

Sylwia KAŁA, Karolina GAJDA, Dorota HUDY, Patryk BIL,
Joanna RZESZOWSKA-WOLNY
Politechnika Śląska

OBSERWACJA AKTYWNOŚCI PROLIFERACYJNEJ KOMÓREK ZA POMOCA CYTOMETRII PRZEPIYWOWEJ

Streszczenie. W każdej populacji komórkowej można wyróżnić odrębne subpopulacje komórek, w których skład wchodzi: komórki nie dzielące się, dzielące się wolno (1 podział), dzielące się szybko (wielokrotne podziały) oraz komórki apoptotyczne. Dostarczenie informacji na temat aktywności proliferacyjnej oraz oszacowanie ilości podziałów jednej komórki w czasie obserwacji było do tej pory niemożliwe. Zaproponowana metoda z użyciem cytometrii przepływowej oraz cytochalazyny B blokującej cytokinezę, pozwala na ocenę średniego czasu podziału badanej populacji oraz obserwację i wyodrębnienie frakcji komórek, które dzielą się wielokrotnie.

OBSERVATION OF CELL PROLIFERATION ACTIVITY WITH USAGE OF FLOW CYTOMETRY

Summary. In each population of cells we might distinguish separate subpopulations in which there are: non-dividing cells, slowly dividing cells (1 division), fast dividing cells (multiple divisions) and apoptotic cells. It was unable to obtain information about proliferation activity so far. Our suggested method, with usage of flow cytometry and cytochalasin B, which blocks cytokinesis allow to evaluate average time of division for each time point of population, and observation of extracted fraction of cells, which divide repeatedly.

1. Wstęp

Rozmnażanie się jest jedną z podstawowych właściwości organizmów żywych. Komórki rozmnażają się kopiując swoją zawartość i dzieląc się na dwie komórki potomne, z równomiernie rozdzielonym materiałem genetycznym. Jest to proces cykliczny, znany jako cykl komórkowy, w prawidłowych komórkach trwający ok. 24 godzin. W przypadku organizmów wielokomórkowych większość komórek pozostaje w fazie spoczynkowej G0 i nie ulega podziałom. Poszczególne fazy cyklu komórkowego mogą różnić się w zależności od typów komórek. W komórkach eukariotycznych cykl podzielony jest na 4 główne fazy: faza G1 (główna faza życia komórki, w której prowadzi ona normalny metabolizm), faza S, w której następuje podwojenie materiału genetycznego, faza G2, w której następuje kondensacja

materiału genetycznego w chromosomach oraz faza M, w której następuje podział materiału genetycznego i cytokineza (podział komórki). Przechodzenie do każdej kolejnej fazy wymaga przejścia przez punkty kontrolne (ang. *checkpoints*). W fazie G1 sprawdzane są właściwości środowiska i stopień uszkodzenia DNA, natomiast punkt kontrolny w fazie G2 zapewnia, to że replikacja DNA zostanie zakończona zanim rozpocznie się mitoz.

W czasie trwania poszczególnych faz komórka decyduje czy przejść do następnego stadium, przechodząc tym samym przez punkty kontrolne. Raz rozpoczęty podział komórkowy musi zostać zakończony, rozpoczęta replikacja musi się zakończyć, a komórka, która przeszła do fazy G2 z podwojonym materiałem genetycznym musi podzielić się na dwie komórki potomne. Dlatego po zainicjowaniu cyklu jego kolejne fazy nie mogą zależeć od czynników wzrostowych. Badania cyklu w komórkach nowotworowych wykazały, że deficyt punktów kontrolujących fazę G1 jest jedną z najpowszechniejszych zmian występujących w ludzkich nowotworach. Cykl komórkowy jest w nich uzależniony od własnych ścieżek promujących wzrost, a potomne komórki nowotworowe posiadają szereg powielających się i zwiększających swoją liczebność mutacji, z każdym przejściem kolejnego cyklu [1,3,7,8,13].

Podział komórkowy jest to proces, w którym przyjmuje się powstanie dwóch równorzędnych komórek, zachodzi on symetrycznie, tworząc komórki o takim samym potencjale rozwojowym, jednak komórki mogą dzielić się również asymetrycznie i tworzyć komórki zróżnicowane względem siebie. Istnieją dwa mechanizmy powodujące asymetryczny podział. W pierwszym, komórki początkowo są sobie równe, a różnica jest indukowana poprzez sygnalizację pomiędzy komórkami, przez środowisko zewnętrzne lub komórkę matkę. Mechanizm ten znany jest jako zewnętrzny podział asymetryczny. W drugim przypadku, potomna komórka jest inna od komórki matki, już w czasie podziału. Mechanizm ten nie jest zależny od komunikacji pomiędzy komórkami, ani środowiska zewnętrznego, jest związany z asymetrią wewnętrzną. Wewnętrzny podział asymetryczny zachodzi podczas mitozy, konkretne białka, transkrypty RNA oraz inne makromolekuły są zlokalizowane asymetrycznie w komórce. Tak niesymetrycznie rozłożone składniki są dziedziczone inaczej dla każdej z komórek. Ponieważ molekuly te determinują tożsamość komórki, nazywane są wskaźnikami losu komórki (ang. *fate determinants*). Przedstawiony mechanizm wymaga polarności komórki matki, a rozmiar dwóch komórek potomnych zależy od bruzdy podziałowej i specyficznej pozycji wrzeciona podziałowego, którego jakiegokolwiek przesunięcie powoduje powstanie dwóch komórek o różnej wielkości [2,10÷12].

Przykładem komórek przechodzących podziały asymetryczne są komórki macierzyste. Potrafią one dzielić się symetrycznie, tworząc kolejne komórki macierzyste lub asymetrycznie, tworząc kopię komórki macierzystej i jedną zróżnicowaną komórkę. Przyjmuje się, że jeśli komórka macierzysta podzieli się na dwie zróżnicowane komórki, to inna musi podzielić się symetrycznie na dwie komórki macierzyste. Główną właściwością charakteryzującą ten rodzaj komórek jest ich umiejętność do odnowy, bez straty możliwości podziałowych traconych przy każdym podziale w zróżnicowanych komórkach. Komórki macierzyste mają nieograniczony potencjał proliferacyjny i są nieśmiertelne [6,9,14].

2. Materiały i metody

Eksperymenty zostały przeprowadzane linii komórkowej ludzkiego nowotworu jelita (Human Colorectal Carcinoma; HCT116) we wczesnych pasażach. Hodowle były prowadzone w pożywce DMEM:F12 HAM (1:1), firmy Sigma, Germany, dodatkowo wzbogacone 10% surowicą płodową (PAA/Immuniq, Poland). Komórki były inkubowane w standardowych warunkach 37°C, 80% wilgotności, 5% dwutlenku węgla. Około 12 godzin przed rozpoczęciem eksperymentu i napromieniowaniem, komórki zostały posiane na szalki (BD Immunogen) po 100 tysięcy dla komórek przeznaczonych do analizy mikroskopowej oraz 120 tysięcy dla komórek przeznaczonych do analizy cytometrycznej. Przed napromieniowaniem zebrano medium oraz zdjęto nakrywkę. Konfluencja komórek wynosiła ok. 40-60% w zależności od eksperymentu. Komórki zostały napromieniowane promieniowaniem UVA w temperaturze pokojowej (21°C) dawką 10kJ/m², urządzeniem CL-100 models, UVP, Upland, CA, USA. Po napromieniowaniu dodano świeżego medium. Komórki inkubowano przez wyznaczony wcześniej czas, w standardowych warunkach.

2.1 Cykl komórkowy

Po upływie określonego czasu inkubacji usunięto medium hodowlane, komórki zostały zebrane za pomocą trypsynizacji, następnie inkubowano je w standardowym warunkach do czasu odczepienia komórek od podłoża. Zawiesinę komórek przeniesiono do probówek typu Eppendorf, następnie zwirowano je (1500rpm, 3min.). Po zwirowaniu usunięto nadsącz z nad otrzymanego osadu, osad zawieszono w 1ml zimnego, 70% alkoholu etylowego, podawanego kroplami przy jednoczesnym wortexowaniu. Następnie inkubowano komórki w temperaturze -20°C przez 24 godziny.

Po upływie 24 godzin schłodzono wirówkę do 4°C, zwirowano komórki (200rpm, 4min.), usunięto nadsącz, dodano 1ml PBS, ponownie zwirowano. Usunięto nadsącz, do otrzymanego osadu dodano 50µl RNAzy (100µg/ml ze stoku 10mg/ml), inkubowano przez 20 minut w temperaturze 37°C. Po upływie ustalonego czasu dodano 250µl PI (Propidium Iodide, 100µg/ml PI w PBS/H₂O), inkubowano przez 10 minut w ciemności. Analizę wyznakowanych komórek prowadzono przy użyciu cytofluorometru przepływowego FACS Aria™ III (Becton Dickinson), dla 10 000 komórek z każdej próbki.

2.2 Odczynniki chemiczne

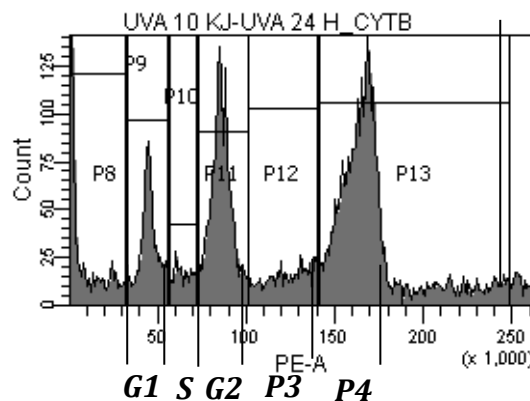
Cytochalazyna B hamuje różnorodne reakcje komórkowe takie jak: cytokineza, poruszanie się i ruchy związane z procesami ustrojowymi. Wpływa na aktywność filamenty, ale nie ma wpływu na mitozę. Uniemożliwia transport glukozy i innych cukrów w błonach komórkowych oraz fragmentuje powstałe mikrofilamenty. Cytochalazyna B została dodana do szalek po napromieniowaniu, w ilości 2µl na każdy mililitr medium, łącznie 4µl o stężeniu 0,5µg/ml [4,5].

2.3 Analiza statystyczna

Przedstawione wyniki zostały uzyskane w trzech niezależnych eksperymentach, a prezentowane zmiany, względem kontroli, sprawdzone zostały testem statystycznym t-Studenta na poziomie istotności 5%.

3. Wyniki

Przeprowadzone eksperymenty z wykorzystaniem cytometrii przepływowej zostały wykonane dla linii HCT116. W eksperymencie porównywano rozkłady komórek znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego. Doświadczenia przeprowadzono na komórkach, do których dodano lub nie dodano cytochalazyny B, związku blokującego podział cytoplazmy, który indukuje powstawanie komórek wielojądrzastych. Zbadano również wpływ promieniowania UVA. Oznaczono ilości komórek znajdujących się w różnych fazach cyklu: G1 – faza spoczynkowa, pojedynczy materiał DNA w komórce, S – faza replikacji, materiał DNA pomiędzy pojedynczym, a podwojonym, G2/M – faza przed podziałem lub w trakcie podziału, podwojony materiał DNA. Obserwowano również subpopulacje komórek poliploidalnych o większej zawartości DNA. P3 – populacja komórek trójjądrzastych, potrojony materiał DNA, P4 – populacja komórek poliploidalnych, 4 razy i więcej materiał DNA. Rysunek 1. przedstawia subpopulacje komórek HCT116, 24 godziny po ekspozycji na promieniowanie UVA, zmianie pożywki, i podaniu cytochalazyny B. Po 24 h inkubacji z cytochalazyną oprócz komórek zawierających pojedynczą (faza G1) i podwojoną (faza G2/M) ilość materiału genetycznego pojawia się subpopulacja o poczwórnej ilości materiału genetycznego (P4), wskazująca na obecność komórek wielojądrzastych lub dwujądrzastych przygotowujących się do kolejnego podziału.



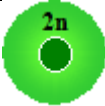










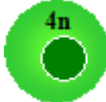


Rys. 1. Fazy cyklu komórkowego z dodaniem cytochalazyny B

Na rysunku 1 przedstawiono fazy G1 – pojedynczy materiał DNA $2n$, S – faza replikacji, faza podwajania materiału DNA, G2 – faza z podwojonym materiałem DNA $4n$, P3 – faza z potrojonym materiałem DNA $6n$, P4- faza z 4 i więcej materiałem DNA $8n$, pole P8 przedstawia uszkodzone komórki. Pik P4 zawiera 4 genomy czyli są to komórki które podzieliły się 2 razy, na początku obserwacji musiały być w fazie G2.

Dodanie cytochalazyny B, implikuje powstawanie różnych kombinacji subpopulacji komórkowych, które przedstawiono w tabeli 1. Obserwowano populacje

G1, S, G2, P3, P4. Populacja komórek G1 posiada standardową ilość materiału DNA $2n$, po replikacji przed podziałem ilość materiału zostaje podwojona i wynosi $4n$. W przypadku użycia cytochalazyny B nie zachodzi podział cytoplazmy, dlatego komórki należące do populacji G2 są zarówno komórkami z jednym jądrem, ze zreplikowanym materiałem genetycznym oraz komórkami nierozdzielonymi podczas cytokinezy z dwoma jądrami. Komórki subpopulacji P3 zawierają potrojony materiał genetyczny $6n$, należą do niej zarówno komórki, w których jedna komórka przeszła drugi podział szybciej niż jej komórka siostrzana oraz komórki, w których jedna przygotowuje się do podziału z podwojonym materiałem DNA, a druga nie. Subpopulacja P4 obejmuje komórki, które przeszły dwa podziały, komórki, które przeszły jeden podział, w których trzecia komórka przygotowuje się do podziału oraz komórki, które w tym samym czasie przygotowują się do podziału i mają podwojoną ilość materiału DNA.

Tabela 1
Model powstawania subpopulacji z różną ilością DNA
w zależności od przynależności do danej grupy przed podziałem

Populacja	1	2	3
G1			
G2			
P3	 	 	
P4	 	  	 

W kolumnie pierwszej tabeli 1 przedstawiono komórki, które należą do danej populacji w zależności od liczby podziałów, które przeszły, a tym samym liczby jąder i ilości materiału DNA. W drugiej kolumnie przedstawiono komórki należące do danej populacji ze względu na ilość materiału genetycznego, w jej skład wchodzi także komórki, które przygotowują się do podziału i mają podwojoną ilość materiału DNA z liczbą jąder o jeden mniejszą niż ich liczba przedstawiona w kolumnie 1 dla poszczególnych populacji. W kolumnie 3 przedstawiono komórki wchodzące w skład populacji P4. Są klasyfikowane do tej populacji ze względu na podwojoną ilość

materiału genetycznego, jest to sytuacja, w której komórka przeszła już jeden podział bez przeprowadzenia cytokinezy (cyt. B), a powstałe komórki potomne ponownie przygotowują się do przejścia następnego podziału.

W tabeli 2 przedstawiono wyniki z cytometrii przepływowej, dla eksperymentu z użyciem cytochalazyny B dla linii HCT116. W pierwszym wierszu przedstawiono kontrolę po 24 godzinach, bez użycia cytochalazyny B, komórki przechodzą podział cytoplazmy. Piki dla subpopulacji P3 i P4 zawierają różne ilości komórek, ale są widoczne w każdej populacji. Komórki ze zwiększoną ilością materiału genetycznego, obecne w populacji komórek nowotworowych to poliploidy obecne bez traktowania komórek cytochalazyną B.

W kolejnych wierszach przedstawiono wyniki otrzymane dla komórek inkubowanych z cytochalazyną B. Komórki przechodzą do kolejnych faz zwiększając ilość materiału genetycznego przez brak możliwości podziału cytoplazmy. Dla promieniowania UVA widoczna jest zwiększona ilość komórek w subpopulacjach P3 i P4 w stosunku do komórek nienapromieniowanych, nie jest to różnica znamienna statystycznie.

Tabela 2

Wyniki z cytometrii przepływowej dla komórek linii HCT116

Czas	Kontrola	UVA
24 godzin kontrola		
0 godzin		
12 godzin		
24 godzin		

4. Dyskusja i wnioski

W populacji komórkowej, dzielące się komórki zazwyczaj produkują dwie komórki potomne, a następny podział przeprowadzają również synchronicznie. Okazyjnie w komórkach nowotworowych pojawiają się komórki dzielące się asynchronicznie, w stosunku do komórki siostrzanej. Jedna z komórek dzieli się zdecydowanie wolniej, nawet o kilka dni, niż jej komórka siostrzana. Asynchronizacja ta ma związek z hamowaniem białka AKT. Komórki AKT^{low} potrzebujące więcej czasu do przeprowadzenia kolejnego podziału zostały wyróżnione w komórkach nowotworowych piersi i okazały się odporne na przedłużone leczenie kombinowanej chemioterapii stanowiąc podłoże do określenia ich jako komórki odporne na terapię, stanowiące potencjał kliniczny do dalszych badań [15].

W eksperymentach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, po blokadzie cytokinezy cytochalazyną B, zaobserwowano komórki z trzema jądrami. Są to komórki, które musiały przejść podział asynchroniczny albo podział z anomalią podziałową. Komórki, które przeszły podział asynchroniczny mogą być nowotworowymi komórkami macierzystymi. Metoda użycia cytochalazyny B może być alternatywą dla istniejących metod do wykrywania nowotworowych komórek macierzystych, ze względu na jej niski koszt oraz łatwość i szybkość stosowania. Jest to obszar do dalszych badań, a eksperyment z użyciem odpowiedniego przeciwciała pozwoli na potwierdzenie użyteczności cytochalazyny w tym obszarze. W przeprowadzonych badaniach, dzięki jej użyciu, zaobserwowano komórki dzielące się asynchronicznie, obserwowane pod mikroskopem jako komórki z trzema jądrami. Komórka dzieli się niesymetrycznie w czasie, w stosunku do swojej komórki siostrzanej, która nie przechodzi kolejnego podziału. Komórki dzielące się asynchronicznie podejrzane są o odporność na terapię. Ich łatwiejsza identyfikacja może mieć kluczowe znaczenie w znalezieniu cech odróżniających je od zwykłych komórek obecnych w całej populacji. Taka identyfikacja, z udziałem blokady cytokinezy, mogłaby być kamieniem milowym na drodze do zrozumienia mechanizmów kontrolujących powstawanie i rozwój nowotworów, także ze względu na niski koszt jej użycia. Obserwowana populacja komórek z trzema jądrami wynosi ok. 2÷3% całej populacji komórek, bez uwzględnienia komórek powstałych pod wpływem anomalii podziałowych.

Dodatkowo zastosowanie cytochalazyny B w cytometrii przepływowej pokazało nowy sposób obserwacji komórek, ze względu na ich aktywności podziałowe. Po dodaniu tego odczynnika chemicznego, na standardowym histogramie, otrzymanym z analizy cyklu komórkowego, można wyodrębnić kolejne piki (rys. 1.), które zawierają w sobie komórki ze zwiększoną ilością materiału genetycznego, a co za tym idzie, komórki, które w czasie obserwacji podzieliły się więcej niż jeden raz. Dodatkowo dzięki takiemu podejściu można wyszczególnić osobne subpopulacje komórek nie dzielących się, dzielących się wolno (1 podział), dzielących się szybko (wielokrotne podziały) oraz frakcję komórek apoptotycznych. Dalsze badania mogą potwierdzić użyteczność przedstawionej metody do obserwacji ilości podziałów zachodzących w czasie oraz zdefiniowania momentów podziałowych w proliferujących populacjach komórkowych.

**Praca finansowana ze środków BKM/506/RAU1/2016/ (S.K., K.G., D.H.),
NCN2012/07/B/NZ1/00008 (J.R.W.) oraz BK-213/Rau1/2016, t.3. (P.B).**

LITERATURA

1. Alberts B., Bray D., Hopkin K.: Podstawy biologii komórki. Tom II. PWN, Warszawa, 2007.
2. Atena M., Reza A. and Mehran G.A.: Review on the Biology of Cancer Stem Cells. *Stem Cell Discovery*. 2014 Sep, 4, 83-89. doi: 10.4236/scd.2014.44009.
3. Blagosklonny M.V., Pardee A.B.: The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle*. 2002 Mar-Apr;1(2):103-10. Review.
4. Cooper G.: The cell: A molecular approach. 2nd edition. Sinauer Associates, US, 2004.
5. Dey-Guha I., Alves C.P., Yeh A.C., Salony Sole X., Darp R., Ramaswamy S.: A mechanism for asymmetric cell division resulting in proliferative asynchronicity. *Mol Cancer Res*. 2015 Feb;13(2):223-30. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0474. Epub 2015 Jan 12.
6. Guo W, Lasky J.L. 3rd, Wu H.: Cancer stem cells. *Pediatr Res*. 2006 Apr;59(4 Pt2):59R-64R. Review.
7. Hawkins N., Garriga G.: Asymmetric cell division: from A to Z. *Genes Dev*. 1998 Dec 1;12(23):3625-38. Review.
8. Knoblich J.A.: Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):583-97. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.007. Review.
9. Lin S., Santi DV, Spudich J.A.: Biochemical studies on the mode of action of cytochalasin B. Preparation of (3H)cytochalasin B and studies on its binding of cells. *J Biol Chem*. 1974 Apr 10;249(7):2268-74
10. Morrison S.J., Kimble J.: Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006 Jun 29;441(7097):1068-74. Review.
11. Neumüller R.A., Knoblich J.A.: Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev*. 2009 Dec 1;23(23):2675-99. doi: 10.1101/gad.1850809. Review.
12. Soltysova A., Altanerova V., Altaner C.: Cancer stem cells. *Neoplasma*. 2005;52(6):435-40. Review
13. Szopa J: Biologia i inżynieria komórki. Laboratorium. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź, 1994.
14. Turner W.B. Carter S.B.: The chemistry and some biological effects of the cytochalasins. *Biochem J*. 1972 Apr;127(2):1P.
15. Winter P.C: Genetyka. Krótkie wykłady. PWN, Warszawa, 2000.