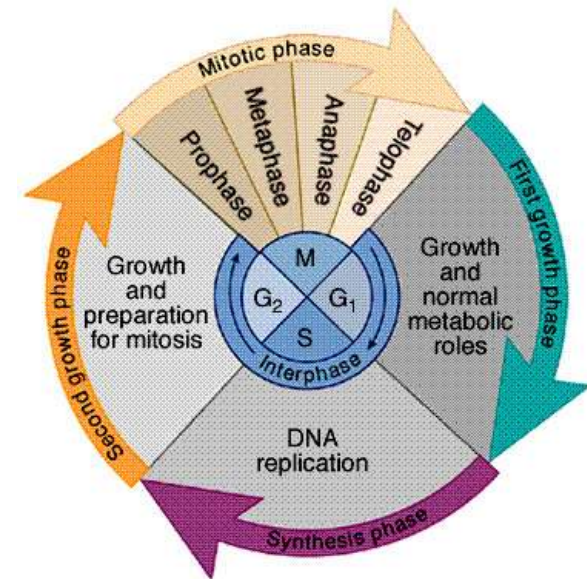
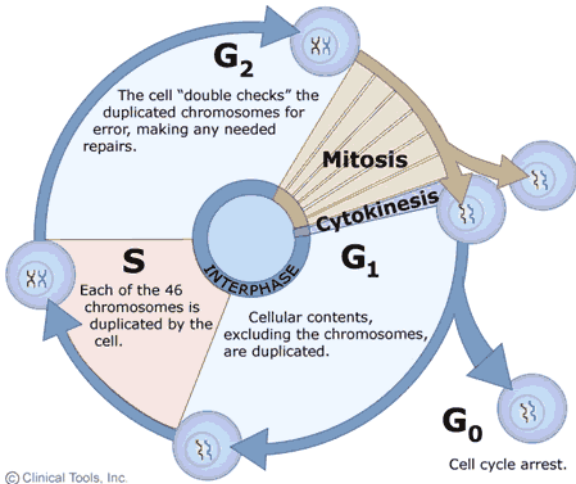
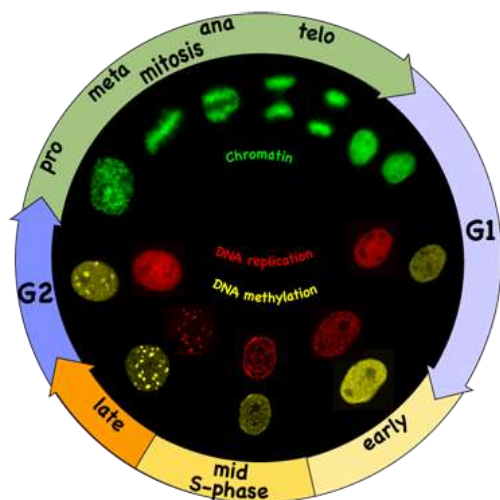
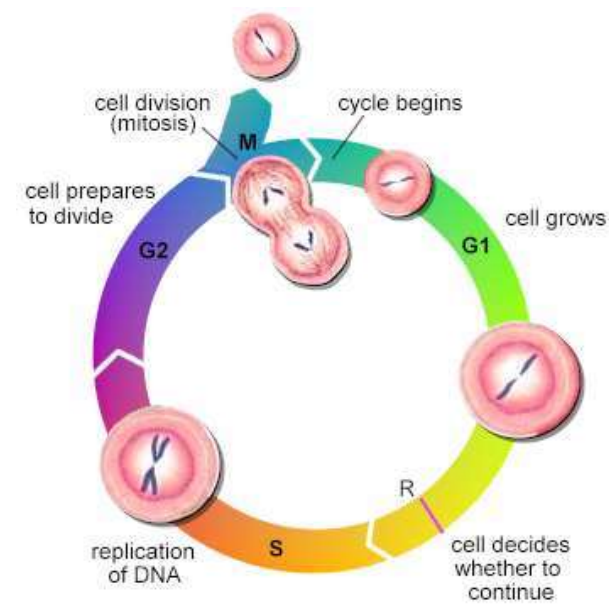




DNA πλοειδία, ανάλυση κυτταρικού κύκλου, κυτταρικός πολλαπλασιασμός



Γεώργιος Α. Βαρθολομάτος



Στόχοι της παρουσίασης

- Εισαγωγή σε μερικές από τις πλέον κοινές χρώσεις των νουκλεϊνικών οξέων
- Πραγματοποίηση διαγνωστικών και ερευνητικών πρωτοκόλλων για ανάλυση κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής
- Τα πλέον κοινά προβλήματα που σχετίζονται με την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου
- Σωστά πρωτόκολλο κυτταρικού κύκλου

Πλεονεκτήματα της ανάλυσης του DNA με κυτταρομετρία ροής

- Μπορεί να γίνει μονιμοποίηση με αιθανόλη και με αυτό τον τρόπο, επιτρέπει στα κύτταρα που έχουν συλλεχθεί σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα, να αναλυθούν σε μεταγενέστερο χρόνο, ταυτοχρόνως
- Πολλά επιφανειακά αντιγόνα είναι ανθεκτικά στην μονιμοποίηση με αιθανόλη, έτσι ώστε η ανάλυση του DNA μπορεί να συνδυαστεί με τις συνήθεις τεχνικές ανοσοφθορισμού για χαρακτηριστικά κυτταρικών υποπληθυσμών
- Εναλλακτικά, το περιεχόμενο κυτταρικό RNA χαρακτηρίζει κυτταρικούς φαινοτύπους που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση, την ηρεμία και το κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
- Μελέτη του κυτταρικού κύκλου από τομές παραφίνης ιστών επιτρέποντας έτσι αναδρομικές μελέτες.

Γενικό Πλαίσιο

- **Μέρος Ι**
Χρώσεις Νουκλεϊνικών οξέων
- **Μέρος ΙΙ**
Οι περισσότερες κοινές εφαρμογές της
ανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων
- **Μέρος ΙΙΙ**
Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με PI

Πώς ξέρεις τι χρώση να χρησιμοποιήσεις;

- Χαρακτηριστικά των χρωστικών
 - 1) Φασματοσκοπικές ιδιότητες
 - Διέγερση της χρωστικής. Έχετε πρόσβαση στην απαιτούμενη λείζερ; UV; 488; 633;
 - 2) Χημικές ιδιότητες
 - 3) Χαρακτηριστικά δέσμησης.
- Χρώσεις με εξειδίκευση ζευγών βάσεων δεν μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη σύγκριση των μεγεθών του γονιδιώματος των διαφορετικών ειδών.
- Επίσης, νωρίς στη σύνθεση του DNA είναι περιοχές πλούσιες σε - AT- οι οποίες αντιγράφονται πρώτα από τις πλούσιες CG-περιοχές, κατά την S φάση.

Ως εκ τούτου διαφορετικές χρώσεις DNA θα δώσουν διαφορετικά προφίλ του κυτταρικού κύκλου

Απαιτήσεις για μία χρώση ώστε να είναι χρήσιμη για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA και του RNA ανά κύτταρο

- Η χρώση πρέπει να είναι ειδική για τα νουκλεϊκά οξέα και για τίποτε άλλο.
- Οι χρώσεις πρέπει να εμφανίζουν ένα λογικό βαθμό ειδικότητας (εκλεκτικότητας) για το DNA ή το RNA.
- Μετά τη χρώση, η εκπομπή της χρωστικής ουσίας θα πρέπει να είναι σε στοιχειομετρία με το περιεχόμενο DNA ή RNA του κυττάρου.

Ιδανικά, μια χρώση του νουκλεϊκού οξέος πρέπει να εμφανίζει έντονη αύξηση του φθορισμού κατά τη σύνδεση με το νουκλεϊκό οξύ στόχο της.

Οι Χρωστικές των Νουκλεϊνικών οξέων εμπίπτουν σε δύο βασικές κατηγορίες

Χρωστικές σύνδεσης σε
ζεύγη Βάσεων

DAPI (4,6-diamidino-2-
phenylindole)

Hoechst 33342

Hoechst 33258

Χρωμομυκίνη

Μιθραμυκίνη

Χρωστικές παρεμβαλλόμενες
(Intercalating)

7-AAD

PI

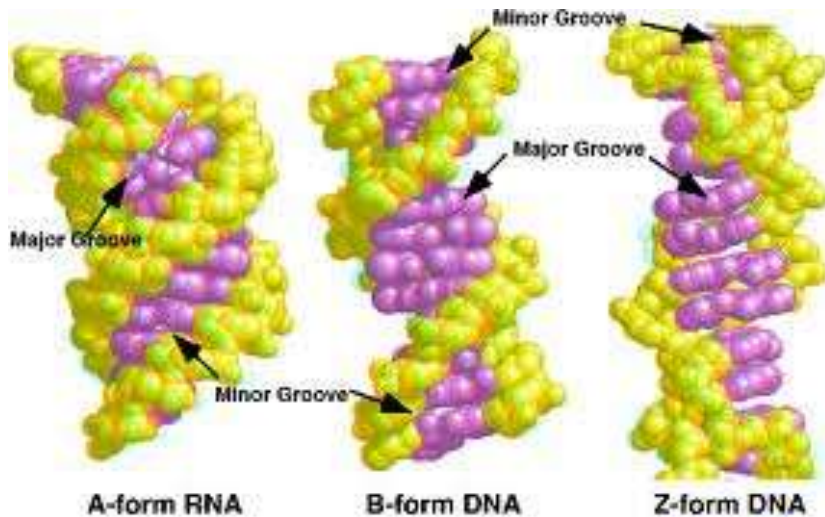
Ethidium bromide

Acridine Orange

Pyronin Y

Και πολλές άλλες!!

Δέσμευση στη μικρή (ελάσσονα) αύλακα του DNA



- Αυτές οι χρωστικές συνδέονται αποκλειστικά με την ελάσσονα αύλακα της διπλής έλικας του DNA. Αυτές οι χρωστικές δίνουν εκλεκτικότητα για το DNA μόνο.

Χρωστικές **Hoechst**

33342- Permeant - Διαπερνά τα ζωντανά κύτταρα, δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα σε τμήματα τουλάχιστον τριών ζευγών βάσεων AT πλαισιωμένα από ένα ζεύγος βάσεων GC.

33258- Impermeant- δεν διαπερνά, δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα σε τμήματα τουλάχιστον τριών ζευγών βάσεων AT πλαισιωμένα από ένα ζεύγος βάσεων GC.

- **DAPI**

UV excited: [Hoechst 33342](#), Hoechst 33258, [DAPI](#)

Χρωστικές που παρεμβάλλονται (Intercalating)

- Αυτές οι χρωστικές που παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA και του RNA σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα
 - **PI (Propidium iodide)**, δεν παρουσιάζει εκλεκτικότητα στα ζεύγη των βάσεων, διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη
 - **EtBr (Ethidium bromide)**, καμία εκλεκτικότητα ζευγών βάσης, διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη
 - **7-AAD (7-Aminoactinomycin D)**, μικρή εκλεκτικότητα σε GC, διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη
 - Χρωστικές Διμερών της κυανινικής (**Dimeric cyanine**)

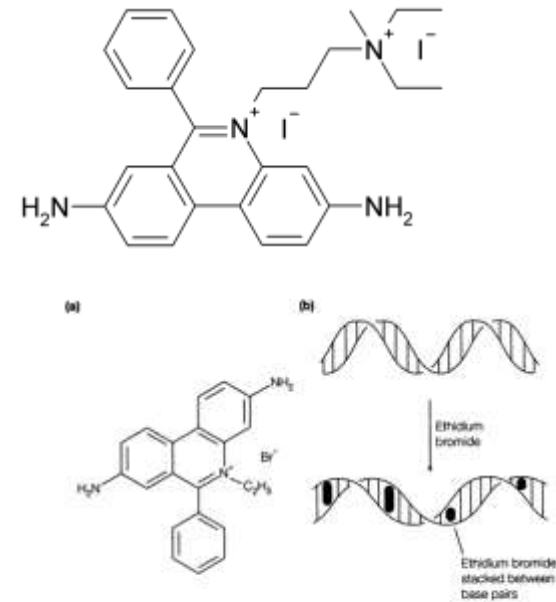
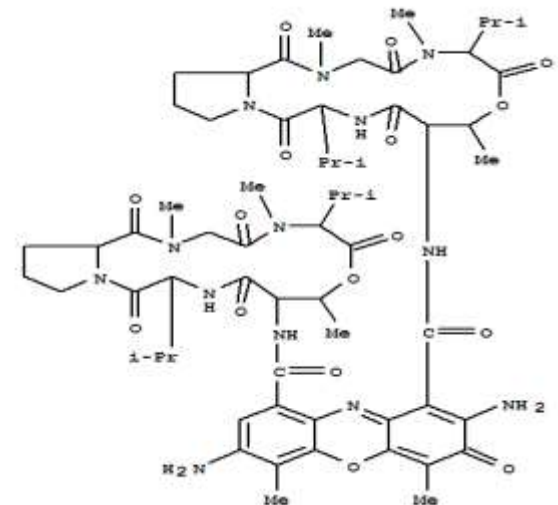
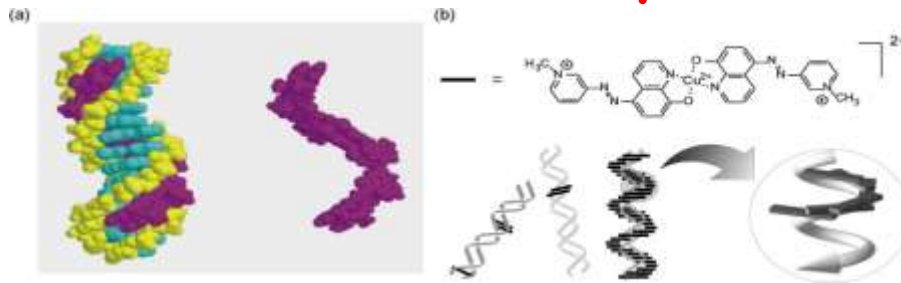
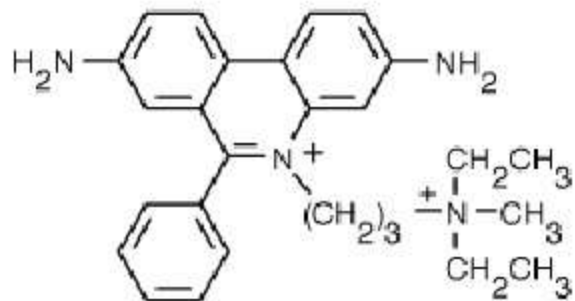


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and unwinding of the DNA helix.



Propidium iodide



488 nm 610 nm

Weakly Fluorescent

INTERCALATION

DNA



488 nm 610 nm

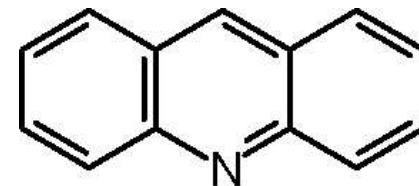
Highly Fluorescent

Χρωστικές που παρεμβάλλονται (Intercalating)

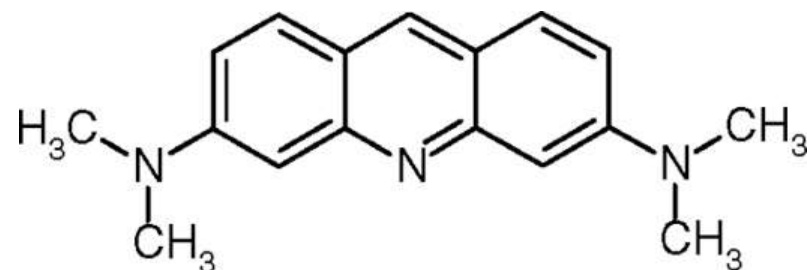
- Παρεμβαλλόμενες χρωστικές που εκφράζουν διαφορετικά φάσματα εκπομπής ανάλογα με το αν δεσμεύονται με το DNA ή το RNA

- **Οι ακριδίνες** η δέσμευση σε ds νουκλεϊνικού οξέως οδηγεί σε εκπομπή στα 530nm, ενώ σε ss νουκλεϊκό οξύ προκαλεί εκπομπή στα 640nm

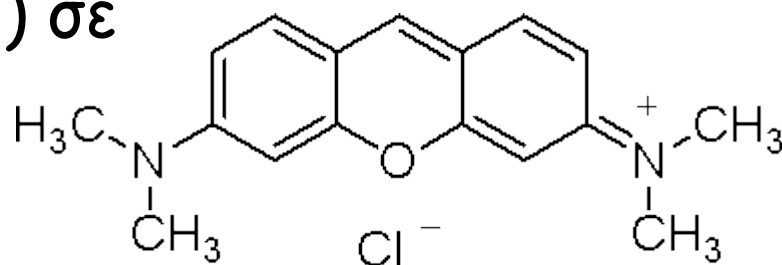
- **Pyronin Y** Δεν παρουσιάζει εκλεκτικότητα (ειδικότητα) σε ζεύγος βάσεων



acridine



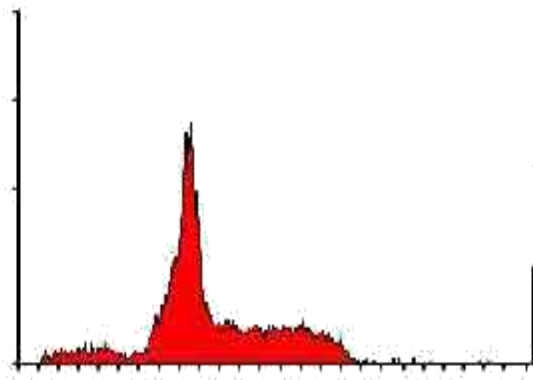
Acridine Orange



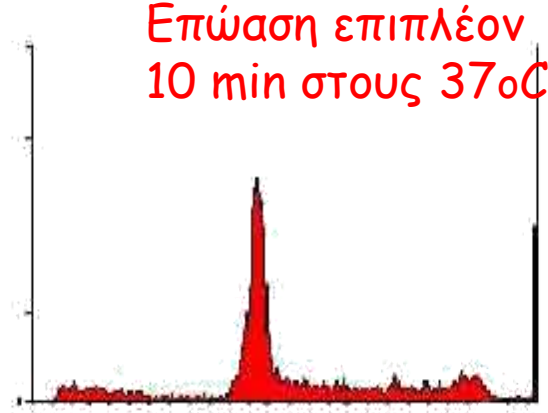
Η πολυπλοκότητα των δεσμευτικών τρόπων στις χρωστικές απαιτεί προσεκτικό έλεγχο των συνθηκών χρώσης

- Για τον προσδιορισμό του βέλτιστου χρόνου χρώσης λαμβάνουμε υπόψη την ποσότητα των κυττάρων και τη συγκέντρωση της χρωστικής. Στη συνέχεια, αναλύουμε με κυτταρομετρία ροής. Όταν η κορυφή του ιστογράμματος δεν μετακινείται, αυτός ο χρόνος **είναι ο προτιμώμενος (προτεινόμενος) της χρώσης αυτής.**

Χρώση Πυρήνων με PI



Ανεπαρκής χρώση



Σωστή χρώση

Συμπερασματικά.....

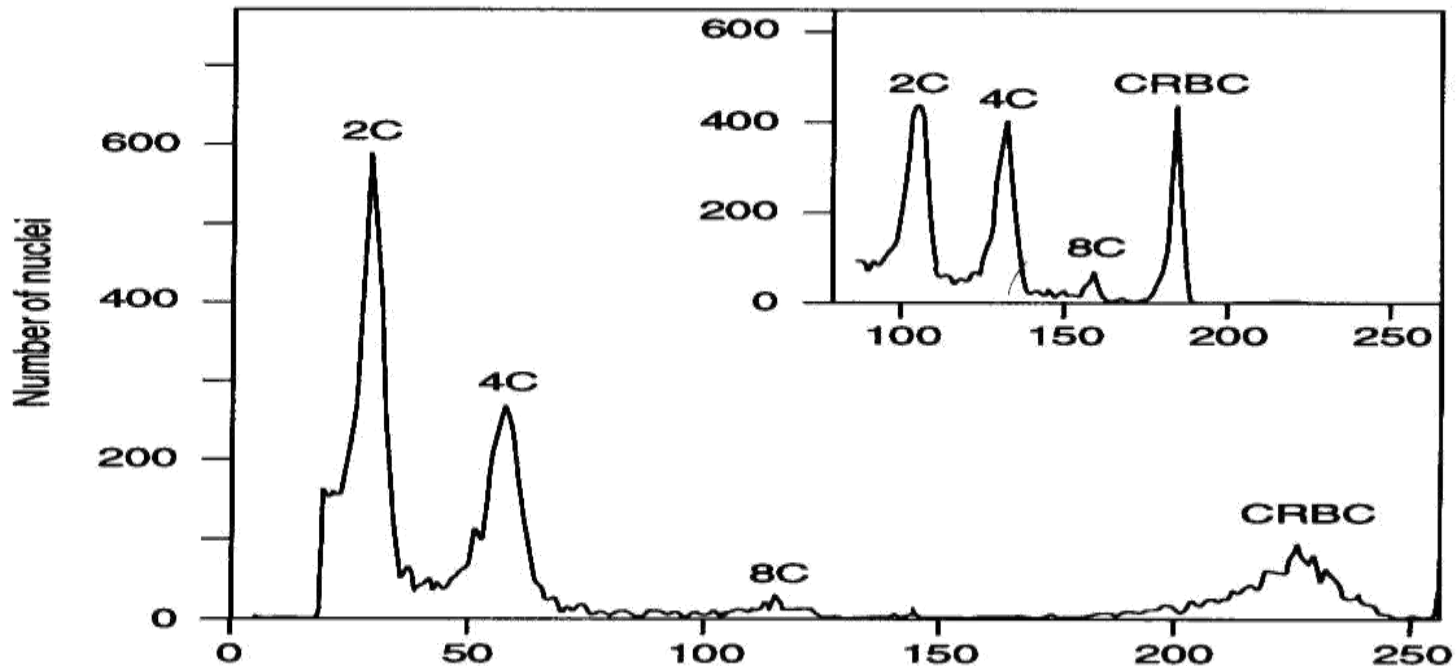
- Για οποιαδήποτε δεδομένη εφαρμογή, υπάρχει **ένας αριθμός χρωστικών** οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν.
- Εξοικειωθείτε με τις χημικές ιδιότητες, τα **φάσματα απορρόφησης και εκπομπής**, και την **δεσμευτική ιδιότητα** της χρωστικής πριν τη χρησιμοποιείτε.

Ποια είναι η σωστή μέθοδος ανίχνευσης νουκλεϊνικών οξέων για εσένα?

- Περιεχόμενο DNA
- Υποπληθυσμός κυττάρων
- Απόπτωση
- Κινητική της διαφοροποίησης
- Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου

Καθορισμός του περιεχομένου του DNA

- Η χρωστική δεσμεύεται στο DNA με κατάλληλο πρότυπο αναφοράς
-PI, DAPI, EtBr με πέστροφα ή κοτόπουλο RBC's
- Μετρήστε το Peak



CRBC MFI=225

CRBC=10pgms

2C Sample MFI= 30

4C Sample MFI=60

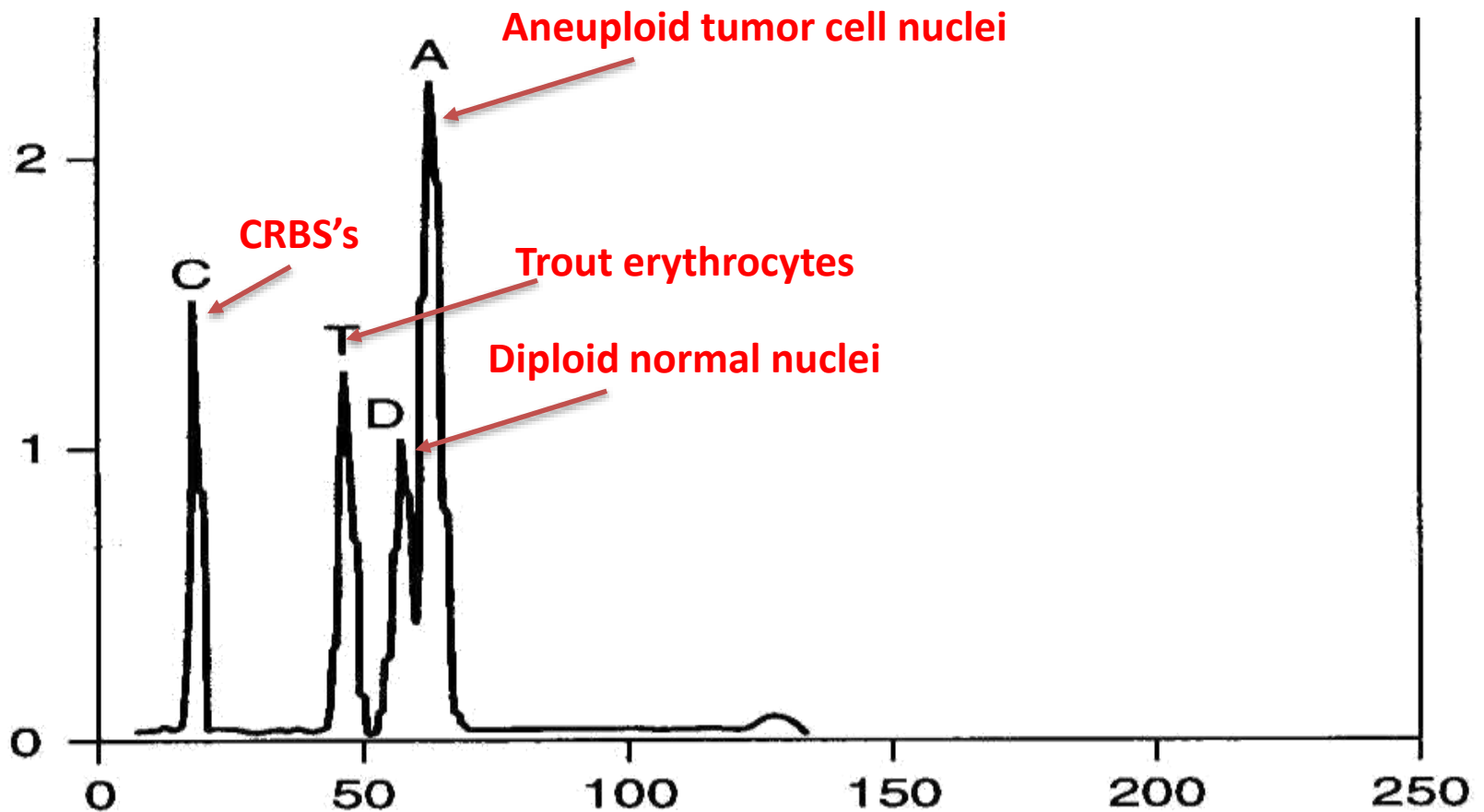
8C Sample MFI=120

$225/30=10\text{pgms}/X\text{pgms}$

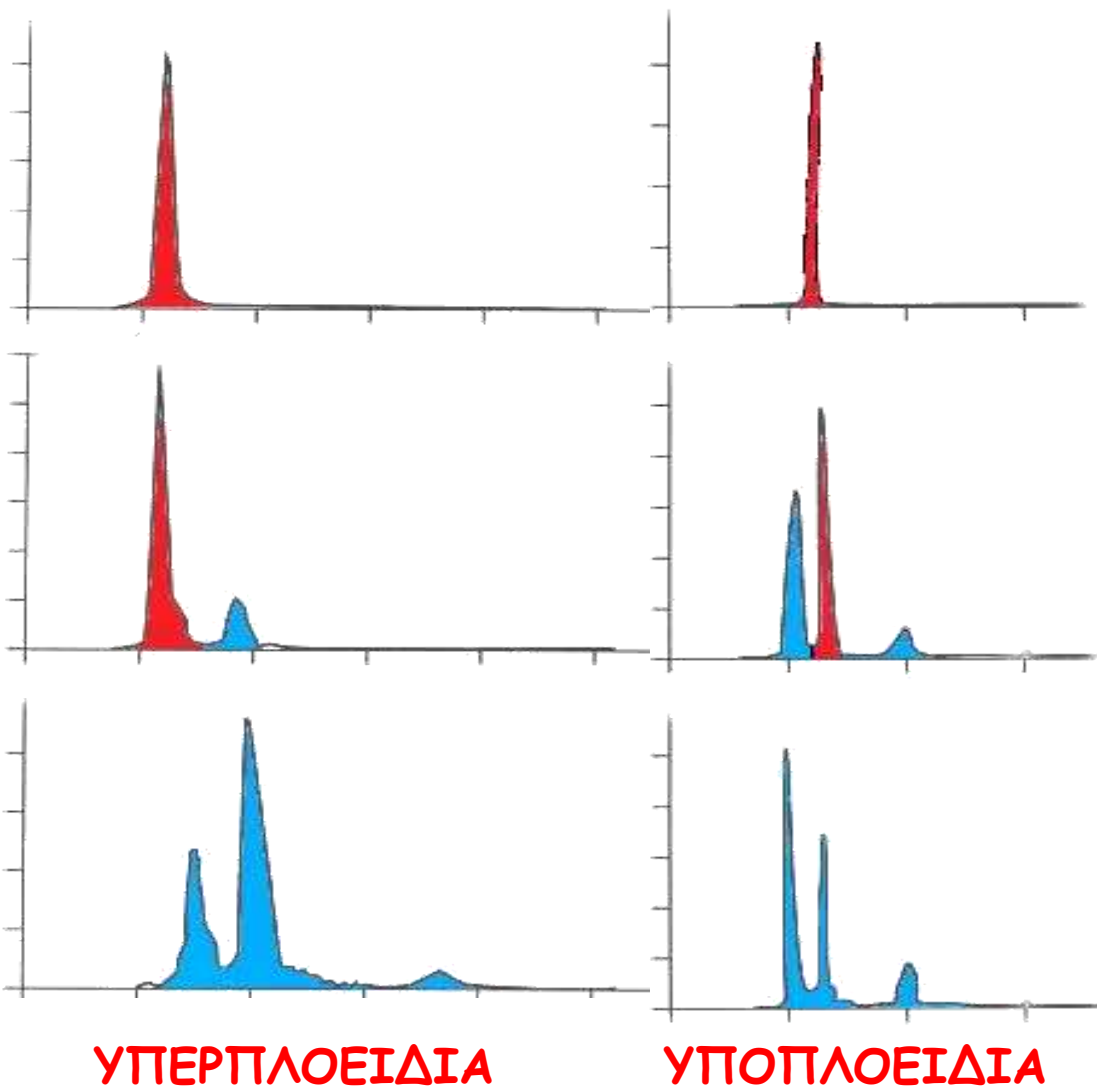
$X=1.34\text{pgms}$

Προσδιορισμός της πλοειδίας των κυττάρων

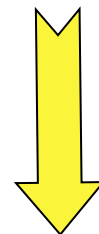
PI, DAPI, EtBr με κατάλληλο πρότυπο αναφοράς



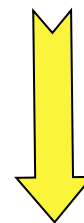
Έλεγχος πλοειδίας



Έλεγχος διπλοειδικός
μόνο

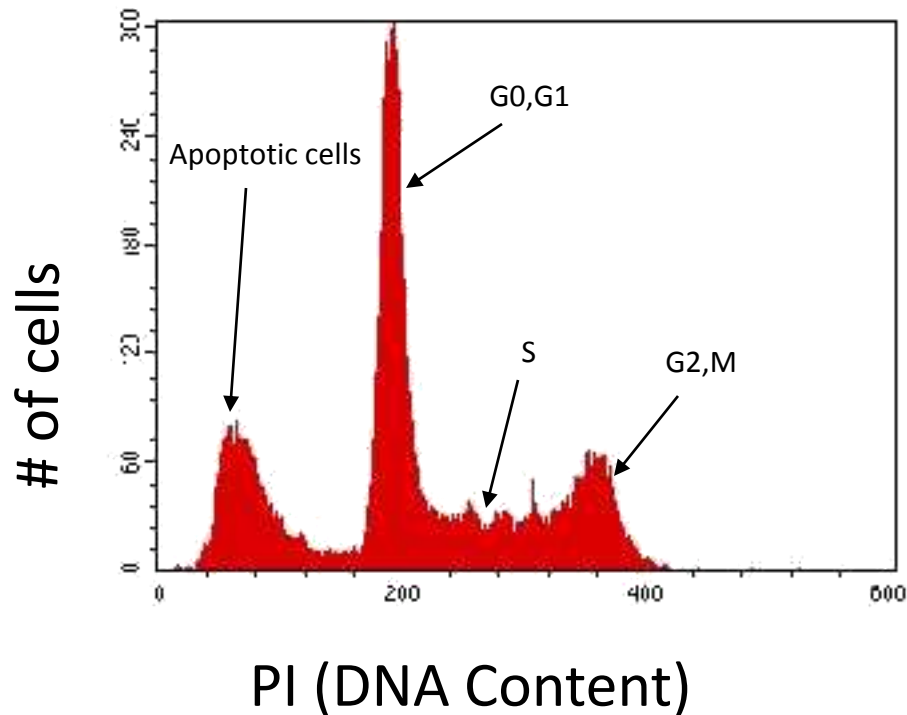


Έλεγχος διπλοειδικός που
αναμιγνύεται με το δείγμα
ιστού



Το δείγμα ιστού
μόνο

Ανάλυση DNA ως δείκτης της απόπτωσης



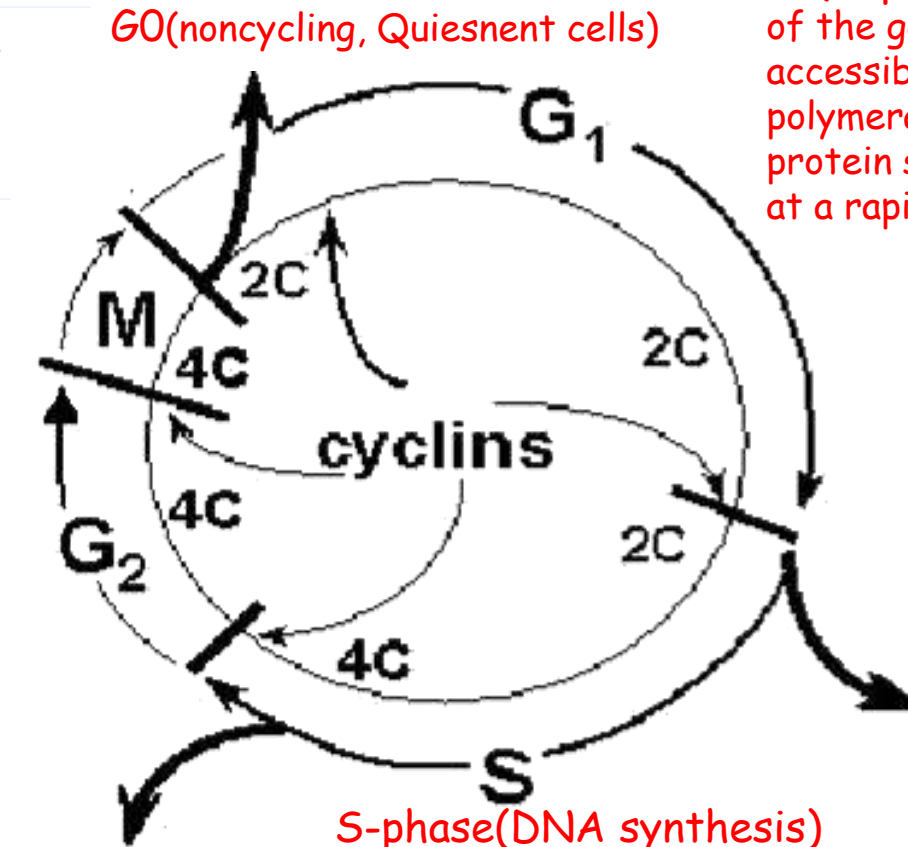
Εκτός από την ανάλυση του DNA, θα μπορούσε κανείς να διακρίνει επίσης αποπτωτικά κύτταρα

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

M (Mitosis)

Nuclear membrane disappears; homologues of each chromosome pair pulled to opposite poles of cell; at end of mitosis the cell membrane pinches off to form 2 daughter cells and completes cytokinesis

G₂ (Gap 2)
Chromosome condensation occurs



G₁(Gap1) specific regions of the genome become accessible to RNA polymerases. RNA and protein synthesis resume at a rapid rate.

S-phase(DNA synthesis)
High rate of synthesis of AT-rich DNA early in S-phases, high rate of synthesis of GC rich DNA late in S-phase

Necrosis due to cell injury can occur at any cell cycle stage

Apoptosis

Τι μας λέει ο κυτταρικός κύκλος

- Η μέτρηση του κυτταρικού περιεχομένου σε DNA μπορεί να μας δώσει μια εκτίμηση της κάθε φάσης του κυτταρικού κύκλου
- Επίσης, είναι μια μέτρηση των χαρακτηριστικών ανάπτυξης, μιας κυτταρικής καλλιέργειας ή ενός ιστού υπό κανονικές συνθήκες ή συνθήκες στρες

Χρήσιμες πληροφορίες

- Η S φάση έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί θεωρείται ότι αντανακλά την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα της νεοπλασίας
- Ο δείκτης πολλαπλασιασμού υπολογίζεται από το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση και την μίτωση G2/M επί του συνόλου του κυτταρικού πληθυσμού
- Το κλάσμα της S φάσης (S-Phase Fraction -SPF) είναι το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκουμε μόνο στην S φάση
- Η πλοειδία ή η περιεκτικότητα των κυττάρων σε DNA στηρίζεται στις διαφορές που υπάρχουν στο ποσό του DNA μεταξύ φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων

Χρήσιμες πληροφορίες

- Το πυρηνικό DNA που προσδιορίζεται με κυτταρομετρία ροής εκφράζεται συνήθως ως δείκτης DNA (DNA-Index, ID), ο οποίος εκφράζει το λόγο της ποσότητας του DNA του νεοπλασματικού πληθυσμού στη φάση G₀/G₁ προς την ποσότητα του DNA του φυσιολογικού πληθυσμού στην ίδια φάση

Πίνακας Συσχέτιση του δείκτη ID και της ανευπλοειδίας

Δείκτης DNA (ID)	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ
1.00	Διπλοειδικός (2n)	46
0.50	Απλοειδικός (1n)	23
2.00	Τετραπλοειδικός (4n)	92
<1.00	Υποπλοειδικός	<46
>1.00	Υπερπλοειδικός	>46
Όχι 0.5, 1.0, ή 2.0	Ανευπλοειδικός	Απόκλιση από το ακριβές πολλαπλάσιο του απλοειδικού

Οι διαταραχές της πλοειδίας ανιχνεύονται με την κυτταρομετρία μόνο όταν το ποσό του DNA υπερβεί ένα όριο και αυτό για πολλούς είναι ο αριθμός +/- τρία τουλάχιστον χρωμοσώματα (από 46 σε 43 ή 49 χρωμοσώματα)

Διαχωρίζοντας διάφορα στάδια του ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

□ Διαφορετική χρώση του DNA και RNA

Πορτοκαλί ακριδίνης

(σε ds εκπέμπει στο πράσινο, σε ss εκπέμπει στο κόκκινο.

-Προηγείται σύντομη μονιμοποίηση των κυττάρων με φορμαλδεΰδη

-ακολουθεί μερική in vitro μετουσίωση του DNA με σύντομη έκθεση σε οξύ και επώαση με AO σε χαμηλό pH.

-Η ευαισθησία του DNA στην in situ μετουσίωση είναι μεγαλύτερη στη συμπυκνωμένη χρωματίνη των κυττάρων στη μίτωση σε σχέση με αυτή στη μεσόφαση (κάτι ανάλογο συμβαίνει και στα αποπτωτικά κύτταρα), δεν μπορεί να διακρίνει τα αποπτωτικά από τα μιτωτικά κύτταρα. Πολύ χρήσιμη σε περιπτώσεις που η παρουσία αποικοδομημένου DNA στα νουκλεοσώματα δεν είναι φανερή.

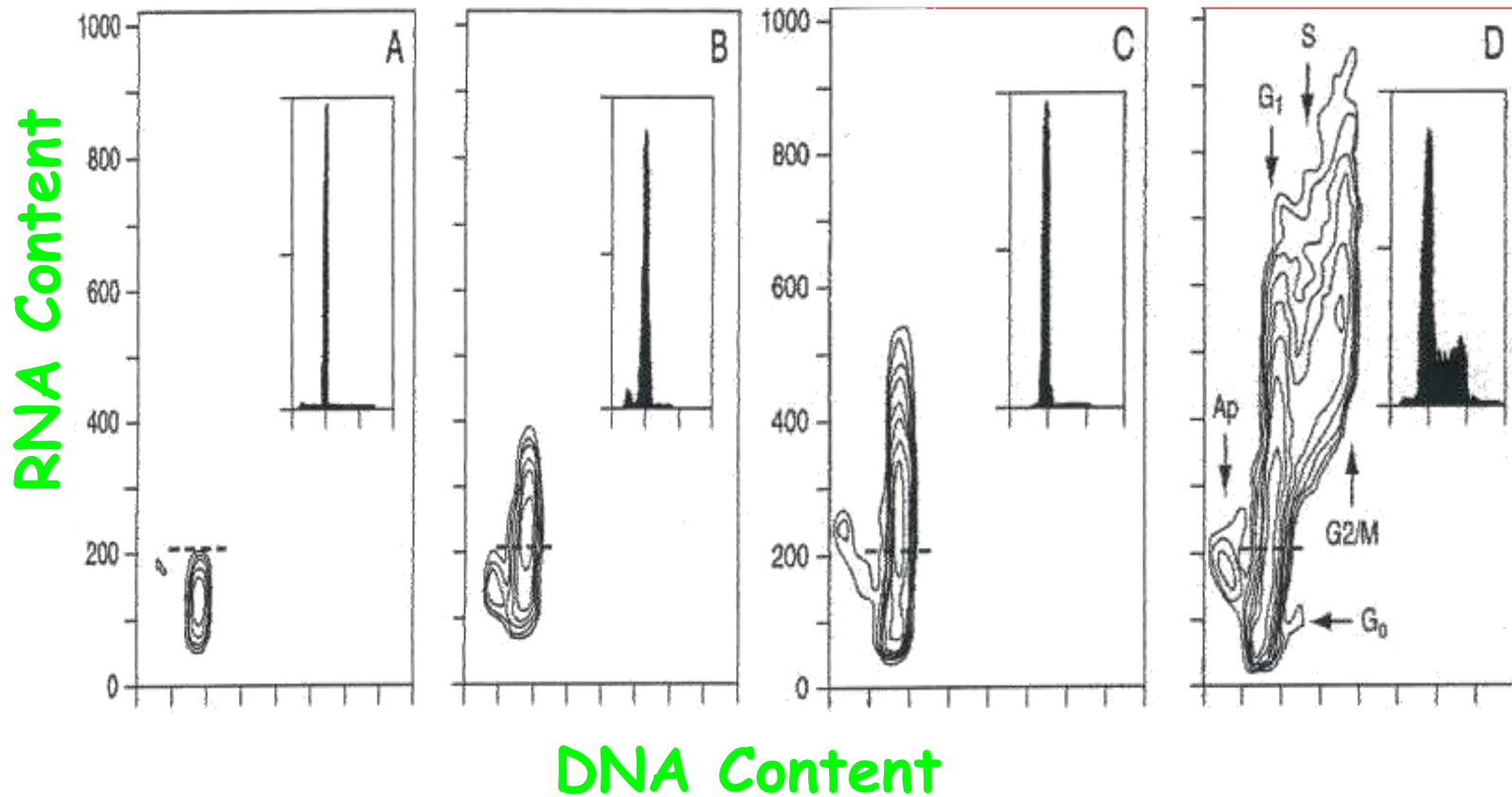
Διάφορα πρωτόκολλα κυτταρομετρίας

□ BrdU ενσωμάτωση (η bromodeoxyuridini είναι ανάλογο της θυμίνης, η οποία ενσωματώνεται στο DNA των κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση)

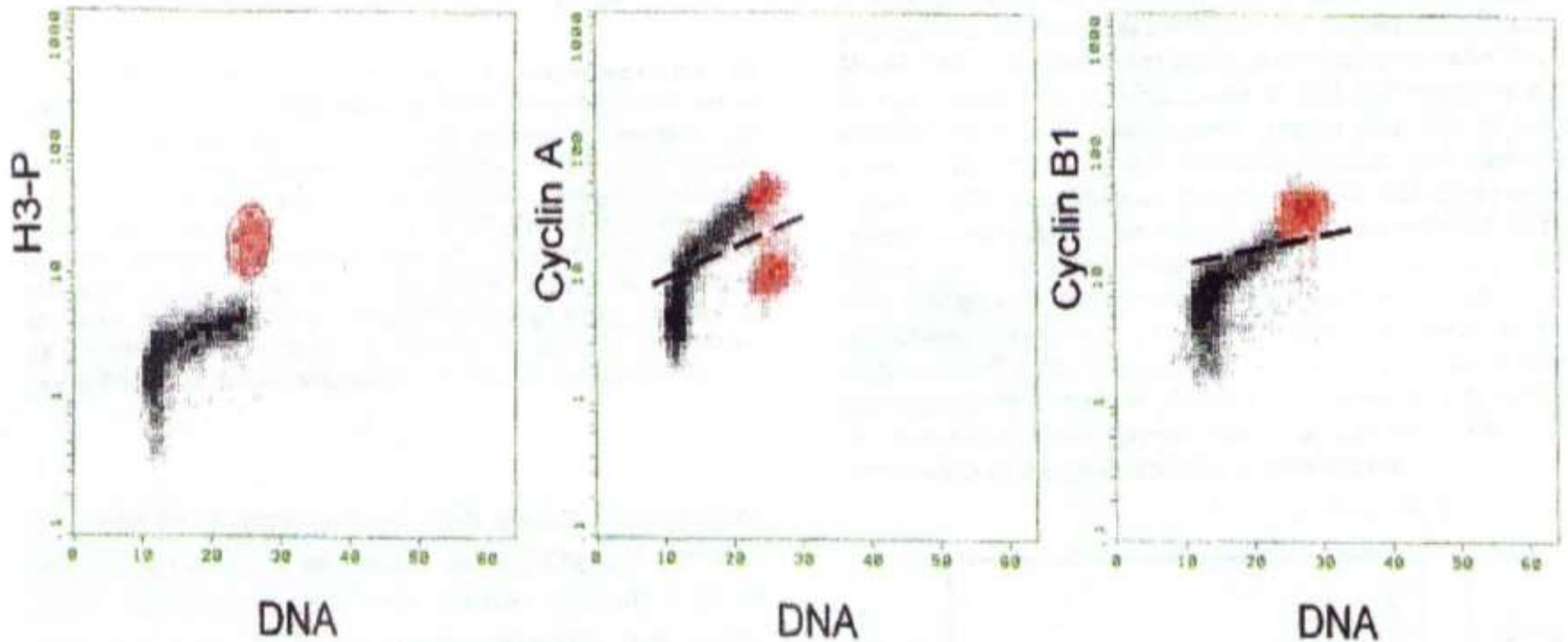
□ ανάλυση κυκλίνης

Acridine Orange

- Διαχωρίζει την G_0 από την G_1



Μιτωτικά κύτταρα-ιστόνη H3-P



Αντιδρούν με κύτταρα από την πρόφαση στην τελόφαση,
και ασθενέστερα στη μεσόφαση

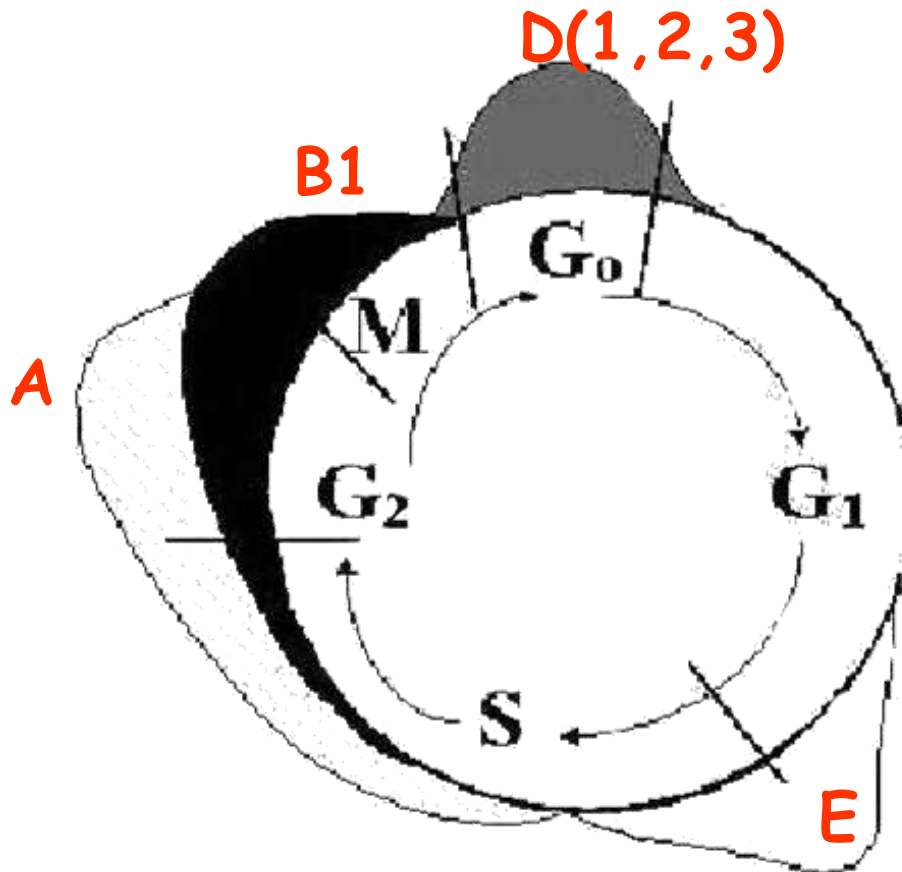
Ανάλυση κυκλινών

- Βασισμένη στο κυτταρικό κύκλο
- Ανάλογα με την έκφραση των πρωτεϊνών των κυκλινών

Οι κυκλίνες είναι μία τάξη προϊόντων γονιδίων που ελέγχουν τη μετάβαση των κυττάρων από μια φάση του κυτταρικού κύκλου σε άλλη. Σε φυσιολογικά κύτταρα αυτά τα σημεία ελέγχου είναι προβλέψιμη. Σε διαταρασσόμενα ή καρκινικά κύτταρα έχουν αλλάξει οι σχέσεις αυτές, συχνά οδηγούν σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη

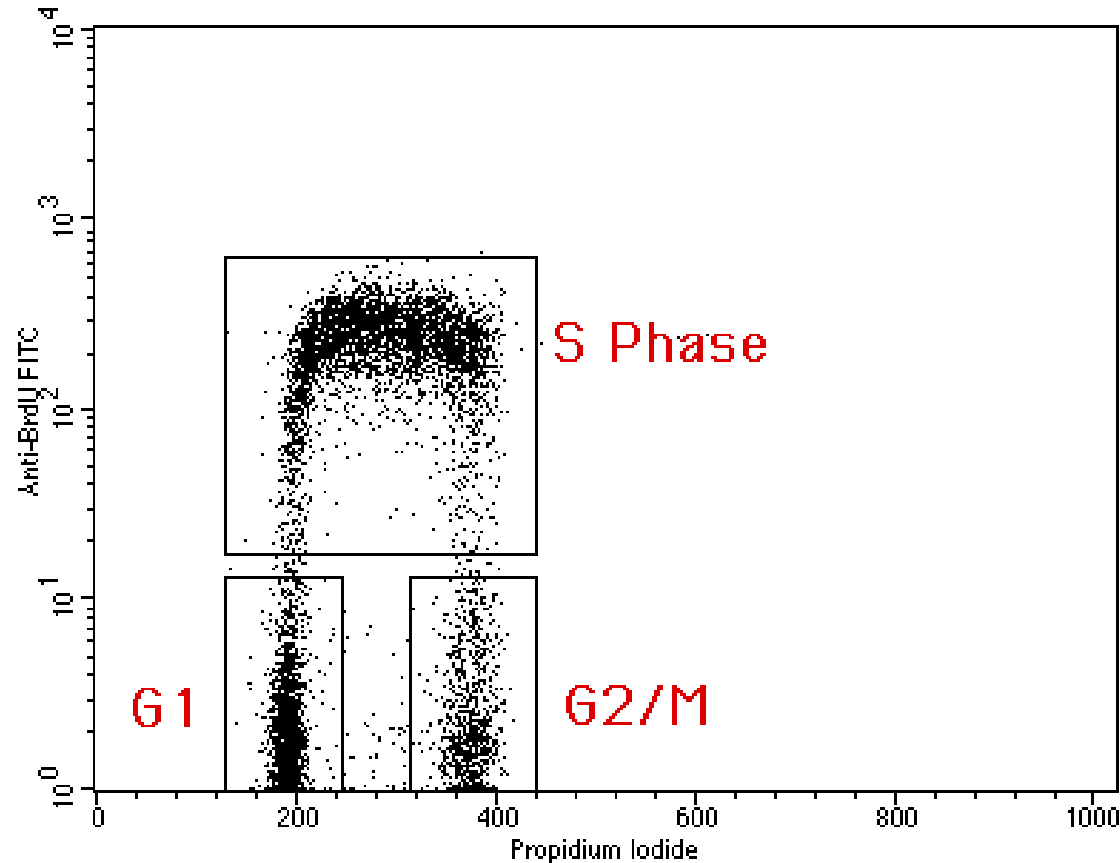
Cyclin	Cell cycle phase	cdk Protein	Localization
A	S and G2/M	cdc2/cdk1,cdk2	Nucleus
B1	G2/M	cdc2/cdk1	cytoplasm
B2	G2/M	cdc2/cdk1	cytoplasm
B3	G2/M	cdc2/cdk1,cdk2	Nucleus
D1	G1	cdk4/cdk6/cdk2	Nucleus
D2	G1	ND	Nucleus
D3	G1	cdk4/cdk6	Nucleus
E	G1/S	ND	Nucleus
H	All phases	CDK7	ND

Η έκφραση των διαφόρων κυκλινών στον κυτταρικό κύκλο



Καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μη φυσιολογική ή ακατάλληλη (inappropriate) ανάρμοστη έκφραση αυτών των κυκλινών σε αυτά τα σημεία στον κυτταρικό κύκλο

Ενσωμάτωση-BrdU



- Λόγω της ανάγκης για δίκλωνο DNA για τη χρώση, και την ανάγκη για μετουσιωμένο DNA ώστε να γίνει η δέσμευση και η ανίχνευση του BrdU, ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΚΟΛΟΥΘΟΥΝΤΑΙ ειδικές κατευθυντήριες γραμμές προετοιμασίας του δείγματος περισσότερο εμπειρικά για κάθε τύπο κυττάρου.

Συμπερασματικά.....

- Θα πρέπει να γνωρίζετε ότι με τη κυτταρομετρία ροής υπάρχουν πολλές δυνατότητες που σχετίζονται με την ανάλυση των νουκλεϊνικών οξέων.
- Βεβαιωθείτε ότι η μέθοδος που επιλέξατε είναι η καλύτερη για το πείραμά σας.

Δηλαδή. Θα λάβετε τα πιο σημαντικά δεδομένα που είναι δυνατόν;

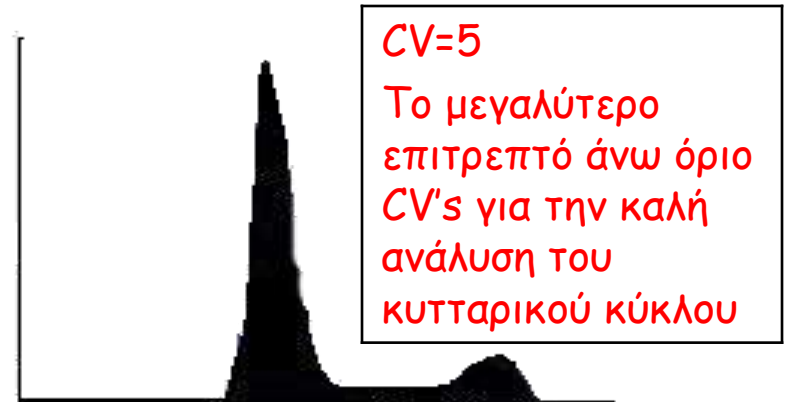
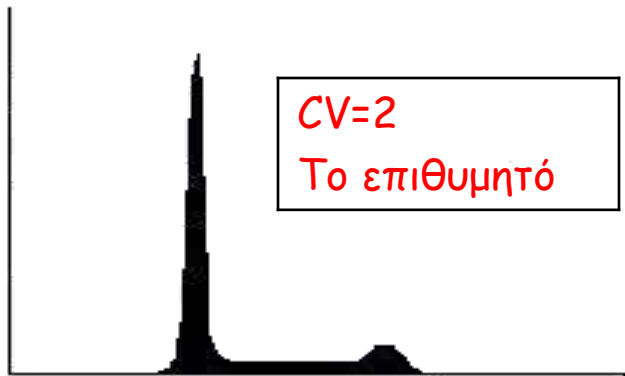
- **Μέρος III**

Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με PI

Ποιοτικός έλεγχος για την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων

- **Έλεγχοι**
 - Περιορίστε τα $cn's$
 - Σε περίπτωση που σχηματίζουν ζεύγη και τρίδυμα (εκτός)
 - Πρέπει να είναι μεγάλο όσο το δυνατόν
 - Πρέπει να περιέχουν αληθή κύτταρα του κύκλου
- **Διαδικασία χρώσης πρέπει να εκτελείται αυστηρά**
- **Υπολείμματα χρωστικής σε σωλήνες μπορεί να παραποιήσουν τα δεδομένα**
- **Ανάλυση Δεδομένων**

Επίδραση του CV στο κυτταρικό κύκλο



Η προετοιμασία των δειγμάτων

- Υπάρχουν προγράμματα μοντελοποίησης που αφαιρούν τα συντρίμια, λαμβάνονται όμως καλύτερα αποτελέσματα όταν αφαιρούνται τα νεκρά κύτταρα με φυγοκέντρηση σε Ficoll / Histopaque
- Όλα τα αντιδραστήρια να είναι free DNase δηλ. να τα έχουμε βράσει για 15 λεπτά τουλάχιστον.

Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με ΡΙ

- Πρωτόκολλο
- Προετοιμασία των δειγμάτων
- Διάκριση των Doublet
- Ανάλυση των δεδομένων

Η ανάλυση κυτταρικού κύκλου με PI

- Πλένονται τα κύτταρα 2X σε PBS για να απαλλαγούμε από τις πρωτεΐνες του ορού.
- Επανεωρείται το ίζημα σε PBS (έως 3×10^6 κύτταρα σε 1,2 ml)
- Βεβαιωθείτε ότι το PBS είναι ελεύθερο από Ca και Mg. Η παρουσία των Ca και Mg στο PBS προκαλεί συγκόλληση των κυττάρων.
- Προσθέστε 3,0 ml 95% αιθανόλης στάγδην υπό στροβιλισμό (vortexing).
- Η μονιμοποίηση σε αυτό το τελικό διάλυμα αιθανόλης 70% για τουλάχιστον 30 λεπτά. Τα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν σε αυτό το διάλυμα για μέχρι μία εβδομάδα.
- Πλύση των κυττάρων 2X σε PBS σε συνολικό όγκο 15ml. Φυγοκέντρηση στις 2000-2200rpm για 10 min. Το ίζημα των κυττάρων εκτός της αιθανόλης είναι πιο δύσκολο να επανεωρηθεί και απαιτείται μεγαλύτερη περιστροφή. Εάν δεν γίνει αυτό, αυτό το βήμα μπορεί να ευθύνεται για μια δραματική απώλεια των κυττάρων.
- Επαναιωρούμε το ίζημα σε 4,5 ml PBS. Προσθέστε 0,5 ml RNase από διάλυμα αποθέματος. Επωάζουμε για 30 λεπτά στους 37C.
- Πλύνετε 2X σε PBS
- Καταμέτρηση των κυττάρων
- Επαναιωρήσετε σε 0,5 έως 2,0 ml διαλύματος χρώσης PI (τελική συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα / ml) & επωάστε για 30 λεπτά στους 4C ή σε πάγο.
- Αναλύστε

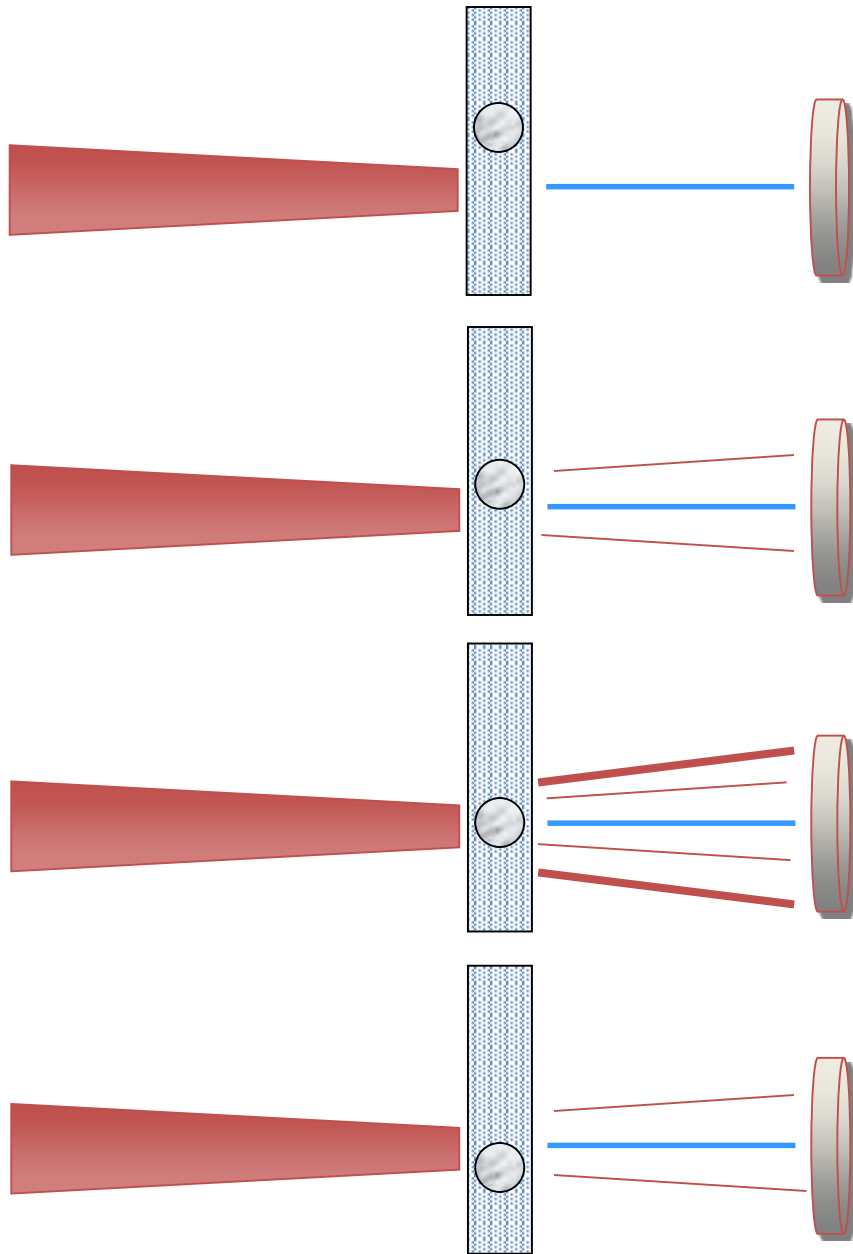
Περίληψη για την διάκριση των Doublet

- ◆ Ο ορισμός της doublet (για αυτή την ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ) ορίζεται ως δύο $G0/G1$ κύτταρα κολλημένα μαζί, καθώς διασχίζουν το λείζερ
- ◆ Ο κυτταρομετρητής επεξεργάζεται τον παλμό ως ένα συμβάν, γιατί ο παλμός ο οποίος παράγεται ποτέ δεν πέφτει κάτω από ένα ορισμένο όριο (a set threshold level).
- ◆ Έτσι δύο $G0/G1$ κύτταρα θα έχουν ένα παρόμοιο ύψος παλμού σαν ενός στην $G2/M$ φάση.
- ◆ Αυτό οδηγεί σε μια εσφαλμένη υπερεκτίμηση των κυττάρων που είναι στη $G2/M$.
- ◆ Αν και ένα $G2+M$ κύτταρο έχει διπλάσιο όγκο ενός $G0/G1$ φάσης κύτταρο, η διάμετρος του αυξάνει μόνο κατά $\sim 26\%$.
- ◆ Από την άλλη πλευρά, η συνδυασμένη διάμετρος ενός $G0/G1$ doublet είναι διπλάσιο ενός μονήρους γεγονότος $G0/G1$, υπό την προϋπόθεση ότι η υδροδυναμική εστίαση ευθυγραμμίζει τα κύτταρα στην κατεύθυνση της ροής.
- ◆ Συνεπώς, η αναλογία πλάτους προς επιφάνεια (width to area), η οποία είναι μια μέτρηση συνολικού φθορισμού, και το μήκος του χρόνου που παίρνει το κύτταρο για να διασχίσει την ακτίνα λείζερ, παρουσιάζουν αυξήσεις σε δυσανάλογη τιμή σε μια doublet από ένα πραγματικό κύτταρο στη φάση $G2$.
- ◆ Επομένως, η ανάλυση του παλμού πλάτους (pulse width) καθιστά δυνατόν να βρούμε τα doublets.

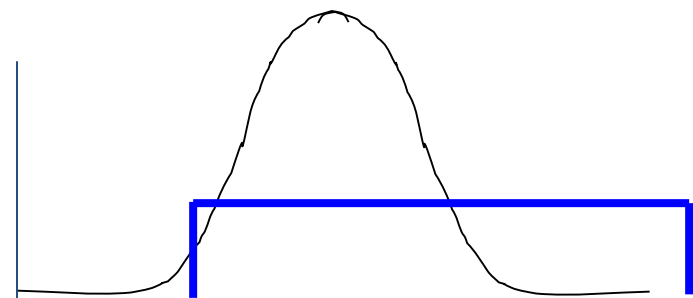
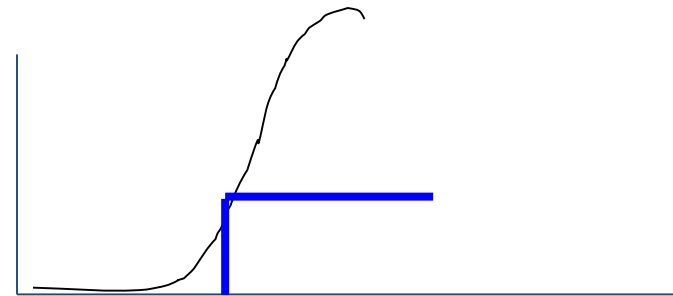
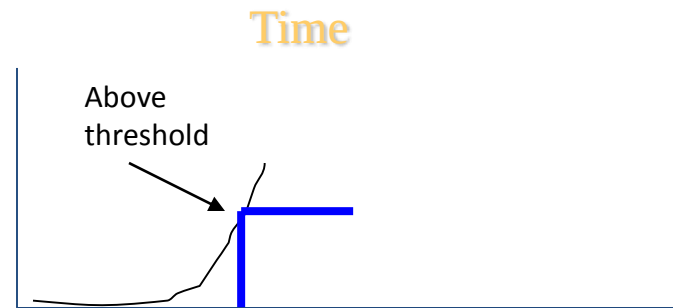
Η τάση παλμού

- Όταν ένα κύτταρο περνά μπροστά από το λέιζερ, όλο και περισσότερο φως φθορισμού εκπέμπεται έως ότου το κύτταρο είναι στο κέντρο του λέιζερ (maxim)
- Καθώς το κύτταρο αφήνει το λέιζερ, και λιγότερο φθορίζον φως εκπέμπεται
- Και με δεδομένο, ότι εκπέμπονται φωτόνια τα οποία μετατρέπονται σε φωτοηλεκτρονία στο PMT, αυτό δημιουργεί ένα παλμό τάσης

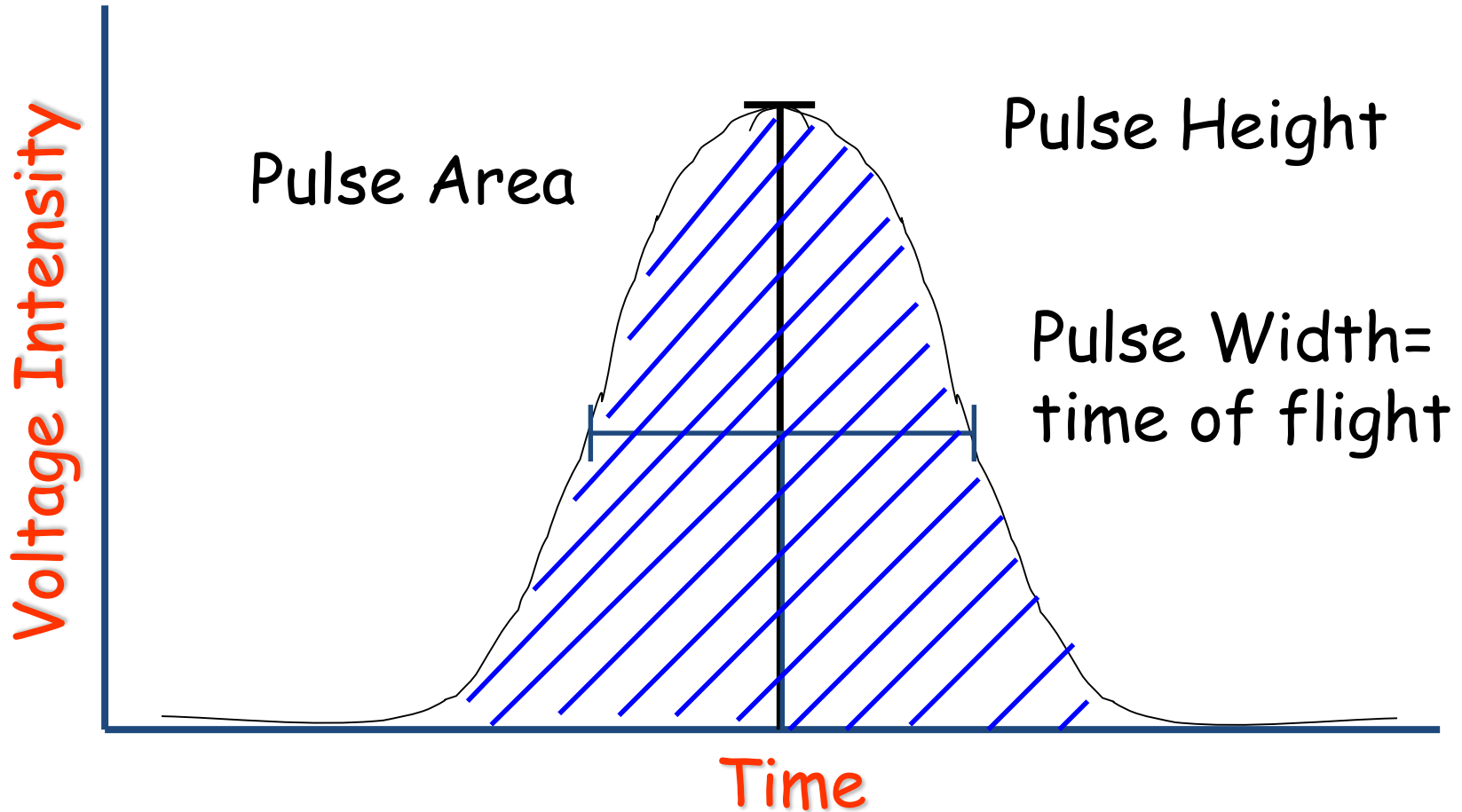
Ο παλμός



FL-2 Height detector



Η μέτρηση του παλμού



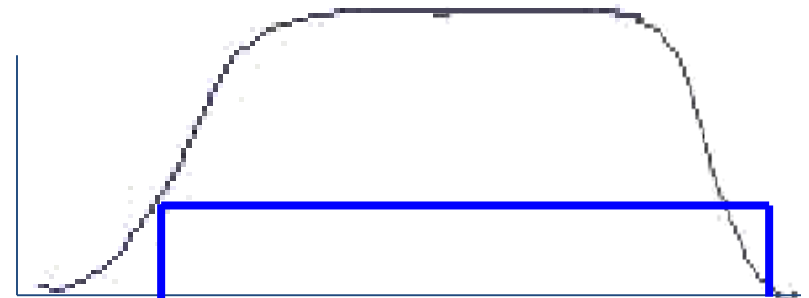
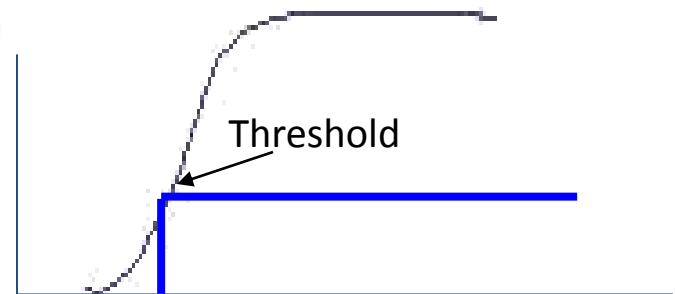
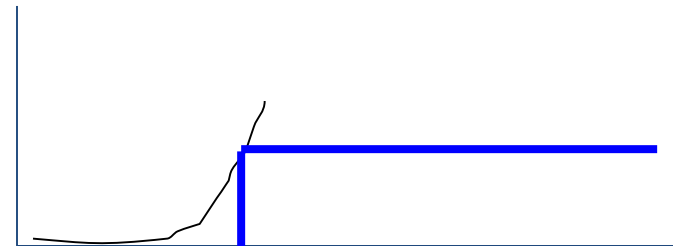
Μέτρηση του παλμού Doublet



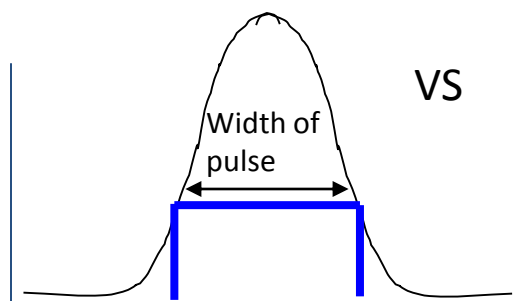
FL-2 Height detector



Time

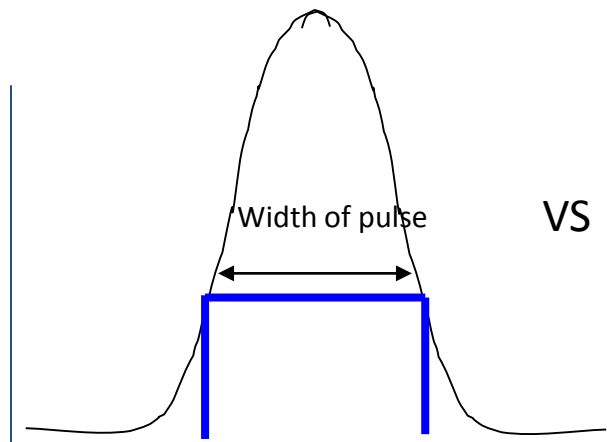


Single G_0 pulse



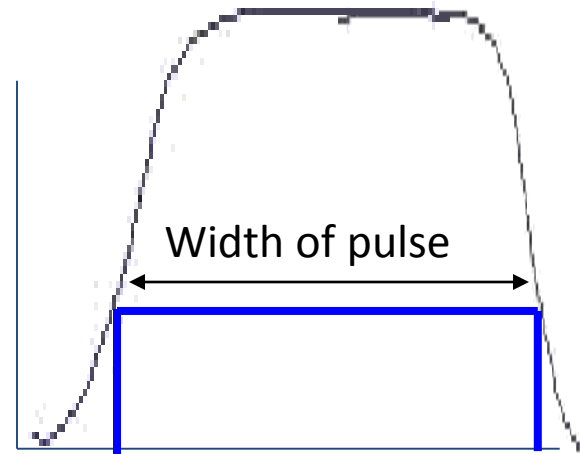
Width= W

Single G_2 pulse



Width= $W+(W \cdot .26)$

Doublet pulse



Width $\sim 2W$

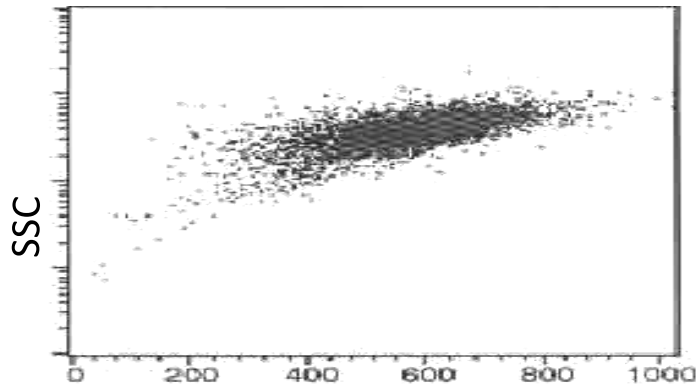
Τι δείχνουν αυτοί οι παλμοί?

1. Το πλάτος ενός μονού G_0 και G_2 είναι σχεδόν το ίδιο
2. Το ύψος του G_2 και της doublet είναι περίπου η ίδια
3. Αν δούμε μόνο στο ύψος παλμού, το κύτταρο G_2 δεν μπορεί να διαφοροποιηθεί από το doublet.

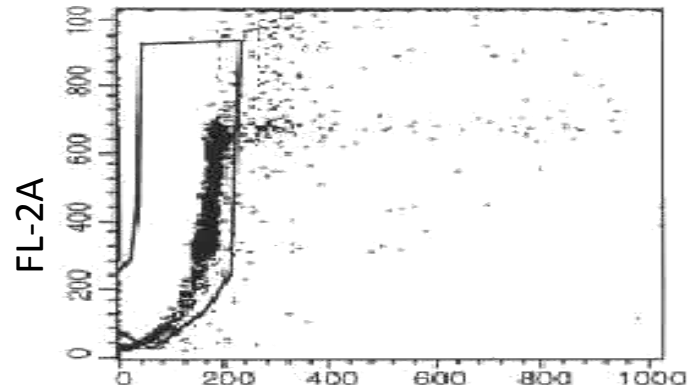
Συμπερασματικά.....

- Όσο καλύτερη είναι η προετοιμασία του δείγματος τόσο πιο σημαντικά στοιχεία θα βρείτε
- Οι περισσότερες κοινές πηγές των σφαλμάτων που σχετίζονται με την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου είναι?
 - DNase στα διαλύματα
 - Δεν προστίθεται η αιθανόλη στάγδην κατά το στροβιλισμό
 - Μήπως δεν προσθέτουμε Rnase??
 - Απώλεια των κυττάρων κατά τη διάρκεια των βημάτων πλύσεως, ειδικά όταν τα γυρίζουμε προς τα έξω με το διάλυμα της μονιμοποίησης με την αιθανόλη -τα χάνουμε.
- Οι διακρίσεις των Doublet είναι πολύ σημαντική για την εξάλειψη ψευδών G2/M κυττάρων.

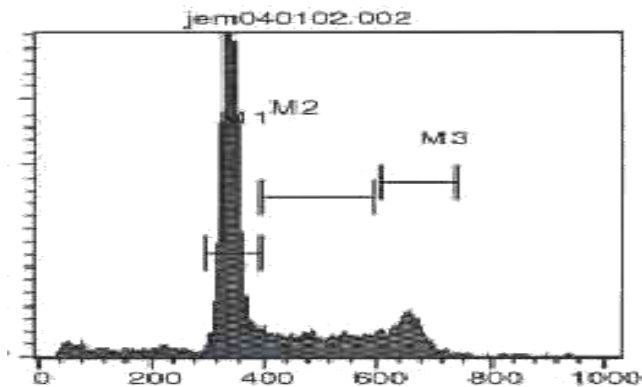
Instrument setup



FSC



FL-2W



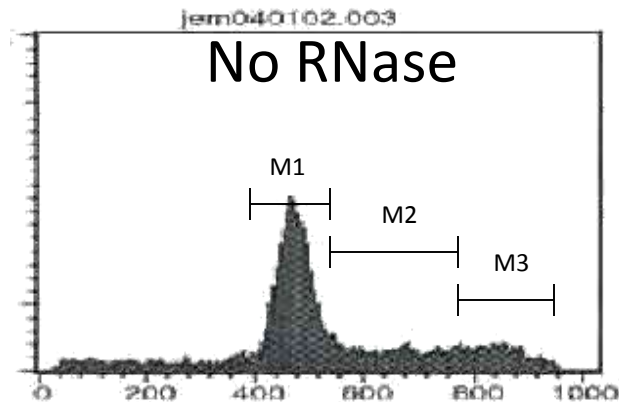
FL-2A

Histogram Statistics

File: jem040102.004
 Sample ID: 60min stain
 Tube:
 Acquisition Date: 1-Apr-2
 Gated Events: 9493
 X Parameter: FL2-A (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel:
 Gate: G1
 Total Events: 13493

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	CV
All	0, 1023	9493	100.00	70.35	409.53	28.13
M1	286, 388	6447	67.91	47.78	341.32	4.02
M2	393, 625	1953	20.57	14.47	511.16	13.49
M3	625, 790	1003	10.57	7.43	662.05	3.40



FL-2A

Histogram Statistics

File: jem040102.003
 Sample ID: No RNase 30min stain
 Tube:
 Acquisition Date: 1-Apr-2
 Gated Events: 9533
 X Parameter: FL2-A (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel:
 Gate: G1
 Total Events: 12661

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	CV
All	0, 1023	9533	100.00	75.29	543.26	26.55
M1	393, 528	5967	62.59	47.13	463.83	5.93
M2	528, 751	1780	18.67	14.06	634.24	10.66
M3	751, 916	1339	14.05	10.58	823.82	5.19

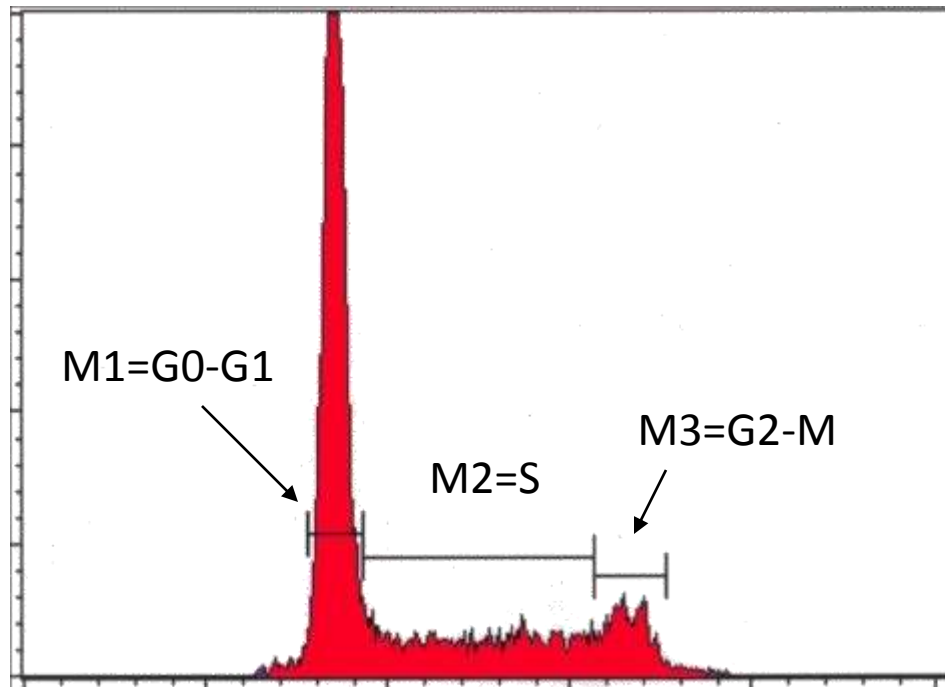
Data analysis

Οι κυτταρομετρητές είναι εξοπλισμένοι με τα κατάλληλα υπολογιστικά προγράμματα ώστε να δίδονται όλες οι πληροφορίες ως αναφορά τα ποσοστά των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και του φυσιολογικού και του ανευπλοειδικού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα δίδονται επί της εκατό των κυττάρων στις φάσεις G0/G1, S, G2/M.

- Cell quest
- Modfit
- WinList
- WinCycle
- Flowjo

Cellquest

vs Modfit

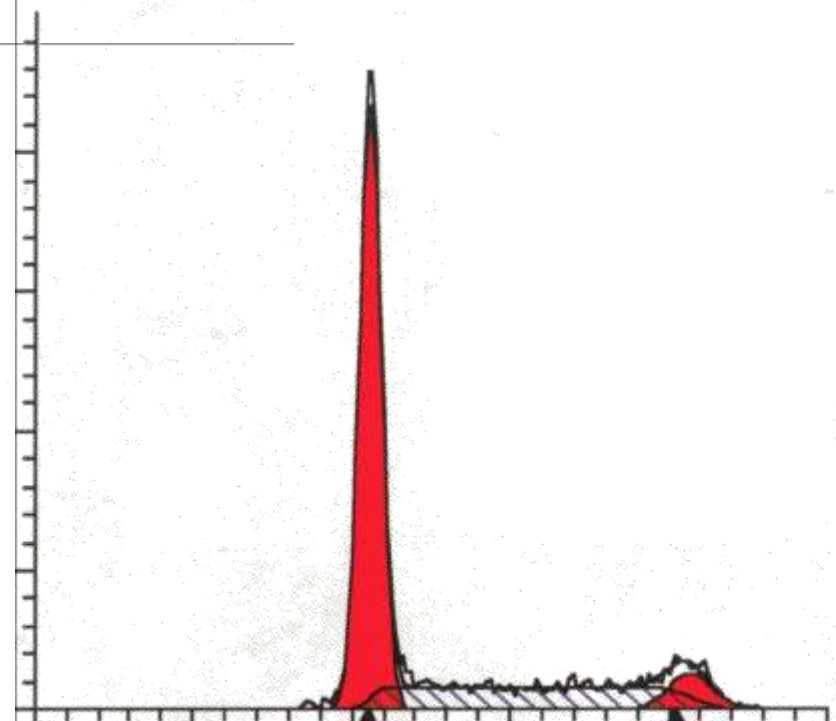


Histogram Statistics

File: jem040102.004
 Sample ID: 60min stain
 Tube:
 Acquisition Date: 1-Apr-2
 Gated Events: 9515
 X Parameter: FL2-A (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel:
 Gate: G1
 Total Events: 13493

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Peak Ch
All	0, 1023	9515	100.00	70.52	410.67	28.18	337
M1	312, 372	6150	64.63	45.58	340.65	3.27	337
M2	372, 626	2250	23.65	16.68	496.19	15.68	372
M3	626, 706	969	10.18	7.18	660.18	2.87	656

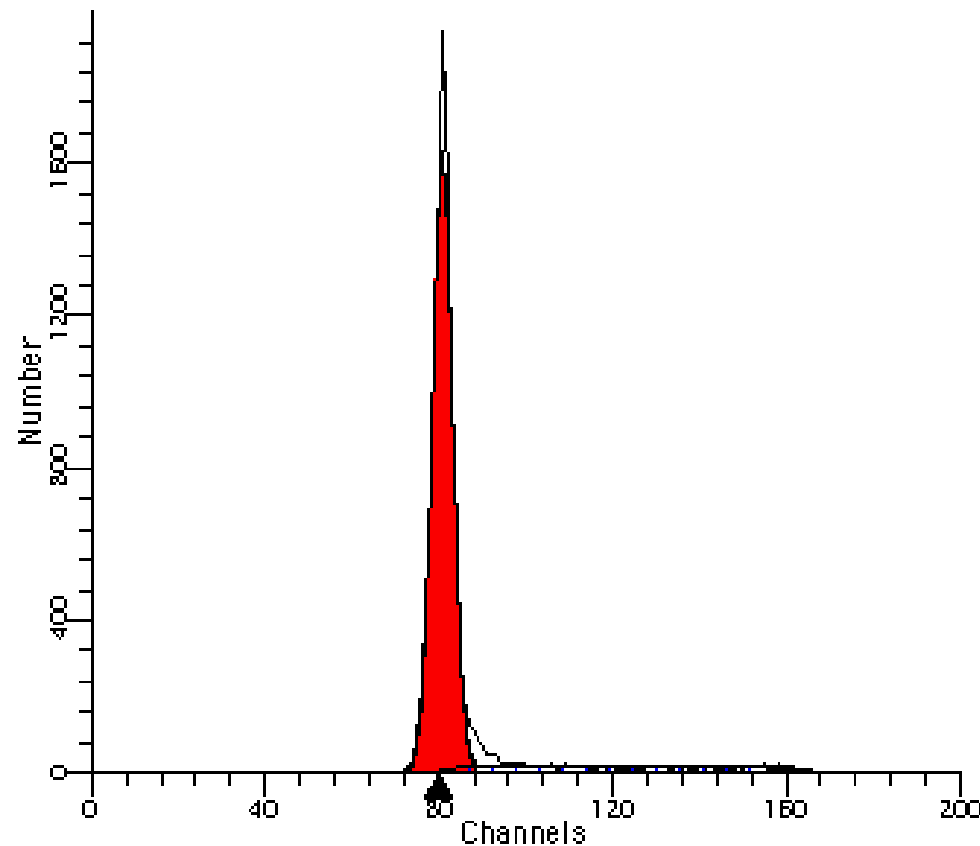


Date acquired: 1-Apr-2
 File: jem040102.004
 Source: 60min stain
 Case: PATIENT ID
 Analysis type: Automatic analysis

DIPLOID: 100.00 %

Dip G0-G1: 63.69 % at 84.56
 Dip G2-M: 7.52 % at 165.45
 Dip S: 28.79 % G2/G1: 1.96
 Dip %CV: 3.23
 Total S-Phase: 28.79 %

Extra Pop: %
 Debris: 0.00 %
 Aggregates: 0.00 %
 Modeled Events: 9288
 RCS: 1.237



Date acquired: 05-Sep-01
File: ALIAGAS XRHST05.001
Source: SAMPLE ID
Case: PATIENT ID
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

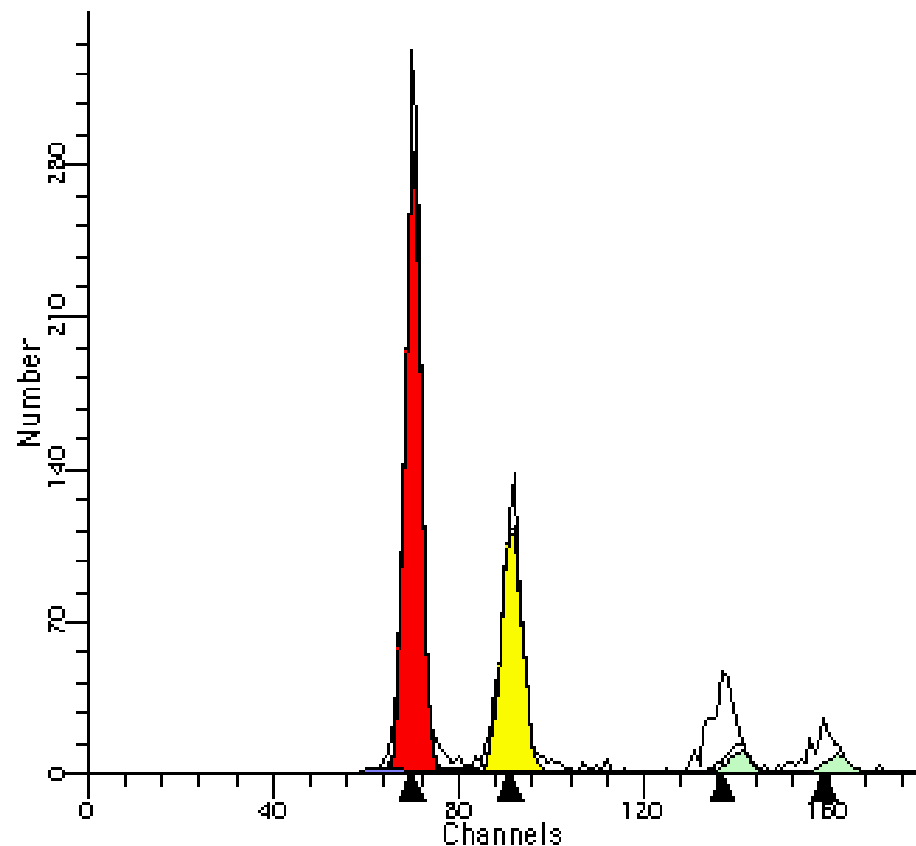
DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 89.40 % at 80.77
Dip G2-M: 0.00 % at 161.53
Dip S: 10.60 % G2/G1: 2.00
Dip %CV: 2.80

Total S-Phase: 10.60 %

Extra Pop: %
Debris: 0.49 %
Aggregates: 0.75 %
Modeled Events: 10564
RCS: 3.101

Diploid B.A.D.: 0.45 %

S-Phase Assessment Not Active.



S-Phase Assessment Not Active.

Date acquired: 30-Aug-01
 File: mpalatsinos.gerasimos.001
 Source: SAMPLE ID
 Case: PATIENT ID
 Analysis type: Manual analysis
 Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 68.29 %
 Dip G0-G1: 89.70 % at 70.22
 Dip G2-M: 1.28 % at 140.45
 Dip S: 9.03 % G2/G1: 2.00
 Dip %CV: 2.25
 ANEUPLOID 1: 31.71 %
 An1 G0-G1: 100.00 % at 91.57
 An1 G2-M: % at
 An1 S: 0.00 % G2/G1:
 An1 %CV: 2.32
 An1 DI: 1.30

Total S-Phase: 6.17 %

Extra Pop: %
 Debris: 4.01 %
 Aggregates: 6.67 %
 Modeled Events: 2169
 RCS: 2.741

Diploid B.A.D.: 4.94 %

Aneuploid B.A.D.: 0.00 %

Total B.A.D.: 0.00 %

DNA QC Particles (Becton Dickinson
No.
349523 [95-0023])

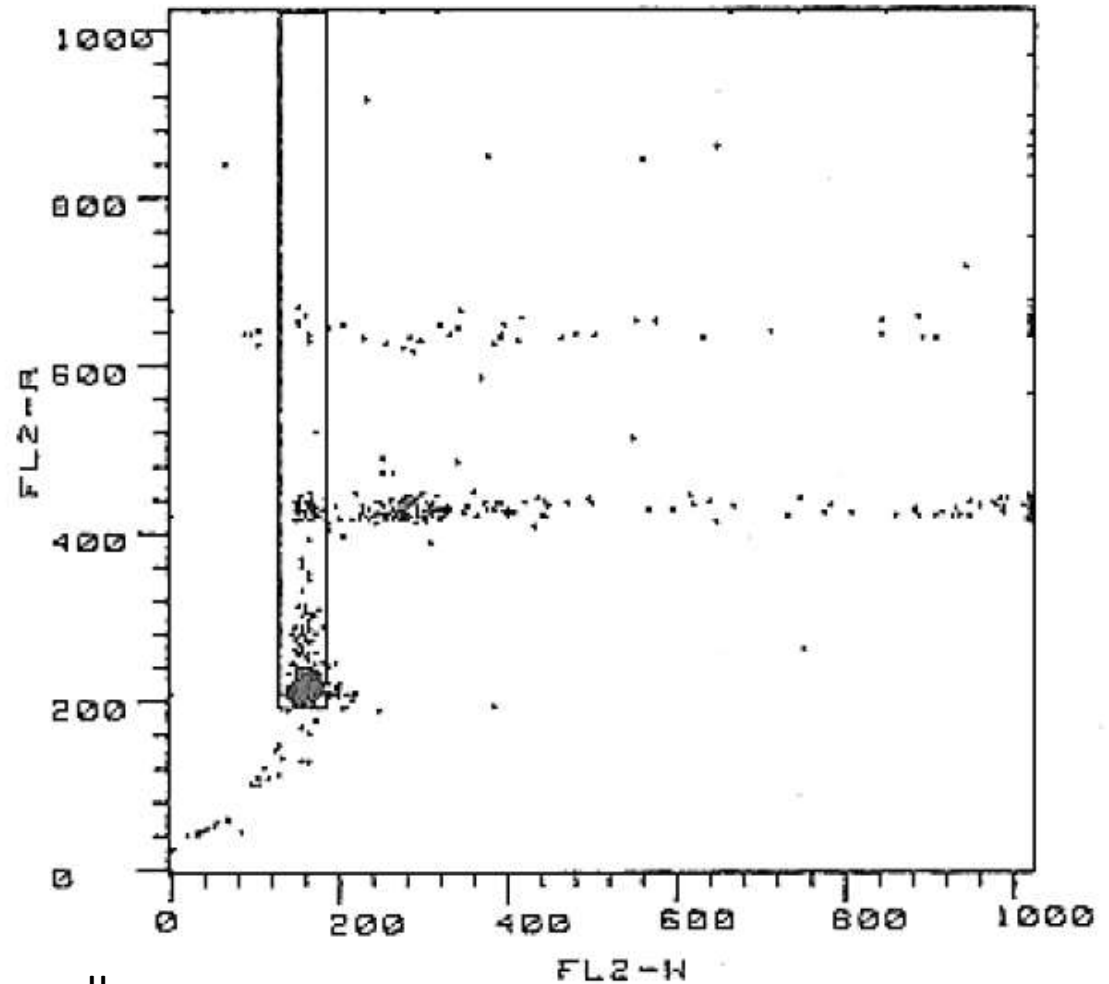


Figure 1. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): FL2-Width versus FL2-Area dot plot showing a singlet gate, which excludes aggregates. PBMCs may be mixed with tumor samples as an internal control.

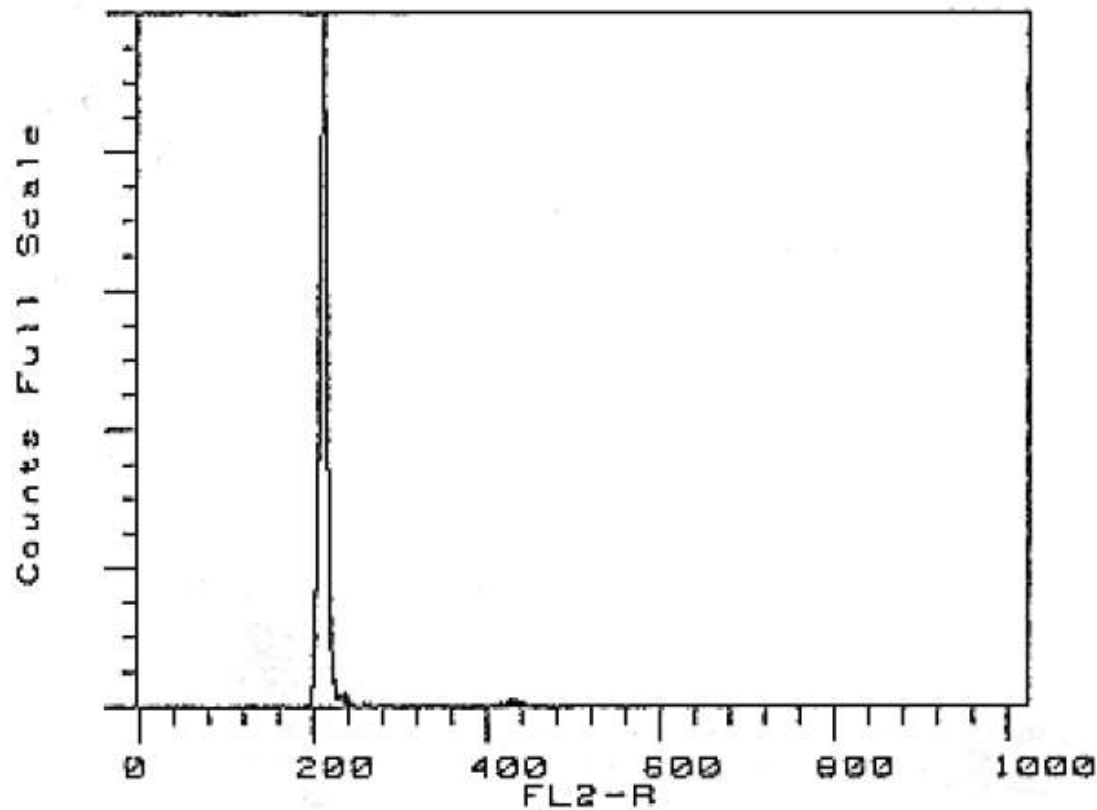


Figure 2. FL2-A DNA histogram of PBMCs, which has been gated to exclude aggregates.

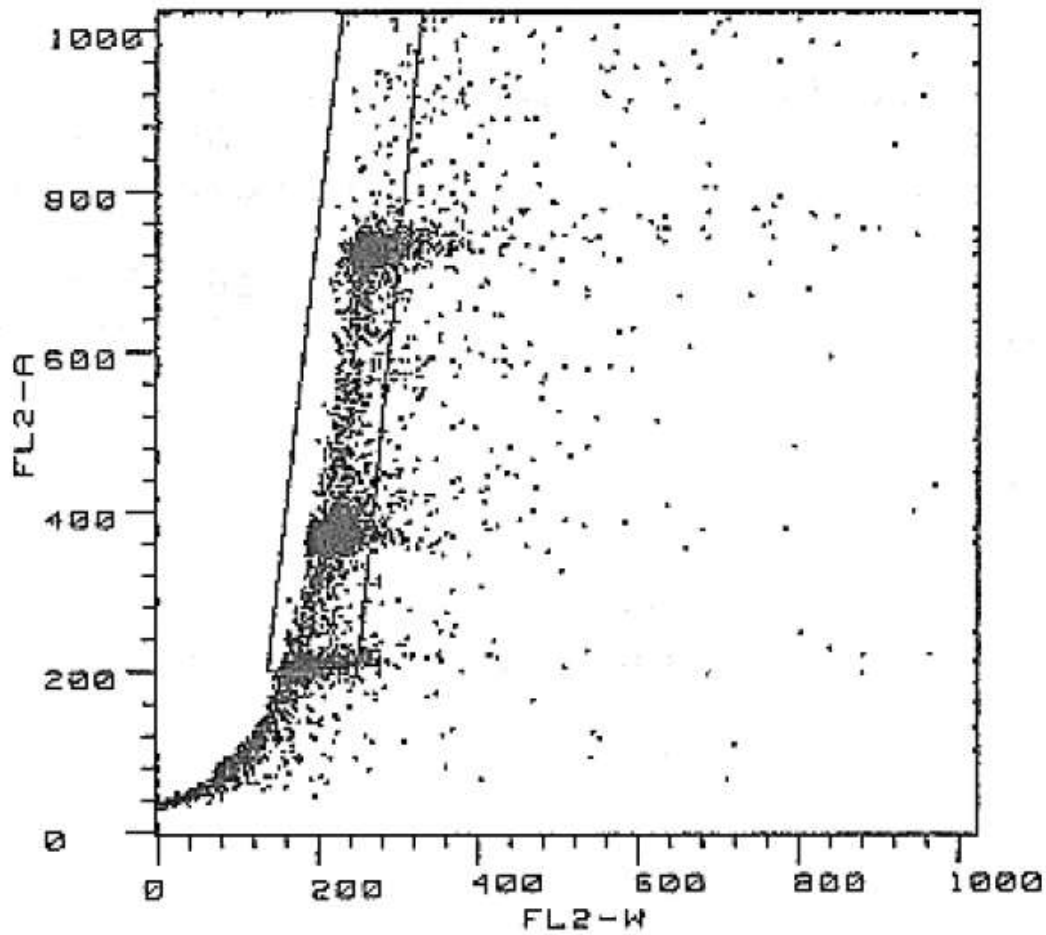


Figure 3. Breast tumor tissue: FL2-Width versus FL2-Area dot plot showing a singlet gate, which excludes aggregates.

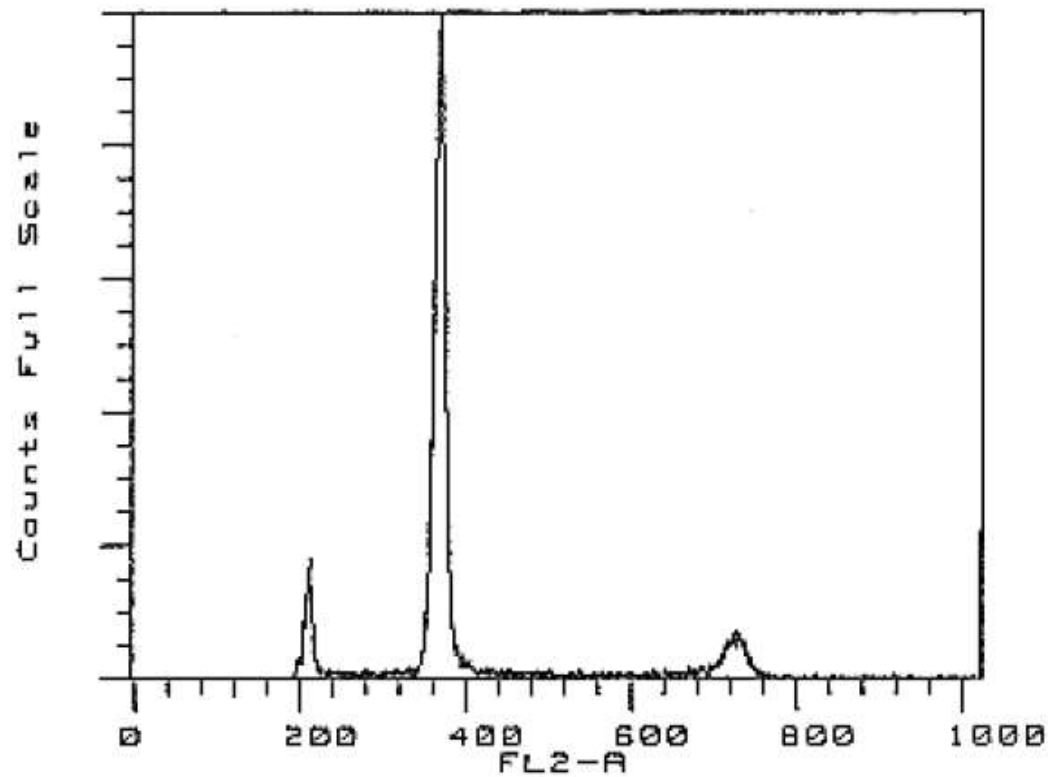


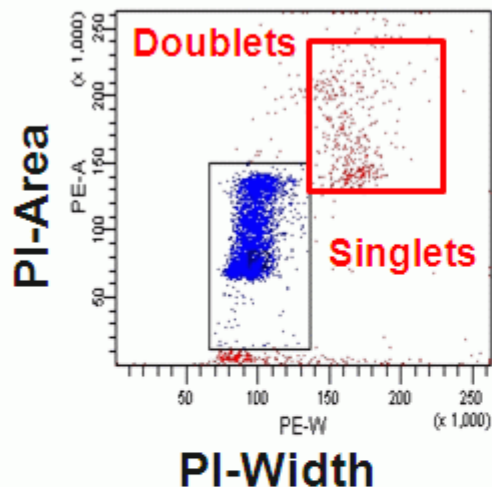
Figure 4. FL2-A DNA histogram of breast tumor tissue, prepared by in vitro FNA, which has been gated to exclude aggregates.

10. TROUBLESHOOTING

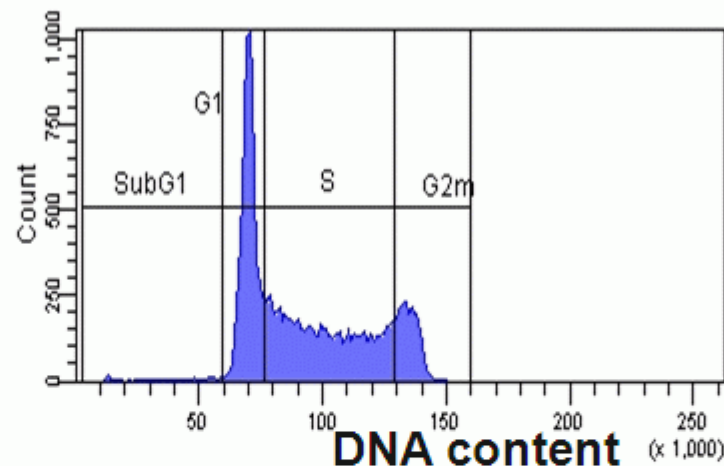
Problem	Cause	Solution
<i>Sudden change or slow drift of diploid G_0 G_1 peak location.</i>	1. Air bubbles or clogs in fluidics system. 2. Different tonicity of sheath and sample fluids. 3. Insufficient PI staining. 4. Insufficient incubation of nuclei in PI.	1. Flush fluidics and clear lines of air. 2. Check quality of sheath fluid. 3. Check concentration of nuclei and adjust. 4. Increase incubation time.
<i>Presence of excess debris in fluorescence histogram.</i>	1. Necrosis in original specimen. 2. Incomplete cell lysis. 3. Particles in sheath fluid.	1. Visually check the tissue specimen for necrosis. 2. Check suspension for incomplete lysis. 3. Clean system and replace sheath fluid and/or sheath filter if necessary.
<i>Broadened peaks; Increased CVs.</i>	1. Flow rate too high. 2. Air bubbles in fluidics. 3. Necrotic cells included in sample.	1. Fluidics control switch should be placed on LO. 2. Check fluidics for air. 3. Check for presence of necrotic cells and prepare another sample.

Problem	Cause	Solution
<i>Shifting of peaks due to loss of fluorescence.</i>	1. Too many cells. 2. DNA not saturated with propidium iodide. 3. Residual bleach left in sample injection probe (SIP).	1. Check concentration of nuclei and adjust to optimum. 2. Stain another sample with correct concentration and volume of PI stain. 3. Ensure that fluidics are adequately rinsed after exposure to bleach.
<i>Few or no events being acquired.</i>	1. Incorrect mounting of sample tube. 2. No nuclei in sample. 3. Sample line clogged. 4. Debris in flow cell.	1. Remount sample tube or check for cracks in sample tube. 2. Check for presence of nuclei in the sample using a microscope. 3. Backflush and clean sample line. 4. Ensure that fluidics are rinsed thoroughly of sample fluid before placing the flow cytometer's fluidics control knob into STANDBY mode to prevent debris from adhering to the inside of the flow cell.

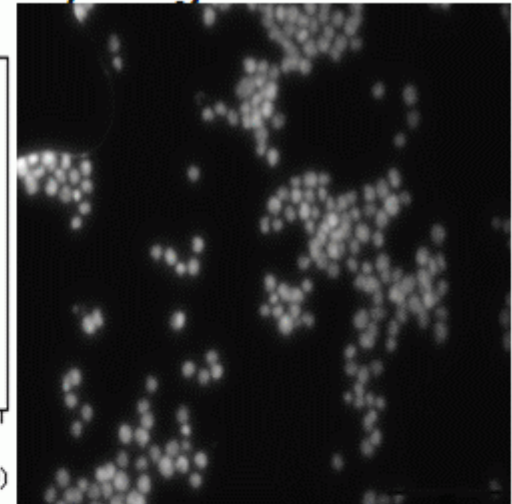
a) single cell gating



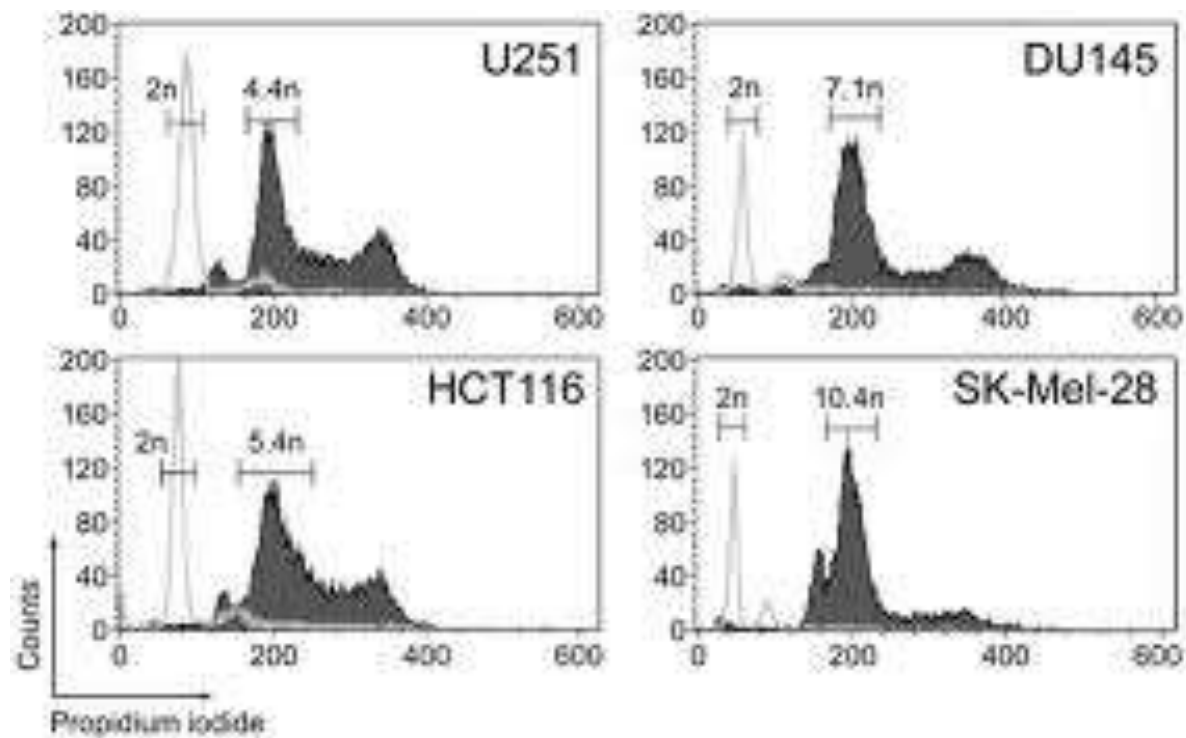
b) single cells



c) imaged PI cells



Legend. Processed cells labelled with PI (50 $\mu\text{g/ml}$) were gated on single cells via use of Width and Area signals a). Single cells were then marked to calculate G_1 , S phase, G_2m and any apoptotic cells in Sub G_1 b). Cells were also imaged d). Courtesy of Dr. William Ogunkolade, Neuroscience, ICMS, Barts & The Royal London, London University, 4 Newark Street, London E1 2AT.



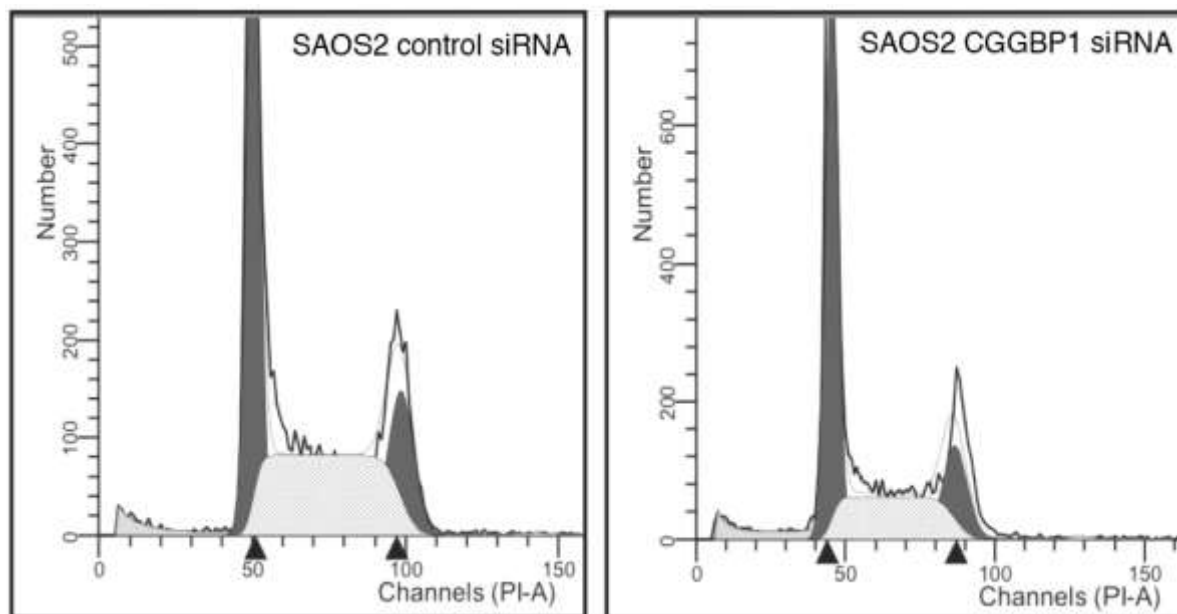
<http://cgp.iiarjournals.org/content/7/6/337/F3.large.jpg>

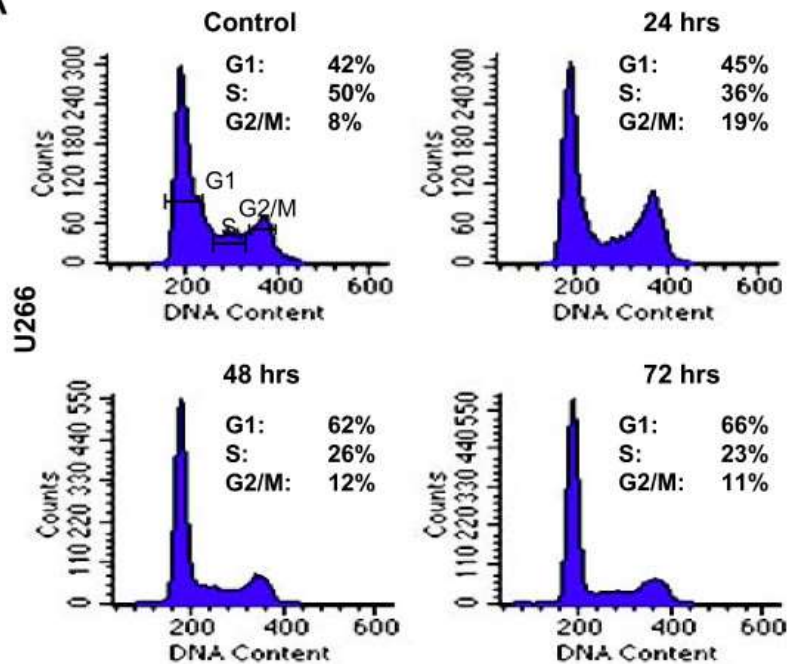
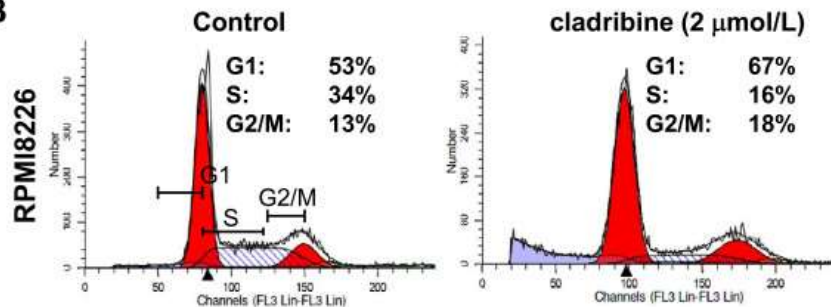
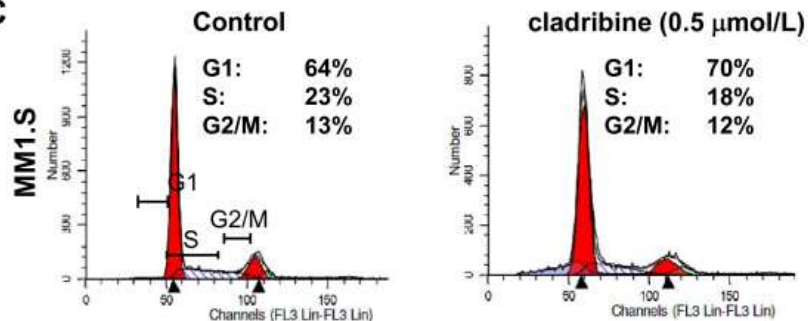
RESEARCH ARTICLE

Open Access

CGGBP1 regulates cell cycle in cancer cells

Umashankar Singh^{1*}, Pernilla Roswall², Lene Uhrbom¹ and Bengt Westermark¹



A**B****C**

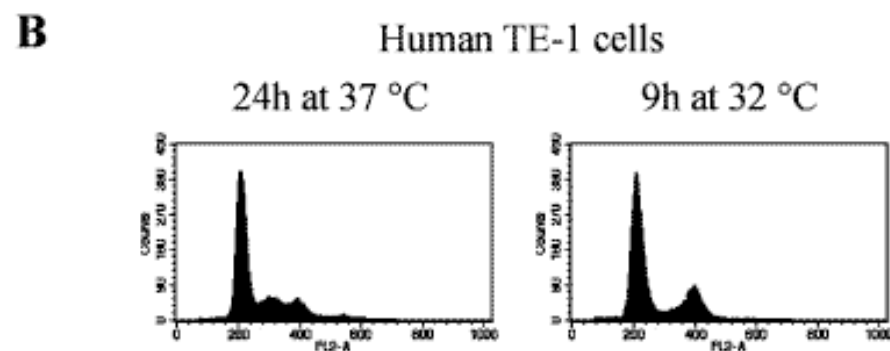
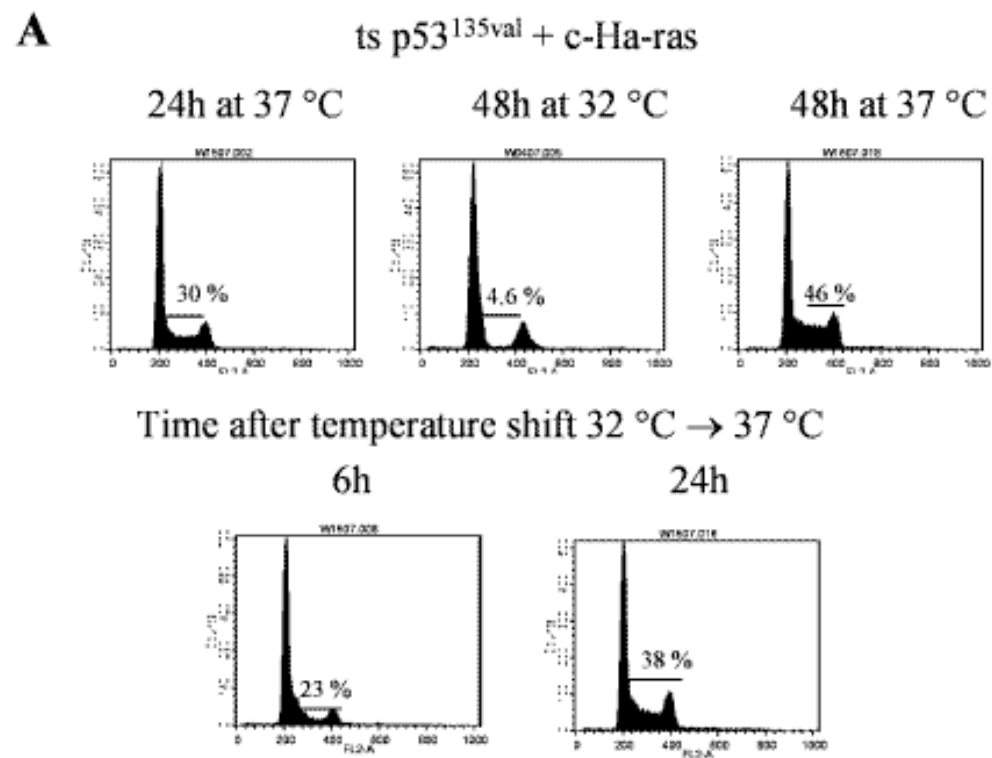


Fig. 2. p53-mediated G1 cell cycle arrest is reversible. Cells were detached from substratum by trypsinization and used for propidium iodide staining. DNA content of rat (A) and human (B) cells expressing conditional p53 mutants was measured by flow cytometry on the Becton Dickinson FACScan.

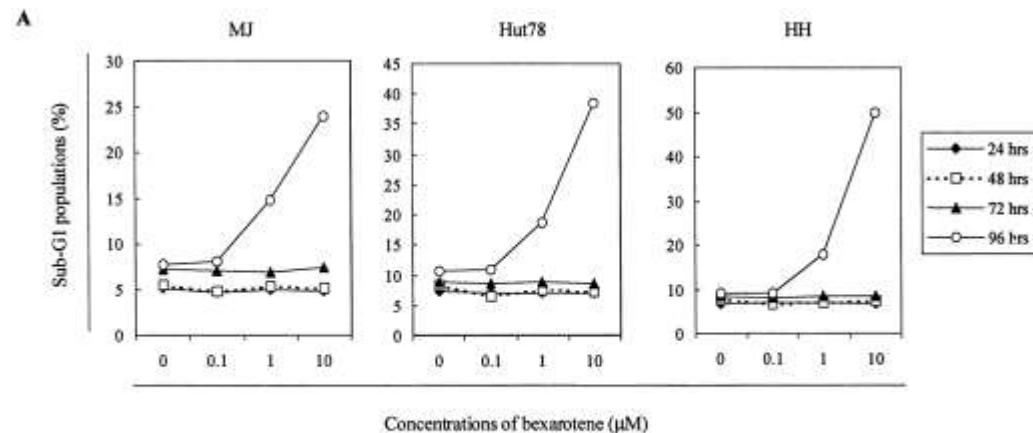
Clinical Cancer Research



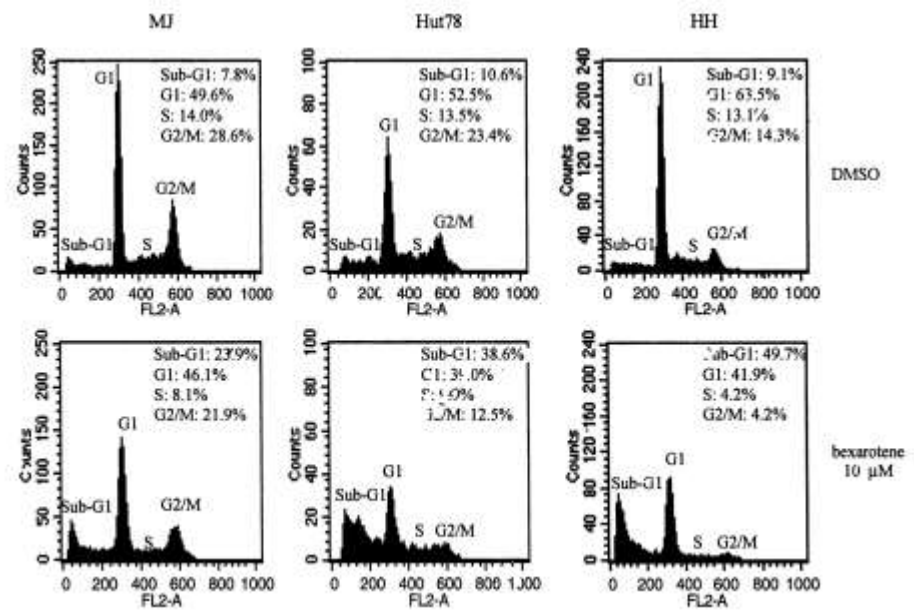
Induction of Apoptosis by Bexarotene in Cutaneous T-Cell Lymphoma Cells : Relevance to Mechanism of Therapeutic Action

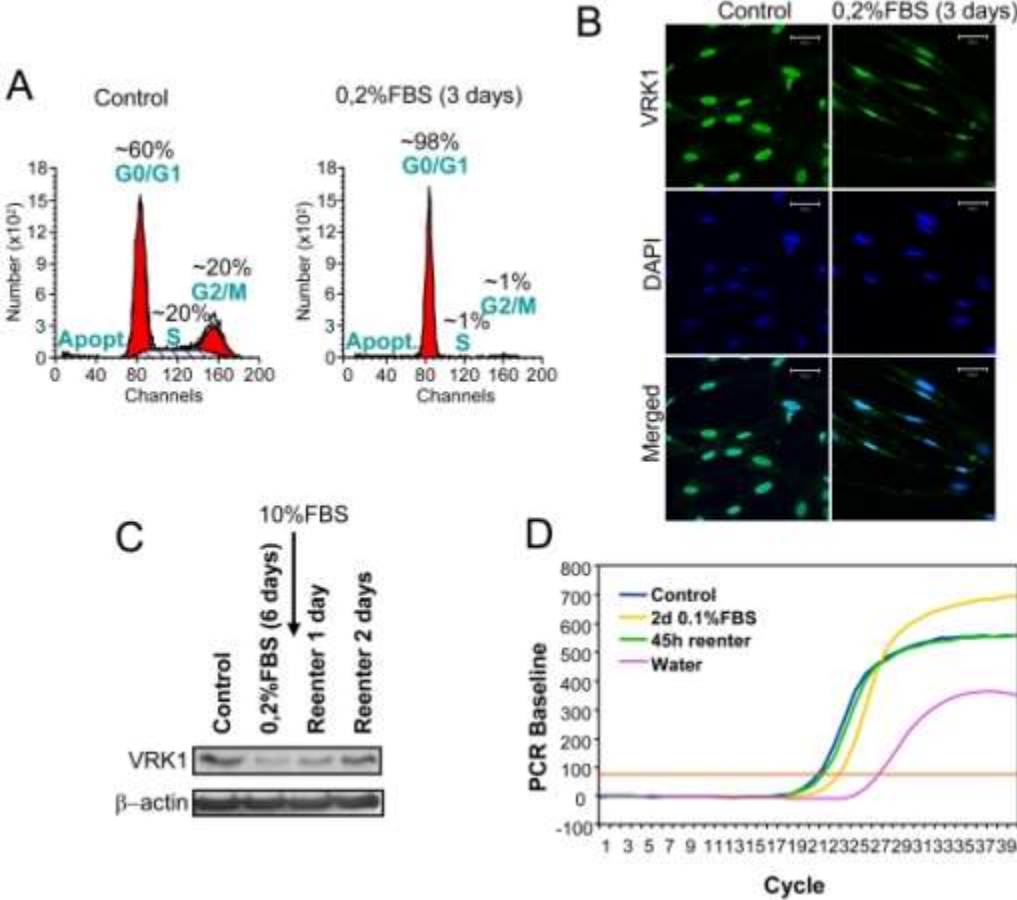
Chunlei Zhang, Parul Hazarika, Xiao Ni, et al.

Clin Cancer Res 2002;8:1234-1240.



B

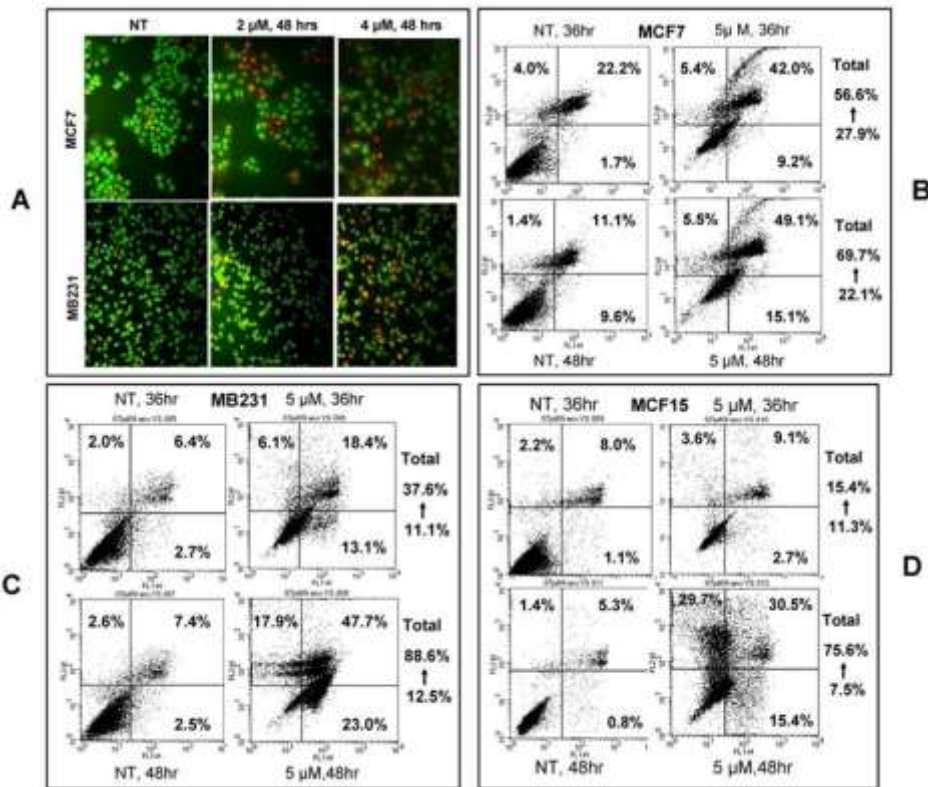




Human VRK1 Is an Early Response Gene and Its Loss Causes a Block in Cell Cycle Progression
 Valbuena A, López-Sánchez I, Lazo PA - PLoS ONE (2008)

Bottom Line: The elimination of VRK1 by siRNA results in a G1 block in cell division, and in loss of phosphorylated-Rb, cyclin D1, and other proliferation markers. Elimination of VRK1 by siRNA induces a reduction of cell proliferation. VRK1 colocalizes with p63 in proliferating areas of squamous epithelium, and identifies a subpopulation in the basal layer. VRK1 is an immediate early response gene required for entry in G1, and due to its implication in normal cell proliferation and division, might be a new target for development of inhibitors of cellular proliferation.

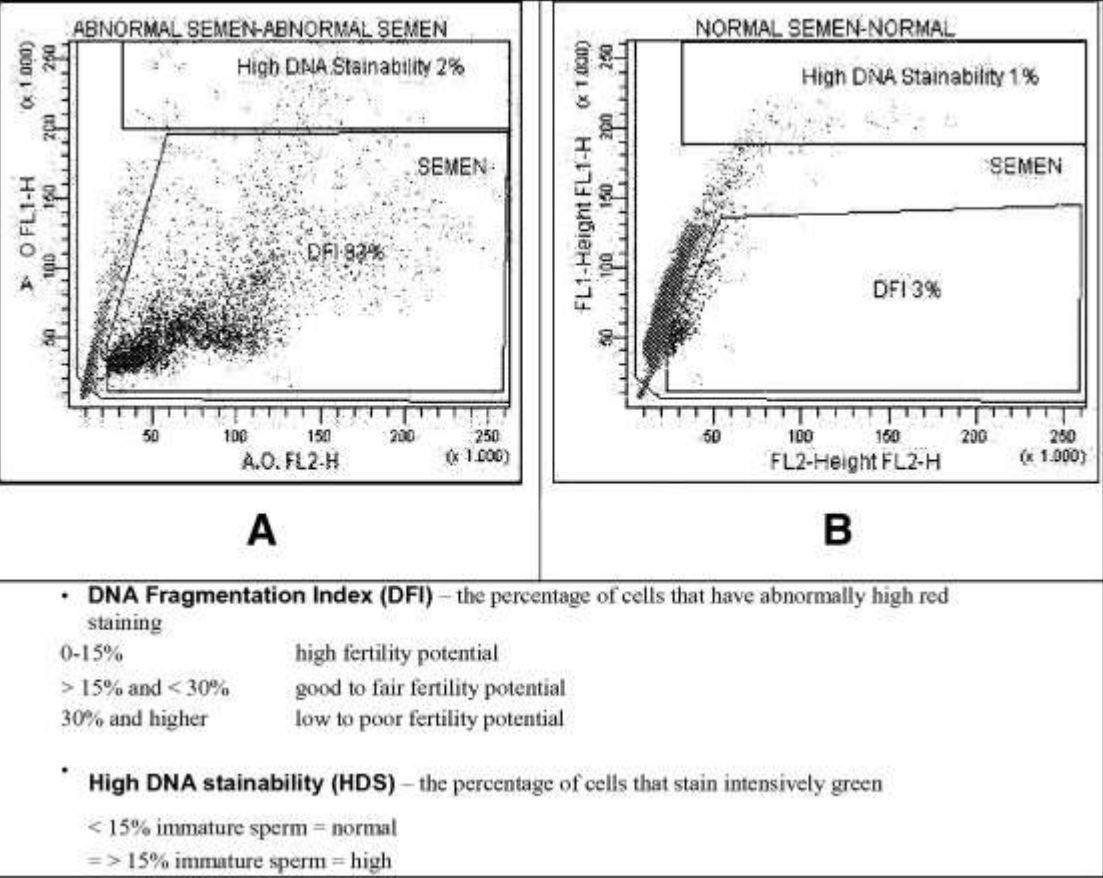
pone-0001642-g001: VRK1 levels in different growth conditions of human fibroblasts. (A). Flow cytometry profile of WS1 cell cycle in non-synchronized (left) and serum starved cells (right). (B). Nuclear localization of VRK1 and morphology of WS1 cells in non-synchronized and starved WS1 cells. Endogenous VRK1 protein was detected with a specific polyclonal antibody (VE1) in the cell nuclei. The size bar represents 50 μm. (C). Level of VRK1 endogenous protein determined in an immunoblot. (D). Change in VRK1 gene expression by qRT-PCR upon withdrawal or addition of serum to the cell culture. These experiments were independently performed three times.



Acridine orange and ethidium bromide staining: Cells were seeded in 96-well plates at 3,000 cells per well and incubated at 37°C with 5% CO₂. NPCD at a final concentration of 2 or 4 μM was added 24 hours later in multiple repetitions (5 wells per dose); plates were incubated for an additional 24 or 48 hours. Prior to cell staining, the medium was discarded. The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) first and then incubated with 10 μl PBS containing 10 μg/ml of Ethidium Bromide (EB) and 3 μg/ml of Acridine orange (AO). The cells stained by EB and AO were immediately visualized under the Leica DM IRB inverted fluorescence microscope (Leica Microsystems Inc. Bannockburn, IL). Multiple photos were taken at randomly-selected areas of the well to ensure that the data obtained are representative. Photographs were processed using “Image ProPlus 6.0” ultimate image analysis software (Media Cybernetics, Inc. Bethesda, MD).

Cell cycle analysis: Cells were cultured in 6-cm culture dishes until they reached 70~80% confluence. NPCD was given at an indicated concentration with DMSO as non-treated control; the cells were harvested 36 or 48 hours later. At the cessation of the treatment, both floating and adherent cells were collected, combined, washed with cold PBS, and then fixed overnight with 70% ethanol in PBS at -20°C. The cells were then washed with PBS again and incubated in the dark with in a PBS solution containing 20μg/ml propidium iodide (PI) and 200μg/ml RNase for 30 minutes at room temperature. The cells at different stages of the cell cycle were detected with a Becton Dickinson FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). Intact cells were gated in the FSC/SSC plot to exclude small debris. The population of cells at different stages of the cell cycle was quantified using ModFit LT software (Verity Software House, Inc., Topsham, ME).

NPCD induced death of MCF7, MB231 and MCF15 cells. **A**): Acridine orange/ethidium bromide staining shows viable cells in green fluorescence and dead cells in red-orange fluorescence. **B, C and D**): Necrotic (upper-left quadrant), early apoptotic (bottom-right quadrant) and both late apoptotic and necrotic (upper-right quadrant) fractions of MCF7 (**B**), MB231 (**C**) and MCF15 (**D**) cells 36 or 48 hours after treatment with 5 μM NPCD.



Using semen flow cytometry to evaluate association of ploidy status and chromatin condensation of spermatozoa with conventional semen parameters: Clinical application in intrauterine insemination

[Leandros Lazaros](#), Ph.D.^a,
[Apostolos Kaponis](#), M.D.^a,
[Georgios Vartholomatos](#), Ph.D.^b,
[Elissavet Hatzj](#), Ph.D.^a,
[Stefania Botsari](#), M.D.^a,
[Nikolaos Plachouras](#), M.D.^a,
[Georgios Makrydimas](#), M.D.^a,
[Konstantinos Zikopoulos](#), M.D.^a,
[Nikolaos Sofikitis](#), M.D.^c,
[Ioannis Georgiou](#), Ph.D.^a

Figure 2. Scattergrams of acridine orange–stained spermatozoa analyzed by flow cytometry, showing (A) a semen sample containing an increased percentage of spermatozoa in red population zones and (B) a normal reference semen pool. To define the nuclear abnormalities and to estimate the percentage of mature spermatozoa in every semen sample, the data were examined using two-dimensional scattergrams plotting red versus green fluorescence. The FL1-H axis represented the green fluorescence, the FL2-H axis the red fluorescence.