

# Metody detekce buněčné smrti (apoptózy) s využitím průtokové cytometrie

RNDr. Alena Hyršlová Vaculová, Ph.D.

Analytická cytometrie  
2018

# Apoptóza

- geneticky kontrolovaný komplexní proces, cílená sebedestrukce buňky
- obrovský význam ve vývoji a udržení homeostáza mnohobuněčného organismu
- charakteristické biochemické a morfologické znaky

# Morfologie - nekróza vs. apoptóza

- ztráta integrity plazmatické membrány
- bobtnání cytoplazmy a zvětšení buňky
- rozbití jádra
- desintegrace buněčných organel
- kompletní lyze buňky
- bobtnání cytoplazmatické membrány, integrity membrány není porušena
- zmenšení velikosti buňky
- kondenzace a specifická fragmentace jaderného chromatinu
- udržení integrity intracelulárních organel
- formace tzv. apoptotických bodies

# Biochemie - nekróza vs. apoptóza

- Většinou bez účasti specifických molekul
- Pasivní proces bez dodání energie z ATP
- Neregulovaná destrukce jaderné DNA
- Není specifická role mitochondrií
- Ztráta regulace iontových rovnováh
- Aktivace specifických molekul - **kaspázy, nukleázy**
- Nutné dodání energie ve formě ATP
- **Specifická fragmentace jaderné DNA**
- Aktivace **mitochondrií** a volnění specifických regulátorů do cytoplazmy
- Změny **symetrie membrán**

# Detekce buněčné smrti - asymetrie/permeabilita plazmatické membrány

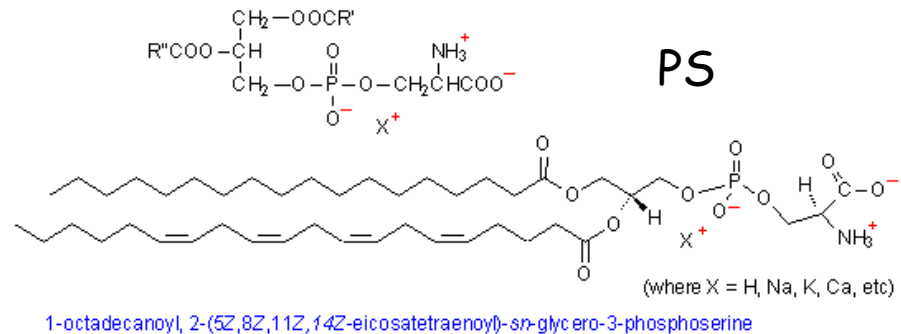
Translokace fosfatidylserinu

Průtoková cytometrie

# Annexin-V assay

## Detekce asymetrie

## Plazmatické membrány



- Phosphatidylserin (PS) – fosfolipid v plazmatické membráně, důležitý v regulaci řady strukturních a funkčních změn v membráně, zapojený v lipidových signálních drahách
- v „normální“ buňce je lokalizován na vnitřní straně plazmatické membrány, kde mj. kotví cytoskeletární proteiny k lipidovým membránám
- Během apoptózy dochází k translokaci PS z vnitřní strany plazmatické membrány na stranu vnější, což je důsledkem změny morfologie a modulace cytoskeletu během apoptózy
- PS translokovaný na povrch buňky je signálem pro fagocyty, tzv. “eat me signal”

REVIEW

doi: 10.1111/j.1365-3083.2006.01771.x

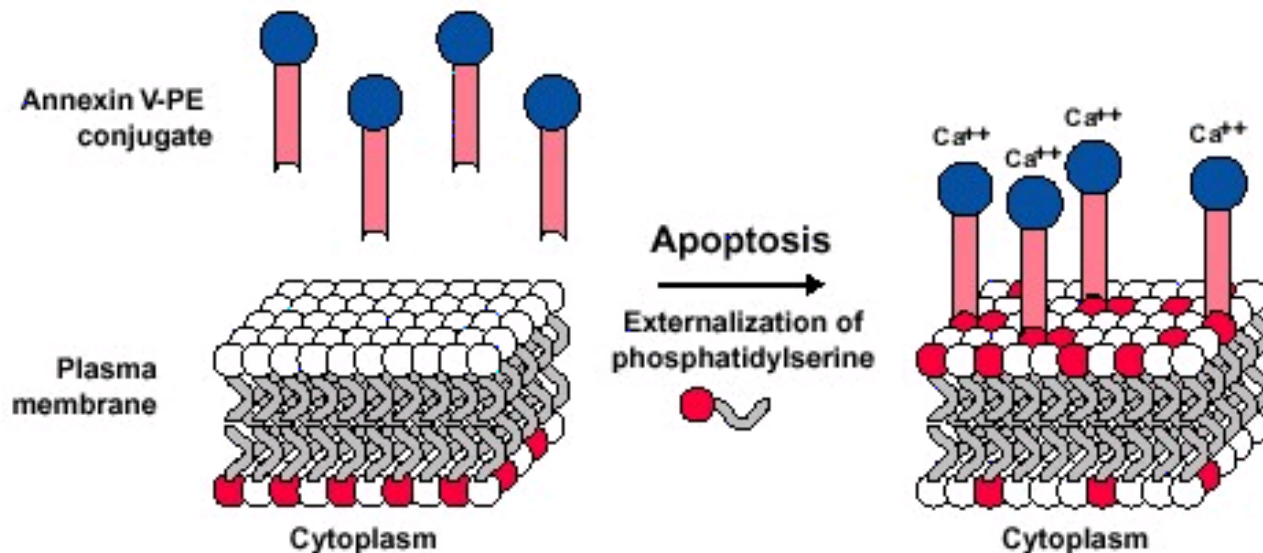
Phagocytosis of Apoptotic Cells and Immune Regulation

G. Liu\*, C. Wu†, Y. Wu\* & Y. Zhao\*

## Annexin V staining - detekce PS

**annexin V** - protein, který má schopnost vázat fosfolipidy, s vysokou afinitou pro PS, vazba závislá na vápníku

- citlivá próba pro detekci PS
- conjugace s fluorescenčními próbami (FITC, PE atd.)
- vizualizace vazby/přítomnosti PS



## Annexin V se váže na PS u apoptotických i nekrotických buněk!

- je to díky tomu, že u nekrotických buněk je porušená integrita plazmatické membrány, a proto značený annexin V proniká do buněk a váže se k PS na vnitřní straně plazmatické membrány

Je proto klíčové:



rozlišit mezi apoptotickými a nekrotickými buňkami, které jsou obojí pozitivní pro vazbu značeného annexinu V

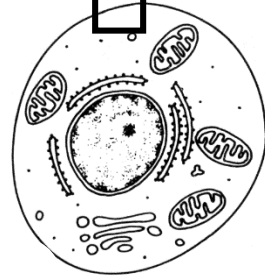
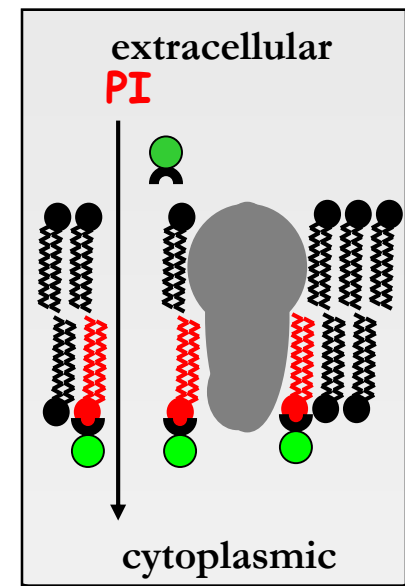
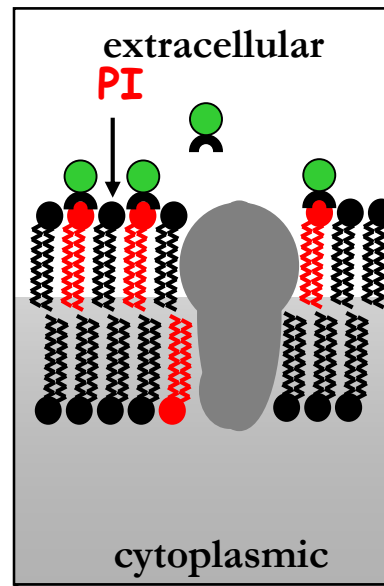
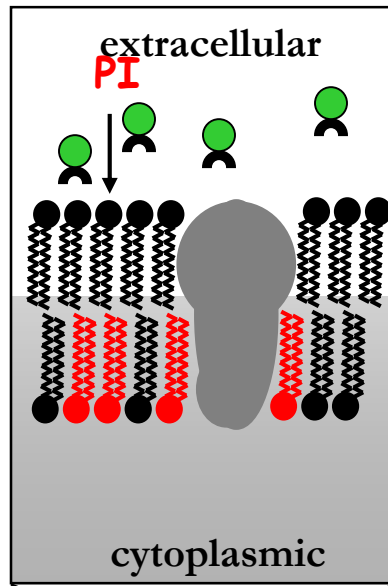
**Test integrity plazmatické membrány** - barví se nekrotické buňky, ne však buňky apoptotické

- např. využití propidium jodidu



# Annexin V staining: phosphatidylserine exposure

 Annexin V-conjugate  
 phosphatidylserine



staining

normal cell

apoptotic cell

necrotic cell

annexin V  
 propidium iodide

-

+

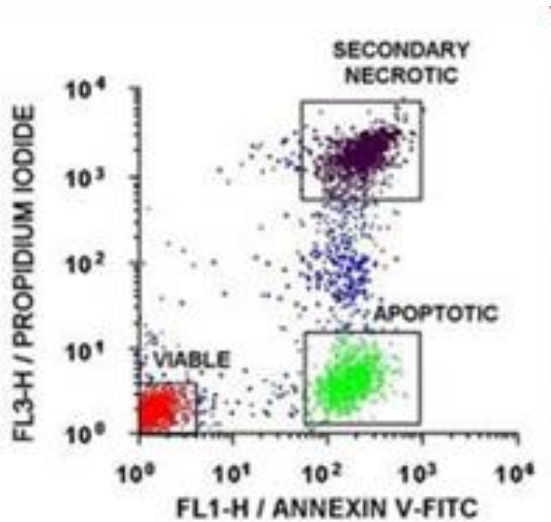
+

-

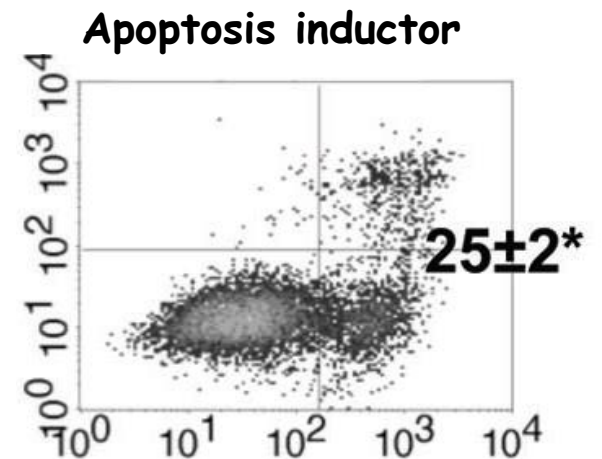
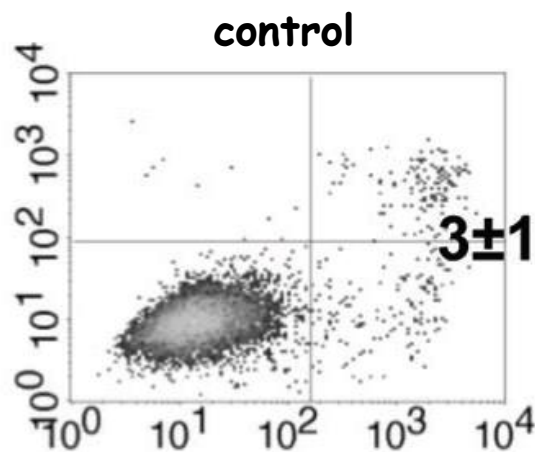
-

+

# Annexin V/PI assay



Důležitost správného načasování analýzy  
(apoptóza, nekróza, sekundární nekróza)



# Detekce translokace PS

- **Výhody:**

- specifický znak apoptózy, relativně časný
- možnost kombinace s detekcí povrchových CD antigenů nebo dalších parametrů apoptózy

- **Limitace:**

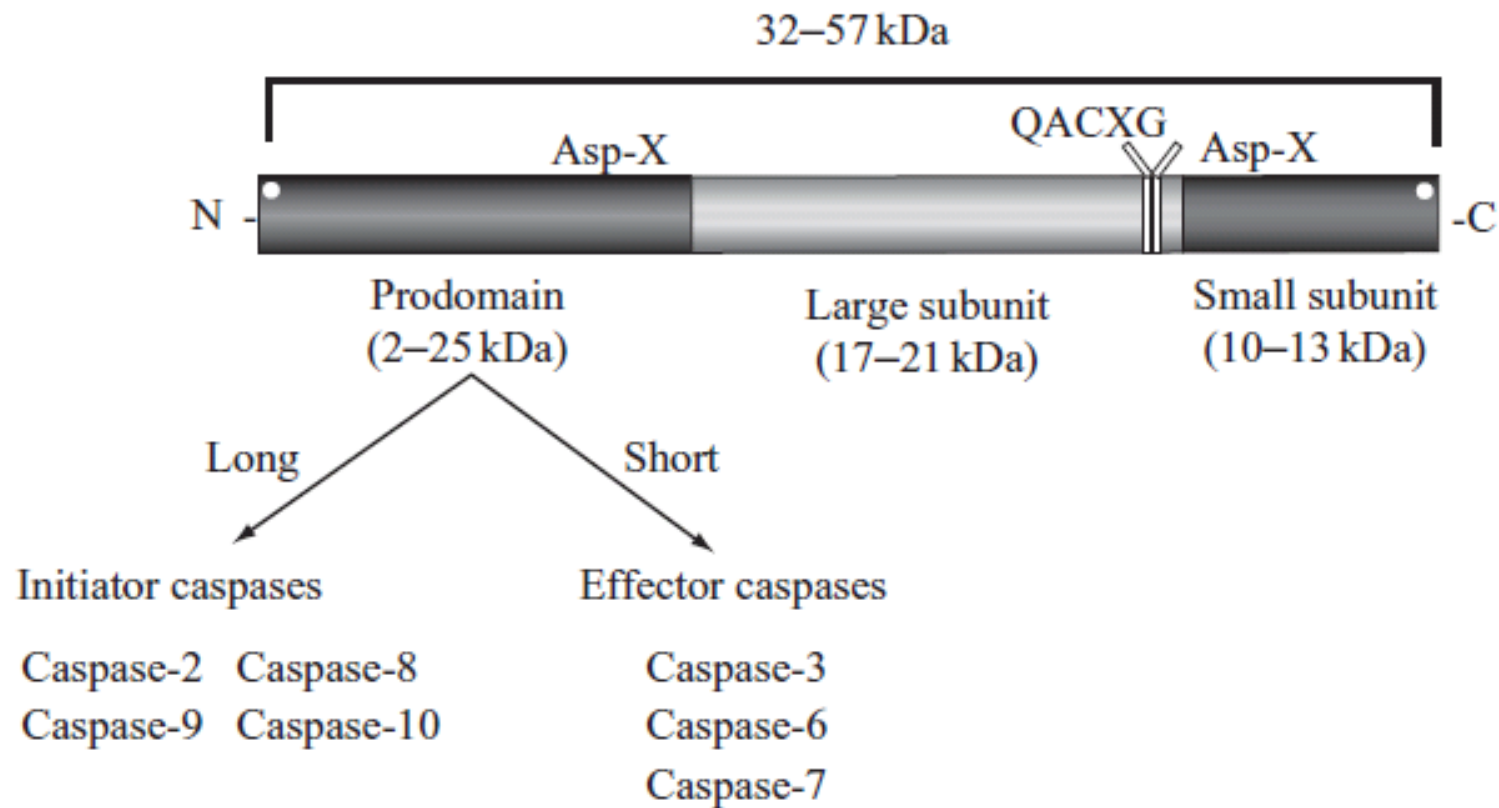
- je nutné během analýzy odlišit mrtvé buňky
- optimalizace koncentrace PI pro daný typ buněk (současné vs. následné přidání PI)
- po nabarvení nutná rychlá detekce
- není možné analyzovat fixované vzorky
- adherentní buňky opatrně trypsinizovat

# Detekce buněčné smrti - změny na úrovni aktivace kaspáz

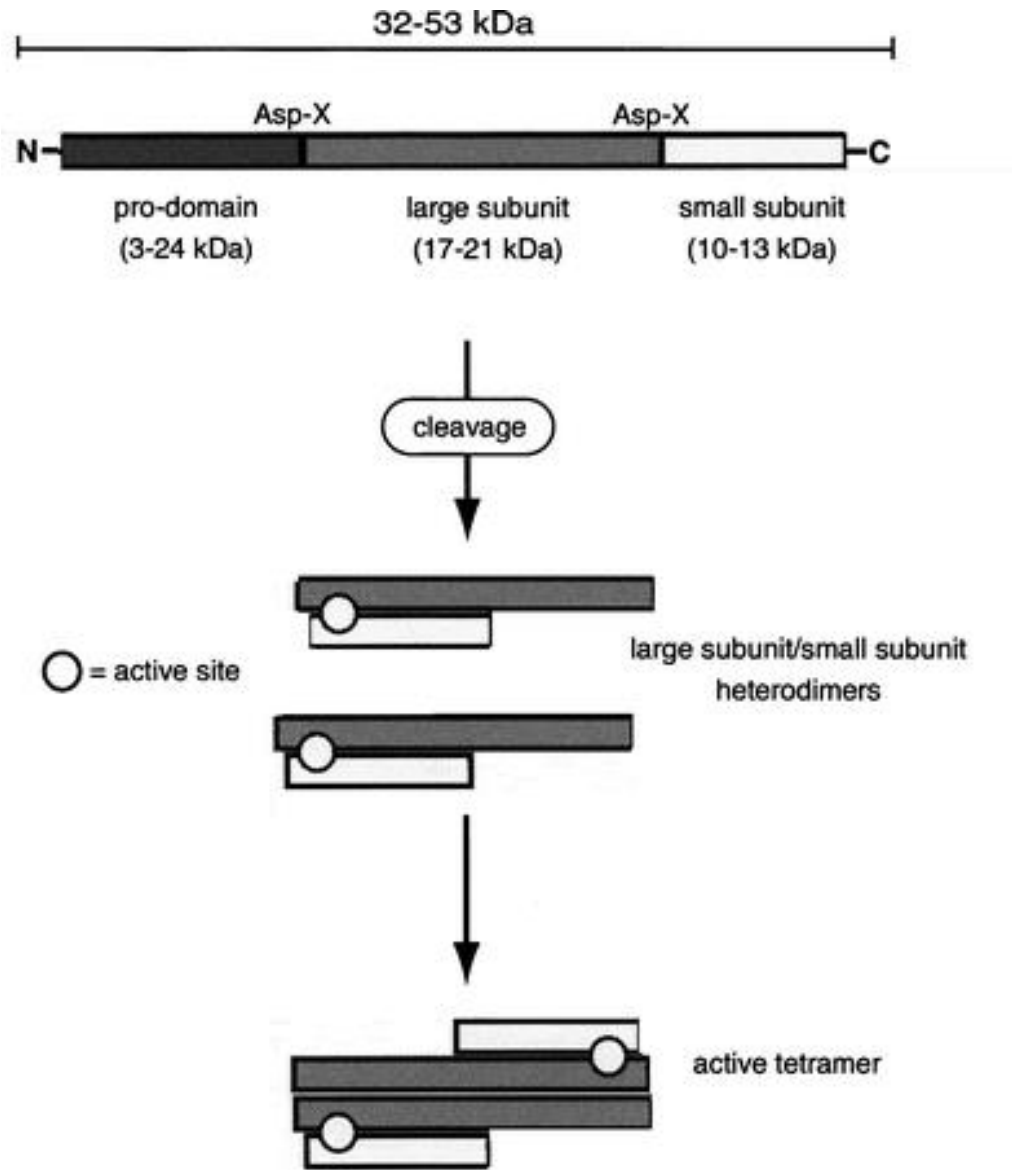
## Průtoková cytometrie

# Kaspázy

- Cysteinové proteázy, specificky štěpí proteinové substráty v místě kyseliny asparagové
- Klíčová úloha v přenosu apoptotického signálu
- v inaktivní formě (proenzymy, pro-kaspázy) v cytoplazmě, štěpení - aktivní kaspáza schopná dále štěpit tzv. „death substráty“ a významně se tak podílet na šíření apoptotického signálu a exekuci apoptózy
- struktura:
  - Prodoména
  - Katalytické podjednotky - velká a malá (heterotetramer)



# Activace pro-kaspáz



# **CASPASES: DETERMINATION OF THEIR ACTIVITIES IN APOPTOTIC CELLS**

Alena Vaculova *and* Boris Zhivotovsky

**Methods in Enzymology, 2008;442:157-81.**



# Detekce štěpení kaspáz

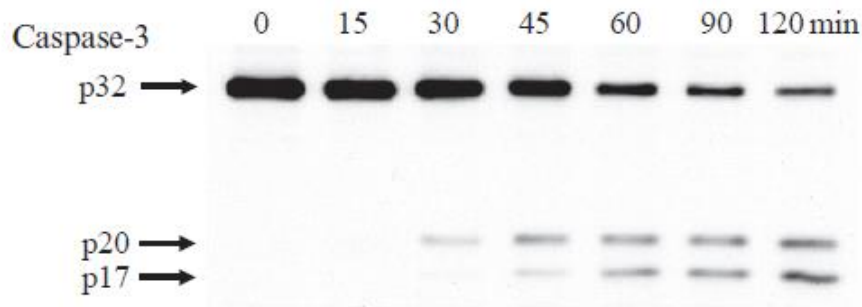
- Využití **specifických protilátek**, které:
  - rozpoznávají nově vzniklá místa (**neoepitopy**) v proteinových fragmentech vzniklých při aktivaci (štěpení) kaspázy
  - nereagují s nenaštěpenými prokaspázami, pouze **selektivně** s aktivní formou enzymu
  - jsou buď přímo **konjugované** s fluorochromy, nebo **nekonjugované** (nutnost následně použít fluorescenčně značené sekundární protilátky)

Před přidáním protilátky k buňkám je nutné je permeabilizovat, po skončení inkubace je potřeba odmýt nenavázané protilátky

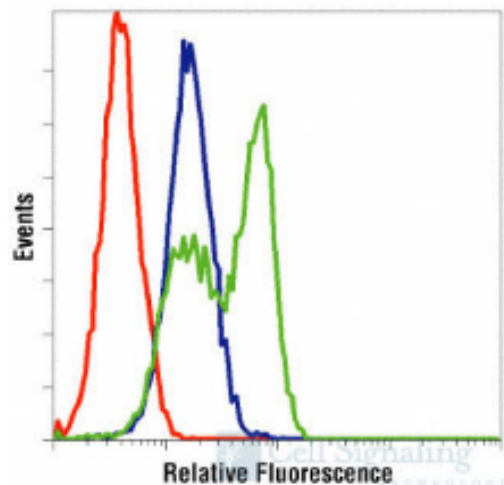
# Detekce aktivní formy kaspáz

Jurkat cells, anti-Fas antibody

(Vaculova, Zhivotovsky, 2007)

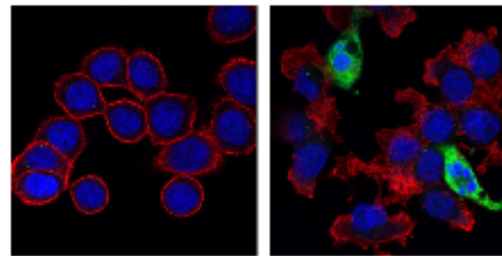


## Flow Cytometry



Flow cytometric analysis of Jurkat cells, untreated (blue) or etoposide-treated (green), using Cleaved Caspase-3(Asp175) (5A1E) Rabbit mAb compared to a nonspecific negative control antibody (red).

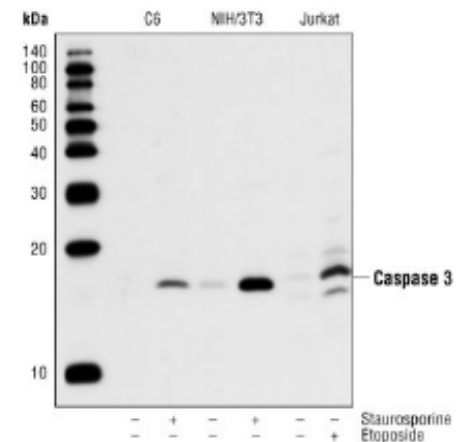
## IF-IC



Confocal immunofluorescent images of HT-29 cells, untreated (left) or Staurosporine #9953 treated (right) labeled with Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb (green). Actin filaments have been labeled with Alexa Fluor® 555 phalloidin (red). Blue pseudocolor = DRAQ5® #4084 (fluorescent DNA dye).

[www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)

## Western Blotting



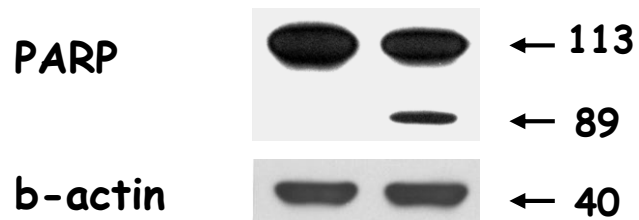
Western blot analysis of extracts from C6 (rat), NIH/3T3 (mouse), and Jurkat (human) cells, untreated or treated with staurosporine (1uM, 3hrs) or etoposide (25uM, 5hrs) as indicated, using Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb.

# Detekce endogenních kaspázových substrátů - PARP

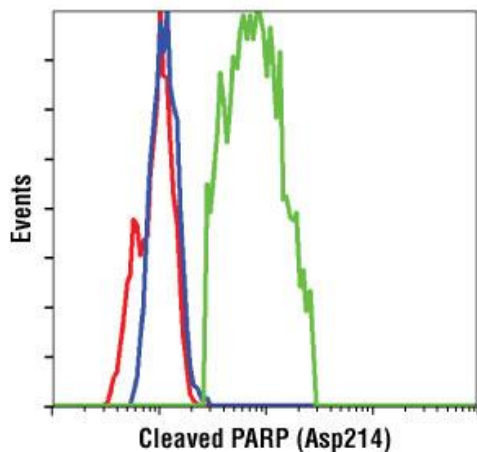
- Poly(ADP)ribose polymerase (PARP)
- Jaderný protein (113 kDa), opravy DNA - inaktivace PARP blokuje opravu DNA, posílení fragmentace DNA
- Během apoptózy specificky štěpený na fragmenty 89 a 24 kDa, citlivý marker pro detekci apoptózy
  - substrát kaspázy -3, -6, -7
  - rutinní detekce fragmentů pomocí Western blotu / IHC
  - analýza na průtokovém cytometru pomocí protilátek proti štěpeným fragmentům
    - PARP (p25; p89)



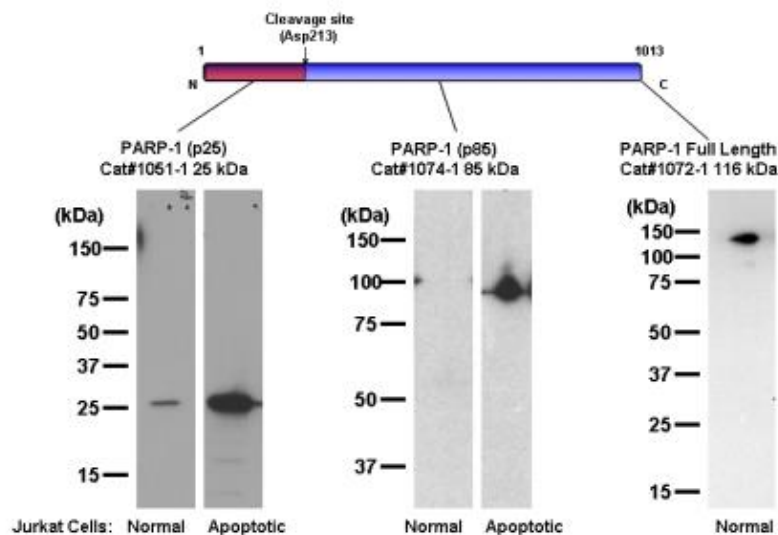
# Detection of PARP cleavage



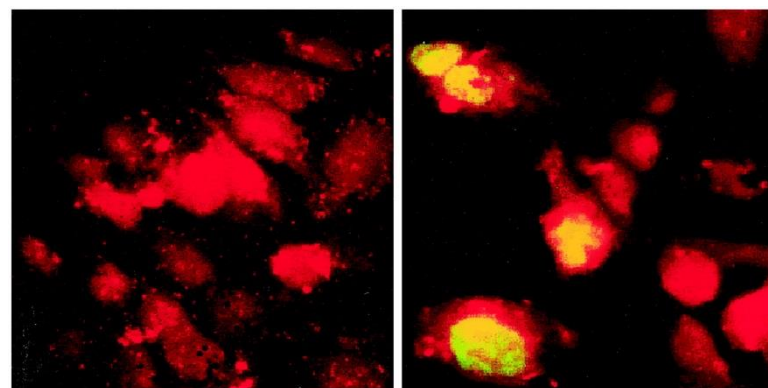
control  
TRAIL



Jurkat cells,  
etoposide,  
ctrl, iso ctrl



[http://www.epitomics.com/technology/parp1\\_intro](http://www.epitomics.com/technology/parp1_intro)

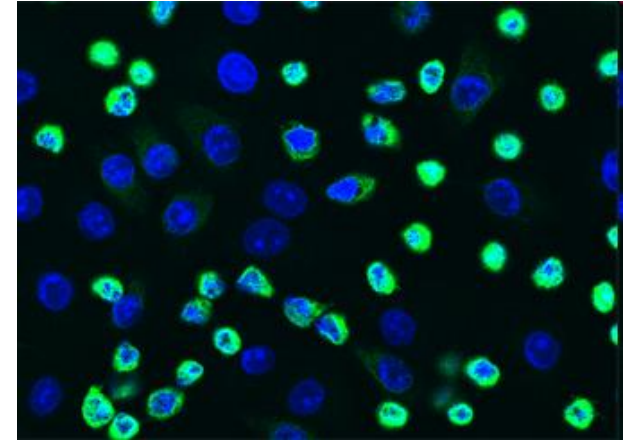
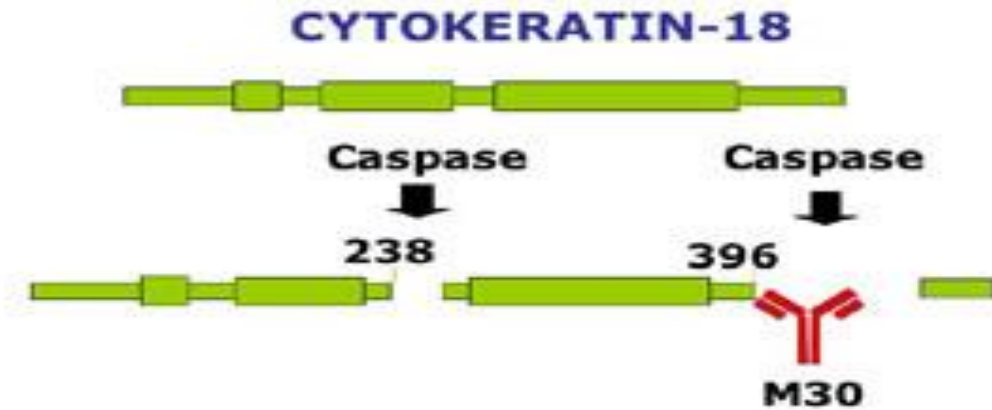


(Bao J et al. , 2002)

# Detekce endogenních kaspázových substrátů - cytokeratin 18 (CK18)

- Cytokeratin 18

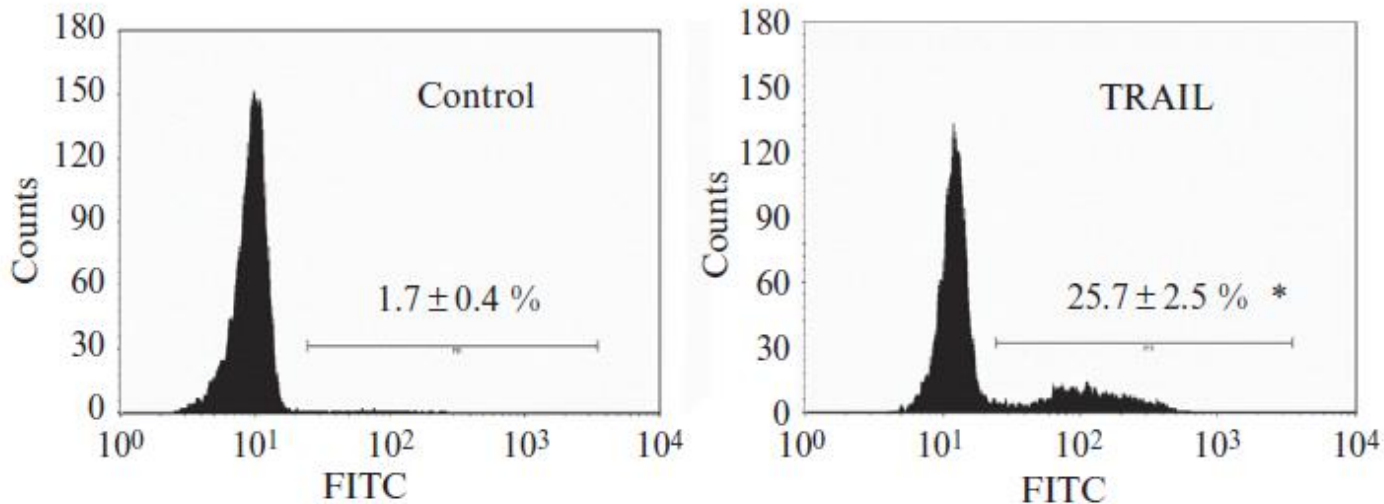
- Složka cytoskeletu, intermembránová filamenta epitheliálních buněk
  - pozor! - použití metody omezeno pouze na buňky epitheliálního původu - normální i nádorové; ne však např. krevní, nervové; ale - výhoda - využití při monitorování buněk karcinomu v krvi pacientů po terapii
- Štěpení během apoptózy - kaspázy-3, -6, -7, -9
- detekce specifického fragmentu (nový epitop) pomocí M30 Cytodeath™ protilátky (konjugovaná s fluorochromy, nekonjugovaná - nutnost značené sekundární protilátky)



HeLa cells treated with TRAIL + CHX,  
M30 cytodeath (www.enzolifesciences.com)

HCT116 cells treated with TRAIL

M30 cytodeath (Vaculova, Zhivotovsky, 2007)



**ALEXIS**<sup>®</sup>  
BIOCHEMICALS  
A Brand of Enzo Life Sciences, Inc.

**PEVIVA**

**Roche**

# Detekce štěpení CK18

- **Výhody:**

- jednoduchý protokol - standardní intracelulární imunodetekce
- možnost kombinace s detekcí dalších intracelulárních antigenů

- **Limitace:**

- buněčná specifita (CK18 - epitheliální buňky)
- obtížná kombinace analýzy s detekcí povrchových antigenů
- nemožná kombinace s analýzou vitálních funkcí

# Detekce buněčné smrti - změny na úrovni DNA/jádra

## Analýza fragmentace DNA

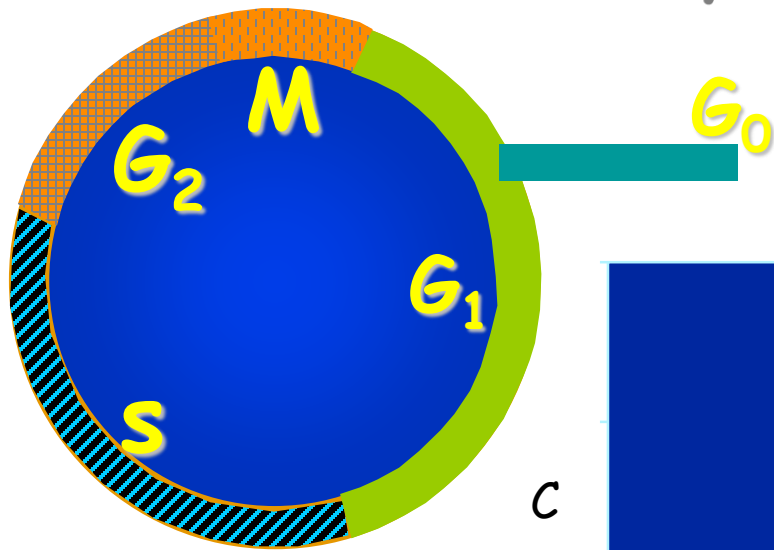
- sub  $G_0/G_1$  populace
- TUNEL

## Průtoková cytometrie

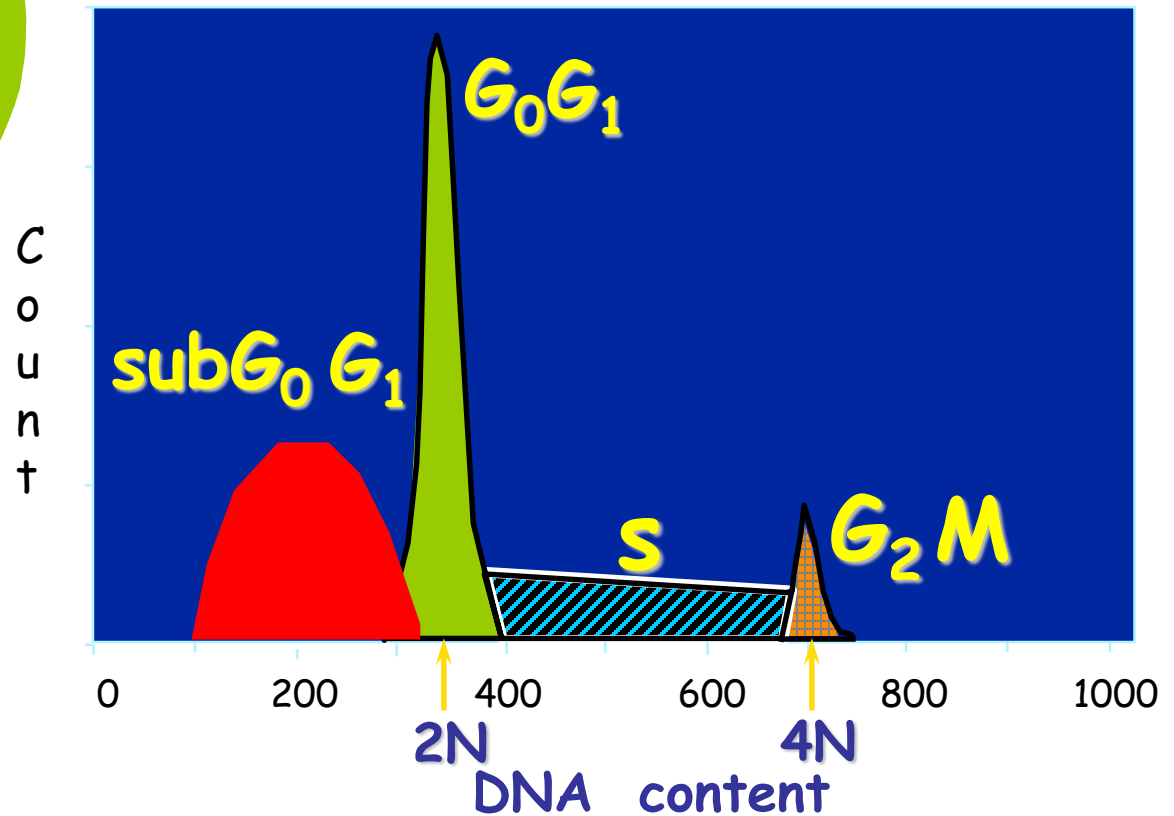


# Analýza subdiploidní populace (barvení DNA)

# Cell Cycle and cell death



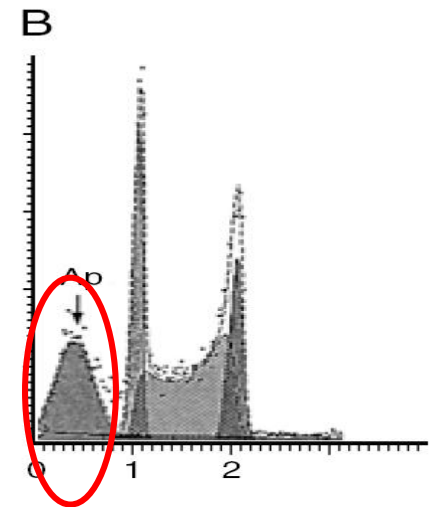
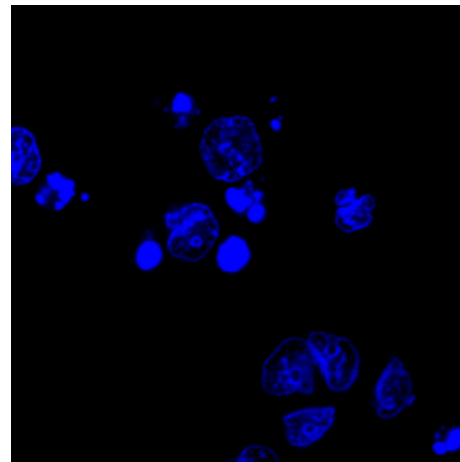
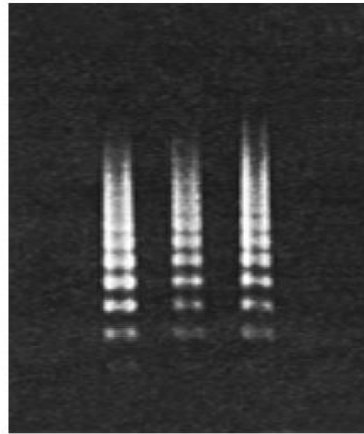
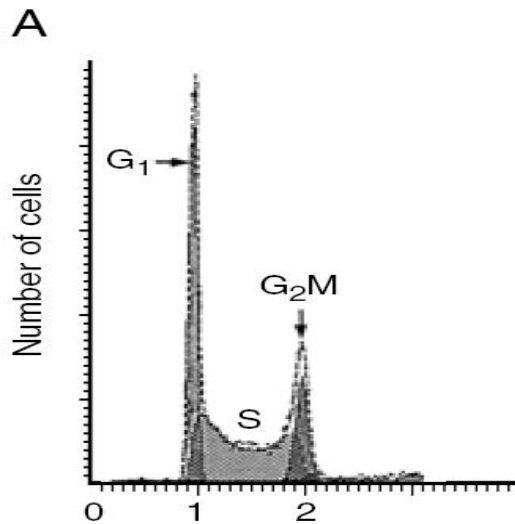
## DNA Analysis



- propidium iodide
- DAPI
- Hoechst 33342
- 7-AAD

Purdue University Cytometry Laboratories

# Analýza sub $G_0/G_1$ populace



+ popis protokolu

# Analýza subG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> populace

- extrakce nízkomolekulárních fragmentů pomocí citrátového pufru

© 1997 Wiley-Liss, Inc.

Cytometry 27:1-20 (1997)

DARZYNKIEWICZ ET AL.

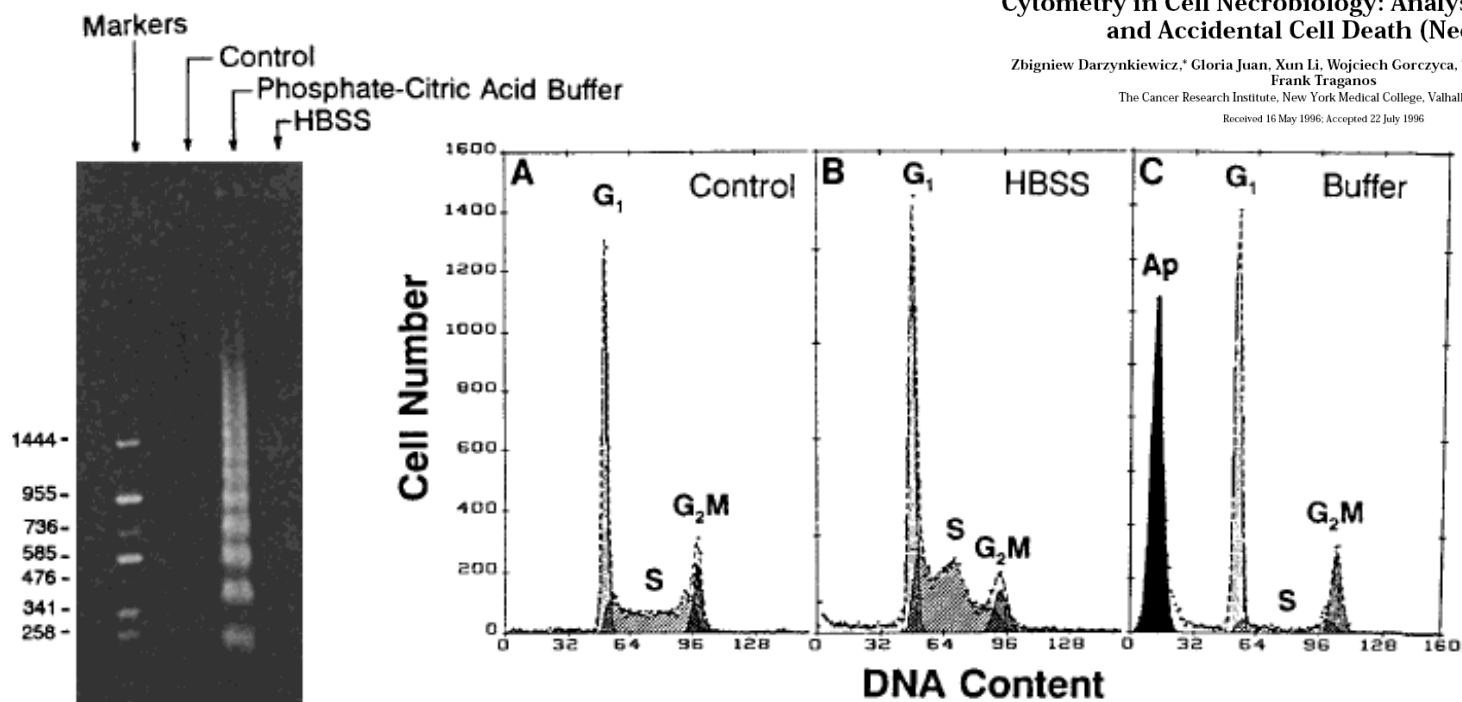
Review Article

## Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Necrosis)

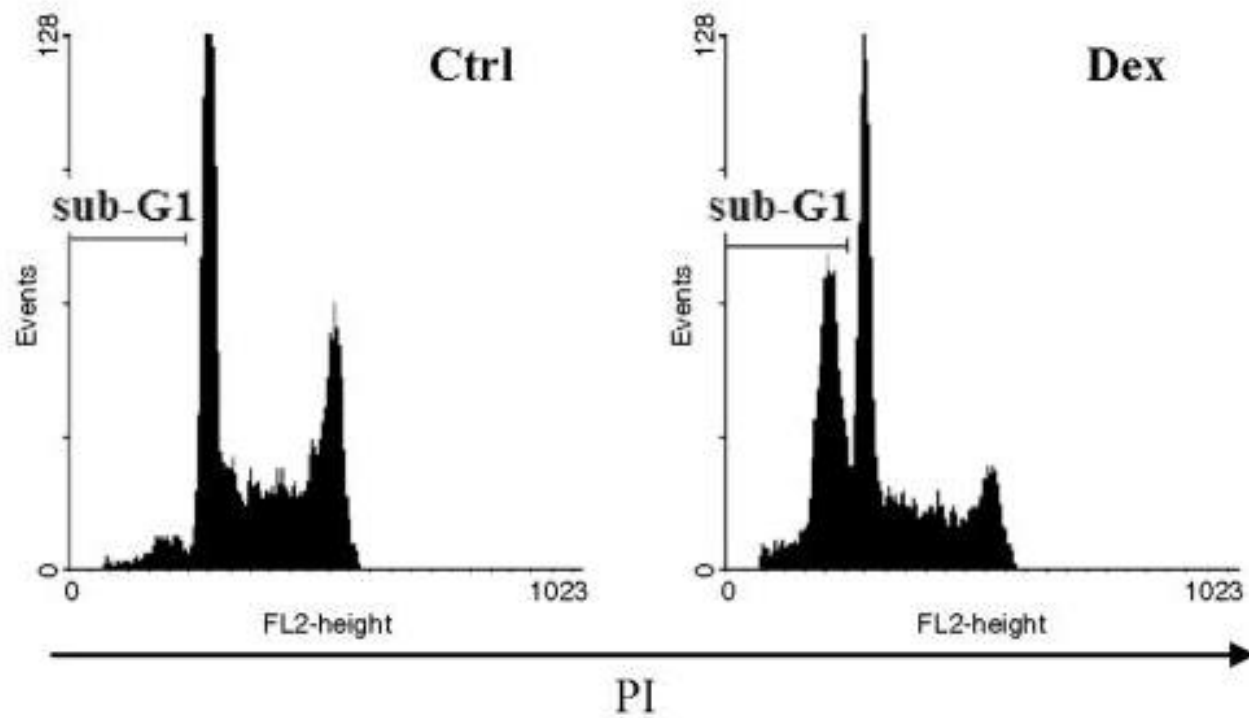
Zbigniew Darzynkiewicz,\* Gloria Juan, Xun Li, Wojciech Gorczyca, Tomoyuki Murakami, and Frank Traganos

The Cancer Research Institute, New York Medical College, Valhalla, New York

Received 16 May 1996; Accepted 22 July 1996



# Analýza subG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> populace



# Analýza sub $G_0/G_1$ populace

- **Výhody:**
  - rychlá a levná analýza
  - analýza možná zároveň s detekcí buněčného cyklu
  - lze použít jakoukoliv značku vázající se na DNA
- **Limitace:**
  - omezená specifita - sub $G_0$  populace je detekovatelná i u mechanicky poškozených buněk
  - extrakce nízkomolekulárních fragmentů DNA závisí na protokolu zpracování buněk
  - buňky umírající apoptózou z  $G_2$  fáze je obtížné detekovat
  - nelze považovat za specifickou metodu detekce apoptózy

# Analýza zlomů DNA (modifikované dNTPs) TUNEL

## Apoptóza a štěpení DNA - TUNEL assay

- apoptóza - aktivace endonukleáz -  
charakteristické štěpení DNA

- Přítomnost zlomů DNA, vznik fragmentů  
různé velikosti, volné 3'-OH konce DNA

- detekce specifických zlomů - významný  
marker apoptózy



## TUNEL

• **deoxynucleotidyl transferase (TdT)**, katalyzuje  
kovalentní připojení modifikovaných nukleotidů k  
3'-OH konci DNA, nezávisle na templátu

(**terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling**)

(modified deoxyuridine triphosphate nucleotides)

- 3'-OH konec jedno- nebo dvouřetězcových zlomů DNA je označen  
modifikovaným analogem báze pomocí TdT

- vizualizace

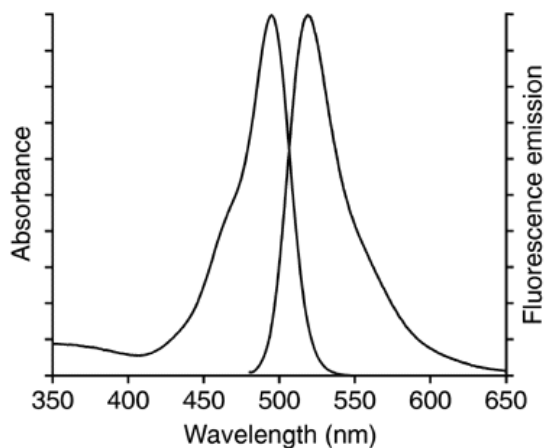
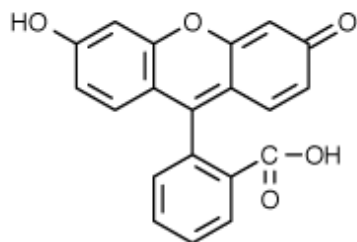
**přímá** - dUTP přímo značený fluorescenčně (FITC-dUTP)

**nepřímá** - inkorporace modifikovaných dUTPs, ty jsou specificky  
rozpoznávány fluorescenčně značenou Ab (např. anti-BrdU Ab)



# Značené nukleotidy - přímá konjugace dUTP s fluorochromy s různými spektrálními vlastnostmi

- Fluorescein
- Texas red
- Cyanine
- BODIPY etc.

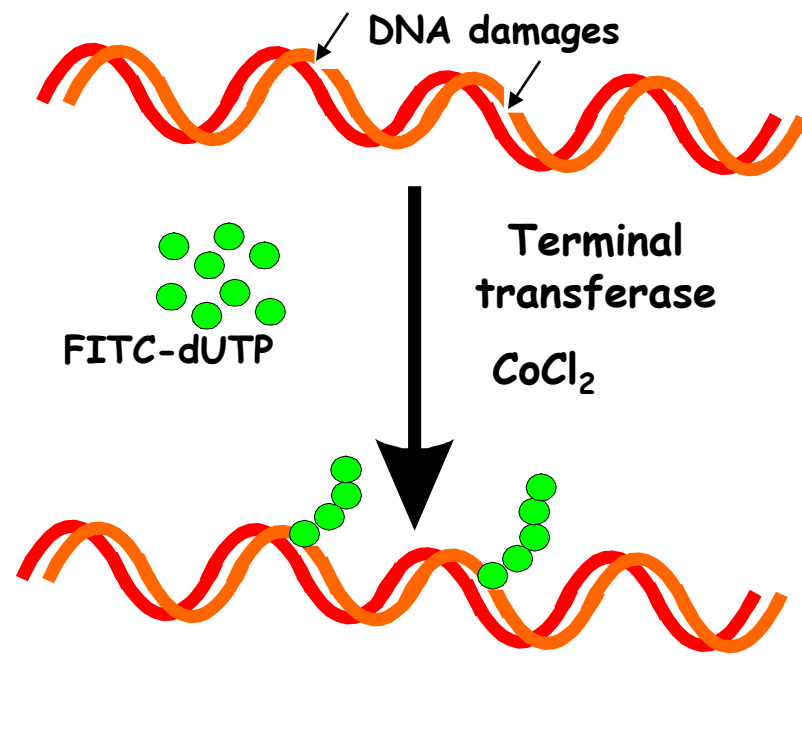


## TUNEL:

DNA fragmentation

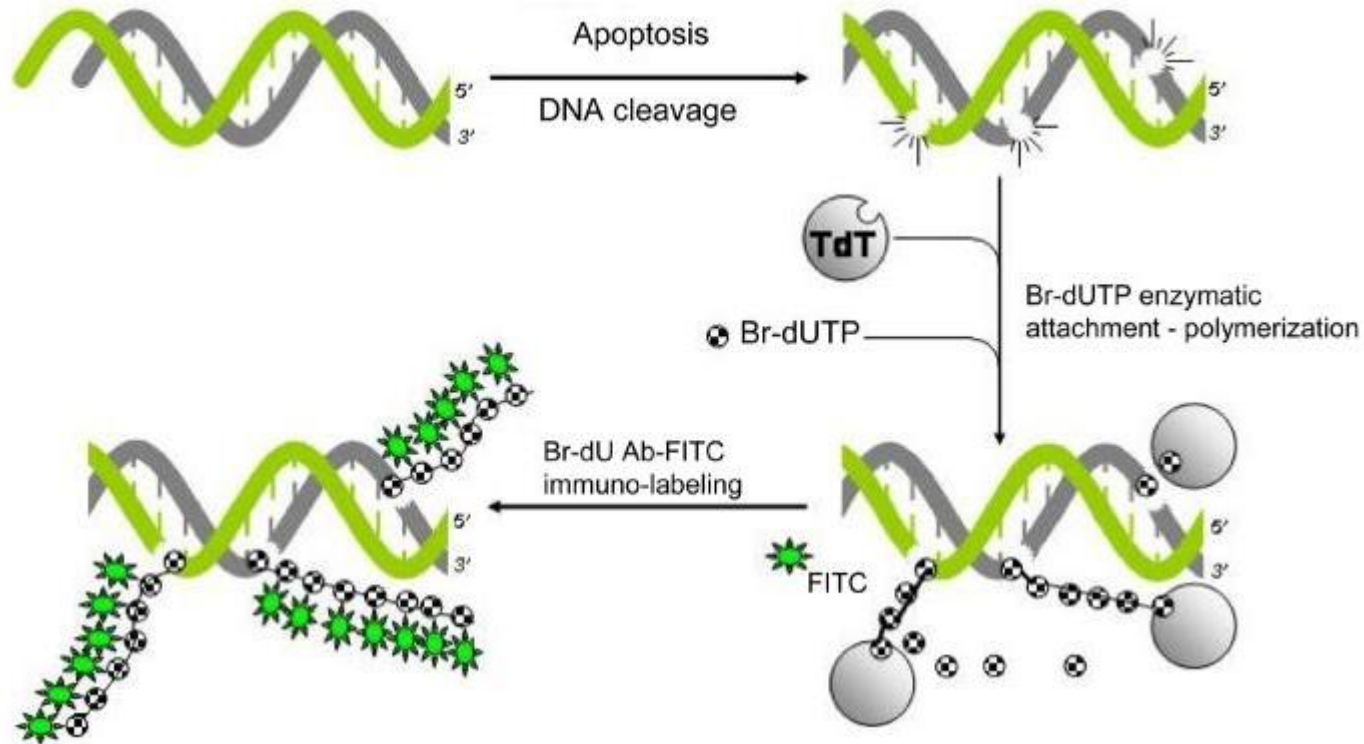
## Fluorescein-12-dUTP

### *In situ* end labeling (TUNEL)



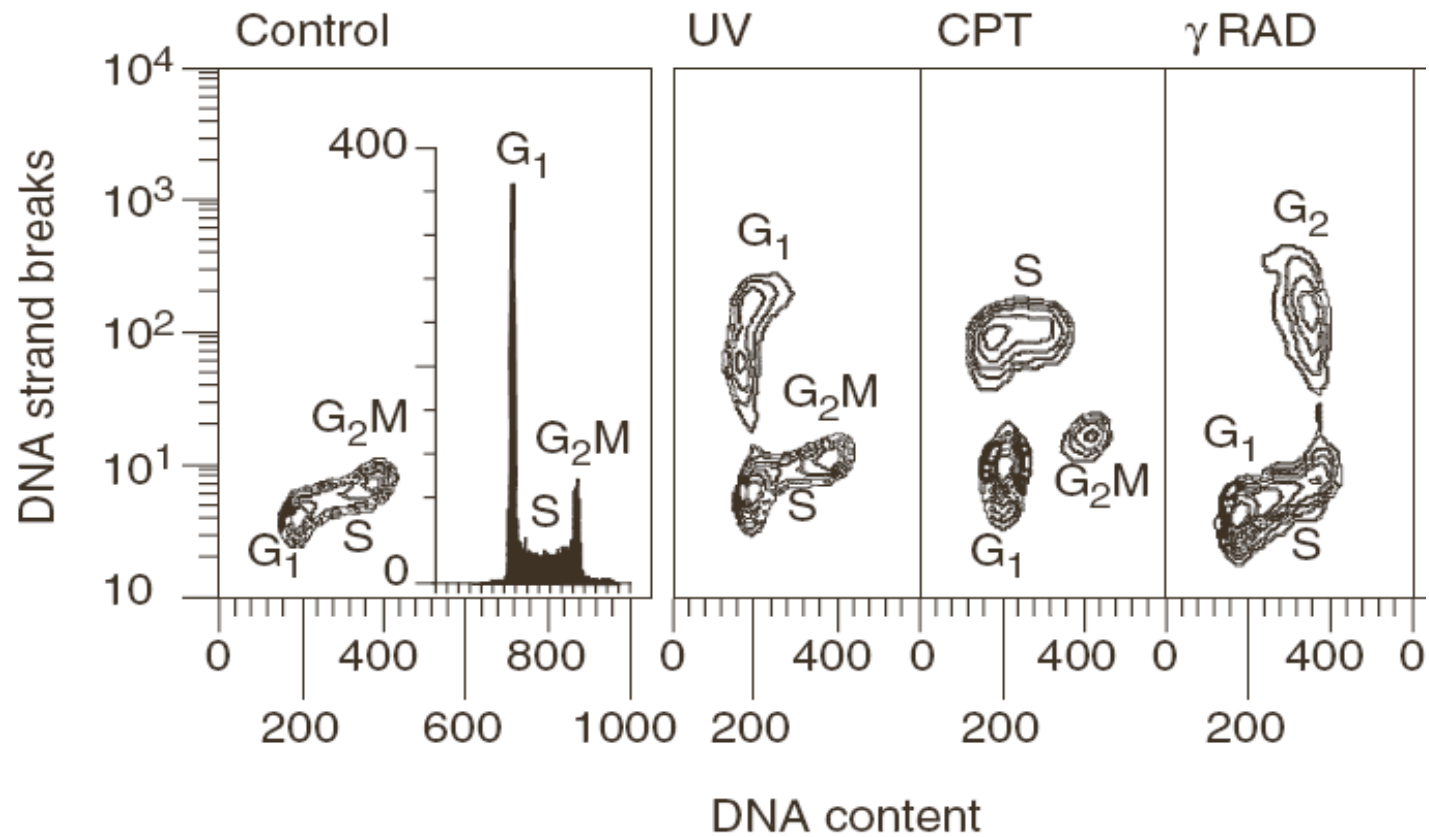
# BrdUTP-based detection of DNA fragmentation

Addition of the deoxythymidine analog 5-bromo-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (BrdUTP) to the TdT reaction serves to label the break sites. Once incorporated into the DNA, BrdU can be detected by an anti-BrdU antibody using standard immunohistochemical techniques

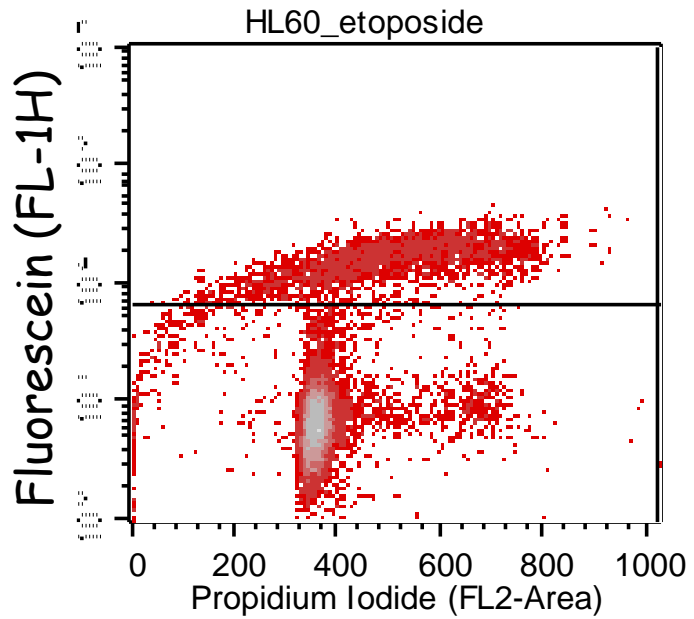


Citlivější než přímé značení dUTP

# TUNEL

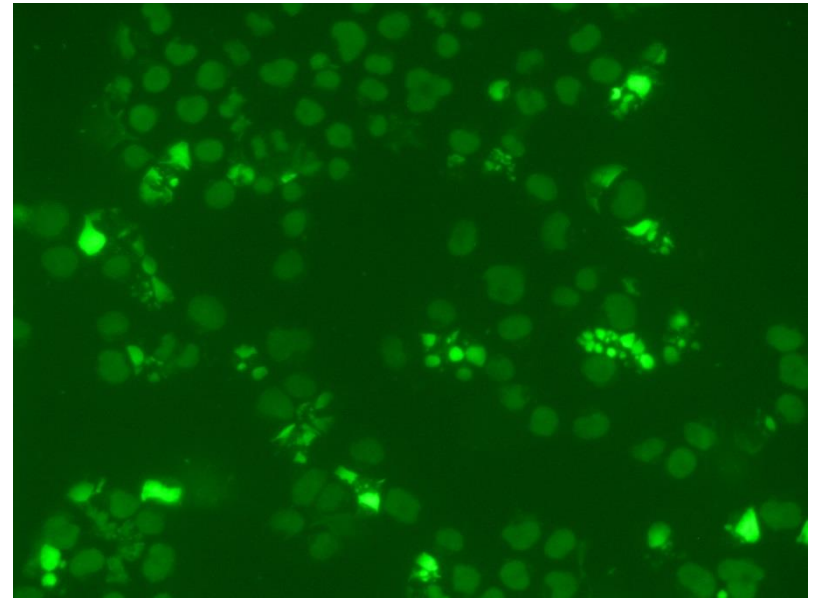


## Průtokový cytometr



TUNEL

## Fluorescenční mikroskop



# TUNEL

- **Výhody:**
  - vysoká citlivost, specificita
  - současná analýza detekcí buněčného cyklu, určení, ze které fáze buňky přednostně umírají
- **Limitace:**
  - relativně náročný protokol (finančně a časově)
  - spotřeba relativně velkého množství buněk
  - některé druhy fixace mohou u určitých buněk vést k artefaktům
  - nevhodné pro buňky, u nichž během apoptózy nedochází k nízkomolekulární fragmentaci DNA

# Detekce buněčné smrti - změny na úrovni mitochondrií

Mitochondriální membranový potenciál

Detekce exprese/aktivace proteinů rodiny Bcl-2

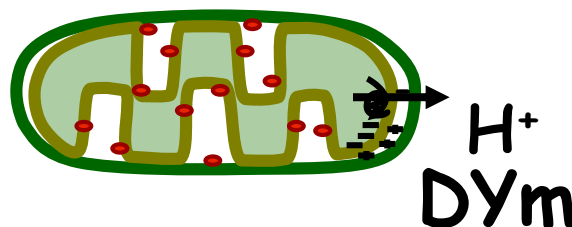
Vylití cytochromu c z mitochondrií

Průtoková cytometrie

# Mitochondrie a apoptóza

- Důležitá úloha mitochondrií v regulaci apoptózy
- Klíčové regulátory v mitochondriích - proteiny rodiny Bcl-2
- Změny na úrovni mitochondriální membrány - membránový potenciál, tvorba pórů
- Uvolnění proapoptotických proteinů z mitochondrií - cytochrom c, AIF, endoG, Smac/DIABLO, Omi

## Mitochondriální membranový potenciál



- Mitochondrie - centra buněčné respirace, elektron-transportní řetězec ve vnitřní mitochondriální membráně, redoxní potenciál, translokace protonů ( $H^+$ ) z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru mitochondrií
  - Elektrochemický protonový gradient napříč vnitřní mitochondriální membránou (nutný pro tvorbu ATP)
  - Rozdíl napětí, elektrického potenciálu mezi vnitřní a vnější stranou vnitřní mitochondriální membrány (150-180 mV)
    - nerovnoměrné rozdělení volných kationtů a aniontů na obou stranách membrány



# Mitochondrie, $\Delta Y_m$ a apoptóza

Depolarizace mitochondriální membrány a ztráta  $\Delta Y_m$  je důsledek otevření „permeability transition pores“ (PTP) nebo narušení integrity vnější mitochondriální membrány

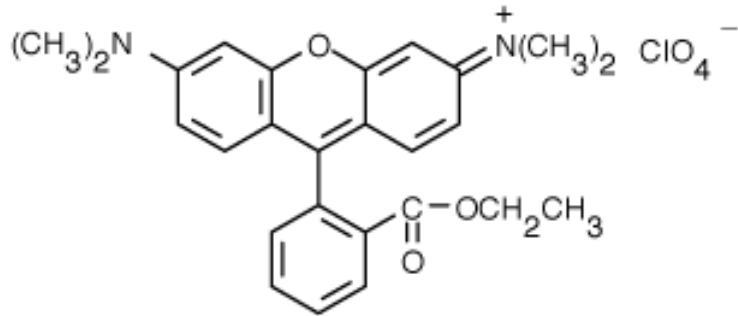
Depolarizace mitochondrií je spojena s:

- ischemií/reperfúzí
- oxidativním stresem
- **buněčnou smrtí**

# Měření MMP

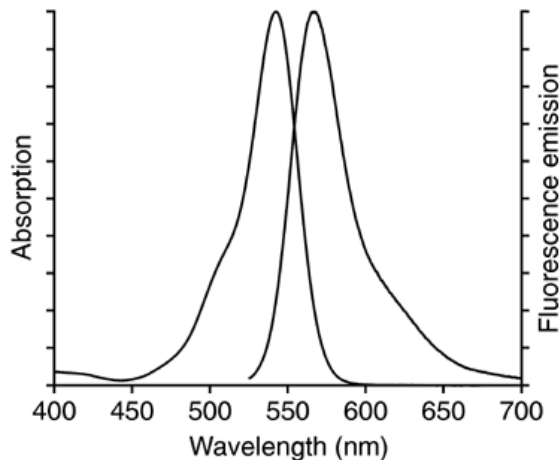
- Přímé měření
  - elektrody
- Nepřímé měření
  - Neinvazivní lipofilní kationické próby
    - radioaktivně značené
    - fluorescenční
  - **neinvazivní** - netoxické pro živé buňky
  - **lipofilní** - snadný transport přes lipidovou membránu
  - **kationické** - akumulace v místě s negativním nábojem

# tetramethylrhodamine, ethyl ester, perchlorate (TMRE)

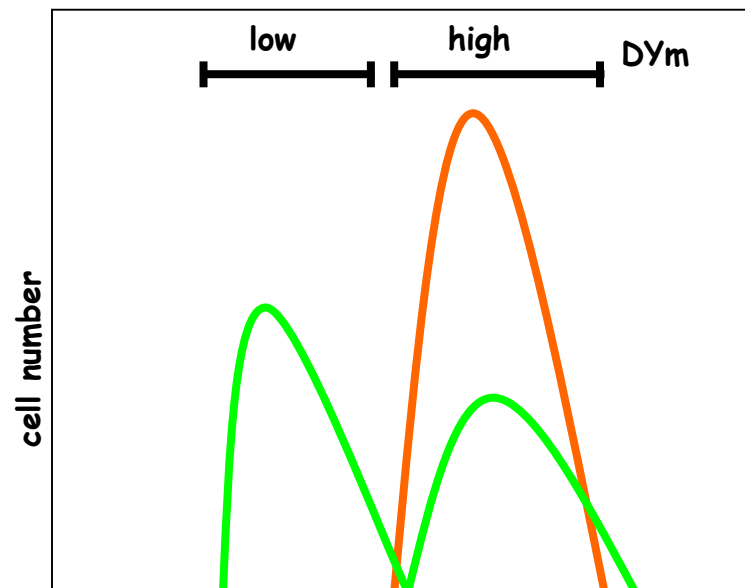


Akumulace TMRE v mitochondriích závisí na MMP

ex./em. = 551/576 nm



Mitochondrial membrane potential



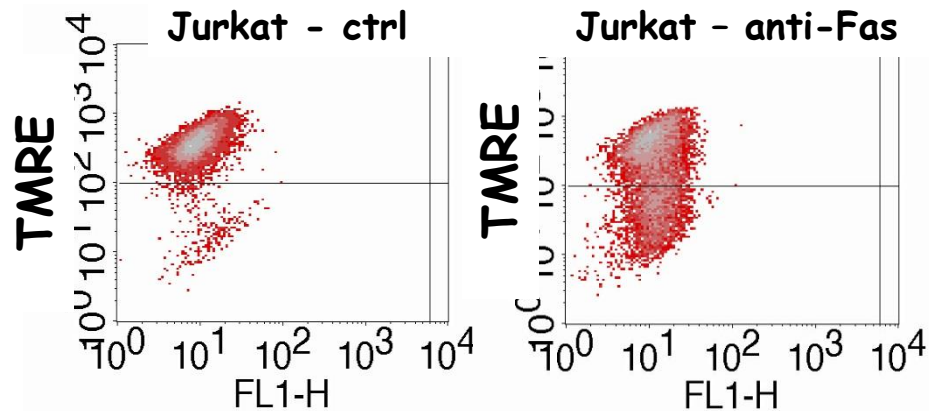
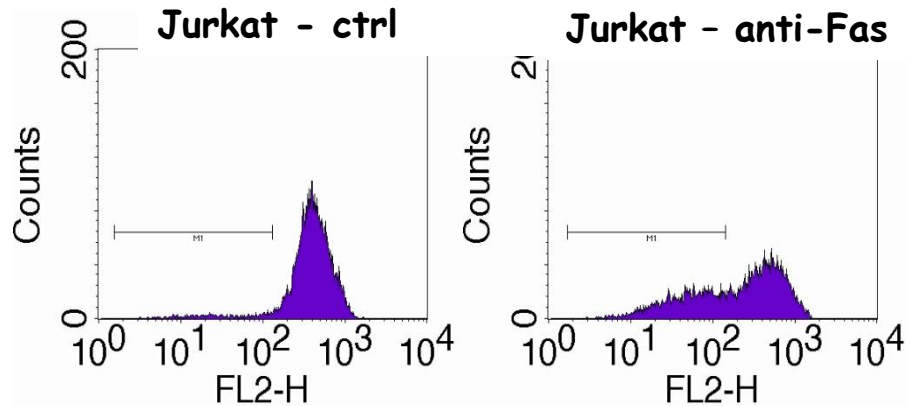
Control

Anti-Fas 2 hours

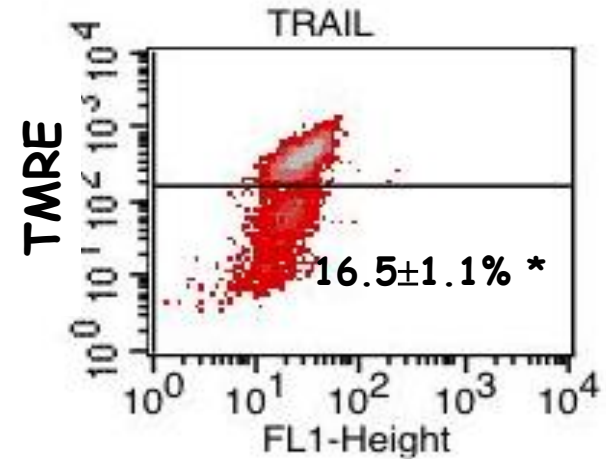
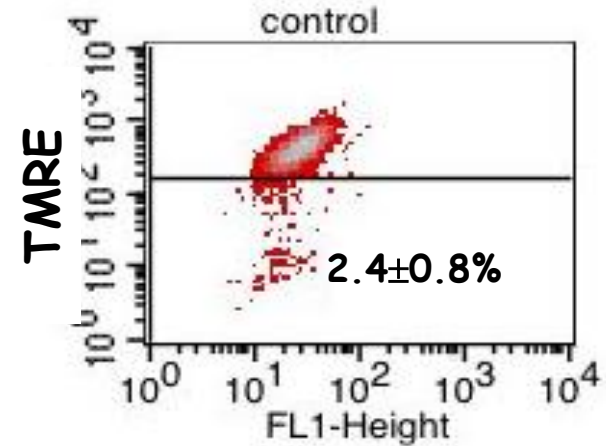
Jurkat cells

TMRE staining

Jurkat leukemia cells,  
anti-Fas antibody (2 h)

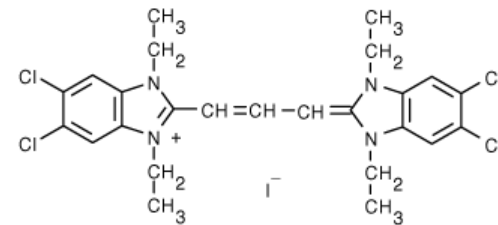


HT-29 colon cancer cells,  
TRAIL (4 h)



5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide

JC-1

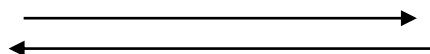


JC-1 Monomer

Em.: 527 nm

green

Ex.: 488 nm



REVERZIBILNÍ

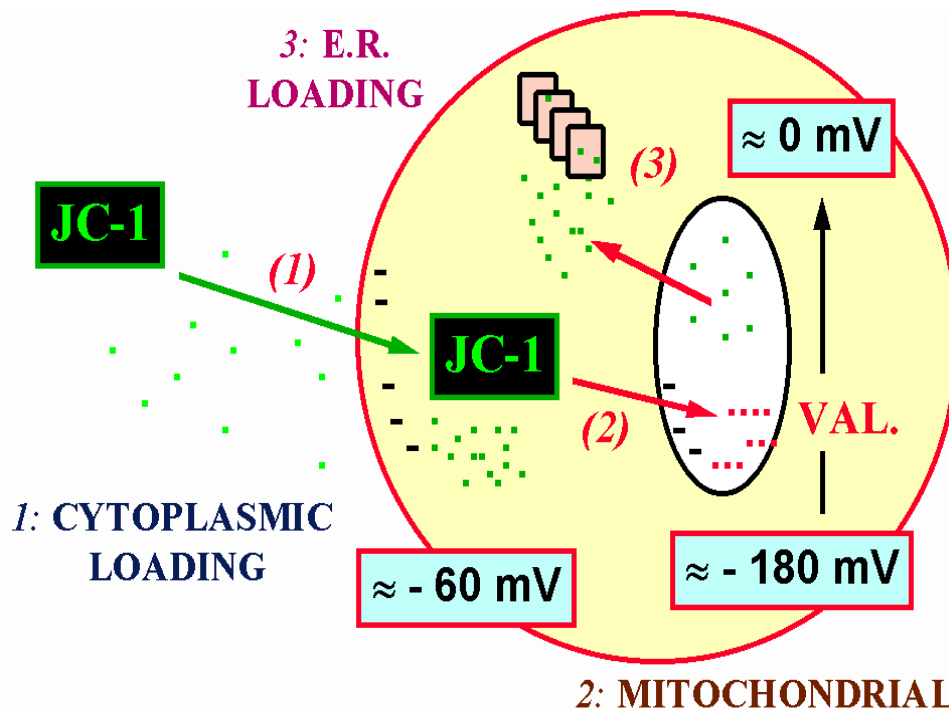
J-aggregate

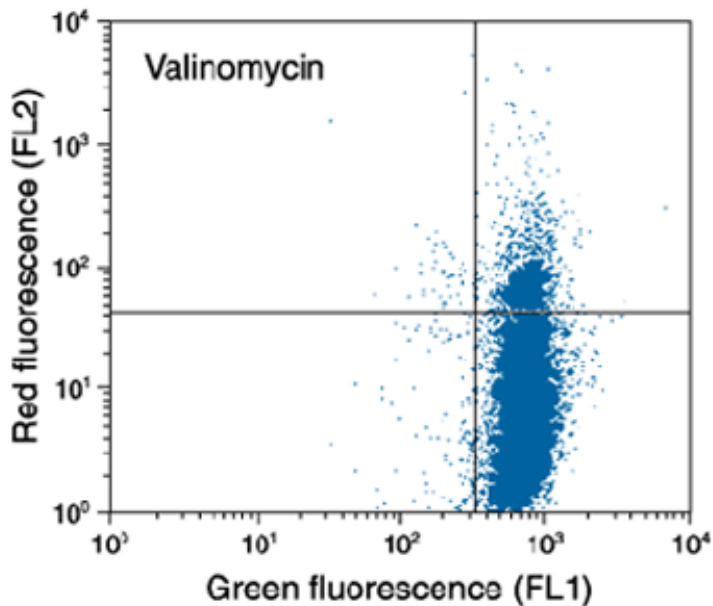
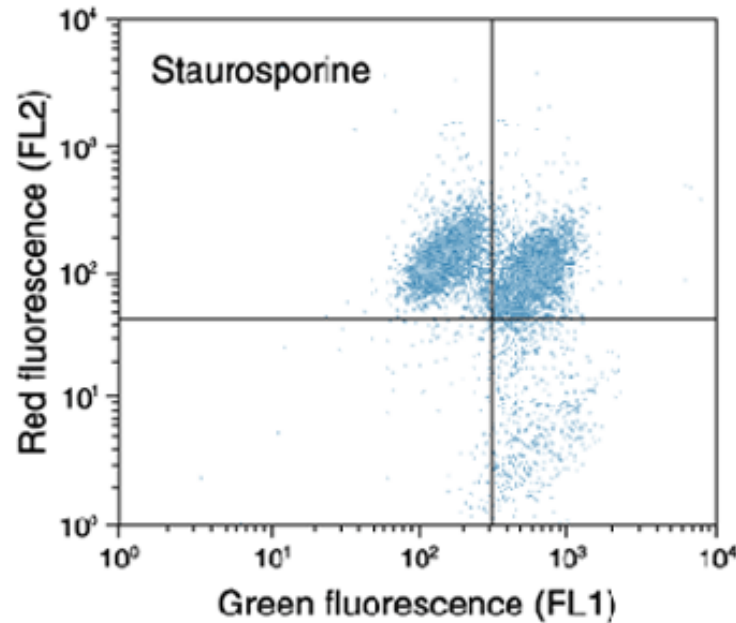
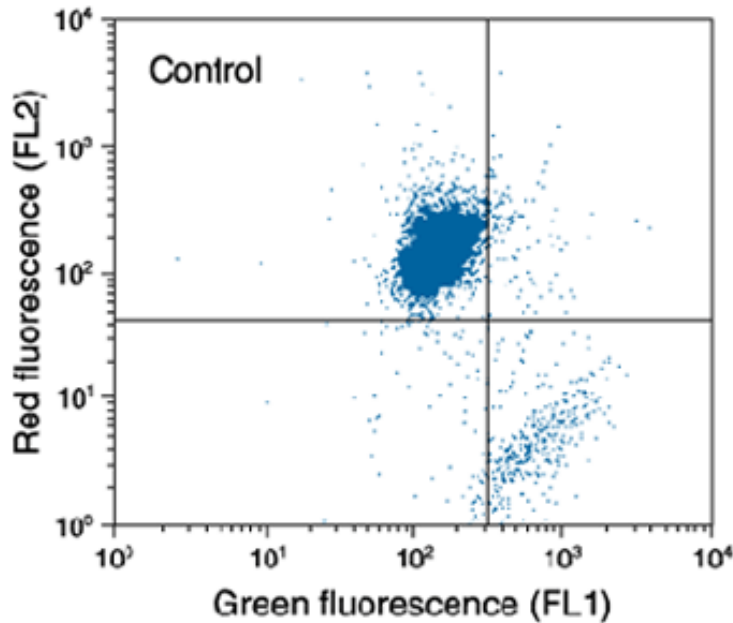
Em.: 590 nm

red

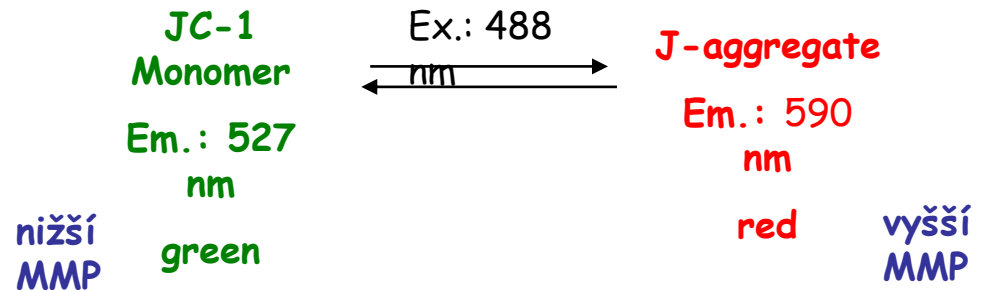
nižší MMP

vyšší MMP





**Apoptotická buňka má snížený  
MMP ve srovnání s buňkou  
normální**



# Měření MMP

- **Výhody:**

- rychlá a nenáročná metoda, relativně levná
- snadné odlišení buněčných populací
- možné kombinovat s detekcí řady dalších vitálních funkcí

- **Limitace:**

- specificitu nutno potvrdit další metodou
- nelze považovat za specifickou metodu detekce apoptózy
- vhodná koncentrace próby, pH

# Proteiny rodiny Bcl-2

- Klíčové regulátory apoptózy na úrovni mitochondrií
- Proapoptotické a antiapoptotické, tvorba homo- a heterodimerů, důležitost rovnováh
- Stanovení množství celkového nebo aktivního proteinu - s využitím specifických protilátek pomocí průtokové cytometrie
  - např. Bax protein

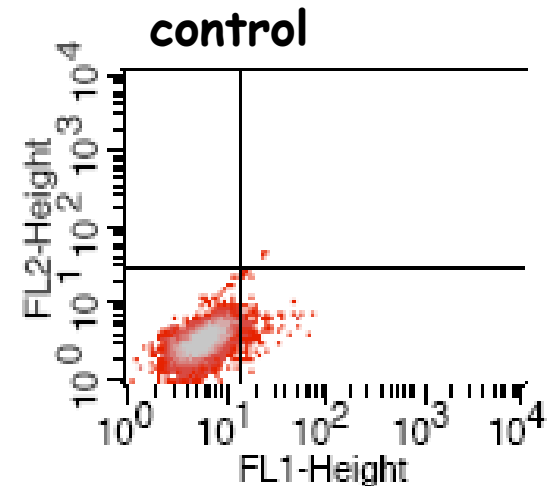


## Bax protein activation

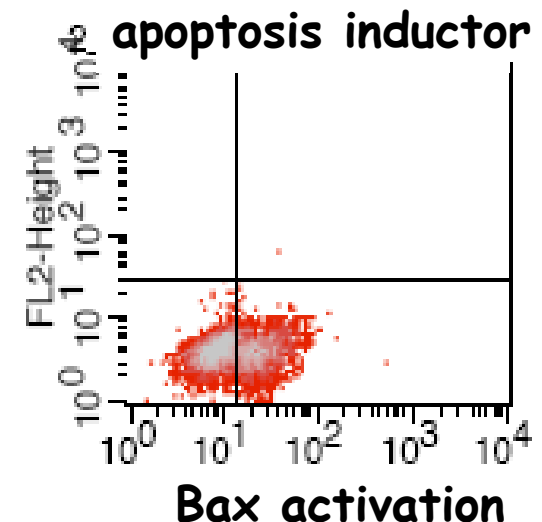
- **healthy cells** - Bax as a soluble monomeric protein, diffusely distributed in the cytoplasm
- **apoptotic cells** - Bax undergoes conformational changes (dissociation of its termini, exposing previously occluded epitopes) allowing recognition of the active form by conformation-specific antibodies

Specific anti-active Bax antibody

mouse anti-Bax (BD556467, clone 6A7, Becton Dickinson)



Bax activation

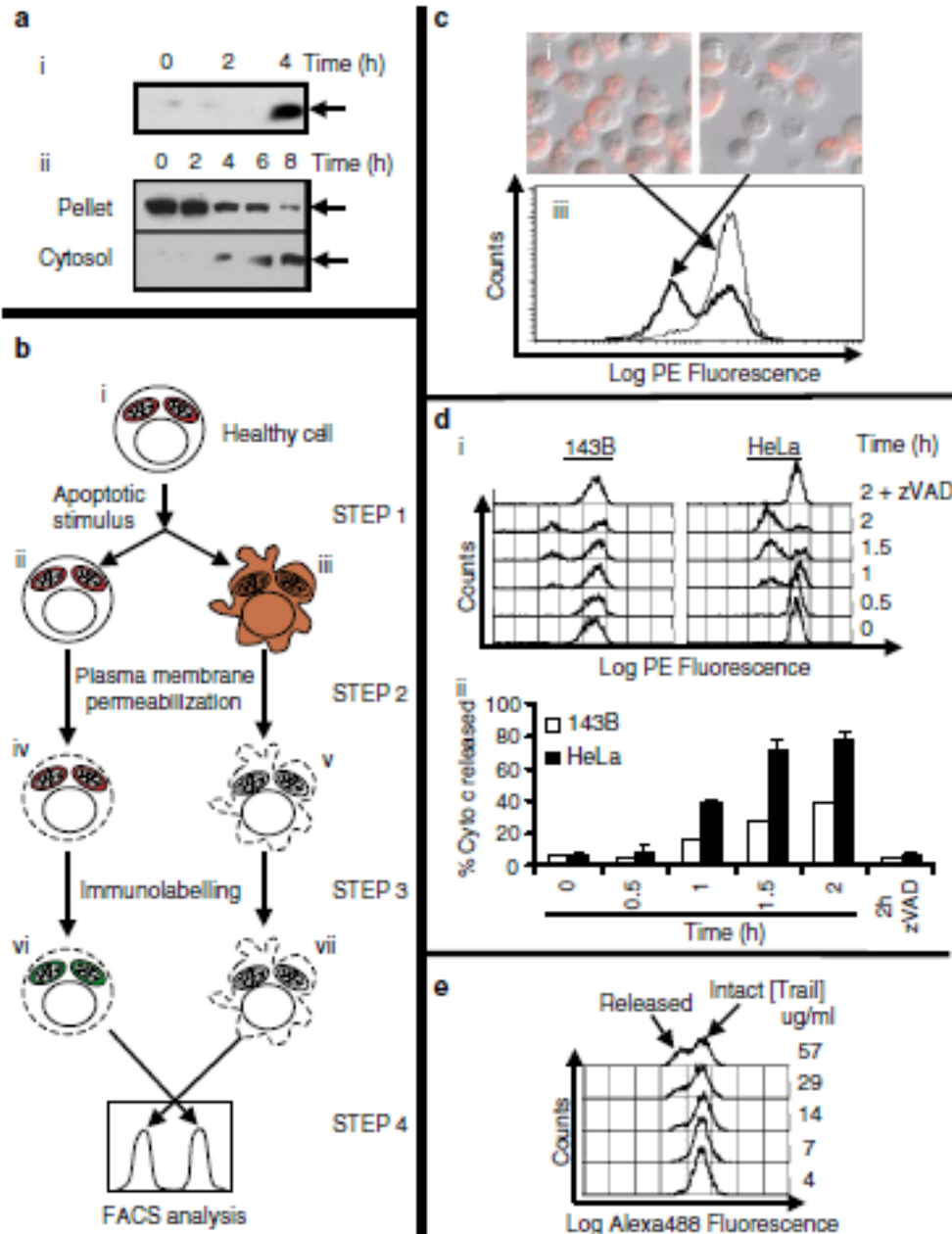


# Release of apoptogenic proteins from mitochondria

## Cytochrome c release

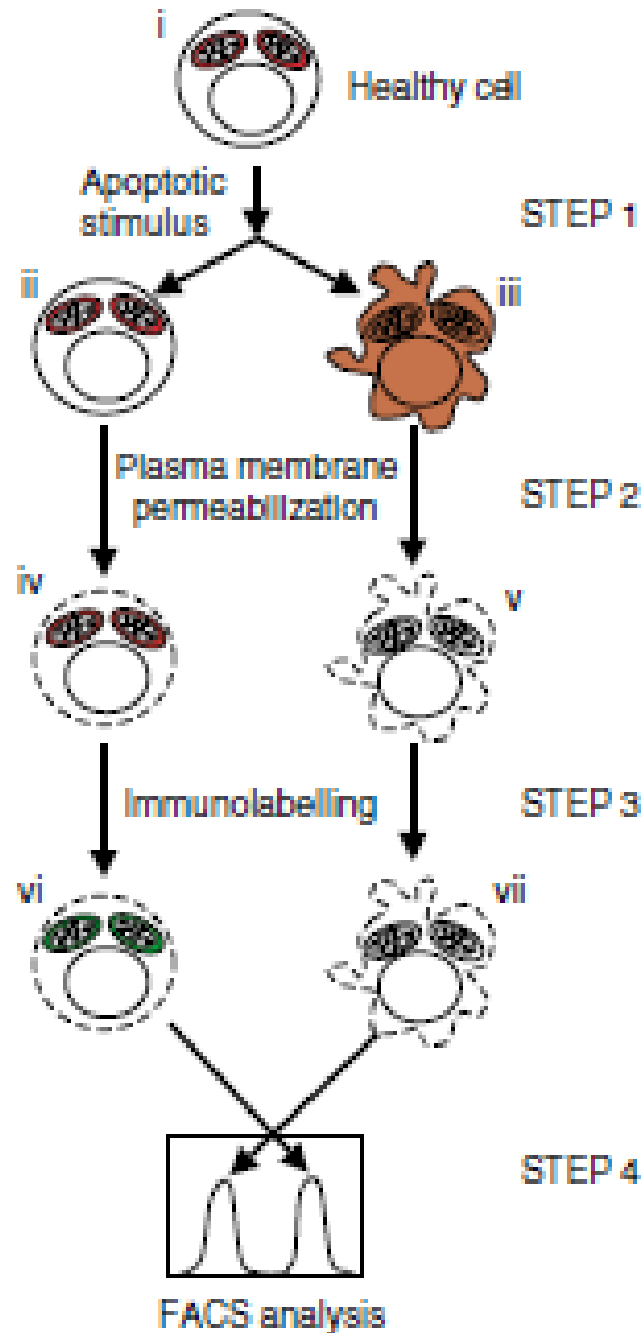
- Detection by antibodies specifically recognizing cytochrom c (mitochondrial and/or cytoplasmic)
  - **Flow cytometry**
    - Quantification of cells with released cyt c
  - **Western blotting**
    - Cellular fractionation, and immunodetection
  - **Fluorescence microscopy**
    - Visualisation of cytochrome c in the cytoplasm

# Cytochrom c release



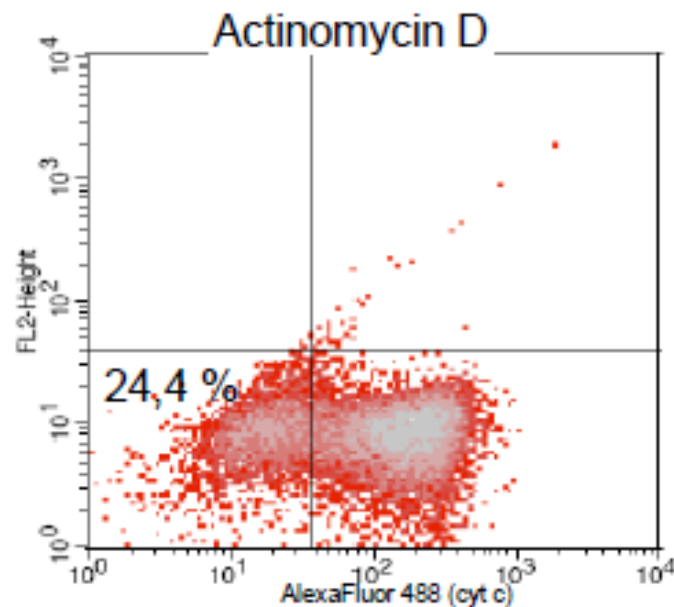
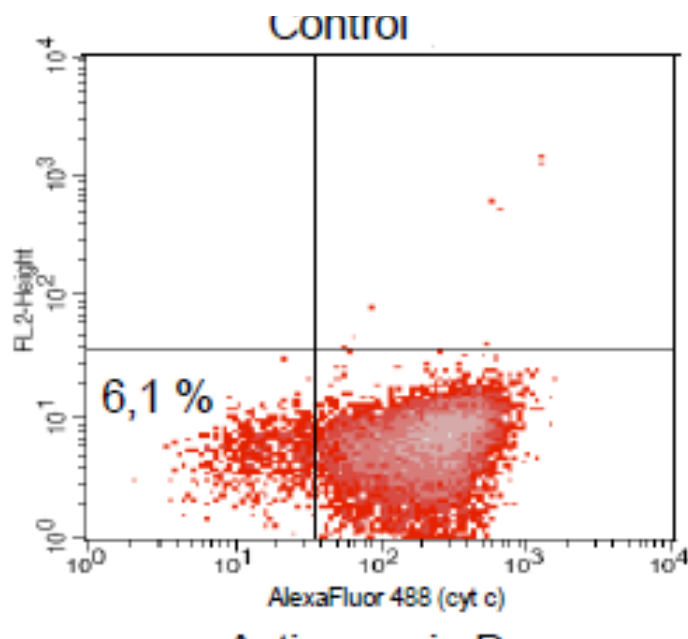
(Waterhouse,  
Trapani, 2003)

# Cytochrom c release



(Waterhouse,  
Trapani, 2003)

# Vylití cytochromu c z mitochondrií



SW620 cells, actinomycin D  
(30 ug/ml, 24 h)

Skender, Vaculova  
(unpublished data)

# Jakou metodu detekce apoptózy použít?

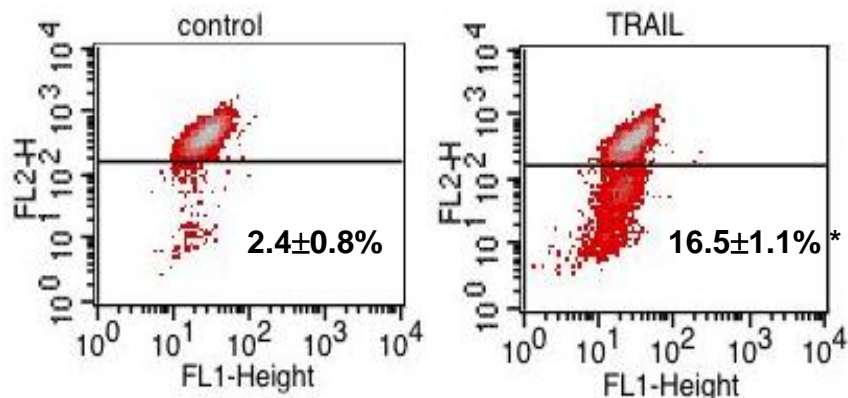
- **více než jednu**; nikdy nedělat celkové závěry postavené pouze na detekci jednoho parametru apoptózy
- **principiálně odlišnou** (např. aktivita kaspázy + jaderná morfologie)
- v závislosti na **buněčném typu** (např. detekce CK18 atd.)
- a **experimentálním zásahu** (koncentrace a doba působení studovaného induktoru apoptózy)

# Čemu dále věnovat pozornost při detekci apoptózy?

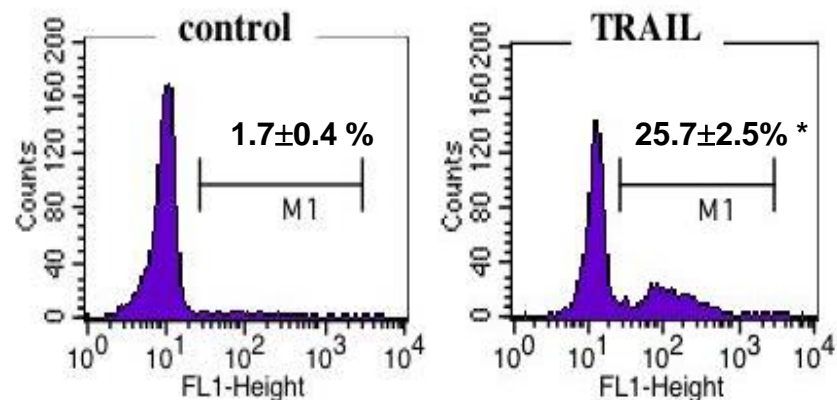
- Absolutní **počty (%)** apoptotických buněk se mohou lišit v závislosti na typu metody/parametru; je vždy nutné uvést, jaká metoda byla použita, nemluvit pouze obecně o % apoptotických buněk
- Správné **načasování** detekce - brát ohled na kinetiku buněčné smrti, homogenitu/(a)synchronizaci buněčné populace, stádia buněčné smrti atd.
  - doba trvání „časového okna“, kdy je možné zachytit určitý znak se liší (!)
    - u jednotlivých buněčných populací
    - v závislosti na induktoru buněčné smrti
    - v závislosti na konkrétním znaku který detekujeme (metodě)
- různé buňky ze stejné populace mohou umírat různým **způsobem smrti**
- *in vitro* vs. *in vivo*

# Apoptóza indukovaná TRAILem u buněk HT-29

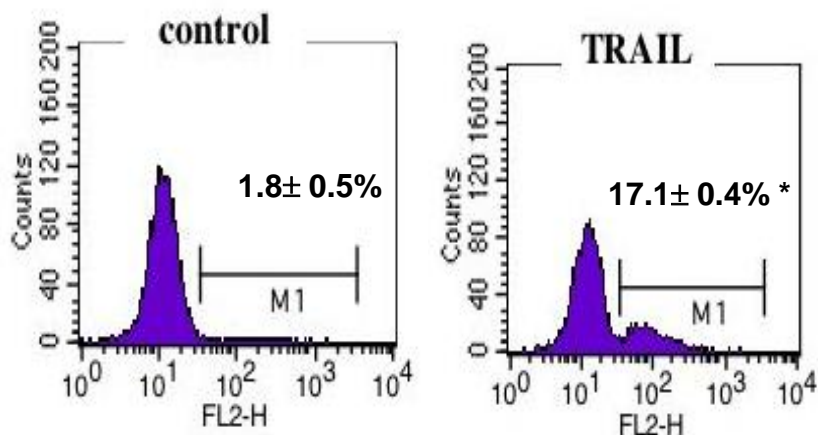
## MMP



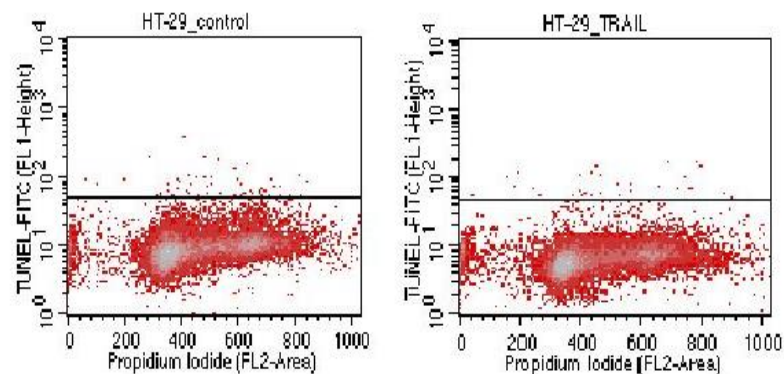
## Štěpení CK18



## Apo2.7



## TUNEL





## Modelový experiment:

### Srovnání vybraných metod detekce apoptózy

na zvoleném modelu nádorových buněk tlustého střeva HT-29 po treatmentu s TRAILem 100 ng/ml, 4h

	cytoskeleton and plasma membrane		mitochondria		nucleus	
Cells (%)	CK 18	PS	Apo2.7	MMP	TUNEL	DAPI
control	1.7	4.0	1.8	2.4	0.2	2.8
TRAIL	25.7	26.3	17.1	16.5	0.3	15.0

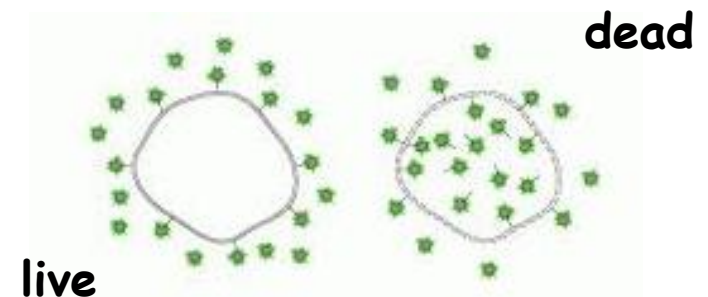
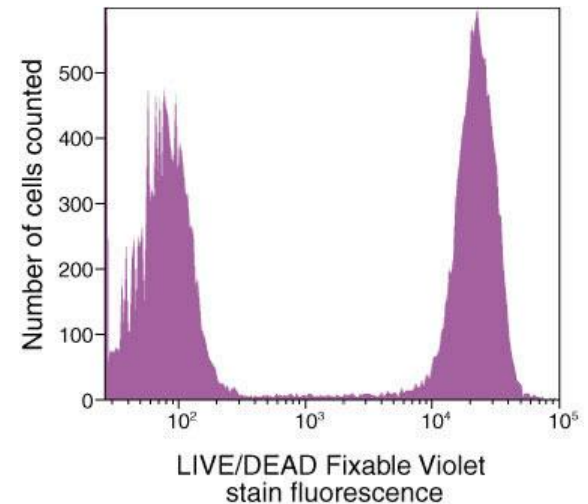
## Vícebarevné analýzy průtokové cytometrie

- Současná detekce několika parametrů apoptózy
- Ideální přístup pro komplexní studium buněčné smrti

## Live Dead Fixable dead cell stain kits (Invitrogen)

- react with cellular proteins (amines)
- cannot penetrate the intact cell membrane
  - live cells - stain only surface amines - dim staining
  - dead cells - stain both surface and intracellular amines - bright staining (>50-fold)
- covalent binding, well preserved, stable, resistant to following fixation and washing steps...
- multiple color available for major lasers, excellent for multicolor staining
- does not interfere with surface antibody binding
- do not use with BSA...

Thermo Fisher Scientific



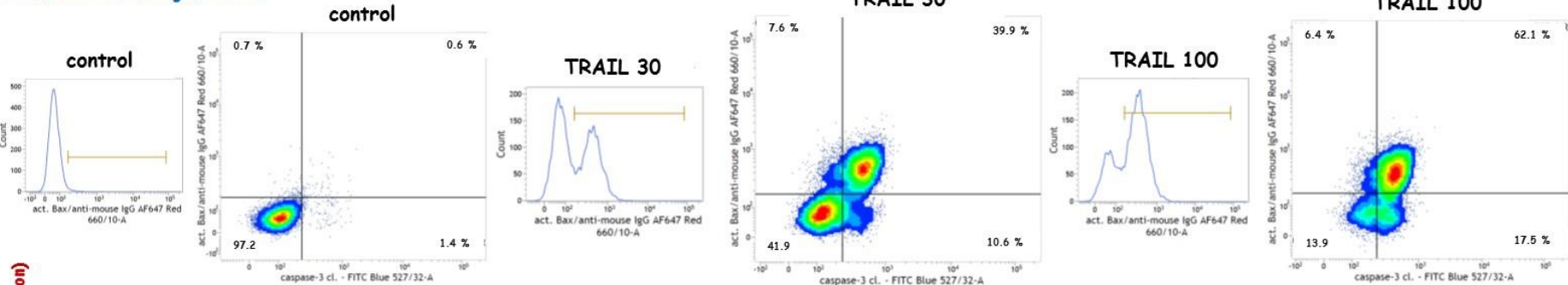
## Simultaneous flow cytometry detection of:

- **caspase-3 cleavage** (anti-cleaved caspase-3 Ab)
- **Bax activation** (anti-active Bax Ab)
- **viability** (Live/Dead Violet)

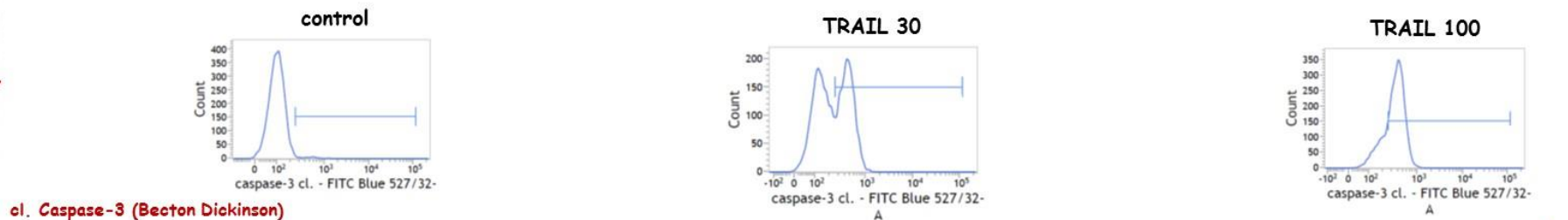


- Live/Dead (Violet)
- Caspase-3 (FITC)
- Active Bax (AF647)

Live/Dead Violet-negative cells



Act. Bax (Becton Dickinson)



cl. Caspase-3 (Becton Dickinson)

FACSVerse

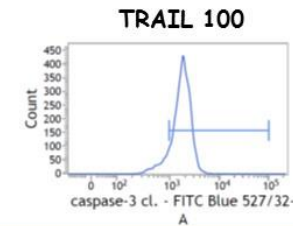
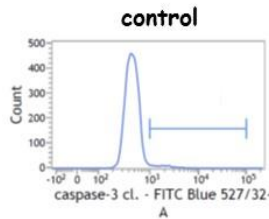
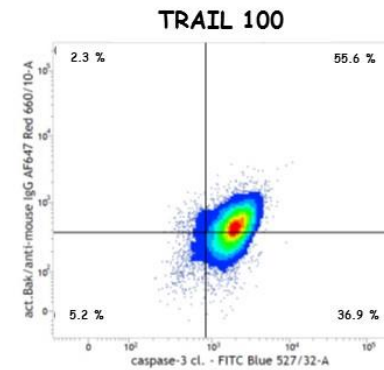
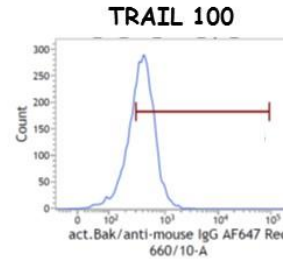
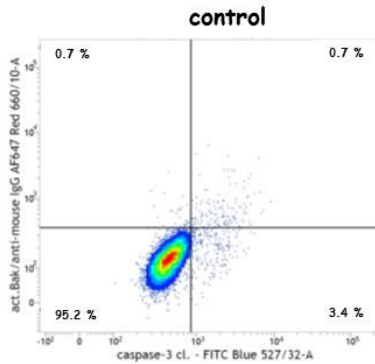
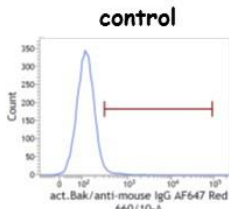
Simultaneous flow cytometry detection of:

- caspase-3 cleavage (anti-cleaved caspase-3 Ab)
- Bak activation (anti-active Bak Ab)
- viability (Live/Dead Violet)



Live/Dead (Violet)  
 Caspase-3 (FITC)  
 Active Bak (AF647)

Live/Dead Violet-negative cells



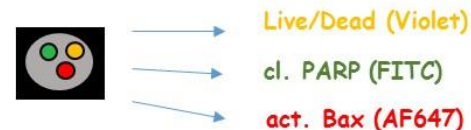
cl. caspase-3 (Becton Dickinson)

active Bak (Calbiochem)

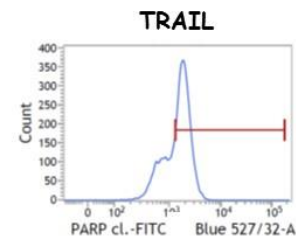
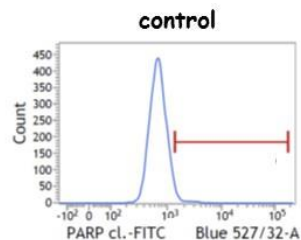
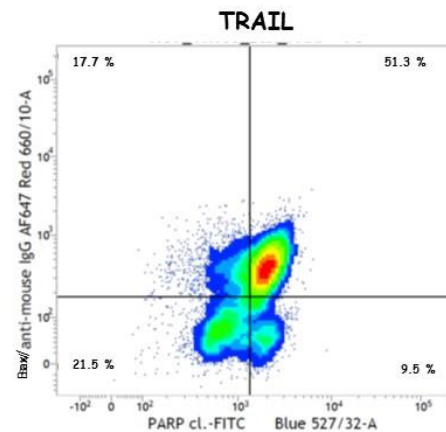
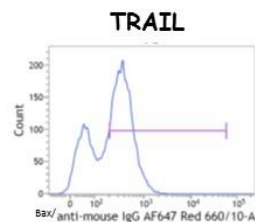
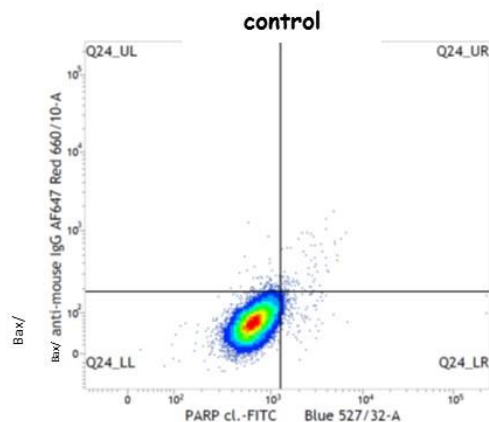
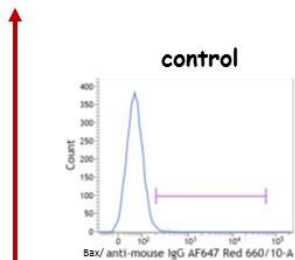
FACSVerse

## Simultaneous flow cytometry detection of:

- **PARP cleavage** (anti-cleaved PARP Ab)
- **Bax activation** (anti-active Bax Ab)
- **viability** (Live/Dead Violet)



Live/Dead Violet-negative cells



Act. Bax (Becton Dickinson)

cl. PARP (Biosource)

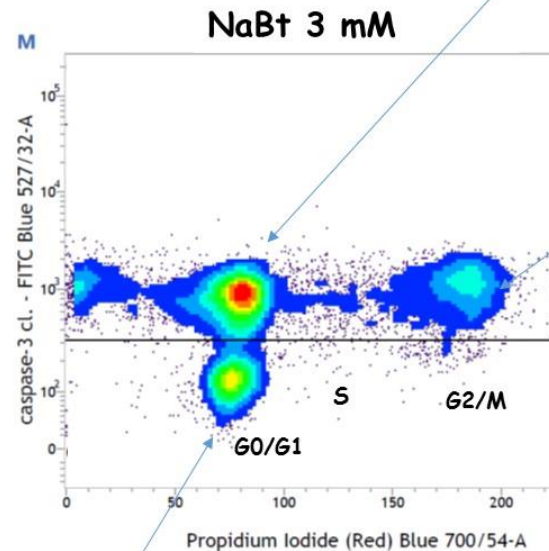
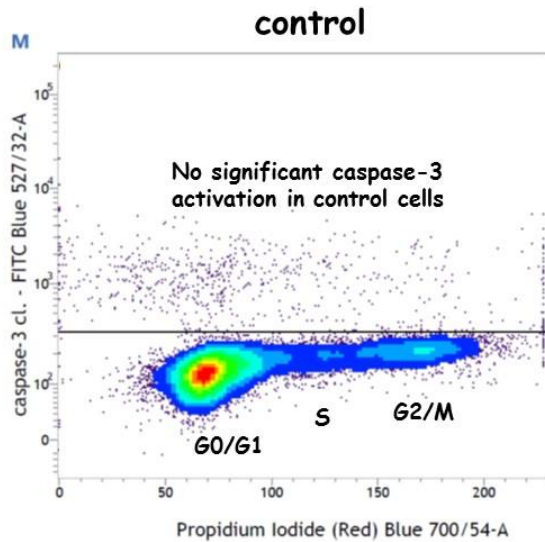
FACSVerse

Simultaneous flow cytometry detection of:

- caspase-3 cleavage (anti-cleaved caspase-3 Ab)
- cell cycle distribution (propidium iodide)



→ cl. caspase-3 (FITC)  
→ cell cycle (PI)



HT-29 cells

Cells in G1-phase, with inactive caspase-3



Does apoptosis preferentially occur in cells in particular cell cycle phase?

cl. caspase-3 (Becton Dickinson)

DNA content (PI)

FACSVerse

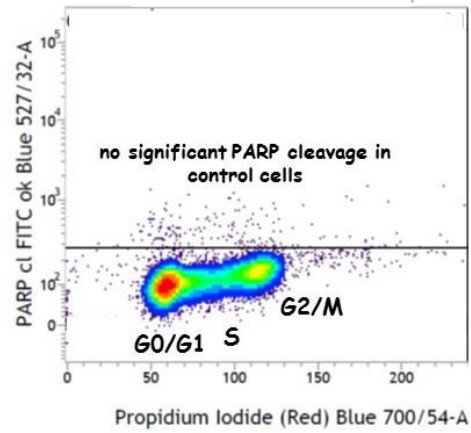
Simultaneous flow cytometry detection of:

- PARP cleavage (anti-cleaved PARP Ab)
- cell cycle progression (propidium iodide)



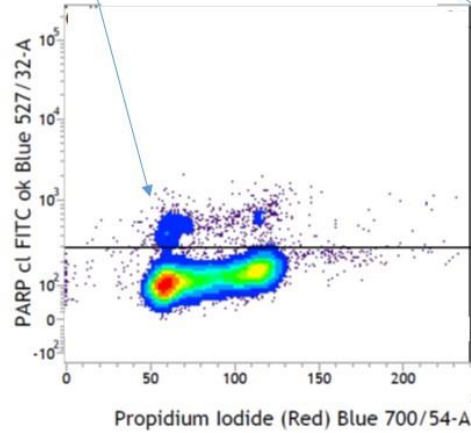
HCT116 cells

control



Cells in G0/G1-phase, with cleaved PARP

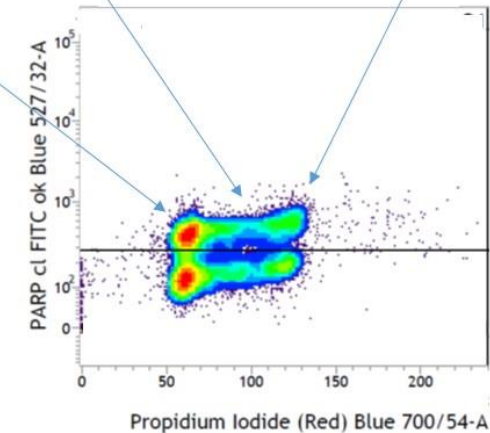
TRAIL 30



Cells in S-phase, with cleaved PARP

Cells in G2/M-phase, with cleaved PARP

TRAIL 100



cl. PARP (Biosource)

DNA content (PI)



Does apoptosis preferentially occur in cells in particular cell cycle phase?

FACSVerse



# Shrnutí přednášky

Z dnešní přednášky byste měli vědět:

- jaké jsou hlavní charakteristiky procesu apoptózy a jak je lze využít při detekci specifických parametrů apoptózy
- jakým způsobem detekovat apoptózu na průtokovém cytometru na různých úrovních v buňce:  
změny na úrovni kaspáz, membrány, jádra, mitochondrií
- principy, výhody a limitace jednotlivých metod
- jakými kritérii se řídit při výběru metod detekce apoptózy a interpretaci získaných výsledků
- konkrétní příklady vícebarevných analýz - současná detekce několika parametrů apoptózy na průtokovém cytometru (+ jejich výhody)

# Děkuji za pozornost!

Vaše případné dotazy směřujte na adresu:

[vaculova@ibp.cz](mailto:vaculova@ibp.cz)

RNDr. Alena Hyršlová Vaculová, Ph.D.  
Oddělení cytokinetiky  
Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.  
Královopolská 135  
612 65 Brno