

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ МИТОЗА ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ НАЧАЛО ТЕЛОФАЗНОЙ РЕОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В КЛЕТКАХ МУТАНТНОЙ ЛИНИИ *ff3* *Drosophila melanogaster*

© 2003 г. Л. И. Лебедева, С. А. Федорова, Л. В. Омельянчук

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск 630090;
факс: (3832)33-12-78; e-mail: lil@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 24.12.2001 г.
Окончательный вариант 05.06.2002 г.

На фиксированных клетках нервных ганглиев личинок *D. melanogaster* изучено влияние мутации гена клеточного цикла *ff3* на сегрегацию хромосом. Для этого сравнивали распределение клеток по размеру диаметра интерфазного ядра и расстоянию между сестринскими наборами хроматид в анафазе и телофазе. У контрольной линии дикого типа Lausanne распределение клеток по расстоянию между сестринскими хроматидами в анафазе оказалось сходным с распределением клеток по размеру ядра, среднее расстояние между расходящимися хроматидами в анафазе (l_{cp}) совпало со средним диаметром интерфазного ядра (d_{cp}) и составило 8.3 мкм; переход клеток в телофазу происходил при расхождении хроматид на расстояние 10 мкм и более. У мутантной линии *ff3* по сравнению с контрольной линией Lausanne менялось распределение клеток по размеру ядра в интерфазе и расстоянию между сестринскими наборами хроматид в анафазе, при этом средний диаметр ядра и среднее расстояние между расходящимися хроматидами увеличилось одинаково до 9.3 мкм. Специфической особенностью митоза у мутантной линии *ff3* было преждевременное начало телофазной реорганизации хроматина. Вследствие этого имели место клетки с аномально коротким – меньше диаметра интерфазного ядра – расстоянием между сестринскими наборами хроматид в телофазе, но не в анафазе, как если бы переход этих клеток из анафазы в телофазу происходил преждевременно, во время движения хроматид к полюсам в анафазе А.

Митоз – самая короткая и вместе с тем самая насыщенная молекулярными и морфологическими преобразованиями стадия клеточного цикла. На этой стадии осуществляется второе после репликации ДНК ключевое событие цикла – сегрегация хромосом. Точная репликация ДНК и сегрегация хромосом при клеточном делении обеспечивают непрерывность последовательных поколений клеток и организмов, являются непременным условием устойчивого существования биологических систем. Молекулярная основа точной репликации ДНК изучена достаточно полно [1, 2]. Механизмы, обеспечивающие точную передачу хромосом, остаются неясными, хотя известно, что сегрегация хромосом относится к числу довольно точных процессов. Например, у диких штаммов *S. cerevisiae* спонтанная частота потери хромосомы на клеточное деление составляет порядка 10^{-5} . Существенная роль в изучении механизмов сегрегации хромосом сыграли генетические исследования на дрожжах [3]. Хромосомная стабильность может быть прослежена у них по окраске колоний. Было показано, что при различных мутациях и мутагенных воздействиях частота хромосомных потерь увеличивается. Так, из 14 *cdc*-мутантов дрожжей у 13 наблюдалась потеря хромосом [3]. К потере хромосом могут при-

водить отсутствие или дозовый дисбаланс продуктов других генов, а также разнообразные патологические состояния клеток [4–6]. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что в процесс сегрегации хромосом вовлечены продукты многих генов, прямо или косвенно участвующих в формировании и/или функционировании митотического веретена, непосредственно ответственного за расхождение хромосом.

Подготовка к формированию веретена и делению хромосом на два идентичных дочерних набора идет на протяжении всего клеточного цикла, непосредственная же сегрегация хромосом осуществляется во время анафазы. Расхождение сестринских хроматид к полюсам в анафазе обеспечивается многочисленными силами, генерируемыми в веретене моторными белками [7], и протекает в две стадии (А и Б), различающиеся механизмами расхождения хроматид [8]. В анафазе А хроматиды движутся к полюсам посредством деполимеризации микротрубочек, а в анафазе Б расходятся полюса (центросомы). Это второе расхождение центросом во время митоза. Первое происходит в начале митоза при формировании веретена. В клетках высших эукариот оба расхождения осуществляются астральными микротрубочками [9], что свидетельствует о сходстве

механизмов, посредством которых осуществляются оба расхождения центросом. Но, по-видимому, есть и различия между ними, связанные с возможным участием центрального веретена во втором расхождении полюсов. Его роль в элонгации полюсов проявилась у дрожжей [10] и предполагается для клеток высших эукариот. Силами, генерируемыми в центральном веретене, возможно, объясняются наблюдаемые в отдельных случаях феноменологические различия между первым и вторым расхождениями центросом. Так, у тритона на клетках легкого показано, что направление первого расхождения центросом может временами меняться от противоположного до встречного, тогда как в анафазе Б центросомы расходятся только в противоположные стороны, их встречное движение отсутствует [9]. Одной только активности астральных микротрубочек недостаточно для успешного расхождения центросом в анафазе Б. Высказано предположение, что во время анафазы Б в экваториальной зоне веретена генерируются силы, препятствующие возможному встречному движению центросом [9]. В целом же роль анафазы А в сегрегации хромосом кажется понятной. А биологический смысл анафазы Б остается во многом неясным. Мы попытались проследить динамику расхождения сестринских наборов хромосом в анафазе в клеточной популяции нервных ганглиев личинок дрозофилы контрольной линии дикого типа и нескольких линий, мутантных по генам клеточного цикла. Для этого применили новый методический прием, основанный на сравнении распределения клеток по расстоянию между сестринскими наборами хроматид в анафазе и ранней телофазе с распределением интерфазных клеток по размеру диаметра ядра. Использование такого подхода позволило показать гетерогенность клеточной популяции нервных ганглиев личинок третьего возраста по размеру ядра и расстоянию между расходящимися хроматидами в анафазе у контрольной и мутантных линий и выявить ряд не описанных ранее аномалий в расхождении хроматид у мутантных линий. В настоящем сообщении приведены данные для контрольной линии дикого типа Lausanne и линии *ff3*, мутантной по гену клеточного цикла. В клетках линии *ff3* обнаружен не описанный ранее дефект митоза, проявляющийся через преждевременную телофазную реорганизацию хроматина в анафазе А, что приводит к аномально короткому расстоянию между сестринскими наборами хроматид в телофазе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на клетках нервных ганглиев личинок середины третьего возраста *D. melanogaster* контрольной линии дикого типа Lausanne и линии *ff3*, мутантной по гену клеточно-

го цикла. Мутация *ff3* была получена в генетическом скрининге с использованием трансгенной дрожжевой FLP/FRT системы, встроенной в геном дрозофилы [11]. Методики приготовления цитологических препаратов описаны в [12]. На фотографиях препаратов при масштабе 10 мкм : 15 мм измеряли расстояние между центромерами сестринских хроматид в анафазе и ранней телофазе и диаметр ядра в интерфазе. В подавляющем большинстве клеток ядра имели круглую форму, в некоторых клетках – эллипсоидную. В последнем случае определяли условный диаметр (d_{yc}) по уравнению $d_{yc} = \sqrt{d_1 d_2}$, где d_1 и d_2 – большой и малый диаметры соответственно. В анафазе и телофазе учитывали аномалии в расхождении хроматид, проявившиеся через слипание и отставание отдельных хроматид, через пролонгированное по времени асинхронное расхождение сестринских наборов хроматид к полюсам, асимметричную анафазу. Результаты обрабатывали статистически по методу Стьюдента и Фишера с ϕ -преобразованием.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Контрольная линия дикого типа Lausanne

На рис. 1, а воспроизведено рассмотренное нами ранее [13] распределение клеток нервных ганглиев третьей личиночной стадии по расстоянию между оппозитно расходившимися сестринскими наборами хроматид в анафазе. Видно, что среди разных клеток это расстояние варьировало от 5 до 23 мкм, с максимальной частотой представлены клетки, в которых хроматиды расходились на расстояние от 6 до 9 мкм. Чем определяется это расстояние в анафазе и его варьирование в таких довольно широких пределах? По данным [14], в мейозе сперматоцитов *D. melanogaster* расстояние между полюсами в анафазе А определяется размером ядра. Мы попытались выяснить, как расстояние между оппозитно расходящимися наборами сестринских хроматид согласуется с размером ядра в соматических клетках. С этой целью изучено распределение интерфазных клеток по диаметру ядра. Результаты, приведенные на рис. 1, б, свидетельствуют, что популяция клеток нервных ганглиев гетерогенна по размеру ядра и состоит из нескольких неодинаковых по численности субпопуляций. На препаратах, приготовленных описанным в [12] методом, диаметр ядра варьировал от 5 до 15 мкм, с наибольшей частотой представлены клетки с диаметром ядра от 6 до 9 мкм. В целом распределение клеток по диаметру ядра совпало с распределением клеток по расстоянию между хроматидами, расходящимися в анафазе в пределах 5–15 мкм (ср. рис. 1, а и 1б), и среднее расстояние, на которое расходились хроматиды в анафазе, $l_{cp} = 8.3$ мкм, совпало

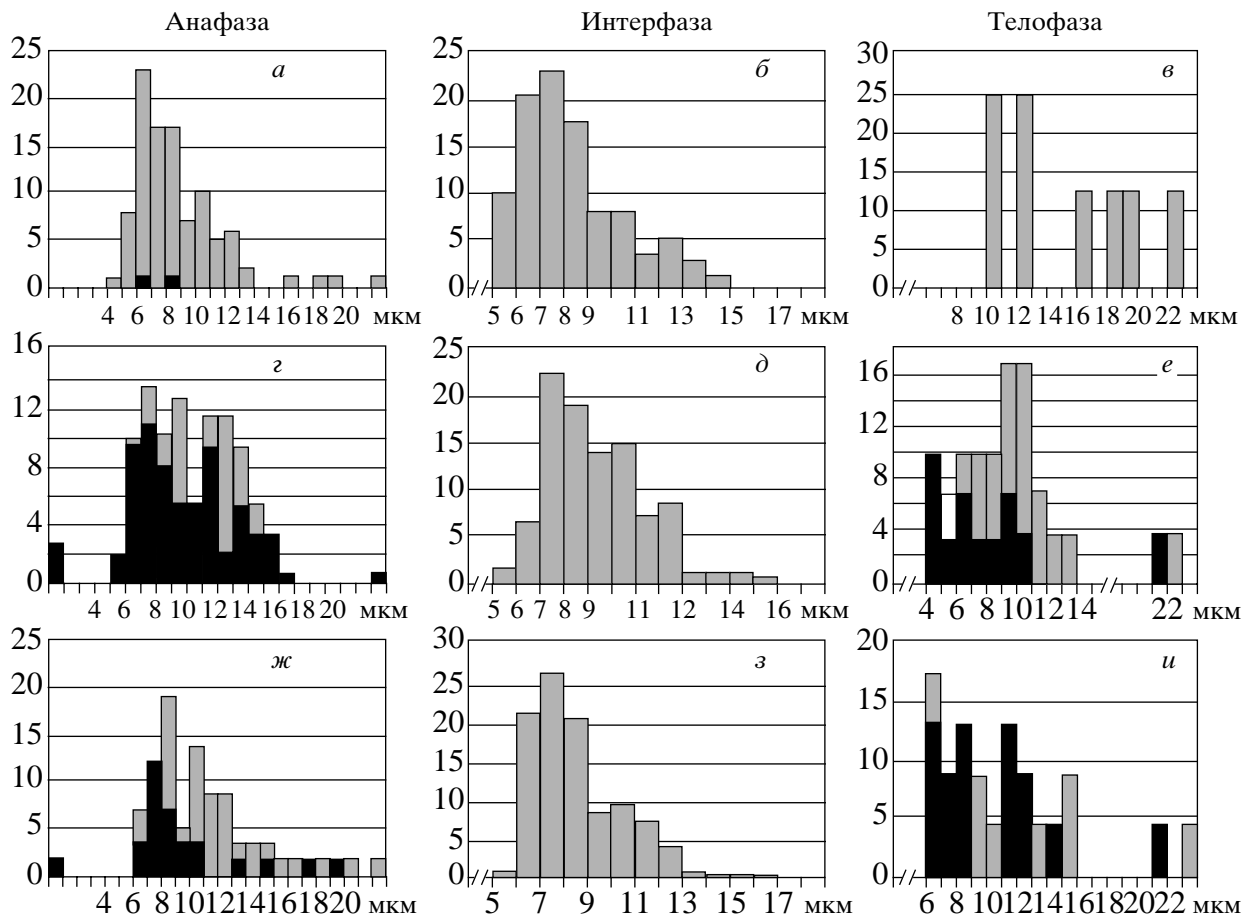


Рис. 1. Сравнительное распределение клеток по диаметру интерфазного ядра и расстоянию между сестринскими наборами хроматид в анафазе и телофазе в нервных ганглиях личинок *D. melanogaster* контрольной линии дикого типа Lausanne (а–в) и мутантной линии *ff3*: гомозиготы (z–е), гетерозиготы (ж–и). Число проанализированных клеток: а – 100, б – 176, в – 8, z – 147, д – 175, е – 30, ж – 57, з – 489, и – 23. Черным цветом обозначена относительная доля клеток с аномальной сегрегацией хроматид.

со средним диаметром ядра $d_{cp} = 8.3$ мкм (табл. 1). Из совпадения между этими величинами и общего сходства между двумя указанными распределениями следует, что для подавляющего числа клеток, учтенных в анафазе, расстояние между расходящимися хроматидами определялось размером ядра. Это означает, что во-первых, в клетках нервных ганглиев личинок две centrosомы, точнее центры организации микротрубочек (ЦОМТ), часто обозначаемые как астры (например, [14]), к началу анафазы А располагались одна напротив другой на расстоянии диаметра ядра (рис. 2). Во-вторых, в большинстве учтенных клеток в анафазе хроматиды расхолись до ЦОМТ, следовательно, эти клетки находились в конце анафазы А. Клетки, находившиеся на начальной и промежуточной стадиях анафазы А и анафазы Б, представлены на препаратах с относительно низкой частотой, по-видимому, по причине высокой скорости расхождения хроматид и полюсов на этих стадиях. Вероятно, в конце анафазы А происхо-

дила временная задержка дальнейшего продвижения клеток по циклу, обусловленная сменой механизма последующего расхождения хроматид.

Не обнаружено ядер с диаметром больше 15 мкм, тогда как в анафазе примерно в 4% клеток хроматиды расхолись на расстояние от 15 до 23 мкм, т.е. больше диаметра ядра (ср. рис. 1,а и 1,б). Эти клетки учтены нами, как анафаза Б. В от-

Таблица 1. Средний диаметр (d_{cp}) интерфазного ядра и среднее расстояние (l_{cp}) между оппозитно расходящимися сестринскими наборами хроматид в биполярной анафазе

Линия	Ядро		Анафаза	
	<i>n</i>	d_{cp}	<i>n</i>	l_{cp}
<i>Lausanne</i>	176	8.3 ± 0.16	96	8.3 ± 0.21
<i>y w; ff3/ff3</i>	175	9.3 ± 0.16	142	9.3 ± 0.20
<i>y w; ff3/TM6, Ubx y+</i>	489	8.5 ± 0.09	43	8.2 ± 0.35

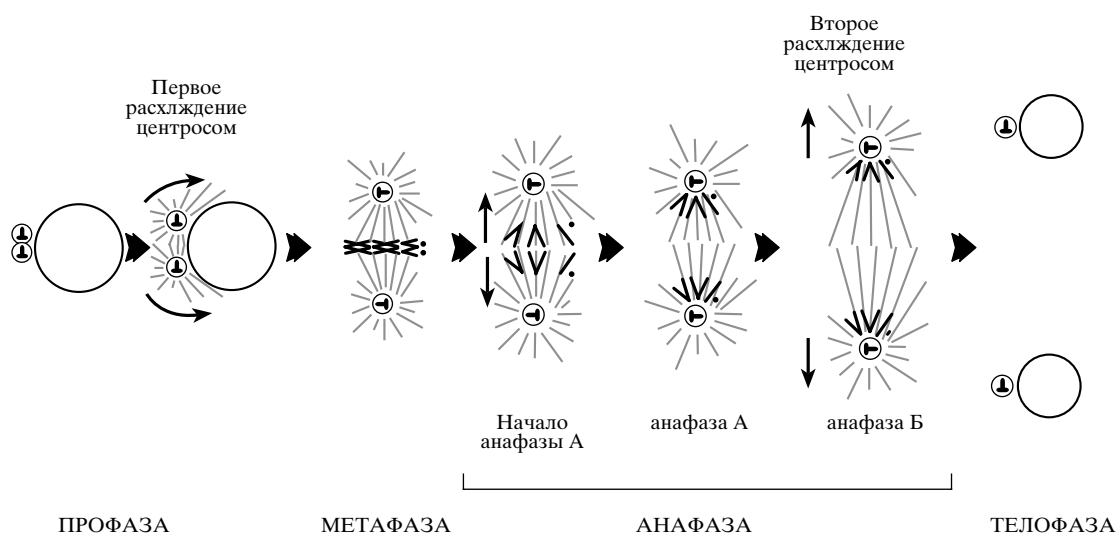


Рис. 2. Условная схема расхождения центросом и хроматид при митозе.

дельных клетках расстояние между сестринскими наборами хроматид в конце анафазы Б составляло 10–15 мкм. Этот вывод следует из приведенных на рис. 1, в данных о расстоянии между сестринскими хроматидами в телофазе и существующих представлений о преимущественной передаче клеток в телофазу из анафазы Б. Таким образом, клетки нервных ганглиев различаются по расстоянию между сестринскими хроматидами не только в конце анафазы А, но и в конце анафазы Б. Неясно, чем определяется это расстояние в анафазе Б. Возможно, как и в анафазе А, оно тоже зависит от размера ядра.

Мутация *ff3*

Мутация *ff3* картирована в 3L-плече; гомозиготы по мутации жизнеспособны и фертильны [11]. В клетках нервных ганглиев личинок третьего возраста в метафазе наблюдалась гиперплоидия (преимущественно с числом хромосом $2n + 1$) примерно в 3.6% клеток; в анафазе примерно в 3% клеток имело место монополярное, в 3.5% – асимметричное расхождение сестринских хроматид, в 3% – разрывы хроматид [11], а также отставание, слипание отдельных хроматид и асинхронное, пролонгированное по времени расхождение сестринских наборов хроматид к полюсам.

Распределения клеток нервных ганглиев по расстоянию между сестринскими наборами хроматид в анафазе (рис. 1, г) и по размеру интерфазного ядра (рис. 1, д) у гомозиготных по мутации *ff3* личинок отличались от таковых в контроле. В анафазе уменьшилась примерно на 17% частота расхождений хроматид на расстояние меньше 9 мкм ($P > 0.99$) и увеличилась примерно на 19.2% частота расхождений хроматид на расстояние ≥ 10

мкм ($P > 0.99$). В результате величина l_{cp} увеличилась по сравнению с контролем на 1 мкм и составила 9.3 мкм (см. табл. 1). Сходные изменения имели место в распределении клеток по размеру интерфазного ядра. По сравнению с контролем уменьшилась примерно на 20.8% частота клеток с диаметром ядра меньше 9 мкм ($P > 0.999$) и на 14.4% увеличилась встречаемость ядер диаметром ≥ 10 мкм ($P > 0.99$). Величина d_{cp} увеличилась на 1 мкм по сравнению с контролем (дикий тип) и составила 9.3 мкм (см. табл. 1). Как и в контроле дикого типа, $l_{cp} = d_{cp}$.

Характерной особенностью митоза в клетках нервных ганглиев личинок линии *ff3* было аномально короткое расстояние между сестринскими наборами хроматид в телофазе, но не в анафазе. В отдельных клетках оно было меньше диаметра интерфазного ядра (ср. рис. 1, д и 1, е). Встречаемость клеток, находившихся в анафазе и телофазе, среди делившихся клеток не изменилась по сравнению с таковой у контрольной линии дикого типа (табл. 2).

С частотой около 2–3% сестринские хроматиды расходились в анафазе монополярно (см. рис. 1, з). Возникавшие при этом тетраплоидные клетки в дальнейшем не делились, о чем свидетельствовало отсутствие тетраплоидных клеток в метафазе. В метафазе с частотой около 3.6% имели место гиперплоидные клетки с числом хромосом $2n + 1$. Их наличие в метафазе свидетельствует о том, что в отличие от тетраплоидных клеток они сохраняли способность к последующим делениям.

Примерно в 70.6% клеток в анафазе с биполярным веретеном наблюдали слипание и отставание отдельных хроматид или пролонгированное по времени асинхронное расхождение сестринских наборов хроматид к полюсам. При этом чис-

Таблица 2. Распределение делящихся клеток по фазам митоза

Линия	Число анализированных клеток	Процент клеток в фазах митоза				
		профаза	метафаза	начало анафазы	анафаза	телофаза
<i>Lausenne</i>	238	22.3	51.7	3.4	18.9	3.8
<i>y w; ff3/ff3</i>	1494	27.2	48.1	8.4	13.1	3.1
<i>y w; ff3/TM6, Ubx y⁺</i>	710	29.1	54.2	7.3	8.7	0.6

Таблица 3. Зависимость частоты клеток с аномальным* расхождением хроматид в биполярной анафазе и ранней телофазе от расстояния между сестринскими наборами хроматид

Линия	Число анализированных клеток	Процент клеток с аномалиями при расхождении сестринских наборов хроматид на расстояние			Достоверность различий между I и III группами
		<6 мкм, группа I	от 6 до 9 мкм, группа II	≥9 мкм, группа III	
Стадия анафазы					
<i>Lausenne</i>	100	0	3.5	0	<i>P</i> < 0.95**
<i>y w; ff3/ff3</i>	143	94.4	66.7	67.6	<i>P</i> > 0.99
<i>y w; ff3/TM6, Ubx y⁺</i>	56	–	59.1	23.5	<i>P</i> > 0.99**
Стадия ранней телофазы					
<i>y w; ff3/ff3</i>	30	80.0	44.4	25.5	<i>P</i> > 0.95
<i>y w; ff3/TM6, Ubx y⁺</i>	23	–	88.9	50.0	<i>P</i> > 0.95**

* Учтено слипание, отставание отдельных хроматид, асинхронное, пролонгированное по времени расхождение сестринских наборов хроматид и асимметричная анафаза.

** Достоверность различия между II и III группами.

тота клеток с указанными аномалиями составляла 73.6% среди тех клеток, в которых к моменту наблюдений хроматиды расходились на расстояние меньше 9 мкм, и 50% в клетках, у которых это расстояние было больше 9 мкм (см. табл. 3). Из табл. 3 видно, что в телофазе по мере увеличения расстояния между полюсами частота указанных аномалий также снижалась. У гетерозиготных личинок отмеченные выше нарушения выражены слабее, но их частота тоже снижалась по мере увеличения расстояния между оппозитными группами хроматид (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Гетерогенность клеточной популяции нервных ганглиев по размеру ядра и расстоянию между сестринскими наборами хроматид в анафазе и по диаметру интерфазного ядра у контрольной линии *Lausenne* следует, что на третьей личиночной стадии:

1) популяция клеток нервных ганглиев дрозофилы состоит из нескольких субпопуляций, различающихся размерами ядер и расстоянием между оппозитно расходящимися хроматидами в анафазе (т.е., как мы предполагаем, размером веретена);

2) во всех субпопуляциях есть делящиеся клетки и клетки, потенциально готовые вступить в митоз. Делятся не только клетки, содержащие относительно большое ядро, в отношении которых можно подразумевать, что они прошли через стадию роста, но делятся также клетки с небольшим ядром. Эти данные дают основание предположить, что в нервных ганглиях личинок размер ядра формируется в самом начале митотического цикла (возможно, при цитотомии в предыдущем цикле) и в дальнейшем он меняется слабо, несмотря на увеличение ploidy генома и массы ядерного вещества при репликации ДНК. По-видимому, при прохождении клеток по стадиям цикла увеличивается не столько размер ядра, сколько плотность его содержимого.

Гетерогенность клеточной популяции по размеру ядра и веретена определяется, вероятнее всего, процессами, контролирующими формирование клеточной популяции, детерминацию и дифференцировку клеток нервного ганглия. Следует заметить, что в наших экспериментах ни у контрольной, ни у мутантной по гену *ff3* линий не обнаружено в нервных ганглиях субпопуляции мелких, преимущественно неделящихся, ганглиозных клеток, которые, как известно [15], образуются при асимметричных делениях нейроблас-

тов и в дальнейшем после одного деления перестают делиться. Возможно, этот результат объясняется тем, что в моменту наших наблюдений их численность была недостаточной для того, чтобы при использованном нами методе анализа проявиться как специфическая субпопуляция неделящихся клеток.

Концы диаметра ядра – терминальные точки миграции центросом в начале митоза

Наблюдаемое у контрольной линии Lausanne совпадение между величинами d и l наводит на мысль, что в норме во время профазы две центросомы (или только одна из них) как бы “скатываются” по поверхности ядра в противоположные стороны до точек (точки), где расстояние между центросомами, точнее астрами, становится равным диаметру ядра. В этих точках они остаются до начала анафазы Б. т.е. до следующего расхождения центросом. Но в действительности пути движения центросом до указанных точек могут оказаться более сложным, чем это представляется на первый взгляд. Известно, что у некоторых организмов, например в клетках легкого тритона [9], путь центросом в начале митоза при общем сохранении выбранного направления описывается ломаной кривой, свидетельствующей о том, что в отдельные моменты центросомы движутся не “вперед”, а “вбок” и даже “назад”. Высказано предположение [9], что миграция центросом реализуется с помощью несбалансированных тянущих сил, которые генерируются вдоль астральных микротрубочек и пропорциональны их длине. В основе механизма, продуцирующего движущую силу, лежит астральная асимметрия – неравномерное распределение микротрубочек вокруг центросом. Направление асимметрии периодически меняется, ломаный трек движения центросом объясняется соответствующими изменениями случайных асимметричных закреплений минус-концов микротрубочковых моторов на внутренней поверхности плазматической мембраны. Неясно, в какой мере подобное расхождение центросом имеет место в клетках нервных ганглиев личинок дрозофилы. В любом случае, наблюдавшаяся нами в клетках контрольной линии Lausanne терминация анафазных полюсов на концах диаметра ядра означает, что концы ядерного диаметра являются “идеальными” точками для устойчивой локализации центросом к началу анафазы А и установления равновесия между тянущими силами двух оппозитных ЦОМТ. Расстояние между ЦОМТ, равное диаметру ядра, является “идеальным” для формирования и оптимального функционирования веретена.

Распределение клеточных субпопуляций в нервных ганглиях личинок $ff3$ менялось по сравнению с контрольной линией дикого типа в сто-

рону примерно одинакового увеличения доли клеток с относительно большими ядрами и клеток с большим расстоянием между сестринскими хроматидами в анафазе. Поэтому величины d_{cp} и l_{cp} хотя и увеличилась по сравнению с контролем, но остались равными между собой. Их совпадение дает основание считать, что у мутантной линии $ff3$ центросомы мигросомы мигрировали до точек, расположенных на концах диаметра ядра, а мутация гена $ff3$ не влияла ни на миграцию центросом, ни на расхождение хроматид в анафазе А. Изменения в распределении клеточных субпопуляций были, по-видимому, вторичными, адаптивными к условиям метаболизма мутантных личинок $ff3$. Отчасти они могли быть связаны с увеличением пloidности ядра в отдельных клетках после монополярного расхождения хроматид в анафазе (в результате чего возникали тетраплоидные клетки) и нерасхождения сестринских хроматид в отдельных клетках (что привело к возникновению гиперплоидных клеток с числом хромосом $2n + 1$ в метафазе).

Известно, что размер ядра пропорционален пloidности генома [16]. Известно также, что пloidность генома контролируется системой контрольных точек (checkpoints) [17]. В ответ на изменение пloidности эта система блокирует дальнейшую прогрессию клеток в клеточном цикле. В наших экспериментах, по-видимому, таким путем было заблокировано деление тетраплоидных клеток, о чем свидетельствовало отсутствие тетраплоидных клеток в метафазе. Гиперплоидные клетки с набором хромосом $2n + 1$, в отличие от тетраплоидных, сохраняли способность делиться, их частота в метафазе составляла около 3.6% [11]. Эти различия между тетраплоидными и гиперплоидными клетками свидетельствуют о недостаточной эффективности внутриклеточного контроля гиперплоидии по сравнению с контролем тетраплоидии у личинок, несущих мутацию $ff3$. Неясно, связано ли это с различиями между процессами контроля двух указанных аномалий, которые могли быть обусловлены, например, разной природой аномалий и соответственно разными мишенями (субстратами) мониторинга тетраплоидии и гиперплоидии, или гиперплоидные клетки в отличие от тетраплоидных клеток преодолевали checkpoint. Известно, что в отдельных случаях клетки с дефектами могут делиться (преодолевать checkpoint), это явление получило название адаптации точек контроля [18].

Преждевременное начало телофазной реорганизации хроматина в клетках, несущих мутацию $ff3$

Характерной особенностью митоза в клетках нервных ганглиев личинок мутантной линии $ff3$ было аномально короткое расстояние между сес-

тринскими наборами хроматид в телофазе, но не в анафазе. У гомозиготных по данной мутации особей в отдельных клетках расстояние между сестринскими наборами хроматид в телофазе было меньше диаметра ядра (см. рис. 1,е), как если бы телофаза начиналась не после завершения анафазы Б, а в анафазе А, во время движения хроматид к полюсам. Поскольку частота клеток, находившихся в анафазе, не увеличена по сравнению с контролем (табл. 2), то нет оснований предполагать снижение скорости расхождения хроматид в анафазе А, т.е. увеличение продолжительности анафазы А как возможной причины начала телофазы при неполном расхождении хроматид. Нам представляется более вероятным предположить преждевременное начало телофазы как следствие дезорганизации временных параметров митотического цикла.

Альтернативное объяснение наблюдаемой аномалии в телофазе предполагает встречное движение сестринских наборов хроматид в конце анафазы Б, непосредственно перед началом телофазы. В работе [19] описана осцилляция хроматид между полюсами в анафазе А и Б при стабильных циклидах V^s и $V3^s$, содержащих мутацию в Dextruction box. Случаи встречных движений сестринских хроматид в анафазе можно регистрировать на препаратах по аномальному направлению хроматидных плеч. В нашем исследовании ни в контроле, ни у мутантной линии не обнаружено клеток с аномальным направлением хроматидных плеч в анафазе. Поэтому встречное движение хроматид в анафазе у изученных нами линий представляется маловероятным.

В анафазе Б расхождение прикрепленных к полюсам хроматид связано с расхождением центросом (астр). Выше отмечалось, что астрам внутренне присуща способность двигаться в разных направлениях, обусловленная постоянно меняющимся асимметричным распределением астральных микротрубочек вокруг центросом. Это свойство астр проявляется через меняющееся направление движения центросом в профазе, но не в анафазе Б [9]. В анафазе Б центросомы, как правило, расходятся в противоположных направлениях, их встречное движение отсутствует. По литературным данным [9], последнему препятствуют перекрывающиеся в экваториальной области веретена микротрубочки. В известном смысле структуру, складывающуюся в среднем области веретена, можно рассматривать как один из элементов системы, контролирующей направление расхождения центросом в анафазе Б; по приводимому в [9] определению, она “действует, как хравик, который позволяет центросомам расходиться и одновременно препятствует их движению навстречу одна другой”. Можно было бы предположить, что мутация $ff3$ подавляет функцию этой структуры, но и в этом случае при встречном дви-

жении астр следовало бы ожидать изменений в направлении хроматидных плеч, чего, как отмечалось выше, мы не наблюдали.

Некоторые аномалии в расхождении хроматид исправляются во время анафазы

Описанным выше аномалиям в распределении клеток по расстоянию между сестринскими наборами хроматид в анафазе и телофазе сопутствовали такие аномалии в сегрегации хроматид, как отставание и слипание отдельных хроматид, пролонгированное по времени асинхронное расхождение сестринских наборов хроматид к полюсам, асимметричное расхождение хроматид к полюсам (асимметричная анафаза). В анафазе за время расхождения хроматид на расстояние выше 9 мкм частота указанных аномий (кроме случаев асимметричной анафазы) снижалась у мутантной линии примерно на 30%, в контроле – на 100% (см. табл. 3). Тенденция к снижению их частоты по мере увеличения расстояния между разошедшимися хроматидами проявилась также в ранней телофазе (см. табл. 3). В клетках мутантной линии около 60% аномалий оставалось неисправленными к началу телофазы. Потенциально они могли бы проявиться через анеуплоидию в метафазе при последующих делениях клеток. Но в действительности такой высокой частоты анеуплоидных клеток в метафазе мы не наблюдали. Это означает, что подавляющее большинство перечисленных выше аномалий либо исправлялись во время последующих стадий телофазы и цитокинеза, либо аномальные клетки в дальнейшем необратимо задерживались в контрольных точках клеточного цикла и переставали делиться.

Особой категорией аномальной сегрегации хромосом было асимметричное расхождение хроматид. Частота таких клеток в анафазе составляла около 3.5% и не зависела от расстояния между сестринскими наборами хроматид (проанализировано 339 клеток). С такой же частотой (3.6%) в метафазе наблюдались гиперплоидные клетки с числом хромосом $2n + 1$ (проанализировано 845 клеток). В совокупности эти данные позволяют отнести асимметричное расхождение хромосом к числу аномалий, не исправляемых в анафазе. Возникающие при этом гиперплоидные клетки сохраняют способность делиться (гипоплоидные клетки нами не учитывались, поскольку не исключалась возможность “артефактной” потери хромосом при приготовлении цитологических препаратов по использованному нами методу).

Что лежит в основе отмеченной выше коррекции дефектов сегрегации: специфический процесс восстановления нормальной сегрегации хромосом или исправление дефектов является лишь побочным следствием процессов, задействованных при расхождении хроматид? В последнем

случае для исправления аномалий было бы достаточно простого пролонгирования времени анафазы и/или увеличения расстояния между полюсами. Заметим, что до конца остается неясным значение анафазы Б для митоза, для обнаруженного нами исправления аномалий в расхождении хроматид. Получить ответы на эти вопросы нам представляется важным, поскольку отмеченные выше аномалии, оставаясь не исправленными, могут приводить к анеуплоидии, а через нее – к трансформации клеток и канцерогенезу [20].

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 99-0449730 и 02-04-49323), МАС РФФИ (№ 02-04-06013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Radman M., Wagner R. Mismatch repair in *Escherichia coli* // *Annu. Rev. Genet.* 1986. V. 20. P. 523–538.
2. Mordich P. DNA mismatch correction // *Annu. Biochem.* 1987. V. 56. P. 435–466.
3. Hartwell L.H., Dutcher S.K., Wood S., Garvik B. The fidelity of mitotic chromosome reproduction in *S. cerevisiae* // *Recent Adv. Yeast Mol. Biol.* 1982. V. 1. P. 28–38.
4. Hartwell L.H., Smith D. Altered fidelity of mitotic chromosome transmission in cell cycle mutants of *S. cerevisiae* // *Genetics.* 1985. V. 110. P. 381–395.
5. Meeks-Wagner D., Hartwell L.H. Normal stoichiometry of histone dimer sets is necessary for high fidelity mitotic chromosome transmission // *Cell.* 1986. V. 44. P. 43–52.
6. Maaks-Wagner D., Wood J.S., Garvik B., Hartwell L.H. Isolation of two genes that affect mitotic chromosome transmission in *S. cerevisiae* // *Cell.* 1986. V. 44. P. 53–63.
7. Heald R. Motor in the mitotic spindle // *Cell.* 2000. V. 102. P. 399–402.
8. Inoue S., Ritter Jr.H. Dynamics of mitotic spindle organization and function // *Molecules and cell movement* / Eds. S. Inoue, R.E. Stephens. N.Y.: Raven Press, 1975. P. 3–30.
9. Waters J.C., Cole R.W., Rieder C.L. The force-producing mechanism for centrosome separation during spindle formation in vertebrates is intrinsic to each aster // *J. Cell Biol.* 1993. V. 122. P. 361–372.
10. Sullivan D.S., Huffaker T.C. Astral microtubules are not required for anaphase B in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Cell Biol.* 1992. V. 119. P. 379–588.
11. Федорова С.Ф., Ноккала С., Омелянчук Л.В. Генетический скрининг мейотических мутаций в мозаичных клонах зародышевой линии самок *Drosophila melanogaster* // *Генетика.* 2001. Т. 37. № 12. С. 1621.
12. Омелянчук Л.В. Ген *leopard nuclei (len P103)*, участвующий в контроле расхождения и спирализации хромосом дрозофилы // *Генетика.* 1995. Т. 31. № 12. С. 1645–1649.
13. Лебедева Л.И., Трунова С.А., Омелянчук Л.В. Генетический контроль митоза. Адаптивные модификации проявления мутации *v158* // *Генетика.* 2000. Т. 36. № 10. С. 1348–1354.
14. Gunsalus K.C., Bonaccorsi S., Williams E. et al. Mutation in *twistar*, a *Drosophila* gene encoding a cofilin / ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis // *J. Cell Biol.* 1995. V. 131. № 5. P. 1243–1259.
15. Khoblich J.A., Jan L.Y., Jan Y.N. Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division // *Nature.* 1995. V. 377. № 6560. P. 624–627.
16. Gonzalez C., Casal J., Ripoll P. Relationship between chromosome content and nuclear diameter in early spermatids of *Drosophila melanogaster* // *Genet. Res. Camb.* 1989. V. 54. P. 205–212.
17. Hayashi S. A Cdc2 dependent checkpoint maintains diploidy in *Drosophila* // *Development.* 1996. V. 122. № 2. P. 1051–1058.
18. Goebel M., Byers B. Cyclin in fission yeast // *Cell.* 1988. V. 54. P. 739–749.
19. Perry D.H., O'Farrell P.H. The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing events during exit from mitosis // *Curr. Biol.* 2001. V. 11. P. 671–683.
20. Veerdoodt B., Castelain Ph., Bourgain C., Kirsch-Volders M. Aneuploidy for chromosome 1 and overall DNA-content in benign and malignant breast disease // *Cancer Genet. Cytogenet.* 1994. V. 78. № 1. P. 53–63.