

Metody immortalizacji komórek i ich zastosowanie w badaniach nad rozrodem^{*)}

GABRIEL BODEK, AGNIESZKA BLITEK, ANNA E. KOWALCZYK,
JOLANTA KIEWISZ, ADAM J. ZIĘCIK

Zakład Mechanizmów Działania Hormonów Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN,
ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

Bodek G., Blitek A., Kowalczyk A. E., Kiewisz J., Zięciak A. J.

Methods of cell immortalization and their application in reproductive studies

Summary

After a few cell divisions primary cell cultures enter into a terminally nondividing state. Replicative senescence of cells involves a wide range of cellular events including changes in gene expression. Using immortalization methods it is possible to immortalize many of the primary cell cultures. The major advantage is that the immortalized cells represent the tissue of origin. It is possible to distinguish spontaneous and induced immortalization. The spontaneous immortalization of cultured cells is quite a rare event. Carcinogenic agents, radiation and viral oncogens can induce immortalization of cells. Transfection of cells with oncogens and telomerase activation generates an extended lifespan of cells. This review discusses various approaches to cell immortalization and the application of such cell lines for studies on animal reproduction.

Keywords: animal reproduction, immortalization, cell line, transfection

Wykorzystanie linii komórek nowotworowych do badań nad poznaniem mechanizmów molekularnych zachodzących w komórkach jest dziś bardzo rozpowszechnione. Pionierskie badania *in vitro* przyczyniły się do wyjaśnienia wielu procesów zachodzących *in vivo*. W przypadku badań na zwierzętach hodowlanych użycie stabilnych linii komórkowych jest znikome. Przy braku wyprowadzonych linii komórek nowotworowych, co ma miejsce np. u człowieka, jedną z możliwości prowadzących do uzyskania wspomnianego materiału badawczego, jest izolacja komórek bezpośrednio z tkanek. Hodowle komórek pierwotnych z powodzeniem wykorzystano do wyjaśnienia, między innymi, szlaku syntezy prostaglandyn w błonie śluzowej macicy świni (5, 6), odpowiedzi *endometrium* na hormony steroidowe czy oksytocynę, a także poznania kaskady reakcji zachodzących podczas implantacji u świni (8, 12). Trzeba jednak pamiętać, że, jak każdy sztuczny model, i ten z użyciem hodowli pierwotnych, ma swoje zalety i wady. Najcenniejszą zaletą komórek hodowli pierwotnych jest ich fenotypowa niezmiennosc i podobienstwo do tkanki, z której pochodzą (przynajmniej przez kilka pierwszych pasaży). Wadą hodowli pierwotnych jest natomiast ograniczona ilość podziałów oraz różnicowanie się komórek podczas hodowli.

Większość typów komórek w hodowlach pierwotnych po określonej liczbie podziałów, charakterystycznej dla danego typu, spowalnia tempo proliferacji, aby w końcu przestać się dzielić (9). Komórki stają się niewrażliwe na czynniki mitogenne bez względu na ich obecność w medium inkubacyjnym. Dla przykładu, komórki w hodowlach pierwotnych błony śluzowej macicy, średnio już po 2 tygodniach hodowli na plastikowych płytkach przestają proliferować (19). Po wejściu w fazę spowolnionej proliferacji, komórki w szybkim tempie zmieniają swoje właściwości morfologiczne, między innymi kształt i objętość. Wszystkim tym zmianom towarzyszy przebudowa struktury jądra, ekspresji genów, produkcji białek, niewrażliwość na czynniki apoptotyczne oraz zmiana dynamiki metabolizmu (4). Badania pokazują, iż wyjście z cyklu komórkowego i przedwczesna śmierć komórek w hodowlach pierwotnych związana jest w dużym stopniu z nieodpowiednimi warunkami hodowli, a nie jedynie z mechanizmem związanym ze starzeniem się komórek. Rutynowe metody hodowli w atmosferze 5% zawartości dwutlenku węgla i 95% powietrza, poprzez stres oksydacyjny, obniżają zdolności adaptacyjne komórek i przyczyniają się do przedwczesnej śmierci. Jedynie te komórki, które potrafią szybko zaadaptować się do nowych warunków, przeżyją i zaczną się namnażać (15). Forsythe i wsp. badali żywotność płodowych fibroblastów płuc hodowanych w atmosferze 2-5% i 21% tlenu. Komórki inkubowane w środowiu-

^{*)} Praca częściowo finansowana z grantu Ministerstwa Nauki Szkolnictwa Wyższego nr 1360/B/P01/2007/33; Jolanta Kiewisz otrzymuje stypendium Prezesa PAN.

sku obniżonej zawartości tlenu żyły i dzieliły się dłużej (11). Podobnie zachowywały się komórki nabłonkowe gruczołu mlekowego. Ponadto w hodowlach o obniżonym stężeniu tlenu w atmosferze zaobserwowano spadek ekspresji kinaz białkowych zależnych od cyklin (CDK – cyclin-dependent protein kinases), czego skutkiem jest trwanie komórek w cyklu komórkowym (30). Różnicowanie się komórek to kolejne niepożądane zjawisko zachodzące w hodowlach pierwotnych, które prowadzi do zmiany właściwości fenotypowych komórek. Znany i opisany jest od dawna problem utraty receptorów w komórkach nabłonkowych w hodowlach *in vitro*, jako efekt ich różnicowania (10).

Immortalizacja spontaniczna i indukowana

Uzyskanie stałej linii komórkowej zapewnia nieograniczony dostęp do niezmiennego genotypowo i fenotypowo materiału badawczego, który w przyszłości posłużyć może do bardziej kompleksowych badań. Stan immortalizacji, czyli inaczej „nieśmiertelności” to nabycie przez komórkę zdolności do nieograniczonej liczby podziałów. Immortalizację komórek możemy uzyskać w sposób spontaniczny i indukowany.

Immortalizacja spontaniczna w hodowlach pierwotnych jest bardzo rzadko spotykana. Istnieje kilka doniesień, opisujących powstanie tego typu linii komórkowych w hodowlach pierwotnych. Jedną z nich była linia HMT-3522, wyizolowana z hodowli pierwotnej nabłonka gruczołu mlekowego człowieka, jakkolwiek autorzy nadmieniają, że hodowla została wyprowadzona z tkanek nie w pełni zdrowych (25, 27). Linia komórek HMT-3522 wyizolowana od pacjentki z mastrofią (dysplazja włóknisto-torbielowata sutka) przez wiele lat używana była jako modelowa linia nowotworu piersi. Kolejnym, klasycznym przykładem immortalizacji spontanicznej jest linia MCF-10A (27), również wyizolowana z materiału pochodzącego od pacjentki z mastrofią. Pozyskane komórki uzyskały nieśmiertelność po inkubacji w medium o niskiej zawartości wapnia. Powyższe badania poprzedzone zostały wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi wydłużenia przeżywalności komórek w hodowlach pierwotnych nabłonka gruczołu mlekowego w obecności obniżonego stężenia wapnia w warunkach *in vitro* (Ca^{2+} obniżono z 1,05 mM do $< 0,06$ mM). Prawdopodobnie dzięki zahamowaniu procesu różnicowania komórki zachowały swój pierwotny fenotyp (21). Komórki linii MCF-10A charakteryzowały się typowymi cechami dla komórek pierwotnych nabłonka gruczołu mlekowego, a mianowicie: (a) brakiem nowotworzenia w ksenografach (u myszy o obniżonej odporności), (b) wzrostem przestrzennym na błonie kolagenowej, (c) wzrostem kontrolowanym przez hormony i czynniki wzrostu, (d) niezdolnością do wzrostu komórek w zawieszynie. Komórki MCF-10A transfekowano następnie genem oporności dla neomycyny tworząc linie MCF-10AneoN. Następne transfekcje tych komórek genem hras czy zmutowanym T-24 hras doprowadzi-

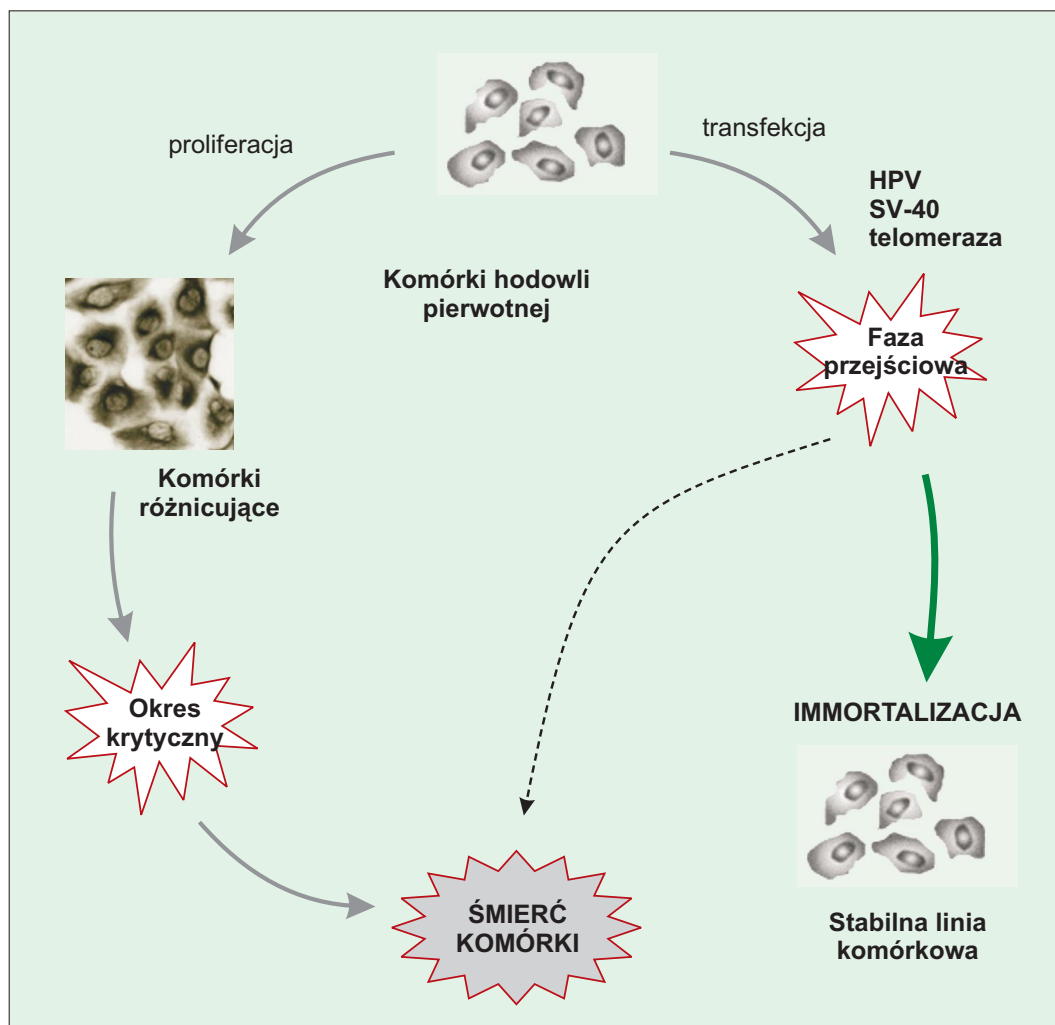
ły do powstania linii MCF-10AneoT (22). Linie te w dużym stopniu przyczyniły się do poznania biologii rozwoju nowotworów gruczołu mlekowego człowieka (24). W 1995 roku Shay i wsp. z materiału pobranego od pacjentki z zespołem Li-Fraumeni uzyskali kolejną, stabilną, spontanicznie immortalizowaną linię komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego (25). Interesujący wydaje się fakt, iż spontaniczna immortalizacja została jedynie zaobserwowana w komórkach pochodzenia nabłonkowego (25), co podkreśla wrodzoną różnicę pomiędzy komórkami nabłonkowymi a śródmiąższowymi gruczołu mlekowego.

Dzięki wykorzystaniu czynników nowotworczych, napromieniowania czy transfekcji za pomocą onkogenów, obecnie jesteśmy w stanie unieśmiertelnić większość rodzajów komórek.

Jednym ze sposobów na unieśmiertelnienie komórek może być ich napromieniowanie. Metoda radiacyjna doskonale sprawdza się w przypadku komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego. Jednakże promieniowanie jonizujące w przypadku innych komórek nie jest używane jako główny czynnik transformacji nowotworowej ze względu na nieprzewidywalność wyników, a szczególnie daleko idące zmiany fenotypowe komórek w stosunku do komórek pochodzenia (2). Porównując komórki nabłonkowe gruczołu mlekowego poddane napromieniowaniu stwierdzono regulację w dół genu *nes1* (normal epithelial specific 1), który ulega ekspresji w zdrowych komórkach (20). Podobnie jak w przypadku komórek nabłonka piersi poddanych działaniu promieni jonizujących, zauważono spadek ekspresji tego genu w większości nowotworów gruczołu mlekowego i prostaty (13). Dodatkowo wykazano, iż napromieniowanie w hodowlach nabłonka piersi wywołuje zmiany ekspresji genów E-kadheryny, β -kateniny oraz koneksyny 43, które związane są, między innymi, z ustaleniem polarności komórki (23).

Immortalizację komórek hodowli pierwotnych można uzyskać poprzez transfekcję onkogenami, takim jak antygen-T wirusa SV-40 (Simian virus-40, SV-40 T-anty), adenowirusem E1A i E1B, zmutowanym onkogenem p53, onkogenem ha-ras czy polimerazy T-antygenem (1, 25). Jednym z szerzej wykorzystywanych w badaniach jest onkogen SV-40 T-anty. Transfekcja onkogenem SV-40 T-anty powoduje utrzymanie komórek w cyklu komórkowym poprzez inaktywację genów p53 i Rb (retinoblastoma) odpowiedzialnych za kontrolę cyklu komórkowego. Jednakże całkowite unieśmiertelnienie tak transferowanych komórek wymaga dodatkowej przebudowy genomu komórki poprzez ekspresję transfekowanego wirusowego onkogeny.

Wirus HPV16 najczęściej kojarzony jest z nowotworem szyjki macicy (16). Wprowadzenie wirusa HPV do komórek nabłonka prowadzi do immortalizacji tych komórek, a związane jest to z aktywacją onkogenów E6 i E7, których działanie powoduje zmianę



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie procesu proliferacji oraz transformacji komórek hodowli pierwotnej w stabilną linię komórkową

ekspresji wspomnianych już dwóch regulatorów cyklu komórkowego, mianowicie białek p53 i Rb. Wykorzystując wirusowy konstrukt LXS_N-16E6E7, Johnson i wsp. unieśmiertnili i scharakteryzowali owcze komórki błony śluzowej macicy z 5. dnia cyklu rujoowego (17). Komórki te wykazywały ekspresję białka STAT 1, 2 i 3 (signal transducers and activators of transcription). Stwierdzili również w komórkach wyizolowanych z nabłonka światła macicy, iż INF- τ (interferon tau) wzbudzał translokację jądrowego STAT 1, 2 i 3 oraz powodował regulację w górę genów zależnych od INF- τ . Dzięki immunocytochemii potwierdzono ekspresję receptorów estrogenowych i progesteronu we wszystkich immortalizowanych liniach. Wang i wsp., używając podobnego systemu HPV16 E6/E7, po raz pierwszy unieśmiertnili komórki nabłonka światła macicy, nabłonka gruczołowego, komórki śródmiąższowe oraz komórki mięśniówki macicy świni (27). W ten sposób uzyskano stabilne linie komórkowe nawet po 50. pasażu, podczas gdy te same komórki w hodowlach pierwotnych przestają się dzielić już między 6. a 12. pasażem, często ulegając wcześniej różnicowaniu, co wiąże się, między innymi, z utratą receptorów steroidowych. Pod względem morfologicz-

nym komórki immortalizowane przypominały komórki hodowli pierwotnych. Analiza Western blotting wykazała ekspresję receptorów estrogenowych oraz progesteronu we wszystkich typach komórek.

Użycie onkogenów powodujących inaktywację szlaku białek p53 i Rb, jak niektórzy twierdzą, prowadzić może do zmiany funkcji składowych komórki, co w konsekwencji spowodować może genetyczną niestabilność komórek i zmianę fenotypu. Niemniej Gudjonsson i wsp. stwierdzili, iż pomimo użycia systemu HPV16-E6E7 podczas immortalizacji nabłonkowych komórek sutka, uzyskano immortalizowane linie, które fenotypowo przypominały komórki hodowli pierwotnych o stabilnym genotypie (14).

Jak wiadomo, komórki eukariotyczne tuż przed podziałem podwa-

wiają swój materiał genetyczny podczas replikacji DNA tak, aby w trakcie podziału każda potomna komórka otrzymała kompletny zestaw genów komórki macierzystej. Wraz z każdym podziałem w komórkach somatycznych ulegają skróceniu telomery, czyli powtarzające się sekwencje DNA na końcach każdego z chromosomów. Nadmierne skrócenie telomerów po każdym podziale włącza molekularne mechanizmy, które prowadzą do zahamowania proliferacji. Istnieje teoria mówiąca, że w długości telomerów zapisana jest liczba podziałów komórkowych, jakie może przejść typowa komórka somatyczna. Drogą awaryjną dla niektórych komórek, pozwalającą ominąć mechanizm kontrolujący, jest uruchomienie ekspresji telomerazy. Odkrycie enzymu telomerazy i jego podjednostek miało znaczący wkład w badaniach nad proliferacją, immortalizacją oraz transformacją nowotworową (18). Jest to enzym o niespotykanej budowie, zawierający elementy białkowe, jak również RNA, posiadający aktywność odwrotnej transkryptazy. Telomeraza potrafi wydłużać telomery, a jej wysoką aktywność obserwuje się w komórkach nieustannie proliferujących, między innymi w komórkach macierzystych szpiku kostnego. Dowiedziono, że pozakomórkowe wprowadze-

nie telomerazy zwiększa liczbę podziałów komórek w niektórych liniach fibroblastów czy komórkach nabłonkowych (7). Jednakże dalsze badania pokazały, iż zwiększona aktywność telomerazy nie jest wystarczająca do całkowitej immortalizacji komórek. Telomeraza przedłuża żywotność, ale jej wzmożona aktywność nie zapewnia nieśmiertelności. Dla przykładu, w komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego do pełnego unieśmiertelnienia, poza aktywną telomerazą, niezbędna była blokada szlaku Rb oraz inaktywacja strażnika genomu białka p53 (3).

Piśmiennictwo

1. *Band V.*: In vitro models of early neoplastic transformation of human mammary epithelial cells. *Methods Mol. Biol.* 2003, 223, 237-248.
2. *Band V.*: Preneoplastic transformation of human mammary epithelial cells. *Semin. Cancer Biol.* 1995, 6, 185-192.
3. *Beausejour C. M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S. W., Yaswen P.*: Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 2003, 22, 4212-4222.
4. *Ben-Porath I., Weinberg R. A.*: When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *Review. J. Clin. Invest.* 2004, 113, 8-13.
5. *Blitek A., Waclawik A., Kaczmarek M. M., Stadejek T., Pejsak Z., Ziecik A. J.*: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in the porcine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. *Reprod. Domest. Anim.* 2006, 41, 251-257.
6. *Blitek A., Ziecik A. J.*: Effect of LH on prostaglandin F2alpha and prostaglandin E2 secretion by cultured porcine endometrial cells. *Reproduction* 2005, 130, 105-112.
7. *Bodnar A. G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu C. P., Morin G. B.*: Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998, 279, 349-352.
8. *Bowen J. A., Newton G. R., Weise D. W., Bazer F. W., Burghardt R. C.*: Characterization of a polarized porcine uterine epithelial model system. *Biol. Reprod.* 1996, 55, 613-619.
9. *Campisi J.*: The biology of replicative senescence. *Eur. J. Cancer* 1997, 33, 703-709.
10. *Cussenot O., Teillac P., Le Duc A., Ketels F., Calvo F.*: Culturing of normal and tumor cells of the human prostate. *Ann. Urol. (Paris)* 1989, 23, 533-537.
11. *Forsythe N. R., Evans A. P., Shay J. W., Wright W. E.*: Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. *Aging Cell* 2003, 2, 235-243.
12. *Glasser S. R., Bazer F. W., Wang G.*: ICI 182 870 produces mixed antiestrogen effects on polarized pregnant pig uterine luminal epithelial cells. *Biol. Reprod.* 1998, 58, 173.
13. *Goyal J., Smith K. M., Cowan J. M., Wazer D. E., Lee S. W., Band V.*: The role for NES1 serine protease as a novel tumor suppressor. *Cancer Res.* 1998, 58, 4782-4786.
14. *Gudjonsson T., Villadsen R., Nielsen H. L., Ronnov-Jessen L., Bissell M. J., Petersen O. W.*: Isolation, immortalization and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev.* 2002, 16, 693-706.
15. *Halliwel B.*: Oxidative stress in cell culture: an underappreciated problem? *FEBS Lett.* 2003, 540, 3-6.
16. *Hausen H.*: Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1994, 186, 131-156.
17. *Johnson G. A., Burghardt R. C., Newton G. R., Bazer F. W., Spencer T. E.*: Development and characterization of immortal ovine endometrial cell lines. *Biol. Reprod.* 1999, 61, 324-330.
18. *Klingelutz A. J.*: The roles of telomeres and telomerase in cellular immortalization and the development of cancer. *Anticancer Res.* 1999, 19, 4823-4830.
19. *Kyo S., Nakamura M., Kiyono T., Maida Y., Kanaya T., Tanaka M., Yatabe N., Inoue M.*: Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics. *Am. J. Pathol.* 2003, 163, 2259-2269.
20. *Liu X. L., Wazer D. E., Watanabe K., Band V.*: Identification of a novel serine protease-like gene, the expression of which is down-regulated during breast cancer progression. *Cancer Res.* 1996, 56, 3371-3379.
21. *McGrath C. M., Soule H. D.*: Calcium regulation of normal human mammary epithelial cell growth in culture. *In Vitro* 1984, 20, 652-662.
22. *Miller F. R., Soule H. D., Tait L., Pauley R. J., Wolman S. R., Dawson P. J.*: Xenograft model of progressive human proliferative breast disease. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993, 85, 1725-1732.
23. *Park C. C., Henshall-Powell R. L., Erickson A. C., Talhouk R., Parvin B., Bissell M. J.*: Ionizing radiation induces heritable disruption of epithelial cell interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 10728-10733.
24. *Santner S. J., Dawson P. J., Tait L., Soule H. D., Eliason J., Mohamed A. N.*: Malignant MCF10CA1 cell lines derived from premalignant human breast epithelial MCF10AT cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2001, 65, 101-110.
25. *Shay J. W., Tomlinson G., Piatsyzek M. A., Gollahon L. S.*: Spontaneous in vitro immortalization of breast epithelial cells from a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15, 425-432.
26. *Shay J. W., Van Der Haegen B. A., Ying Y., Wright W. E.*: The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Exp. Cell Res.* 1993, 209, 45-52.
27. *Soule H. D., Maloney T. M., Wolman S. R., Peterson W. D. Jr, Brenz R., McGrath C. M.*: Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* 1990, 50, 6075-6086.
28. *Wang G., Johnson G. A., Spencer T. E., Bazer F. W.*: Isolation, immortalization, and initial characterization of uterine cell lines: an in vitro model system for the porcine uterus. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000, 36, 650-656.
29. *Weaver V. M., Petersen O. W., Wang F., Larabell C. A., Briand P., Damsky C.*: Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J. Cell Biol.* 1997, 137, 231-245.
30. *Yaswen P., Stampfer M. R.*: Molecular changes accompanying senescence and immortalization of cultured human mammary epithelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002, 34, 1382-1394.

Adres autora: dr Gabriel Bodek, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn; e-mail: gbodek@pan.olsztyn.pl