



FONDAZIONE IRCCS
ISTITUTO NAZIONALE
DEI TUMORI



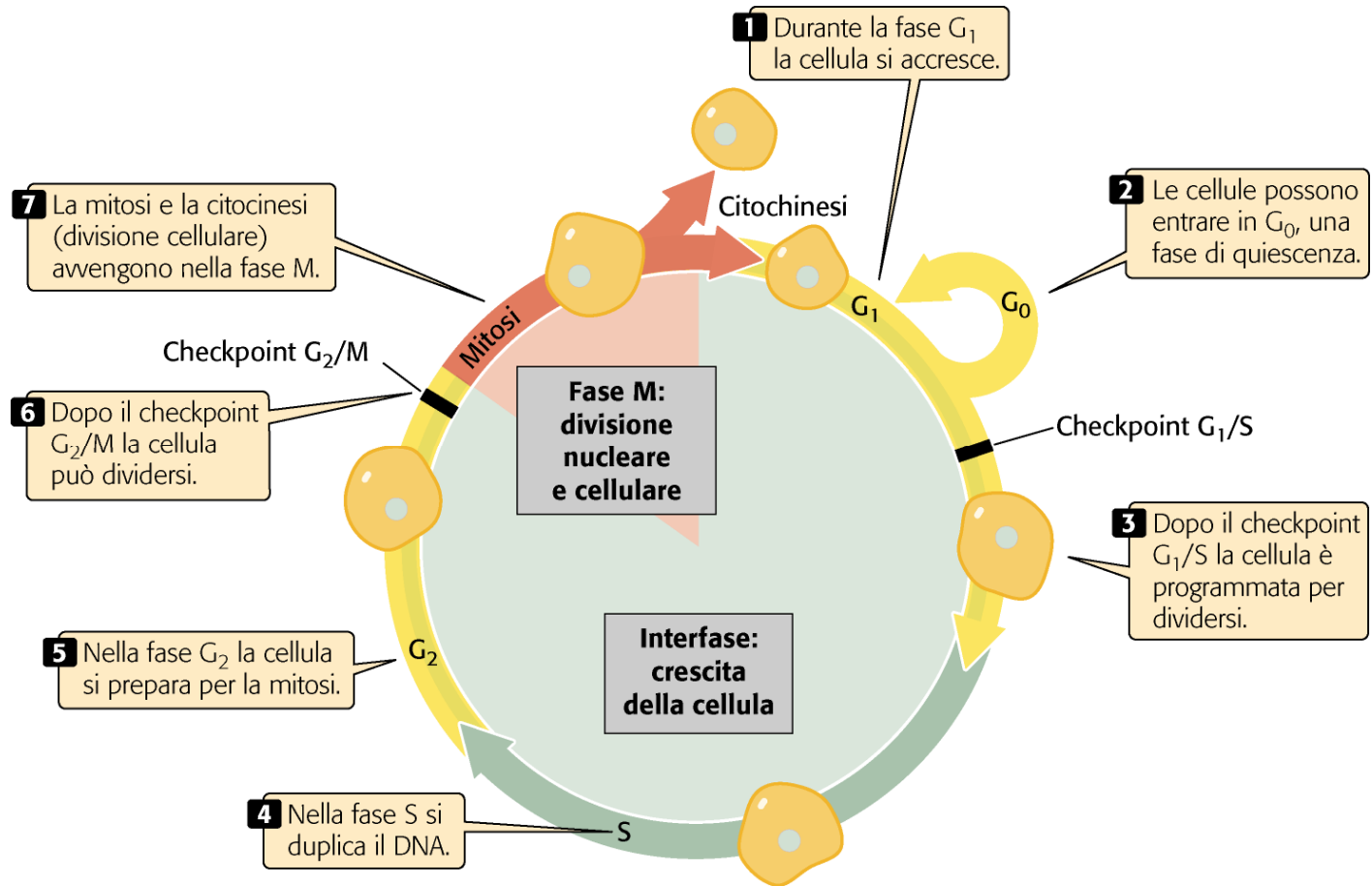
Applicazioni della citometria a flusso nel laboratorio di ricerca: Corso teorico-metodologico

17-18 Ottobre 2007

Ciclo cellulare - Contenuto di DNA - Apoptosi

Delia Mezzanzanica

Il ciclo cellulare

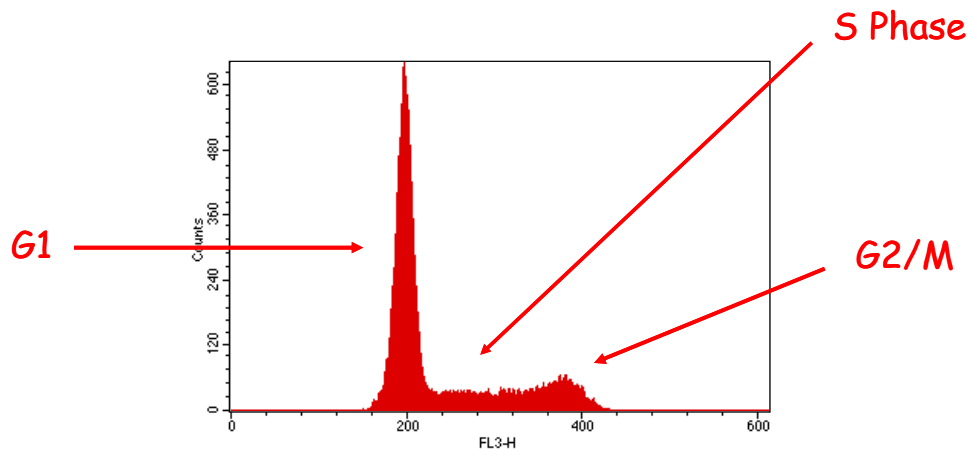


Analisi del ciclo cellulare in citofluorimetria mediante marcatura con propidio Ioduro

Il Propidio Ioduro (PI) si lega al DNA in modo proporzionale alla quantità di DNA presente. Non è in grado di permeare la membrana cellulare, per valutare il contenuto di DNA è pertanto necessario permeabilizzare le cellule.

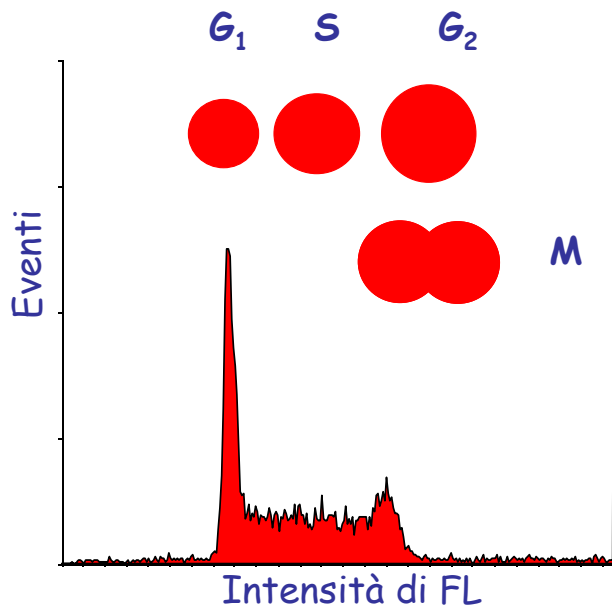
La permeabilizzazione può essere effettuata con:

- Alcool o acetone
- Detergenti: nel caso si utilizzino detergenti è meglio farlo in presenza di proteine esogene (1% albumina o 10% siero) che proteggono i campioni da una lisi eccessiva.
- Tamponi ipotonici: il loro utilizzo può isolare frammenti nucleari in grado di interferire con l'interpretazione del dato.

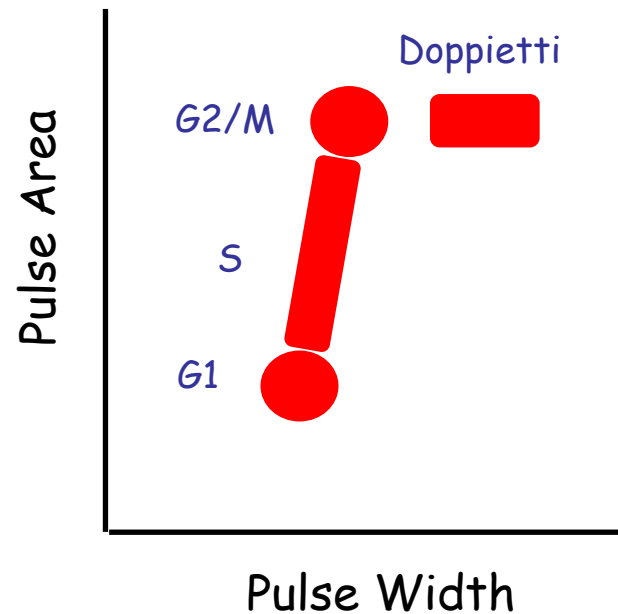


La lettura va fatta in scala lineare in canale FL2 o FL3

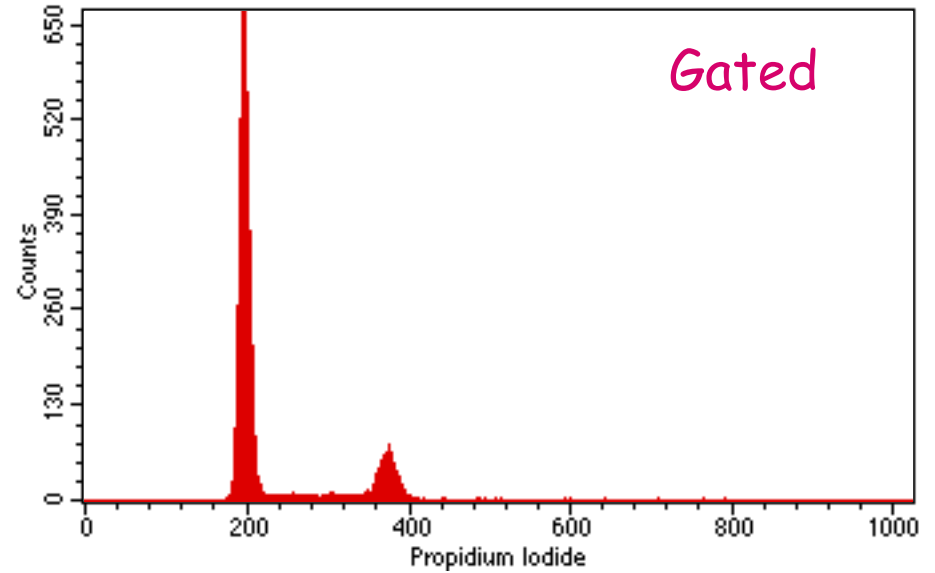
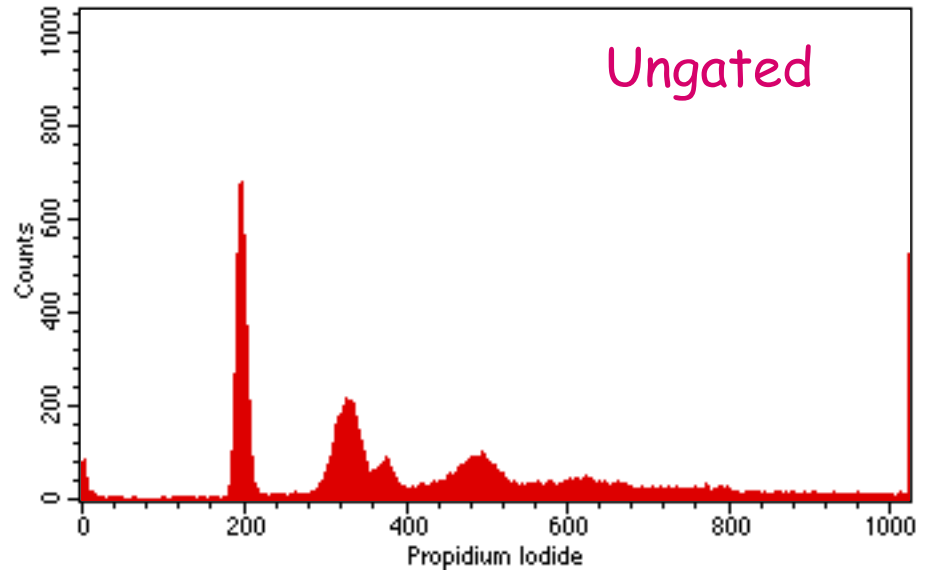
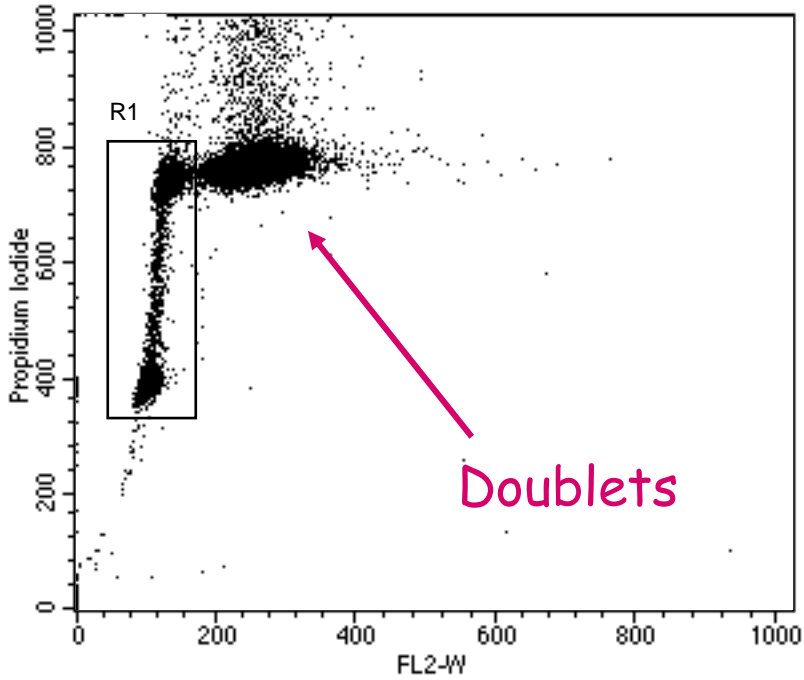
Un pre requisito fondamentale per l'analisi del ciclo cellulare in citofluorimetria è che le cellule siano in sospensione singola, i clumps possono alterare la valutazione del ciclo.



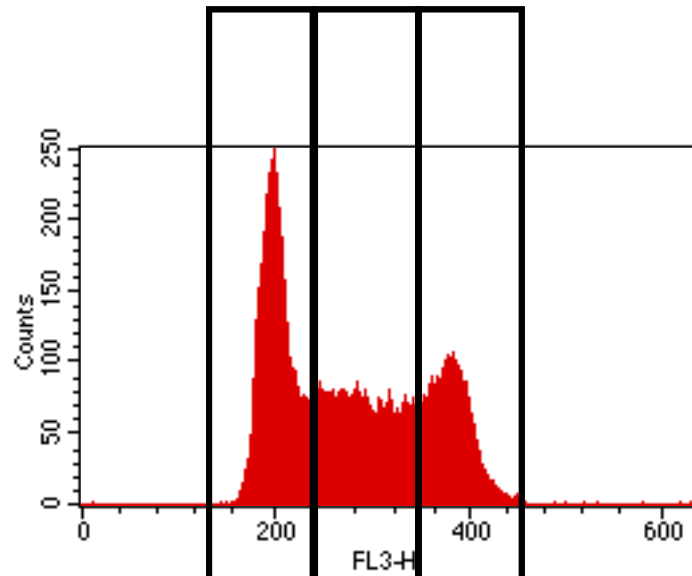
Due cellule appaiate, potrebbero essere interpretate come una cellula in fase G_2 o in fase M. I doppietti cellulari devono quindi essere esclusi dall'analisi del ciclo valutando l'ampiezza del segnale: cellule appaiate hanno un'ampiezza di segnale più ampia di una singola cellula a doppio contenuto di DNA in quanto impiegano più tempo ad attraversare il laser.



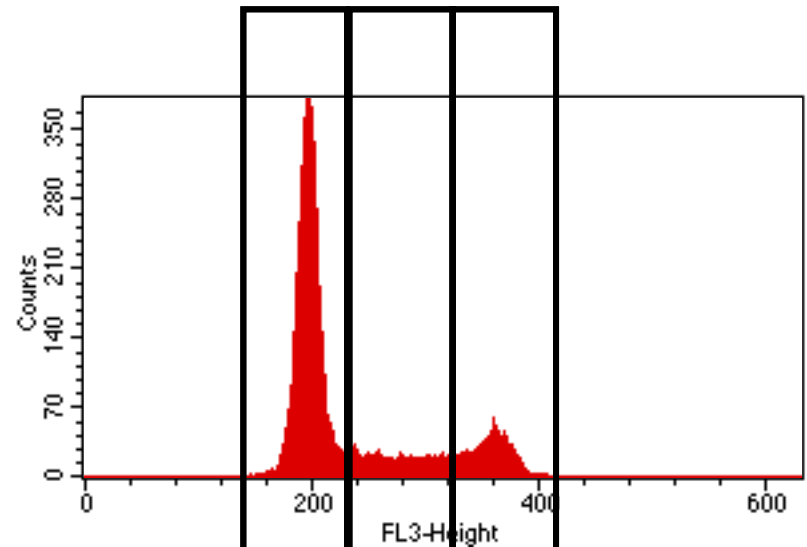
I doppietti vanno rimossi dall'analisi



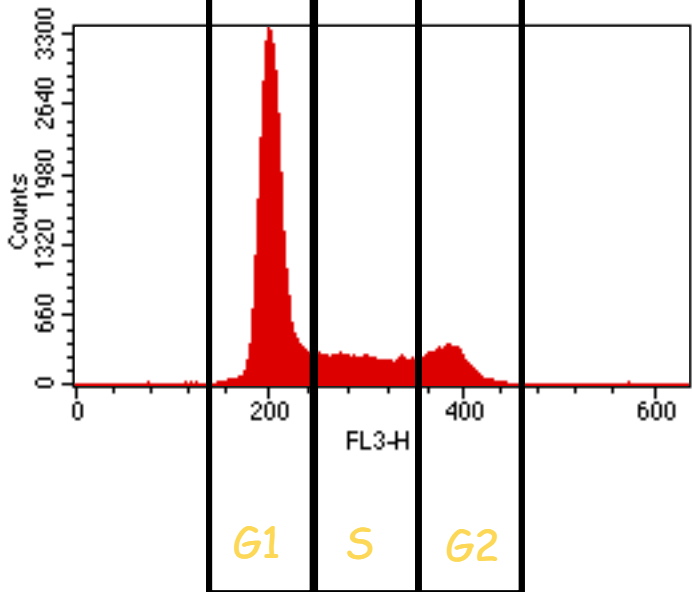
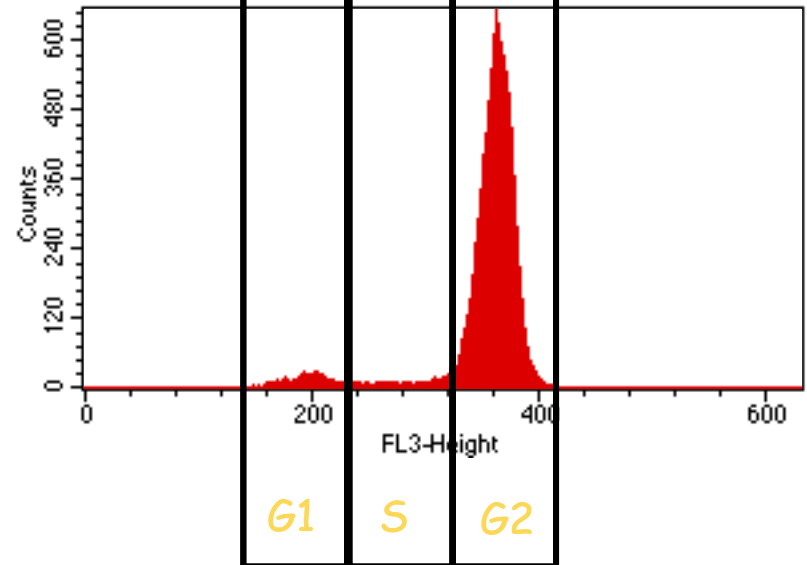
E' possibile quantificare la percentuale di cellule in ogni fase del ciclo cellulare e monitorare l'effetto di un trattamento.



Giorno 1



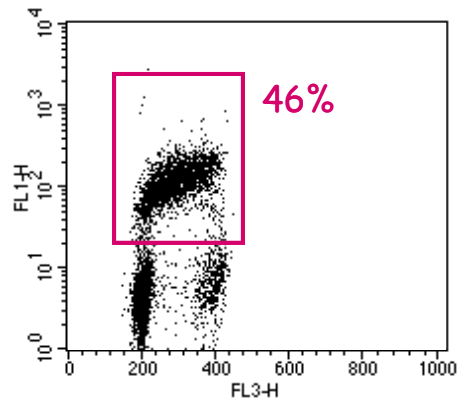
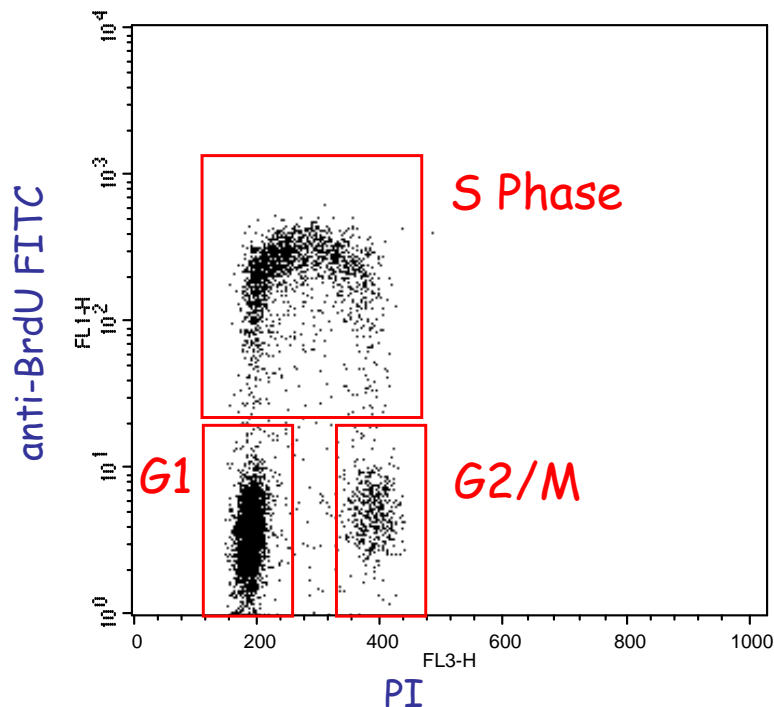
Giorno 3



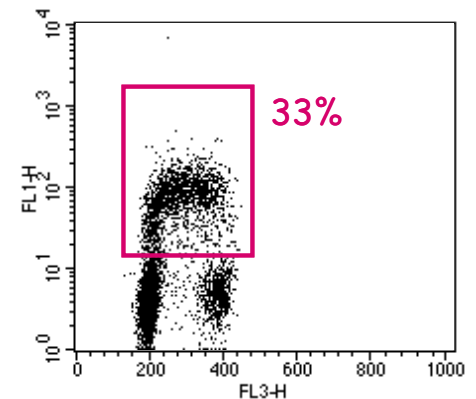
L'analisi del ciclo cellulare con PI dà informazioni "statiche"

Analisi con - Bromodeoxyuridine (BrdU)

- La BrdU viene incorporata solo dalle cellule in proliferazione e marca in particolare le cellule in fase S
- Dopo incorporazione le cellule vengono fissate, il DNA denaturato e la BrdU incorporata viene rilevata con un anticorpo anti-BrdU fluorescinato
- L'analisi di incorporazione di BrdU può essere combinata con l'incorporazione di PI



Non trattate



trattate

L'Apoptosi è un processo di morte cellulare programmata con particolari caratteristiche morfologiche: è coinvolta in numerosi processi fisiologici e patologici.

➤ **Processi fisiologici:**

controllo dell'omeostasi tissutale
sviluppo embrionale
ricambio tissutale
selezione negativa nel sistema immunitario
risposta immune cellulo-mediata
risposta ad agenti tossici (chemioterapici)

➤ **Processi patologici:**

viene attivata nelle:

- infezioni virali (AIDS)
- malattie neurodegenerative (Alzheimer)
- malattie autoimmuni (Artrite reumatoide)
- patologie ematiche (anemie)

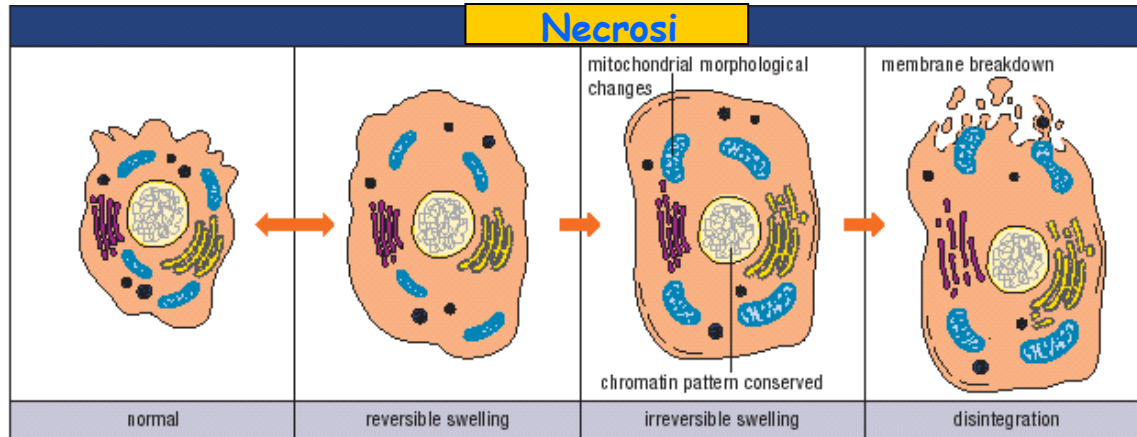
viene disattivata nei:

- processi di carcinogenesi
- resistenza a chemioterapici
- resistenza a risposta immune

Meccanismi di morte cellulare

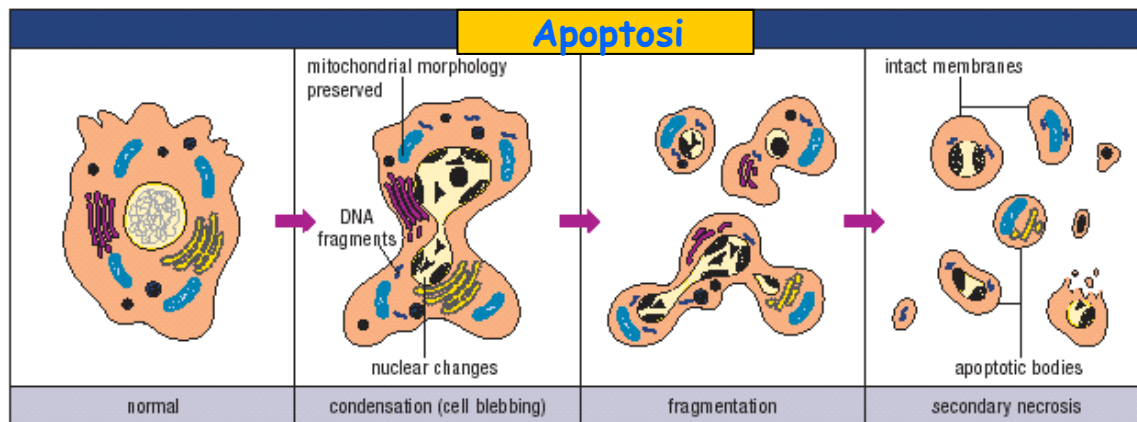
Perdita della capacità omeostatica:
Assorbimento di acqua e ioni,
aumento delle dimensioni cellulari e
mitocondriali, dissoluzione nucleare

Necrosi



Rottura della membrana Plasmatica, rilascio di enzimi proteolitici che provocano Infiammazione

Apoptosi



Si formano i corpi apoptotici che vengono fagocitati dalle cellule vicine senza provocare infiammazione

Disidratazione cellulare e condensazione del citoplasma, condensazione nucleare e frammentazione del DNA

Variazioni morfologiche biochimiche e funzionali nel processo apoptotico

Caratteristiche morfologiche:

- ✓ Diminuzione delle dimensioni cellulari per condensazione citoplasmatica
- ✓ Mantenimento degli organelli
- ✓ Mantenimento dell'integrità di membrana
- ✓ Condensazione nucleare
- ✓ Formazione di corpi apoptotici

Caratteristiche biochimiche:

- ✓ Alterazione della simmetria di membrana
- ✓ processo energia -dipendente
- ✓ rilascio di citocromo-c nel citoplasma per alterazione mitocondriale
- ✓ attivazione delle caspasi
- ✓ taglio di substrati nucleari
- ✓ regolare frammentazione del DNA

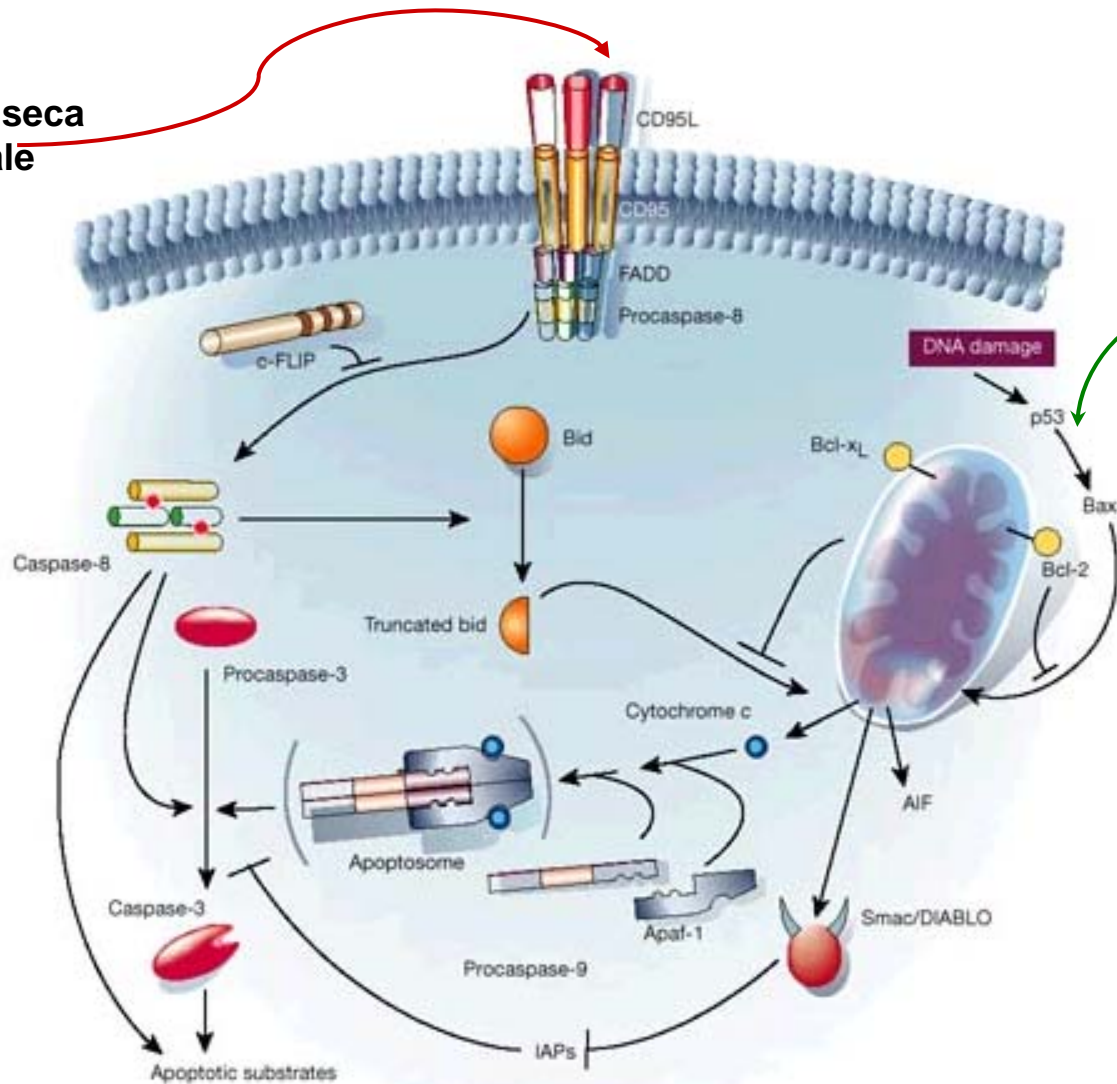
Caratteristiche funzionali:

- ✓ causata da processi fisiologici (deprivazione di fattori di crescita)
- ✓ non induce risposta infiammatoria

Cascata del segnale apoptotico

Via estrinseca recettoriale

Via intrinseca mitocondriale



Modificazioni morfologiche e biochimico-funzionali

- **Modificazione delle dimensioni cellulari:** la condensazione citoplasmatica provoca una contrazione cellulare.
- **Modificazioni della membrana plasmatica:** cambia la distribuzione dei fosfolipidi di membrana. Durante lo stimolo apoptotico la fosfatidilserina (PS) trasloca dalla parte citoplasmatica alla parte extracellulare della membrana plasmatica.
- **Distruzione della fisiologia mitocondriale:** depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale e alterazione della permeabilità della membrana mitocondriale esterna con conseguente rilascio di citocromo-c nel citosol.
- **Modificazioni citoplasmatiche:** il rilascio di citocromo-c dai mitocondri provoca l'attivazione delle caspasi in grado di tagliare diversi substrati citoplasmatici e nucleari.
- **Modificazioni nucleari:** la firma biochimica dell'apoptosi è la regolare frammentazione del DNA dovuta al taglio fra le unità nucleosomali.

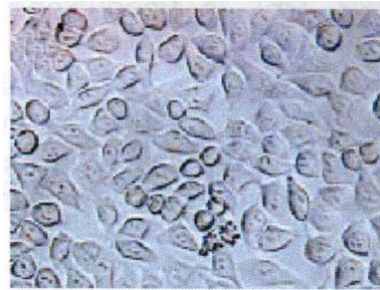
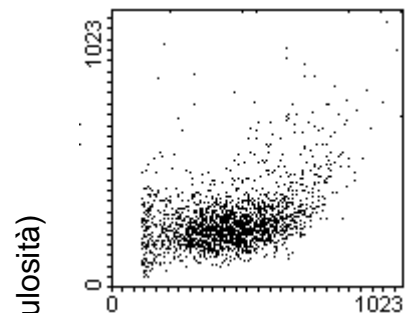
Valutazione dell'apoptosi su linee cellulari che crescono in adesione

Per qualsiasi test si intenda utilizzare va tenuto in considerazione il modello cellulare con cui si lavora.

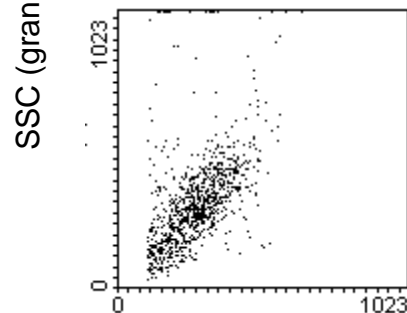
- Cellule che crescono in sospensione, come le linfoidei, danno in genere pochi problemi e dati molto ben interpretabili.
- Nel caso si lavori con linee cellulari che crescono adese (carcinomi) è necessario ricordare che sotto stimolo apoptotico parecchie cellule si staccheranno dal substrato solido. Le cellule in sospensione saranno con più probabilità quelle apoptotiche. È importante quindi recuperare queste cellule prima del distacco delle adese e includerle nella valutazione.

Modificazione delle dimensioni cellulari: condensazione citoplasmatica

La condensazione citoplasmatica provoca una modificazione dei parametri fisici valutati in citofluorimetria. Le cellule appaiono più piccole (riduzione di FSC) e più granulose (aumento di SSC) a causa del cambio dell'indice di rifrazione citoplasmatico.



Cellule normali



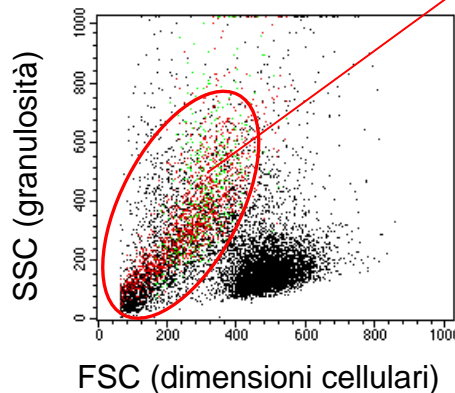
Cellule sotto
stimolo apoptotico

FSC (dimensioni cellulari)

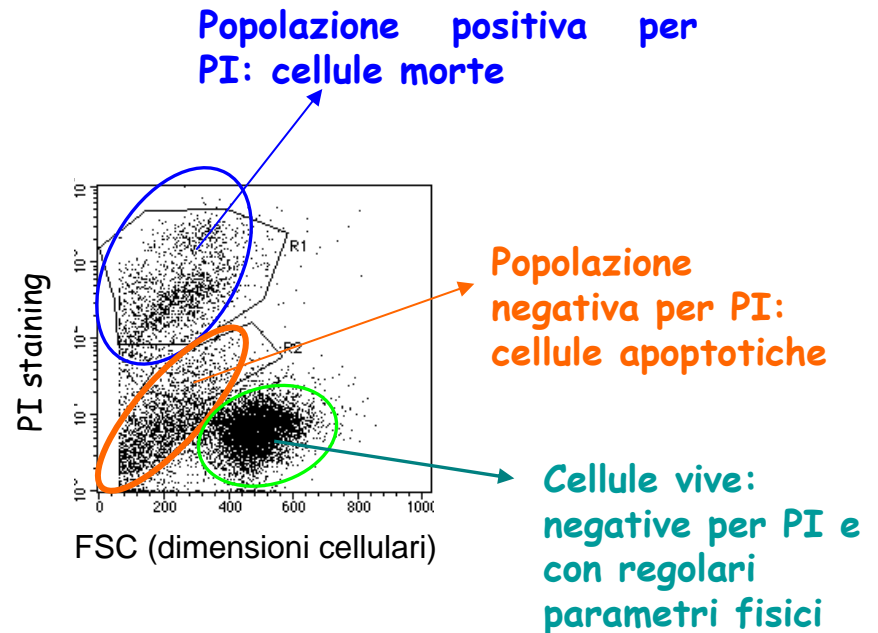
Valutazione della condensazione citoplasmatica e della permeabilità di membrana

Durante le fasi tardive dell'apoptosi si ha la compromissione dell'integrità della membrana plasmatica. Utilizzando un colorante nucleare come lo Ioduro di Propidio (PI) capace di penetrare solo in cellule con membrana plasmatica compromessa è possibile discriminare questa popolazione di cellule. E' arbitrariamente possibile anche individuare una popolazione intermedia definibile come "apoptotica". Questo metodo è assolutamente aspecifico, ma è utile nel dare veloci indicazioni sul potenziale apoptotico di un dato stimolo.

Parametri fisici



Popolazione con parametri fisici modificati a causa della condensazione citoplasmatica



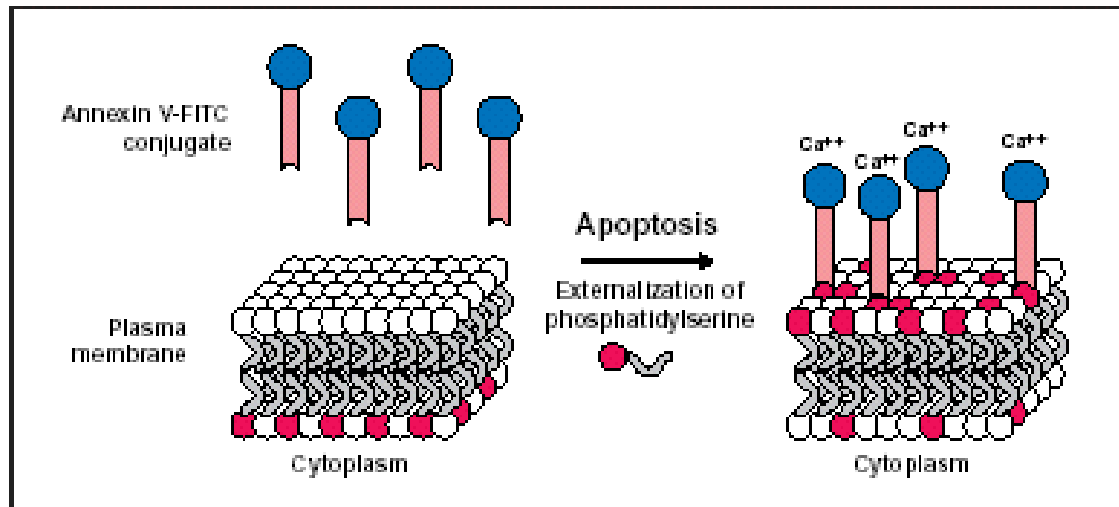
Popolazione positiva per PI: cellule morte

Popolazione negativa per PI: cellule apoptotiche

Cellule vive: negative per PI e con regolari parametri fisici

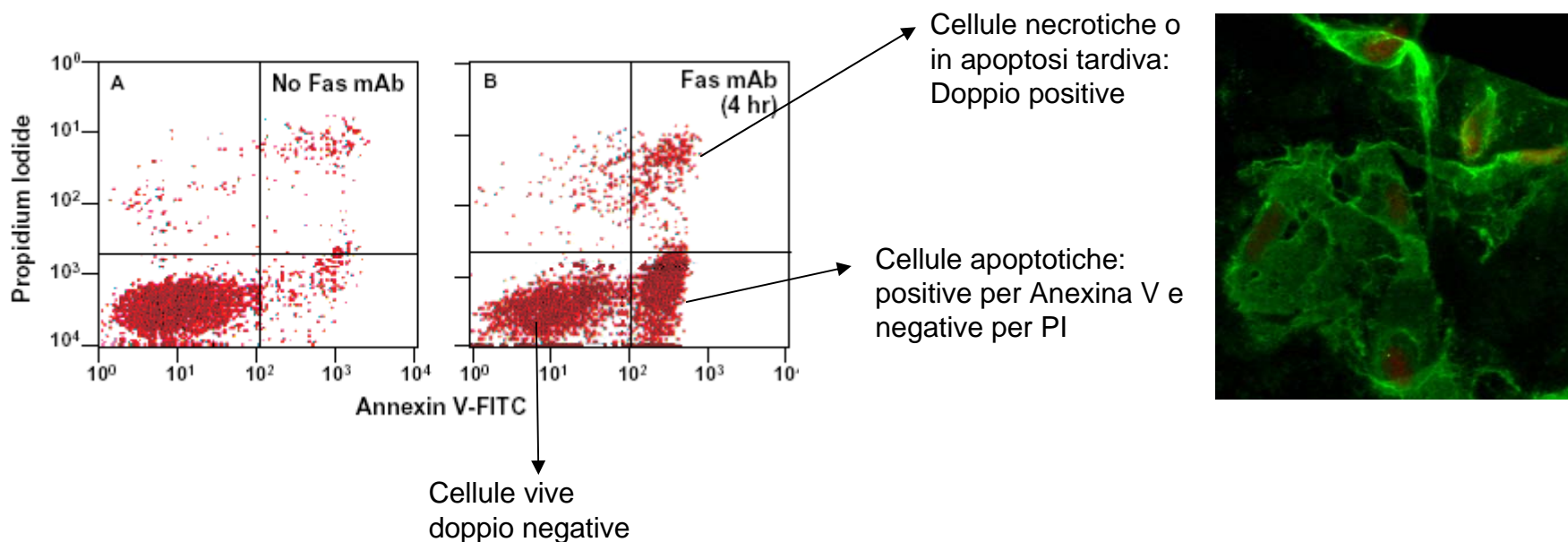
Modificazioni della membrana plasmatica: esposizione di fosfatidilserina (PS).

Anexina V è una proteina che, in presenza di Ca^{++} , lega PS con affinità molto elevata. Le cellule normali, in cui PS è rivolta al citoplasma, non legheranno Anexina V; le cellule in apoptosi, con i residui di PS rivolti all'esterno, la legheranno. La coniugazione di Anexina V con fluorocromi quali FITC permette l'identificazione, in citofluorimetria o in microscopia, di cellule apoptotiche.

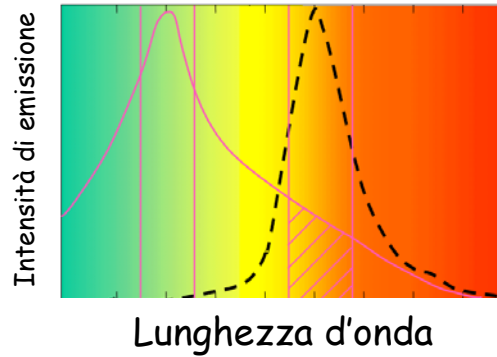


Valutazione di cellule marcate con Anexina V

La contemporanea marcatura delle cellule con Anexina V e coloranti vitali quali lo Ioduro di Propidio (PI) permetterà di discriminare, in fluorescenza doppia, fra cellule in apoptosi (con membrana integra negative per PI) o in necrosi (membrana danneggiata positive per PI).



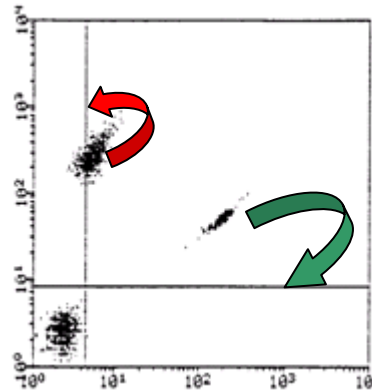
Settaggio della compensazione di fluorescenza



I fluorocromi che si utilizzano in citometria per le analisi in fluorescenza doppia (es. FL1-FL2) non hanno spettri di emissione completamente separati. La zona di emissione sovrapposta deve essere "compensata" per la corretta interpretazione dei dati

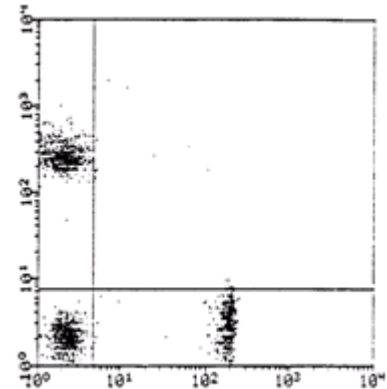
FL1-%FL2: questa compensazione sposterà la popolazione marcata con il solo fluorocromo "rosso" fuori dal campo di positività del fluorocromo "verde"

Campione non compensato



FL2-%FL1: questa compensazione sposterà la popolazione marcata con il solo fluorocromo "verde" fuori dal campo di positività del fluorocromo "rosso"

Campione correttamente compensato



Vantaggi e svantaggi dell'utilizzo di Annexina V

Vantaggi:

- ✓ metodica semplice e rapida
- ✓ non richiede fissazione
- ✓ permette di studiare stadi precoci di apoptosi
- ✓ permette di distinguere l'apoptosi dalla necrosi
- ✓ interpretazione molto chiara su cellule in sospensione

Svantaggi:

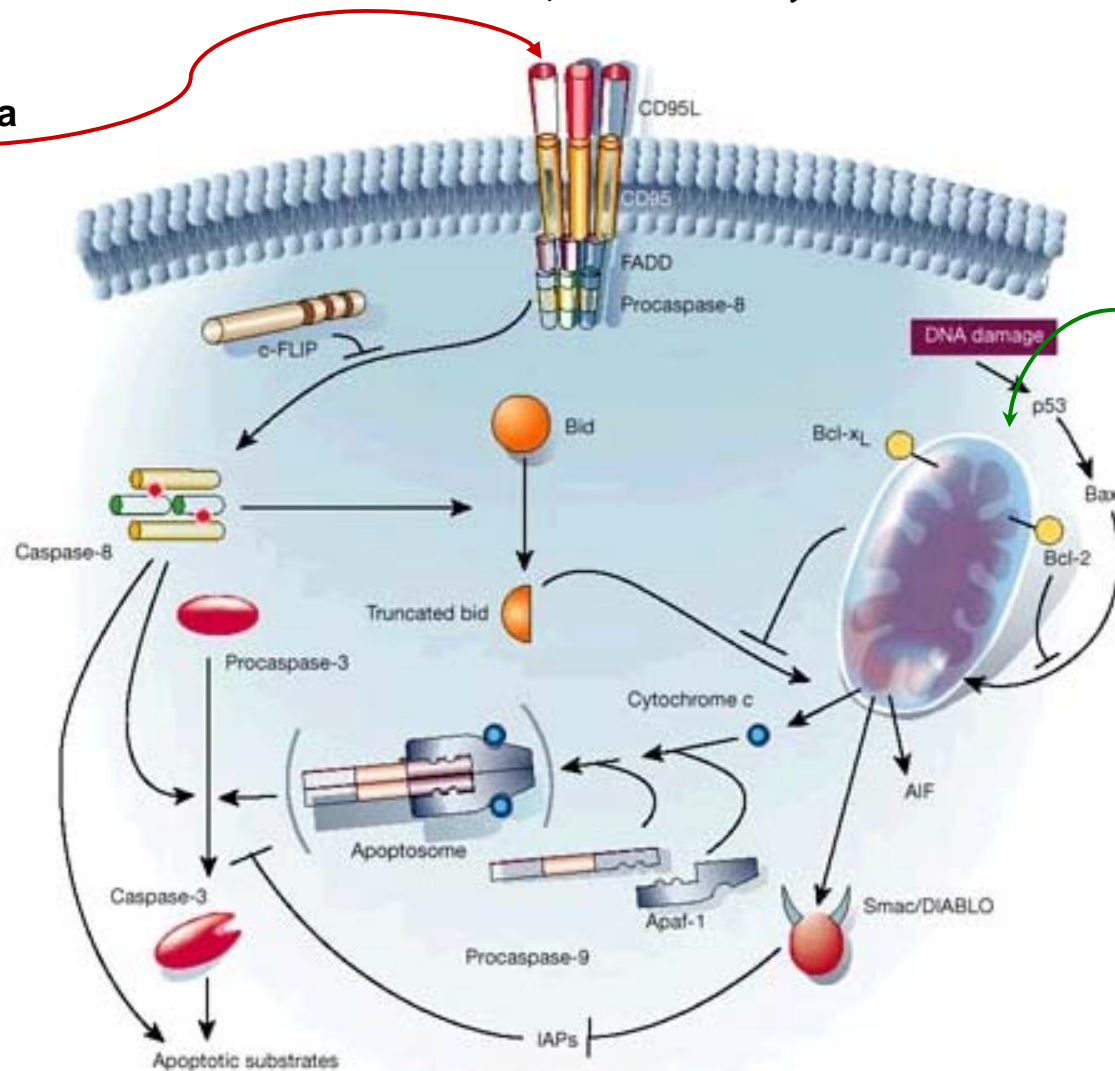
- ✓ non facile interpretazione su tumori solidi con crescita in adesione
- ✓ è necessario il settaggio di una doppia fluorescenza
- ✓ la concentrazione di PI deve essere ben calibrata (non oltre $2\mu\text{g/ml}$) soprattutto per la microscopia

Il coinvolgimento mitocondriale

I mitocondri vengono coinvolti nel fenomeno apoptotico sia in seguito a stimoli recettoriali che intrinseci (deprivazione di fattori di crescita, farmaci, radiazioni).

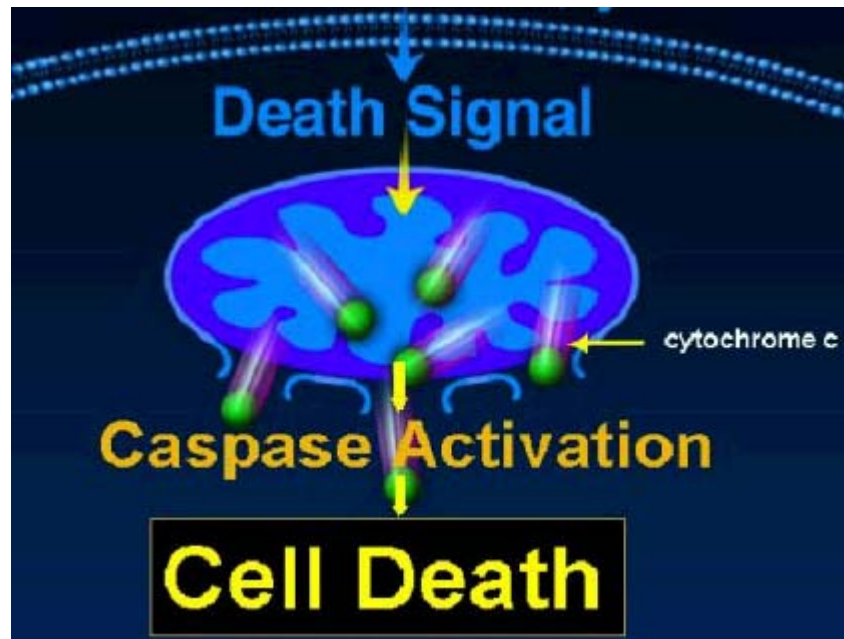
Via estrinseca recettoriale

Via intrinseca mitocondriale



Distruzione della fisiologia mitocondriale.

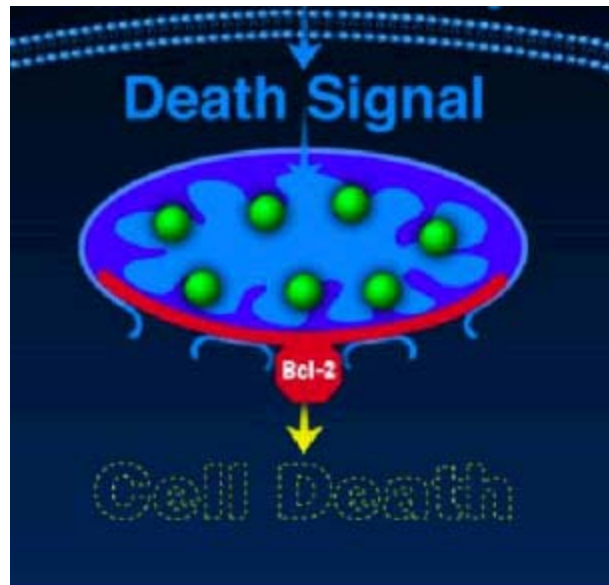
I mitocondri vengono coinvolti nel fenomeno apoptotico sia in seguito a stimoli recettoriali che intrinseci (deprivazione di fattori di crescita, farmaci, radiazioni) mediante depolarizzazione di membrana e alterata permeabilità della membrana esterna con conseguente rilascio di citocromo-c nel citosol.



Molecole coinvolte nel controllo mitocondriale dell'apoptosi

Membri della famiglia di Bcl-2

- **Pro-apoptotici:** Bax, Bak la loro oligomerizzazione permette il rilascio di citocromo-c
- **Anti-apoptotici:** Bcl-2, Bcl-X_L sono in grado di bloccare il rilascio di citocromo-c inibendo la cascata apoptotica che segue



Valutazione delle variazioni del potenziale di membrana mitocondriale

La caduta del potenziale di membrana mitocondriale è uno degli eventi precoci della cascata apoptotica ed è un evento reversibile.

Questo fenomeno causa un aumento della permeabilità della membrana con conseguente rilascio di molecole quali il citocromo-c. Il potenziale della membrana mitocondriale è garantito dalla catena respiratoria mitocondriale che produce energia gestita come gradiente elettrochimico.

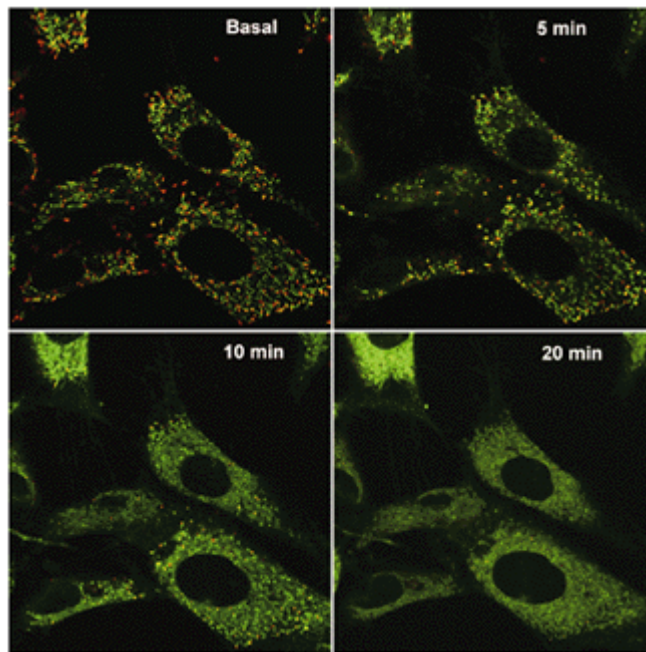
Cellule vitali hanno un elevato potenziale di membrana mitocondriale mentre cellule apoptotiche hanno una caduta del potenziale di membrana.

La caduta del potenziale di membrana può essere rilevata, sia al citofluorimetro che in microscopia, mediante l'utilizzo di coloranti cationici lipofilici (JC-1).

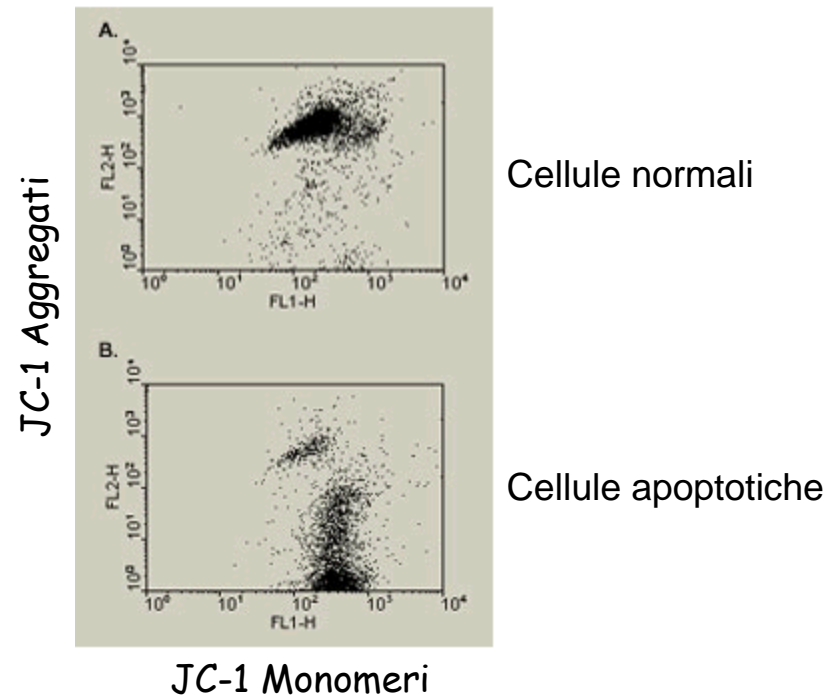
Utilizzo di coloranti cationici lipofilici (JC-1) per la valutazione della variazione del potenziale di membrana mitocondriale.

- Nelle cellule vitali con elevato potenziale di membrana, JC-1 si localizza a livello della membrana mitocondriale sotto forma di aggregati che danno fluorescenza rossa.
- Nelle cellule dove è avvenuta una caduta del potenziale di membrana il colorante rimane in forma monomeric a livello citoplasmatico dando una fluorescenza verde diffusa.

Valutazione microscopica



Valutazione citofluorimetrica



Vantaggi e svantaggi dell'utilizzo di coloranti cationici lipofilici per la valutazione della variazione del potenziale di membrana mitocondriale.

Vantaggi:

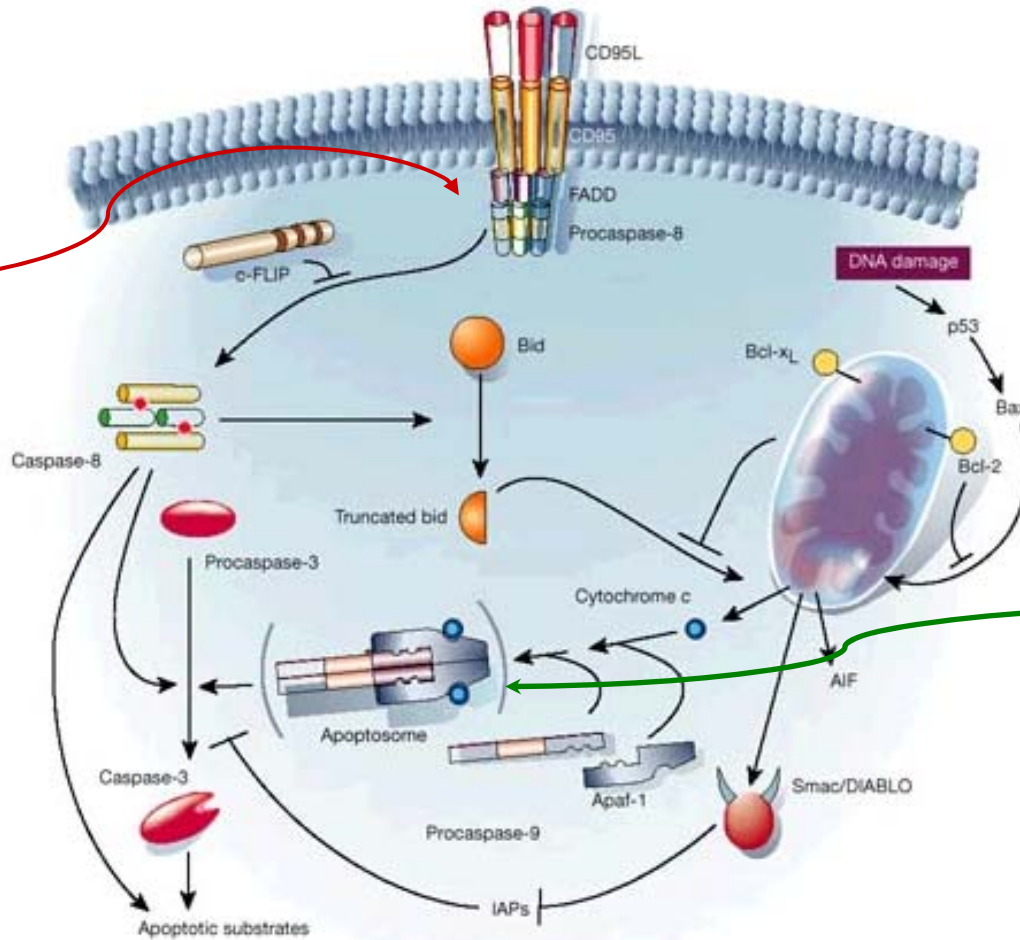
- ✓ Non è necessaria fissazione
- ✓ Saggio rapido
- ✓ Variazione di emissione con stessa eccitazione 488nm (emissione a 530nm in forma monomerica e a 590nm in forma aggregata) le due emissioni possono essere rilevate con i due canali di FL1 e FL2.

Svantaggi:

- ✓ Elevata fluorescenza verde di fondo che può rendere difficile la valutazione della forma rossa aggregata.
- ✓ Necessità di lettura in doppia fluorescenza con conseguente settaggio dello strumento. Può essere utile utilizzare reagenti, come la valinomicina, che causano un collasso del potenziale di membrana di tutti i mitocondri in modo da localizzare le cellule depolarizzate nel dot-plot.

Modificazioni citoplasmatiche: l'attivazione delle caspasi

Attivazione
recettoriale

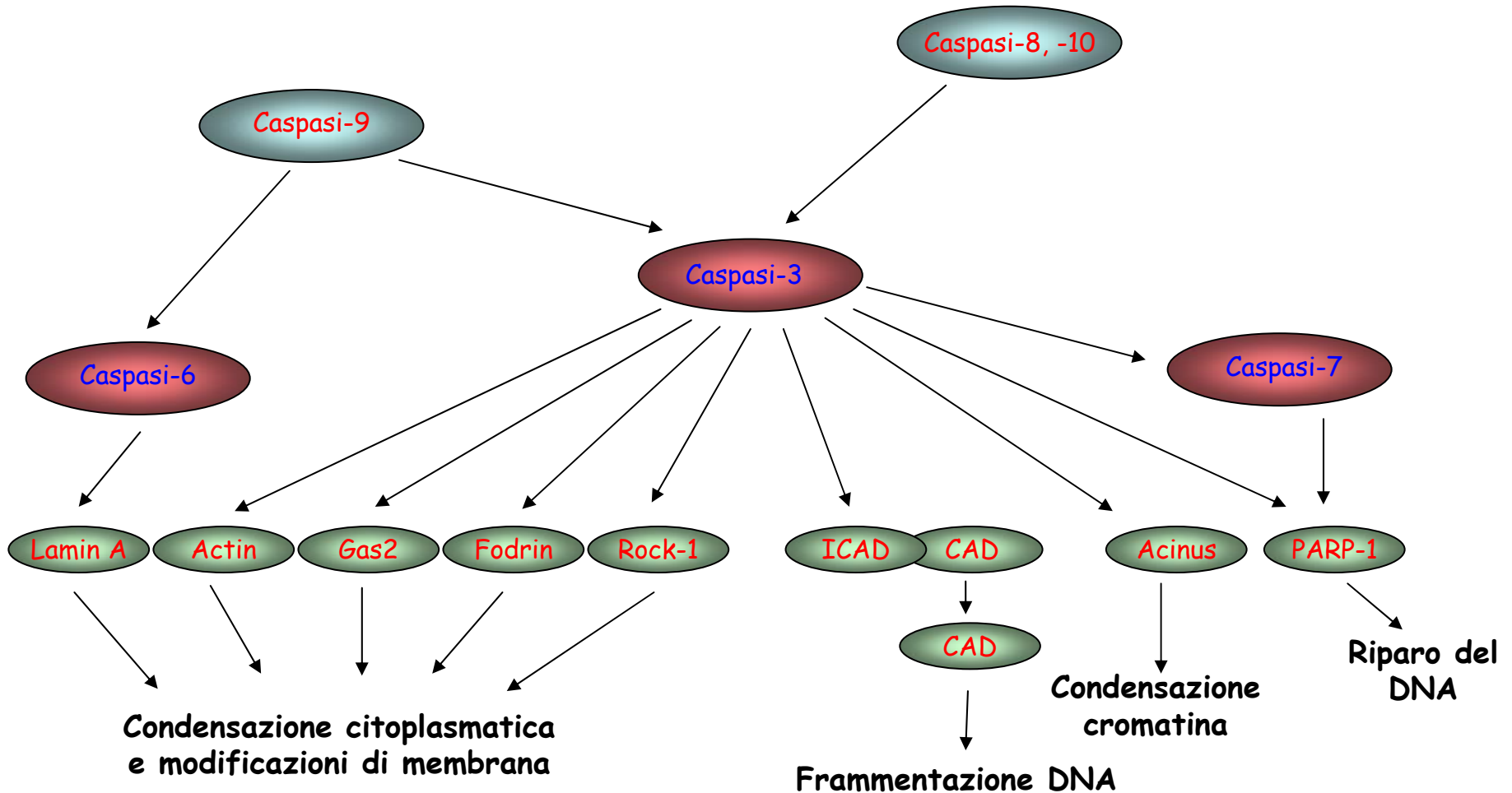


Attivazione
mitocondriale

Modificazioni citolasmatiche: l'attivazione delle caspasi

- Le caspasi sono proteasi citoplasmatiche aspartato specifiche (tagliano substrati proteici dopo residui di acido aspartico) altamente conservate a livello evolutivo.
- Le caspasi vengono sintetizzate in forma di zimogeni inattivi (pro-caspasi). Nelle cellule apoptotiche la pro-caspasi viene processata per autoproteolisi o per intervento di altre caspasi (forma attiva).
- Le Caspasi iniziatrici vengono attivate da stimoli a livello della membrana plasmatica (caspasi-8, -10) o dal rilascio di citocromo-c mitocondriale (caspasi-9).
- le Caspasi effettrici (caspasi-3, -6, -7), attivate dalle iniziatrici, sono responsabili della rottura proteolitica di importanti substrati citoplasmatici e nucleari.

I substrati delle caspasi



Apoptosi

I substrati delle caspasi effettrici

Caspasi-6

Lamin-A: proteina della membrana nucleare il cui taglio provoca disgregazione nucleare, è un marker di attivazione della Caspasi-6.

α -Fodrin: proteina associata al citoscheletro coinvolta nel mantenimento della struttura di membrana, è uno dei primi bersagli dell'attività delle caspasi. Il suo taglio provoca perdita della funzionalità di membrana e "cell-shrinkage".

Rock1: bersaglio di GTPasi implicate nel controllo della struttura del citoscheletro.

Caspasi-3

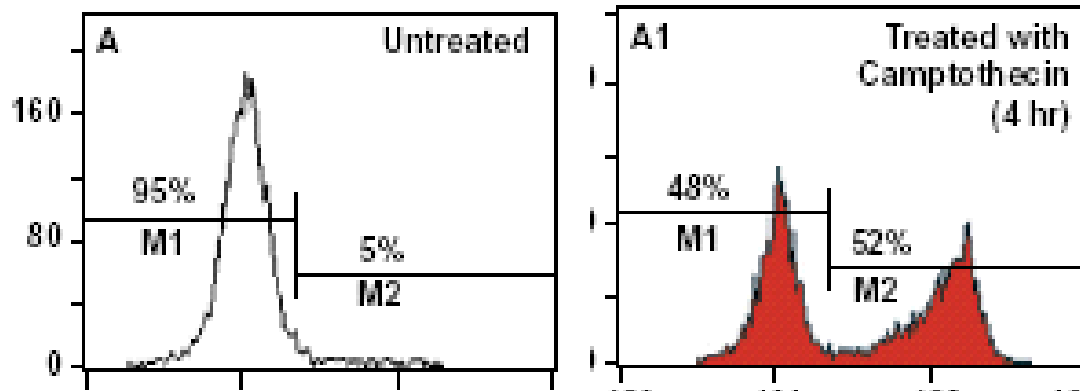
ICAD: è l'inibitore di CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) un "DNA fragmentation factor", il taglio da parte della caspasi-3 libera CAD che entrando nel nucleo degrada il DNA.

PARP-1: (poly (ADP ribosio) polimerasi) è un enzima coinvolto nel processo di riparo del DNA e nel mantenimento della stabilità genomica. Il suo taglio è un indice di attivazione della caspasi-3.

Caspasi-7

Rilevamento delle forme attive delle caspasi

Permeabilizzando le cellule sottoposte ad uno stimolo apoptotico è possibile raggiungere le caspasi citoplasmatiche e, scegliendo opportuni anticorpi, è possibile valutare la presenza della forma tagliata attiva indice di un processo apoptotico in atto.



Rilevamento del taglio della caspasi-3 con un anticorpo diretto contro la forma clivata della molecola (Caspasi-3 attiva).

Vantaggi e svantaggi della valutazione dell'attivazione caspasi

Vantaggi:

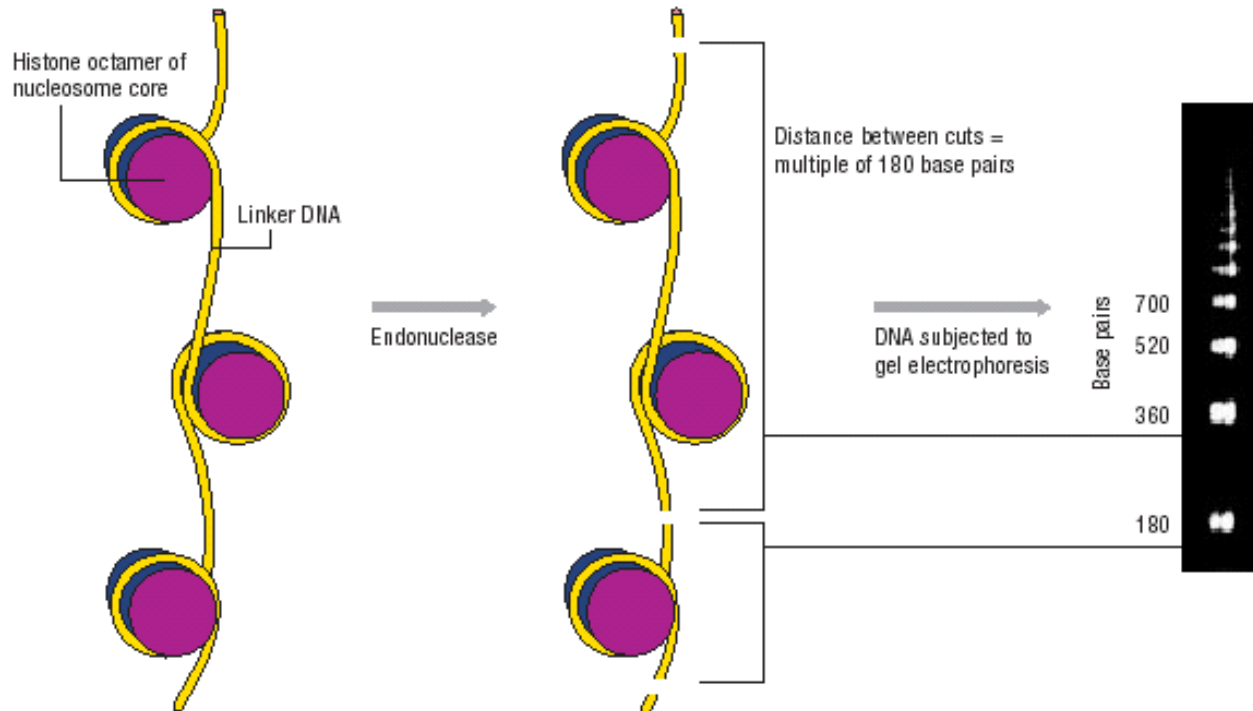
- ✓ saggi relativamente semplici
- ✓ informazioni qualitative e quantitative

Svantaggi:

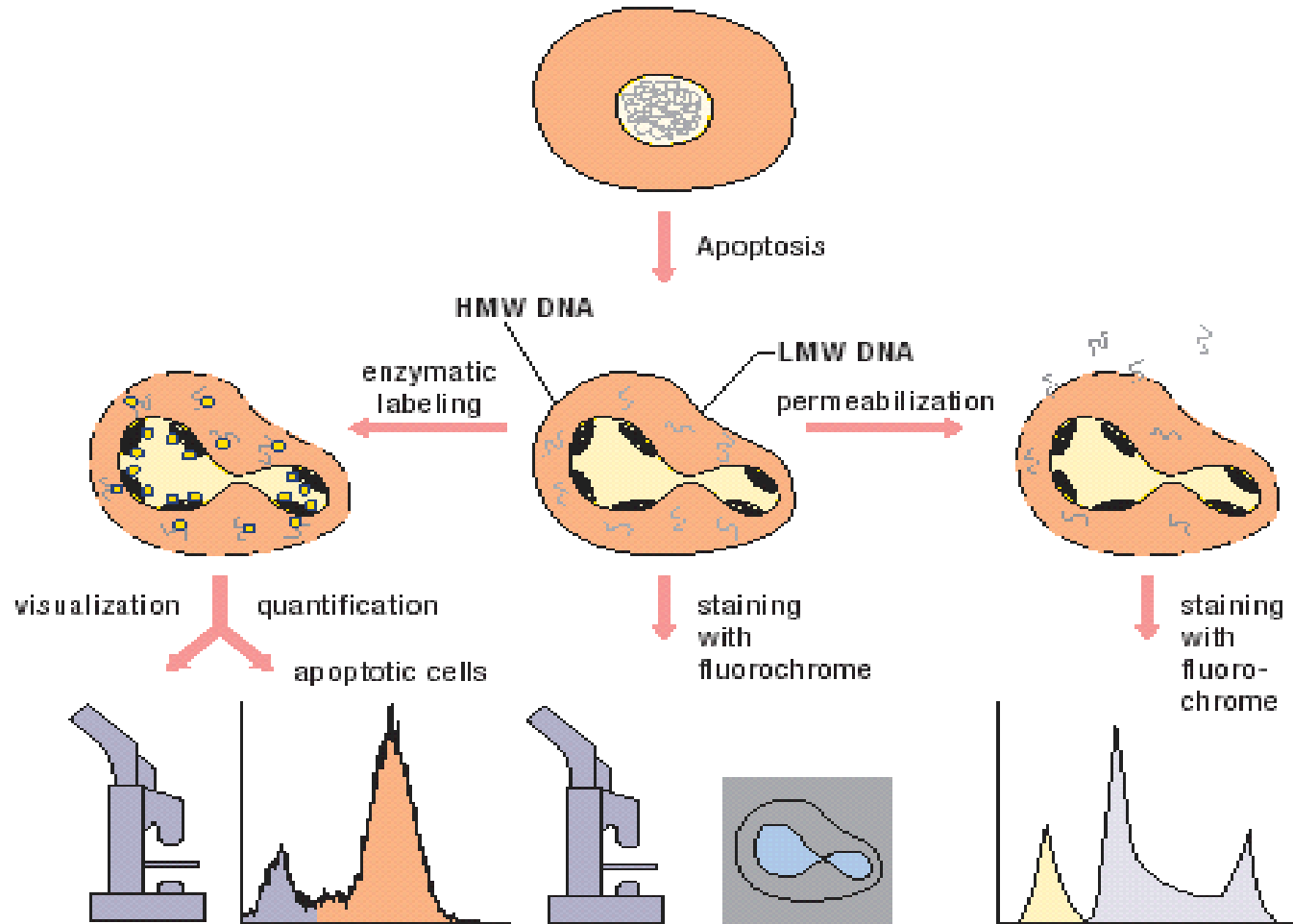
- ✓ richiedono un discreto numero di cellule
- ✓ nel caso dei saggi citofluorimetrici è necessario permeabilizzare le cellule
- ✓ nel caso dei saggi spettrofluorimetrici o spettrofotometrici può essere indicato fare una separazione sub-cellulare. L'utilizzo di un lisato cellulare totale può essere meno sensibile rispetto all'utilizzo di un estratto citosolico.

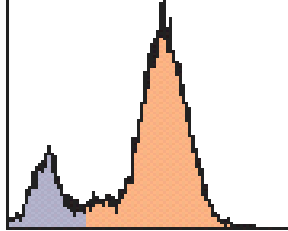
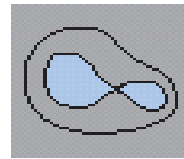
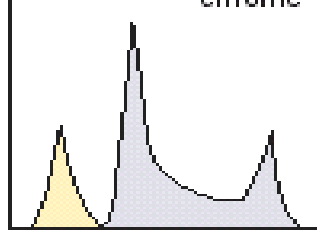
Modificazioni nucleari: frammentazione del DNA nucleare

E' un "end-point" di apoptosi. La frammentazione del DNA avviene ad opera di specifiche endonucleasi che tagliano a livello dei linker di DNA compresi fra i nucleosomi producendo dei frammenti nucleosomiali o oligonucleosomiali di 180 pb o multipli. Questo processo di frammentazione provoca il tipico DNA ladder considerato una firma biochimica dell'apoptosi.



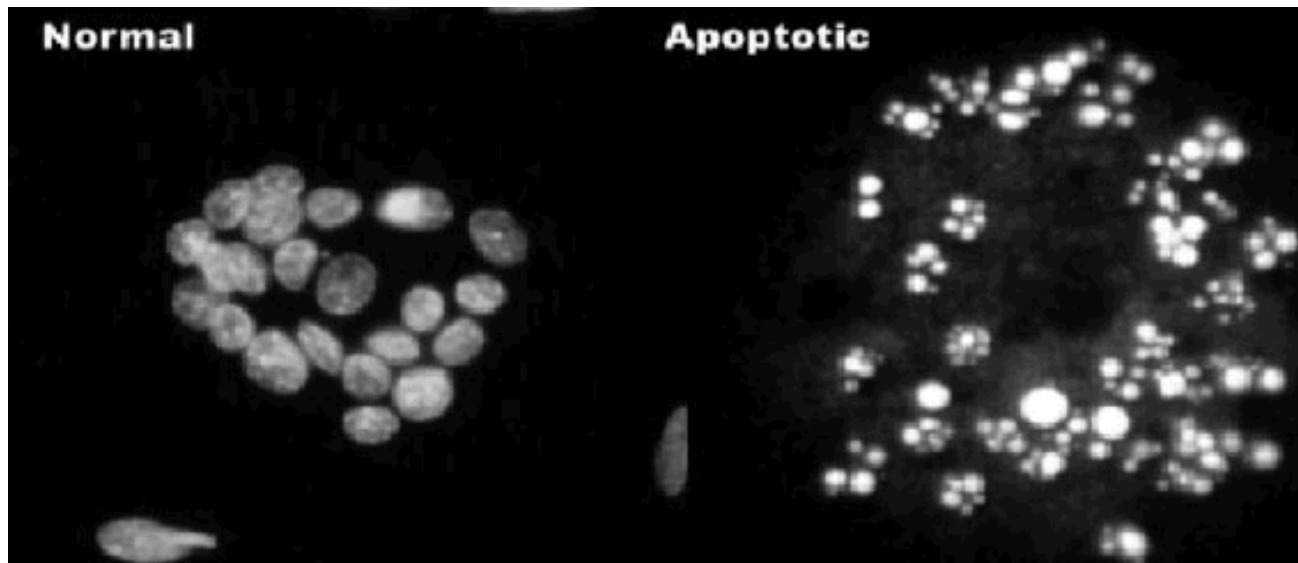
Ulteriori metodi per valutare il danno apoptotico al DNA



Parameter	DNA strand breaks	altered nucleus morphology	Reduced DNA content
			
			

Marcatura con fluorocromi per valutazione della morfologia nucleare

Il DNA può essere marcato con fluorocromi aventi caratteristiche diverse di legame e di emissione. Alcuni sono in grado di intercalarsi in modo aspecifico nella doppia elica del DNA (bromuro di etidio, propidio ioduro) altri si legano al passo minore dell'elica (DAPI, Hoechst). Si differenziano anche per la loro capacità di permeare la membrana plasmatica. Bromuro di etidio, propidio ioduro non passano membrane plasmatiche integre, (sono usati come marcatori di cellule necrotiche dove la membrana è alterata) è necessaria quindi la permeabilizzazione. DAPI, Hoechst hanno maggiore capacità di permeare le membrane. La marcatura del DNA permette una valutazione morfologica dei nuclei normali o apoptotici.



Marcatura nucleare con Hoechst

Marcatura con propidio ioduro (PI) per la valutazione del contenuto di DNA

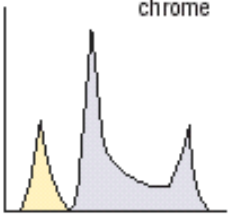
PI si lega al DNA in modo proporzionale alla quantità di DNA presente. Non è in grado di permeare la membrana cellulare, per valutare il contenuto di DNA è pertanto necessario permeabilizzare le cellule.

La permeabilizzazione può essere effettuata con:

- ✓ Alcool o acetone
- ✓ Detergenti: nel caso si utilizzino detergenti è meglio farlo in presenza di proteine esogene (1% albumina o 10% siero) che proteggono i campioni da una lisi eccessiva.
- ✓ Tamponi ipotonici: il loro utilizzo può isolare frammenti nucleari in grado di interferire con l'interpretazione del dato.



staining with fluoro-chrome



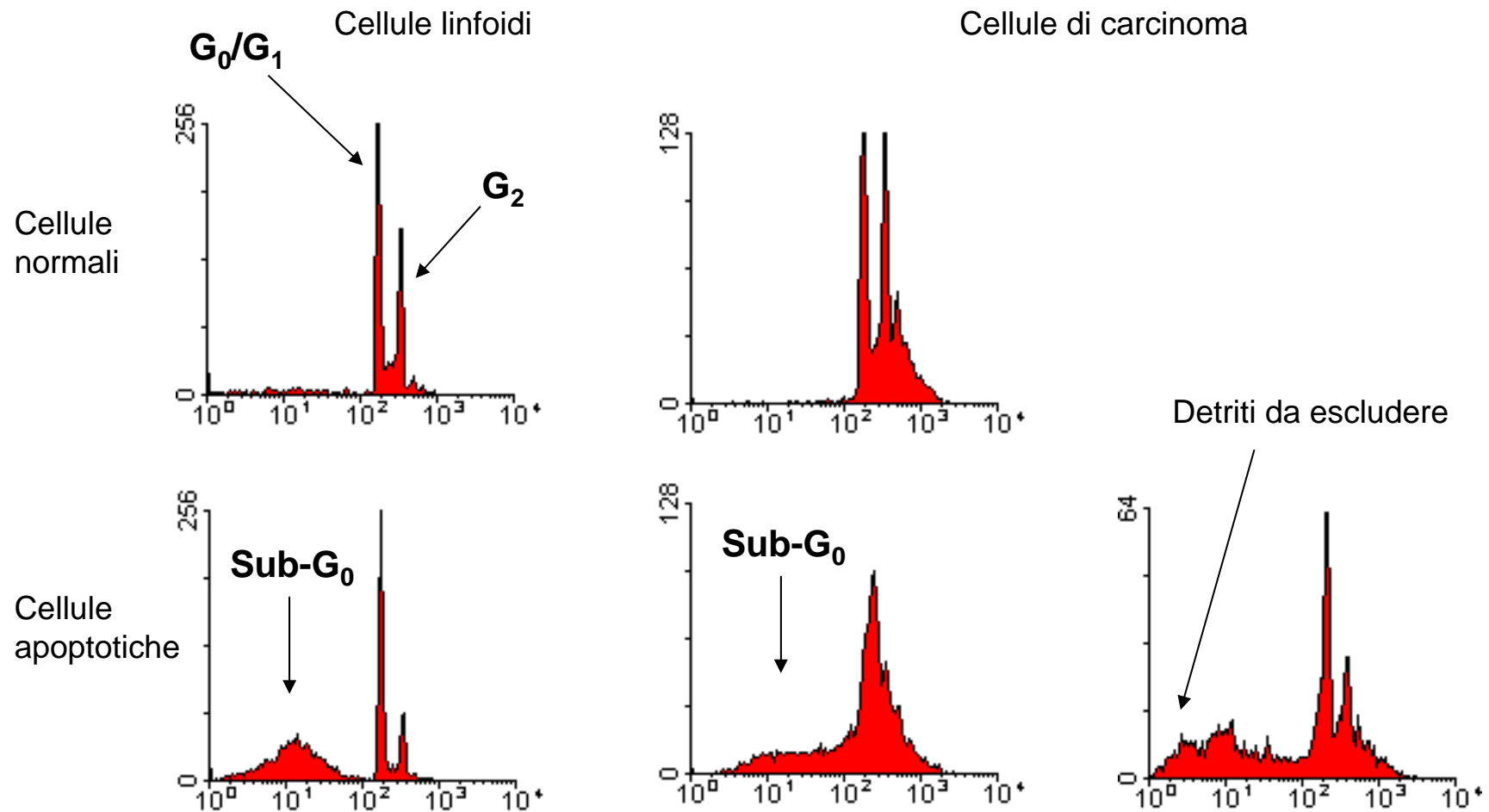
Reduced DNA content

Questi processi di permeabilizzazione non conservano i frammenti di DNA a basso peso molecolare presenti nel citoplasma, pertanto tali frammenti vengono persi durante i lavaggi. Il risultato è che le cellule in apoptosi avranno un contenuto totale di DNA inferiore a quello delle cellule normali. L'utilizzo di tamponi fosfato:citrato ad alta molarità nelle ultime fasi del test aumenta l'eliminazione del DNA frammentato migliorando la risoluzione dei profili di citometria.

La frazione di cellule a contenuto di DNA ridotto verrà individuata da un picco di marcatura inferiore a quello delle popolazioni in G_0/G_1 : definito come picco sub- G_0 o picco ipodiploide.

La valutazione del picco ipodiploide viene effettuata in scala logaritmica.

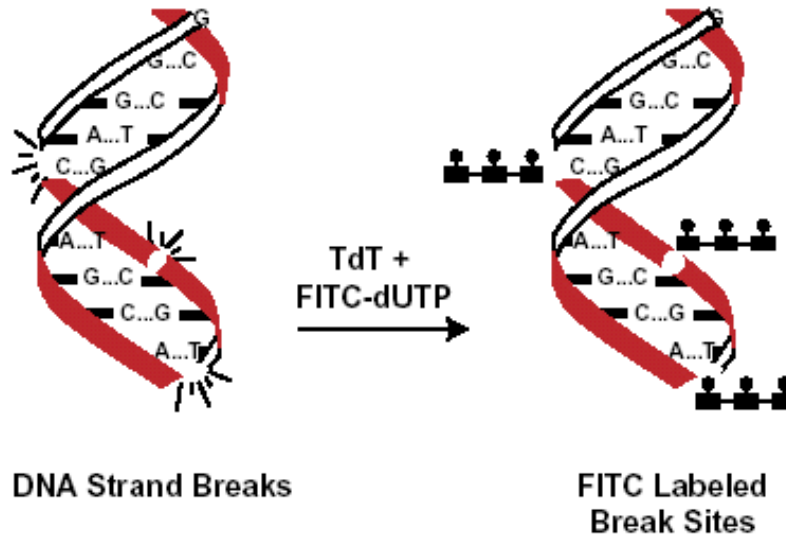
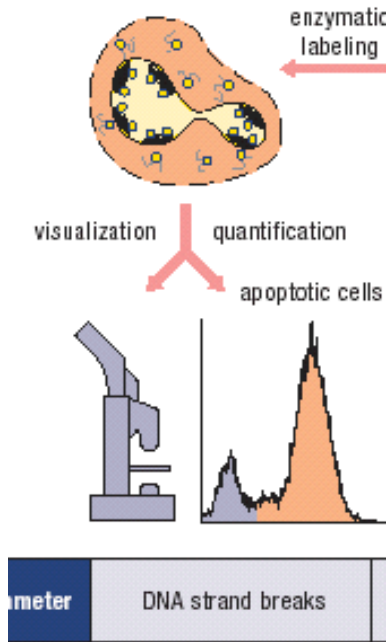
Marcatura con propidio ioduro (PI) per la valutazione del contenuto di DNA



L'identificazione del picco ipodiploide è molto chiara per cellule linfoidi, di più difficile interpretazione per tumori solidi.

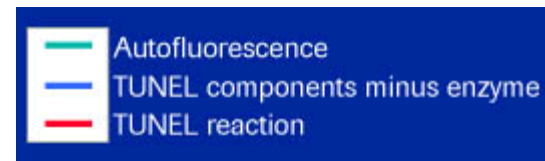
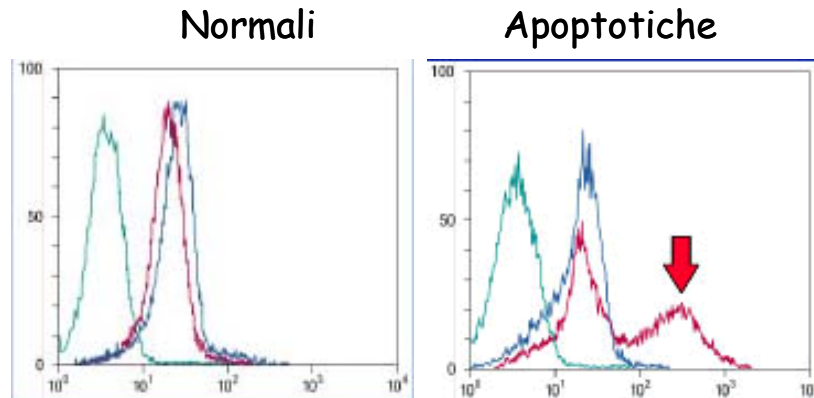
Marcatura enzimatica

Durante il processo apoptotico, oltre alla frammentazione nucleosomica del DNA, si verificano anche delle rotture su singoli filamenti. Queste rotture del DNA possono essere identificate con la marcatura dei terminali 3'-OH liberi utilizzando dei nucleotidi modificati e una reazione enzimatica. L'enzima è la Terminal deossinucleotide Transferasi (TdT) che catalizza in modo templatoindependente la polimerizzazione di nucleotidi-FITC al 3'-OH libero. Metodica TUNEL (terminal deoxynucleotidiltransferase dUTP nick end labelling).

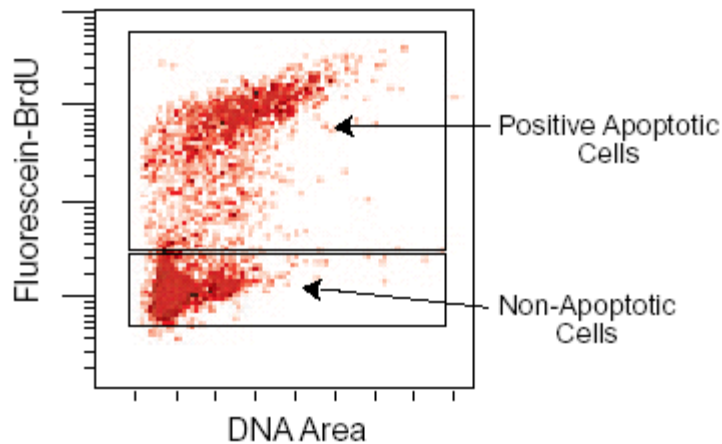


Valutazione del TUNEL in citofluorimetria

Fluorescenza singola: valutazione del solo TUNEL



Fluorescenza doppia: TUNEL + PI



La contemporanea marcatura delle cellule con il TUNEL e il PI, permette di correlare l'apoptosi con le fasi del ciclo cellulare.

Punti critici della metodica TUNEL

- ✓ metodica piuttosto complicata e costosa
- ✓ le cellule vanno fissate con sostanze (paraformaldeide) in grado di dare un cross-linking del DNA per evitare di perderlo durante la preparazione del campione
- ✓ è consigliabile utilizzare tubi di polistirene per evitare di perdere il campione sulle pareti delle provette, le cellule diventano “appiccicose”, si sconsiglia anche l’uso dei puntali.