

GERAÇÃO DE UM WORKFLOW DE ANÁLISE DE BIOIMAGENS DE MICROSCOPIA PARA A DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE CDK2 E CDK4 AO NÍVEL DE CÉLULA ÚNICA

Lucas de Oliveira Cambuim

Alexandre Bruni Cardoso

Instituto de Química/Universidade de São Paulo

lucasoliveracambuim@usp.br

Objetivos

As quinases dependentes de ciclina (Cdks) são reguladoras centrais do ciclo celular. O monitoramento e a modulação da atividade de Cdk2 e Cdk4 são de grande interesse para o entendimento da decisão da célula de se proliferar ou se manter no estado de quiescência.¹ O ciclo celular é principalmente estudado em culturas de células submetidas a sincronização forçada, não reproduzindo a quiescência *in vivo* e podendo ocultar respostas heterogêneas de células individuais.²⁻⁴ Este trabalho tem como objetivos gerar datasets de imagens de microscopia de células epiteliais mamárias Eph4 que expressam sensores fluorescentes para Cdk2 e Cdk4 e desenvolver um workflow computacional em Python para avaliar a atividade dessas quinases ao nível de célula única nessas imagens.

Métodos e Procedimentos

Foi utilizada uma sublinhagem de células Eph4 que expressa as sondas fluorescentes DHB-Venus (para atividade de Cdk2), mCherry-Cdk4-KTR (para atividade de Cdk4) e histone-H2B-mTurquoise (para cromatina). No primeiro experimento, as células foram cultivadas em baixa (5.000 células/cm²) e alta (50.000 células/cm²) densidade por 72h. As células Eph4 são sensíveis à inibição por

contato⁴, de modo que apresentam menor proliferação e atividade de Cdks em alta densidade, em comparação com baixa densidade. No segundo experimento, as células foram tratadas com inibidores específicos para Cdk2 e Cdk4 por 24h. As células foram fotografadas com microscópio de fluorescência Leica DMI8, com quatro canais: um contraste de fase e três canais correspondentes às sondas utilizadas. O workflow foi implementado em Python, utilizando a plataforma Jupyter Notebook e ambientes virtuais criados em miniconda, se baseando em scripts desenvolvidos pelo laboratório e em pacotes open source. A segmentação dos núcleos foi feita a partir do canal de H2B-mTurquoise, com uso de pacote baseado em Deep Learning (Stardist). A partir da primeira máscara, foram geradas máscaras nuclear erodida e citoplasmática, permitindo a quantificação a partir da razão de intensidade média de fluorescência nessas regiões (citoplasma/núcleo), com um fator de correção para atividade de Cdk4.⁵ Na última etapa, os dados obtidos foram plotados em gráficos utilizando pacotes como Matplotlib e Seaborn.

Resultados

O workflow tem todas as etapas de análise funcionando. O processo é totalmente automatizado, permitindo a análise de todas as

imagens em uma única execução.



Figura 1: Recorte de imagem original do canal nuclear e as máscaras utilizadas para a quantificação da atividade de Cdk2. (A) Imagem de microscopia de fluorescência com sonda H2B-mTurquoise. (B) Máscara nuclear. (C) Máscara de anel citoplasmático.

Foram adquiridas 240 imagens de microscopia, pareadas com suas imagens de segmentação.

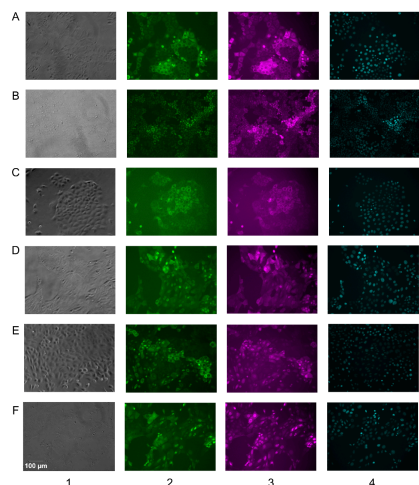


Figura 2: Imagens de microscopia de fluorescência e contraste de fase da sublinhagem EpH4 utilizada, cultivada sob diferentes condições experimentais. Cada linha corresponde a uma condição: (A) baixa densidade, (B) alta densidade, (C) controle (DMSO), (D) tratamento com Cdk2 inibidor III, (E) tratamento com Palbociclib (inibidor de Cdk4), (F) combinação dos inibidores. Cada coluna corresponde a um canal: (1) contraste de fase, (2) YFP - Cdk2, (3) TXR - Cdk4, (4) CFP- núcleos.

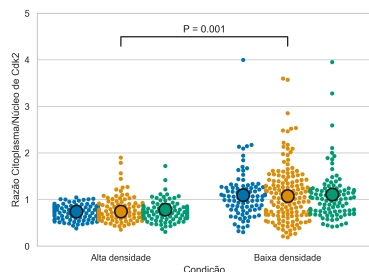


Figura 3: Gráfico de atividade de Cdk2 (razão citoplasma/núcleo) em alta e baixa densidade, obtido pelo workflow. A atividade de Cdk4 seguiu o mesmo padrão.

Conclusões

A variedade de condições e estados celulares obtida com os datasets auxiliou no desenvolvimento do workflow e permite a validação de outros pipelines de análises computacionais, o treinamento de redes neurais profundas para a predição de atividade de Cdk2 e novos insights biológicos. Os resultados obtidos indicam que o workflow é eficaz na análise das atividades das Cdk2, e sua estrutura automatizada permite a execução da análise em larga escala. Além disso, o workflow parece ser promissor para avaliação da intensidade média de fluorescência de outras sondas cujo funcionamento se baseie em translocação núcleo-citoplasma.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Referências

- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 36, 131-149 (2003).
- Spencer, S. L. et al. The Proliferation-Quiescence Decision Is Controlled by a Bifurcation in CDK2 Activity at Mitotic Exit. *Cell* 155, 369–383 (2013).
- Fiore, A. P. Z. P., Ribeiro, P. D. F. & Bruni-Cardoso, A. Sleeping Beauty and the Microenvironment Enchantment: Microenvironmental Regulation of the Proliferation-Quiescence Decision in Normal Tissues and in Cancer Development. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 59 (2018).
- Fomicheva, M. & Macara, I. G. Genome-wide CRISPR screen identifies noncanonical NF- κ B signaling as a regulator of density-dependent proliferation. *eLife* 9, e63603 (2020).
- Yang, H. W. et al. Stress-mediated exit to quiescence restricted by increasing persistence in CDK4/6 activation. *eLife* 9, e44571 (2020).