiple centrosomal microtubule-organizing centers and increased microtubule stability are early features of VP-16-induced apoptosis in CCRF-CEM cells. *Leuk. Res.* 21 : 491—499.
- Quintyne N. J., Reing J. E., Hoffelder D. R., Gollin S. M., Saunders W. S. 2005. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science*. 307 : 127—129.
- 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.
- Ring D., Hubble R., Kirschner M. 1982. Mitosis in a cell with multiple centrioles. *J. Cell Biol.* 94 : 549—556.
- Sato Ch., Kuriyama R., Nishizawa K. 1983. Microtubule-organizing centres abnormal in number, structure and nucleating activity in X-irradiation mammalian cells. *J. Cell Biol.* 96 : 776—782.
- Sato N., Mizumoto K., Nakamura M., Tanaka M. 2000. Radiation-induced centrosome overduplication and multiple mitotic spindles in human tumor cells. *Exp. Cell Res.* 255 : 321—326.
- Saunders W. 2005. Centrosomal amplification and spindle multipolarity in cancer cells. *Semin Cancer Biol.* 15 : 25—32.
- Schiebel E. 2000. γ -Tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 : 113—118.
- Schulze E., Asai D. J., Bulinski J. C., Kirschner M. 1987. Posttranslational modification and microtubule stability. *J. Cell Biol.* 105 : 2167—2177.
- Vinogradova T. M., Balashova E. E., Smirnov N. V., Bystrevskaya V. B. 2005. Detection of the centriole tyrosinated or acet-tubulin changes in endothelial cells treated with thrombin using microscopic immunocytochemistry. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 62 : 1—12.
- Wang Q., Hirohashi Y., Furuuchi K., Zhao H., Liu Q., Zhang H., Murali R., Berezov A., Du X., Li B., Greene M. I. 2004. The centrosome in normal and transformed cells. *DNA Cell Biol.* 23 : 475—489.
- 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.
- Wehland J., Weber K. 1987. Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J. Cell Sci.* 88 : 185—203.
- Wiese C., Zheng Y. 2006. Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J. Cell Sci.* 119 : 4143—4153.
- Wolf K. W., Spaniel-Borowski K. 1995. Acetylation of α -tubulin in different bovine cell types: implications for microtubule dynamics in interphase and mitosis. *Cell Biol. Int.* 19 : 43—52.
- 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.

THE ORGANIZATION OF THE MITOTIC APPARATUS POLES IN ETOPOSIDE-TREATED CHO-K1 CELLS

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

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

In this study, we have examined the organization of the mitotic spindle poles in CHO-K1 cells dividing after treatment with the etoposide (1 h, 25 μ M). We studied at various periods after the treatment: 1) the distribution of γ -tubulin in mitotic cells by immunofluorescent staining; 2) the level of posttranslational modification of α -tubulin in the spindle microtubules by immunoelectron microscopy; 3) the ultrastructure of the mitotic apparatus poles by standard electron microscopy. In 48 h after the addition of the agent we identified considerable changes in the ultrastructure of poles in etoposide-treated CHO-K1 cells with bipolar and multipolar spindles. The number of centrioles increased. The centrioles were unevenly distributed among the poles, and some centrioles were not explicitly involved in the organization of mitotic spindle, furthermore they can differ in the number of outgrowing microtubules. Most centrioles were without fibrillar halo. In 48 h after the addition of etoposide, electron microscopy of cells after immunoperoxidase staining with antibodies to acetylated and tyrosinated α -tubulin has shown that different poles of a multipolar spindle within the same cell are stained differently for tyr-tubulin but not for acet-tubulin. Immunofluorescence staining for γ -tubulin also points to different organization of poles in the same spindle. Our findings provide the first evidence that the pattern of immunostaining and the ultrastructure of mitotic apparatus poles differ in the cells dividing at various periods after etoposide treatment.

Key words: mitosis, tubulin, etoposide.
