

Генетична нестабільність ембріональних гермінативних клітин лінії G1 миші та порушення функцій контрольної точки мітозу і білка p53

А. П. Яцишина, С. М. Кваша, О. В. Підпала, Т. П. Рубан, І. М. Вагіна,
Л. Л. Лукаш

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

a.p.iatsyshyna@imbg.org.ua

Проаналізовано життєздатність клітин лінії G1 миші при обробці колхіцином у різних концентраціях. Встановлено меншу чутливість до дії колхіцину клітин лінії G1 на 26-му та 114-му пасажах порівняно з ембріональними фібробластами миші лінії BALB/c, що свідчить про ослаблення контрольної точки мітозу в клітинах лінії G1. За допомогою Вестерн-блот аналізу виявлено білок p53 на низькому рівні як у клітинах лінії G1, так і її субліній G1-OA та G1-T. Методом імунопреципітації в клітинах лінії G1 визначено присутність білка p53 обох типів: як дикого, так і мутантного, що може призводити до порушення його функції. Генетична нестабільність клітин лінії G1 миші пов'язана з порушенням функції контрольної точки мітозу і, ймовірно, з функціональною інактивацією p53.

Ключові слова: клітина миші in vitro, контрольна точка мітозу, хромосомна нестабільність, p53.

Вступ. Хромосомна нестабільність, втрата чи набуття хромосом, а також анеуплоїдія, часто спостерігаються у різноманітних пухлинах людини та вважаються одним із маркерів солідних пухлин [1]. Зміни плоідності є значнішими на пізніх стадіях розвитку пухлин, тому хромосомна нестабільність корелює із набуттям малігнізованих фенотипів [2, 3]. Існує думка, що хромосомна нестабільність діє як мутатор, підвищуючи швидкість накопичення мутацій, які призводять до утворення пухлини [4]. Молекулярні основи хромосомної нестабільності вивчено недостатньо, однак останнім часом значний інтерес зосереджено на питанні генетичних і епігенетичних змін генів контрольної точки мітозу

(або контрольної точки збирання веретена), функція якої полягає у забезпеченні рівноцінного розподілу хромосом під час мітозу між двома дочірніми клітинами [5–7]. Оскільки переважна більшість клітин пухлин не здатні зупинити свій поділ у відповідь на присутність таких речовин, як нокодазол [8], пошук мутацій, що спричиняють хромосомну нестабільність, збузився до пошуку мутацій генів контрольної точки мітозу. Подібні мутації виявлено у деяких клітинних лініях людини, які виявляють хромосомну нестабільність [9]. Однак показано, що в клітинах ссавців пошкодження контрольної точки мітозу спричиняє, у першу чергу, загибель клітин [1, 10], а для появи фенотипу хромосомної нестабільності необхідна, наприклад, одночасна втрата і функції p53 [1]. Кореляцію між хромосомною нестабільністю (змінною плоідності)

та втратою або мутаційною інактивацією p53 знайдено у багатьох експериментальних і клінічних дослідженнях [11–17].

Онкосупресорний ген *p53* (у людини ген *TP53*, у миші – *Trp53*) найчастіше мутований у пухлинах людини, його мутації виявлено у понад 50 % пухлин людини [18–20]. Мутаційна інактивация і/або делеція p53 зустрічається у різних типах пухлин при спорадичних і сімейних онкозахворюваннях [18, 19]. Білок p53 виконує численні функції [21, 22], зокрема, бере участь в інгібуванні ненормального росту клітин [23] та запуску програмованої смерті клітин [24]. Завдяки своїй функції у забезпеченні геномної цілісності та елімінації пошкоджених клітин p53 отримав назву «охоронець геному» [25]. Крім того, p53 має й такі важливі функції, як репарація ДНК [26], інгібування ангиогенезу [27]; p53 є транскрипційним фактором багатьох генів [28]. Активация генів – мішеней p53 може призводити до індукції зупинки росту або перед реплікацією ДНК у G1 фазі клітинного циклу, або перед мітозом у G2 фазі. Зупинка росту надає можливість клітині репарувати пошкоджену ДНК, а за допомогою апоптозу елімуються пошкоджені клітини, що запобігає закріпленню пошкодження ДНК як мутації.

У нормальних клітинах білок p53 нефункціональний, він активується у відповідь на різні сигнали, зокрема, на пошкодження ДНК, ненормальні проліферативні сигнали, гіпоксію, втрату адгезії клітин та ін. [27]. У більшості пухлин людини p53 також нефункціональний або функціонує некоректно [27]. Інактивация функції p53 може досягатися різними шляхами, в окремих випадках не лише за допомогою мутації гена *p53*, а також і в разі змін функцій білка p53 при його зв'язуванні з вірусними білками, при локалізації білка у цитоплазмі, в результаті змін у генах, що кодують білки (наприклад, *Mdm2*), асоційовані з p53 тощо [27].

Вивчені нами раніше морфологічні та ростові характеристики нової клітинної лінії G1 гермінативних клітин миші ембріонального походження [29, 30], а також результати її детального цитогенетичного аналізу [31] вказують на протікання спонтанної трансформації досліджуваних клітин в умовах *in vitro*, що супроводжується інтенсивною

каріотипічною еволюцією. Виявлені різні аберантні мітози [30], а також високі частоти анеуплоїдних клітин у популяціях клітин лінії G1 на різних пасажах [31] свідчать про дерегуляцію клітинного поділу та послаблення контрольної точки веретена [6]. Наявність хромосомних абераций у досліджуваних клітинах [31, 32] вказує також на пошкодження репарації. Тому для виявлення можливих чинників хромосомної нестабільності у клітинах миші за умов *in vitro* проаналізовано експресію гена *Trp53* на рівні білка, а також досліджено життєздатність клітин лінії G1 після обробки колхіцином на різних пасажах культивування *in vitro*.

Матеріали і методи. *Клітинні культури.* У роботі використано клітинну лінію G1 миші, отриману з ембріонального матеріалу лабораторної миші лінії BALB/c у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, та її сублінії G1-OA і G1-T, відібрані за ознаками трансформованого фенотипу *in vitro* [29, 30], а також 12,5-денні ембріони миші лінії BALB/c, з яких отримано клітинну лінію G1 миші [29].

Клітини культивували у середовищі DMEM («Sigma», США) із додаванням 1–10 % ембріональної сироватки теляти («Sigma»), 100 ОД/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину.

Аналіз активності контрольної точки мітозу. Для аналізу здатності клітин виживати та ділитися після тривалої обробки колхіцином їх висівали у 96-лункові планшети по 15 тис. на лунку та інкубували при температурі 37 °C і 5 % CO₂ у ростовому середовищі з відповідною концентрацією ембріональної сироватки теляти протягом 24 год. Наступні 24 год клітини інкубували у ростовому середовищі із додаванням 0,05; 0,5 і 5 мкг/мл колхіцину та без нього. Негативним контролем слугували клітини без додавання колхіцину (контроль 1, K-1) та з додаванням розчинника колхіцину – води (контроль 2, K-2). Після обробки клітини культивували протягом 0 і 48 год у ростовому середовищі. Розчинник додавали до ростового середовища у кількості, яка відповідала концентраціям колхіцину 0,5 і 5 мкг/мл. Для визначення кількості живих клітин у зазначений час до ростового середовища додавали барвник Triazolyl blue tetrazolium bromide («Sigma») у концентрації 75 мкг на 1 мл ростового

середовища та інкубували протягом 4 год при температурі 37 °C і 5 % CO₂. Середовище відбирали, додавали диметилсульфоксид по 200 мкл на лунку, обережно розпіпетовували та спектрофотометрично визначали оптичну густина при 540 нм.

Приготування лізатів клітин ссавців. Клітини вирощували до 70–80 % конфлуенції, після чого двічі відмивали фізіологічним розчином на фосфатному буфері (PBS, pH 7,4) та знімали зі скла за допомогою 0,02 %-го розчину ЕДТА. Суспензію клітин двічі відмивали у розчині PBS (pH 7,4) і центрифугували по 10 хв при 1,5 тис. об/хв. До осаду додавали відповідний об'єм буфера для лізування клітин. Шматочки тканин ембріонів миші лінії BALB/c, отримані в асептичних умовах, промивали у PBS (pH 7,4), розтирали в ступці у рідкому азоті до порошкоподібного стану та лізували.

Щоб здійснити імунопреципітацію, клітини лізували протягом 30 хв на льоду у буфері такого складу: 0,05 М трис-НСl (pH 8,0), 0,15 М NaCl, 0,005 М ЕДТА, 1 % NP-40 і 0,002 М фенілметилсульфонілфлюорид.

Для проведення Вестерн-блот аналізу до осаду клітин додавали буфер такого складу: 0,05 М трис-НСl (pH 8,0), 0,15 М NaCl, 0,005 М ЕДТА, 0,003 М 1,4-дитіотреїтол, 0,002 М фенілметилсульфонілфлюорид та лізували клітини протягом 30 хв на льоду. Після цього лізати клітин соніфікували ультразвуком на льоду тричі по 10 с з інтервалом у 30 с, центрифугували протягом 30 хв за температури 4 °C при 10000 g і відбирали супернатант.

Вестерн-блот аналіз лізатів тканин і клітин. Для визначення концентрації тотального білка у клітинних лізатах застосовували кількісний метод Бредфорда [33]. Гель-електрофорез лізатів клітин проводили згідно з рекомендаціями [34].

Імунопреципітацію та Вестерн-блот аналіз проводили, використовуючи моноклональні антитіла анти-p53 фірми «Chemicon International» (США): 1) РАb240, які в денатурувальних умовах детектують обидві форми білка p53: дикого типу і мутантну, а в нативних – тільки мутантну та 2) антитіла РАb246, які реагують лише з p53 дикого типу. Як вторинні антитіла використано кон'юговані з пероксидазою хрому видоспецифічні антитіла фірми «Jackson ImmunoResearch» (США).

Вестерн-блот аналіз здійснено згідно з методичними рекомендаціями, як у роботі [34]. Для цього білки розділяли одновимірним електрофорезом у 10 %-му SDS-ПААГ. Розділені білки переносили на полівінілдіфлюоридну мембрану («Millipore», США) методом напівсухого переносу в буфері, який містив 39 мМ гліцин, 48 мМ трис основний, 0,037 %-й SDS і 20 %-й метанол, pH 8,3, та за допомогою мокрого переносу в буфері такого складу: 192 мМ гліцин, 25 мМ трис-НСl, 10 %-й метанол, використовуючи прилади фірми «BioRad» (США). Після переносу мембрану інкубували протягом 1 год при постійному перемішуванні в буфері для блокування неспецифічного зв'язування (0,01 М трис-НСl, pH 7,5, 0,15 М NaCl, 5 % знежиреного сухого молока). Далі мембрану інкубували упродовж 1 год за кімнатної температури при постійному перемішуванні у розчині первинних моноклональних антитіл (1 мкг/мл антитіл у розчині для блокування). Відмивали мембрану тричі по 10 хв у буфері, що містив 0,01 М трис-НСl, pH 7,5, 0,15 М NaCl і 0,1 %-й твін-20. Видоспецифічні вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, додавали згідно з рекомендаціями фірми-виробника у розчин для блокування та інкубували з мембраною протягом 1 год при кімнатній температурі та постійному перемішуванні.

Хемілюмінесцентну реакцію мембрани проводили протягом 1 хв у розчині: 100 мМ трис-НСl, pH 8,5, 1,237 мМ 3-амінофталгідрозид (люмінол), 0,673 мМ транс-4-гідроксикорична кислота (p-coumaric acid) і 0,011 % H₂O₂. Мембрану експонували з рентгенівською плівкою фірми «Agfa» (США).

Імунопреципітація. Клітинні лізати центрифугували зі швидкістю 10000 g протягом 30 хв за температури 4 °C. Тотальний білок у кількості 500 мкг інкубували протягом 1 год із 40 мкл 50 %-ї протеїн А-сефарози. Центрифугували зі швидкістю 3000 g протягом 2 хв. До лізату додавали 15 мкл антитіл (1,5 мкг) та інкубували (16 год при 4 °C). Після інкубації з антитілами додавали 60 мкл 50 %-ї протеїн А-сефарози та знову інкубували (1 год при 4 °C). Центрифугували зі швидкістю 3000 g протягом 2 хв. Протеїн А-сефарозу промивали тричі у буфері такого складу: 0,05 М трис-НСl, pH 8,0, 0,15 М NaCl, 0,005 М ЕДТА, 1 %-й NP-40 і 0,002 М

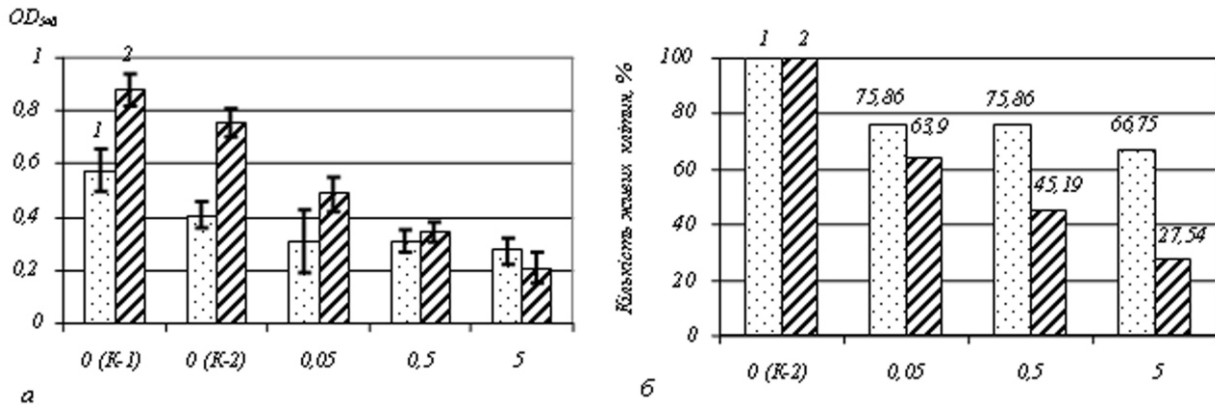


Рис. 1. Аналіз активності контрольної точки мітозу в ембріональних фібробластах миші (ЕФМ, 2-й пасаж *in vitro*): а – кількість живих клітин, абсолютні значення оптичної густини (1 – 0 год; 2 – 48 год); б – відносна кількість живих клітин порівняно із контролем (1 – 0 год; 2 – 48 год). На графіках по осі абсцис – концентрація колхіцину, мкг/мл. К-1 – контроль 1 (тільки клітини); К-2 – контроль 2 (клітини та розчинник колхіцину – вода)

фенілметилсульфонілфлюорид. До протеїн А-сефарози додавали 20 мкл 2-го буфера Леммлі і кип'ятили (10 хв).

Мікрофотографування. Мікрооб'єкти фотографували на мікроскопі Jenaval («Carl Zeiss», Австрія) під об'єктивами 25, 40 та 100 за допомогою цифрового фотоапарата «Canon» («PowerShot», Велика Британія) з використанням комп'ютерної програми «Zoom».

Статистичний аналіз результатів дослідження здійснювали за методом [35].

Результати і обговорення. У популяції клітин лінії G1 миші спостерігали різні аберантні мітози: клітини з неоднаковою кількістю ядер, мікроядерні клітини, мости, К-мітози та ін., а також високі частоти анеуплоїдних клітин на різних пасажах культивування *in vitro* [30, 31]. Виявлені аберантні мітози є відображенням як пошкодження самих хромосом, так і мітотичного апарату та цитотомії [36]. Результатом аберантних мітозів є втрата або придбання хромосом у клітинах, зокрема ракових [37]. У клітинах еукаріотів існує якісний механізм контролю за нормальним перебігом мітозу – контрольна точка мітозу, що забезпечує правильний розподіл хромосом при поділі клітини [6, 7]. Можна припустити, що в клітинах досліджуваної клітинної лінії G1 миші контрольна точка мітозу ослаблена або ж взагалі нефункціональна.

При дефектах контрольної точки мітозу клітина не спроможна зупинити свій поділ, якщо хроматиди не прикріплені до ниток веретена поділу або

прикріплені неналежним чином, також якщо пошкоджений кінетохор чи сформувалися декілька полюсів веретена поділу (так звані багатополюсні мітози) тощо [6, 7]. Така клітина зазнає передчасної анафази. Нормальні клітини, оброблені речовиною, яка деполімеризує мікротрубочки веретена або інгібує його формування, зупиняються у клітинному циклі та не входять у мітоз, оскільки в них активується контрольна точка мітозу [38, 39]. Клітини з пошкодженою контрольною точкою мітозу не здатні зупинити свій поділ при обробці мітотичними отрутами, такими як нокодазол, колхіцин, колцемід та ін. [8]. Тому нами було протестовано клітини лінії G1 на 26-му і 114-му пасажах культивування *in vitro* на здатність виживати та ділитися після обробки колхіцином у різних концентраціях. Для контролю брали показники відносної кількості живих клітин, отримані при тестуванні нормальних клітин, – ембріональних фібробластів миші (ЕФМ), ізольованих з 12,5-денних ембріонів миші лінії BALB/c.

Виявлено, що після інкубації ЕФМ з колхіцином у різних концентраціях через 0 год після зміни середовища кількість живих клітин зменшилась (рис. 1). Порівняно з контролем (клітини та розчинник) кількість клітин знизилася приблизно на 24–33 % (рис. 1, б). Через 48 год після зміни ростового середовища спостерігали ріст клітин в обох контролях і зменшення їхньої кількості у лунках, оброблених колхіцином у різних концентраціях (рис. 1). Відносно контролю клітини були найменш чутли-

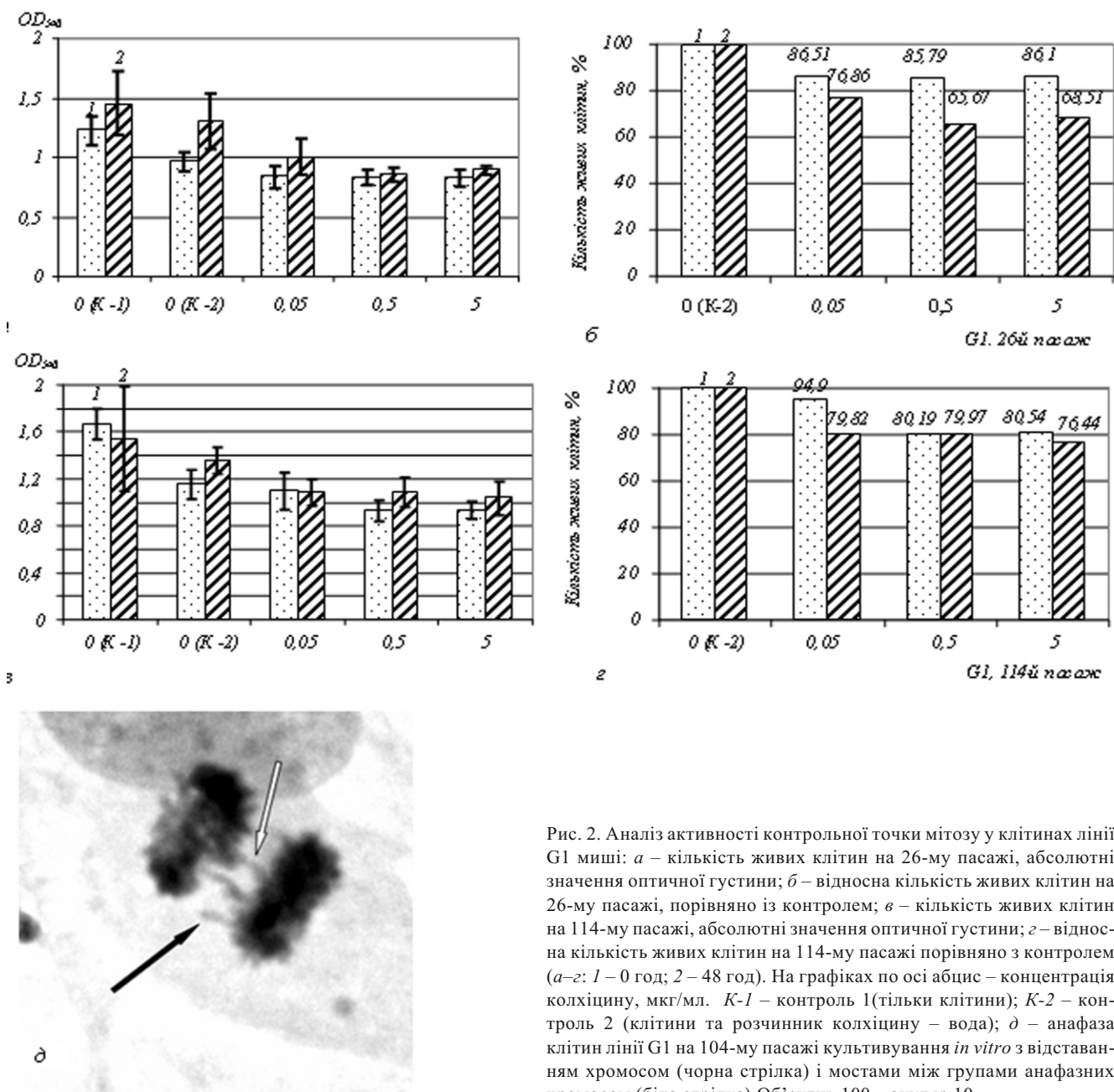


Рис. 2. Аналіз активності контрольної точки мітозу у клітинах лінії G1 миші: а – кількість живих клітин на 26-му пасажі, абсолютні значення оптичної густини; б – відносна кількість живих клітин на 26-му пасажі, порівняно із контролем; в – кількість живих клітин на 114-му пасажі, абсолютні значення оптичної густини; г – відносна кількість живих клітин на 114-му пасажі порівняно з контролем (а-г: 1 – 0 год; 2 – 48 год). На графіках по осі абсцис – концентрація колхіцину, мкг/мл. K-1 – контроль 1 (тільки клітини); K-2 – контроль 2 (клітини та розчинник колхіцину – вода); д – анафаза клітин лінії G1 на 104-му пасажі культивування *in vitro* з відставанням хромосом (чорна стрілка) і мостами між групами анафазних хромосом (біла стрілка). Об'єктив 100, окуляр 10

вими до концентрації колхіцину 0,05 мкг/мл – живими виявилися 63,9 % клітин. Середня чутливість була до концентрації 0,5 мкг/мл (45,19 % клітин) і дуже чутливими виявилися ЕФМ до 5 мкг колхіцину на 1 мл середовища (27,54 % клітин) (рис. 1, б). Це свідчить про пряму кореляцію між чутливістю ЕФМ та концентрацією колхіцину. Таким чином, нами встановлено ефективне блокування поділу та суттєве зменшення живих клітин у по-

пуляції ЕФМ після обробки колхіцином, що вказує на функціональну активність контрольної точки мітозу в ЕФМ.

Кількість живих клітин лінії G1 миші на 26-му пасажі після обробки колхіцином у різних концентраціях знизилася несуттєво (рис. 2, а). Порівняно з контролем кількість клітин зменшилася приблизно на 13–14 % (рис. 2, б). Через 48 год після зміни ростового середовища кількість живих клітин при кон-

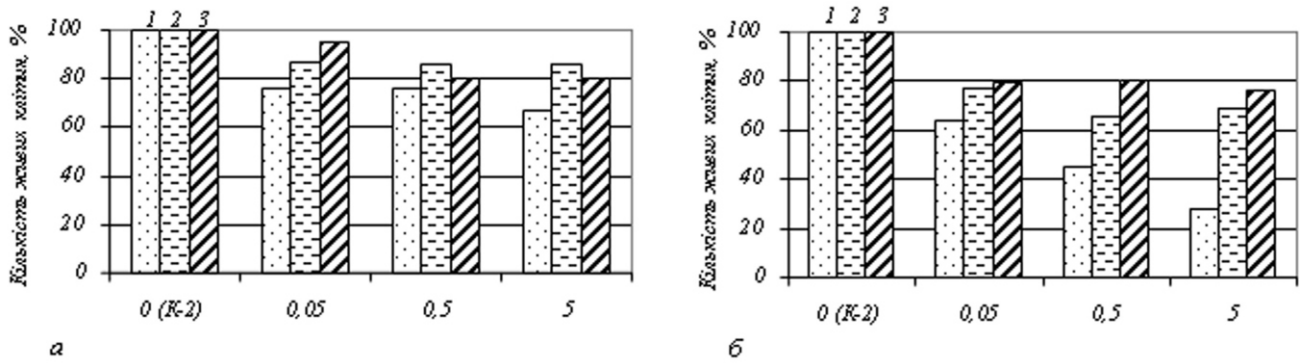


Рис. 3. Кількість живих клітин відносно контролю: *a* – 0 год і *б* – 48 год росту клітин, попередньо оброблених колхіцином у різних концентраціях, після зміни ростового середовища (1 – ЕФМ, 2-й пасаж; 2 – G1, 26-й пасаж; 3 – G1, 114-й пасаж). По осі абсцис – концентрація колхіцину, мкг/мл. *K-2* – контроль 2 (клітини та розчинник колхіцину – вода)

центрації колхіцину 0,05 мкг/мл перевищувала таку в ЕФМ та становила 76,86 % (рис. 1, рис. 2, *a*, *б*). Також підвищеною порівняно з ЕФМ була кількість живих клітин лінії G1 на 26-му пасажі при 0,5 і 5 мкг/мл колхіцину (рис. 2) – живими виявлено відповідно 65,67 і 68,51 % клітин. Не знайдено суттєвої різниці в чутливості досліджуваних клітин лінії G1 до концентрації колхіцину 0,5 і 5 мкг на 1 мл ростового середовища. Таким чином, активність контрольної точки мітозу на 26-му пасажі культивування клітин лінії G1 миші ослаблена порівняно з ЕФМ.

Аналізуючи активність контрольної точки мітозу клітин лінії G1 миші на 114-му пасажі культивування *in vitro*, ми визначили найвищу кількість живих клітин після обробки колхіцином порівняно з 26-м пасажем і ЕФМ. Кількість клітин відносно контролю зменшилася лише на 5 % при концентрації колхіцину 0,05 мкг/мл і на 20 % – при 0,5 і 5 мкг/мл (рис. 2, *в*, *г*). Через 48 год після зміни ростового середовища кількість живих клітин не відрізнялася при різних концентраціях колхіцину і була на високому рівні (79,82; 79,97 і 76,44 % живих клітин при досліджених концентраціях колхіцину) (рис. 2). Таким чином, клітини лінії G1 миші на 114-му пасажі виявилися нечутливими до дії колхіцину в різних концентраціях, тобто контроль мітозу у них ослаблений.

У результаті проведеного аналізу активності контрольної точки мітозу в ЕФМ та в клітинах лінії G1 на 26-му і 114-му пасажах культивування *in vitro* визначено, що ЕФМ є найчутливішими до дії

колхіцину в різних концентраціях. Менш чутливіми були клітини лінії G1 миші як на ранньому, так і на пізньому пасажах (рис. 3, *a*).

Через 48 год росту клітин після зміни середовища спостерігали суттєву різницю в кількості живих клітин у популяції ЕФМ при різних концентраціях колхіцину, а також різницю між кількостями клітин у популяціях ЕФМ і G1 (рис. 3, *б*). Клітини лінії G1 миші виявилися нечутливими до дії колхіцину в різних концентраціях, у той час як при кожному наступному 10-разовому збільшенні його концентрації ЕФМ не лише не ділилися, але й гинули. Таким чином, встановлено меншу чутливість до дії колхіцину клітин лінії G1 на 26-му і 114-му пасажах порівняно з ЕФМ, причому клітини 114-го пасажу були найменш чутливими (рис. 3).

Про інактивацію контрольної точки мітозу у клітинах лінії G1 миші свідчить і передчасне роз'єднання центромер порівняно з сестринськими хроматидами, виявлене вже на 15-му пасажі культивування *in vitro* [40]. До чинників, які спричинюють втрату хромосом і формування мікроядер з них та анеуплоїдію досліджуваної клітинної лінії, можна віднести не тільки дефекти веретена (оскільки спостерігали і багатоядерні клітини в популяціях клітин лінії G1, і багатоплюсні мітози у її сублініях), а й дефекти кінетохор, зокрема, відставання хромосом в анафазі (рис. 2, *д*).

Таким чином, ці результати свідчать про те, що саме дисфункція контрольної точки мітозу відповідальна за хромосомну нестабільність клітин лінії G1 миші.

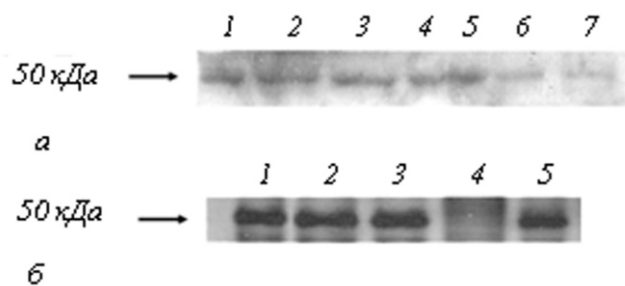


Рис. 4. Детекція білка p53: *a* – Вестерн-блот аналіз білка p53 за допомогою моноклональних антитіл РАb240 у клітинах: 1 – ЕФМ; 2 – G1, 30-й пасаж; 3 – G1, 106-й пасаж; 4 – G1-OA, 35/24-й пасаж; 5 – G1-OA, 35/65-й пасаж; 6 – G1-T, 66/17-й пасаж; 7 – G1-T, 66/35-й пасаж; *б* – імунопреципітація білка p53 за допомогою антитіл РАb240 (1, 2, 4) і РАb246 (3, 5) із білкових екстрактів клітин: 1 – G1, 30-й пасаж; 2, 3 – G1, 106-й пасаж; 4, 5 – ЕФМ

До появи фенотипу хромосомної нестабільності у клітинах ссавців, окрім втрати контрольної точки мітозу, залучаються й інші чинники, наприклад, втрата функції онкосупресора p53 [1]. Показано, що фібробласти p53^{-/-} мишей виявляли високу ступінь анеуплоїдії [11, 12–16]. У різних пухлинах людини також визначено кореляцію між мутацією або делецією p53 та виникненням анеуплоїдії [17].

Механізми залучення інактивації p53 до появи хромосомної нестабільності до кінця не з'ясовані. Один із відомих на сьогодні механізмів полягає у порушенні регуляції циклу подвоєння центросом при інактивації p53 [11, 41, 42]. Так, на клітинах миші в культурі показано, що втрата p53 призводить до гіперампліфікації центросом, внаслідок чого у клітинах спостерігається висока частота аберантних мітозів (багатополюсних мітозів і пошкоджень цитокінезу), що в свою чергу спричиняє збільшення помилок у передачі хромосом дочірнім клітинам [11, 41]. Інші ймовірні механізми пов'язані з участю p53 в регуляції клітинного циклу та запрограмованій клітинній загибелі.

Тому ми проаналізували експресію гена *Trp53* в клітинах лінії G1 миші та її субліній G1-OA і G1-T на різних пасажах культивування *in vitro* за допомогою Вестерн-блот аналізу та імунопреципітації. Вестерн-блот аналіз проводили з моноклональними антитілами РАb240, які в денатурувальних умовах розпізнають обидві форми (нативну та мутантну) білка p53 [43, 44]. Імунопреципітацію виконували з

антитілами РАb246, специфічними до дикого типу білка p53, та з антитілами РАb240, які у нативних умовах зв'язуються лише з мутантним p53 [43, 44].

За допомогою Вестерн-блот аналізу білок p53 виявлено в усіх досліджуваних клітинних культурах на низькому рівні (рис. 4, *a*). Як позитивний контроль експресії p53 використовували лізати ЕФМ.

Оскільки за допомогою антитіл РАb240 за денатурувальних умов Вестерн-блот аналізу детектується білок p53 і дикого типу, і мутантний, то щоб визначити, яка форма білка p53 присутня у клітинах лінії G1 миші, здійснили імунопреципітацію білка p53 у нативних умовах з антитілами РАb240 і РАb246. За таких умов антитіла РАb240 зв'язуються тільки з мутантним p53, а РАb246 – лише з p53 дикого типу. З лізатів ЕФМ імунопреципітовано лише p53 дикого типу. У той же час з лізатів клітин лінії G1 миші на 106-му пасажі культивування *in vitro* імунопреципітовано як p53 дикого типу, так і мутантну його форму (рис. 4, *б*). Мутантний p53 детектували і на 30-му, і на 106-му пасажах культивування клітин лінії G1 *in vitro* (рис. 4, *б*). Наявність у клітинах лінії G1 мутантної форми p53 і білка p53 дикого типу може призводити до функціональної інактивації p53 внаслідок утворення p53-тетрамеру між p53 дикого типу і мутантною формою p53, як показано в роботах [45, 46].

Таким чином, у результаті аналізу експресії p53 виявлено мутантну форму білка p53 у клітинах лінії G1 на 30-му і 106-му пасажах культивування *in vitro*. Ці дані узгоджуються з результатами аналізу активності контрольної точки мітозу у досліджуваних клітинах. В умовах ослабленого контролю за мітозом та відсутності функціонального p53 можна очікувати, що із зростанням кількості пасажів буде посилюватися хромосомна нестабільність та дестабілізація каріотипу клітин лінії. Ймовірно, що одночасна інактивація контрольної точки мітозу та експресія p53 обох типів можуть пояснити також надто тривалий етап становлення *in vitro* клітинної лінії G1 миші з інтенсивною каріотипічною еволюцією [31].

Отже, за результатами аналізу здатності клітин лінії G1 миші виживати та ділитися після обробки колхіцином можна зробити висновок про ослаблен-

ня функції контрольної точки мітозу на різних пасажах культивування *in vitro*. За допомогою Вестерн-блот аналізу білок p53 визначено на низькому рівні у клітинах лінії G1 та її субліній G1-OA і G1-T, а за допомогою імунопреципітації білка p53 у навивних умовах виявлено мутантну форму p53 в клітинах лінії G1 на 30-му і 106-му пасажах культивування *in vitro*. Також у клітинах лінії G1 миші на 106-му пасажі детектували як p53 дикого типу, так і мутантну його форму. З вищевикладеного випливає, що підвищена хромосомна нестабільність та інтенсивне протікання каріотипічної еволюції спонтанно іморталізованої клітинної лінії G1 миші [29, 31, 32], а також аберантні мітози у її клітинах [30] пов'язані з пошкодженням регуляції мітозу та, можливо, з інактивацією p53.

Роботу частково профінансовано Державним фондом фундаментальних досліджень Міністерства освіти і науки України, проект № Ф18/11-2006.

A. P. Iatsyshyna, S. M. Kvasha, O. V. Pidpala, T. P. Ruban, I. M. Vagina, L. L. Lukash

Genetic instability of mouse embryonic germinative G1 cell line and disfunction of the mitotic checkpoint and p53

Summary

The ability of cells of mouse G1 cell line to survive after treatment with different concentrations of colchicine has been analysed. We have shown that G1 cells at 26th and 114th passages are less sensitive to the treatment with colchicine than BALB/c mouse embryonic fibroblasts. These results indicate attenuation of the mitotic checkpoint of G1 cells. The expression of p53 has been detected at low levels in cells of G1 cell line and its sublines G1-OA and G1-T by Western blotting. It has been shown by immunoprecipitation that G1 cells contain wild type and mutant p53 that could lead to the disfunction of p53. Genetic instability of G1 cell line is possibly associated with the failure of the mitotic checkpoint and functional inactivation of p53.

Key words: mouse cell in vitro, mitotic checkpoint, chromosomal instability, p53

A. П. Яцишина, С. М. Кваша, О. В. Підпала, Т. П. Рубан, І. Н. Вагіна, Л. Л. Лукаш

Генетическая нестабильность эмбриональных герминативных клеток линии G1 мыши и нарушение функций контрольной точки митоза и p53

Резюме

Изучена выживаемость мышинных клеток линии G1 при обработке колхицином в разных концентрациях. Установлена меньшая чувствительность к действию колхицина клеток линии G1 на 26-м и 114-м пассажах по сравнению с эмбриональ-

ными фибробластами мыши линии BALB/c, что свидетельствует об ослаблении контрольной точки митоза в клетках линии G1. При помощи Вестерн-блот анализа выявлен белок p53 на низком уровне как в клетках линии G1, так и ее сублиний G1-OA и G1-T. Методом иммунопреципитации в клетках линии G1 определено присутствие белка p53 обоих типов: как дикого, так и мутантного, что может вызвать нарушение его функции. Генетическая нестабильность клеток линии G1 мыши связана с нарушением функции контрольной точки митоза и, вероятно, с функциональной инактивацией p53.

Ключевые слова: клетка мыши in vitro, контрольная точка митоза, хромосомная нестабильность, p53.

PERELIK LITERATURY

1. Burds A. A., Lutum A. S., Sorger P. K. Generating chromosome instability through the simultaneous deletion of Mad2 and p53 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–2005.–**102**.–P. 11296–11301.
2. Cheng K. C., Loeb L. A. Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations // Adv. Cancer Res.–1993.–**60**.–P. 121–156.
3. Holliday R. Chromosome error propagation and cancer // Trends Genet.–1989.–**5**.–P. 42–45.
4. Nowak M. A., Komarova N. L., Sengupta A., Jallepalli P. V., Shih I. M., Vogelstein B., Lengauer C. The role of chromosomal instability in tumor initiation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–2002.–**99**.–P. 16226–16231.
5. Draviam V. M., Xie S., Sorger P. K. Chromosome segregation and genomic stability // Curr. Opin. Genet. Develop.–2004.–**14**.–P. 120–125.
6. Rudner A. D., Murray A. W. The spindle assembly checkpoint // Curr. Opin. Cell Biol.–1996.–**8**.–P. 773–780.
7. Biggins S., Murray A. W. Sister chromatid cohesion in mitosis // Curr. Opin. Cell Biol.–1998.–**10**.–P. 769–775.
8. Jallepalli P. V., Lengauer C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery // Nat. Rev. Cancer.–2001.–**1**.–P. 109–117.
9. Cahill D. P., Lengauer C., Yu J., Riggins G. J., Willson J. K., Markowitz S. D., Kinzler K. W., Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers // Nature.–1998.–**392**.–P. 300–303.
10. Kops G. J. P. L., Foltz D. R., Cleveland D. W. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–2004.–**101**.–P. 8699–8704.
11. Fukasawa K., Wiener F., Vande Woude G. F., Mai S. Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice // Oncogene.–1997.–**15**.–P. 1295–1302.
12. Harvey M., McArthur M. J., Montgomery C. A., Butel J. S., Bradley A., Donehower L. A. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice // Nat. Genet.–1993.–**5**.–P. 225–229.
13. Harvey M., Sands A. T., Weiss R. S., Hegi M. E., Wiseman R. W., Pantazis P., Giovanella B. C., Tainsky M. A., Bradley A., Donehower L. A. In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice // Oncogene.–1993.–**8**.–P. 2457–2467.
14. Purdie C. A., Harrison D. J., Peter A., Dobbie L., White S., Howie S. E., Salter D. M., Bird C. C., Wyllie A. H., Hooper M.

- L. Tumour incidence, spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene // *Oncogene*.—1994.—**9**.—P. 603–609.
15. Bouffler S. D., Kemp C. J., Balmain A., Cox R. Spontaneous and ionizing radiation-induced chromosomal abnormalities in p53-deficient mice // *Cancer Res.*—1995.—**55**.—P. 3883–3889.
 16. Donehower L. A., Godley L. A., Aldaz C. M., Pyle R., Shi Y. P., Pinkel D., Gray J., Bradley A., Medina D., Varmus H. E. Deficiency of p53 accelerates mammary tumorigenesis in Wnt-1 transgenic mice and promotes chromosomal instability // *Genes Develop.*—1995.—**9**.—P. 882–895.
 17. Hainaut P., Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations // *Adv. Cancer Res.*—2000.—**77**.—P. 81–137.
 18. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C. C. p53 mutations in human cancers // *Science*.—1991.—**253**.—P. 49–53.
 19. Levine A. J., Momand J., Finlay C. A. The p53 tumour suppressor gene // *Nature*.—1991.—**351**.—P. 453–456.
 20. Lane D. P., Benchemol S. p53: oncogene or anti-oncogene? // *Genes Develop.*—1990.—**4**.—P. 1–8.
 21. Ko L. J., Prives C. p53: puzzle and paradigm // *Genes Develop.*—1996.—**10**.—P. 1054–1072.
 22. Mowat M. R. p53 in tumor progression: life, death, and everything // *Adv. Cancer Res.*—1998.—**74**.—P. 25–48.
 23. Sionov R. V., Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death // *Oncogene*.—1999.—**18**.—P. 6145–6157.
 24. Heinrichs S., Deppert W. Apoptosis or growth arrest: modulation of the cellular response to p53 by proliferative signals // *Oncogene*.—2003.—**22**.—P. 555–571.
 25. Lane D. P. P53, guardian of the genome // *Nature*.—1992.—**358**.—P. 15–16.
 26. Albrechtsen N., Dornreiter I., Grosse F., Kim E., Wiesmuller L., Deppert W. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53 // *Oncogene*.—1999.—**18**.—P. 7706–7717.
 27. Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. Surfing the p53 network // *Nature*.—2000.—**408**.—P. 307–310.
 28. el-Deiry W. S. Regulation of p53 downstream genes // *Semin Cancer Biol.*—1998.—**8**.—P. 345–357.
 29. Лукаш Л. Л., Яцишина А. П., Підпала О. В., Вазіна І. М., Кочубей Т. П. Одержання нових ліній стовбурових клітин миші і вивчення впливу мікрооточення на їхню каріотипічну мінливість *in vitro* // *Физиология и биохимия культурных растений*.—2006.—**38**, № 2.—С. 144–152.
 30. Яцишина А. П., Підпала О. В., Рубан Т. П., Тімощук О. В., Лукаш Л. Л. Цитоморфологічна характеристика нової клітинної лінії миші G1 // *Цитология и генетика*.—2006.—**40**, № 3.—С. 49–58.
 31. Яцишина А. П., Підпала О. В., Кочубей Т. П., Лукаш Л. Л. Цитогенетичний аналіз спонтанно іморталізованої клітинної лінії G1 миші // *Біополімери і клітина*.—2006.—**22**, № 4.—С. 299–306.
 32. Яцишина А. П., Підпала О. В., Кочубей Т. П., Лукаш Л. Л. Спонтанна каріотипічна еволюція клітин миші *in vitro* // *Фактори експериментальної еволюції організмів*.—К.: Аграрна наука, 2004.—Т. 2.—С. 88–92.
 33. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*—1976.—**72**.—P. 248–254.
 34. Sambrook J., Fritsh E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
 35. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии / Под ред. акад. АН СССР Б. В. Гнеденко.—М.: Изд-во МГУ, 1980.—150 с.
 36. Алов И. А. Цитофизиология и патология митоза.—М.: Медицина, 1972.—264 с.
 37. Carroll P. E., Okuda M., Horn H. F., Biddinger P., Stambrook P. J., Gleich L. L., Li Y.-Q., Tarapore P., Fukasawa K. Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression // *Oncogene*.—1999.—**18**.—P. 1935–1944.
 38. Sentein P. Inhibition of spindle assembly by colchicine and of cell cycle by cycloheximide. Comparison and combination of their cytological action on cleavage mitoses // *Exp. Cell Biol.*—1979.—**47**.—P. 368–391.
 39. Wang Y., Burke D. J. Checkpoint genes required to delay cell division in response to nocodazole respond to impaired kinetochore function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.*—1995.—**15**.—P. 6838–6844.
 40. Глазко Т. Т., Яцишина А. П., Підпала О. В., Вавилина И. В., Лукаш Л. Л. Источники гетерогенности культивируемых *in vitro* популяций эмбриональных клеток мыши линии BALB/c // *Біополімери і клітина*.—2006.—**22**, № 5.—С. 350–354.
 41. Fukasawa K., Choi T., Kuriyama R., Rulong S., Vande Woude G. F. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53 // *Science*.—1996.—**271**.—P. 1744–1747.
 42. Tarapore P., Fukasawa K. Loss of p53 and centrosome hyperamplification // *Oncogene*.—2002.—**21**.—P. 6234–6240.
 43. Yewdell J. W., Gannon J. V., Lane D. P. Monoclonal antibody analysis of p53 expression in normal and transformed cells // *J. Virol.*—1986.—**59**.—P. 444–452.
 44. Gannon J. V., Greaves R., Iggo R., Lane D. P. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form // *EMBO J.*—1990.—**9**.—P. 1595–1602.
 45. Branchmann R. K., Vidal M., Boeke J. D. Dominant-negative p53 mutations selected in yeast hit cancer hot spots // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1996.—**93**.—P. 4091–4095.
 46. Моргунова А. А., Алмазов В. П., Струнина С. М., Копнин Б. П., Чумаков П. М. Доминантно-негативная инактивация p53: влияние количественных соотношений трансдоминантного ингибитора и его мишеней // *Молекуляр. биология*.—2003.—**37**, № 1.—С. 112–120.

УДК 576.5+576.35:576.356+577.21
Надійшла до редакції 09.04.07