

Patryk BIL, Sylwia KAŁA, Karolina GAJDA, Magdalena SKONIECZNA,
Joanna RZESZOWSKA-WOLNY
Grupa Biosystemów, Instytut Automatyki, Politechnika Śląska

REPORTEROWY SYSTEM FUCCI W PRZYŻYCIOWEJ OBSERWACJI PROLIFERACJI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Streszczenie. Zastosowanie systemu reporterowego FUCCI pozwala na mikroskopową obserwację przechodzenia żywych komórek przez kolejne fazy cyklu komórkowego. W niniejszej pracy opisujemy wyniki 24 godzinnej obserwacji i analizy cyklu komórkowego dla 50 komórek linii HEPA 1-6. W populacji badanych komórek zaobserwowano subpopulacje charakteryzujące się asymetrycznym podziałem, w wyniku którego powstawały komórki potomne o różnych szybkościach przechodzenia przez cykl komórkowy.

REPORTER FUCCI SYSTEM FOR THE ANALYSIS OF CELL CYCLE PROGRESSION IN LIVING CANCER CELLS

Summary. Application of FUCCI reporter system allows for the microscopic studies and analysis of the cell cycle in living cells. During the 24 h experiment we registered and analyzed the cell cycle progression for 50 HEPA 1-6 cells. In this population the subpopulation could be distinguished which was characterized by asymmetric divisions and in which daughter cells differed in the length of the cell cycle phases and cell cycle progression.

1. Wstęp

1.1 Cykl komórkowy

Cykl komórkowy jest ciągiem zdarzeń, poprzez które rosnąca komórka podwaja wszystkie swoje organelle i dzieli się na dwie komórki potomne. W cyklu komórkowym wyróżnia się cztery podstawowe fazy: G1, S, G2 i M. Dodatkowo wyróżnia się jeszcze fazę G0, będącą specjalnym rodzajem fazy G1, w którym komórka przechodzi w stan uśpiania i dochodzi u niej do zatrzymania cyklu komórkowego. Za start cyklu można uznać moment, w którym komórka wchodzi w fazę S. Faza ta charakteryzuje się tym, że dochodzi w niej do podwojenia materiału genetycznego komórki. Pod koniec fazy S każdy chromosom komórki składa się z pary siostrzanych chromatyd. Następnie komórka wchodzi w fazę G2, będącą przerwą, w czasie której sprawdzana jest poprawność sekwencji zreplikowanego DNA, i w razie konieczności uruchamiane są szlaki sygnałowe, mające na celu naprawę DNA, lub gdy uszkodzenia są zbyt duże, komórka aktywuje szlak sygnałowy kierujący ją do

apoptozy (zaprogramowanej śmierci komórki). W fazie G2 komórka przygotowuje się do podziału mitotycznego. Podział komórki odbywa się w fazie M, którą dzieli się na cztery pomniejsze fazy: profazę, metafazę, anafazę i telofazę. Ostatnią fazą cyklu komórkowego jest faza G1, która podobnie jak faza G2 nazywana jest przerwą. W fazie G1 komórka sprawdza poprawność podziału materiału genetycznego po podziale i przed przystąpieniem do syntezy DNA, która następuje w fazie S. Fazy G1, G2 i S są wspólnie określane jako interfaza, czyli faza między podziałami komórki [2,5].

1.2 System reporterowy FUCCI

Nazwa systemu reporterowego FUCCI jest skrótem od Fluorescence Ubiquitin Cell Cycle Indicator, czyli oznacza fluorescencyjny wskaźnik cyklu komórkowego oparty o działanie ubikwityny. Metoda FUCCI wykorzystuje dwa białka będące częścią systemu replikacji DNA u wyższych eukariontów – czynnik replikacji Cdt1 oraz jego inhibitor – Gemininę. Białka te wykazują przeciwny wpływ na proces replikacji DNA i w czasie cyklu komórkowego ich poziomy w komórce oscylują z nienakładającą się na siebie częstotliwością. Poziom Cdt1 osiąga najwyższe ilości w czasie fazy G1 cyklu komórkowego i gwałtownie opada wraz z zainicjowaniem fazy S. Natomiast Geminina w przeciwieństwie do Cdt1 najintensywniej jest generowana w czasie trwania faz S i G2, natomiast wraz z tranzycją metafaza-anafaza w czasie mitozy, jej poziom gwałtownie spada i utrzymuje się w niskich wartościach, aż do ponownego wejścia w fazę S. Ekspresja Gemininy i Cdt1 jest regulowana przez ligazy ubikwityny E3 APC/C^{Cdh1} (ubikwitynacja Gemininy w czasie późnej mitozy i fazy G1) i SCF^{Skp2} (ubikwitynacja Cdt1 w fazach S, G2). Poddane ubikwitynacji białka są kierowane do degradacji w proteosomach. Zmieniające się poziomy tych białek pozwalają na wizualizację faz G1 i S/G2/M. Należy zaznaczyć, że wprawdzie system FUCCI wykorzystuje parę wskaźników, dających naprzemiennie sygnał fluorescencyjny czerwony i zielony jądra komórkowego, to do wyznaczenia faz wystarczy jeden wskaźnik. Dwa wskaźniki jednak dają możliwość automatycznego wykrywania komórek i dają wiarygodniejsze wyniki. W systemach FUCCI stosuje się różne wskaźniki fluorescencyjne, wprowadzane do komórki za pomocą plazmidów, zawierających sekwencje kodujące białka fluorescencyjne, które ulegają ekspresji w określonych fazach cyklu komórkowego jako kompleksy z Gemininą lub Cdt1. Jako wskaźniki Gemininy i Cdt1 można stosować wiele białek fluorescencyjnych (niekoniecznie zielonych GFP i czerwonych mKO2 jak w niniejszej pracy), wśród nich mCherry, mVenus, GFP, mKO2 i mAG [3,6]. Przy wyborze markerów fluorescencyjnych należy uważać żeby ich pasma wzbudzenia i emisji nie nachodziły na siebie [4].

2. Materiały i metody

Eksperymenty prowadzono na komórkach HEPA 1-6. Linia HEPA 1-6 została wyizolowana z wątroby myszy (*Mus musculus*), która cierpiała na nowotwór tego narządu. Komórki te wykazują morfologię komórek nabłonka. HEPA 1-6 dobrze nadają się do przeprowadzania transfekcji reporterowymi systemami cyklu komórkowego [7].

2.1 Produkcja retrowirusa

Do namnażania retrowirusa użyto komórek HEK (ludzkie zarodkowe komórki nerkowe) w kompletnym medium DMEM. Odpowiednio przygotowaną mieszaninę transfekującą wkroplono na płytki z komórkami HEK i inkubowano 24h w temperaturze 37°C, stężeniu CO₂ 5% i saturowanej H₂O. Po inkubacji wymieniono medium hodowlane i przygotowano płytki z komórkami HEPA 1-6. Następnego dnia zebrano supernatant z hodowli HEK poprzez przepuszczenie go przez filtry PES 0.45µm, które pozwalają na zbieranie wirusów. Zainfekowano wirusem płytki z HEPA 1-6 poprzez wprowadzenie do każdej mieszaniny 5 ml supernatantu z 5 ml DMEM oraz 4 µg/ml bromku heksadimetryny. Po 24 h powtórzono proces infekowania komórek HEPA 1-6. Przez następne 15 dni prowadzono selekcję na komórkach HEPA 1-6 z użyciem puromycyny.

2.2 Przygotowanie komórek do eksperymentu

Zainfekowane komórki HEPA 1-6 (retrowirusem będącym wektorem kodującym białka GFP i mKO2) posiano w niskim zagęszczeniu na dziesięciu płytkach hodowlanych. Płytki pokryte były standardowym medium hodowlanym DMEM, zawierającym surowicę wołową (FBS) o stężeniu 10% dla pięciu płytek kontrolnych i stężeniu 5% dla pozostałych płytek. Obniżona zawartość FBS miała stanowić czynnik stresowy dla komórek.

2.3 Mikroskopia fluorescencyjna

Wzrost i obserwację komórek prowadzono w komorze hodowlanej zintegrowanej z mikroskopem fluorescencyjnym, pozwalającym na akwizycję poklatkową zdjęć z układu eksperymentalnego, przy zachowaniu stałych warunków temperatury 37°C i stężenia CO₂ na poziomie 5%. Obserwację prowadzono przez 24 h wykonując zdjęcia płytek co 15 min, w dwóch zakresach fluorescencji (odpowiednich dla GFP i mKO2) i świetle widzialnym.

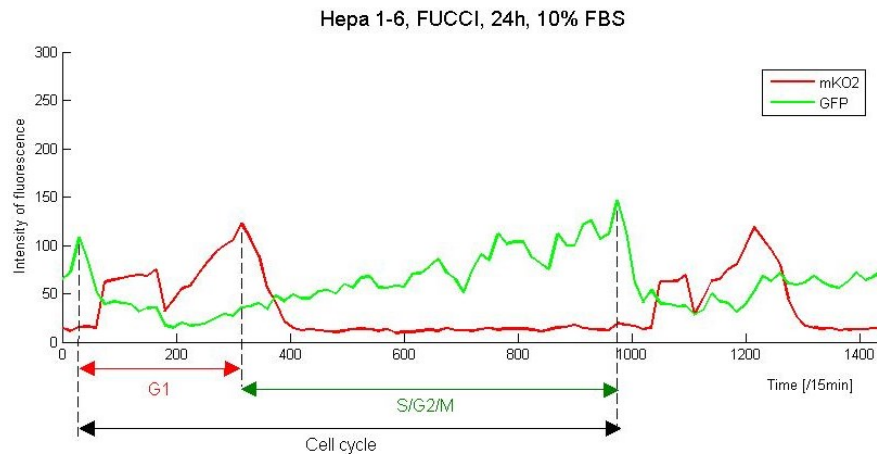
2.4 Odczyt poziomów fluorescencji

Pomiaru poziomu fluorescencji na podstawie sekwencji zdjęć mikroskopowych dokonano za pomocą programu LineageTracker v1.2.4, pozwalającego dokonać segmentacji komórek na obrazach, przeprowadzić śledzenie poszczególnych komórek w sekwencji obrazów, a także odczytać ich poziom świecenia i następnie zapisać wyniki do pliku xls.

2.5 Czas trwania faz cyklu komórkowego

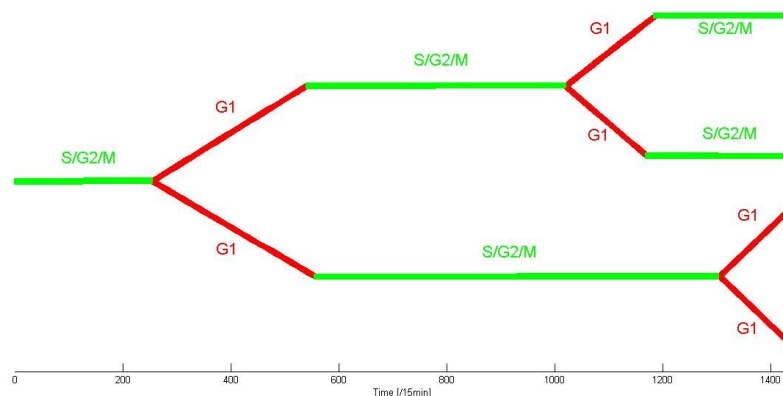
Długości trwania faz wyznaczane były na podstawie wykresów wartości intensywności świecenia fluorescencyjnego uzyskanych za pomocą programu LineageTracker (rys. 1). Jako początek fazy G1 i jednocześnie koniec fazy M uznawano punkt czasowy tuż przed gwałtownym spadkiem na wykresie fluorescencji

zielonej (GFP), natomiast jako punkt kończący fazę G1 i zaczynający fazę S przyjęto moment gwałtownego spadku fluorescencji czerwonej (mKO2), czemu towarzyszyło narastanie fluorescencji zielonej (GFP) [1].



Rys. 1. Wykres zmian intensywności świecenia fluorescencyjnego markerów FUCCI (mKO2 i GFP) w czasie 24 h

Metoda FUCCI pozwala śledzić fazy G1 i S/G2/M zarówno komórek „matek”, jak i potomnych „córek”, dzięki czemu można przedstawić dynamikę cyklu w postaci wykresu o topologii drzewa, dla lepszej wizualizacji zmian w cyklu komórkowym (rys. 2).



Rys. 2. Przedstawienie długości trwania faz cyklu komórkowego badanej komórki w postaci dendrogramu

3. Wyniki

3.1 Cykl komórkowy

Do analizy wybrano wyłącznie komórki, u których zaobserwowano przynajmniej jeden podział, które przez 24 godziny obserwacji nie opuściły obserwowanego obszaru

oraz przy wzrastającym zagęszczeniu populacji dało się oddzielić od komórek sąsiednich. Ostatecznie wybrano po 25 komórek początkowych próby kontrolnej (10% FBS) i próby z niedoborem FBS (5% FBS).

Komórki „matki” poddano podziałowi ze względu na otrzymaną ilość komórek potomnych, osobno dla obu prób. Wyniki tego podziału przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Podział komórek obu badanych populacji ze względu na liczbę komórek potomnych uzyskanych w czasie 24 h obserwacji z jednej komórki „matki”

Próba	Komórki „matki”, które podzieliły się jednokrotnie (na 2 potomne) w 24 h	Komórki „matki”, które podzieliły się dwukrotnie (na 3 potomne) w 24 h	Komórki „matki”, które podzieliły się dwukrotnie (na 4 potomne) w 24 h
5% FBS	15	3	7
10 % FBS	16	7	2

Liczba komórek „matek”, które podzieliły się jednokrotnie jest niemal identyczna dla obu eksperymentów. Różnice widać natomiast w przypadku obserwacji większej liczby podziałów w czasie 24 h. W próbie kontrolnej częściej powstawała w wyniku dwukrotnej proliferacji trójka komórek potomnych, w ujęciu 24 godzinnej obserwacji, a w próbie z obniżoną zawartością surowicy wołowej w medium hodowlanym uzyskano pod koniec eksperymentu cztery komórki potomne z jednej komórki „matki”, śledzonej od początku obserwacji.

W ciągu 24 godzin, z 25 komórek próby kontrolnej (10% FBS) powstało 61 komórek potomnych, natomiast w przypadku próby z niedoborem FBS (5% FBS), z identycznej liczby komórek uzyskano 66 potomnych.

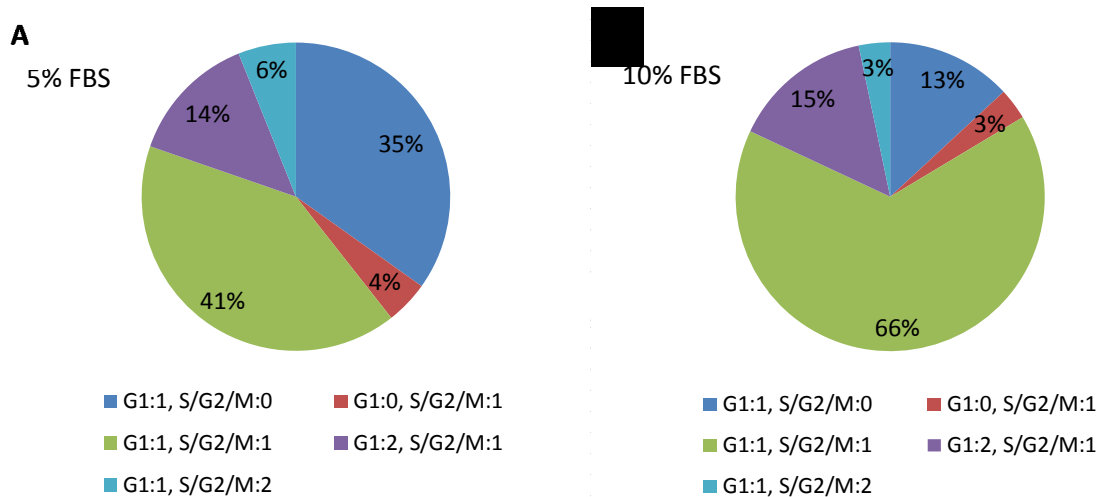
Komórki potomne uzyskane z obserwowanych komórek podzielono na różne kategorie. Jako kryterium przynależności do kategorii przyjęto ilość faz G1 i S/G2/M dających się zmierzyć w czasie 24 godzin obserwacji. Komórki potomne podzielone na kategorie przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Podział komórek obu badanych populacji ze względu na liczbę komórek potomnych uzyskanych w czasie 24 h obserwacji z jednej komórki „matki”

Fazy cyk. kom.	5% FBS	10% FBS
G1:1, S/G2/M:0	23	8
G1:0, S/G2/M:1	3	2
G1:1, S/G2/M:1	27	40
G1:2, S/G2/M:1	9	9
G1:1, S/G2/M:2	4	2

Dane dla porównania przedstawiono na wykresach kołowych, w postaci procentu wszystkich komórek potomnych z danego eksperymentu (rys 3). Zabieg ten był konieczny z powodu różnej ilości proliferacji ślędzonych komórek w obu eksperymentach.

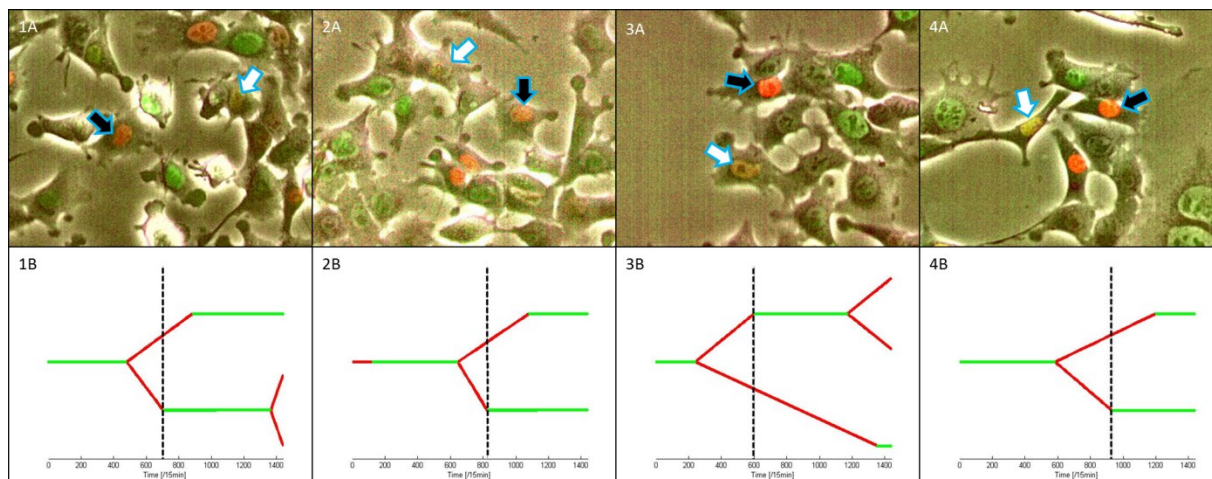


Rys. 3. Porównanie stosunku procentowego komórek potomnych pogrupowanych ze względu na różne ilości obserwowanych faz w cyklu, w czasie 24 h. (A) Próba z obniżoną zawartością FBS. (B) Próba kontrolna.

W próbie kontrolnej (rys.3 B) tylko w 16% przypadków nie udało się zaobserwować więcej niż jednego pełnego etapu cyklu komórkowego (G1 lub S/G2/M), w próbie z obniżoną ilością FBS (rys.3 A) udział takich komórek w populacji wzrasta do 39%. Dominującymi grupami są te, w których udało się zaobserwować u ślędzonych komórek jeden pełen etap G1 i jeden pełen etap S/G2/M (niekiedy z tego samego cyklu), z tym, że w próbie kontrolnej (rys.3 B) proporcja ta jest o ponad 1/3 wyższa.

3.2 Inhibicja kontaktowa

Na podstawie wyznaczonych metodą FUCCI czasów trwania faz cyklu komórkowego wybrano kilka komórek, u których mogło wystąpić zjawisko inhibicji kontaktowej. Uzyskane w programie LineageTracker dane porównano z kompozytami zdjęć z mikroskopu fluorescencyjnego.



Rys. 4. (1-4 A) Kompozyty zdjęć mikroskopowych przedstawiające badane komórki (strzałka biała – komórka przechodząca w fazę S, strzałka czarna – komórka z opóźnionym przejściem do fazy S). (1-4 B) Zmiany faz cyklu komórkowego w 24 h, z uwzględnieniem komórek potomnych (pionowa czarna przerywana linia przedstawia moment w czasie widoczny na zdjęciach obok).

Na podstawie wybranych przykładów, w których wystąpiły różnice w czasie trwania fazy G1 między komórkami pochodzącymi od jednej komórki „matki”, nie można jednoznacznie stwierdzić, czy sąsiedztwo innych komórek opóźniło ich wejście w fazę S. Część obserwacji wydaje się potwierdzać tę tezę (rys 4, 3A i 4A), a część jej zaprzecza (rys 4, 1A i 2A).

Ze względu na stosunkowo krótki czas obserwacji nie było możliwe określenie, czy któraś z badanych komórek weszła w fazę spoczynku G0.

4. Dyskusja i wnioski

Pełna automatyzacja procesu śledzenia poklatkowego znakowanych fluorescencyjnie jąder komórkowych za pomocą programu LineageTracker nie była możliwa. Problem wynikał z właściwości metody FUCCI, gdzie komórka zaraz po podziale traci świecenie fluorescencyjne (LineageTracker dokonuje segmentacji na podstawie sygnału fluorescencyjnego), więc zaszła konieczność ręcznego oznaczania nieświejących jąder do czasu ponownego pojawienia się świecenia. Co więcej, należało metodą prób i błędów dobrać właściwe parametry segmentacji dla obrazów, ponieważ program nie wykonuje tego za użytkownika. Dodatkowo konieczna była kontrola, czy LineageTracker zaznacza przy śledzeniu właściwe komórki w serii obrazów, gdyż duża ruchliwość i zagęszczenie komórek linii HEPA 1-6, czasami prowadziły do przeskakiwania oznaczenia na sąsiednie komórki. Potencjalnie można by uniknąć wielu z zaistniałych problemów poprzez zastosowanie jakiejś metody segmentacji jąder, na podstawie zdjęć w świetle widzialnym, jednak uzyskanie zdjęć z wyraźnym kontrastem jądra względem reszty komórki, w obserwacji przyzyciowej, nie należy do prostych zadań.

Analiza zdjęć z mikroskopii fluorescencyjnej z użyciem metody FUCCI wskazała, że wywołanie stresu poprzez zmniejszenie zawartości FBS przyczyniło się

do opóźnienia przejścia komórek w następne fazy cyklu i tym samym ograniczyło liczbę proliferacji w badanej próbie w odniesieniu całościowym. Zwrócono również uwagę na zróżnicowany czas trwania cyklu w obrębie jednej populacji.

Eksperyment wykazał, że najczęstszą obserwacją dla komórek HEPA 1-6 w czasie 24 h jest jeden pełen cykl komórkowy. Jest to prawdziwe zarówno dla komórek kontrolnych jak i poddanych stresowi, jednak w przypadku tych drugich ta proporcja jest silnie zaburzona zwiększoną liczbą komórek z maksymalnie jedną fazą cyklu możliwą do zaobserwowania przez 24 h obserwacji – wynika to prawdopodobnie ze zmniejszonej zawartości czynników wzrostowych znajdujących się w surowicy wołowej.

Część komórek proliferowała lepiej od reszty, jednak nie udało się określić przyczyny tego zjawiska. Spowolniony czas przechodzenia przez kolejne fazy cyklu komórkowego mógł być spowodowany wystąpieniem zjawiska inhibicji kontaktowej, niestety ograniczony czas pomiaru zmusił do wybrania do analizy tylko komórek, u których doszło do minimum jednego podziału, co mocno zawężyło zakres analizy i na jej podstawie nie można zdecydować czy komórki wpływały na siebie hamująco przez bliskie sąsiedztwo.

Praca finansowana ze środków BKM/506/RAU1/2016/ (S.K., K.G.), BK-213/Rau1/2016, t.3. (P.B.), NCN DEC-2012/04/A/ST7/00353 (J.R.W.), NCBiR PBS3/B3/32/2015 (M.S).

Podziękowania składamy dla C.A. Feillet i F. Delaunay z Institut de Biologie Valrose, Université Nice-Sophia Antipolis, Parc Valrose, 06108 Nice cedex 2, France, za udostępnienie systemu FUCCI.

LITERATURA

1. Billy F., Clairambault J., Delaunay F., Feillet C., Robert N.: Age-structured cell population model to study the influence of growth factors on cell cycle dynamics, *Mathematical Biosciences and Engineering*, Volume 10, Number 1, February 2013
2. Daignan-Fornier B., Sagot I.: Proliferation/Quiescence: When to start? Where to stop? What to stock?, *Cell Division*, 2011, p.6–20
3. Sakaue-Sawano A., Ohtawa K. et al.: Tracing the Silhouette of Individual Cells in S/G2/M Phases with Fluorescence, *Chemistry & Biology* 15, December 22, 2008, p.1243–1248
4. Shaner N.C., Steinbach P.A., Tsien R.Y.: A guide to choosing fluorescent proteins, *Nature Methods* 2, 2005, p.905–909
5. Tyson J.J., Novak B.: Regulation of the Eukaryotic Cell Cycle: Molecular Antagonism, Hysteresis and Irreversible Transitions, *J. theor. Biol.* 210, doi:10.1006/jtbi.2001.2293, 2001, p.249–263
6. Zielke N., Edgar B. A.: FUCCI sensors: powerful new tools for analysis of cell proliferation, *WIREs Dev Biol*, 4, doi: 10.1002/wdev.189, 2015, p.469–487
7. Opis linii komórkowej HEPA 1-6 dostępny na stronie firmy Altogen Biosystems: <http://www.altogen.com/hepa.php>