

## ИЗМЕНЕНИЕ ХАРАКТЕРА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛИРОВАННОГО И ТИРОЗИНИРОВАННОГО $\alpha$ -ТУБУЛИНА В СОСТАВЕ ЦЕНТРИОЛЕЙ В ХОДЕ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА КЛЕТОК 3Т3 И SV40-3Т3

© Е. Е. Балашова,<sup>1</sup> П. Г. Лохов,<sup>2</sup> В. Б. Быстревская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий и <sup>2</sup> ГУ НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН, Москва;

<sup>1</sup> электронный адрес: balashlen@mail.ru

Проведен сравнительный электронно-микроскопический анализ характера иммунопероксидазного окрашивания центриольных и цитоплазматических микротрубочек с помощью антител против ацетилованного и тирозинированного  $\alpha$ -тубулина на протяжении клеточного цикла диплоидных мышечных клеток Valb 3Т3 (клон А31) и вирустрансформированных гетероплоидных клеток SV40-3Т3. Показано, что характер иммунопероксидазного окрашивания центриолей антителами как к ацет-, так и к тир-тубулину закономерно изменяется в ходе клеточного цикла контрольной клеточной линии 3Т3 (А31) в отличие от туморогенной клеточной линии SV40-3Т3. Резкое изменение характера окрашивания центриолей наблюдается в те периоды клеточного цикла, когда белковая организация centrosомы претерпевает изменения при переходе из интерфазы в митоз и обратно в связи с перестройкой системы микротрубочек. Установлено, что высокий уровень окрашивания центриолей антителами к тир-тубулину наблюдается на всех стадиях клеточного цикла, за исключением периода подготовки к митозу, в то время как высокий уровень интенсивности окрашивания антителами к ацет-тубулину наблюдается на всех стадиях клеточного цикла, за исключением периода завершения митоза.

Ключевые слова: митоз, тубулин, центриоль.

Центриоль является обязательным компонентом митотической centrosомы во всех соматических тканях млекопитающих (Vorobjev, Chentsov, 1982; Andersen, 1999b; Marshall, 2007). Тем не менее на сегодняшний день нет единой точки зрения относительно биологического смысла присутствия центриоли в полюсе митотического веретена. Накапливающиеся данные указывают на то, что не центриольный цилиндр как таковой, а белки, формирующие перичентриольный матрикс, такие как  $\gamma$ -тубулин, центрин и перичентрин, непосредственно обеспечивают процесс нуклеации цитоплазматических микротрубочек (Joshi et al., 1992; Dichtenberg et al., 1998; Andersen, 1999a; Ou et al., 2004). Предполагают, что в ходе митоза роль центриольного цилиндра состоит в поддержании упорядоченной организации перичентриольных белков (Marshall, Rosenbaum, 1999; Ou et al., 2004). Эти предположения основываются на том факте, что экспериментальное разрушение центриолей в животной клетке хотя и не прекращает прохождение митоза, но приводит к разнообразным аномалиям в распределении centrosомного материала и организации митотического веретена (Bobinac et al., 1998a). Таким образом, некое специальное взаимодействие центриоли с белками перичентриольного облака, по-видимому, является важной частью системы регуляции митоза (Онищенко, 1993), однако то, какой молекулярный механизм лежит в основе такого взаимодействия, все еще неизвестно.

К настоящему времени накоплено много данных, показывающих, что белковый состав перичентриольного

матрикса закономерно изменяется при вступлении клетки в митоз, на разных его стадиях и при выходе из него (Зиновкина, Надеждина, 1996; Andersen, 1999b; Krämer et al., 2004). К тому же белки, являющиеся постоянным компонентом centrosомы и непосредственно участвующие в нуклеации микротрубочек (МТ), также образуют вокруг центриолей чрезвычайно лабильный каркас, структура и мощность которого подвержены регулярным изменениям в ходе клеточного деления (Doxey et al., 1994, 2005; Dichtenberg et al., 1998; Schnackenberg, Palazzo, 1999; Azimzadeh, Bornens, 2007). В итоге сложилось убеждение, что центриоль остается совершенно неизменной в ходе клеточного цикла, когда вокруг нее и непосредственно в связи с центриольным цилиндром происходят перестройки структуры и функции перичентриольного материала.

С точки зрения вопроса о возможном взаимодействии центриоли с окружающими ее белками было бы интересно выяснить, изменяется ли характер посттрансляционных модификаций тубулина в составе МТ центриольного цилиндра в ходе клеточного цикла — модификаций, которые затрагивают СООН-конец  $\alpha$ -тубулина, который, как известно, принимает непосредственное участие во взаимодействии цитоплазматических МТ с различными ассоциированными с ними белками (Rosenbaum, 2000). Имеющиеся данные показывают, что центриоль подвергается по крайней мере трем типам таких посттрансляционных модификаций — ацетилрованию, детирозинированию и полиглутаминированию  $\alpha$ -тубулина (Bre et al., 1987; Piperno et al., 1987; Bobinac et al., 1998b). Однако

уровень детализации окрашивания в этих исследованиях был невысоким и не позволил провести сравнительную оценку характера распределения модифицированного тубулина в составе центриольных МТ на разных стадиях клеточного цикла, и тем более митоза.

Вместе с тем показано, что инактивация одного из ферментов, обеспечивающих посттрансляционную модификацию тубулина, а именно тир-лигазы (Lafanechere et al., 1998), сопровождается опухолевой прогрессией, а наблюдающееся в результате этого накопление модифицированного тубулина в составе митотических МТ может лежать в основе нарушений митоза опухолевых клеток. До настоящего времени не проводилось сравнительного изучения характера распределения модифицированного тубулина в составе центриольных МТ в нормальных и опухолевых клетках. Таким образом, было бы актуальным выяснить, изменяется ли уровень как тирозинирования, так и ацетилирования центриольных МТ в клетках, подвергшихся опухолевой трансформации.

Таким образом, цель настоящей работы — выяснить, изменяется ли уровень ацетилирования и тирозинирования центриольных МТ в ходе митотического цикла нормальных и трансформированных клеток. Для этого мы провели сравнительный электронно-микроскопический анализ характера иммунопероксидазного окрашивания как центриольных, так и цитоплазматических МТ на протяжении клеточного цикла диплоидных мышинных клеток Balb 3Т3 (клон А31) и вирустрасформированных гетероплоидных клеток SV40-3Т3, способных формировать опухоль при введении мышам (Stephenson et al., 1973; Smith et al., 1976; Gluck et al., 1993).

## Материал и методика

Культура клеток. Клетки Balb/c 3Т3 (клон А31) и SV40-3Т3 (АТСС) выращивали в среде DMEM с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота. Клеточные культуры наращивали на протяжении 5 (для клеток 3Т3) или 2 (для клеток SV40-3Т3) пассажей и замораживали. Для каждого эксперимента размораживали новую ампулу с клетками. Через 1—2 пассажа после размораживания клетки высевали на покрытые желатиной стекла в 24-луночные планшеты. Для получения экспоненциально растущей культуры клетки 3Т3 и SV40-3Т3 высевали в количестве около  $2,5 \cdot 10^3$  клеток в каждую лунку (в 1 мл культуральной среды). Фиксировали клетки через 36 ч. Для получения покоящейся популяции (Tucker et al., 1979) клетки 3Т3 рассеивали по  $10 \cdot 10^3$ — $20 \cdot 10^3$  клеток в каждую лунку (в 1 мл культуральной среды) и через 18—24 ч после посева производили смену среды на DMEM с 1%-ной сывороткой. Через 48 ч после смены среды клетки фиксировали.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Окрашивание проводили по стандартной методике. Клетки фиксировали 10 мин в смеси 4%-ного формальдегида и 1%-ного Тритона X-100, приготовленной на буфере, стабилизирующем МТ (100 мМ PIPES, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ EGTA, 33%-ный глицерин, pH 6.8). Клетки инкубировали с моноклональными антителами против  $\gamma$ -тубулина (GTU-88; Sigma, США). Моноклональные антитела визуализировали с помощью биотинилированных козьих антител к иммуноглобулинам мыши (Amersham, Великобритания) и авидина, конъюгированного с флуорохромом флуоресцинизоцианатом (FITC; Sigma, США). Препараты

докрашивали флуоресцентным красителем ДНК DAPI (Sigma, США) и заключали в Мовиол. Для исследования препаратов использовали микроскоп Opton III.

Иммуноэлектронная микроскопия. Чтобы сравнить уровень посттрансляционных модификаций  $\alpha$ -тубулина, использовали собственную модификацию (Vinogradova et al., 2005) известного метода иммунопероксидазной микроскопии (Calarco-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<sub>2</sub>, 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 ацетилированного (клон 6-11В-1; Sigma, США) или тирозинированного (клон TUB-1A2; Sigma, США)  $\alpha$ -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<sub>4</sub> (оба на PBS) и заключали в Эпон 812.

С помощью фазово-контрастной микроскопии (Opton III) выбирали клетки разных стадий клеточного цикла в культурах 3Т3 и SV40-3Т3 и готовили срезы 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 распределения ацет- и тир-тубулина в клетках 3Т3 и SV40-3Т3 (световая микроскопия). Поскольку из двух использованных нами клеточных культур лишь в отношении одной, а именно 3Т3, имелись предварительные сведения о характере распределения тир- и ацет-МТ во время митоза (Gundersen, Bulinski, 1986; Piperno et al., 1987), было проведено сравнительное исследование распределения тир- или ацет-МТ в клетках 3Т3 и SV40-3Т3 методом иммунофлуоресцентного окрашивания после фиксации параформальдегидом и методом иммунопероксидазного окрашивания после фиксации глутаральдегидом. В результате было установлено, что в обеих клеточных культурах характер окрашивания системы МТ не зависит от способа визуализации антигена при использовании антител к тир- и ацет-тубулину.

В митотических клетках 3Т3 выявлен сходный характер окрашивания для тир- и ацет-тубулина, во всех деталях совпадающий с описанным ранее в клетках млекопитающих (Gundersen, Bulinski, 1986; Piperno et al., 1987; Wolf, Spaniel-Borowski, 1995). В интерфазных клетках SV40-3Т3 выявлена сходная с клетками 3Т3 сеть МТ при окрашивании антителами к тир- или ацет-тубулину, однако наблюдались различия в характере окрашивания митотических МТ. По сравнению с клетками 3Т3 в клетках SV40-3Т3 наблюдается намного большая вариабельность

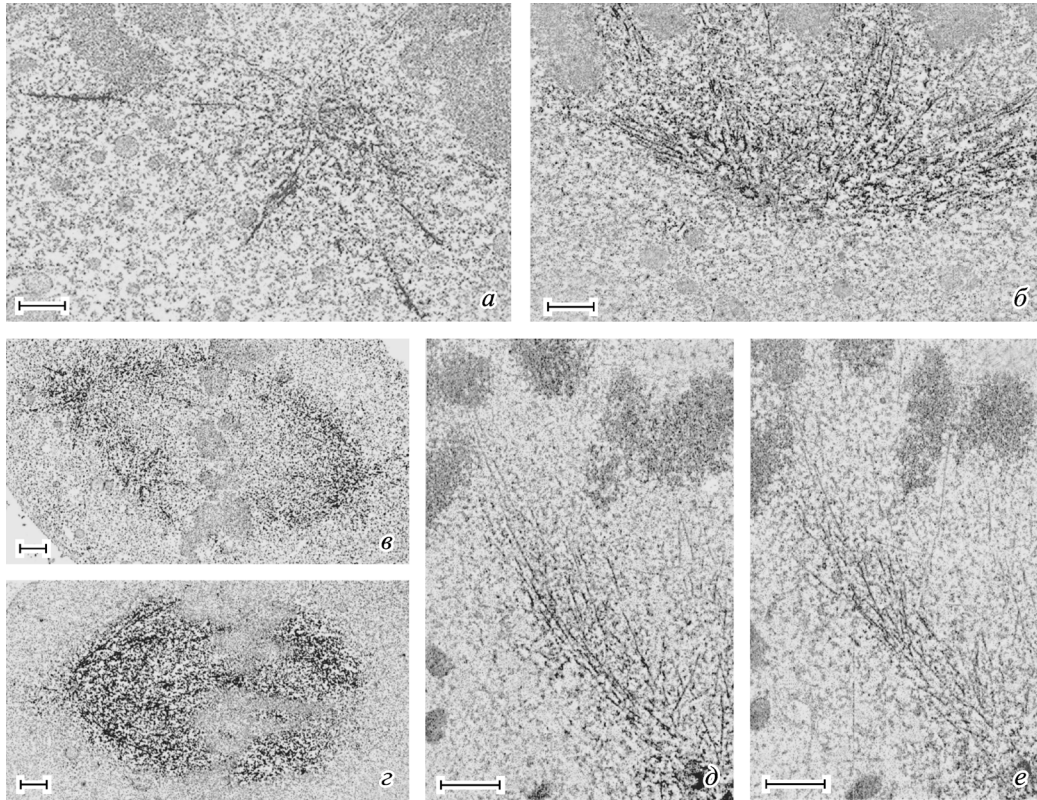


Рис. 1. Электронно-микроскопическое распределение тирозинированного (а, в) и ацетилованного (б—е)  $\alpha$ -тубулина в митотических клетках 3Т3 и SV40-3Т3 (иммунопероксидазное окрашивание).

а, б — прометафаза; в—е — метафаза. Масштабные отрезки — 1 мкм.

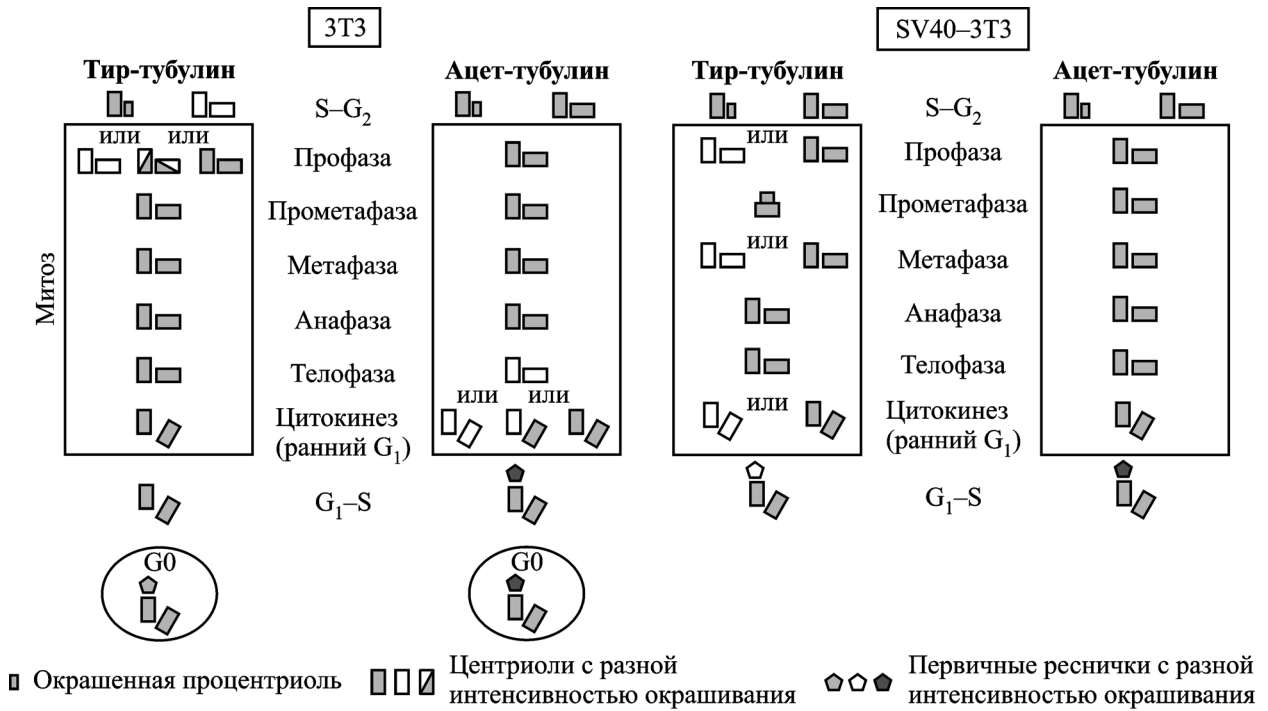


Рис. 2. Схема изменения иммунопероксидазного окрашивания центриолей антителами к тирозинированному и ацетилованному  $\alpha$ -тубулину в ходе клеточного цикла клеток 3Т3 и SV40-3Т3.

Характер окрашивания центриолей закономерно изменяется в ходе клеточного цикла линии 3Т3 в отличие от линии SV40-3Т3; высокий уровень окрашивания антителами к тир-тубулину наблюдается на всех стадиях клеточного цикла, за исключением периода подготовки к митозу, а антителами к ацет-тубулину — периода завершения митоза.



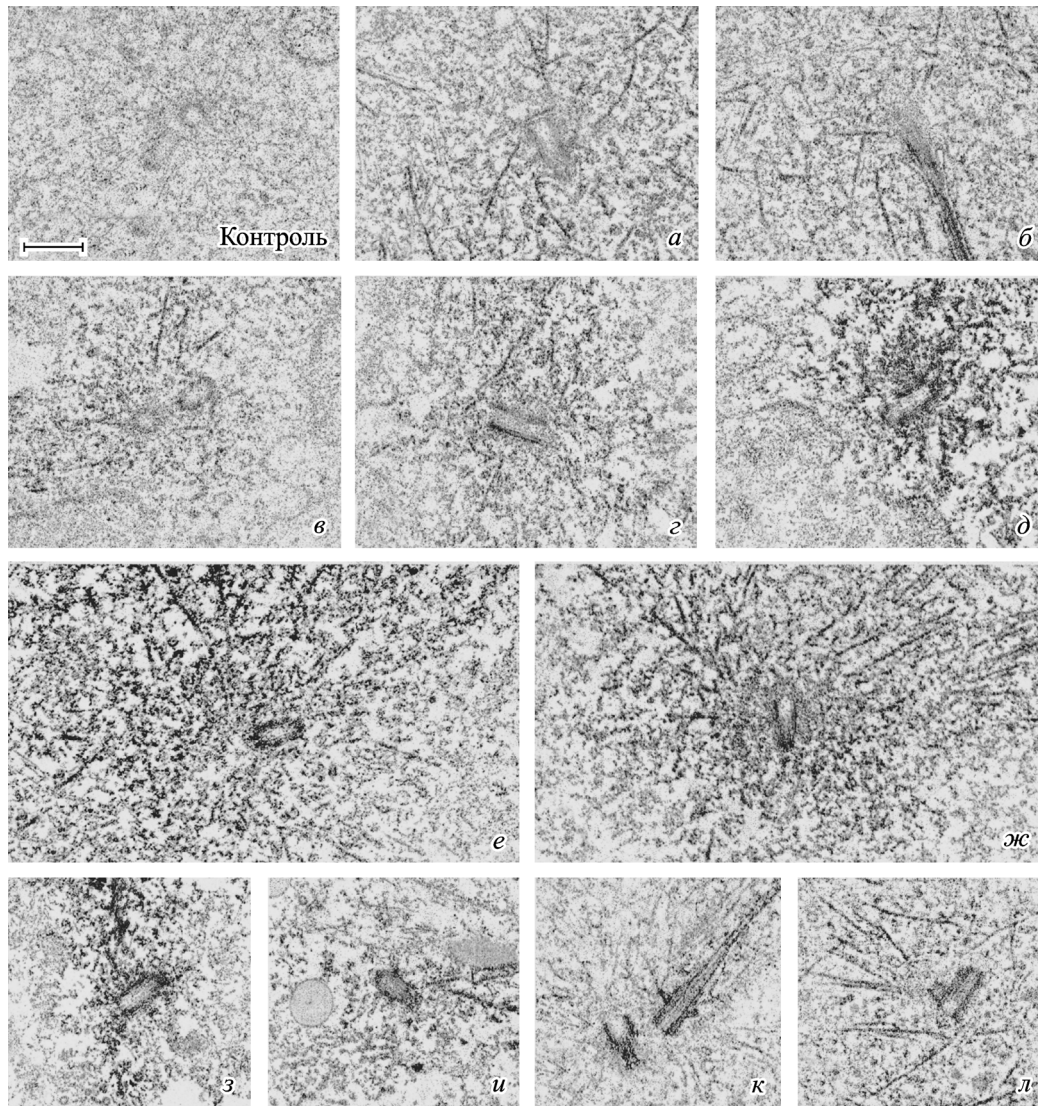


Рис. 3. Электронно-микроскопическое распределение тирозинированного  $\alpha$ -тубулина в микротрубочках центриолей и перичентриолярных микротрубочках в ходе клеточного цикла клеток 3Т3 (иммунопероксидазное окрашивание).

*a, б* —  $G_2$ -период; *в—д* — профазы; *е* — прометафаза; *ж* — метафаза; *з* — цитокинез (ранний  $G_1$ ); *и* —  $G_1$ -период; *к* — период покоя  $G_0$ ; *л* — S-период. Масштабный отрезок — 0.5 мкм.

по интенсивности окрашивания митотических МТ антителами как к тир-, так и к ацет-тубулину для одной и той же стадии митоза. Как правило, среди клеток SV40-3Т3 были как клетки, не различающиеся по интенсивности окрашивания от 3Т3, так и те, которые окрашивались намного слабее (данные не показаны).

Электронно-микроскопическое распределение ацет- и тир-тубулина в цитоплазматических МТ. Распределение тир- и ацет-МТ в клетках 3Т3 и SV40-3Т3 было изучено в ходе митоза с помощью электронной микроскопии. Как правило, интенсивность иммунопероксидазного окрашивания цитоплазматических МТ антителами как к тир-, так и к ацет-тубулину варьирует в широких пределах в отдельной клетке в обеих клеточных культурах.

В митотических клетках 3Т3 и SV40-3Т3 обнаружен сходный характер распределения цитоплазматических МТ разной интенсивности окрашивания антителами к тир- или ацет-тубулину. Пространственное распределение МТ, интенсивно окрашенных антителами к тир- или

ацет-тубулину, различается в профазных, прометафазных и метафазных клетках. В профазных и прометафазных клетках частота встречаемости МТ, наиболее интенсивно окрашенных антителами к тир-тубулину, возрастает по мере удаления от центриолей (рис. 1, *a*), в то время как частота встречаемости МТ, интенсивно окрашенных антителами к ацет-тубулину, снижается (рис. 1, *б*). В метафазных клетках МТ, интенсивно окрашенные антителами к тир-тубулину, наиболее многочисленны по периферии веретена (рис. 1, *в*), в то время как МТ, интенсивно окрашенные антителами к ацет-тубулину, с одинаковой частотой распределяются по всему веретену (рис. 1, *г*). У кинетохоров МТ всегда окрашены антителами против тир-тубулина намного слабее, чем перичентриолярные МТ (рис. 1, *д, е*), в то время как по крайней мере у части МТ, связанных с кинетохорами, интенсивность окрашивания антителами к ацет-тубулину совпадает с перичентриолярными МТ (данные не показаны). После анафазы в митотических клетках наблюдается сходный характер распределения МТ, интенсивно окрашенных антителами к тир-



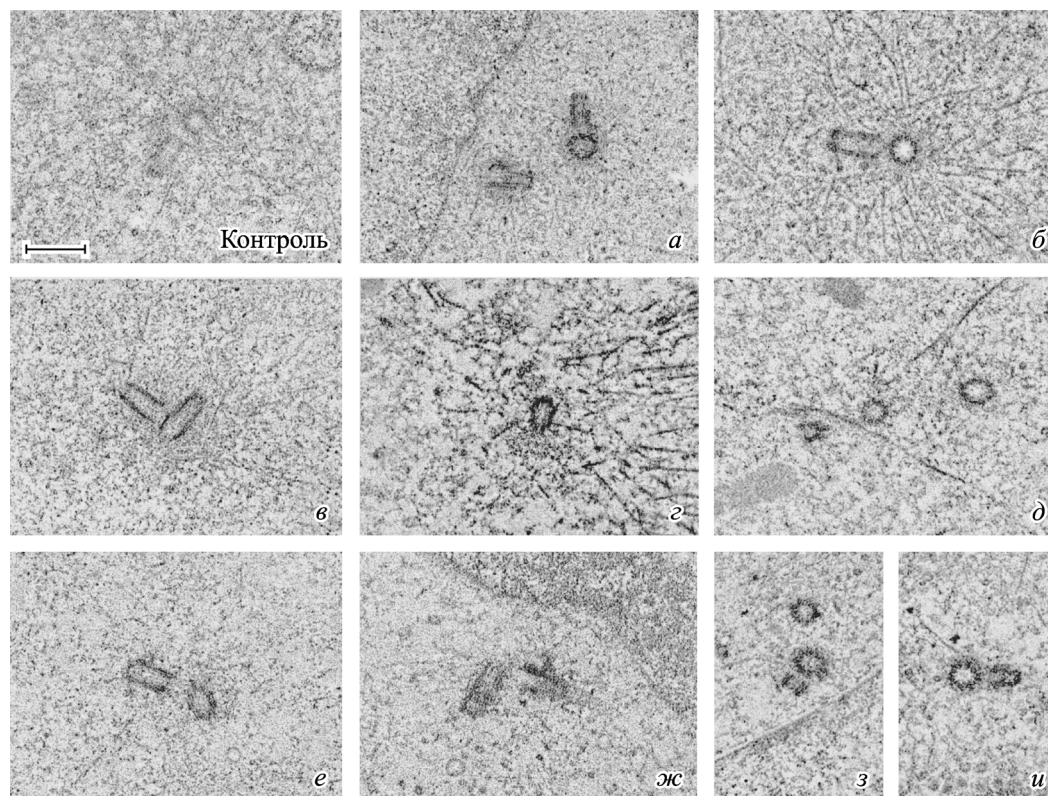


Рис. 4. Электронно-микроскопическое распределение тирозинированного  $\alpha$ -тубулина в микротрубочках центриолей и перичентриольных микротрубочках в ходе клеточного цикла клеток SV40-3ТЗ (иммунопероксидазное окрашивание).

*а, б* — профаза; *в* — полиплоидная метафаза; *г* — метафаза; *д* — телофаза; *е* — цитокinesis (ранний  $G_1$ ); *жс* —  $G_1$ -период; *з* — S-период; *и* —  $G_2$ -период. Масштабный отрезок — 0,5 мкм.

или ацет-тубулину. В телофазе антитела к тир-тубулину и ацет-тубулину окрашивают часть МТ как в полярной, так и в интерзональных областях, а в ходе цитокinesis окрашивают как МТ в районе centrosомы, так и МТ остаточного тельца (данные не показаны).

Электронно-микроскопическое распределение ацет- и тир-тубулина в МТ центриольного цилиндра. С помощью электронной микроскопии показано, что в культуре 3ТЗ интенсивность иммунопероксидазного окрашивания центриолей антителами против тир-тубулина закономерно изменяется в ходе клеточного цикла: высокий уровень окрашивания наблюдается на всех стадиях клеточного цикла, за исключением этапа созревания дочерней центриолы в период подготовки к митозу (S— $G_2$ ) и начала профазы (рис. 2, *схема*). В пределах одной клетки центриолы окрашиваются одинаково.

Среди интерфазных клеток, изученных в пролиферирующей культуре (9 клеток), центриолы окрашены на уровне негативного контроля только в тех клетках (5 клеток), в которых найдено по две диплосомы. Как видно на рис. 3, по крайней мере часть перичентриольных МТ в этих клетках окрашивается более интенсивно, чем МТ центриольного цилиндра (рис. 3, *а*). В одной из таких клеток обнаружена окрашенная первичная ресничка (рис. 3, *б*). В клетках с типичной  $G_1$ -конфигурацией центриолей (4 клетки; рис. 3, *и*), а также в клетках, содержащих процентриолы (2 клетки; рис. 3, *л*), центриолы окрашены так же интенсивно, как и окружающие их МТ. В покоящихся клетках 3ТЗ центриолы окрашены интенсивнее, чем первичная ресничка (рис. 3, *к*). Следует отметить, что в покоящихся клетках антитела к тир-тубулину окраши-

вают перичентриольные сателлиты, которые контактируют со слабо окрашенными МТ (рис. 3, *к*).

Среди изученных митотических клеток (20 клеток) только в профазных клетках (6 клеток) показана вариабельность по степени окрашивания центриолей. В одной из профазных клеток центриолы почти не отличаются от негативного контроля (рис. 3, *в*), а в двух других окрашены неравномерно — имеются участки, не отличающиеся от негативного контроля, и участки, интенсивно окрашенные (рис. 3, *г*). В трех профазных клетках центриолы окрашены интенсивно и равномерно (рис. 3, *д*). Во всех исследованных прометафазных (2 клетки; рис. 3, *е*), метафазных (3 клетки; рис. 3, *жс*), анафазных (2 клетки), телофазных (3 клетки) и в клетках в ходе цитокinesis (4 клетки; рис. 3, *з*) центриолы не отличаются по степени окрашивания от сильно окрашенных профазных клеток или от окрашенных интерфазных клеток.

В культуре SV40-3ТЗ в отличие от клеток 3ТЗ интенсивность иммунопероксидазного окрашивания центриолей антителами против тир-тубулина не изменяется в ходе клеточного цикла (рис. 2, *схема*).

Интенсивно окрашенные центриолы обнаружены во всех исследованных интерфазных клетках (8 клеток), среди которых 3 содержат типичную  $G_1$ -конфигурацию центриолей, 2 — процентриолы и 3 — диплосомы. По крайней мере по одной клетке среди клеток  $G_1$ -периода и клеток с диплосомами содержат больше двух центриолей или диплосом. Интересно, что в одной из клеток с типичной  $G_1$ -конфигурацией центриолей видна первичная ресничка, практически не окрашенная по сравнению с центриолой (рис. 4, *жс*). Во всех исследованных интерфазных



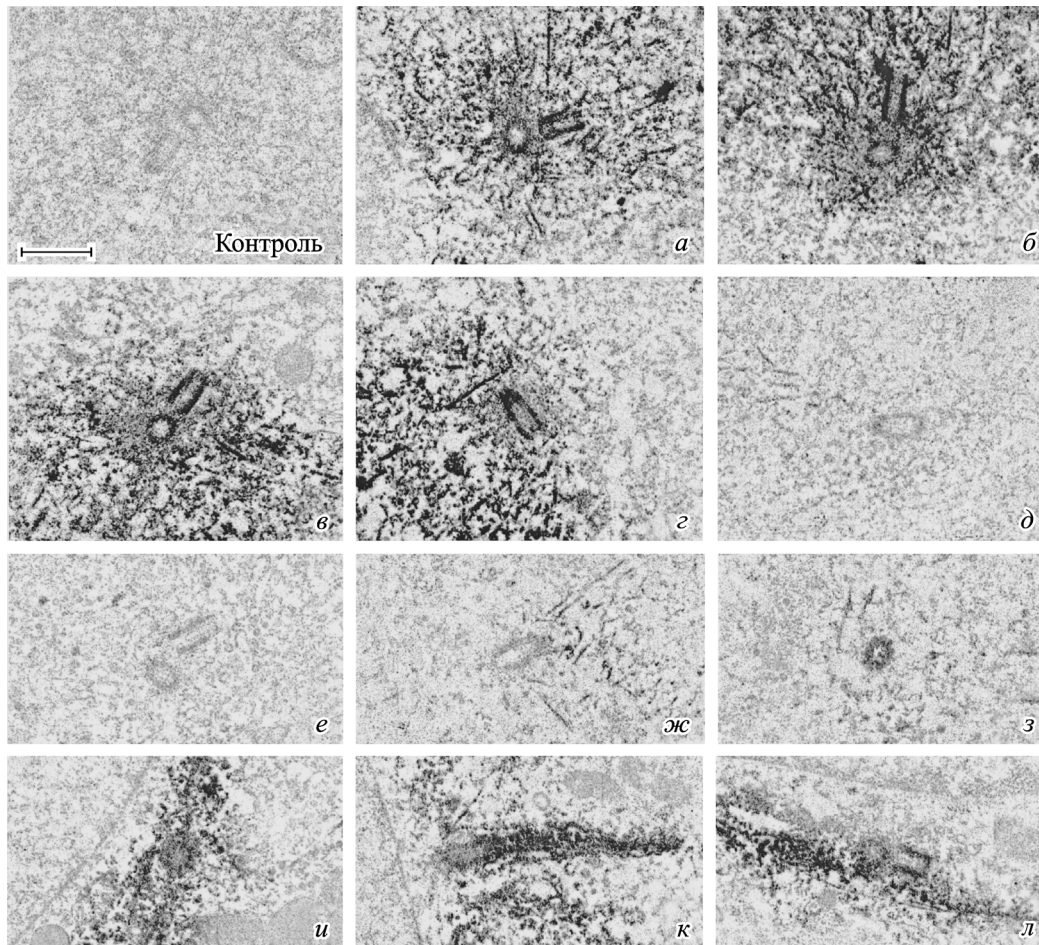


Рис. 5. Электронно-микроскопическое распределение ацетилированного  $\alpha$ -тубулина в микротрубочках центриолей и перичентриольных микротрубочках в ходе клеточного цикла клеток 3Т3 (иммунопероксидазное окрашивание).

*a* — профазы; *б* — прометафазы; *в* — метафазы; *г* — анафазы; *д* — телофазы; *е—з* — цитокинез (ранний  $G_1$ ); *и* —  $G_1$ -период; *к* — период покоя  $G_0$ ; *л* —  $S-G_2$ -период. Масштабный отрезок — 0,5 мкм.

клетках подавляющее большинство МТ, расположенных в непосредственной близости от центриоли, почти не отличаются по интенсивности окрашивания от негативного контроля. Лишь единичные МТ окрашены, но заметно слабее, чем центриоли (рис. 4, *з, и*).

Характер окрашивания центриолей в 20 исследованных митотических клетках был таким же, как в интерфазных. Были изучены 4 профазы (рис. 4, *а, б*), 3 прометафазы, 4 метафазы (рис. 4, *в, г*), 1 анафаза, 2 телофазы (рис. 4, *д*) и 6 клеток в ходе цитокинеза (рис. 4, *е*). Более двух диплосом обнаружено по меньшей мере в одной из клеток на каждой из перечисленных стадий митоза. К тому же среди метафазных и телофазных клеток были изучены как клетки, содержащие хорошо окрашенный митотический аппарат, так и клетки, в которых митотический аппарат был окрашен слабо (рис. 4, *в, г*).

В культуре 3Т3 интенсивность иммунопероксидазного окрашивания центриолей антителами против ацет-тубулина закономерно изменяется в ходе клеточного цикла: высокий уровень окрашивания наблюдается на всех стадиях клеточного цикла, за исключением периода завершения митоза (рис. 2, *схема*).

В ходе митоза во всех исследованных профазных (2 клетки; рис. 5, *а*), прометафазных (2 клетки; рис. 5, *б*), метафазных (6 клеток; рис. 5, *в*) и анафазных (6 клеток; рис. 5, *г*) клетках центриоли интенсивно окрашены

(рис. 5, *а—г*), однако центриоли в телофазных клетках (4 клетки) лишь незначительно отличаются от негативного контроля (рис. 5, *д*). Окрашивание центриолей в ходе цитокинеза варьирует в широких пределах (8 клеток). В половине изученных клеток (4 клетки) обе центриоли окрашены так же, как в телофазе (рис. 5, *е*), в трех других клетках одна центриоль не окрашена, а другая окрашена (рис. 5, *ж* и *з* соответственно), в одной клетке интенсивно окрашены обе центриоли. Следует отметить, что характер окрашивания центриолей всегда одинаков в сестринских клетках. Падение интенсивности окрашивания центриолей в ходе митоза клеток 3Т3 всегда сопровождается резким падением числа интенсивно окрашенных МТ в непосредственной близости от центриолей.

В ходе интерфазы центриоли интенсивно окрашены как в клетках  $G_1$ -периода (11 клеток; рис. 5, *и*), так и в клетках с процентриолями (1 клетка) или с диплосомами (3 клетки; рис. 5, *л*). Центриоли также окрашены в покоящихся клетках (5 клеток). Первичная ресничка в них окрашена интенсивнее, чем центриоль (рис. 5, *к*).

В культуре SV40-3Т3 в отличие от клеток 3Т3 интенсивность иммунопероксидажного окрашивания центриолей антителами против ацет-тубулина не изменяется в ходе клеточного цикла (рис. 2, *схема*).

В клетках SV40-3Т3 центриоли интенсивно окрашены в клетках всех стадий митоза вне зависимости от чис-



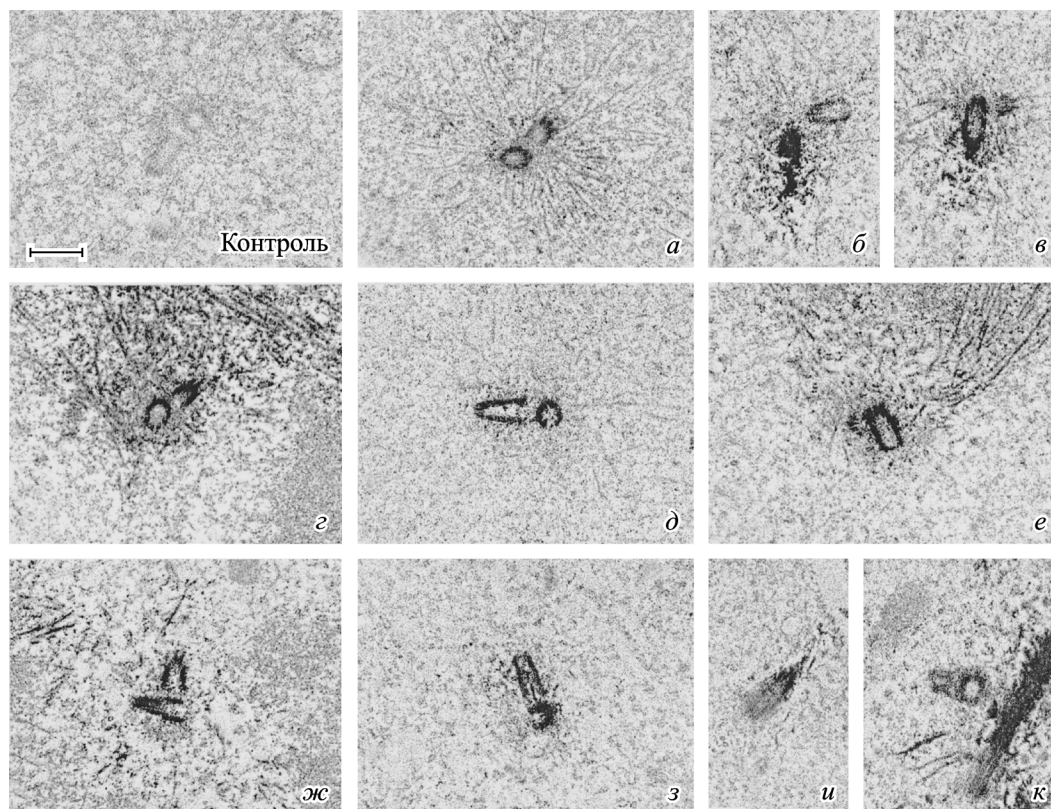


Рис. 6. Электронно-микроскопическое распределение ацетилированного  $\alpha$ -тубулина в микротрубочках центриолей и перичентриольных микротрубочках в ходе клеточного цикла клеток SV40-3ТЗ (иммунопероксидазное окрашивание).

*а* — профазы; *б–г* — прометафазы; *д, е* — метафазы; *ж* — анафазы; *з* — цитокinesis (ранний G<sub>1</sub>); *и* — G<sub>1</sub>-период; *к* — S–G<sub>2</sub>-период. Масштабный отрезок — 0,5 мкм.

ла диплосом в этих клетках или от степени окрашивания митотических МТ (рис. 2, *схема*). Изучены 4 профазные клетки (рис. 6, *а*), 4 прометафазы (рис. 6, *б–г*), 6 метафаз (рис. 6, *д, е*), 2 анафазы (рис. 6, *ж*), 2 телофазы и 3 клетки в ходе цитокinesis (рис. 6, *з*). Также интенсивно окрашивались центриоли и в интерфазных клетках (6 клеток; рис. 6, *и, к*). Первичная ресничка всегда была окрашена интенсивнее, чем центриоли (рис. 6, *и, к*).

### Обсуждение

Центросома является главным МТ-организующим центром в клетке, который определяет течение многих МТ-зависимых процессов, таких как клеточная подвижность, поддержание потоков мембран, клеточное деление. В центросоме животной клетки выделяют два структурных компартмента — центриоль и перичентриольный материал. Анализ накопленных на сегодняшний день данных указывает на то, что белковый состав центросомы подвергается драматическим изменениям в клеточном цикле, но остается неясным, происходят ли какие-то зависимости от клеточного цикла изменения в структуре собственно центриолей, которые рассматриваются как остов, на который насажен белковый каркас центросомы (Tassin, Bornens, 1999; Ou et al., 2004; Marshall, 2007).

Проводимые ранее исследования продемонстрировали на светооптическом уровне, что такие посттрансляционные модификации, как детирозинирование и ацетилирование, характерны для  $\alpha$ -тубулина в составе МТ центриольного цилиндра (Bre et al., 1987; Piperno et al., 1987;

Winkelhaus, Hauser, 1997). Причем предполагают, что содержание детирозинированного (глутаминированного) тубулина в МТ центриоли изменяется в ходе митоза (Winkelhaus, Hauser, 1997). Однако попытки выявить тир- или глу-тубулин в центриолях с помощью антител, меченных коллоидным золотом, не увенчались успехом (Geuens et al., 1986), в то время как присутствие ацет-тубулина в МТ центриольного цилиндра было подтверждено на выделенных центросомах (Bobinnec et al., 1998a). Чтобы исключить проблемы, связанные с проникновением антител, меченных коллоидным золотом, в центросому клеток *in situ*, в настоящей работе использовали собственную модификацию (Vinogradova et al., 2005) пероксидазного метода иммуноокрашивания для электронно-микроскопического исследования (Calarco-Gillan et al., 1983; Bre et al., 1987). Данный метод позволяет полуквантитативно оценить уровень связывания антител с МТ, ориентируясь на различия в интенсивности пероксидазного окрашивания.

Мы обнаружили, что характер иммунопероксидазного окрашивания центриолей антителами как к ацет-, так и к тир-тубулину закономерно изменяется в ходе клеточного цикла контрольной диплоидной клеточной линии 3ТЗ (A31) в отличие от опухолевой гетероплоидной клеточной линии SV40-3ТЗ. Резкое изменение характера окрашивания центриолей наблюдается в те периоды клеточного цикла, когда белковая организация центросомы претерпевает изменения при переходе из интерфазы в митоз и обратно в связи с перестройкой системы МТ. Установлено, что высокий уровень окрашивания центриолей антителами к тир-тубулину наблюдается на всех стадиях клеточного цикла, за исключением периода подготовки к

митозу, в то время как высокий уровень интенсивности окрашивания антителами к ацет-тубулину наблюдается на всех стадиях клеточного цикла, за исключением периода завершения митоза. В отношении тир-тубулина наши данные согласуются с результатами других авторов, сравнивавших на светооптическом уровне содержание дитирозинированного тубулина (глу-тубулина) в центриолях неиммортизированных клеток на разных стадиях митоза. Так, было показано, что в клетках зеленой мартышки ТС-7, фиксированных метанолом, окрашивание точек, похожих на центриоли, антителами к глу-тубулину было интенсивным в профазе, а в ходе цитокинеза наблюдалось лишь слабое окрашивание (Gundersen, Bulinski, 1986). Точно так же в митотических клетках эндотелиальной клеточной линии сердца лягушки *Xenopus* наблюдалась максимальная интенсивность окрашивания центросомальной области антителами к глу-тубулину на начальных стадиях митоза (Winkelhaus, Hauser, 1997).

Возможно, ослабление окрашивания антителами к тир-тубулину в наших клетках есть результат временного повышения уровня глу-тубулина в МТ центриолей. Иначе кратковременное ослабление интенсивности окрашивания центриолей антителами к тир- или ацет-тубулину могло бы происходить в результате временного экранирования этих эпитопов в результате их взаимодействия с белками перичентриолярного матрикса. Не исключено также, что фиксация глутаральдегидом приводит к конформационным изменениям  $\alpha$ -тубулина, в результате которых эпитопы становятся недоступными для антител на отдельных стадиях интерфазы или митоза.

Наши данные впервые указывают на то, что МТ центриолярного цилиндра претерпевают зависимые от митотического цикла изменения, коррелирующие со структурной реорганизацией центросомы по крайней мере в неиммортизированных клетках, для которых характерен низкий уровень аномалий деления и в которых в полной мере работает система интерфазных и митотических «точек запрета клеточного цикла». Иными словами, изменение уровня посттрансляционных модификаций центриолярного тубулина может влиять на взаимодействие центриолей с белками перичентриолярного матрикса или на взаимодействие белков перичентриолярного матрикса между собой.

Кроме того, вызывает интерес и обнаруженный нами факт, что интенсивность окрашивания МТ, расположенных непосредственно у центросомы, антителами против тирозинированного тубулина повышается от профазы к метафазе. Таким образом, в метафазе перичентриолярные МТ окрашиваются антителами против тир-тубулина так же, как наиболее интенсивно окрашенные МТ профазной звезды. Наблюдается значительное увеличение содержания тир-тубулина в митотических МТ по мере прохождения митоза от профазы к метафазе, т. е. в то время, когда в клетке резко возрастает пул полимеризованного тубулина (Kline-Smith, Walczak, 2004). Вероятно, это происходит в результате увеличения общего пула тир-тубулина за счет активации фермента TTL (лигазы) в ходе митоза, на фоне снижения общего уровня белкового синтеза. Можно также предположить, что в связи с ускорением обновления центросомных МТ на начальных стадиях митоза (Snyder, McIntosh, 1975; Brinkley et al., 1981; Kuriyama, Borisy, 1981) ТСП (карбокситепептидаза) не успевает отщеплять тирозиновые остатки от МТ. Однако ацетилтрансфераза, по-видимому, продолжает работать даже на короткоживущих митотических МТ, время полужизни которых, как

считается, не превышает 3 мин (McNally, 1996; Zhai et al., 1996), так как не наблюдается снижения интенсивности окрашивания митотических звезд антителами против ацет-тубулина от профазы к метафазе. Не исключено также, что ацет-тубулин накапливается за счет подавления в этот период активности ацетилазы — фермента, выполняющего обратную реакцию деацетилирования. Чтобы проверить эти предположения, нужны дальнейшие исследования.

### Список литературы

- Зиновкина Л. А., Надеждина Е. С. 1996. Белки центросомы. Биохимия. 61 (8) : 1347—1365.
- Онищенко Г. Е. 1993. Центриолярный и центросомный циклы при дифференцировке и патологии. М.: Наука. 255 с.
- Andersen S. S. L. 1999a. Balanced regulation of microtubule dynamics during the cell cycle: a contemporary view. BioEssays. 21 : 53—60.
- Andersen S. S. L. 1999b. Molecular characteristic of the centrosome. Int. Rev. Cytol. 187 : 51—109.
- Azimzadeh J., Bornens M. 2007. Structure and duplication of the centrosome. J. Cell. Sci. 120 : 2139—2142.
- Bobinac Y., Khodjakov A., Mir L. M., Rieder C. L., Ede B., Bornens M. 1998a. Centriole disassembly *in vivo* and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. J. Cell. Biol. 143 : 1575—1589.
- Bobinac Y., Moudjou M., Fouquet J. P., Desbrières E., Eddé B., Bornens M. 1998b. Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. Cell. Motil. Cytoskeleton. 39 : 223—232.
- 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., Cox S. M., Pepper D. A., Wible L., Brenner S. L., Pardue R. L. 1981. Tubulin assembly sites and the organization of cytoplasmic microtubules in cultured mammalian cells. J. Cell. Biol. 90 : 554—562.
- 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.
- Dictenberg J. B., Zimmerman W., Sparks C. A., Young A., Vidair C., Zheng Y., Carrington W., Fay F. S., Doxsey S. J. 1998. Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized in a novel lattice at the centrosome. J. Cell. Biol. 141 : 163—174.
- Doxsey S. J., Stein P., Evans L., Calarco P. D., Kirschner M. 1994. Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. Cell. 76 : 639—650.
- Doxsey S., Zimmerman W., Mikule K. 2005. Centrosome control of the cell cycle. Trends Cell. Biol. 15 : 303—311.
- Geuens G., Gundersen G. G., Nuydens R., Cornelissen F., Bulinski J. C., DeBrabander M. 1986. Ultrastructural colocalization of tyrosinated and detyrosinated alpha-tubulin in interphase and mitotic cells. J. Cell. Biol. 103 : 1883—1893.
- Gluck U., Kwiatkowski D. J., Ben-Ze'ev A. 1993. Suppression of tumorigenicity in simian virus 40-transformed 3T3 cells transfected with  $\alpha$ -actinin cDNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90 : 383—387.
- Gundersen G. G., Bulinski J. C. 1986. Distribution of tyrosinated and nontyrosinated alpha-tubulin during mitosis. J. Cell. Biol. 102 : 1118—1126.
- Joshi H. C., Palacios M. J., McNamara L., Cleveland D. W. 1992.  $\gamma$ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. Nature. 356 : 80—83.
- Kline-Smith S. L., Walczak C. E. 2004. Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. Mol. Cell. 15 : 317—327.



- Krämer A., Lukas J., Bartek J. 2004. Checking out the centrosome. *Cell Cycle*. 3 : 1390—1393.
- Kuriyama R., Borisy G. G. 1981. Microtubule-nucleating activity of centrosomes in *Chinese hamster* ovary cells is independent of the centriole cycle but coupled to the mitotic cycle. *J. Cell. Biol.* 91 : 822—826.
- 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.
- Marshall W. F. 2007. What is the function of centrioles? *J. Cell. Biochem.* 100 : 916—922.
- Marshall W. F., Rosenbaum J. L. 1999. Cell division: the renaissance of the centriole. *Curr. Biol.* 9 : 218—220.
- McNally F. J. 1996. Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle. *Curr. Biol.* 8 : 23—29.
- Ou Y., Zhang M., Rattner J. B. 2004. The centrosome: the centriole-PCM coalition. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 57 : 1—7.
- Piperno G., LeDizet M., Chang X.-j. 1987. Microtubules containing acetylated  $\alpha$ -tubulin in mammalian cells in culture. *J. Cell. Biol.* 104 : 289—302.
- Rosenbaum J. 2000. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr. Biol.* 10 : 801—803.
- Schnackenberg B. J., Palazzo R. E. 1999. Identification and function of the centrosome centromatrix. *Biol. Cell.* 91 : 429—438.
- Smith H. S., Turner S., Leong J.-A., Rigby W. J. 1976. Effect of passage in culture of BALB/c 3T3 cells transformed by simian virus 40. *J. Virol.* 19 : 146—153.
- Snyder J. A., McIntosh J. R. 1975. Studies on the centriolar region of mammalian cells at the onset of mitosis. *J. Cell. Biol.* 70 : 368a.
- Stephenson J. R., Reynolds R. K., Aaronson S. A. 1973. Characterization of morphologic revertants of murine and avian sarcoma virus-transformed cells. *J. Virol.* 11 : 218—222.
- Tassin A. M., Bornens M. 1999. Centrosome structure and microtubule nucleation in animal cells. *Biol. Cell.* 91 : 343—354.
- Tucker R. W., Pardee A. B., Fujiwara K. 1979. Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell.* 17 : 527—535.
- Vinogradova T. M., Balashova E. E., Smirnov V. N., Bystrevskaya V. B. 2005. Detection of the centriole tyr- or acet-tubulin changes in endothelial cells treated with thrombin using microscopic immunocytochemistry. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 62 : 1—12.
- Vorobjev I. A., Chentsov Y. S. 1982. Centrioles in the cell cycle. I. Epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 98 : 938—949.
- Winkelhaus S., Hauser M. 1997. Ortho-vanadate affects both the tyrosination/ detyrosination state of spindle microtubules and the organization of XTH-2 spindles. *Eur. J. Cell. Biol.* 73 : 306—315.
- Wolf K. W., Spanel-Borowski K. 1995. Acetylation of  $\alpha$ -tubulin in different bovine cell types: implications for microtubule dynamics in interphase and mitosis. *Cell Biol. Int.* 19 : 43—52.
- Zhai Y., Kronebusch P. J., Simon P. M., Borisy G. G. 1996. Microtubule dynamics at the G<sub>2</sub>/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *J. Cell. Biol.* 135 : 201—214.

Поступила 20 VIII 2008

THE PATTERN OF CENTRIOLE IMMUNOSTAINING FOR TYROSINATED OR ACETYLATED  $\alpha$ -TUBULIN CHANGES DURING MITOSIS IN 3T3 (A31) CELLS BUT NOT IN SV40-3T3 CELLS

E. E. Balashova,<sup>1</sup> P. G. Lokhov,<sup>2</sup> V. B. Bystrevskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cardiology Research Center and <sup>2</sup> Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow;

<sup>1</sup> e-mail: balashlen@mail.ru

Comparative electron microscopic analysis of the patterns of centriolar and cytoplasmic microtubules immunostaining for acetylated or tyrosinated  $\alpha$ -tubulin was performed during the cell cycles of the mouse diploid 3T3 (A31) and virus-transformed heteroploid SV40-3T3 cell lines. It was shown that the pattern of centriole immunostaining changed during mitosis in control 3T3 (A31) cells, but not in tumorigenic SV40-3T3 cells. A sharp change in the pattern of centriole immunostaining was observed in those cell cycle periods when the protein organization of centrosome underwent changes during interphase/mitosis or mitosis/interphase transitions due to the rearrangement of microtubule system. A high level of centriole immunostaining for tyrosinated and acetylated  $\alpha$ -tubulin was observed at all cell cycle stages with the exception of entering mitosis for the former and the end of mitosis for the latter.

Key words: mitosis, tubulin, centriole.