

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Sistemi

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria



Sommario

**ANALISI A SINGOLA CELLULA DI COLONIE DI
LIEVITO IN ADATTAMENTO ALL'ARRESTO
MITOTICO**

Relatrice: Prof.ssa Linda PATTINI

Correlatore: Dott. Andrea CILIBERTO

Laureando:

Emanuele MARTINI

Matricola 770107

Sommario

Questo lavoro di tesi si inserisce nel filone di ricerca riguardante lo studio del sistema di controllo del ciclo di divisione cellulare. Ogni cellula deriva, infatti, da una sua cellula progenitrice, da qui l'importanza e la delicatezza del processo di duplicazione cellulare. Il ciclo cellulare può essere diviso in due fasi: una di sintesi (fase **S**) del materiale genetico attraverso la copiatura del DNA e il legame fisico dei cromosomi duplicati (*cromatidi fratelli*), ed una detta mitotica (fase **M**) in cui si ha la divisione nucleare (*mitosi*) e, infine, cellulare (*citocinesi*).

Il ciclo cellulare progredisce grazie ad una famiglia di enzimi chiamati chinasi ciclina-dipendenti (*Cdks*) che sono attive solo quando sono legate a delle particolari proteine dette cicline, che si alternano nel tempo scandendo le diverse fasi della duplicazione cellulare. L'attività di queste chinasi è controllata da dei meccanismi di sorveglianza chiamati **checkpoint**.

In questo progetto di tesi ci si è occupati di uno di questi punti di controllo, denominato Spindle Assembly Checkpoint (**SAC**), il quale verifica la correttezza nella separazione dei cromatidi fratelli (*segregazione cromosomica*) e arresta la divisione cellulare nel caso di problemi. In particolare, ci siamo occupati del fenomeno dell'**adattamento al checkpoint** per cui una cellula arrestata in mitosi dal SAC riesce a duplicarsi ugualmente. Il fenomeno dell'adattamento è rilevante poiché viene osservato nel caso di cellule sottoposte a trattamento con farmaci antimitotici.

Lo Spindle Assembly Checkpoint

Il SAC sorveglia la transizione da metafase, in cui i cromosomi vengono allineati formando la cosiddetta *piastra metafasica*, ad anafase, in cui i cromatidi fratelli vengono separati attraverso delle strutture chiamate *microtubuli* che li tirano verso i due poli opposti della cellula.

Questa transizione può essere suddivisa in due eventi: la separazione dei cromatidi,

attraverso la degradazione della *coesina* (il complesso proteico che tiene fisicamente legati i cromatidi fratelli) e la degradazione della ciclina mitotica. Entrambi questi eventi sono catalizzati da un complesso proteico detto APC (*Anaphase Promoting Complex*) che risulta attivo solo quando legato alla proteina Cdc20 (*Cell Division Cycle protein 20*).

Il SAC si inserisce in questa transizione sorvegliando il corretto attacco dei microtubuli ai cromosomi. In seguito a un errato, o mancante, aggancio tra microtubuli e cromosomi il checkpoint porta al sequestro della proteina Cdc20 in un altro complesso proteico denominato MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*), inibendo l'attività dell'APC e, in definitiva, non permettendo il passaggio in anafase. L'importanza di questo meccanismo di sorveglianza risiede nel fatto che un errore in questa fase del ciclo cellulare provoca una duplicazione diseguale nel numero di cromosomi (*aneuploidia*) delle due cellule generate.

L'aneuploidia non è necessariamente letale, ma è altamente correlata a patologie quali i tumori e altre malattie genetiche (per esempio la sindrome di Down o *trisomia21*). Per questo l'evoluzione ha creato un meccanismo di sorveglianza, il SAC, per evitarla. Come detto in precedenza, molti farmaci antitumorali in uso clinico utilizzano il SAC per arrestare la crescita delle cellule tumorali, destabilizzando il legame con i microtubuli. Cellule sottoposte ad un prolungato stimolo attivatore del checkpoint alla fine si adattano, e continuano nella divisione cellulare, pur incapaci di dividere correttamente il DNA. In questa tesi, si vuole, quindi, indagare il fenomeno dell'adattamento studiandone la correlazione con le due proteine maggiormente coinvolte nella transizione metafase-anafase (Cdc20 e la ciclina mitotica Clb2) e, inoltre, cercando di capire il comportamento delle cellule che sono riuscite a duplicarsi in presenza di un segnale di arresto del checkpoint.

Tecniche sperimentali

Per studiare lo Spindle Assembly Checkpoint in questo lavoro di tesi si è utilizzato l'organismo modello *Saccharomyces Cerevisiae*, un lievito eucariote unicellulare, in quanto è facilmente manipolabile geneticamente, ha un tempo di duplicazione breve

e condivide la rete molecolare con gli eucarioti pluricellulari più evoluti.

Essendo l'adattamento un fenomeno altamente **variabile**, ci si è dovuti rivolgere a una tecnica in grado di catturare il comportamento di ogni singola cellula, conosciuta come **analisi a singola cellula** (*single cell analysis*). Questa tecnica prevede l'utilizzo della microscopia a fluorescenza time lapse di colonie cellulari. Attraverso la raccolta di più immagini, a intervalli di tempo regolari, è possibile catturare il comportamento nel tempo delle singole cellule di una colonia di lievito in condizioni specifiche, come quelle dell'adattamento.

La disponibilità in natura di **proteine fluorescenti** (*GFP, mCherry, YFP*) rende possibile mediante un processo chiamato *tagging* la marcatura delle proteine di interesse. È, infatti, possibile fondere alla sequenza genica che codifica per una proteina una sequenza genica che codifica per una proteina fluorescente. In questo modo è stato possibile usare dei ceppi di lievito che producessero le proteine di interesse (Cdc20 e Clb2) fluorescenti, legando così la fluorescenza emessa con la concentrazione della proteina. L'utilizzo di un microscopio in grado di acquisire delle sequenze di fotogrammi derivanti dalle emissioni fluorescenti ha quindi permesso di rilevare la dinamica delle proteine di interesse in presenza dello Spindle Assembly Checkpoint costantemente indotto.

L'attivazione del SAC è stata indotta mediante l'utilizzo di ceppi in cui la presenza di galattosio nel terreno di coltura cellulare inducesse l'over-espressione di una proteina del checkpoint, Mad2. Quest'ultima fa parte del MCC che sequestra Cdc20, e quindi la sua overespressione non permette l'attivazione del APC e il passaggio in anafase anche se il legame tra microtubuli e cinetocori avviene normalmente. Si tratta di un SAC comparabile a quello generato da farmaci, come il *nocodazolo*, che agiscono direttamente sui microtubuli, permette l'adattamento e, inoltre, è inducibile a piacimento cambiando il terreno di coltura cellulare. La strumentazione sperimentale è completata dalla presenza di piastre microfluidiche per il *live cell imaging* attraverso le quali è possibile far crescere le cellule. A causa della lunga durata degli esperimenti, necessaria per lo studio

dell'adattamento, si sono utilizzate delle camerette microfluidiche che consentano, mediante perfusione, il mantenimento del nutrimento delle cellule. Le camerette usate, inoltre, risolvono anche il problema della sovrapposizione verticale delle cellule, attraverso un sistema di intrappolamento lungo il piano orizzontale; questo è molto importante perché permette il riconoscimento di una singola cellula in un'immagine.

Analisi di immagine

Dopo l'acquisizione della sequenza di fotogrammi, attraverso una fotocamera digitale collegata al microscopio, si entra in una delle fasi fondamentali per l'analisi a singola cellula: l'**analisi delle immagini**.

I passi fondamentali che deve effettuare un software di analisi di immagini per l'analisi a singola sono tre: individuazione di ogni singolo corpo cellulare, estrazione dei suoi contorni (**segmentazione**) e capacità di seguire nei vari frames della sequenza lo stesso corpo cellulare.

Sono disponibili diversi software che si occupano di questo, tra i quali si è deciso di utilizzare *Phylocell*, un codice MATLAB utilizzato per lo studio di colonie di *Saccharomyces Cerevisiae* in condizioni non perturbate, cioè in ambiente favorevole alla crescita delle cellule.

La scelta è ricaduta su questo programma in quanto il più preciso nel segmentare le cellule di lievito. Al tempo stesso, *Phylocell* presenta diversi limiti, che sono stati affrontati nella tesi. Il primo limite risulta evidente in condizioni di checkpoint indotte negli esperimenti. L'arresto della divisione cellulare indotta dal checkpoint provoca un **cambiamento morfologico** nelle cellule: tondeggianti in condizioni non perturbate e non circolari in adattamento. Questa differenza morfologica si riflette in errate segmentazioni di *Phylocell*, che nella sua strategia di segmentazione utilizza delle forti ipotesi geometriche delle cellule; il lavoro di questa tesi è stato, quindi, anche quello di risolvere questa criticità. La soluzione proposta prevede l'utilizzo di una strategia di segmentazione *Region Based*, che non considera la morfologia dell'oggetto da estrarre, che prende il nome di ***Watershed Marker Controlled***.

Questo metodo interpreta l'immagine come un rilievo topografico con montagne e avvallamenti dove l'altezza della superficie è determinata dall'intensità del pixel, ricavando i contorni come le linee che rappresentano gli spartiacque, immaginando di riempire con dell'acqua (che fluirà verso il minimo topografico più vicino) l'intera regione dell'immagine.

L'utilizzo dei **marker**, cioè delle regioni dell'immagine in cui viene imposto il valore di minimo, risolve uno dei principali problemi della strategia Watershed: l'over-segmentazione, si sono utilizzati i contorni estratti da *Phylocell* per individuare queste regioni di minimo.

Un'ulteriore criticità di *Phylocell* evidenziata dalle nostre analisi è la segmentazione dell'inizio della **fase di gemmazione**, in quanto i parametri geometrici utilizzati da questo software prevedono l'utilizzo di un diametro medio che non permette l'estrazione di contorni di oggetti troppo piccoli (come ad esempio la gemma del lievito).

Anche per risolvere questo tipo di errore si è proposta una strategia di segmentazione *Region Based*, che non considera la morfologia dell'oggetto da estrarre, chiamata **Region Growing**, che utilizzano dei criteri di omogeneità (nel caso del recupero della gemma è l'intensità) dei pixel vicini a un pixel di partenza (*seed*) per unirli in un'unica regione. Il metodo implementato oltre al criterio di omogeneità, utilizza anche un criterio di massima distanza dal punto di partenza e di livelli di soglia di intensità minima e massima per estrarre i contorni.

Anche per questo metodo si sono utilizzate i contorni ottenuti da *Phylocell* come punto di partenza: il seed per la segmentazione *Region Growing* è identificato come il centroide della segmentazione al frame successivo e, inoltre, per l'individuazione della soglia di intensità.

Questi due metodi, recupero della fase di gemmazione e recupero di cellule non circolari, sono state implementate all'interno dell'interfaccia grafica di *Phylocell*, inserendo due ulteriori strumenti grafici per risolvere due problemi (errato seed per il recupero della fase di gemmazione e individuazione come unico corpo cellulare di due cellule nell'estrazione con Watershed) molto riscontrati nel loro utilizzo: uno

strumento di reseedling manuale per il recupero della gemma e uno strumento di divisione automatica lungo la strozzatura di un corpo cellulare. Per verificare la bontà dei metodi implementati si sono confrontati con delle segmentazioni manuali, prese come riferimento. Questi test hanno dato dei buoni risultati in termini di numero di errori recuperati e di sovrapposizione con i contorni fatti a mano.

Risultati biologici

La strumentazione descritta e i metodi di analisi di immagine introdotti sono stati utilizzati per l'analisi a singola cellula di tre esperimenti: i) correlazione tra adattamento e la ciclina mitotica Clb2 (necessaria per attivare APC e quindi per entrare in anafase), ii) correlazione tra adattamento e l'attivatore di APC Cdc20 e iii) studio della memoria di adattamento.

Lo studio della ciclina mitotica ha evidenziato l'assenza di quantità di soglia superata la quale le cellule adattano, e quindi una **mancanza di correlazione diretta tra Clb2 e adattamento** al checkpoint. Riguardo alla dinamica della ciclina mitotica si è visto che i livelli di questa proteina si accumulano in condizioni di SAC attivo fino a un livello di plateau per un lungo periodo, per poi una volta divise degradarsi velocemente: questo è in **contrapposizione con i risultati ottenuti da studi in popolazione** (ad esempio Western Blot) in cui si deduceva erroneamente una degradazione lenta e costante di Clb2. Lo studio di Cdc20, a causa della sua rapida degradazione che non permette la maturazione del fluoroforo e quindi non permette di vedere il segnale in fluorescenza, è stato fatto per via indiretta. Si è deciso di cercare una correlazione tra la sintesi di Cdc20 e l'adattamento per vedere la sintesi, si è utilizzato un fluoroforo prodotto esattamente come Cdc20. L'analisi di immagine non ha evidenziato differenze tra le due popolazioni e quindi abbiamo concluso che **la sintesi di Cdc20 non guida il fenomeno dell'adattamento**.

Si è poi voluto indagare il ruolo di questa proteina diminuendone la degradazione. Per questo si è utilizzato dei ceppi senza una proteina (Mnd2) coinvolta nella degradazione di Cdc20. Si è dimostrato che nei ceppi con Mnd2 deleto (e quindi con

una maggiore quantità di Cdc20) il fenomeno dell'adattamento avviene in tempi più rapidi e più sincroni, suggerendo quindi un **coinvolgimento di questa proteina nell'adattamento** al checkpoint mitotico.

Studiando quello che succede in seguito all'adattamento si è intuiva la presenza di una **forma di memoria, o di perdita di sensibilità**, al SAC che accorcia la durata dei cicli cellulari dopo un primo ciclo con un tempo di adattamento lungo.