

Úloha lipidových komponent v buněčných signalizacích

(vybrané modely a metody detekce)

A. Kozubík

Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i., (*Oddělení cytokinetiky*)

Ústav experimentální biologie, PŘF MU

(*Oddělení fyziologie a imunologie živočichů*)

Brno

Metody používané v laboratoři cytokinetiky BFÚ AV ČR, Brno

Legenda: FACS - průtoková cytometrie

FM - fluorescenční mikroskop

SM - světelný mikroskop

WB - western blotting

FM - fluorimetrie (FluoStar)

CM - kolorimetrie (FluoStar nebo Elisa reader)

LM - luminometrie (VUVEL, Lojek)

PAGE - polyakrylamidová elektroforéza

RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction

RG - radiografie

ELFO – agarosová elektroforéza

Přehled metod a metodologií

Možné přístupy
při studiu „chování“ buněčných populací



Foreign Invited Speakers

Welcome

J. Bergervoet (Netherlands)

D. Marie (France)

G. Mazzini (Italy)

(M. Z. Ratajczak)

M. Kucia (USA)

J. P. Robinson (USA)

H. M. Shapiro (USA)

J. Szöllösi (Hungary)



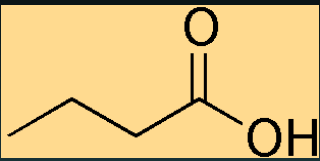
ANALYTICKÁ CYTOMETRIE III

Červenohorské sedlo

Zavedené modely a vybrané metodické možnosti (v kooperaci)

Modely	Studované parametry a metodické přístupy
<p style="text-align: center;">Buňky <i>in vitro</i></p> <p>Řada buněčných linií <i>in vitro</i> odvozené od různých typů <u>nádorových i nenádorových tkání, mezi nimi zejména:</u></p> <ul style="list-style-type: none">• krvetořné (HL-60, U937, lidské promyelocytární linie)• střevní epitel (linie lidského adenokarcinomu kolonu HT-29, embryonální linie FHC)• jaterní tkáň (myši Hepa 1, nádorové krysí buňky WB-F344) <p><u>Fagocyty a lymfocyty:</u></p> <ul style="list-style-type: none">• izolované z krve myši a zdravých lidských dobrovolníků• buněčná linie myších peritoneálních makrofágů RAW 264	<p>ÚROVEŇ BUNĚČNÁ</p> <p>Oxidační a antioxidační vlastnosti emulzí, změny spekter buněčných lipidů a mastných kyselin (<u>HPLC, plynová chromatografie</u>)</p> <p>Produkce superoxidového aniontu, peroxidu vodíku, hydroxylového radikálu, oxidu dusnatého a působení na PUFA, lipidy a buňky (luminometrie, fotometrie, elektrochemie)</p>
<p style="text-align: center;">Studie <i>in vivo</i></p> <p style="text-align: center;">Laboratorní myši kmenů CBA, C57B1, nebo jejich kříženci (event. lab. potkani)</p> <ul style="list-style-type: none">• <u>změny krvetvorby</u>- myši s krvetvorbou normální nebo utlumenou ionizujícím <u>zářením</u> či aplikací <u>cytostatika</u> podávány testované substance• <u>nádorový růst</u>- u myši s experimentálně <u>implantovaným nádorem</u> sledovány efekty léčby testovanými substancemi na nádorový růst• <u>zánětlivý/septický model</u>- myši intraperitoneálně podáván endotoxin (10 mg/kg) rozpuštěný ve fyziologickém roztoku. Současně nebo následně mohou být podávány také studované látky event. lipidové emulze apod.	<p>ÚROVEŇ buněčných POPULACÍ A TKÁNÍ</p> <p>Změny cytokinetiky (proliferace, diferenciace, apoptóza) a <u>oxidativního metabolismu</u> (<u>flow cytometrie, fluorimetrie, fluorescenční mikroskopie</u>)</p> <p>Extra- a intracelulární <u>tvorba reaktivních metabolitů kyslíku a dusíku</u> buňkami, <u>peroxidace lipidů</u> (luminometrie, flow cytometrie, fotometrie, Western blotting)</p> <p><u>Akumulace triacylglycerolů v cytoplasmě buněk ovlivněných různými složkami lipidových emulzí, fluidita membrán</u> (HPLC, plynová chromatografie, fluorimetrie)</p> <p><u>Komplexní analýza krvetvorby</u> pokusných myši - stanovení počtů jednotlivých typů buněk v periferní krvi a krvetořných orgánech, vyhodnocení stavu poolu progenitorových buněk pro granulocyty, makrofágy (GM-CFC) a erytrocyty (BFU- E).</p>

buněčné linie (tkáňové kultury)



Přechod adenom x karcinom

Inhibiční účinky butyrátu

Buněčné linie

fetální colon
FHC

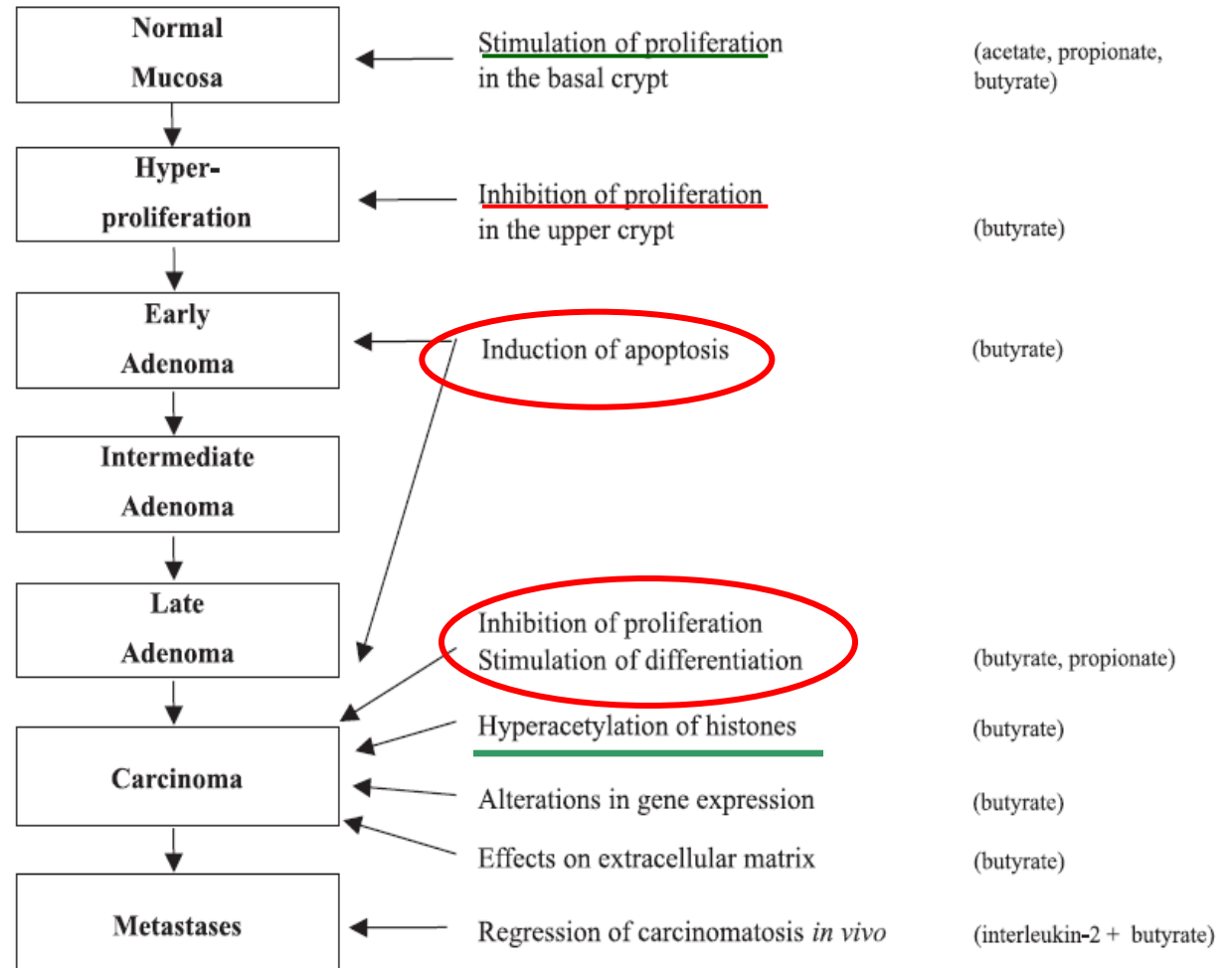
adenomy
AA/C1
RG/C2

adenocarcinomy
HT-29

HCT116

lymf.
metastáza
SW-620

**Carcinogenní
potenciál**



Buňky epiteliálního původu

Označení	Lokalizace	Organismus	Patologie
A2780	ovárium	člověk	karcinom, Pt - citlivé
A2780cis	ovárium	člověk	karcinom, Pt - rezistentní
A549	plíce	člověk	karcinom
BEAS-2B	plíce	člověk	tranformované virem
CaCo2	kolon	člověk	adenokarcinom
CCL-64	plíce	norek	normální
CH-1	ovarium	člověk	karcinom, Pt- citlivé
COR-L23	plíce	člověk	karcinom
COR-L23/CP3	plíce	člověk	karcinom, Pt - rezistentní
COR-L23R	plíce	člověk	karcinom, doxorubicin - rezistentní
CT26	kolorectum	myš	karcinom
E10	plicní	myš	normální
FHC	kolon	člověk	embryonální
H4IIELuc	játra	krysa	karcinom

Buňky epiteliálního původu

Označení	Lokalizace	Organismus	Patologie
HaCaT	epidermis	člověk	normální
HeLa	cervix	člověk	karcinom
Hepa1	játra	myš	karcinom
HepG2	játra	člověk	karcinom
HT-29	kolon	člověk	adenokarcinom
HT115	kolon	člověk	adenokarcinom
HUVEC	endotel	člověk	embryonální
LEP	plíce	člověk	embryonální (fibroblasty)
MCF-7	prs	člověk	adenokarcinom
MDA-MB-231	prs	člověk	adenokarcinom
MDCK	ledvina	pes	normální
MVLN	prs	člověk	adenokarcinom
SKOV-3	ovarium	člověk	adenokarcinom, Pt – primárně rezistentní
T47D	prs	člověk	karcinom
WB-F344	játra	krysa	normální

Buňky mezenchymálního původu

Označení	Lokalizace	Organismus	Patologie
G5:113		myš	fibrosarkom
HL-60	krev	člověk	leukemie
IMM	nervové		imortalizované
Jurkat	krev	člověk	leukemie (lymfoidní)
K562	krev	člověk	leukemie (erytroidní)
MOLT-4	krev	člověk	leukemie (lymfoidní)
ML-1	krev	člověk	leukemie (myeloidní)
NB4	krev	člověk	leukemie (myeloidní)
U937	krev	člověk	leukemie (monocytární)
V79	fibroblasty	křeček	normální (fibroblasty)
WEHI	krev	myš	leukemie (lymfoidní)

Metody průkazu apoptotické formy buněčné smrti

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
DAPI staining	Studium morfologických změn buněčného jádra apoptotických buněk	FM
Annexin V - FITC + propidium jodid (PI)	Externalizovaný fosfatidylserin apop. buněk + zachovaná semipermeabilita (detekce rané apoptózy)	FACS, FM
TUNEL + PI	Průkaz specifické fragmentace DNA (DNA zlomů - nicků – ss DNA breaks)	FACS, FM
SubG0/G1 peak v distribuci buněčného cyklu	Barvení buněčné DNA propidium jodidem s extrakcí nízkomolekulární DNA citrátovým pufrem	FACS
PI - Hoechst double - stain	Rozdělení buněk na mrtvé/živé, podle morfologie jádra identifikace apoptotických buněk	FM
DNA žebřík	Průkaz fragmentace DNA na 180 bp fragmenty (tzv. ladder)	ELFO
Kaspáza 1, 3, 7, 8, 9	Detekce exprese specifických proteáz	WB
Caspase assay (c-3, -6, -8, -9 subs.)	Důkaz aktivity specifických proteáz štěpením specifické sekvence na fluorescenční substrát	FM
cytokeratin 18 - protilátka M30	Neoepitop vytvořený štěpením cytokeratinu kaspázou	FACS,
Lamin B	Degradace Laminu B kaspázami	WB
PARP	Detekce štěpení proteinu PARP	WB
JC-1, TMRE, DiOC6, MitoTracker Red, Rh 123	Detekce změn mitochondriálního potenciálu $\Delta\Psi_m$	FACS
Hoechst + propidium jodid (PI)	Detekce apoptických, nekrotických a sekundárně nekrotických buněk (detekce i pozdní apoptózy)	FM
F-aktin	Detekce intenzity polymerizace a depolymerizace aktinu (pomocí konjugátu faloidin-FITC)	FCM, FM
Intracelulární pH	Průkaz poklesu intracelulárního pH vůči fyziol. hodnotě nutného k aktivaci enzymu DNA-ázy	
Izolace cytochromu c z cytos. frakce	Vylití Cyt. C z mitochondrií do cytosolu a formování komplexu s Apaf-1 a procasp-9 vytváří apoptosom	WB
OxPhos Complex IV subunit II	Studium funkce mitochondrií	WB

Proteiny a molekuly spojené s procesem apoptózy

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Bad, Bag-1, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-XL, Bid, Mcl-1	Bcl-2 rodina - regulátory průběhu apoptózy	WB
c-FLIP	Inhibitor kaspázy 8	WB
c-IAP1, XIAP	Rodina inhibitorů kaspáz	WB
Hydroethidin, 2',7'-dichlorofluoresceindiacetát	Stanovení respiračního vzplanutí a produkce ROS provázející apoptózu	FACS
Dihydrorhodamin 123	Stanovení respiračního vzplanutí a produkce ROS provázející apoptózu	FACS
Lucigenin	Stanovení respiračního vzplanutí a produkce ROS provázející apoptózu	LM

Metody stanovení úrovně proliferace, cytotoxicity, viability

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Počítání buněk	Počítač částic založený na principu konduktivity	Coulter counter
Dye exclusion assay - eosin, trypanová modř	Barvení mrtvých buněk s permeabilizovanou membránou	SM
Dye exclusion assay - propidium jodid	Barvení mrtvých buněk s permeabilizovanou membránou	FACS
MTT, WST-1	Stanovení relativního množství buněk metabolizujících tetrazolové soli MTT, WST-1 na formazanové produkty	CM
CyQuant	Kit (Molecular Probes) pro značení DNA speciální fluorescenční barvou - proliferační assay	FM
PCNA	Marker proliferace - podjednotka DNA-polymerázy δ a ϵ	WB, SM
Inkorporace BrdU	Analog deoxyuridinu se inkorporuje během replikace DNA v proliferačních buňkách	FACS, FM
Inkorporace 3H-thymidinu (izotopová metoda)	Triciem značený thymidin se inkorporuje do buněk během replikace DNA - scintilační hodnocení	RG
Clonogenic assay	Ošetřované buňky rostou v médiu nebo na agaru, sleduje se schopnost vytvářet kolonie buněk	

Metody analýzy buněčného cyklu

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Barvení pomocí PI (např. Vindelův roztok)	Distribuce buněčné populace podle množství celkové buněčné DNA do jednotlivých fáz bun. Cyklu	FACS
Mouse anti-BrdU-FITC + PI	Sledování syntézy DNA na základě inkorporace BrdU do DNA proliferujících buněk	FACS
Pulse-chase BrdU labeling	Sledování průchodu buněk cyklem	FACS

Proteiny spojené s regulací buněčného cyklu

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
cyklin A	Řízení S - G2 fáze b. cyklu - asociuje s cdk 2	WB
cyklin D1	Řízení přechodu z fáze G1 do S - asociuje s cdk 4	WB
cdk 2 activity assay	Řízení S - G2 fáze b. cyklu - asociuje s cyklinem A	RG
cdk 4	Řízení přechodu z fáze G1 do S - asociuje s cyklinem D	WB
p15, 16	Rodina p16 - inhibující kinázy cdk 4 a 6	WB
p21/waf1/cip1/sdi1/pic1	Inhibitor cdk a DNA replikace, transaktivovaný pomocí p53	WB
p27/kip1	Inhibitor komplexů cyklin D-cdk 4, cyklin A-cdk 2	WB
Topoizomeráza II α	Replikační faktor - marker pozdní S/G2/M fáze b. cyklu	WB
pRb	Onkosupresor zastavující ve fosforylované formě b. cyklus v souvislosti s p21	WB
p53	Tumor supresorový gen - "Guardian of the genome" - downstream reguluje p21/waf	WB

Metody detekce diferencujících se buněk

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
CD11b, CD14	Znaky monocytární diferenciace lidských leukemických buněk	FACS
Nespecifické esterázy	Stanovení aktivity α -naftyl acetát esterázy (difer. leukemických buněk)	CM
Fagocytická aktivita	Znak monocytární diferenciace leukem. buněk - pohlcení částic konjug. s FITC	FACS
NBT redukční test	Se zvyšující se úrovní diferenciace roste počet reduk. formazanových zrn	CM
Aktivita alkalické fosfatázy	Znak diferenciace kolonových buněk - disodná sůl 4-nitrofenyl fosfátu	CM
Nespecifické esterázy	Stanovení aktivity nespecifických esteráz pomocí štěpení fluorescenční sondy CFDA (karboxyfluorescein diacetát)	FACS
Intracelulární pH	Stanovení intracelulárního pH jako markru diferenciace buněk pomocí fluorescenční sondy SNARF-1	FACS
Polymerizace aktinu	FITC značený faloidin	FM

Proteiny spojené s diferenciací buněk

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
RAR α	Receptor all-trans retinoic acid, indukující diferenciaci leukemických buněk	WB
RXR α	Receptor aktivovaný 9-cis-retinovou kyselinou	WB
VDR	Receptor vitamínu D, množství VDR moduluje růst a diferenciaci nádorových buněk	WB

Mezibuněčná komunikace, anoikis, motilita buněk

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
FAK	Nereceptorová tyrosin kináza zapojená v přenosu signálů z ECM	WB
Cadheriny	Složka desmosomu, nachází se v komplexu s cateniny	WB, FM
γ -catenin	Složka desmosomu, nachází se v komplexu s cadheriny	WB
connexin 43	Složka gap junctions (GJIC)	WB
GJIC inhibition assay	Testování funkčnosti GJIC pomocí luciferové žluti	FM
Wound healing assay	Testování motility buněk	FM

Metabolismus kyseliny arachidonové

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
cytopl. fosfolipáza A2	Odštěpuje AA z membrán	WB
5-lipoxygenáza	Metabolizuje AA na leukotrieny	WB
Cyklooxygenáza 2	Metabolizuje AA na prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany	WB
Uvolňování AA	Uvolnění AA z buněk do media	HPLC (VUVEL)

Signální dráhy receptorů smrti

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Fas-L	Ligand Fas-R - signál smrti	WB
Fas-R (CD95)	Receptor smrti - aktivovaný navázáním Fas-L	WB,FACS
FADD	Adaptérová molekula - součást DISC komplexu	WB
Toso	Inhibitor Fas indukované apoptózy nacházející se na povrchu T lymfocytů	WB
TRAIL	Ligand TRAIL-R - signál smrti	WB
TRAIL-R1,2 (DRs)	Receptory smrti - aktivovány navázáním TRAIL-L	WB,FACS
TRAIL-R3,4 (DcRs)	Decoy receptory - vážou TRAIL, ale neaktivují proces apoptózy	WB,FACS

Kinázy a proteiny s nimi asociované

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Ras, N-Ras	Mebránový G-protein	WB
ERK 1/2	Imunochemické stanovení neaktivní a aktivní (fosforylované formy)	WB
p38	Imunochemické stanovení totální (na fosforylačním stavu nezávislé) hladiny p38	WB
JNK/SAPK activity assay	stanovení aktivity analýzou fosforylace substrátu (radioizotopová metoda)	RG
Akt/PKB	Serin/Threoninová protein kináza, může stimulovat Ras	WB
pTyr	Protilátka detekující fosforylovaný Tyrosin	WB
pSer	Protilátka detekující fosforylovaný Serin	WB

Signální dráha TGFβ

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
TGF β1	Růstový faktor	WB
TGF β R I, II	Receptor pro TGF β	WB
Smad 2, 4	Aktivace TGF R vede k translokaci těchto transkripčních faktorů do jádra	WB

Proteiny asociované s AhR

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
AhR	Ligand-dependentní transkripční faktor,	WB, RT-PCR EMSA, FM
Reporter gene assay for AhR	Metoda stanovení aktivity Ah R	LM
Stabilní transfekce mutantních variant AhR a ARNT pomocí plazmidových vektorů		
ARNT	Jaderný partner receptoru AhR umožňující jeho vazbu na XRE element	WB, RT-PCR
CYP1A1	Oxidáza se smíšenou funkcí patřící do rodiny cytochromů P450	WB, RT-PCR

Proteiny spojené s hormonální regulací

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
ER α , β	Receptory estrogenů	WB
Reporter gene assay for ER	Metoda stanovení aktivity estrogenních receptorů	LM
Cathepsin D	Endopeptidáza indukovaná estrogeny	WB
LRP/MVP	Ribonukleoproteinové částice ovlivněné hladinou estrogenů	WB
PPAR γ	Jaderný receptor pro hormony ovlivňovaný MAPK	WB

Transkripční faktory a asociované proteiny

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
NF- κ B	Aktivátor řady genů spojených s hematopoezou, apoptózou atd.	WB, EMSA
I κ B	Inhibitor NF- κ B, který jej zadržuje v cytoplasmě	WB
c-Myc	Po navázání heterodimerizačního partnera Max působí jako TF	WB
p53	Onkosupresor podílející se na řízení oprav DNA lézí	WB
AP - 1 (Jun + Fos)	Homo- či heterodimerní transkripční faktor	WB, EMSA

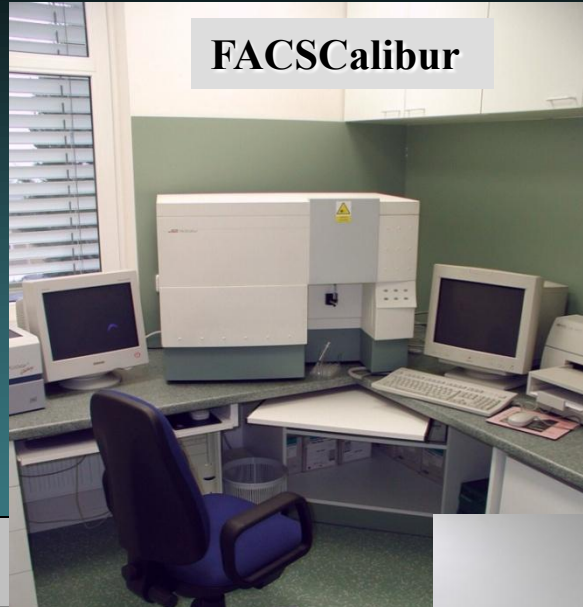
Informativní seznámení s FCM

(jedna z klíčových metod
výzkumu in vitro:

Naznačení možností !!!!!)

Viz dále K. Souček et al.– Moderní metody....

FACSCalibur



FACS ARIA SORP II



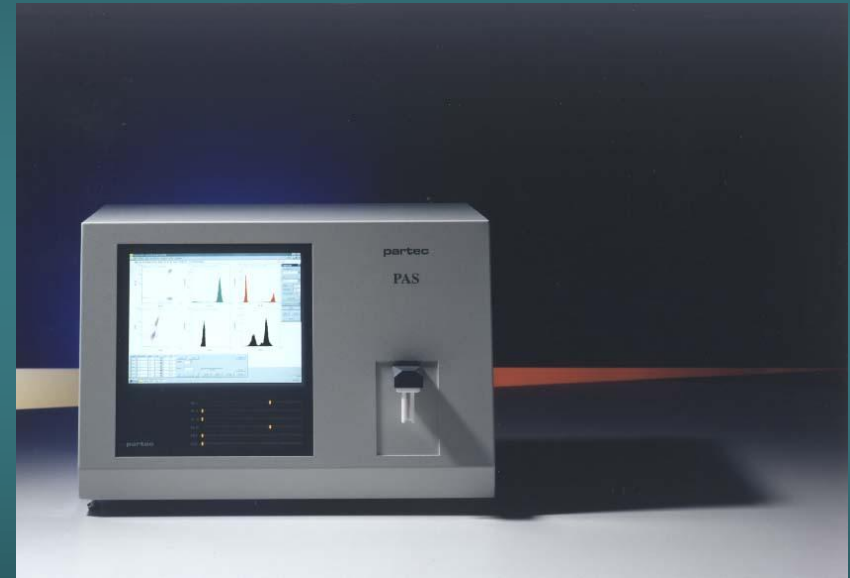
KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP LEICA

The Flowcytometers – (short introduction)

- a sophisticated product family equipped with the most advanced technologies available.



Partec CCA



Partec PAS

FACSCalibur BD – since 1974 BD has been the leading provider

-recent models

of innovative technology in flow cytometry



The FACSCalibur is the first a 4-colour, dual laser,

benchtop system capable of both cell analysis and sorting fully integrated multiparameter system, wide range of research and clinical applications

High performance, high speed cell sorter FACSDiVa (Vantage)



Flow sorting instrument for the research laboratory

BD LSR - the first 6-Color Benchtop Research Flow Cytometer



It has combined benchtop easy-of-use with the flexibility and performance of high-end flow cytometers

Building on the easy-of-use standard set by the FACSCalibur, the BD LSR offers software instrument Control, push button fluids, and fine-adjust sample flow-rate control



Beckman Coulter Instruments

(are Analogical to those of Becton Dickinson)

**Cytomics FC 500 Series
Flow cytometry system**



FACSCalibur



Laboratory
of **ytokinet**ics

**Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic**

Definitions

**histochemistry in
flow**

■ Flow Cytometry

- ◆ Measuring properties of cells in flow

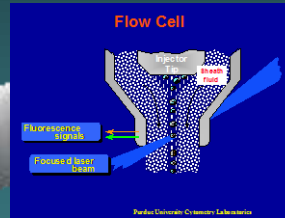
■ Flow Sorting

- ◆ Sorting (separating) cells based on properties measured in flow
- ◆ Also called Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

BASICS of FLOW CYTOMETRY

Represent:

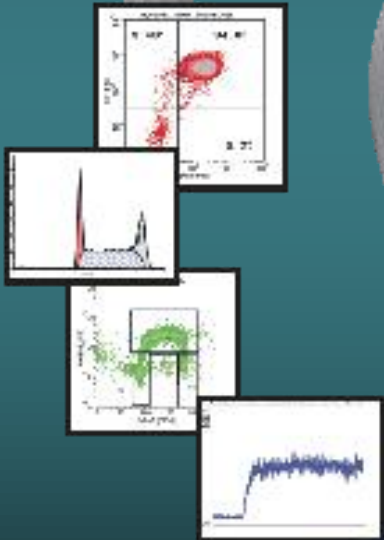
FLUIDS



OPTICS

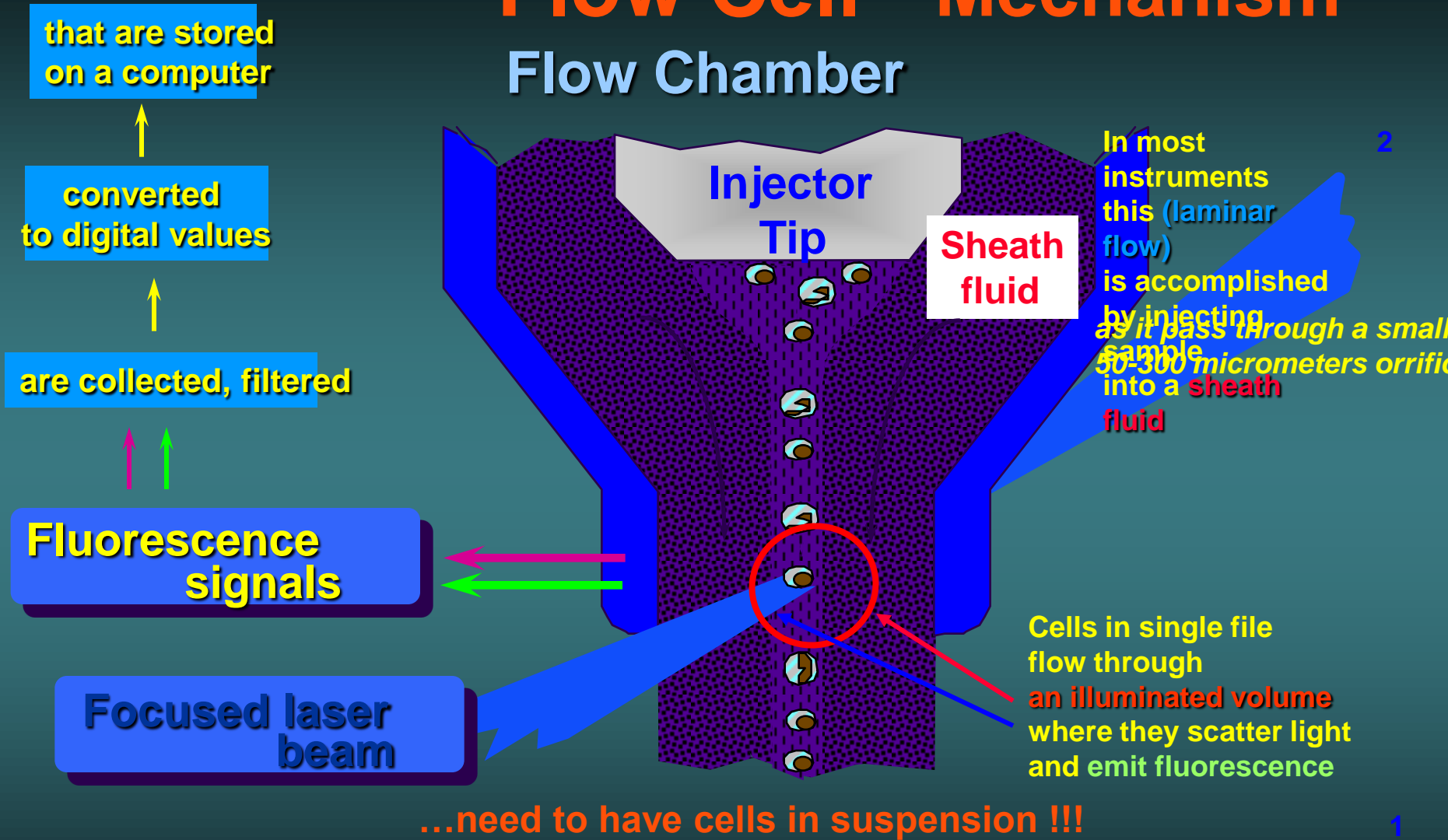


ELECTRONICS



Flow Cell - Mechanism

Flow Chamber



The speed of flowing cells
 Optimum for immunophenotyping: 1000 cells/s
 Optimum for DNA analysis: 200-300 cells/s

INTERACTION OF LIGHT WITH THE CELL

Fluorescence is emitted, and light scattered, in all directions.

THE AMOUNT OF LIGHT SCATTERED AT LARGE ANGLES (15 - 150°) INCREASES WITH CELLS' INTERNAL GRANULARITY AND SURFACE ROUGHNESS

INCIDENT LIGHT BEAM

CELL

EXTINCTION, I. E., THE LIGHT LOSS FROM THE INCIDENT BEAM, REPRESENTS THE SUM OF LIGHT ABSORBED AND LIGHT SCATTERED BY THE CELL

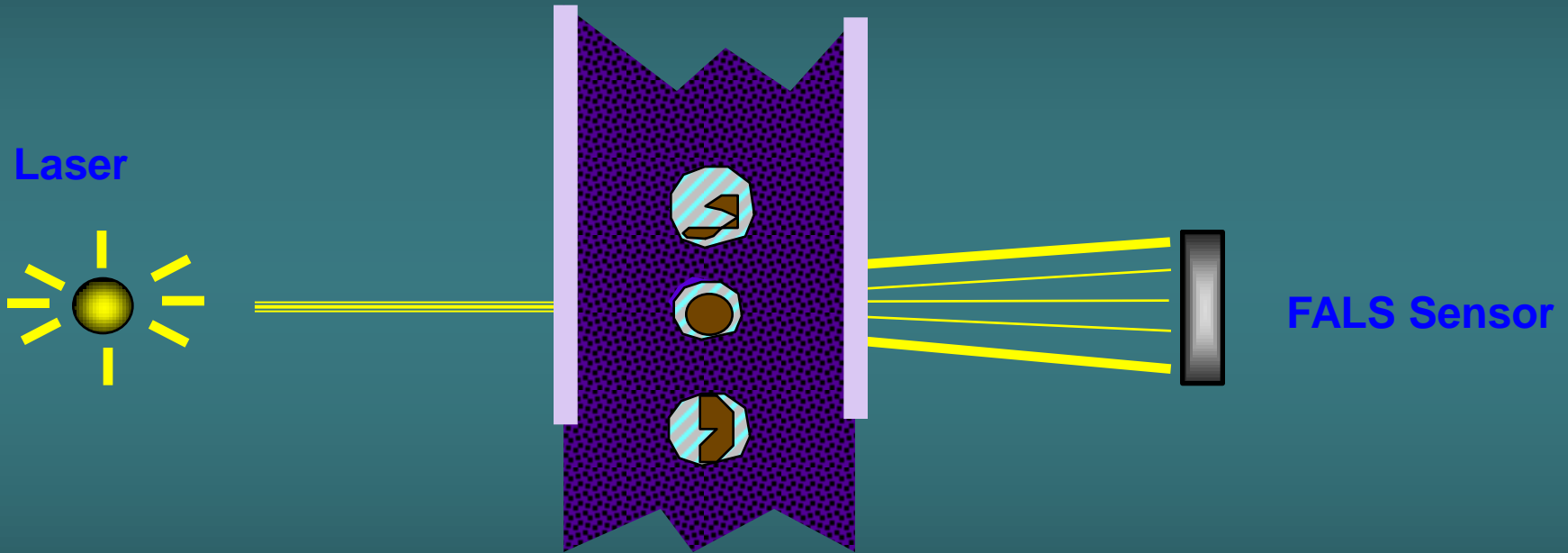
THE AMOUNT OF FLUORESCENCE EMITTED MUST BE LESS THAN THE AMOUNT OF LIGHT ABSORBED, AND IS GENERALLY PROPORTIONAL TO THE AMOUNT(S) OF INTRINSIC AND/OR EXTRINSIC FLUORESCENT MATERIAL(S) IN OR ON A CELL

THE AMOUNT OF LIGHT SCATTERED AT SMALL ANGLES (0.5 - 5°) GIVES A ROUGH MEASURE OF CELL SIZE

but is affected by other factors, such as refractive index

How Forward Angle Light Scatter is collected

The intensity of forward scatter is proportional to the
Size
Shape (tvar)
Optical homogeneity
of cells (or other particles)



When a laser light source is used

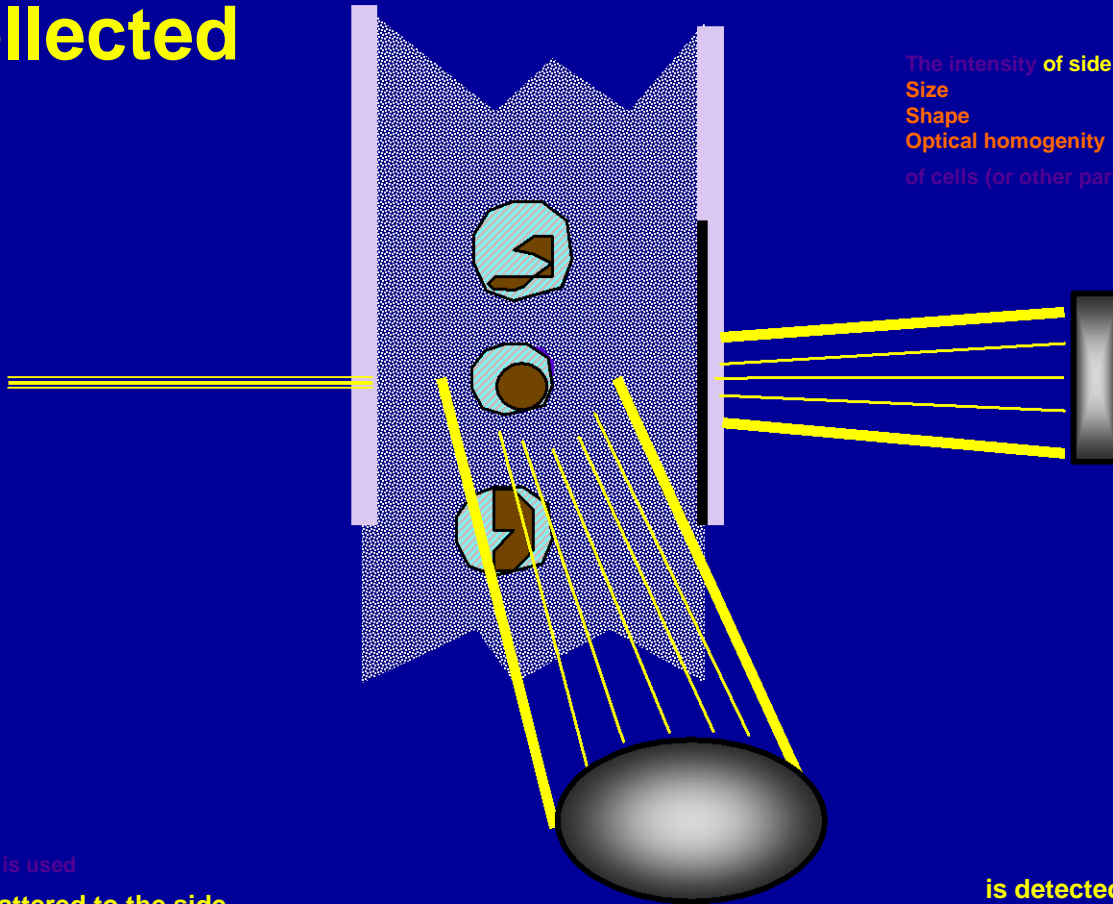
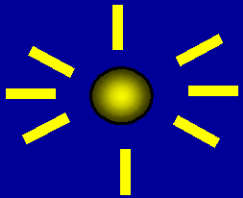
The amount of light scattered in the Forward direction

(along the same axis
that the laser light is traveling)

is detected
in the forward scatter channel

How 90 Degree (side) Light Scatter is collected

Laser



The intensity of side scatter is proportional to the
Size
Shape
Optical homogeneity
of cells (or other particles)

FALS Sensor

90LS Sensor

is detected
in the side or 90°
scatter channel

1
When a laser light source is used
the amount of light scattered to the side
(perpendicular to the axis
that the laser light is traveling)

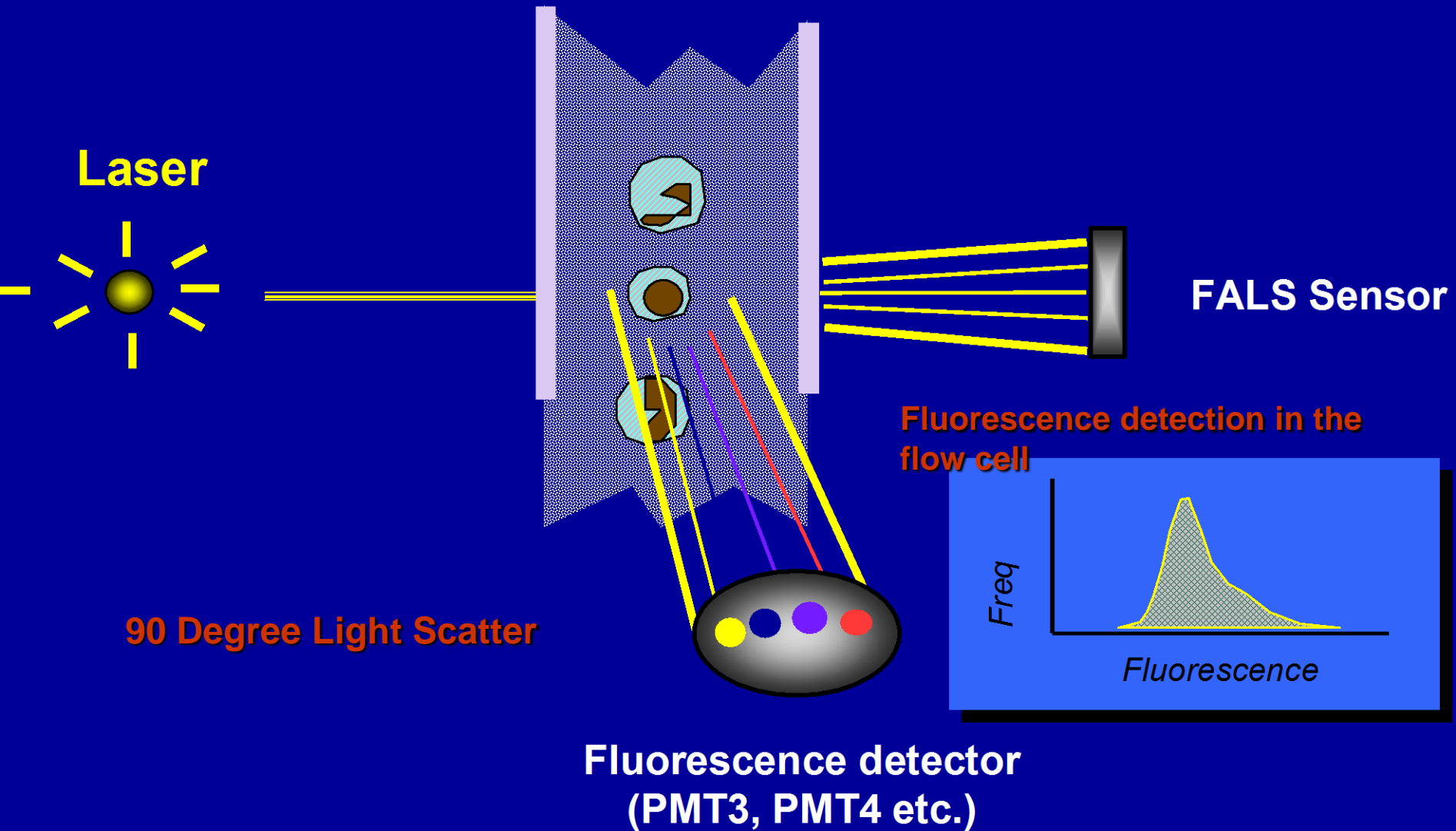
Optics - Light Scatter (Summary)

- Forward scatter tends to be more sensitive to **surface properties** of particles (e.g., cell ruffling) than side scatter
 - ◆ can be used to distinguish **live** from **dead** cells
- Side scatter tends to be more sensitive to **inclusions within** cells than forward scatter
 - ◆ can be used to distinguish **granulated** cells from **non-granulated** cells

Optics - Fluorescence Channels (Definitions)

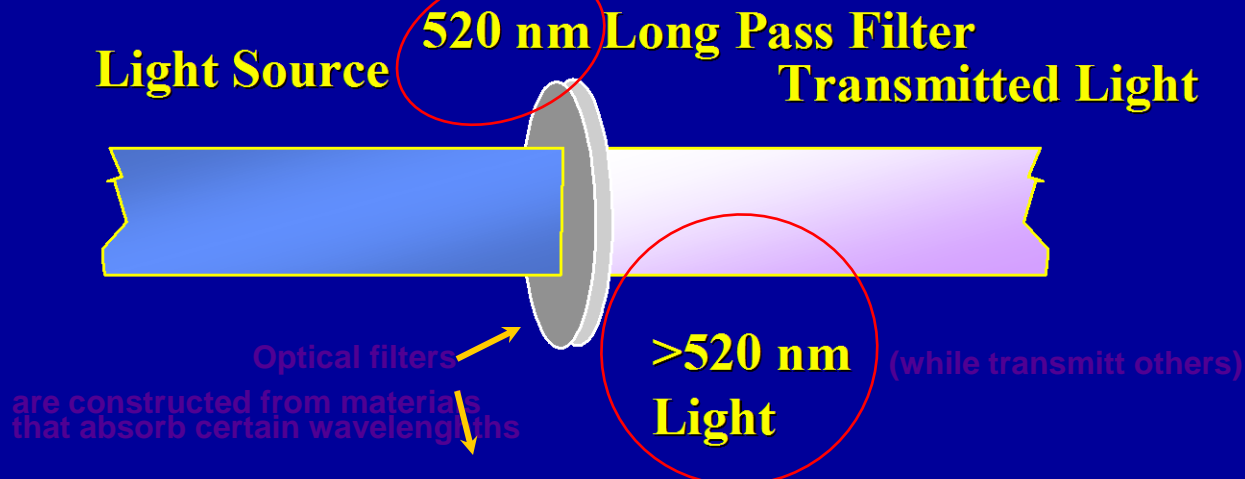
- The fluorescence emitted by each fluorochrome is usually detected in a unique **fluorescence channel**
- The specificity of detection is controlled by the wavelength selectivity of optical filters and mirrors

Fluorescence Detectors



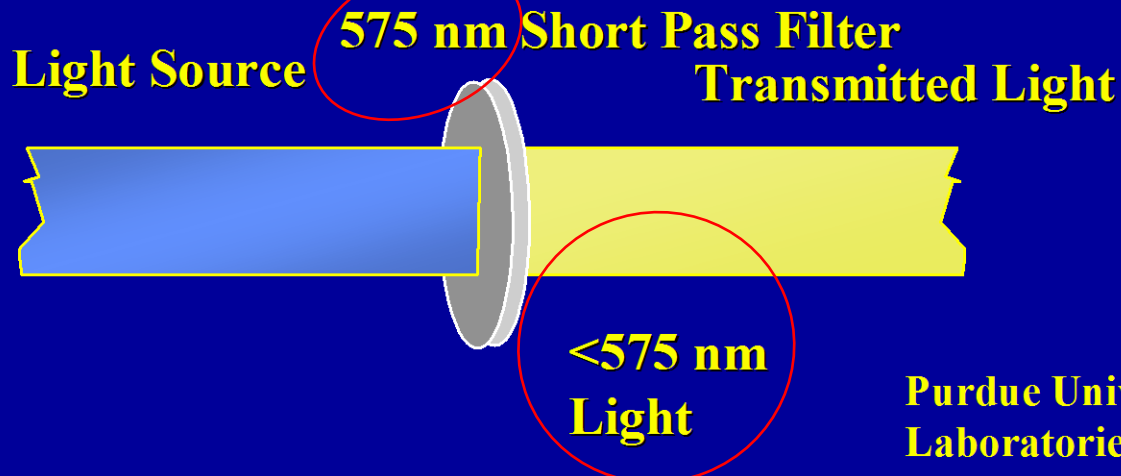
Standard Long Pass Filters

(transmit wavelengths **above** a cut-on wavelength)



Standard Short Pass Filters

(transmit wavelengths **below** a cut-off wavelength)



Optics - Filter Layout

- To simultaneously measure more than one scatter or fluorescence from each cell, we typically use multiple channels (multiple detectors)

Optics - Detectors

■ Two common detector types

◆ **Photodiode**

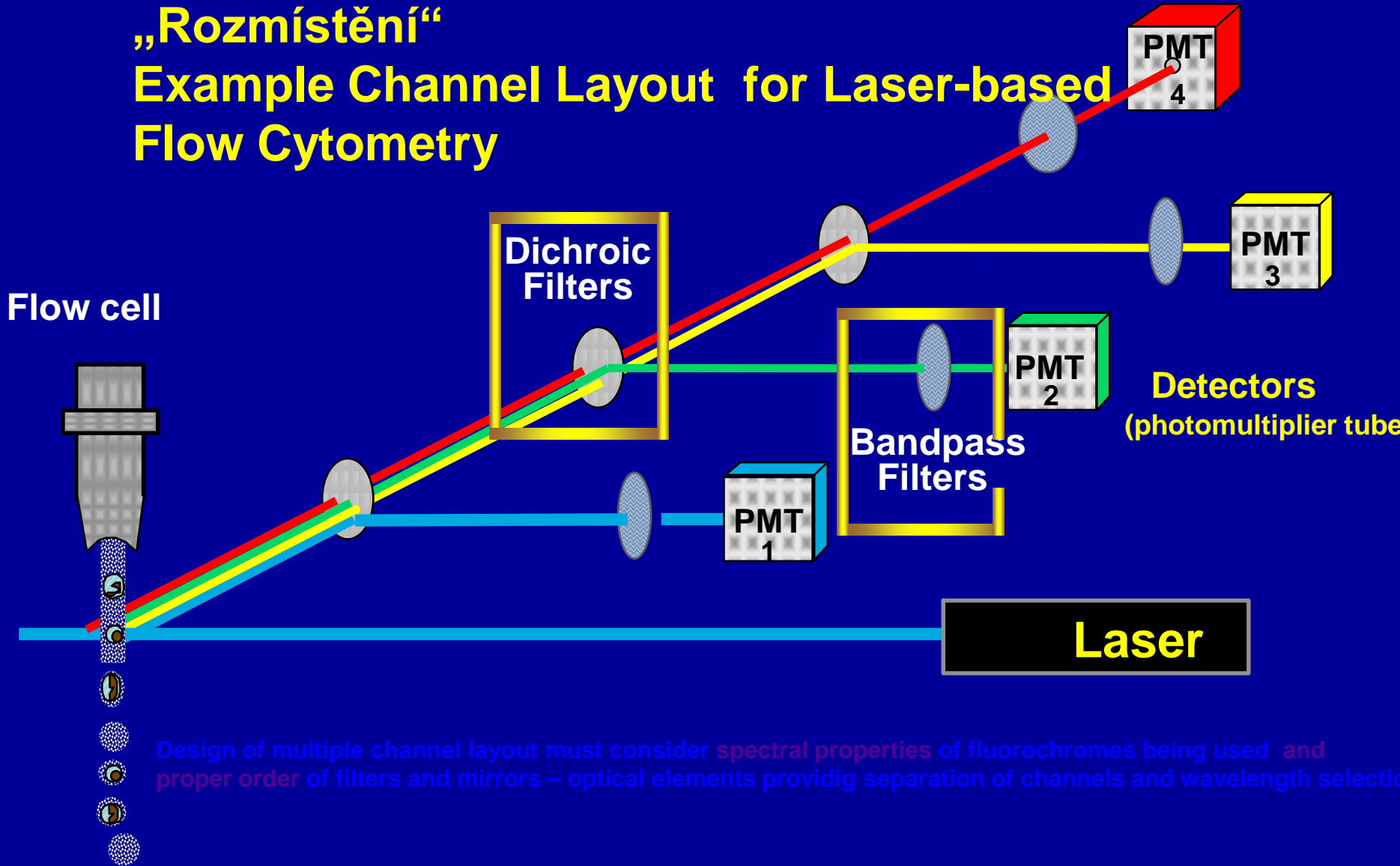
- ◆ used for strong signals when saturation is a potential problem (e.g., forward scatter detector)

◆ **Photomultiplier tube (PMT)**

- ◆ more sensitive than photodiode but can be destroyed by exposure to too much light

„Rozmístění“

Example Channel Layout for Laser-based Flow Cytometry



Design of multiple channel layout must consider spectral properties of fluorochromes being used and proper order of filters and mirrors – optical elements providing separation of channels and wavelength selection

Data Acquisition - Listmode

<i>Event</i>	<i>Param1</i>	<i>Param2</i>	<i>Param3</i>	<i>Param4</i>
	<i>FS</i>	<i>SS</i>	<i>FITC</i>	<i>PE</i>
1	50	100	80	90
2	55	110	150	95
3	110	60	80	30

← Detected Data are collected as a “list” of values,

← for particular “event” (cell) and particular “parameter”

Every „eventes and “parameters”
are evaluated using computers

The most frequently measured FCM parameters are

- **DNA content *and***
- **immunophenotyping**

DNA Analysis - Information:



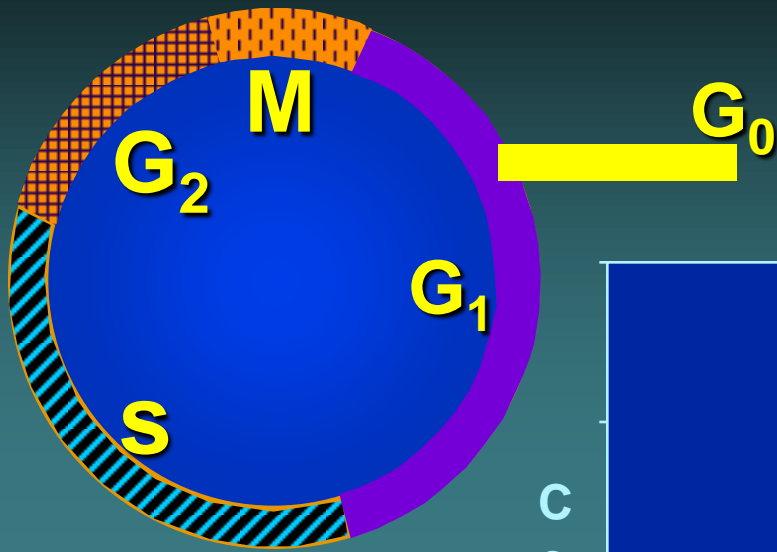
- Detection of
- DNA ploidy
 - cell cycle distribution



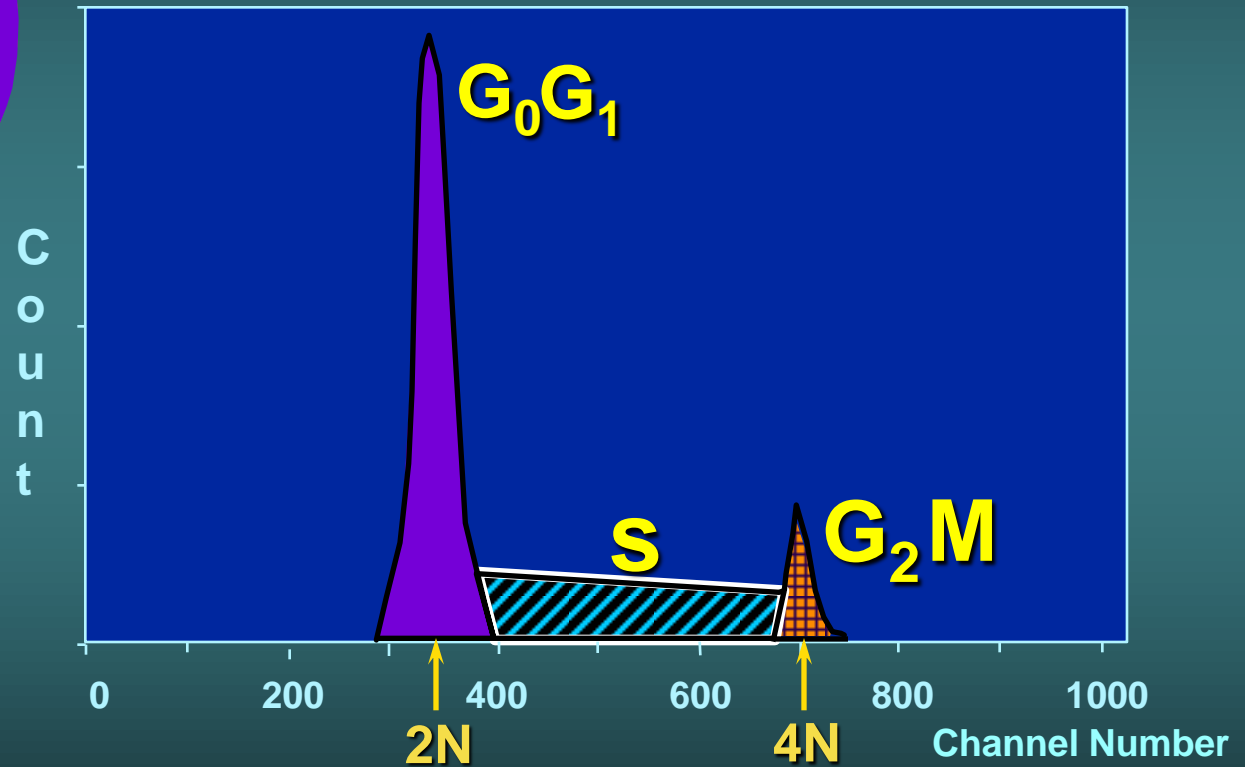
Useful for:

- diagnosis and prognosis of cancer
- the effects of cytotoxic and cytostatic drugs
- research – on the level of cell and molecular biology
experimental and clinical oncology

Normal Cell Cycle



DNA Analysis



DNA Content - Fluorescence Intensity

- propidium iodide
- DAPI
- Hoechst
- 7-AAD

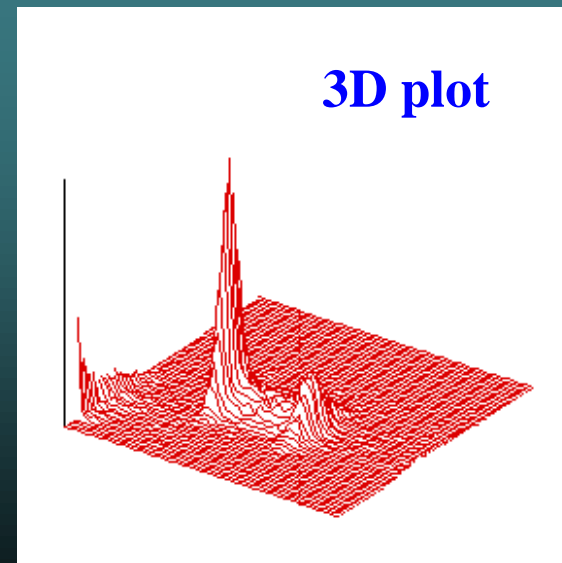
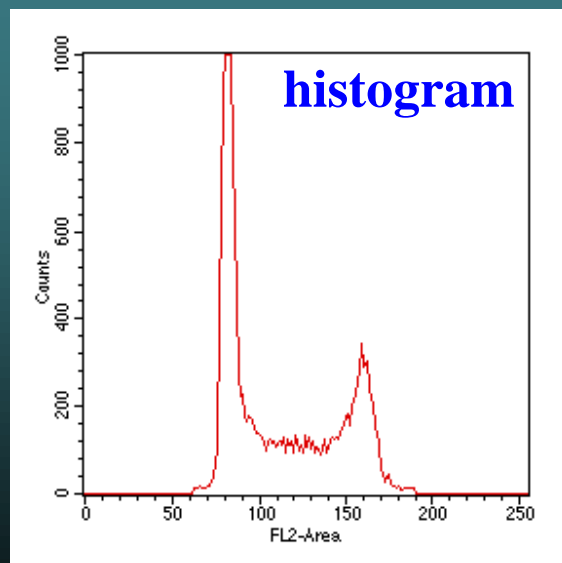
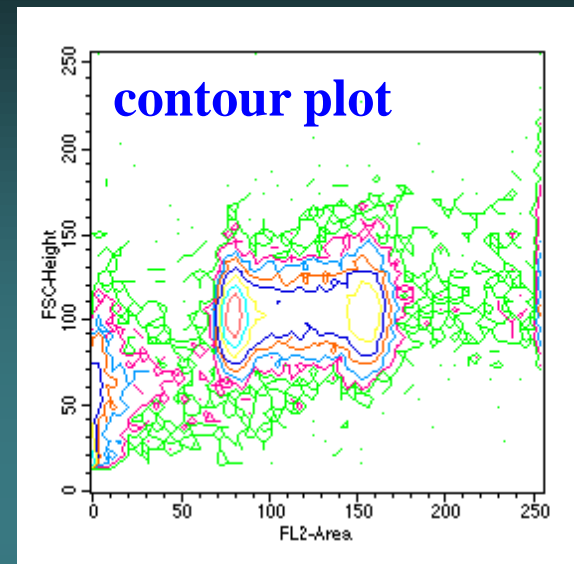
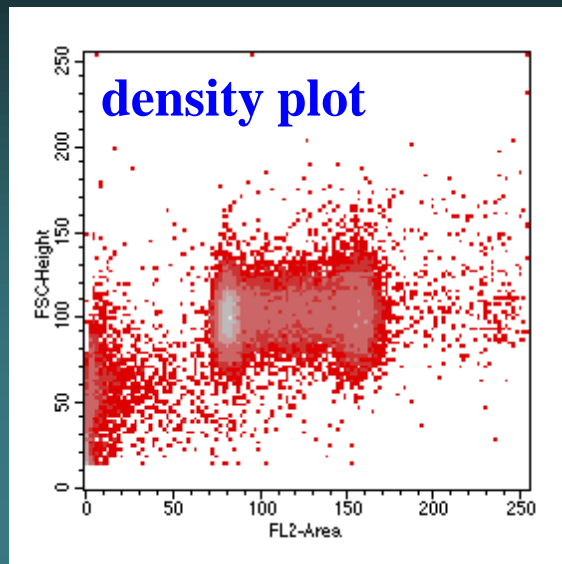
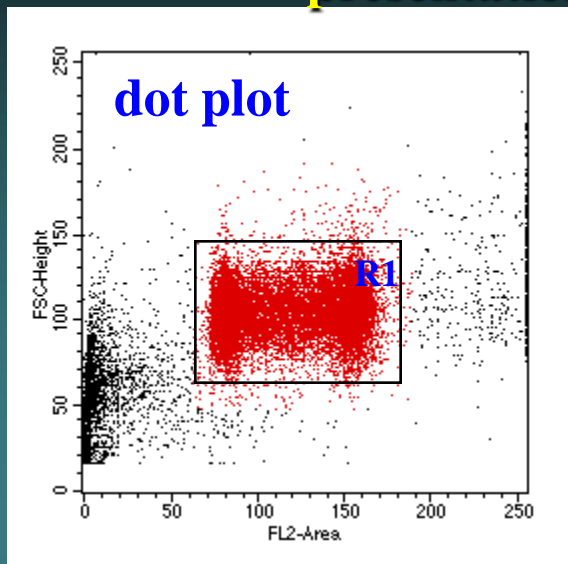
Acquisition and analysis

Important:

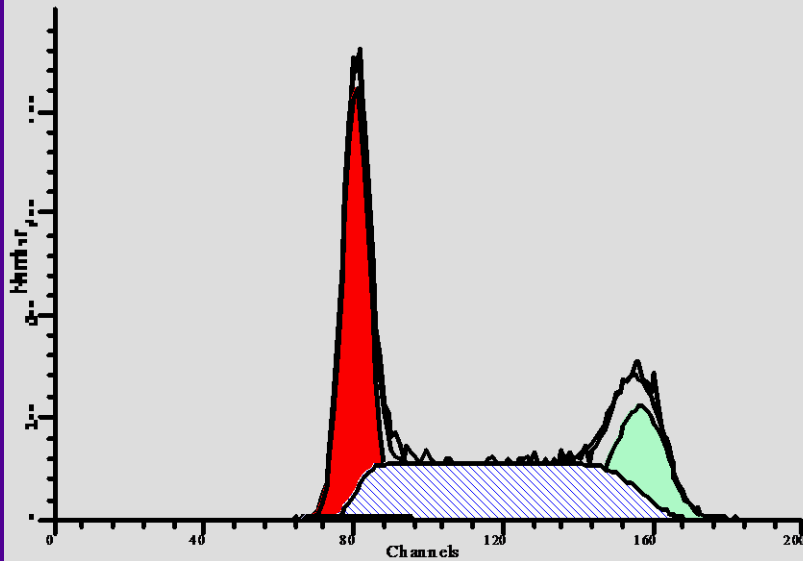
- sample preparation and machine adjustment
- density of the samples (1mil./ml)
- number of cells measured – minimum 10 000 (without debris and aggregates)
- gating of special part of cell population

Cell cycle analysis - special softwares

Cell-Quest allows different types of data presentation



ModFiT 3.0 software for cell cycle analysis



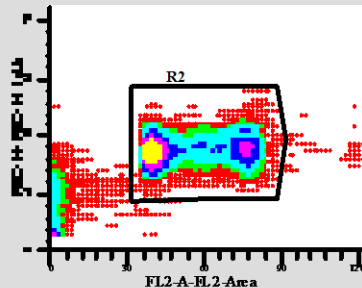
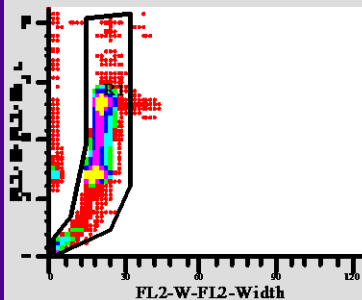
Date acquired: 21-Feb-0
File: K24h
Source: K24h
Case: PATIENT ID
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 37.68 % at 80.79
Dip G2-M: 19.67 % at 156.17
Dip S: 42.65 % G2/G1: 1.93
Dip %CV: 4.27

Total S-Phase: 42.65 %

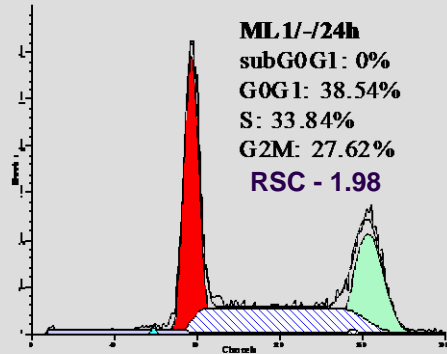
Extra Pop: %
Debris: 1.50 %
Aggregates: 0.07 %
Modeled Events: 19826
RCS: 1.147

Diploid B.A.D.: 1.39 %

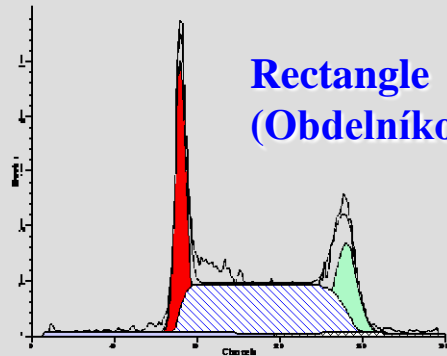


Models for S-phase evaluation ModFit 3.0 (Verity Software House, Inc.)

ModFit
Edit -> Configuration -> S-Phase
psw- Omega

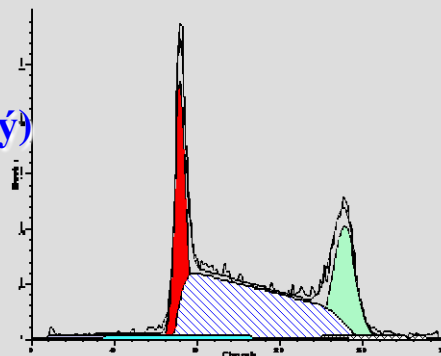


**Trapezoid
(Lichoběžníkový)**



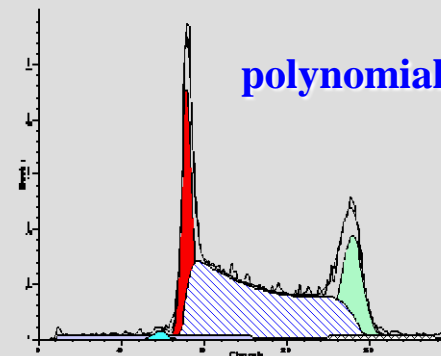
ML1/Escul_40/24h
subG0G1: 0%
G0G1: 27.09%
S: 54.83%
G2M: 18.08%

RSC - 4.244
S phase model -
Rectangle



ML1/Escul_40/24h
subG0G1: 0%
G0G1: 24.85%
S: 53.44%
G2M: 21.71%

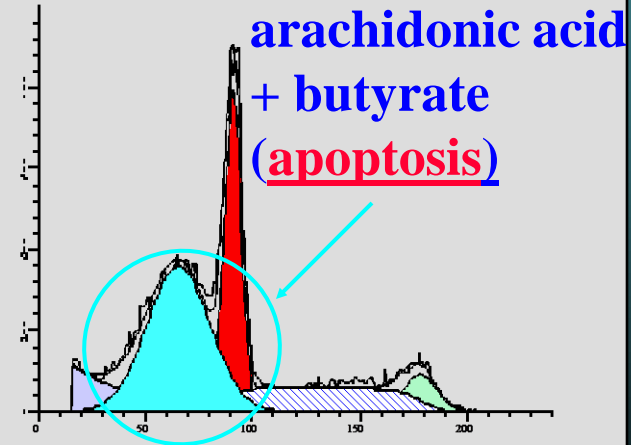
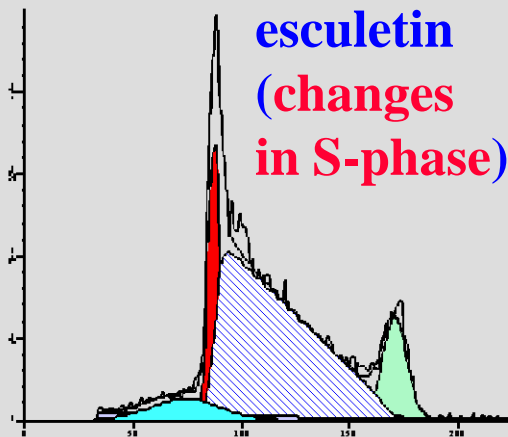
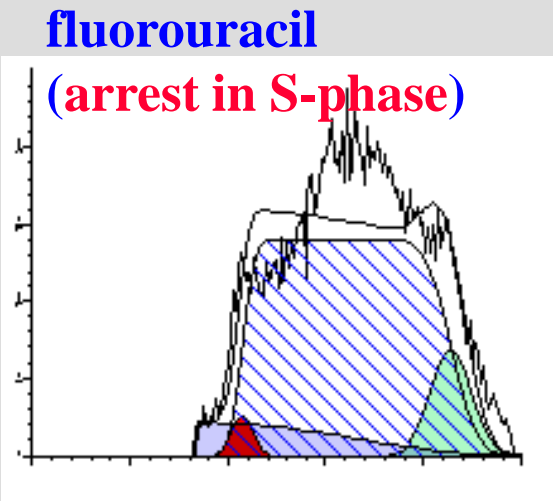
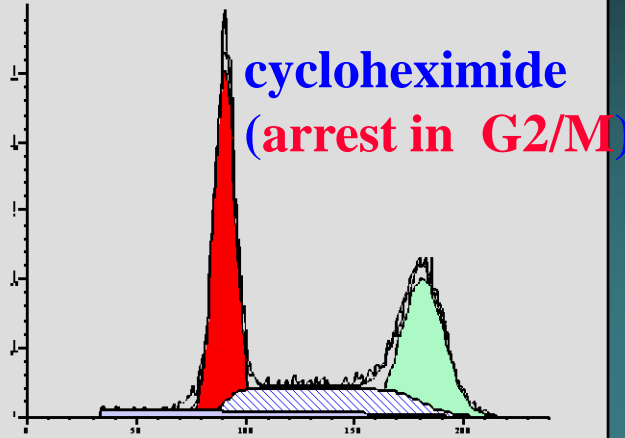
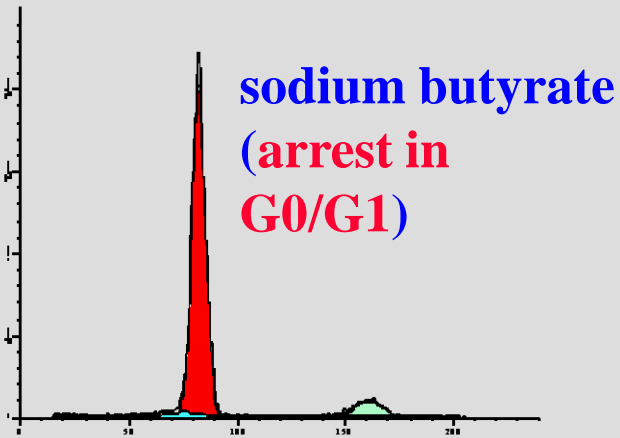
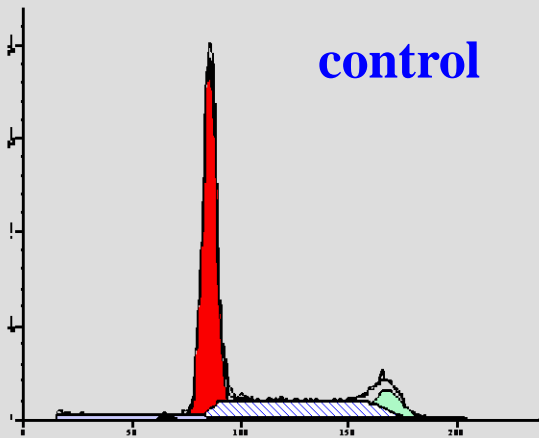
RSC - 2.430
S phase model -
Trapezoid



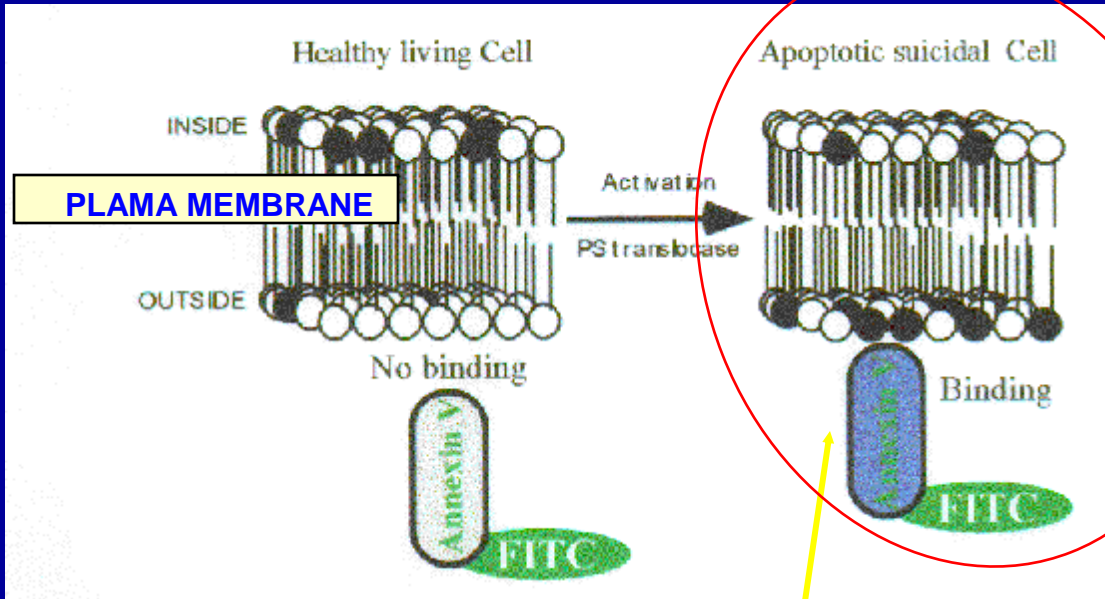
ML1/Escul_40/24h
subG0G1: 0%
G0G1: 23.11%
S: 58.07%
G2M: 18.82%

RSC - 2.112
S phase model -
Polynomial

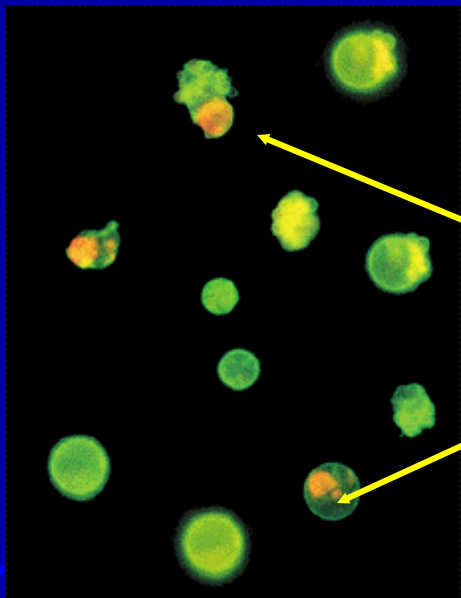
Cell cycle changes after various types of treatment



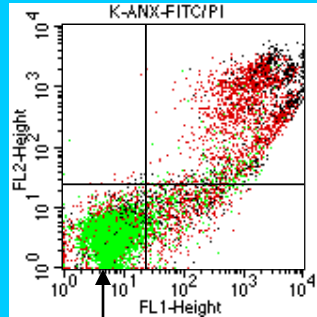
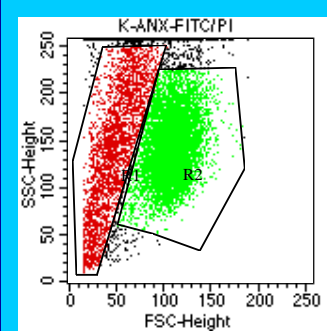
Annexin V detection



Annexin – x - axis



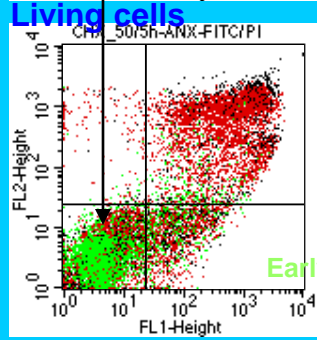
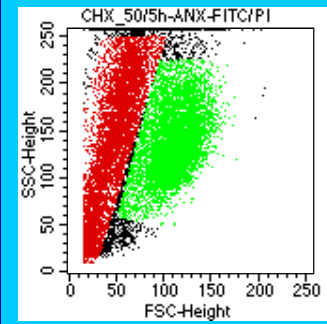
PI



Control

File: K-ANX-FITC/PI

Quad	% Totd
UL	0.21
UR	21.39
LL	70.17
LR	8.23



Living cells

cycloheximide

File: CHX_50/5h-ANX-FITC/PI

Quad	% Totd
UL	1.42
UR	29.11
LL	58.43
LR	11.04

Early apoptosis

5-bromo-2'- deoxyuridine (BrdU)

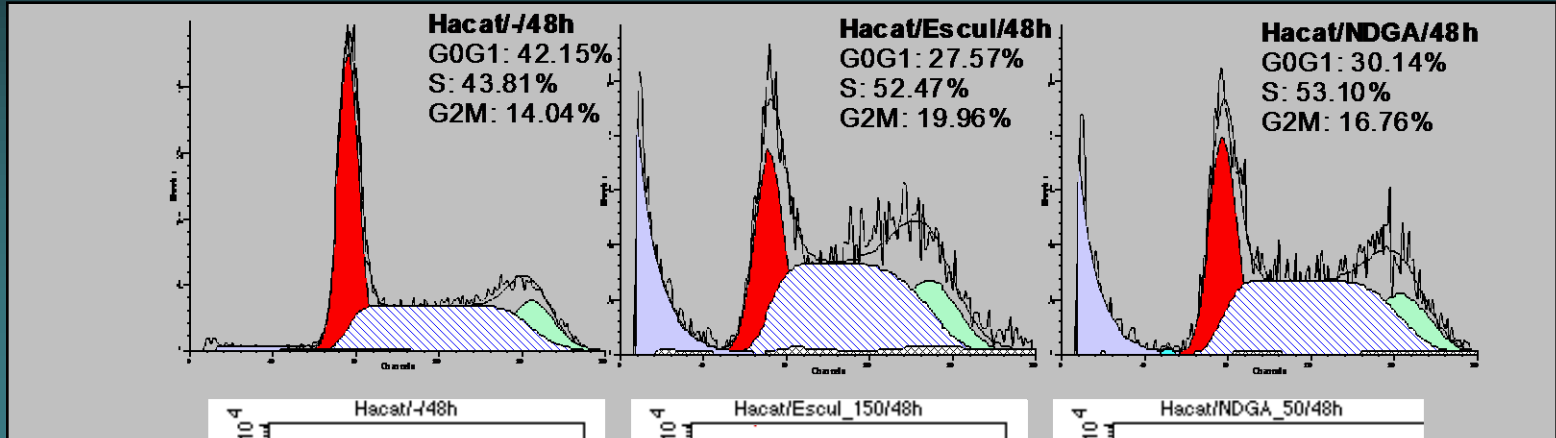


Halogenated precursor of DNA:

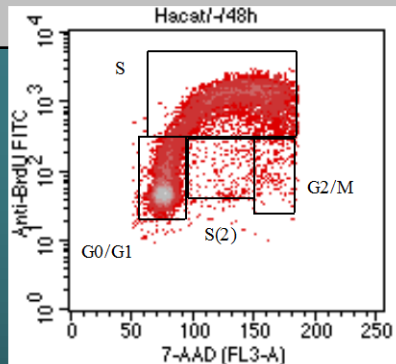
- Incorporation into DNA during replication (S phase)
- Immunohistochemically detected (monoclonal antibody).

- Continual BrdU staining – detection of all proliferating cells – estimation of proliferating fraction
- Pulse staining – cell cycle kinetics, duration of cell cycle phases (TG1, TS, TG2/M) and potential doubling time (T_{pot}).

Two-parametric analysis of cell cycle 7-ADD/BrdU (human keratinocytes HaCaT)

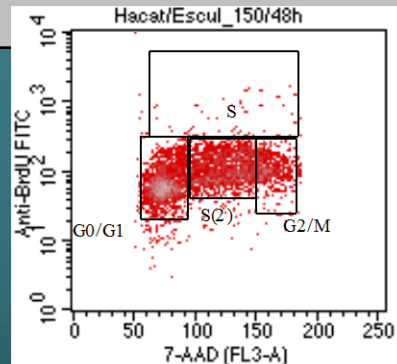


BrdU

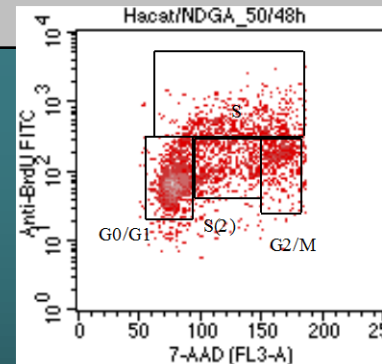


7-ADD

G0/G1 - 48.33%
S - 47.94%
S(2) - 1.93%
G2/M - 1.27%



G0/G1 - 45.57%
S - 1.45%
S(2) - 39.33%
G2/M - 11.81%



G0/G1 - 48.51%
S - 18.87%
S(2) - 17.53%
G2/M - 11.66%

control

esculetin 48h
(S-phase arrest)

NDGA 48h

PREPARATION OF SAMPLES

I. CELL CULTURES:

→ **Suspense or adherent cells** (trypsinisation necessary)

→ **Staining in suspension** (optimal density 10^6 cells/ml, single-cell suspension necessary!!!)

Possibilities for DNA analysis:

- after detergent treatment (Triton X, Nonidet) – cell nuclei
- after fixation, i. e. ethanol (long storing in 4 °C)
- fluorochromes binding to both DNA and RNA - use of

→ **RNase**

Possibilities for other type of analyses

Aproprate staining for simultaneous detection of expression of cell surface antigens or intracellular molecules (cyclins, p53, p21, bcl-2....) , ROS etc. According to SPECIAL PROTOCOLS

PREPARATION OF SAMPLES

II. TISSUES

- Adequate single-cell **suspension** necessary!!!
- Appropriate **methods for specimen handling** depend on the cell parameter measured and tissue type.



Single-cell suspension of whole cells can be prepared from:

- **Fresh tissue** - mechanical or enzymatic disaggregation necessary



- **Fine-needle aspirates, bone marrow aspirates, pleural, ascitic or other fluids.**

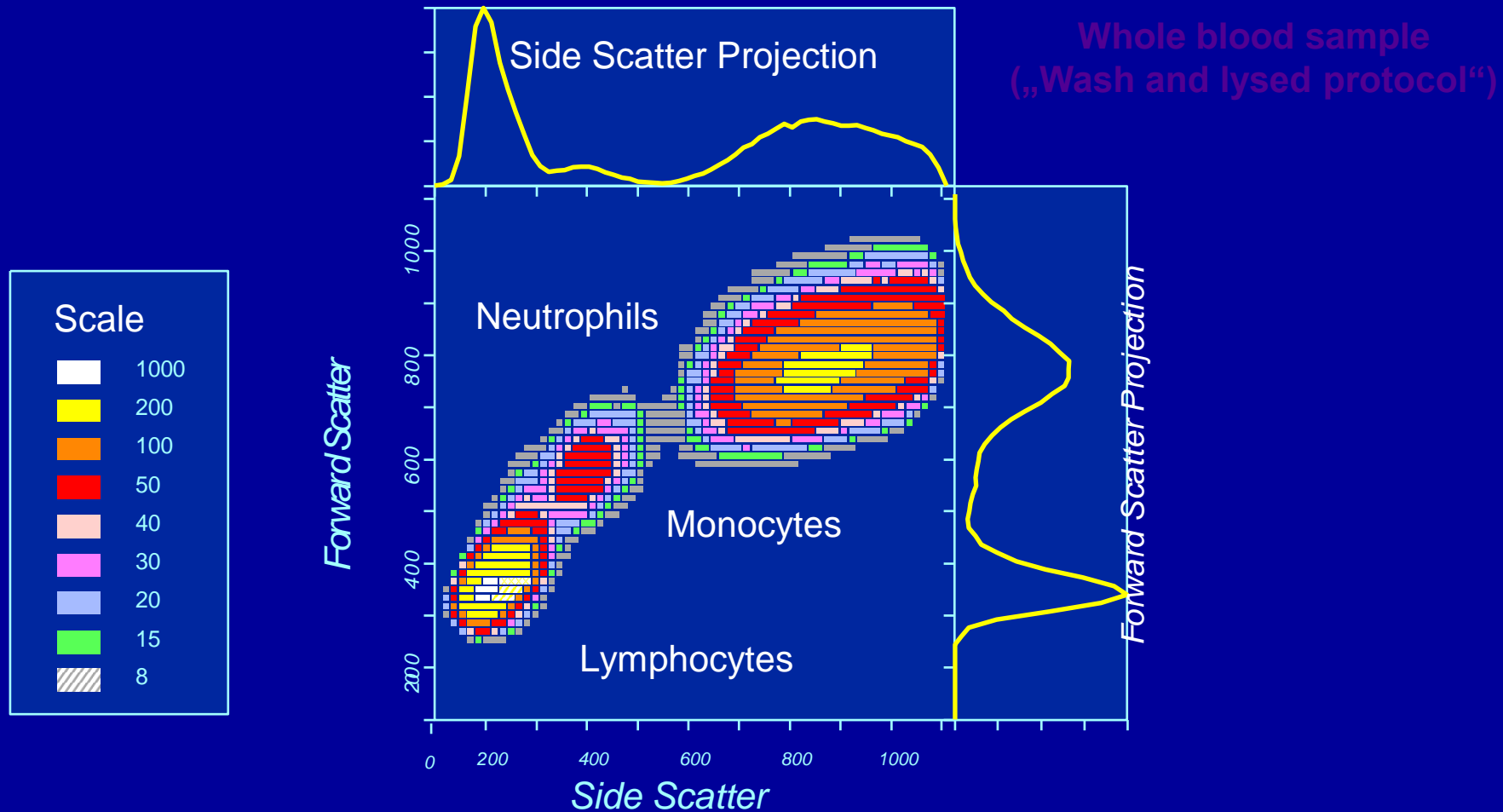


Cell suspension can be **fixed**, used for **cytospin preparations, frozen etc.**

Intact nuclei can be prepared from:

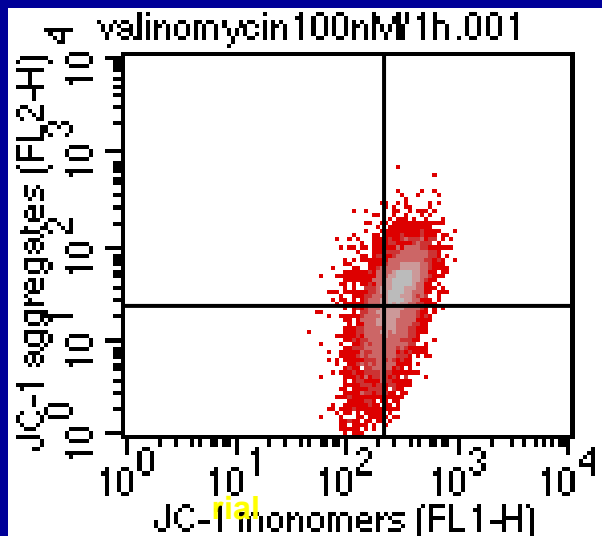
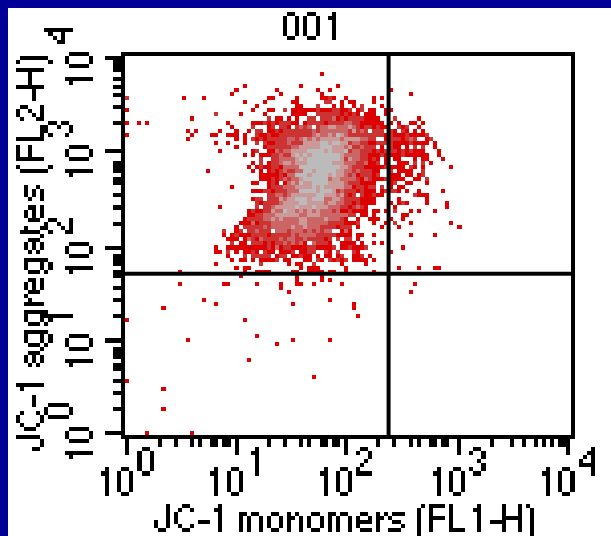
- **fresh or frozen tissues**
- **paraffin-embedded tissues** (debris removed by a sucrose step gradient)

Light Scatter Gating



Mitochondrial membrane potential

aggregates



NIH 3T3

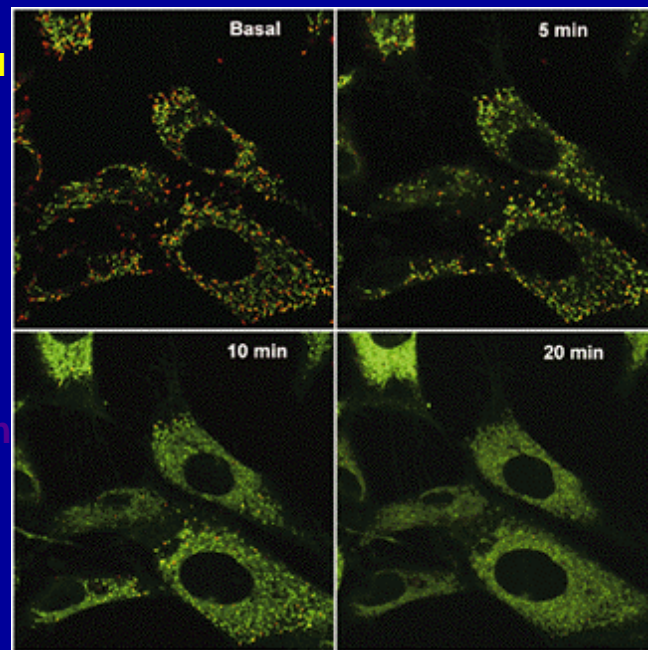
Normal

monomers

Decreased mitochondrial potential

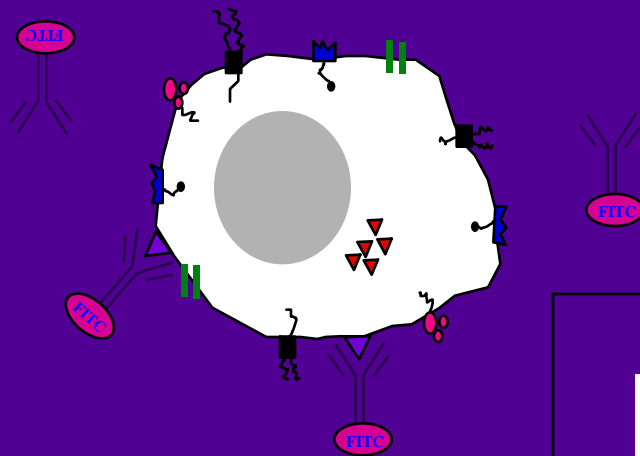
(death cells)

JC-1
Merocyanine 540



Treatment with valinomycin

CELLULAR ANTIGENS

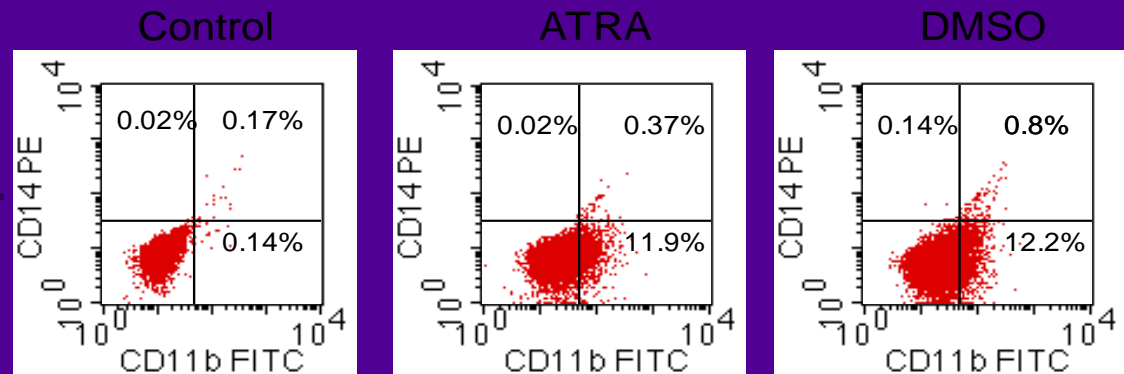


**Two-parametric analysis
of cell surface antigens
(HL-60 human leukemic cells
treated with agents of differentiation)**

CD11b (granulocyte/ monocyte marker)

CD14 (monocytic marker)

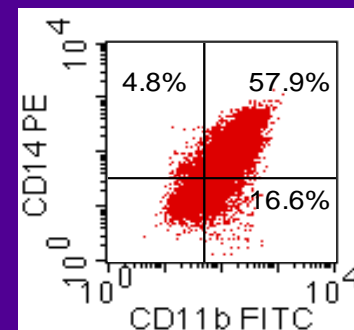
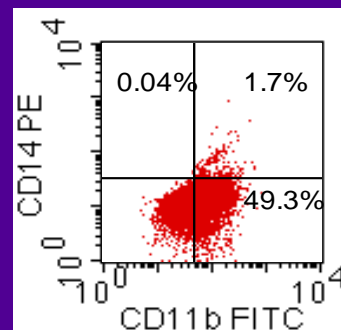
CD 14



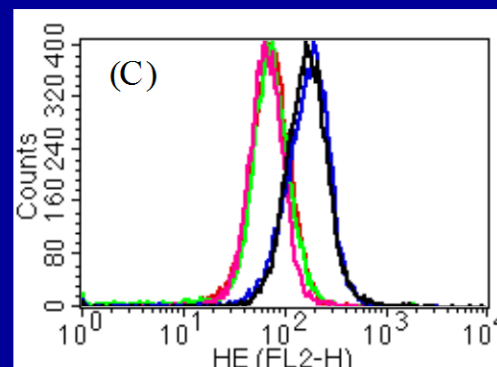
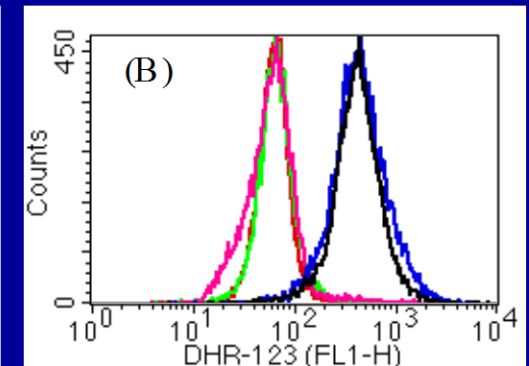
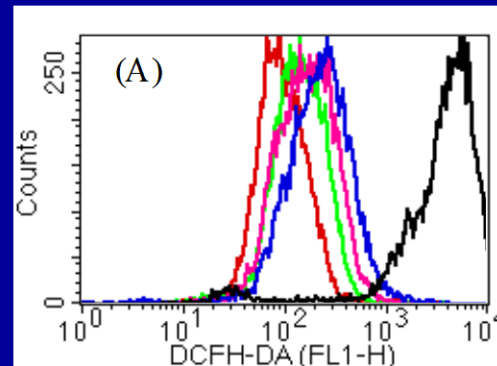
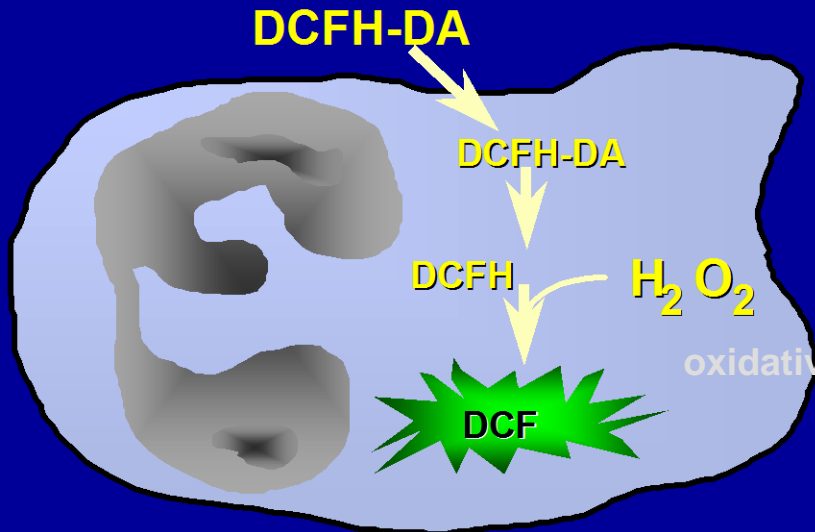
CD 11b

NaBt

vit. D3



Oxidative Burst

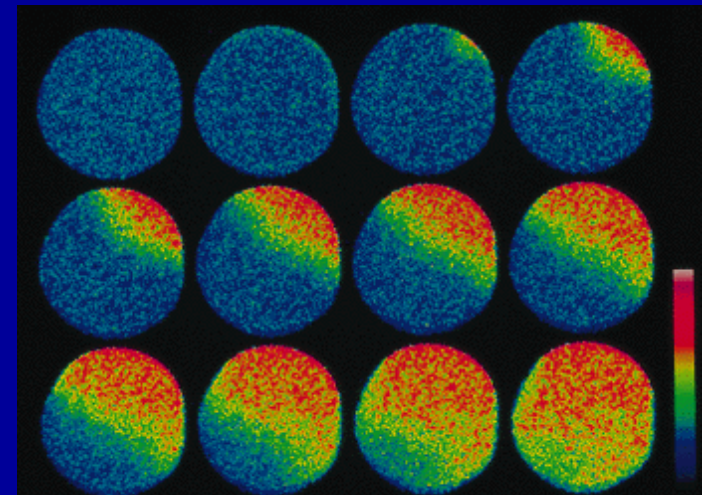
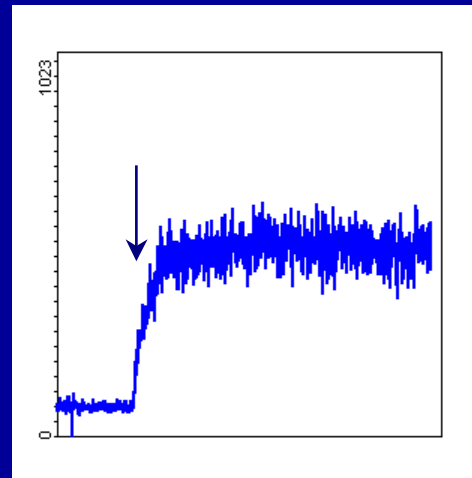
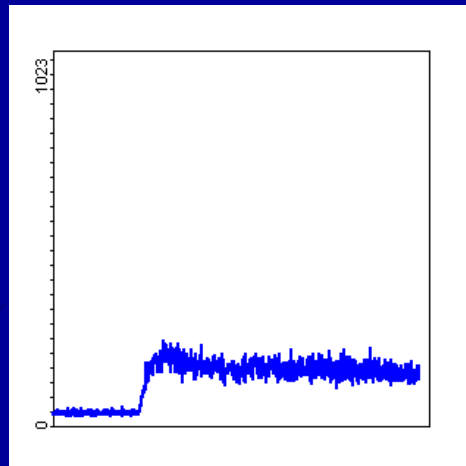
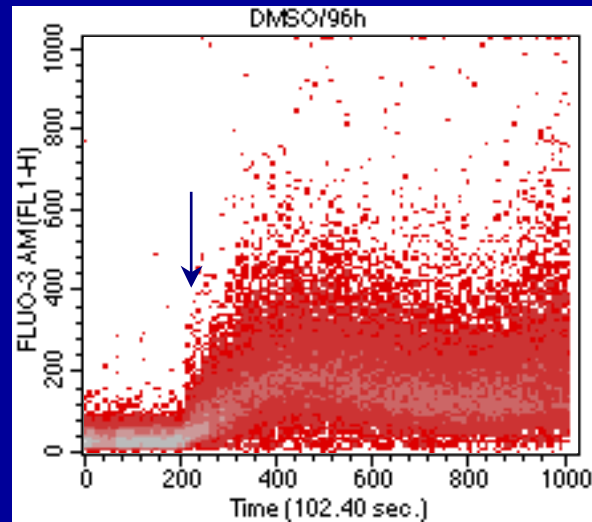
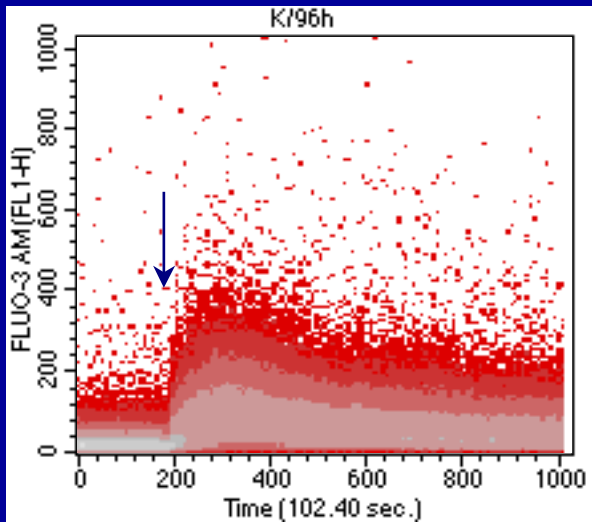


Key	Name
—	K/72h+PMA
—	ATRA/72h+PMA
—	DMSO/72h+PMA
—	NaBT/72h+PMA
—	vit. D3/72h+PMA

- DCFH-DA
- DHR-123
- HE

Ca²⁺ influx

- Fura-2
- Fluo-3
- Indo-1



PARAMETERS MEASURED BY FLOWCYTOMETRY

(have not been mentioned)

PARAMETER	MEASUREMENT METHOD AND PROBE IF USED
-----------	--------------------------------------

Intrinsic Structural Parameters

(no probe)

Cell size

Extinction or small angle light scattering, electronic impedance (DC)

Cell shape.....

Pulse shape analysis

Cytoplasmatic granularity

Large angle light scattering, electronic impedance

(AC)

→ (other, e.g., of eosinophyl granules)... Polarized light scattering

→ Pigment content (e.g., hemoglobin, photosynthetic pigments, porphyrins)

Absorption, fluorescence, multiangle scattering

→ Protein fluorescence.....

Fluorescence

(tryptophan, tyrosine)

→ Intrinsic Functional Parameter (no probe)

Redox state

Fluorescence

(endogenous pyridine and flavin nucleotides)

PARAMETERS MEASURED BY FLOWCYTOMETRY

PARAMETER

MEASUREMENT METHOD AND PROBE IF USED

Extrinsic Structural Parameters

DNA content	Fluorescence (e.g., propidium, DAPI)
DNA base ratio	Fluorescence (A-T and G-C preference dyes; e.g., Hoechst 33342 and chromomycin A ₃ , cyanine/styryl dyes)
Nucleic acid sequence	Fluorescence (labeled oligonucleotides)
Chromatin structure	Fluorescence (fluorochromes after DNA denaturation)
RNA content	
(single and double-stranded).....	Fluorescence (e.g., acridine orange, pyronin Y, thiazole orange)
Total protein	Fluorescence (covalent or ionic bonded acid dyes)
Basic protein.....	Fluorescence (acid dyes at high pH)
Antigens	Fluorescence (labeled antibodies), scattering (dye & gold labels)
Lipids	Fluorescence (e.g., Nile red)
Surface sugars (lectin binding sites)	Fluorescence (labeled lectins)

OTHER PARAMETERS



Extrinsic Structural Parameters

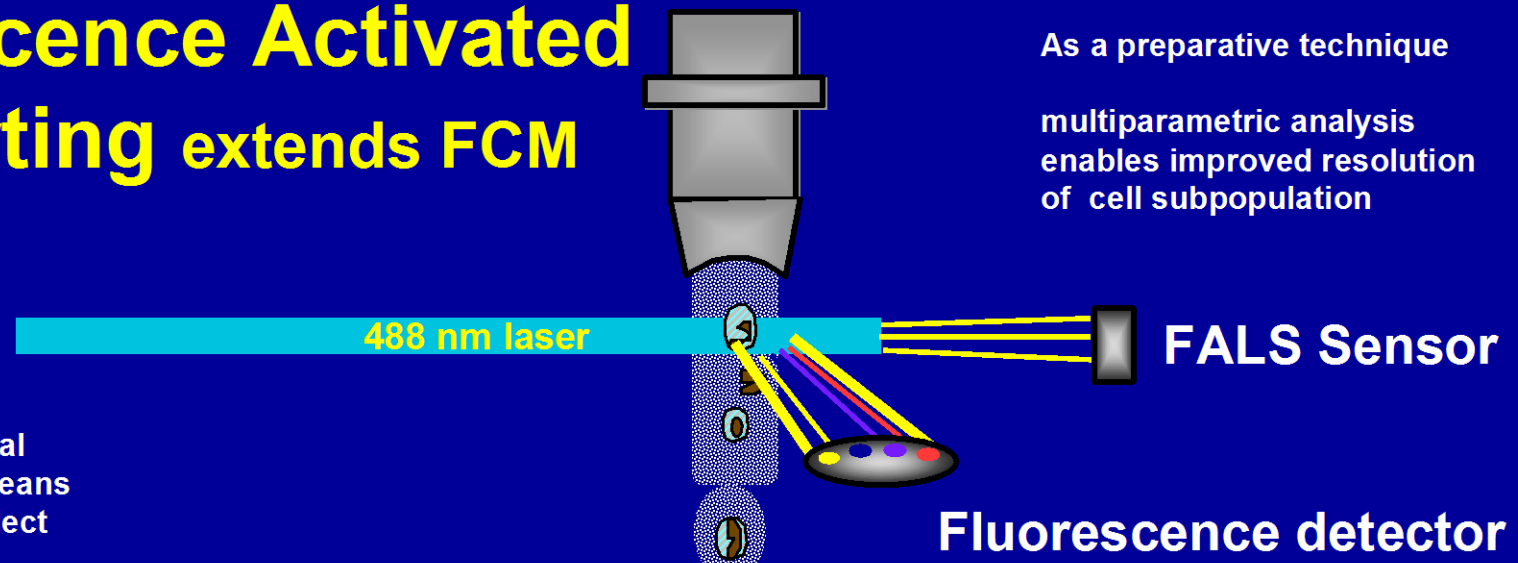
PARAMETER

MEASUREMENT METHOD AND PROBE IF USED

Surface receptors	Fluorescence (labeled ligands)
Surface charge	Fluorescence (labeled polyionic molecules)
Membrane integrity (“viability“)	Absorption or scattering (e.g., trypan blue)
Membrane fusion/turnover	Fluorescence (e.g., propidium, fluorescein diacetate (FDA))
Membrane organization	Fluorescence (labeled long chain fatty acid derivates)
Membrane fluidity or microviscosity	Fluorescence (e.g., merocyanine 540)
Membrane permeability (dye/drug uptake/efflux)	Fluorescence polarization (DPH)
Endocytosis	Fluorescence (e.g., Hoechst 33342, rhodamine 123, cyanines, anthracyclines)
Intracellular receptors	Fluorescence (e.g., labeled beads or bacteria)
Cytoskeletal organization	Fluorescence (labeled ligands)
Enzyme activity	Fluorescence (e.g., NBD- phalloidin)
	Absorption or scattering (chromogenic substrates)
	Fluorescence (fluorogenic substrates)
Oxidative metabolism	Fluorescence (e.g., dichlorofluorescein)
Sulfhydryl groups / glutathione	Fluorescence (e.g., monochlorobimane)
DNA synthesis	Fluorescence (anti-BrUdR antibodies; dye mixtures; SBIP)
DNA degradation (as in apoptosis)	Fluorescence (labeled nucleotides)
“Structuredness of cytoplasmic matrix“	Fluorescence polarization (FDA)
Cytoplasmic/mitochondrial membrane potential	Fluorescence (e.g., cyanines, oxonols, rhodamine 123)
“Membrane/bound“ $[Ca^{++}]$	Fluorescence (chlortetracycline)
Cytoplasmic $[Ca^{++}]$	Fluorescence ratio (e.g., indo-1); fluorescence (e.g., fluo-3)
Intracellular pH	Fluorescence ratio (e.g., ABD, BCECF, SNAFL, SNARF)

Fluorescence Activated Cell Sorting extends FCM

As a preparative technique
multiparametric analysis
enables improved resolution
of cell subpopulation

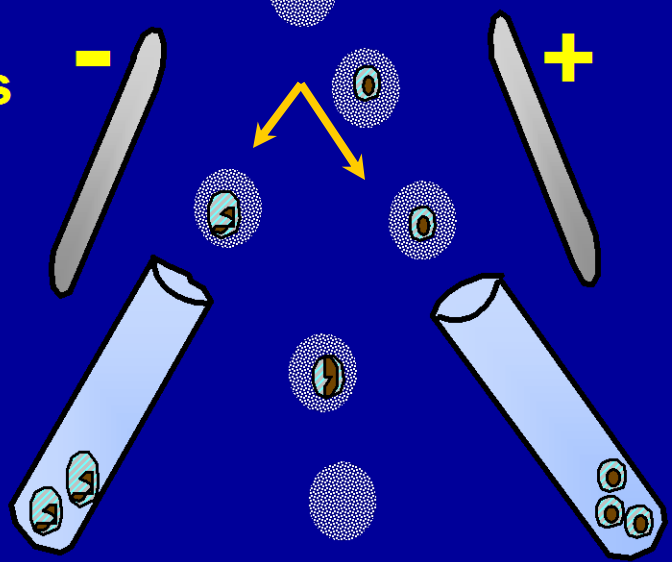


by using electrical
or mechanical means
to divert and collect
cells with
one or more characteristics
made on individual cell

Fluorescence detector

It is possible to
detect heterogenous
expression of analytes

Charged Plates



**Single cells sorted
into test tubes**

FLOW CYTOMETRY (FCM)

Main Disadvantage

The considerable initial costs

Main Advantages

- ➔ Apart from this fact flowcytometry represents relatively **INEXPENSIVE AND FAST METHOD**, which enables us to gain the basic information concerning the developmental tendencies of large cellular populations
- ➔ **FCM allows understanding of COMPLEX CELLULAR PROCESSES** in relatively advantageous proportion as to the yield of information on the level of individual cell compared to large population
- ➔ Using multiparametric analyses **FCM provides considerable amount of both qualitative and quantitative data with high bioindicative potential.**

FCM
has some limits
in special applications
eg. tissue analyses

WE ALWAYS RECOMMEND THE COMPARISON WITH OTHER RELEVANT APPROACHES

USE CELL CULTURES IF POSSIBLE