

© 1991

ВЛИЯНИЕ УФ-МИКРООБЛУЧЕНИЯ ЦЕНТРОСОМЫ НА ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОК

II. ПОСЛЕДСТВИЯ ОБЛУЧЕНИЯ В АНАФАЗЕ: ЗАВЕРШЕНИЕ ДЕЛЕНИЯ И СУДЬБА ИНТЕРФАЗНОЙ КЛЕТКИ

Р. Э. Узбеков, И. А. Воробьев

Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии, Московский университет

Микрооблучение УФ светом (280 нм) centrosомы (полюса веретена деления) культивируемых клеток в ранней анафазе приводит к замедлению и остановке движения хромосом к облученному полюсу вследствие быстрой (в течение 1—2 мин) дезорганизации полуверетена. Движение хромосом к противоположному (необлученному) полюсу не нарушается. Цитотомия после микрооблучения проходит со значительной задержкой. В ряде случаев образуются дополнительные перетяжки или происходит «вскипание» цитоплазмы. Непосредственно после митоза сеть микротрубочек в двух сестринских клетках, одна из которых получила облученную centrosому, различается незначительно, однако через 2 ч в клетке с облученной centrosомой микротрубочек может быть существенно меньше. Инкубация клеток с нокадазолом (0.15 мкг/мл, 0.5—1.5 ч) показала, что в клетке с облученной centrosомой практически отсутствует система микротрубочек, радиально расходящихся от centrosомы. Облучение в анафазе других районов цитоплазмы не приводит к описанным выше эффектам.

В предыдущем сообщении мы описали изменение хода митоза культивируемых клеток после микрооблучения ультрафиолетовым (УФ) светом centrosомы клеток в метафазе (Узбеков, Воробьев, 1991). Поскольку этот эффект зависел от момента, когда было проведено облучение, мы решили выяснить, во-первых, как будет сказываться облучение полюса веретена деления в анафазе на завершении клеточного деления, а во-вторых, поскольку после облучения в конце метафазы деление завершается, как будет вести себя клетка, перешедшая в интерфазу с облученной centrosомой. Последний вопрос в настоящее время практически не исследован, если не считать краткого упоминания в статье Бернса с соавторами (Berns et al., 1981) о том, что клетки с облученной centrosомой вообще не способны вступать в следующий митоз или же делятся со значительной задержкой.

На данном этапе исследования мы попытались ответить на следующие вопросы. 1. Влияет ли микрооблучение полюса веретена в анафазе на процесс расхождения хромосом? 2. Как клетка с облученной centrosомой переходит из митоза в интерфазу (цитотомия, распластывание, формирование ядра)? 3. Способна ли облученная centrosома сформировать нормальную интерфазную сеть микротрубочек (МТ)?

Материал и методика

В качестве объекта исследования использовали клетки культуры ткани СПЭВ (почка эмбриона свиньи). Клетки выращивали на круглых кварцевых покровных стеклах, которые затем монтировали

в модифицированную камеру Дворака—Штоттлера для прижизненных наблюдений. Для культивирования использовали среду 199 с 10% сыворотки плодов коровы.

Для микрооблучения применяли специальную установку, подробно описанную нами ранее (Узбеков, Воробьев, 1991). Облучение проводили через интерференционный светофильтр с помощью кварцевого объектива Ultrafluor 100/1.25, глицериновая иммерсия («Оптон», ФРГ). Диаметр светового (УФ) пучка в фокальной плоскости объектива составлял 1.6—2.0 мкм. Плотность мощности облучения составляла около 4×10^{-2} эрг/(мкм² с). Прижизненные наблюдения клеток осуществляли в фазовом контрасте (объектив Plan-Neofluar 40/0.9, глицериновая иммерсия). Клетки фотографировали с помощью микрофотонасадки МФН-12 на пленку Микрат-300.

Условия лизиса, фиксации и иммунофлуоресцентного окрашивания клеток были описаны ранее (Узбеков, Воробьев, 1991). Для частичной деполимеризации системы МТ в ряде опытов клетки обрабатывали нокодазолом (Aldrich Chemie). Маточный раствор нокодазола (1 мг/мл) в диметилсульфоксиде разводили в культуральной среде до конечной концентрации 0.15 мкг/мл. Для инкубации облученных клеток с нокодазолом чистую среду культивирования замещали на среду с нокодазолом, пропуская через камеру для прижизненных наблюдений 10-кратный объем среды с митостатиком.

Результаты

Микрооблучение центросомы (полюса веретена деления) и (в качестве контроля) хромосомы или участка цитоплазмы вне веретена деления производили спустя 60—90 с после начала анафазного движения хромосом. За это время обе группы хромосом перемещались к полюсам на расстояние, примерно равное ширине метафазной пластинки. В предварительных экспериментах мы выяснили, что облучение полюса веретена продолжительностью от 5 до 15 с не полностью блокирует митоз, а лишь приводит к некоторым аномалиям его. Облучение продолжительностью 30 с и выше приводило к значительному повреждению клеток. В итоге для экспериментов было выбрано время облучения 15 с. Все приводимые ниже результаты получены при облучении в этой дозе.

Из 63 клеток, у которых был облучен полюс веретена, 61 разделилась на 2 дочерние клетки, которые перешли в интерфазу. В 2 клетках цитотомия не завершилась и образовались двудерные клетки.

Наблюдавшийся сразу после облучения одной центросомы эффект (рис. 1, а, б; см. вкл. VI) состоял в том, что движение хромосом к облученному полюсу замедлялось по сравнению с их движением к необлученному полюсу в той же клетке и в большинстве случаев в течение 1—2 мин полностью прекращалось. Далее, в то время как хромосомы противоположного полуверетена группировались вокруг необлученного полюса, вокруг облученного этого не происходило, а хромосомы продолжали оставаться в виде пластинки в течение 10 мин и дольше (рис. 1, в; 2, г; см. вкл. VII). Таким образом, в телофазе расстояние между двумя группами хромосом оказывалось примерно в 1.5 раза меньше, чем при нормальном делении.

В большинстве исследованных клеток после облучения полюса веретена в анафазе наблюдалась задержка цитотомии на 10—15 мин по сравнению с контрольными клетками (см. таблицу). При этом могли образовываться дополнительные перетяжки, отделяющие небольшие лопасти цитоплазмы, около экваториальной плоскости, либо происходило так называемое вскипание цитоплазмы, т. е. образование вздутий по всей поверхности делящейся клетки. Однако во всех случаях, несмотря на задержку, цитотомия завершалась и возникали дочерние клетки. В результате того, что было нарушено нормальное движение хромосом к облученному полюсу, а основная перетяжка образовывалась между двумя группами хромосом посередине, в 10 случаях из 63 дочерняя клетка с облученным полюсом имела после цитотомии заметно больший размер, чем ее сестринская (рис. 1, з; 2, г).

Деконденсация хроматина в обеих дочерних клетках, возникших в результате деления материнской с облученной центросомой, идет параллельно, но через 1 ч после деления морфология ядер двух дочерних клеток начинает различаться: становится заметно, что рост ядрышек из проядрышек идет медленнее в той

Результаты микрооблучения различных участков клеток в анафазе

Облучаемый участок клетки	Число облученных клеток	Число нормально разделившихся клеток	Число клеток с различными нарушениями митоза		
			с нарушением движения хромосом	с задержкой цитотомии	с блоком цитотомии
Центросома	63	3	60	58	2
Цитоплазма	10	9	0	1	0
Хромосомы	20	2	12	18	0

Примечание. Длительность облучения — 15 с. В связи с тем что в одной клетке могло наблюдаться одновременно несколько различных эффектов, общее число клеток, указанное во втором столбце, меньше, чем сумма чисел в остальных столбцах в соответствующей строке.

клетке, которая получила облученную центросому. В течение 10—15 ч в ее ядре сохраняется от 5 до 15 и более плотных округлых телец, напоминающих проядрышки. Затем их число снижается до 3—5, но сохраняются их морфологические отличия от ядрышек в сестринской клетке, выражающиеся в том, что они имеют более округлую форму, меньший размер и больший контраст (при наблюдении методом фазового контраста). Кроме того, оказалось, что в дочерней клетке с облученной центросомой ядро долго располагается вблизи остаточного тельца, в то время как в сестринской клетке оно достаточно быстро занимает центральное положение.

Для выяснения динамики изменения системы МТ клетки, у которых в анафазе были облучены центросомы, были зафиксированы через разные сроки после облучения (от 1 мин до 4 ч) и с помощью иммунофлуоресценции в них выявляли микротрубочки. Всего таким образом было исследовано 43 клетки. В клетках, зафиксированных через 1 мин после облучения, различия между полуверетенами незначительны: между облученным полюсом веретена и хромосомами наблюдается некоторое разрежение пучков МТ; заметно также, что полуверетено со стороны необлученного полюса несколько короче (рис. 2, а, б). Однако уже через 3 мин после облучения центросомы полуверетено со стороны облученного полюса разбирается, и только вдоль пластинки хромосом остаются короткие пучки МТ. Межполюсные МТ при этом сохраняются (рис. 2, в, г).

Исследование клеток, зафиксированных в более поздние сроки (10 мин и более), показало, что микрооблучение центросомы в анафазе заметно не влияет на остаточное тельце. Кроме того, со стороны облученного полюса уже через 8—10 мин выявляются внеполюсные цитоплазматические центры схождения МТ, в то время как с противоположной стороны МТ расходятся только от полюса (рис. 2, д). В участках цитоплазмы, отделенных при цитотомии дополнительными перетяжками, МТ нет.

Формирование интерфазной сети МТ в дочерней клетке, получившей облученную центросому, и в ее сестринской клетке происходит не совсем одинаково. Если сеть МТ в сестринской клетке не отличается от контроля, то в клетке с облученной центросомой их сеть бывает значительно менее густой. Не выявляется также одного ярко выраженного центра организации МТ (рис. 3, а; см. вкл. VII).

Большое общее количество цитоплазматических МТ в интерфазных клетках СПЭВ маскирует МТ, отходящие непосредственно от центросомы. Для того чтобы выявить их, мы за 0.5—1.5 ч перед лизисом клеток вводили в среду культивирования нокодазол в концентрации 0.15 мкг/мл. Всего таким образом было исследовано 20 клеток, получивших облученную центросому.

В качестве контроля были исследованы: 1) сестринские клетки тех клеток, которые получили облученную центросому; 2) клетки, у которых была облучена цитоплазма; 3) клетки, у которых были облучены хромосомы. У контрольных клеток всех трех групп картина была однотипной: при обработке нокодазолом в них в основном разбираются свободные цитоплазматические МТ, и центросома с отходящими от нее МТ отчетливо выявляется в виде звезды. В отличие от

этого в 15 из 20 клеток с облученной центросомой «звезда» отсутствовала, а имелись лишь одиночные МТ, неупорядоченно расположенные в цитоплазме (рис. 3, в, з).

Обсуждение

Ранее было показано, что УФ-микрооблучение участка веретена, не содержащего центросомы, приводит к обратимому разрушению МТ в облученном районе (Forer, 1965; Leslie, Pickett-Heaps, 1984; Wilson, Forer, 1988; Snyder et al., 1989). Если облучение производилось в анафазе, то восстановление МТ происходило не от полюсов, а от кинетохоров (Forer, 1965; Wilson, Forer, 1988). Поскольку в анафазе центросома не является центром организации МТ (хотя она и расположена в фокусе схождения пучков МТ), можно ожидать, что при повреждении ее МТ в полуверетене смогут восстанавливаться. Однако вместо восстановления полуверетена со стороны облученного полюса мы наблюдали появление нескольких цитоплазматических нецентросомальных центров организации МТ. Наличие дополнительных центров со стороны поврежденной центросомы, в то время когда в противоположном полуверетене сохраняется нормальная структура (все МТ сходятся только в район центросомы), может свидетельствовать о том, что до конца митоза существует негативный контроль со стороны центросомы за полимеризацией интерфазных МТ.

Несмотря на повреждение одного из полюсов веретена УФ-облучением в дозе, в 3 раза превышающей дозу облучения, которая вызывает нарушение функций центросомы в метафазе (Узбеков, Воробьев, 1991), сохраняющихся структур веретена оказывается достаточно для завершения анафазы и цитотомии. Результаты настоящей работы согласуются со сделанными ранее наблюдениями о том, что облучение центросомы в анафазе не может блокировать цитотомии (Berns et al., 1981, Воробьев и др., 1988; Узбеков и др., 1988). Однако в наших опытах в отличие от упомянутых выше работ наблюдался значительный «быстрый» эффект — остановка движения хромосом к облученному полюсу. По-видимому, УФ-микрооблучение центросомы приводит к более значительным нарушениям по сравнению с микрооблучением видимым светом (Узбеков и др., 1988).

Первым проявлением функциональной недостаточности облученной центросомы являются замедление и прекращение движения хромосом к облученному полюсу. Кроме уже упоминавшейся работы Бернса с соавторами (Berns et al., 1981) влияние микрооблучения полюса веретена в поздних фазах митоза (анафаза и телофаза) изучали Наканиши и Като (Nakanishi, Kato, 1965). Они показали, что после облучения района клетки, содержащего центросому в телофазе, хромосомы, находящиеся вблизи облученного полюса веретена, смещаются к необлученному полюсу. Однако в отличие от того, что было получено в наших экспериментах, в опытах Наканиши и Като микрооблучение приводило к сдвигу всех хромосом к необлученному полюсу веретена с последующим блоком цитотомии, т. е. к эффектам, которые, по нашим данным, характерны для ответа клетки на микрооблучение центросомы в ранней метафазе (Узбеков, Воробьев, 1991). В наших экспериментах при облучении полюса веретена деления после начала анафазного движения хромосом в подавляющем большинстве случаев цитотомия не блокировалась (см. таблицу).

Нарушение нормального разделения цитоплазмы, выражающееся в образовании дополнительных перетяжек и в разной величине дочерних клеток, может быть как следствием непосредственно инактивации одной из центросом, так и результатом расхождения хромосом на меньшее, чем в норме, расстояние. Если принять последнее предположение, то можно утверждать, что закладывающееся в метафазе сократимое кольцо способно смещаться во время анафазы таким

образом, чтобы все время оказываться на равном удалении от разошедшихся дочерних групп хромосом.

Степень распластанности двух сестринских клеток существенно не различается. По-видимому, наличие нормальной centrosомы не является необходимым условием для распада centrosомы клеток при переходе клеток культуры из митоза в интерфазу, что согласуется с наблюдениями над цитотомией после многополюсного митоза (Keryer et al., 1984; Алиева, Воробьев, 1989).

Задержка формирования нормальных ядрышек в клетках с облученной centrosомой связана, как мы полагаем, с тем, что при облучении полюса веретена в анафазе дифрагированным УФ светом частично повреждаются и хромосомы, которые в анафазе располагаются достаточно близко к облучаемому району клетки и обладают намного большей чувствительностью по сравнению с цитоплазмой (Сахаров, Воронкова, 1966).

В отличие от работ Бернса и соавторов (Berns et al., 1977, 1981; Berns, Richardson, 1977) и нашей предыдущей работы (Воробьев и др., 1988) в настоящем исследовании мы проследили за дальнейшей судьбой облученных клеток, оценивая способность поврежденной микрооблучением centrosомой формировать интерфазную сеть МТ. Как показали наши опыты, в клетках с облученными хромосомами или участком цитоплазмы, не содержащим centrosомы, интерфазная сеть МТ формируется нормально. В ряде случаев практически нормальная сеть МТ наблюдалась и после облучения centrosомы. Однако в условиях повышенной критической концентрации полимеризации тубулина при действии на клетки нокадазола (0.15 мкг/мл) в клетках с облученной centrosомой радиальной системы МТ не выявляется. Это показывает, что в начале интерфазы centrosома в этих клетках функционально неактивна.

Сравнение двух сестринских клеток, одна из которых получила от материнской centrosомы, облученную в анафазе митоза, позволяет заключить, что формирование системы МТ в интерфазе возможно и без участия centrosомы. Аналогичные данные были получены на лишенных centrosомы цитопластах. Однако система МТ в таких клетках (цитопластах) отличается от нормальной. Она часто более разрежена, никогда не имеет выраженного центра организации и сравнительно легко разрушается под воздействием митостатиков. Таким образом, можно сделать вывод о том, что в интерфазной клетке centrosома необходима для формирования только радиальной системы относительно устойчивых МТ.

Авторы выражают свою благодарность проф. Ю. С. Ченцову за постоянное внимание и поддержку в настоящей работе, а также М. С. Вотчалу за техническое содействие в создании и отладке установки для УФ-микрооблучения.

Список литературы

- Алиева И. Б., Воробьев И. А. Поведение клеток и распределение центриолей при многополюсном митозе, индуцированном действием нокадазола // Цитология. 1989. Т. 31, № 6. С. 633—641.
- Воробьев И. А., Драчев В. А., Ченцов Ю. С. Инактивация центросом в митозе лазерным микрооблучением // Биополимеры и клетка. 1988. Т. 4, № 6. С. 313—321.
- Сахаров В. Н., Воронкова Л. Н. О последствиях локального облучения ядрышка живой клетки ультрафиолетовым микрочулом // Генетика. 1966. № 6. С. 144—148.
- Узбеков Р. Э., Драчев В. А., Воробьев И. А. Влияние микрооблучения центросомы на поведение клеток // Исследование структуры, физических свойств и энергетики биологически активных молекул: Тез. докл. IV координационного семинара. Ереван, 1988. С. 44—45.
- Узбеков Р. Э., Воробьев И. А. Влияние УФ-микрооблучения центросомы на поведение клеток. I. Распад митотического веретена и нарушение деления клетки при облучении в метафазе // Цитология. 1991. Т. 33, № 2. С. 15—22.
- Berns M. W., Aist J., Edwards J., Strahs K., Glrton J., McNeill P., Rattner J. B., Kitzes M., Hammer-Wilson M., Liaw L.-H., Siemens A., Koonce M., Peterson S., Brenner S., Burt J., Walter R., Bryant P. J., van Dyk D., Coulombe J., Cahill T., Berns G. S. Laser microsurgery in cell and developmental biology // Science. 1981. Vol. 213. P. 505—513.

Bents M. W., Rattner J., Brenner S., Richardson S. The role of the centriolar region in animal cell mitosis // *J. Cell Biol.* 1977. Vol. 72. P. 351—367.

Herns M. W., Richardson S. M. Continuation of mitosis after selective laser microbeam destruction of the centriolar region // *J. Cell Biol.* 1977. Vol. 75. P. 977—982.

Forer A. Local reduction of spindle fiber birefringence in living (*Nephrotoma surturalis*) spermatocytes induced by ultraviolet microbeam irradiation // *J. Cell Biol.* 1965. Vol. 25. P. 95—117.

Keryer G., Ris H., Borisy G. G. Centriolar distribution during tripolar in Chinese hamster ovary cells // *J. Cell Biol.* 1984. Vol. 98. P. 2222—2229.

Leslie R. J., Pickett-Heaps J. D. Spindle microtubule dynamics following ultraviolet-microbeam irradiation of mitotic diatoms // *Cell.* 1984. Vol. 36. P. 717—727.

Nakanishi Y. A., Kato H. Unusual movement of the daughter chromosome group in telophasic cells following the exposure to ultraviolet microbeam irradiation // *Cytologia.* 1965. Vol. 30. P. 213—221.

Snyder J. A., Armstrong L., Stonington O. G., Spurck T. P., Pickett-Heaps J. D. Analysis of mitotic spindle forces in UV microbeam irradiated cells // ASCB summer res. conf. on chromosome structure and segregation. 1989. P. 40.

Wilson P. J., Forer A. Ultraviolet microbeam irradiation of chromosomal spindle fibres produces an area of reduce birefringence and shears microtubules, allowing study of the dynamic behavior of new free ends in vivo // *J. Cell Sci.* 1988. Vol. 91. P. 455—468.

Поступила 26 II 1991

EFFECT OF UV MICROIRRADIATION OF THE CENTROSOME ON CELL BEHAVIOUR.

II. CONSEQUENCES OF MICROIRRADIATION IN ANAPHASE: THE COMPLETION OF CELL DIVISION AND DESTINATION OF THE INTERPHASE CELL

R. E. Uzbekov, J. A. Vorobjev

Interfaculty Research Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, Moscow University

Ultraviolet (280 nm) microbeam irradiation of the centrosome (spindle pole) in the early anaphase slows down and then stops chromosome movement towards the irradiated pole. This happens as a result of rapid (in 1—2 min) disorganization of the half spindle. Chromosome movement towards the opposite pole continues normally. Irradiation of the centrosome also affects cytotomy — the residual body is formed later than in the normal cell. In some cases additional constrictions are formed or the cytoplasm starts blebbing. Immediately after division the microtubule network in two daughter cells (one of them with irradiated centrosome) is similar. Two hours later in the irradiated cell the amount of microtubules is often less than in the sister cell. Incubation with nocodazole (0.5—1.5 h, 0.15 $\mu\text{g/ml}$) shows that in the irradiated cells microtubules radiating from the centrosome are practically absent. Irradiation of other regions of the cytoplasm does not cause any of the effects described above.

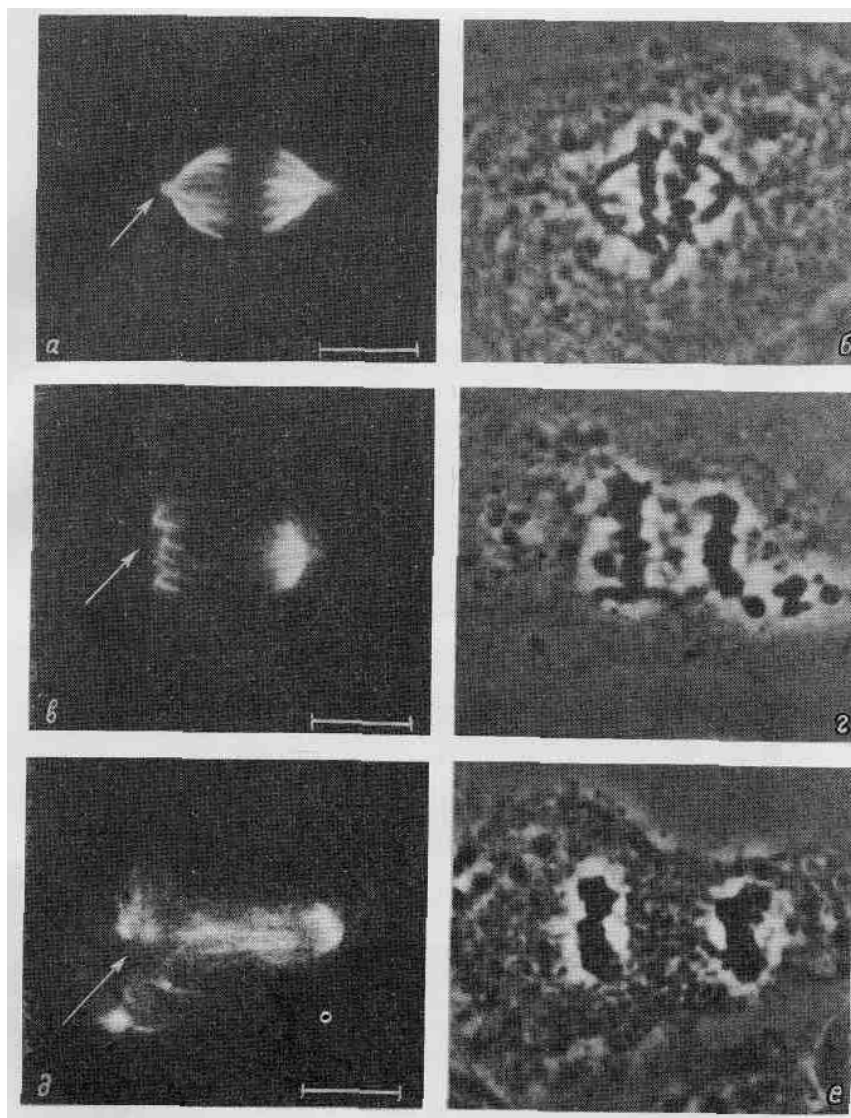


Рис. 2. Система МТ, выявляемая с помощью антител к тубулину, после облучения centrosомы в ранней анафазе.

a, б - 1 мин после облучения; *в, г* - 3 мин; *д, е* - 5 мин. Стрелкой показана облученная centrosома. *а, в д* - иммунофлуоресценция; *б, г, е* - фазовый контраст. Об. 40х, ок. 10х. Масштабная линия 10 мкм.

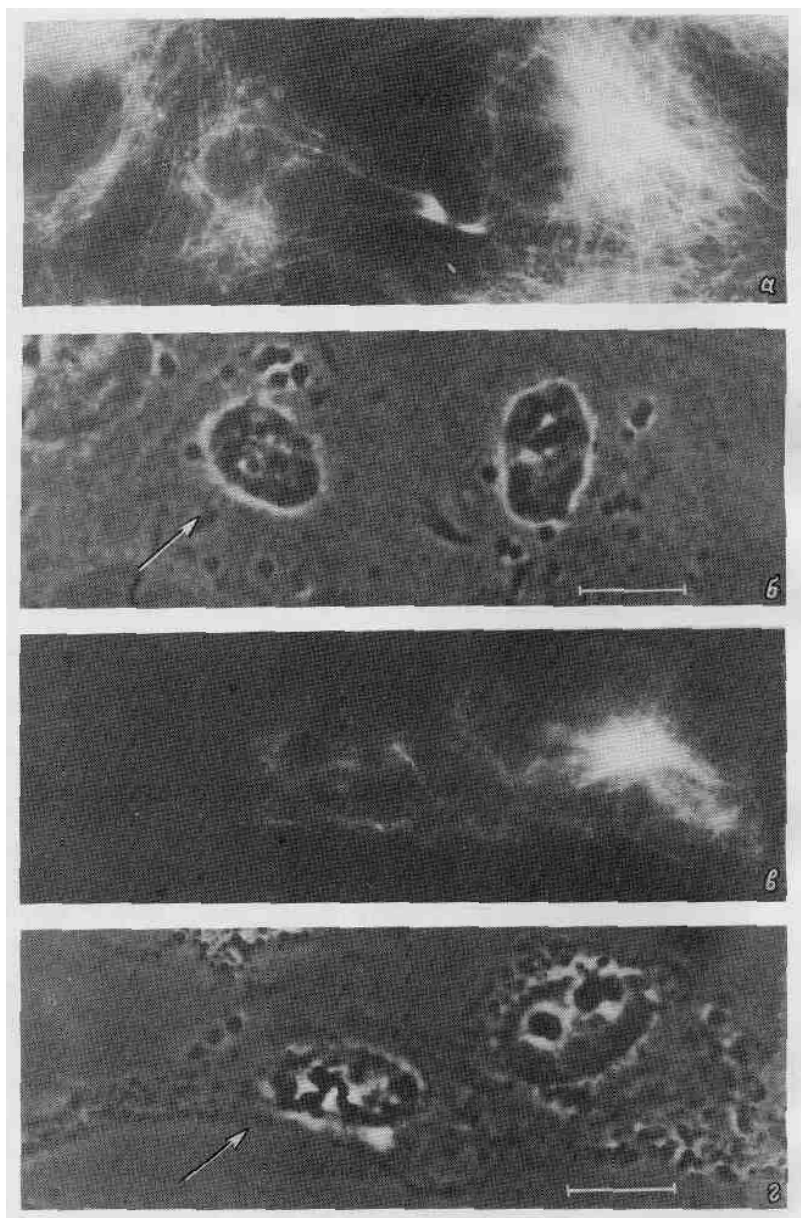


Рис. 3. Интерфазная сеть МТ в дочерних клетках, возникающих в результате деления материнской клетки, у которой в анафазе был облучен один из полюсов веретена.

а, б — 1 ч 10 мин после облучения; *в, г* — 3 ч 12 мин после облучения, 35 мин воздействия нокадазола (0,15 мкг/мл). Стрелкой показана клетка с облученной центросомой. *а, в* — иммунофлуоресценция; *б, г* — фазовый контраст. Об. 40х, ок. 10х. Масштабная линия 10 мкм.