

GRAŻYNA MOSIENIAK

Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: g.mosieniak@nencki.gov.pl

ZASTOSOWANIE MIKROSKOPII DO BADAŃ PRZYŻYCIOWYCH CYKLU KOMÓRKOWEGO

WSTĘP

Większość badań z dziedziny biologii komórkowej opiera się na analizie różnych wizualizacji bardzo złożonych procesów biologicznych w formie pojedynczych obrazów. Najnowsze techniki stosowane w mikroskopii pozwalają na niezwykle precyzyjne badanie nie tylko całych komórek, ale także ich struktur wewnątrzkomórkowych. Większość z nich jednak nie jest w stanie zobrazować dynamiki procesów komórkowych dodając do badań skalę czasu. Tę zaletę posiada bez wątpienia rozwijająca się i wciąż udoskonalana technika video mikroskopii pozwalająca na przyżyciowe obserwacje komórek *in vitro* i *in vivo*. Spośród różnych procesów biologicznych, w których wykorzystywana jest ta technika, badania nad cyklem komórkowym mają bez wątpienia szczególne znaczenie.

Jedną z fundamentalnych dla rozwoju każdego organizmu cechą jest zdolność komórek do podziału. Aby taki podział mógł nastąpić komórka musi przejść przez złożony proces cyklu komórkowego. Najistotniejszymi etapami cyklu komórkowego jest faza syntezy DNA (faza S), która umożliwia namnożenie materiału genetycznego oraz mitozę (faza M cyklu komórkowego), dzięki której możliwe jest precyzyjne rozdzielanie materiału genetycznego do dwóch komórek potomnych. Czas, który poprzedza syntezę DNA określany jest jako faza G1 (ang. Gap 1), podczas gdy etap następujący po syntezie DNA i poprzedzający mitozę to faza G2 (ang. Gap 2). Cykl komórkowy jest procesem uniwersalnym w świecie roślin i zwierząt,

zarówno w organizmach jednokomórkowych, jak i wielokomórkowych i choć jego przebieg może się trochę różnić, głównie jeśli chodzi o czas trwania poszczególnych etapów, to jednak następujące po sobie fazy S-G1-M-G2 odnajdziemy w każdej dzielącej się komórce. O tym, czy komórka wejdzie w cykl komórkowy czy też nie będzie się dzielić decyduje szereg czynników docierających do komórki z otaczającego ją środowiska, jak też czynników wewnątrzkomórkowych. Zarówno zewnętrzne, jak i wewnętrzne sygnały prowadzą do aktywacji białek określanych mianem cyklinozależnych kinaz Cdk (ang. cyclin dependent kinase), które tworzą główny molekularny mechanizm odpowiedzialny za przeprowadzenie komórki przez poszczególne fazy cyklu komórkowego. To właśnie aktywność tych białek decyduje o tym, czy komórka podzieli się, zróżnicuje, ulegnie starzeniu komórkowemu lub umrze (MALUMBRES 2011).

Wiedząc, jak ważny dla prawidłowego rozwoju i rozmnażania każdego żywego organizmu jest cykl komórkowy, nie dziwi fakt, że istnieją precyzyjne mechanizmy kontrolujące przebieg tego procesu. Mechanizmy te uruchamiane są w odpowiedzi na wykryte nieprawidłowości w określonych momentach zwanych punktami kontrolnymi cyklu komórkowego. Jednym z podstawowych defektów, które prowadzą do natychmiastowego zatrzymania cyklu komórkowego są uszkodzenia DNA. Komórka broniąc się przed powieleniem uszkodzonego materiału genetycznego

zatrzymuje się w fazie G1. Jeżeli uszkodzenia miały miejsce na późniejszym etapie, dochodzi do aktywacji punktów kontroli w fazie S lub G2, co zapobiega wejściu w mitozę. Takie zatrzymanie w cyklu komórkowym może być odwracalne, jeżeli tylko możliwe jest naprawienie powstałych uszkodzeń. W sytuacji, gdy uszkodzenia nie są naprawione komórki ulegają starzeniu komórkowemu, co jest jednoznaczne z wyjściem z cyklu komórkowego i zaprzestaniem proliferacji. Alternatywnie, komórki z uszkodzonym DNA mogą umrzeć np. na drodze apoptozy (MEDEMA i MACÛREK 2012).

Pośród punktów kontroli cyklu komórkowego niewątpliwie szczególnie dużą uwagę od lat poświęcano mechanizmom kontrolującym mitozę, które odpowiedzialne są za prawidłowy rozdział chromosomów do dwóch komórek potomnych. Nie ulega bowiem wątpliwości, że zaburzenia tego procesu mogą skutkować niestabilnością genomową

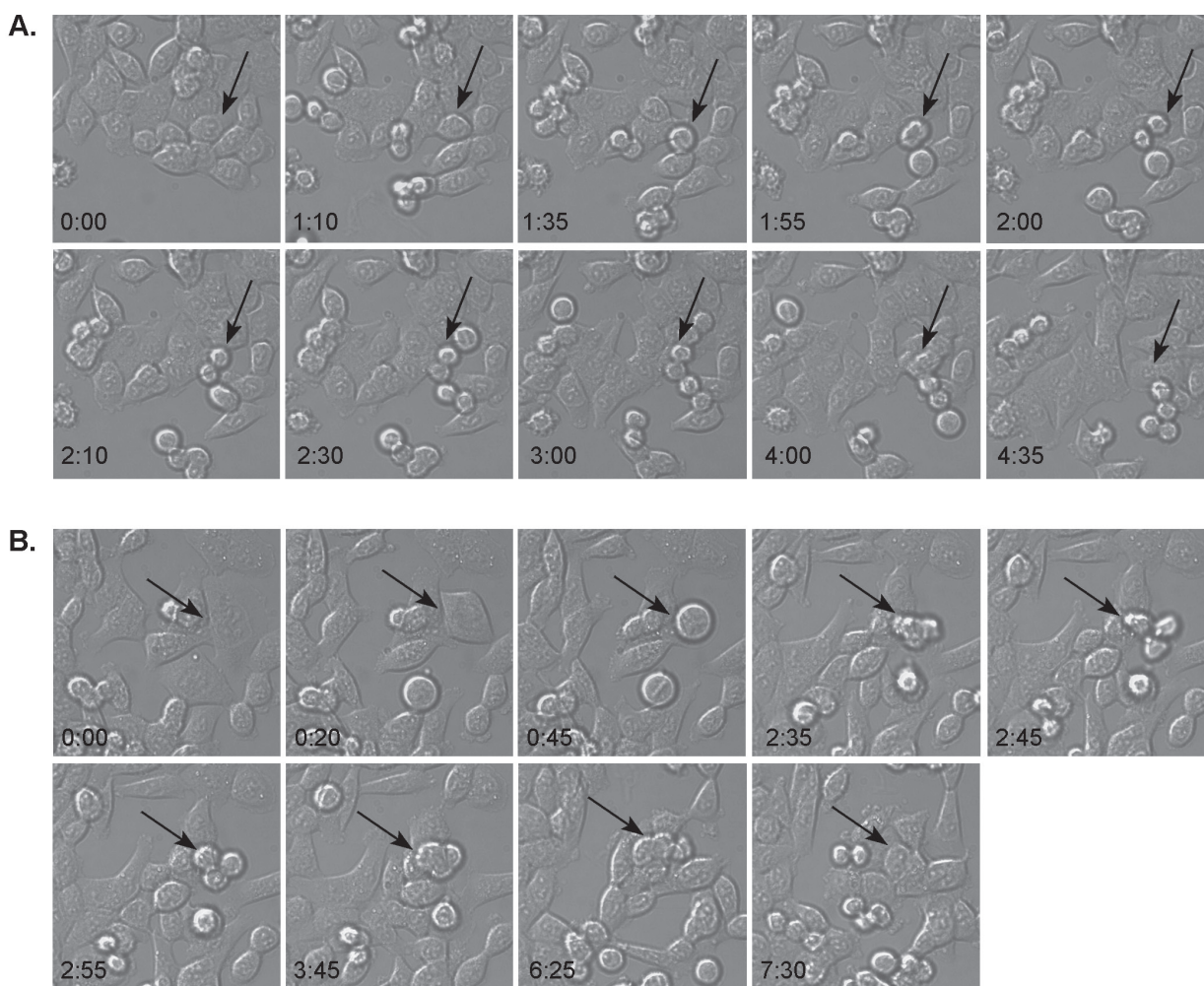
prowadzącą do transformacji komórek prawidłowych w komórki nowotworowe. Proces mitozy (podobnie jak mejozy przebiegającej w komórkach linii rozrodczej) jest procesem dynamicznym, w czasie którego dzięki działaniu wrzeciona mitotycznego możliwy staje się ukierunkowany i ściśle kontrolowany ruch chromosomów, rozdzielanych na dwie równe pule DNA do komórek potomnych (kariokineza). Następnie dochodzi do rozdziału cytoplazmy na dwie części (cytokineza). Aby cały proces rozdziału chromosomów przebiegł bez zakłóceń, komórki wytworzyły złożony, molekularny mechanizm kontrolujący prawidłowe funkcjonowanie wrzeciona mitotycznego (punkt kontroli wrzeciona mitotycznego), który zatrzymuje mitozę, gdy np. któryś z chromosomów nie został w sposób prawidłowy połączony z wrzecionem mitotycznym, co może skutkować brakiem prawidłowej segregacji DNA (MANCHADO i wspóla. 2012).

ZOBACZYĆ DZIELĄCE SIĘ KOMÓRKI

Jako pierwszy mitozę, a dokładnie jej pierwszy etap, czyli kariokinezę, opisał w 1882 r. niemiecki badacz Walther Flemming. Późniejsze prace rozszerzyły pojęcie mitozy o cytokinezę, która następuje zaraz po podziale jądra. Badania prowadzone przez Flemming'a, jak i jego następców, przez wiele lat opierały się na obserwacjach prowadzonych na utrwalonych preparatach wybarwionych określonymi barwnikami chemicznymi, pozwalającymi na rozróżnienie pewnych struktur wewnątrzkomórkowych. Punktem wyjścia do rozpoczęcia badań nad podziałami komórkowymi i mechanizmami, które regulują zarówno mitozę, jak i cały cykl komórkowy było opracowanie w latach 20. ubiegłego wieku metod hodowli komórek w warunkach *in vitro*. Początkowo obserwacje żywych komórek utrudniał fakt, iż w świetle przechodzącym (w jasnym polu), nieskontrastowane w sposób naturalny komponenty komórkowe czyniły je mało widocznymi. Sytuacja uległa zmianie w latach 50., kiedy to wzbogacono mikroskopię o kontrast fazowy, którego opracowanie przez Frits'a Zernike zostało nagrodzone w 1953 r. nagrodą Nobla z fizyki. Podobnie jak mikroskopia kontrastowo-fazowa, również obserwacje żywych komórek w świetle spolaryzowanym oraz w kontraście Nomarskiego (kontrast interferencyjny, DIC) dało możliwość uzyskania bar-

dziej precyzyjnych i bogatszych w informacje obrazów (RIEDER i KHODJAKOV 2003).

Rozwój technologii video w latach 80. XX w. i połączenie kamery video z mikroskopem otworzyło nowe możliwości dla badań dynamicznych procesów biologicznych. Możliwe stało się obserwowanie komórek nie tylko w określonej przestrzeni dwuwymiarowej, ale także w czasie. Do tej pory odtworzenie sekwencji zdarzeń określonych procesów, takich jak podziały komórek, możliwe było tylko poprzez analizę następujących po sobie sekwencyjnie statycznych obrazów. Analizowanie uzyskanych z kamery video filmów poklatkowych (ang. time lapse) dostarcza informacji dotyczących podziałów komórkowych, śmierci komórek, interakcji pomiędzy komórkami, ruchliwości komórek czy też zmiany ich kształtów. Pozwala również na śledzenie losów pojedynczych komórek. Rycina 1 przedstawia wybrane zdjęcia uzyskane tą techniką, ilustrujące przebieg prawidłowej mitozy, prowadzącej do powstania dwóch komórek potomnych oraz mitozy, w wyniku której powstały trzy komórki. Oczywiście prowadzenie obserwacji przyżyciowych w czasie trującym nawet kilka dni i wykonywanie dokumentacji w postaci zdjęć ma swoje ograniczenia, które prowadzą do kompromisu pomiędzy uzyskiwaniem obrazów o niższej jakości a zapewnieniem ob-



Ryc.1. Prawidłowy i nieprawidłowy podział komórki.

Zdjęcia uzyskane w trakcie 24-godzinnej obserwacji komórek nowotworowych w mikroskopie świetlnym z kontrastem Nomarskiego. Strzałką wskazano komórkę, która się podzieliła, na każdym zdjęciu podany jest względny czas (godzina:minuty), w którym wykonano zdjęcie. A. prawidłowy podział komórki na dwie potomne; B. nieprawidłowy podział zakończony powstaniem trzech komórek potomnych (fot. M. Śliwińska).

serwowanym komórkom takich warunków, które pozwolą na zachowanie ich pełnej żywotności. Na przykład, naświetlanie komórek światłem o zbyt dużej intensywności może spowodować zatrzymanie komórek w fazie G2 i opóźnione wejście w mitozę lub ich śmierć. Podobnie zmiany temperatury powyżej lub poniżej optymalnej, wynoszącej 37°C, może prowadzić do nawet kilkukrotnego wydłużenia cyklu komórkowego (KHODJAKOV i RIEDER 2006). Pomimo tych, jak i szeregu innych utrudnień, z którymi musi liczyć się eksperymentator, przyżyciowe obserwacje podziałów komórkowych szybko znalazły wykorzystanie w pracach naukowych.

Stosując tę technikę DOVER i POTTEN (1988) badali zróżnicowanie cyklu komór-

kowego w keratynocytach hodowanych *in vitro*. Oceniali długość cyklu komórkowego, liczonego jako czas pomiędzy następującymi po sobie metafazami. Jest to możliwe dzięki wyraźnym zmianom morfologicznym jakie charakteryzują komórki będące w tej fazie mitozy – komórka jest wtedy zaokrąglona otoczona jasną poświatą, którą można zauważyć prowadząc obserwację w kontraście fazowym. Badali też długość trwania mitozy, synchronizację w cyklu komórek pochodzących z jednego podziału oraz migrację komórek po podziale. Wykazali oni heterogenność komórek hodowanych *in vitro* pod względem cyklu komórkowego, wśród których część komórek podlegała intensywnym podziałom, przyczyniając się do wzrostu populacji, pod-

czas gdy inne po podziale migrowały i różnicowały.

Od czasu pierwszych zastosowań techniki przyżyciowych obserwacji komórek w cyklu komórkowym, pojawiło się wiele prac, które oparły swoje wyniki właśnie na tej technice. Możliwości jej zastosowań jest wiele, ale bez wątplenia najwięcej uwagi poświęca się badaniu regulacji cyklu komórkowego oraz jego zaburzeń indukowanych różnego typu czynnikami zewnętrznymi oraz wewnętrznymi (np. modyfikacje genetyczne) w komórkach nowotworowych. Badania te mają na celu ocenę skuteczności działania istniejących chemioterapeutyków, jak również poszukiwanie nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych. W przeciwieństwie do komórek prawidłowych, które wyposażone są w sprawnie działające punkty kontroli cyklu komórkowego, uniemożliwiające podziały komórek z uszkodzeniami DNA, komórki nowotworowe, dzięki licznym mutacjom obecnych w genach kodujących białka związane w sposób bezpośredni lub pośredni z regulacją cyklu komórkowego, uodporniły się na działanie różnego typu czynników fizycznych i chemicznych stosowanych w terapii. Poznanie zatem wpływu określonych chemioterapeutyków i/lub mutacji na losy komórki nowotworowej stanowi doskonale wyzwanie, jakiemu mogą sprostać badania prowadzone z wykorzystaniem video mikroskopii.

Dowodem na to jest np. praca MARQUEZA i współaut. (2003), w której analizowano wpływ związku uszkadzającego DNA, cisplaty, na podziały komórkowe mysich fibroblastów izolowanych ze zwierząt typu dzikiego i myszy (*Msh2*^{-/-}) z defektem w systemie naprawy niesparowanych zasad w DNA (ang. mismatch repair, MMR). Tego typu mutacja zwiększa ryzyko zachorowania na raka okrężnicy w rodzinach dotkniętych dziedzicznym rakiem jelita grubego, niezwiązanym z polipowatością, jak również występuje w wielu typach nowotworów. W badanej populacji komórek mierzono czas jaki upłynął od momentu potraktowania komórki cisplatiną do mitozy lub śmierci, oceniano ilość komórek, które przeszły prawidłową mitozę zakończoną podziałem na dwie komórki potomne, uległy poliploidyzacji (brak cytokinezy) lub umarły. Ponadto, oceniano czas trwania tych procesów. Wykazano, że defekt w badanym systemie naprawy DNA prowadzi do zaburzeń w funkcjonowaniu punktu kontroli fazy G₂, prowadząc do skrócenia czasu

zatrzymania komórek w fazie G₂, natomiast nie zaburza przebiegu mitozy, prowadząc np. do zwiększonej ilości komórek ulegających śmierci oraz nie zmienia czasu jej trwania w porównaniu do komórek prawidłowych. Taka odpowiedź komórkowa, zgodnie z tym, co konkludują autorzy, może być przyczyną indukcji niestabilności chromosomalnej pod wpływem związku uszkadzającego DNA, co sprzyja transformacji nowotworowej.

FEENEY i współaut. (2003) podjęli badania mające na celu określenie oporności komórek nowotworowych raka piersi na topotekan (związek stosowany w terapii), w zależności od fazy cyklu, w której znajdowała się komórka, poddana trwającemu 1 godzinę działaniu badanego związku. Określenie fazy cyklu obserwowanych komórek było możliwe dzięki pulsacyjnemu podaniu bromodeoksy urydyny (BrdU) do hodowli tuż przed podaniem topotekanu. Zasada ta jest wbudowywana do DNA tylko tych komórek, które w momencie jej użycia syntetyzowały DNA. Immunocytochemiczna detekcja BrdU po zakończeniu eksperymentu, a następnie wsteczne prześledzenie losów komórki, w której wykryto obecność BrdU, umożliwiło zidentyfikowanie komórek będących w fazie S cyklu komórkowego w chwili rozpoczęcia badania, jak również wyznaczenie komórek będących w fazie G₁ oraz w fazie G₂. Dzięki tak zaplanowanemu eksperymentowi autorom udało się wykazać, że topotekan uszkadza komórki będące nie tylko w fazie S, jak powszechnie sądzono, ale również G₁ i G₂. Jednakże, wrażliwość komórek na ten związek jest różna. Szczególnie istotna z punktu widzenia terapii okazała się obserwacja, że część komórek będących w fazie G₂ ulegała podziałom nawet po podaniu topotekanu w bardzo wysokim stężeniu. Ponadto stwierdzono, że komórki nowotworowe poddane działaniu topotekanu mają wydłużony cykl komórkowy, co prowadzi do akumulacji komórek w fazie G₂, które, jak wykazali autorzy, są najbardziej odporne na toksyczne działanie tego związku. Zaprezentowane badania mogą zatem stanowić podstawy do opracowywania nowych terapii, w których czas oraz dawka określonego leku może być optymalizowana w zależności od efektu jaki wywiera badany związek na komórki. Mogą stanowić również wskazówkę do tworzenia złożonych terapii wielolekowych, które np. podane w określonej kolejności będą prowadziły do zatrzymania komórek w określonej fazie cyklu, w której komórki charakteryzują

się największą wrażliwością na kolejny związek zastosowany w terapii.

Analiza cyklu komórkowego w oparciu o dane jakie dostarcza video mikroskopia, chociaż bogata w informacje, wydaje się być techniką o dość niskiej wydajności. Badania ostatnich lat dowodzą jednak, że rozwój technologiczny umożliwi wykorzystanie obrazowania komórek żywych do badań na większą skalę. Takie właśnie rozwiązanie metodyczne wykorzystano w badaniach mających za zadanie zidentyfikowanie nowych białek, które mogłyby posłużyć jako cele w terapii neuroblastomy. Poszukiwania były szczególnie ukierunkowane na białka, które wpływają na przebieg mitozy, zgodnie z przekonaniem, że właśnie indukcja zaburzeń mitozy może prowadzić do efektywnej i selektywnej eliminacji komórek nowotworowych (JANSSEN i MEDEMA 2011, MANCHADO 2012). Wytypowano 240 genów kodujących potencjalnie interesujące białka, następnie stosując technikę interferencji RNA (siRNA) wyciszano pojedynczo ekspresję tych genów w komórkach neuroblastomy. Następnie analizowano przy zastosowaniu mikroskopii

przyżyciowej, które ze zmodyfikowanych klonów charakteryzują się zaburzeniami mitozy prowadzącymi do śmierci komórek. Badania te pozwoliły na wytypowanie 30 genów, których produkty mogłyby być atrakcyjnymi celami w terapii przeciwnowotworowej (BATRA i współaut. 2012).

Możliwości obserwowania cyklu komórkowego i śledzenia losów komórek nie ograniczają się jedynie do badań prowadzonych na hodowlach. Dzięki wykorzystaniu skaningowego mikroskopu konfokalnego możliwe było przeprowadzenie tego typu obserwacji na całym organizmie, czyli na zarodkach muszki owocowej. Zarodek pochodził z organizmu zmodyfikowanego genetycznie, do którego wprowadzono gen kodujący histon H2A, połączony z zielonym białkiem fluorescencyjnym (ang. green fluorescence protein, GFP). Dzięki temu możliwa było obserwowanie jąder komórkowych i na podstawie zmian kondensacji chromatyny, w komórkach interfazowych oraz komórkach mitotycznych, śledzenie cyklu komórkowego (CHINTA i WASSER 2011).

KOLOROWE KOMÓRKI CZYLI ŚLEDZENIE KOMÓREK W CYKLU

Badania cyklu komórkowego dokonywane na podstawie obserwacji w mikroskopie świetlnym mają pewne ograniczenia, bowiem opierają się na analizie zmian morfologii komórki. Na tej podstawie można łatwo wyznaczyć moment rozpoczęcia mitozy oraz określić pewne jej etapy. Niemożliwe jest natomiast jednoznaczne rozróżnienie komórek będących w pozostałych fazach cyklu. Dlatego też wykorzystuje się różne znaczniki molekularne, które pojawiają się lub zmieniają swoją wewnątrzkomórkową lokalizację w określonych fazach cyklu, nie zaburzając jednocześnie prawidłowych podziałów. W tym celu wprowadza się do komórek na drodze transfekcji gen kodujący określone białko markerowe połączone z białkiem fluorescencyjnym, umożliwiającym jego łatwą detekcję w żywych komórkach. Na tej zasadzie, dzięki nadprodukcji białka PCNA (ang. proliferating cell nuclear antygen) połączonego z zielonym białkiem fluorescencyjnym GFP możliwe stało się zidentyfikowanie komórek syntetyzujących DNA (LEONHARDT i współaut. 2000). Wprowadzenie do komórek genu kodującego ligazę I DNA połączoną z czerwonym białkiem fluorescencyjnym (ang. red fluore-

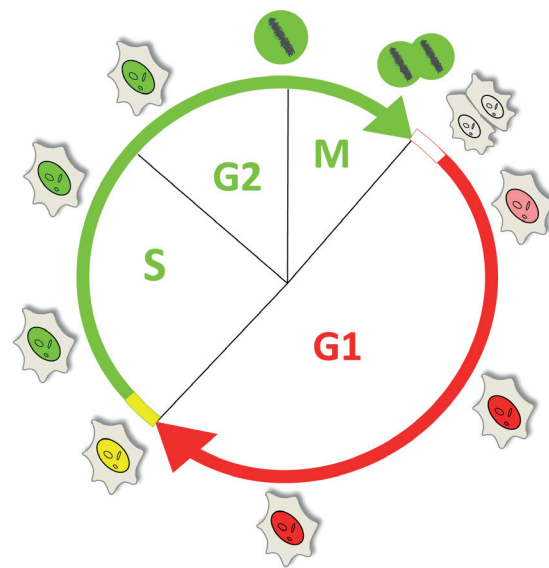
scent protein, RFP) pozwoliło na oznaczenie komórek będących w fazie S, które charakteryzowały się określoną, punktową lokalizacją tego białka, zaś świecenie ligazy w fazie G1 i G2 było rozproszone (EASWARAN i współaut. 2005). Nadprodukcja w komórkach białek określonej fazy cyklu połączonych z białkiem fluorescencyjnym bez wątplenia wzbogaciła dane uzyskiwane w trakcie przyżyciowych obserwacji prowadzonych w mikroskopie świetlnym. Jednak obserwacje te opierają się często na stosunkowo subtelnym zmianach związanych np. z lokalizacją białka markerowego i z tego powodu wymagają uzyskiwania bardzo dobrej jakości obrazów, co nie zawsze jest możliwe w przypadku badania komórek żywych. Dlatego też istotnym przełomem w badaniach nad cyklem komórkowym było opracowanie systemu reporterowego, nazwanego przez jego twórców FUCCI (ang. fluorescent ubiquitination-based cell-cycle indicator). Pozwala on na śledzenie przechodzenia komórek przez kolejne fazy cyklu, a uzyskiwany obraz jest bardzo wysokiej jakości i umożliwia badanie nie tylko komórek hodowanych *in vitro*, ale także tkanek, co do tej pory było niemożliwe.

Istota działania tego systemu opiera się na okresowej, zależnej od fazy cyklu, proteolitycznej degradacji dwóch białek, Cdt1 oraz gemininy. Cdt1 jest białkiem, które wchodzi w skład kompleksu pre-replikacyjnego warunkującego inicjację replikacji DNA, zaś geminina wiąże się z Cdt1 hamując jego aktywność. Precyzyjna regulacja procesu inicjacji replikacji, w którą zaangażowane są te białka, zapewnia, że synteza DNA odbywa się tylko jednokrotnie podczas pojedynczego cyklu komórkowego. Obydwa białka są substratami kompleksów ligazy E3 (kompleks APC^{Cdh1} oraz SCF^{Skp2}), które poprzez dołączanie ubiquityny do białek naznaczają je do proteosomalnej degradacji. Jednocześnie białko Skp2 wchodzące w skład kompleksu SCF jest ubiquitynowane przez APC^{Cdh1}, zatem pomiędzy tymi dwoma kompleksami funkcjonuje negatywne sprzężenie zwrotne regulujące ich aktywność (VODERMAIER 2004). Aktywność tych kompleksów zmienia się w cyklu, APC^{Cdh1} działa w późnej fazie M i G1, podczas gdy SCF^{Skp2} jest aktywny w fazie S i G2. Efektem naprzemiennej ich aktywności w cyklu komórkowym są oscylacje w poziomie ich bezpośrednich substratów, czyli Cdt1 i gemininy. Poziom Cdt1 jest najwyższy w fazie G1, podczas gdy geminina występuje w fazach S, G2 i M (NISHITANI i współaut. 2000). Opierając się na tej wiedzy SAKAUE-SAWANO i współaut. (2008) stworzyli system oparty na syntezie białek Cdt1 i gemininy połączonych z białkami emitującymi odpowiednio czerwoną i zieloną fluorescencję. Dzięki temu możliwe stało się śledzenie komórek w cyklu, w trakcie którego jądra komórek będących w fazie G1 świeciły na czerwono, zaś komórki będące w fazie S, G2 i M na zielono. Możliwe również było wyznaczenie komórek wchodzących w fazę syntezy, ponieważ emitowały one żółtą fluorescencję, co wynikało z krótkiego okresu, w którym narastał poziom Cdt1 (sprzężone z białkiem zielonym), a degradacja gemininy (sprzężona z białkiem czerwonym) jeszcze nie została zakończona. Z kolei, gwałtowny spadek poziomu gemininy pod koniec fazy M i stopniowy wzrost Cdt1 w fazie G1 powodował, że w komórkach kończących mitozę i wchodzących w fazę G1 nie obserwowano ani czerwonej ani zielonej fluorescencji (Ryc. 2).

Wykorzystując FUCCI możliwe było zbadanie wpływu różnych stężeń etopozydu, związku uszkadzającego DNA stosowanego w terapii, na zmiany w cyklu komórkowym (SAKAUE-SAWANO i współaut. 2011). Autorzy

po raz pierwszy pokazali, że komórki gruczołu piersiowego myszy pod wpływem niskich stężeń tego związku zatrzymują się w fazie G2, a następnie wchodzą w nieprawidłową mitozę, w trakcie której dochodzi do fragmentacji chromosomów, przedwczesnego zakończenia mitozy (nieprowadzącej do podziału komórki), dekondensacji chromatyny i zatrzymania komórek w kolejnej fazie cyklu, czyli fazie G1. Z kolei, wyższe stężenia etopozydu prowadziły do endoreduplikacji spowodowanej kolejnymi rundami replikacji DNA, po których nie następowała mitoz. Wykazali również, że inhibitor cyklinozależnej kinazy Cdk4 wywierał różny efekt na komórki w zależności od tego, w której fazie cyklu się znajdowały w momencie podania inhibitora. Przeprowadzenie tego typu obserwacji możliwe jest jedynie dzięki zastosowaniu video mikroskopii świetlnej wzbogaconej o fluorescencyjne znaczniki cyklu komórkowego i dostarcza nowych informacji, których nie można by było uzyskać badając cykl komórkowy oparty na cytometrycznym pomiarze ilości DNA, który jest klasyczną metodą do prowadzenia tego typu analizy.

Wykorzystanie FUCCI nie ogranicza się tylko do komórek hodowanych *in vitro*. SA-



Ryc. 2. Schemat ilustrujący zależne od fazy cyklu komórkowego zmiany we fluorescencji zlokalizowanej w jądrze komórkowym wykorzystanej w systemie reporterowym FUCCI.

Obserwowana fluorescencja komórek wynika ze zmian w poziomie białka Cdt1 (kolor czerwony) i gemininy (kolor zielony) (wg SAKAUE-SAWANO i współaut. 2011, zmieniona).

KAUE-SAWANO i współaut. (2008) wykazali, że możliwe jest prowadzenie obserwacji komórek nowotworowych wyznakowanych FUCCI po podaniu ich myszom, w których komórki te tworzyły guzy. Udało się również uzyskać myszy transgeniczne, których komórki charakteryzowały się ekspresją genów kodujących znaczniki cyklu komórkowego, wykorzystywanych w FUCCI. Taki model eksperymentalny stworzył unikalne możliwości

do śledzenia korelacji pomiędzy cyklem komórkowym a rozwojem organizmu. Wykorzystano go również do obserwacji przyżyciowych z zastosowaniem techniki time-lapse w trzech wymiarach, w celu badania czasowej i przestrzennej regulacji proliferacji, migracji i różnicowania nerwowych komórek progenitorowych w obrębie kresomózgowia. Obiektem, który posłużył do badań były skrawki mózgu embrionów myszy.

PODSUMOWANIE

Prace nad doskonaleniem metod stosowanych do przyżyciowych obserwacji cyklu komórkowego trwają nadal. Powstają nie tylko nowe, udoskonalone systemy biologiczne pozwalające na rozróżnianie komórek w poszczególnych fazach, ale także coraz bardziej wyrafinowane programy pozwalające na wielkoskalową analizę uzyskanych informacji. Bez wątplenia już w niedługim czasie będzie można badać zmiany w poziomie określonych białek biorących udział w przekazywaniu sygnału w określonych fazach cyklu i w sposób bezpośredni badać wpływ różnego

typu interwencji na losy komórek. Możliwości wykorzystania techniki opartej na video-mikroskopii są bardzo duże i mogą mieć niezwykle istotny wpływ na rozwiązywanie różnorodnych problemów biologicznych.

PODZIĘKOWANIA

Zdjęcia zostały wykonane w Pracowni Mikroskopii Konfokalnej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego. Autorka dziękuje członkom Pracowni Mikroskopii za pomoc.

ZASTOSOWANIE MIKROSKOPII DO BADAŃ PRZYŻYCIOWYCH CYKLU KOMÓRKOWEGO

Streszczenie

Pośród wielu różnych technik mikroskopowych wykorzystywanych do badania procesów biologicznych, technika video-mikroskopii (ang. time-lapse microscopy) daje unikalne możliwości prowadzenia obserwacji w czasie na poziomie pojedynczych komórek. Bez wątplenia, jednym z procesów, budzącym od lat szczególne zainteresowanie badaczy jest podział komórki. Prawidłowy rozdział materiału genetycznego, który ma miejsce w trakcie mitozy jest jednym z warunków zachowania stabilności genomu. Z drugiej strony, zaburzenia mitozy mogą prowadzić do aneuploidii i w efekcie transformacji nowotworowej. Zmiany morfologiczne charakterystyczne dla komórki mitotycznej pozwalają na obserwowanie jej w trakcie podziału, a także na śledzenie losów komórek potomnych. Dodatkowo, wprowadzenie do komórek genów kodujących fluorescencyjnie wyznakowane białka, których ekspresja zmienia się w zależności od fazy cyklu, umożliwia stosunkowo precy-

zyjną obserwację komórek w poszczególnych fazach cyklu poprzedzających mitozę lub następujących po niej. Obserwacje żywych komórek i tworzenie filmów poklatkowych znajdują obecnie duże zastosowanie w badaniach prowadzonych na komórkach nowotworowych, mających na celu ocenę skuteczności działania istniejących chemioterapeutyków jak również poszukiwaniu nowych związków o takich właściwościach. Mogą stanowić również wskazówkę do tworzenia złożonych terapii wielolekowych, w trakcie których badane związki podane w określonej kolejności będą prowadziły do zatrzymania komórek w takiej fazie cyklu, w której są one bardziej wrażliwe na kolejny związek zastosowany w terapii.

Możliwości wykorzystania techniki video-mikroskopii są bardzo duże i mogą mieć niezwykle istotny wpływ na rozwiązywanie różnorodnych problemów biologicznych.

CELL CYCLE ANALYSIS USING TIME-LAPSE MICROSCOPY

Summary

Among many different techniques used in microscopy in order to visualize biological processes, time-lapse microscopy gives unique opportunity to observe living cells on single cell level in time. One of the important processes that gain special interest

is mitosis. Equal and undisturbed distribution of genetic material into two daughter cell that take place during mitosis is prerequisite of genome stability. In contrary, mitosis disturbances give rise to chromosomal instability, aneuploidy and cancer. Mor-

physiological changes that characterize mitotic cells enables to monitor cell division as well as tracking the fate of daughter cells. Moreover, transfection of the cells with vectors coding fluorescent proteins which expression changes during cell cycle make possible to follow the cell cycle progression of individual cell. Time-lapse microscopy is used in cancer biology research in order to reveal the influence of

chemotherapeutic drugs on the cell cycle of cancer cells. It is also used to find the new compounds or to set new chemotherapeutics drug regimes, that could lead to cell cycle alteration, lethal for the cancer cell.

Time-laps microscopy is a very powerful technique that could help to resolve different biological issues.

LITERATURA

- BATRA R., HARDER N., GOGOLIN S., DISSL N., SOONS Z., JÄGER-SCHMIDT C., LAWRENZ C., EILS R., ROHR K., WESTERMANN F., KÖNIG R., 2012. *Time-lapse imaging of neuroblastoma cells to determine cell fate upon gene knockdown*. PLoS One, e50988.
- CHINTA R., WASSER M., 2012. *Three-dimensional segmentation of nuclei and mitotic chromosomes for the study of cell divisions in live Drosophila embryos*. Cytometry A. 81, 52–64.
- DOVER R., POTTEN C. S., 1988. *Heterogeneity and cell cycle analyses from time-lapse studies of human keratinocytes in vitro*. J. Cell Sci. 89, 359–364.
- EASWARAN H. P., LEONHARDT H., CARDOSO M. C., 2005. *Cell cycle markers for live cell analyses*. Cell Cycle 4, 453–455.
- FEENEY G. P., ERRINGTON R. J., WILTSHIRE M., MARQUEZ N., CHAPPELL S. C., SMITH P. J., 2003. *Tracking the cell cycle origins for escape from topotecan action by breast cancer cells*. Br. J. Cancer. 88, 1310–1317.
- JANSSEN A., MEDEMA R. H., 2011. *Mitosis as an anti-cancer target*. Oncogene 30, 2799–2809.
- KHODJAKOV A., RIEDER C. L., 2006. *Imaging the division process in living tissue culture cells*. Methods 38, 2–16.
- LEONHARDT H., RAHN H.P., WEINZIERL P., SPORBERT A., CREMER T., ZINK D., CARDOSO M.C., 2000. *Dynamics of DNA replication factories in living cells*. J. Cell Biol. 149, 271–280.
- MALUMBRES M., 2011. *Physiological relevance of cell cycle kinases*. Physiol. Rev. 91, 973–1007.
- MANCHADO E., GUILLAMOT M., MALUMBRES M., 2012. *Killing cells by targeting mitosis*. Cell Death Differ. 19, 369–377.
- MARQUEZ N., CHAPPELL S. C., SANSOM O. J., CLARKE A. R., COURT J., ERRINGTON R. J., SMITH P. J., 2003. *Single cell tracking reveals that Msh2 is a key component of an early-acting DNA damage-activated G2 checkpoint*. Oncogene 22, 7642–7648.
- MEDEMA R. H., MACŮREK L., 2012. *Checkpoint control and cancer*. Oncogene 31, 2601–2613.
- NISHITANI H., LYGEROU Z., NISHIMOTO T., NURSE P., 2000. *The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast*. Nature 404, 625–628.
- RIEDER C. L., KHODJAKOV A., 2003. *Mitosis through the microscope: advances in seeing inside live dividing cells*. Science 300, 91–96.
- SAKAUE-SAWANO A., KOBAYASHI T., OHTAWA K., MIYAWAKI A., 2011. *Drug-induced cell cycle modulation leading to cell-cycle arrest, nuclear mis-segregation, or endoreplication*. BMC Cell Biol. 12, 2.
- SAKAUE-SAWANO A., KUROKAWA H., MORIMURA T., HANYU A., HAMA H., OSAWA H., KASHIWAGI S., FUKAMI K., MIYATA T., MIYOSHI H., IMAMURA T., OGAWA M., MASAI H., MIYAWAKI A., 2008. *Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression*. Cell 132, 487–498.
- VODERMAIER H. C., 2004. *APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle*. Curr. Biol. 14, R787–R796.