

ОТВЕТ КЛЕТОК ЛИНИИ HeLa НА ДЕЙСТВИЕ МИТОМИЦИНА С. I. ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК

© Ю. П. Петров

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: учр3ов@mail.ru*

Используя световую микроскопию, цейтраферную видеосъемку и анализ цифровых изображений, изучили влияние митомицина С в концентрации 10 мкг/мл на клетки HeLa-M. Показано, что после 2 ч контакта с митомицином клетки могут быть разделены на две группы: M-I — функционально активные клетки, сохраняющие жизнеспособность после деления, но больше не вступающие в митоз; M-II — клетки, вступающие в митоз, но неспособные его завершить, что приводит к их гибели. Известно, что митомицин специфически блокирует репликацию ДНК, локализуясь в ее малой бороздке. Если исходить из общепринятой гипотезы образования «транскрипционного пузырька», это должно препятствовать синтезу РНК. Увеличение площади клеток группы M-I и размеров их ядрышек в процессе культивирования, однако, указывают на то, что синтез РНК и белков не блокируется. Автор приходит к выводу о том, что эти данные подтверждают высказанную им ранее гипотезу о синтезе РНК в большой бороздке ДНК без ее локального плавления (Petrov, 2006).

Ключевые слова: митоз, ядро, ядрышко, транскрипция, транскрипционный пузырек, митомицин С.

Один из методов культивирования клеток в искусственных условиях основан на использовании в качестве подложки монослоя из других клеток, называемых фидерными. Такой способ в настоящее время востребован в связи с получением и изучением стволовых клеток. Чтобы клетки, используемые в качестве фидера, не размножались, их обрабатывают антибиотиком митомицином С (Кольцова и др., 2012). В модельных экспериментах установлено, что он ковалентно связывается с ДНК, локализуясь в ее малой бороздке (Tomasz et al., 1987). Сшивая цепи ДНК, митомицин С препятствует ее репликации и тем самым блокирует деление клетки. Именно этот эффект используется при получении неделяющихся, но живых фидерных клеток. Однако действие митомицина С не ограничено только специфическим связыванием с ДНК — показано, что он взаимодействует с рибосомной РНК и ингибитирует синтез белка (Snodgrass et al., 2010).

Перед посевом исследуемых клеток на монослой фидерных последние отмывают от митомицина С. Поэтому совместное культивирование двух типов клеток проходит в среде без митостатика. Несмотря на то что фидерные клетки в конечном счете погибают, они успевают выполнить свою культуральную функцию между пересевами исследуемых клеток. Поскольку фидерные клетки в течение этого периода остаются живыми, можно полагать, что процессы метаболизма в них не прекращаются. Следовательно, должны синтезироваться РНК и белки. Если это так, то возникает определенное противоречие с общепринятой точкой зрения о механизмах транскрипции. Считается, что синтезу РНК предшествует локальное «плавление» двойной спирали ДНК, известное под названием «транскрипционный пузырек» (Nudler, 1999; Ott

et al., 2011). То, что транскрипция может идти при образовании такой структуры, продемонстрировано на бесклеточных моделях (Park, Roberts, 2006). Таким образом, можно предположить, что, ковалентно связываясь с ДНК, митомицин должен препятствовать образованию транскрипционного пузырька, т. е. блокировать не только репликацию, но и транскрипцию. И как следствие, останавливать синтез белка *de novo*. В настоящей работе предпринята попытка проверить это предположение на культивируемых клетках постоянной линии HeLa.

Материал и методика

В качестве объекта исследования использовали клетки постоянной линии HeLa-M (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, сублиния HeLa), полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Клетки культивировали в пластиковых чашках Петри (35 мм; Nunk, Дания) на среде ДМЕМ (Gibco, США) в атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °C. В питательную среду добавляли 10 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США) и 100 мкг/мл гентамицина. Клетки рассеивали с плотностью 3—4 · 10³ кл./см².

Через 1 сут после пересева одну чашку с клетками оставляли в инкубаторе, вторую помещали на столик микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), оборудованного устройствами для долговременного прижизненного наблюдения за клетками (поддержание температуры, влажности и CO₂). Еще

через 1 сут в чашку, находящуюся в инкубаторе, добавляли митомицин С (Sigma, США) в количестве 10 мкг/мл и клетки инкубировали еще 2 ч. После этого удаляли среду с митостатиком, дважды ополаскивали клетки PBS и добавляли свежую питательную среду без митомицина. Контрольную чашку с клетками убирали со столика микроскопа AxioObserver.Z1, а на ее место помещали чашку с клетками, подвергнутыми обработке митомицином. Чашку с интактными клетками помещали в инкубатор. Через 2 сут эксперимент завершали.

Через 1 сут после пересева (до начала цейтраферной съемки интактных клеток), через 2 сут (перед началом съемки обработанных митомицином С клеток) и 4 сут (после окончания съемки клеток, контактировавших с митомицином С) для контрольных и опытных клеток получали цифровые изображения с помощью инвертированного светового микроскопа ECL IPSE TS100 (Nikon, Япония) и цифровой камеры EOS 1000D (Canon, Япония), об. 20×.

Условия цейтраферной съемки на микроскопе AxioObserver.Z1 — объектив Plan-Neofluar ×20/0.4 и цифровая камера AxioCam HRm с разрешением 1388 × 1040 пикселей, обычная микроскопия в проходящем свете (без использования дифференциального интерференционного контраста) и съемка с 5-минутным интервалом между кадрами. Заданные условия эксперимента поддерживали автоматически программой AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Для качественного анализа использовали отдельные изображения, записанные в формате «JPEG».

Цифровые изображения клеток анализировали с помощью программы ImageJ 1.47j (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США). Использовали два параметра — площадь (в пикселях) и светопоглощение как оптическую плотность, выраженную в условных единицах от 0 до 255. Контуры ядер клеток обводили вручную, а их площадь и гистограммы светопоглощения рассчитывали автоматически.

Для статистической обработки данных, построения графиков и диаграмм использовали Excel 2010 (Microsoft, США) и Origin 6.1 (OriginLab, США).

Результаты

Для оценки пролиферативной активности клеток подсчитывали их количество в 10—15 полях зрения на световом микроскопе. Полученные относительные величины адекватно отражают рост клеточной популяции. Как следует из данных, представленных на рис. 1, рост числа клеток в течение 2 сут после посева в обеих чашках одинаков — по сравнению с 1-ми сут число клеток через 2 сут увеличилось приблизительно в 2 раза. Это можно интерпретировать двояко: либо все клетки популяции поделились минимум 1 раз, либо длина клеточного цикла этих клеток в среднем приблизительно равна 24 ч.

К 4-м сут интактные клетки сохраняют ту же пролиферативную активность — число клеток в популяции возросло еще в 2 раза. У клеток, прошедших инкубацию в среде с митомицином, пролиферация резко снизилась, но не исчезла полностью. Общее число клеток выросло приблизительно на 20—25 %. Это означает, что 2-часовая обработка клеток митомицином в концентрации 10 мкг/мл не полностью блокирует размножение клеток. Этот факт

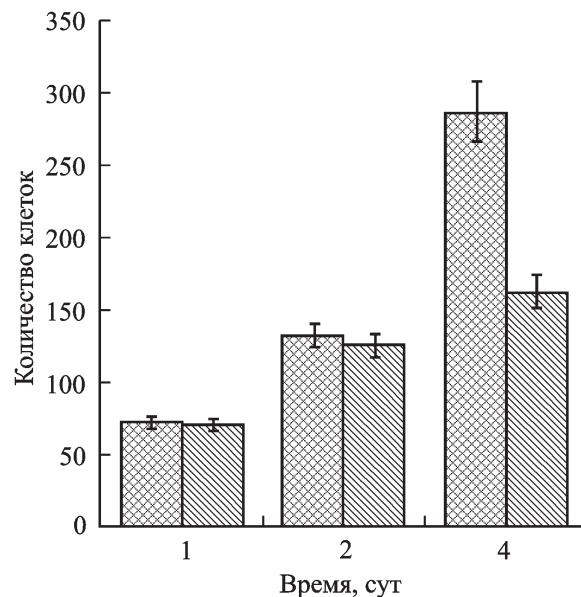


Рис. 1. Динамика изменения числа клеток HeLa в контроле и после экспозиции в среде с митомицином С.

Данные представлены в виде среднего ± ошибки среднего.

можно объяснить либо наличием субпопуляции, клетки которой не реагируют на митомицин, либо определенным физиологическим состоянием клеток, когда этот агент не может препятствовать входению клеток в митоз.

Чтобы решить, какое из предположений верно, с помощью цейтраферной съемки определяли время наступления митоза отдельных клеток от момента окончания обработки их митомицином. Наблюдения за такими клет-

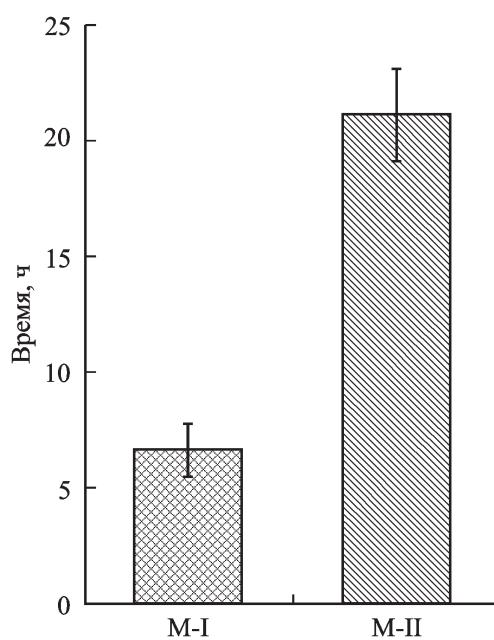


Рис. 2. Время между окончанием экспозиции клеток в среде с митомицином С и началом их митотического деления.

M-I — для клеток, дочерние клетки которых не имеют видимых морфологических нарушений до окончания срока наблюдения (2 сут после контакта с митомицином С); M-II — для клеток, дочерние клетки которых либо разрушаются, либо остаются округлыми до окончания срока наблюдения. Данные представлены в виде среднего ± ошибки среднего.

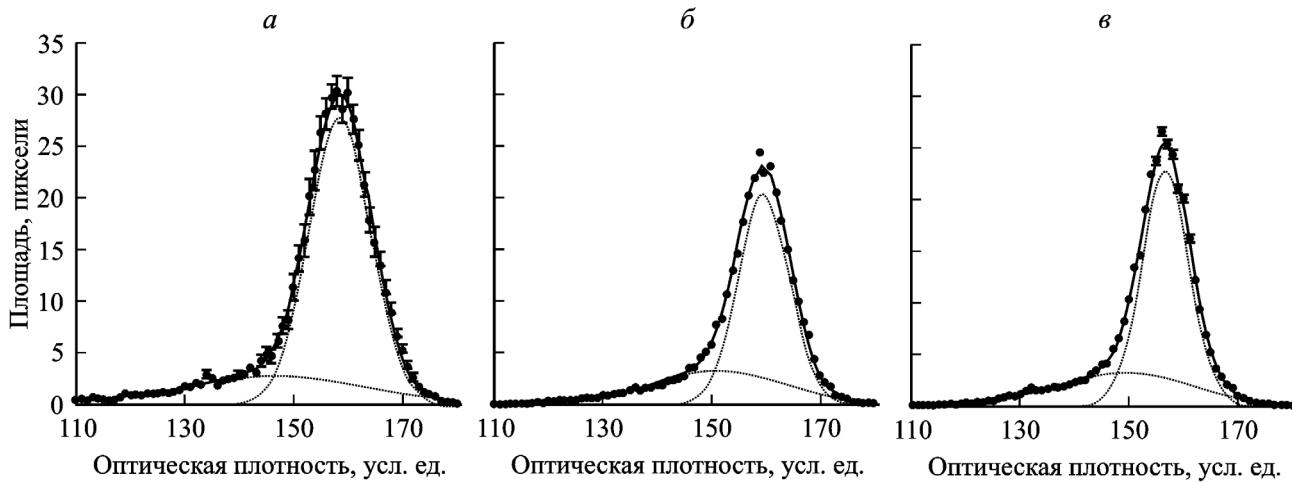


Рис. 3. Соотношение площади ядра и ядрышек материнской (а) и ее дочерних клеток (б, в).

Кружки — экспериментальные значения, *сплошные линии* — суммарные расчетные кривые, *пунктирные линии* — расчетные кривые для площади ядрышек (левые пик) и площади ядер без ядрышек (правые пик). Представлены средние значения с соответствующими ошибками. Объяснения в тексте.

ками показало, что их можно легко разделить на две группы. Первая группа (M-I) — клетки, которые после митоза образуют функционально активные дочерние клетки. Вторая группа (M-II) — клетки, которые после входления в митоз либо остаются округлыми до конца периода наблюдения, либо их дочерние клетки деградируют и разрушаются.

На рис. 2 представлены результаты, отражающие среднее время вступления в митоз клеток обеих групп. Клетки группы M-I начинают делиться в среднем через 6.7 ± 1.2 ч после отмычки их от митомицина С, а группы M-II — через 21.1 ± 2.0 ч. Резкие различия между этими величинами и их абсолютные значения, по-видимому, не случайны и указывают на то, что клетки первой группы на момент обработки их митомицином находились в фазе G₂ клеточного цикла, а клетки второй группы — в фазах G₁ и S.

Поскольку клетки группы M-II в конечном счете погибают, анализ их морфологии не представляет интереса. В группе M-I можно сравнивать морфологию материнских и дочерних клеток. Было замечено, что после деления такие дочерние клетки активны (изменяют форму, образуя короткие филоподии), но в митоз не вступают по крайней мере до конца периода наблюдения (2 сут после контакта с митомицином).

Принимая во внимание данные о токсичности митомицина С по отношению к рибосомам (Snodgrass et al., 2010), был проведен анализ площадей ядрышек у материнских и дочерних клеток группы M-I. При световой микроскопии оптическая плотность ядрышек заметно выше, чем ядра в целом. Используя различия в интенсивности поглощения света, можно определить площадь, занимаемую ядрышками и остальной частью ядра. Для этого использовали гистограммы яркости всех пикселей, составляющих площадь ядра. Такая типичная гистограмма ядра материнской клетки представлена на рис. 3, а. Она получена путем усреднения гистограмм около 30 изображений данной материнской клетки до ее входления в митоз. Следует заметить, что более высокие значения оптической плотности указывают на более светлые области, а низкие — на затененные участки. Очевидно, что суммарная кривая состоит из двух пиков. Малый пик (с темными

пикселями) соответствует ядрышкам, большой — остальной части ядра. Суммарная расчетная кривая очень точно совпадает с опытными значениями (коэффициент линейной корреляции равен 0.998). Расчетное число пикселей, соответствующих площади ядрышек, составляет 117, а остальной части ядра — 394.

В той же манере представлены соотношения площадей ядрышек и остальной части ядра дочерних клеток (рис. 3, б, в). Для построения этих усредненных гистограмм использовали гистограммы 60 последовательных (во времени) изображений для каждой дочерней клетки. Коэффициенты корреляции в этом случае те же — 0.998 и 0.998, т. е. качество соответствия расчетных значений по отношению к опытным очень высокое. Видно, что модальные значения (оптической плотности) пиков всех трех клеток приблизительно одни и те же. Однако исходя из задачи настоящей работы важнее сравнить площади под кривыми, соответствующими малым пикам. Они численно равны площадям ядрышек. Для одной из дочерних клеток площадь ядрышек равна 102 пикселям, для другой — 94. Получается, что общий размер ядрышек дочерних клеток ($102 + 94 = 196$ пикселяй) выше, чем размер ядрышек материнской клетки (117 пикселяй).

Обсуждение

Использование митомицина С в культуральной работе для получения подложки из фидерных клеток нельзя считать основным. Наибольшее распространение он получил в качестве митостатика при лечении злокачественных опухолей и других заболеваний, связанных с избыточной клеточной пролиферацией (Volpato, Phillips, 2007; Kim et al., 2011; Anjos et al., 2012; Wu et al., 2013). Поэтому большинство работ, посвященных изучению этого антибиотика, направлено на исследование его токсичности по отношению к клеткам и способов оптимизации терапевтического эффекта при лечении им онкологических заболеваний (Hlavin et al., 2010; Wang et al., 2012).

Задача настоящей работы не имеет прямой связи ни с одним из этих направлений. Представленные результаты направлены не столько на уточнение механизмов дейст-

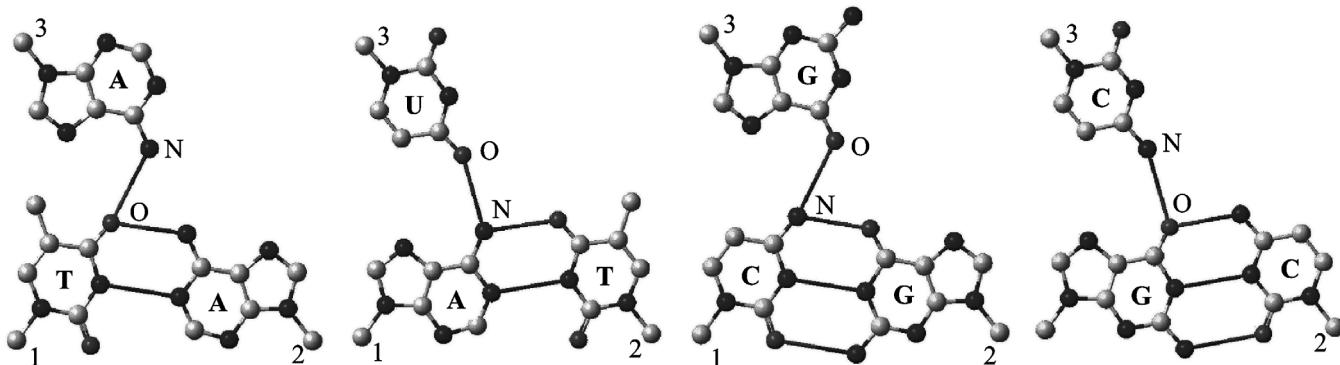


Рис. 4. Четыре комплементарных триплета, предположительно образующиеся при синтезе tf-RNA (из: Petrov, 2006).

вия митомицина С на клетки, сколько на выявление противоречий в понимании этих механизмов и реакции клетки на данный агент. С одной стороны, многочисленные данные литературы указывают на то, что как *in vitro*, так и *in vivo* митомицин С ковалентно связывается с гуанином в малой бороздке ДНК, причем сшивки могут быть как между цепями ДНК, так и внутри одной из них (Bizanek et al., 1992; Rink et al., 1996; Weng et al., 2010). С другой стороны, хорошо известно, что синтез РНК идет на одной из цепей ДНК, в то время как другая не считывается, при этом процесс транскрипции по общепринятыму мнению сопровождается локальным плавлением ДНК с образованием так называемого транскрипционного пузырька (Nudler, 1999; Park, Roberts, 2006). Лишь в одной обзорной работе был сформулирован вопрос о том, как при наличии межнитевых сшивок ДНК после воздействия митомицина С формируется транскрипционный пузырек (Hlavin et al., 2010). Однако ответа на этот вопрос пока не получено.

Из представленных в настоящей работе данных следует, что, несмотря на контакт с митомицином С, часть клеток (группа М-I) заканчивает свой цикл образованием функционально активных дочерних клеток. Судя по времени вступления в митоз, эти клетки находятся в фазе G₂, что неудивительно, поскольку репликации ДНК в этой фазе не происходит и митомициновые сшивки ДНК не могут препятствовать образованию двойного набора хромосом. Однако они должны блокировать формирование транскрипционного пузырька, а следовательно, ни синтеза РНК, ни синтеза белка *de novo* происходить не должно.

Тем не менее в этой фазе клеточного цикла синтез этих молекул не прекращается (Pines, 1991; Livneh, Fishman, 1997; Damia, Broggini, 2004; Shi et al., 2013).

Исследование токсического влияния митомицина С на клетки показало, что этот белок разрушает рибосомы (Snodgrass et al., 2010). Представленные здесь результаты анализа площади ядрашек показывают, что их общая площадь возрастает у дочерних клеток по сравнению с материнской. Это может означать только то, что в дочерних клетках происходит синтез pРНК. Принимая во внимание, что эти дочерние клетки не входят в митоз (по крайней мере в течение 2 сут после деления материнской клетки), можно полагать, что цепи их ДНК остаются сшитыми митомицином С.

Нет сомнения в том, что, отталкиваясь от известных на сегодняшний день данных, можно найти разумные объяснения противоречию между отсутствием плавления ДНК из-за сшивки ее цепей митомицином и фактами, указывающими на то, что при этом происходят и транскрипция, и трансляция. Например, можно предположить, что в клетке всегда есть пул ферментов, которые оперативно могут восстанавливать поврежденные участки ДНК, или что существуют такие важные для клетки участки ДНК, которые недоступны для индукции митомициновых сшивок. Точный ответ на вопрос о том, что происходит в действительности, могут дать только будущие целенаправленные и адекватные эксперименты. Однако теоретически разрешить это противоречие можно, если предположить, что *in vivo* транскрипционный пузырек не образуется.

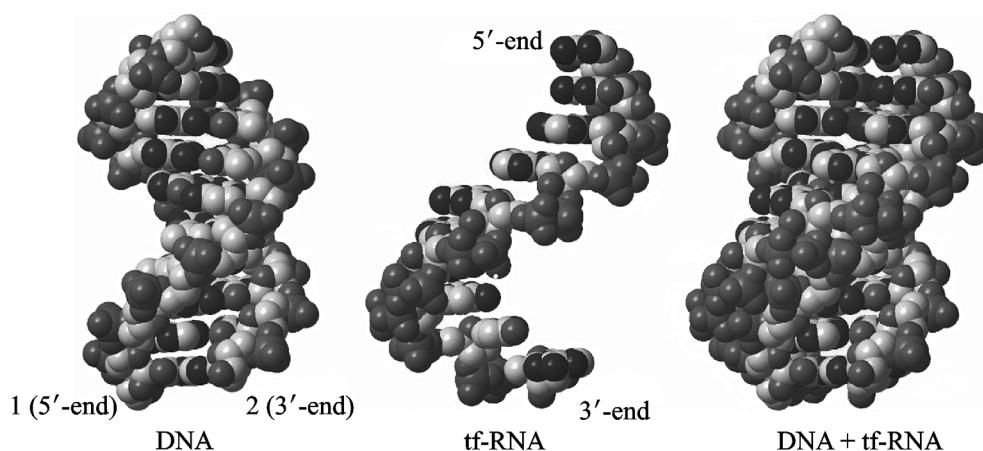


Рис. 5. Локализация тф-РНК (tf-RNA) в большой бороздке ДНК (из: Petrov, 2006).

Ранее эта идея была высказана мной в связи с другими известными фактами, которые тоже ставят под сомнение локальное плавление ДНК во время синтеза РНК (Petrov, 2006). Если отказаться от гипотезы образования транскрипционного пузырька, то единственным механизмом, объясняющим считывание информации, может быть предположение о синтезе РНК в большой бороздке ДНК. Такая модель транскрипции была предложена мной в указанной выше работе, где описаны как детали самой модели, так и ее отрицательные стороны. Основа модели — предположение о синтезе гипотетического промежуточного продукта, названного «транскрипционным фрагментом РНК» (tf-RNA). Ниже представлены компьютерные модели, отражающие принципиальные особенности этого фрагмента (рис. 4, 5).

В заключение необходимо подчеркнуть следующее. Если митомицин С, сшивая цепи ДНК в области малой бороздки, действительно не препятствует синтезу РНК в большой бороздке, то он, по-видимому, не должен оказывать выраженного токсического эффекта на клетки, находящиеся в фазе G₀, т. е. на дифференцированные клетки. Очевидно, это очень важно при лечении злокачественных опухолей, которые, как и культивируемые клетки HeLa, интенсивно пролиферируют.

Благодарю за помощь и обсуждение своих коллег О. А. Петухову, Ю. А. Негуляеву, Н. В. Цупкину и А. М. Кольцову.

Список литературы

- Kольцова А. М., Воронкина И. В., Гордеева О. Ф., Зенин В. В., Лифанцева Н. В., Мусорина А. С., Смагина Л. В., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2012. Разработка новой бесфибральной системы и характеристика полученных в ней сублиний эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании. Цитология. 54 (12) : 637—651.
- Anjos C. P., Vasconcelos A. C., Crosara P. F., Anjos G. C., Becker C. G., Guimarães R. E. 2012. Apoptosis in eosinophilic nasal polyps treated in vitro with mitomycin C. Braz. J. Otorhinolaryngol. 78 : 32—37.
- Bizanek R., McGuinness B. F., Nakanishi K., Tomasz M. 1992. Isolation and structure of an intrastrand cross-link adduct of mitomycin C and DNA. Biochemistry. 31 : 3084—3091.
- Damia G., Broggini M. 2004. Cell cycle checkpoint proteins and cellular response to treatment by anticancer agents. Cell Cycle. 3 : 46—50.
- Kim J. H., Kim H. S., Choi D. R., Jang G., Kwon J. H., Kim H. Y., Jung J. Y., Kim H. J., Song H. H., Shin Y. H., Jung S. Y., Kim B. C., Zang D. Y. 2011. A phase II study of mitomycin-C and S-1 as third-line chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. Oncol. Lett. 2 : 1253—1256.
- Livneh E., Fishman D. D. 1997. Linking protein kinase C to cell-cycle control. Eur. J. Biochem. 248 : 1—9.
- Nudler E. 1999. Transcription elongation: structural basis and mechanisms. J. Mol. Biol. 288 : 1—12.
- Ott M., Geyer M., Zhou Q. 2011. The control of HIV transcription: keeping RNA polymerase II on track. Cell Host Microbe. 10 : 426—435.
- Park J. S., Roberts J. W. 2006. Role of DNA bubble rewinding in enzymatic transcription termination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103 : 4870—4875.
- Petrov Yu. P. 2006. Is RNA synthesis possible without transcription bubble formation? J. Biol. Sci. 6 : 532—539.
- Pines J. 1991. Cyclins: wheels within wheels. Cell Growth Differ. 2 : 305—310.
- Rink S. M., Lipman R., Alley S. C., Hopkins P. B., Tomasz M. 1996. Bending of DNA by the mitomycin C-induced, GpG intrastrand cross-link. Chem. Res. Toxicol. 9 : 382—389.
- Shi K., Wang D., Cao X., Ge Y. 2013. Endoplasmic reticulum stress signaling is involved in mitomycin C (MMC)-induced apoptosis in human fibroblasts via PERK pathway. PLoS ONE 8 : e59330.
- Snodgrass R. G., Collier A. C., Coon A. E., Pritsos C. A. 2010. Mitomycin C inhibits ribosomal RNA. A novel cytotoxic mechanism for bioreductive drugs. J. Biol. Chem. 285 : 19 068—19 075.
- Tomasz M., Lipman R., Chowdary D. 1987. Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. Science. 235 : 1204—1208.
- Volpatto M., Phillips R. M. 2007. Tailoring targeted therapy to individual patients: lessons to be learnt from the development of mitomycin C. Cancer Genomics Proteomics. 4 : 175—186.
- Wang Y. W., Ren J. H., Xia K., Wang S. H., Yin T. F., Xie D. H., Li L. H. 2012. Effect of mitomycin on normal dermal fibroblast and HaCat cell: an *in vitro* study. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 13 : 997—1005.
- Weng M. W., Zheng Y., Jasti V. P., Champeil E., Tomasz M., Wang Y., Basu A. K., Tang M. S. 2010. Repair of mitomycin C mono- and interstrand cross-linked DNA adducts by UvrABC: a new model. Nucleic Acids Res. 38 : 6976—6984.
- Wu Z., Li S., Wang N., Liu W. 2013. A comparative study of the safety and efficacy effect of 5-fluorouracil or mitomycin C mounted biological delivery membranes in a rabbit model of glaucoma filtration surgery. Clin. Ophthalmol. 7 : 655—662.

Поступила 1 VIII 2013

RESPONSE OF HeLa CELLS TO MITOMYCINE C. I. CELL DIVISION

Yu. P. Petrov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: yupe3ov@mail.ru

Using light microscopy, time-lapse imaging, and digital image analysis, the effect of mitomycin C (10 µg/ml) on HeLa-M cells has been studied. It has been shown that, after a 2 h contact with mitomycin, the cells could be separated into 2 groups: M-I — the functional cells surviving after division but non-entering mitosis any more; M-II — the cells entering mitosis but incapable to finish it; they are lost. Mitomycin C is known to specifically block DNA replication being located in the DNA minor groove. It should inhibit PHK synthesis if one follows the standard hypothesis of a transcription bubble formation. However, increasing the cell and nucleolus area during the M-I cell growth suggests that RNA and protein synthesis is not blocked. The author concludes that the presented data confirm his hypothesis about RNA synthesis in the major DNA groove (Petrov, 2006).

Key words: mitosis, cell nucleus, nucleolus, transcription, transcription bubble.