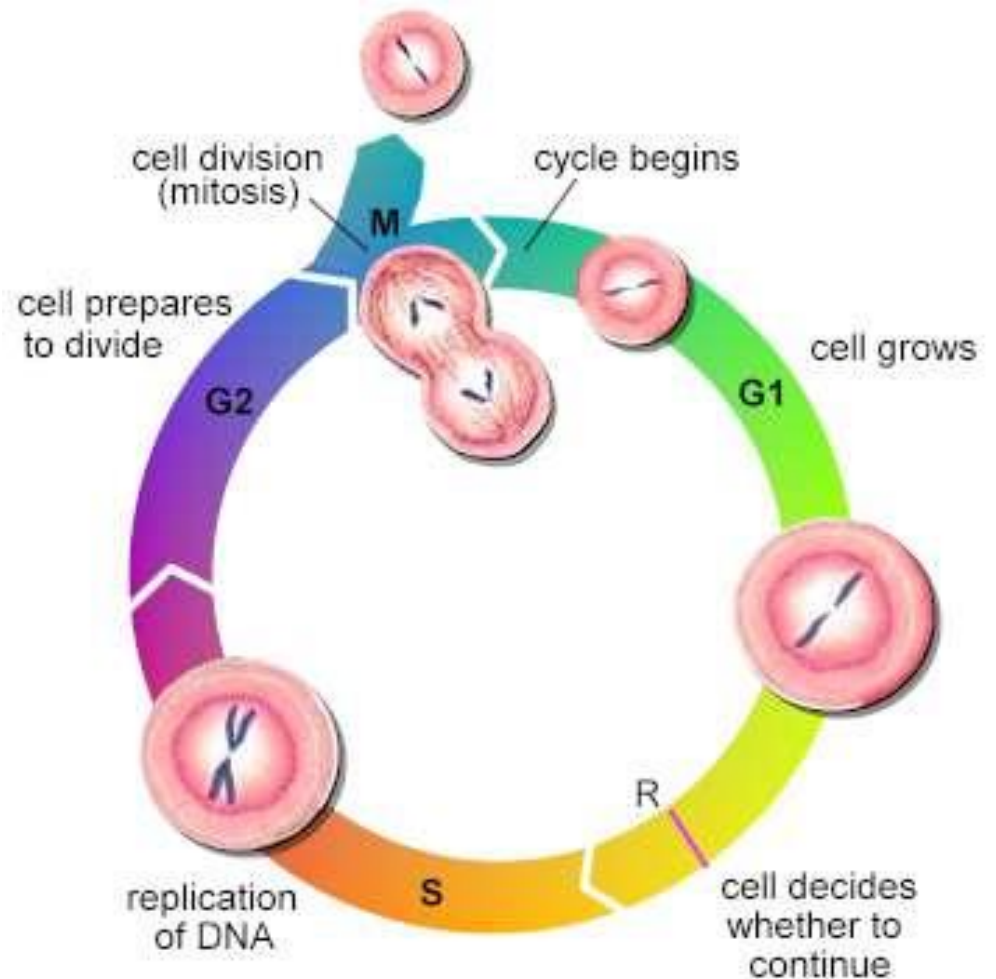


DNA πλοειδία, ανάλυση κυτταρικού κύκλου, Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

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 (επιτρέπει στα κύτταρα που έχουν συλλέξει σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα, να αναλυθούν σε μεταγενέστερο χρόνο, ταυτόχρονα)
- Πολλά επιφανειακά αντιγόνα είναι ανθεκτικά στην μονιμοποίηση με αιθανόλη (η ανάλυση του DNA μπορεί να συνδυαστεί με χαρακτηριστικά κυτταρικών υποπληθυσμών)
- Το κυτταρικό RNA χαρακτηρίζει κυτταρικούς φαινοτύπους που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση, την ηρεμία και το κυτταρικό πολλαπλασιασμό
- Μελέτη του κυτταρικού κύκλου από τομές παραφίνης ιστών (αναδρομικές μελέτες)

Γενικό Πλαίσιο

- **Μέρος I**
Χρώσεις Νουκλεϊνικών οξέων
- **Μέρος II**
Οι κυριότερες εφαρμογές της ανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων
- **Μέρος III**
Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με PI

Πώς ξέρεις τι χρώση θα χρησιμοποιήσεις;

- Χαρακτηριστικά των χρωστικών
 - 1) Φασματοσκοπικές ιδιότητες
 - Διέγερση της χρωστικής (έχεις πρόσβαση στην απαιτούμενη λείζερ; UV; 488; 633;)
 - 2) Χημικές ιδιότητες
 - 3) Χαρακτηριστικά δέσμευσης
- Χρώσεις με εξειδίκευση στα ζεύγη βάσεων, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη σύγκριση των μεγεθών του γονιδιώματος των διαφορετικών ειδών.
- Στα πρώιμα στάδια της σύνθεσης του DNA, είναι περιοχές πλούσιες σε -AT-, που αντιγράφονται πρώτα από τις πλούσιες σε CG-περιοχές, στην S φάση.

Άρα διαφορετικές χρώσεις DNA θα δώσουν διαφορετικά προφίλ του κυτταρικού κύκλου

Απαιτήσεις για μία χρώση ποσοτικού προσδιορισμό DNA / 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 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.

Χρωστικές Νουκλεϊνικών οξέων είναι δύο βασικών κατηγοριών

Χρωστικές σύνδεσης σε ζεύγη Βάσεων Χρωστικές παρεμβαλλόμενες (Intercalating)

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

Hoechst 33342

Hoechst 33258

Χρωμομυκίνη

Μιθραμυκίνη

7-AAD

PI

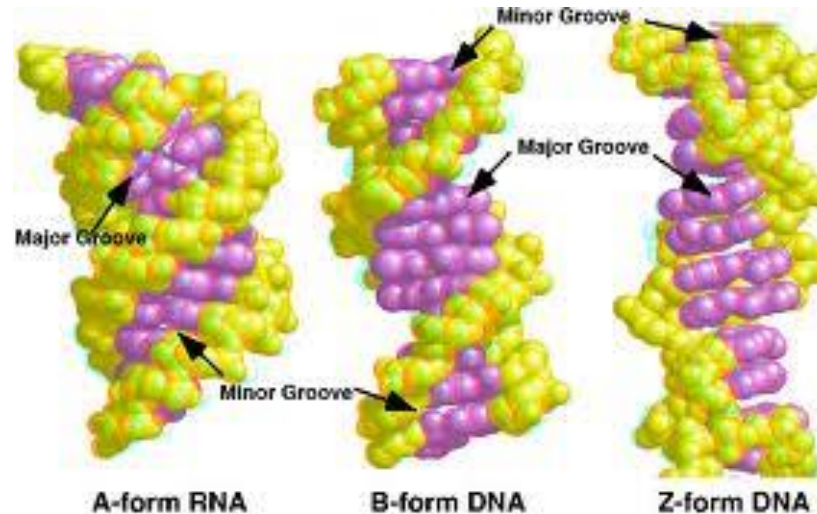
Ethidium bromide

Acridine Orange

Pyronin Y

Και πολλές άλλες!!

Δέσμευση στη μικρή αύλακα του DNA



- συνδέονται αποκλειστικά με τη μικρή αύλακα της διπλής έλικας του DNA
- δίνουν εκλεκτικότητα για το DNA μόνο

Χρωστικές **Hoechst**

33 342- Permeant - διαπερνά τα ζωντανά κύτταρα, δεσμεύεται στην μικρή αύλακα σε τμήματα τουλάχιστον τριών ζευγών βάσεων AT πλαισιωμένα από ένα ζεύγος βάσεων GC

33 258- Impermeant- δεν διαπερνά, δεσμεύεται στην μικρή αύλακα (σε τμήματα AT AT AT GC AT AT AT

- **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)

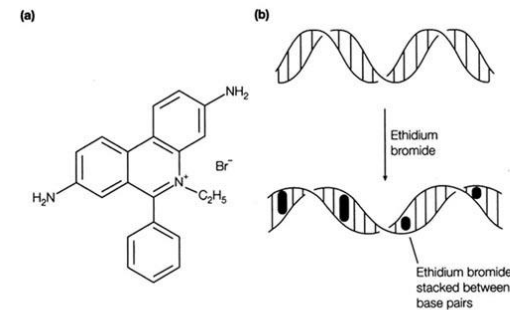
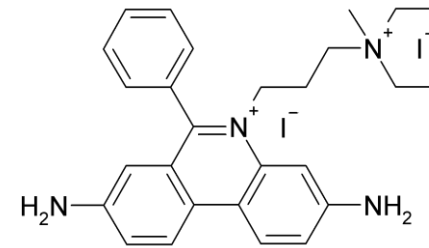
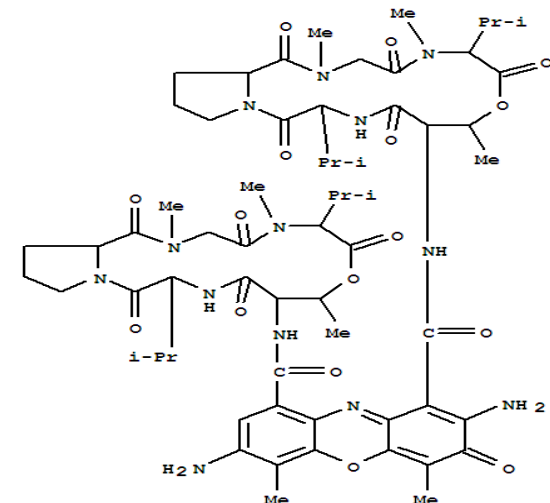
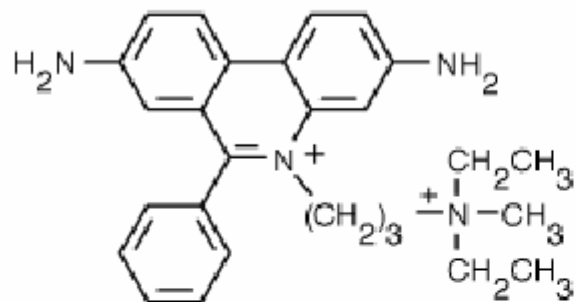


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.



Propidium iodide



488 nm 610 nm

Weakly Fluorescent

DNA



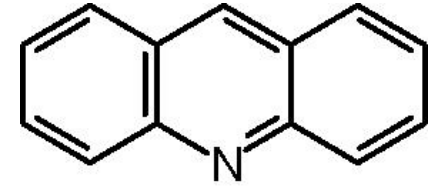
INTERCALATION

488 nm 610 nm

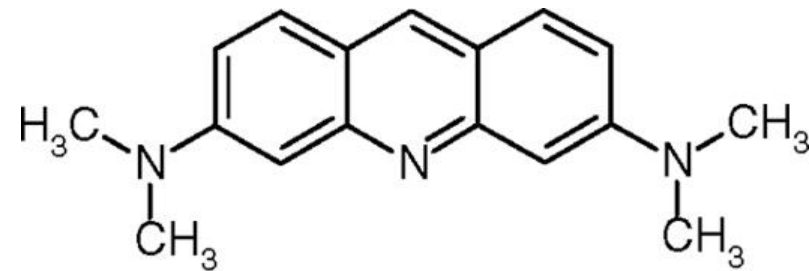
Highly Fluorescent

Χρωστικές που παρεμβάλλονται (Intercalating)

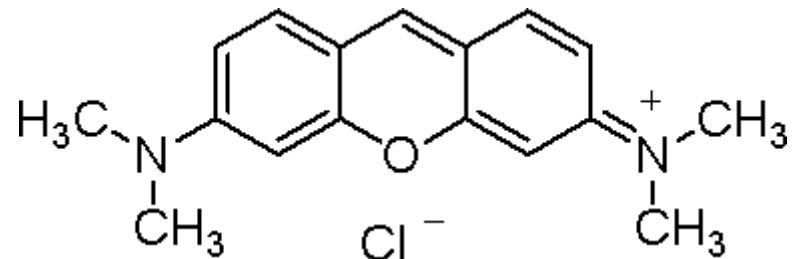
- Παρεμβαλλόμενες χρωστικές που εκφράζουν διαφορετικά φάσματα εκπομπής ανάλογα με το αν δεσμεύονται με το DNA ή το RNA
- Οι ακριδίνες η δέσμευση σε ds νουκλεϊνικού οξέως οδηγεί σε εκπομπή στα 530nm, ενώ σε ss νουκλεϊκό οξύ εκπέμπει στα 640nm
- **Pyronin Y** Δεν παρουσιάζει εκλεκτικότητα (ειδικότητα) σε ζεύγος βάσεων



acridine



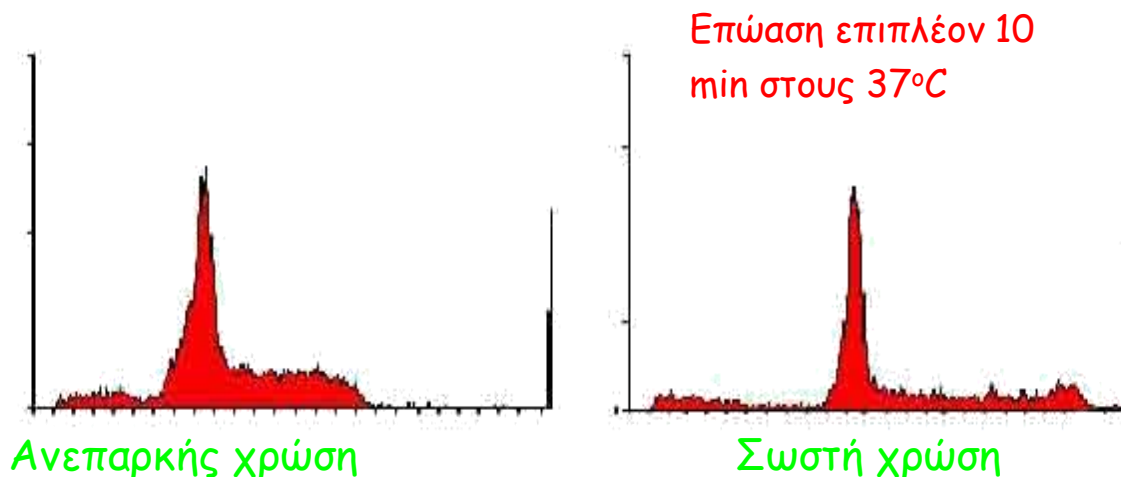
Acridine Orange



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
- αναλύουμε με κυτταρομετρία ροής
- Όταν η κορυφή του ιστογράμματος δεν μετακινείται, αυτός ο χρόνος **είναι ο προτεινόμενος της χρώσης αυτής**

Χρώση Πυρήνων με PI



Συμπερασματικά.....

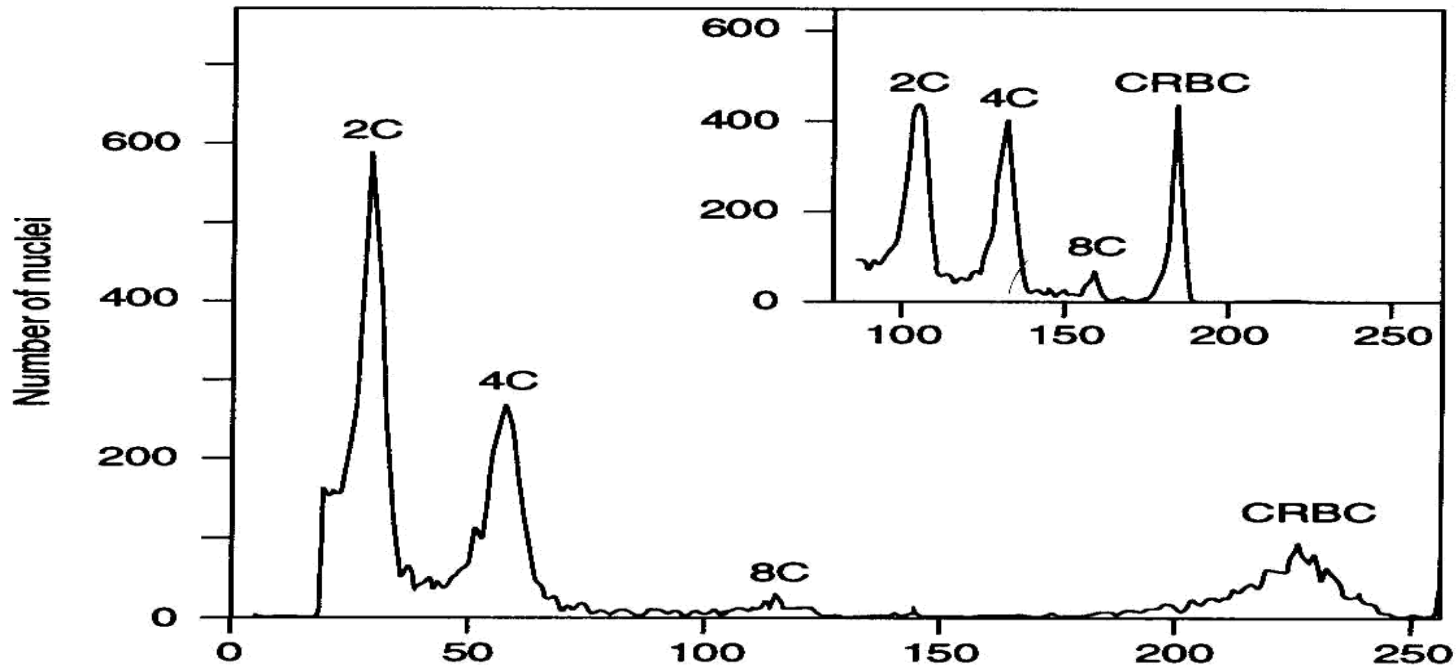
- Για οποιαδήποτε δεδομένη εφαρμογή, υπάρχει **ένας αριθμός χρωστικών** οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν
- Εξοικειωθείτε με τις χημικές ιδιότητες, τα **φάσματα απορρόφησης και εκπομπής**, και την **δεσμευτική ιδιότητα** της χρωστικής πριν τη χρησιμοποιείτε!!!!

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

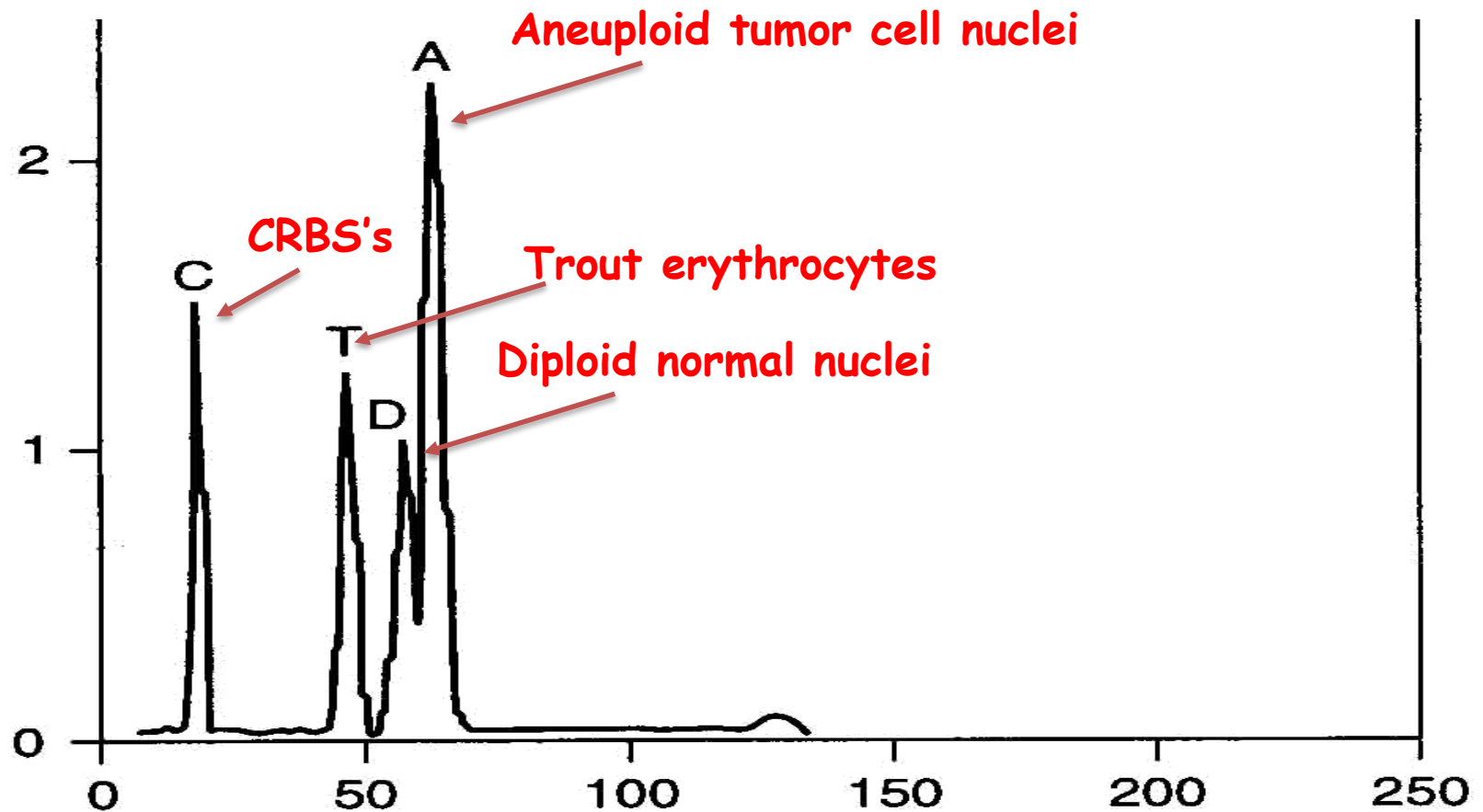
8C Sample MFI=120

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

$X=1.34\text{pgms}$

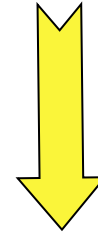
Προσδιορισμός της πλοειδίας των κυττάρων

PI, DAPI, EtBr με κατάλληλο πρότυπο αναφοράς

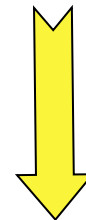


Έλεγχος πλοειδίας

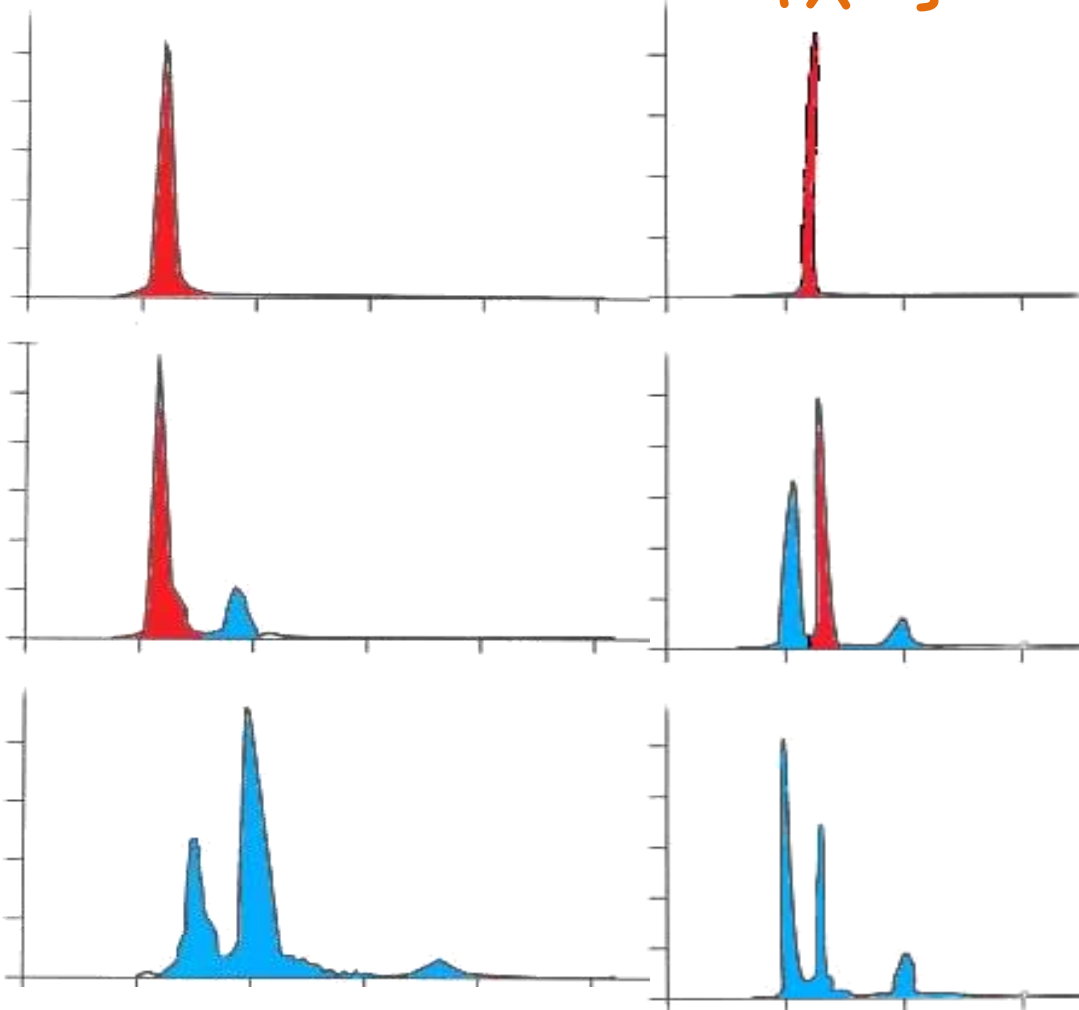
Έλεγχος διπλοειδικός
μόνο



Έλεγχος διπλοειδικός που
αναμιγνύεται με το δείγμα
ιστού



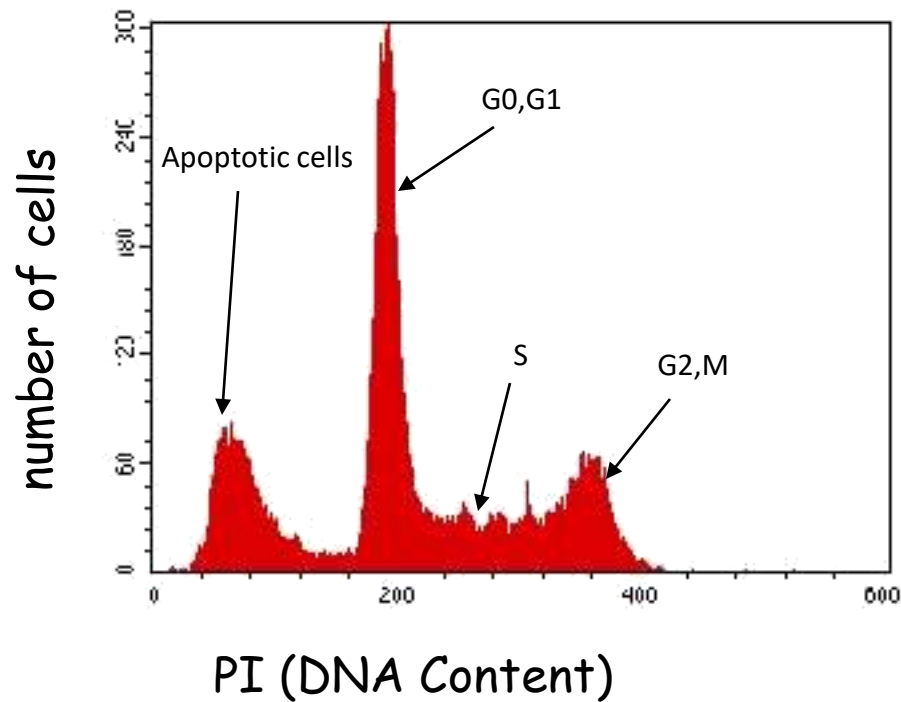
Το δείγμα ιστού
μόνο



ΥΠΕΡΠΛΟΕΙΔΙΑ

ΥΠΟΠΛΟΕΙΔΙΑ

Ανάλυση DNA ως δείκτης της απόπτωσης



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 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), που 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

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 [$\pm$ 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 όξινο περιβάλλον 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

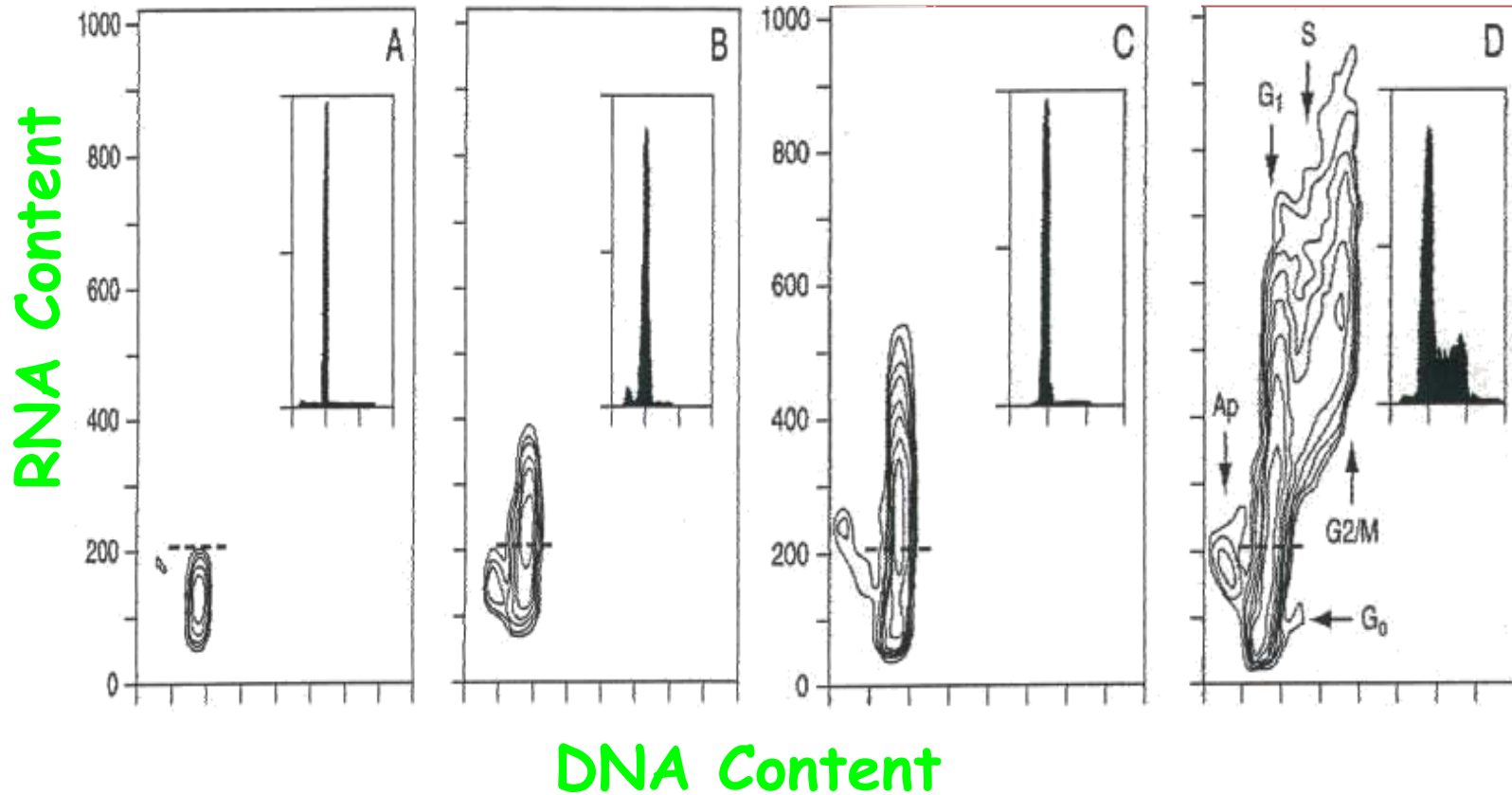
Ενσωμάτωση-BrdU

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

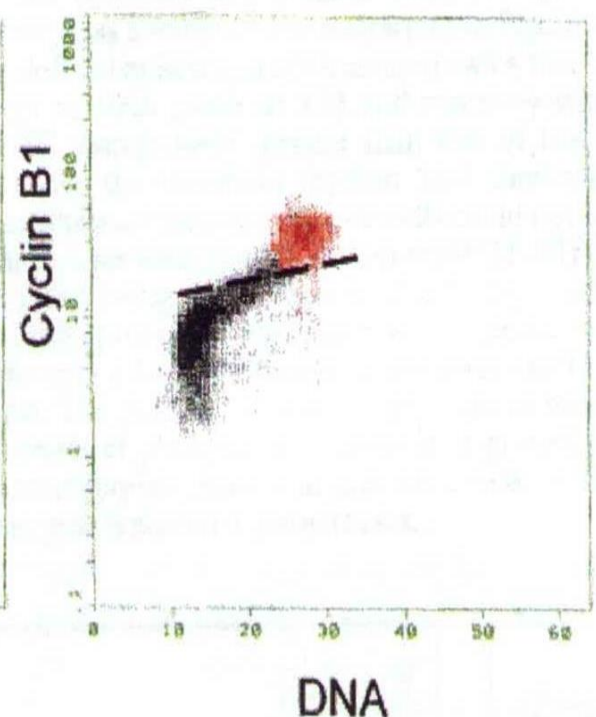
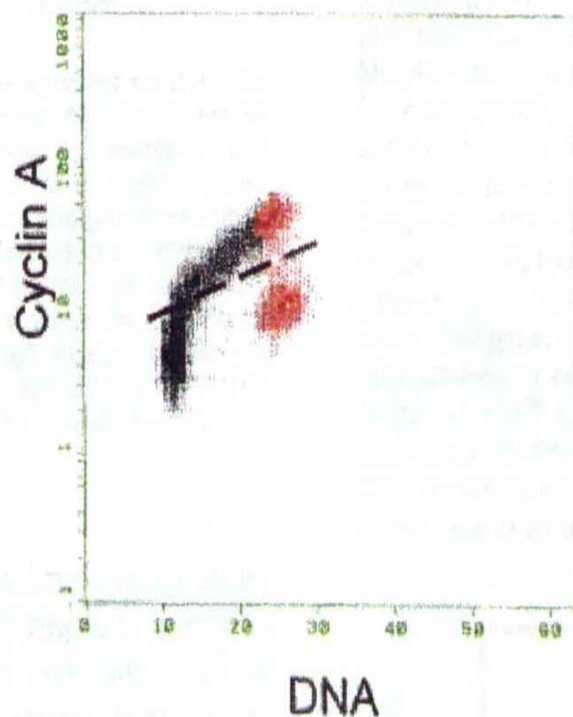
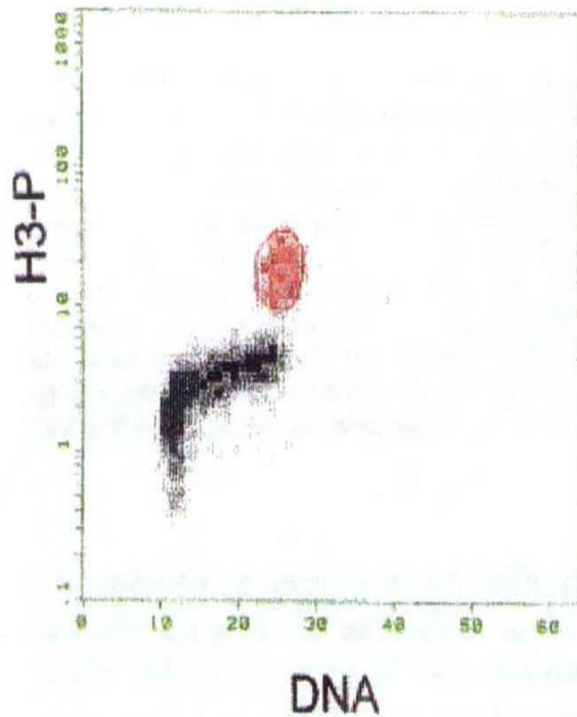
- ανάλυση κυκλινών

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

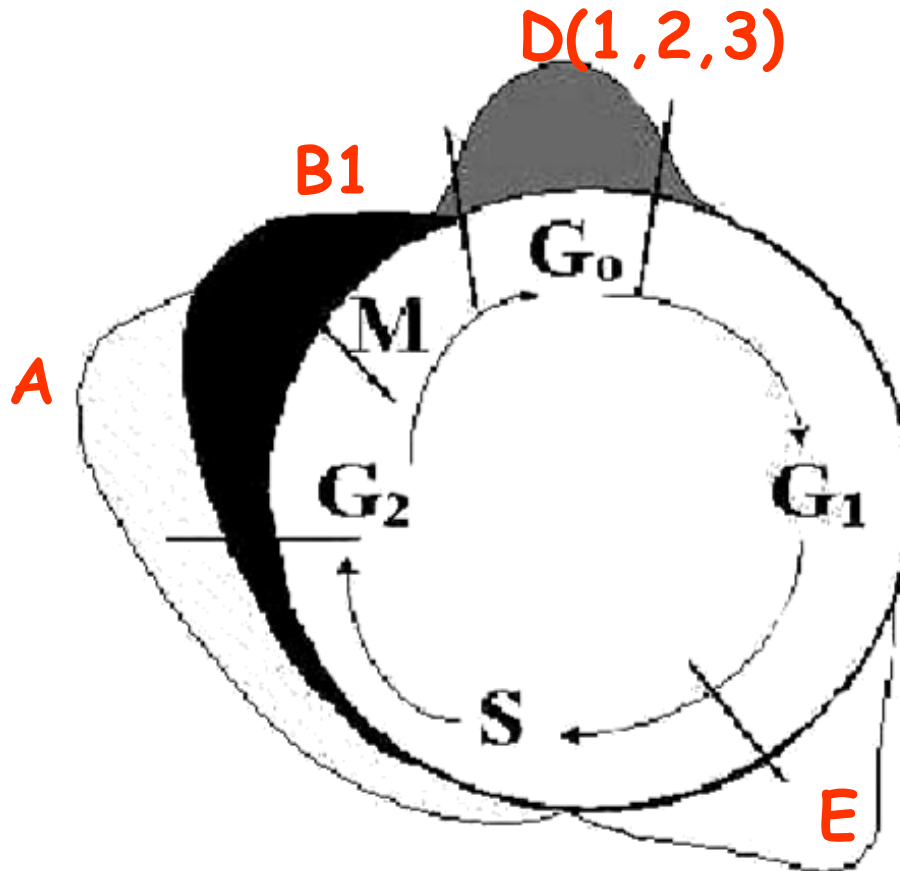
Ανάλυση κυκλινών

- 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

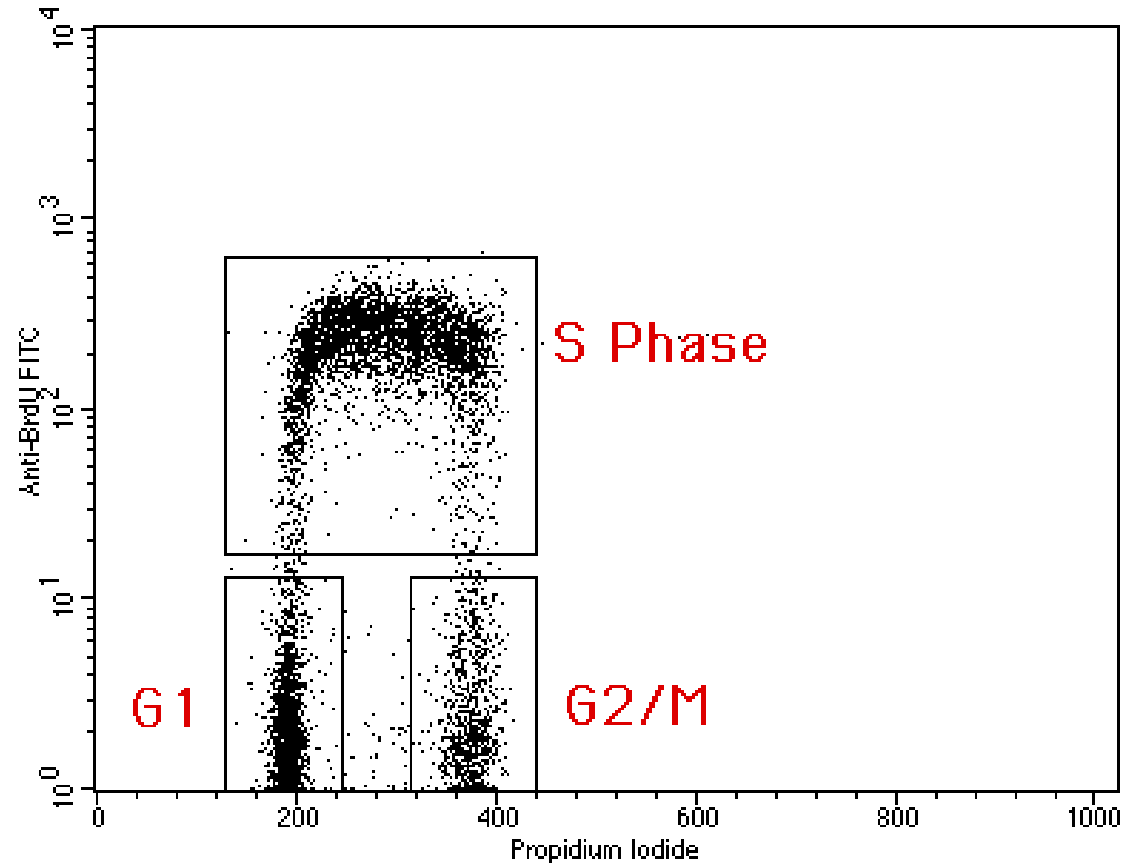
Cyclin	Cell cycle phase	cdk Protein	Localization
A	S and G2/M	cdc2/cdk1,cdk2	Nucleus
B1	G2/M	cdc2/cdk1	cytoplasm
B2	G2/M	cdc2/cdk1	cytoplasm
B3	G2/M	cdc2/cdk1,cdk2	Nucleus
D1	G1	cdk4/cdk6/cdk2	Nucleus
D2	G1	ND	Nucleus
D3	G1	cdk4/cdk6	Nucleus
E	G1/S	ND	Nucleus
H	All phases	CDK7	ND

Η έκφραση των διαφόρων κυκλινών στον κυτταρικό κύκλο



Καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μη φυσιολογική ή (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.

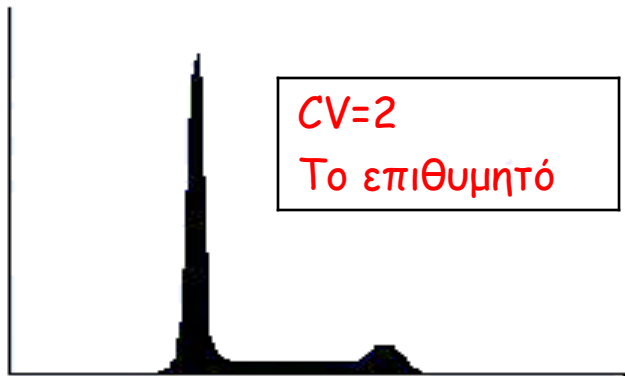
- **Μέρος III**

Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με PI

Ποιοτικός έλεγχος για την ανάλυση των 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**

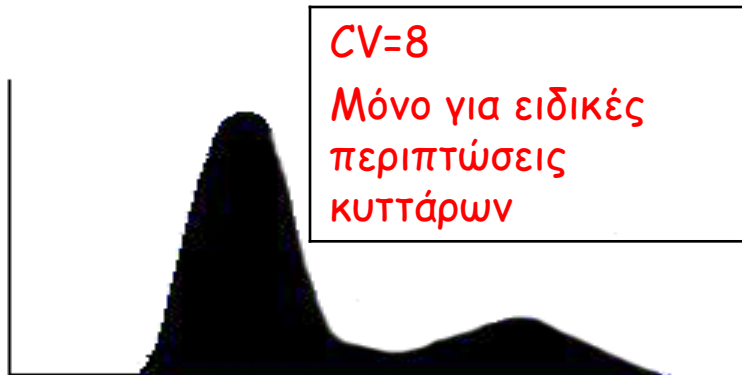
Επίδραση του CV στο κυτταρικό κύκλο



$CV=2$
Το επιθυμητό



$CV=5$
Το μεγαλύτερο
επιτρεπτό άνω όριο
 CV 's για την καλή
ανάλυση του
κυτταρικού κύκλου



$CV=8$
Μόνο για ειδικές
περιπτώσεις
κυττάρων



$CV=15$
Μην
προσπαθήσετε άλλο

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 του 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 και 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 37°C.
- Πλύνετε 2 X σε PBS
- Καταμέτρηση των κυττάρων
- Επαναιώρηση σε 0,5 έως 2,0 ml διαλύματος χρώσης PI (τελική συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα / ml) & επωάστε για 30 λεπτά στους 4°C ή σε πάγο.
- Ανάλυση

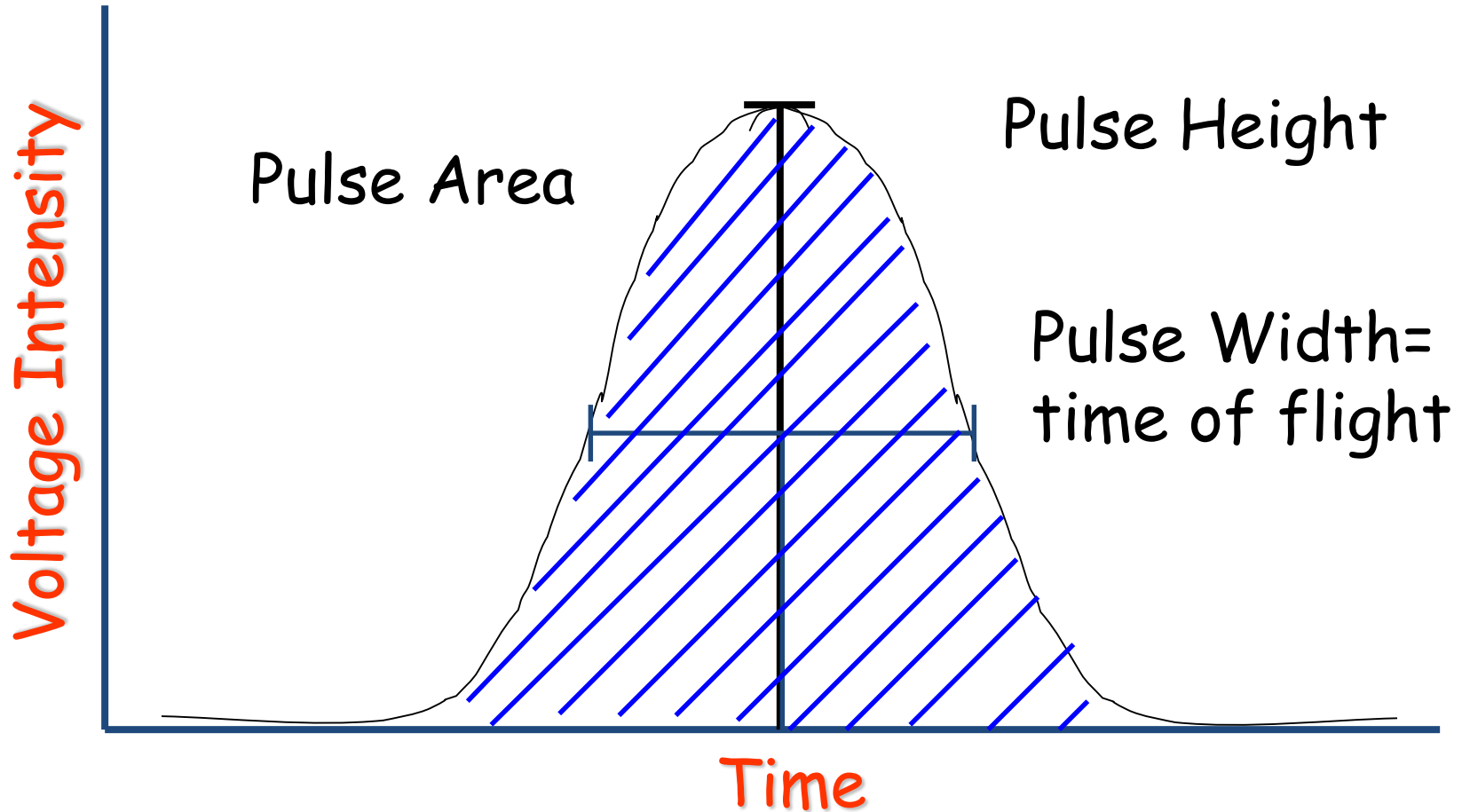
Περίληψη για την διάκριση των Doublet

- ◆ 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.

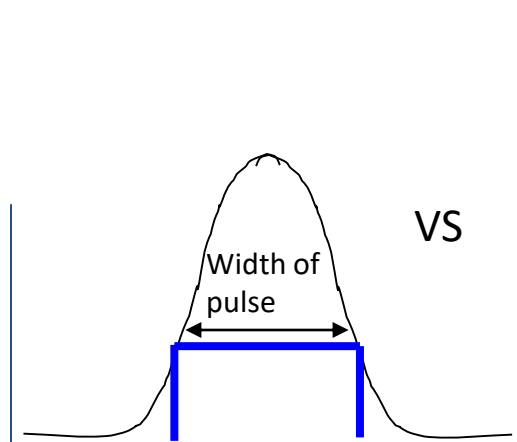
Η τάση παλμού

- 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

Η μέτρηση του παλμού

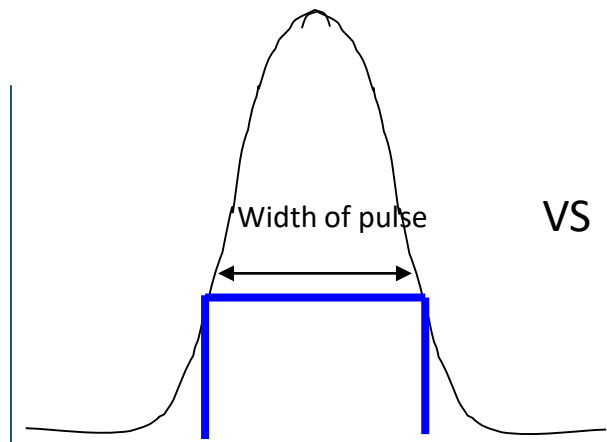


Single G₀ pulse



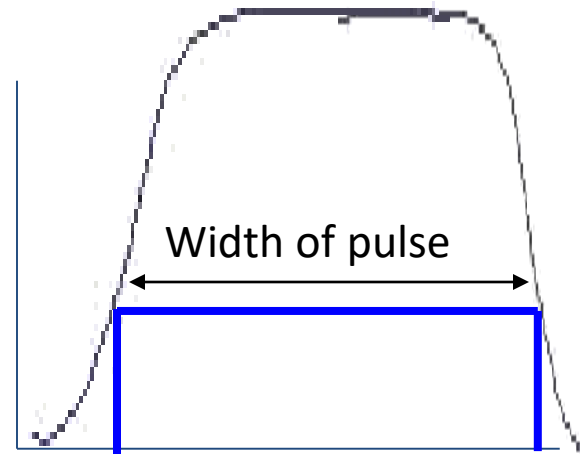
Width=W

Single G₂ pulse



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

Doublet pulse



Width $\sim 2W$

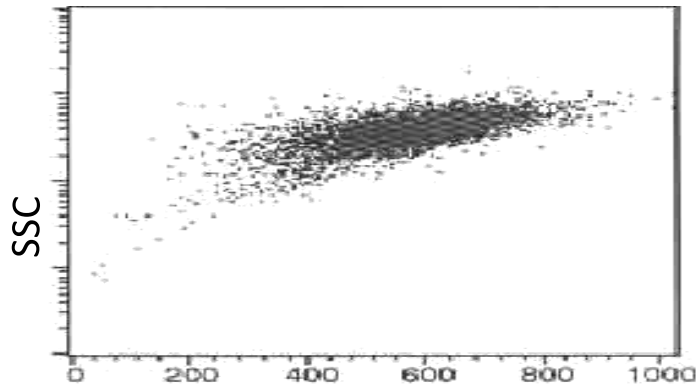
Τι δείχνουν αυτοί οι παλμοί?

1. Το πλάτος ενός μονού G₀ και G₂ είναι σχεδόν το ίδιο
2. Το ύψος του G₂ και της doublet είναι περίπου η ίδια
3. Αν δούμε μόνο στο ύψος παλμού, το κύτταρο G₂ δεν μπορεί να διαφοροποιηθεί από το doublet.

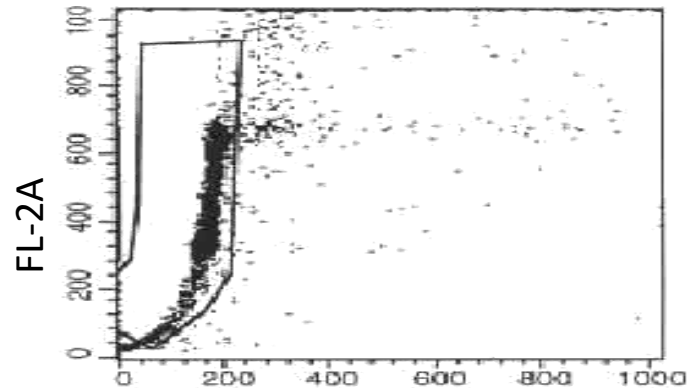
Συμπερασματικά.....

- 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.

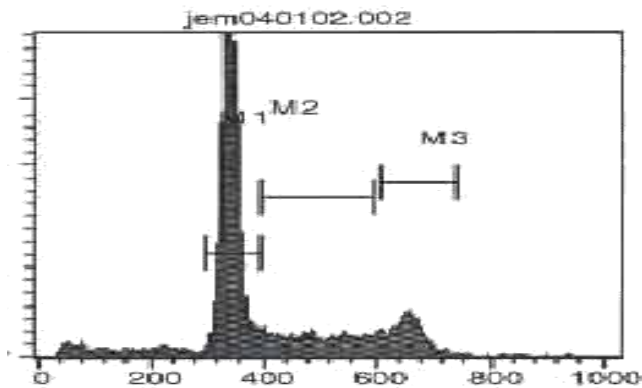
Instrument setup



FSC



FL-2W

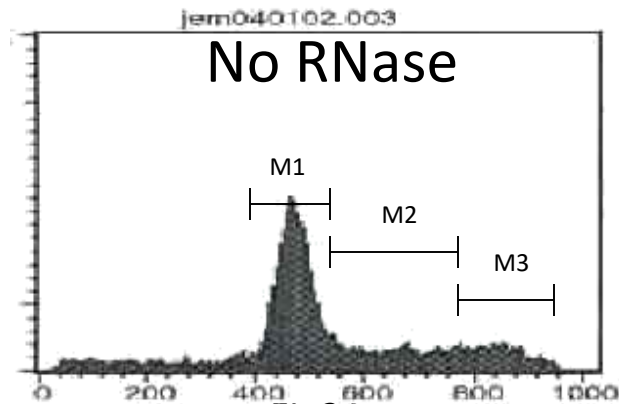


FL-2A

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

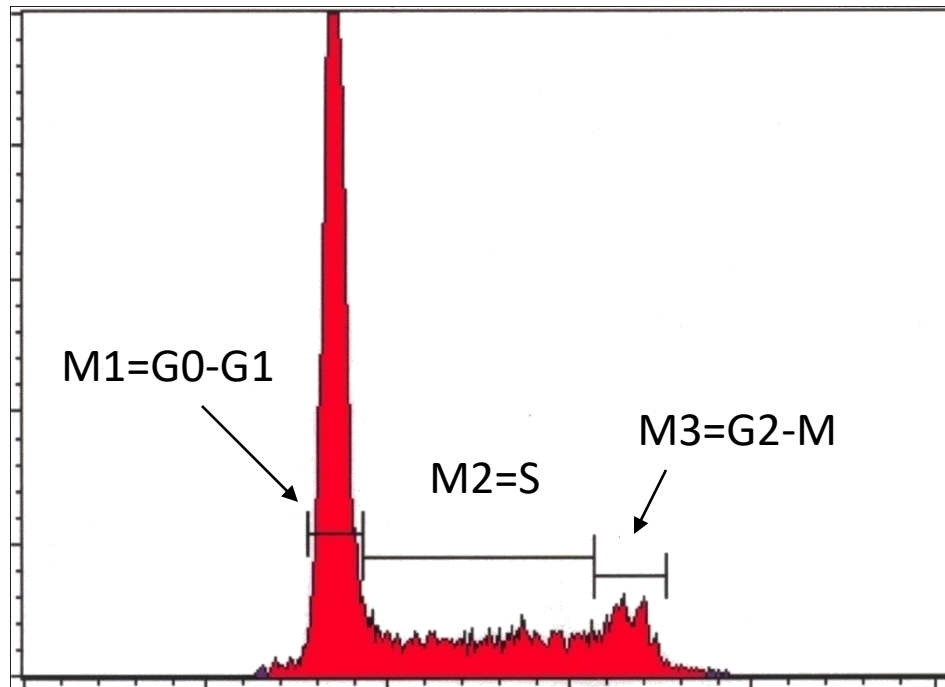
Data analysis

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 G_0/G_1 , S , G_2/M .

- Cell quest
- Modfit
- WinList
- WinCycle
- Flowjo

Cellquest

vs Modfit

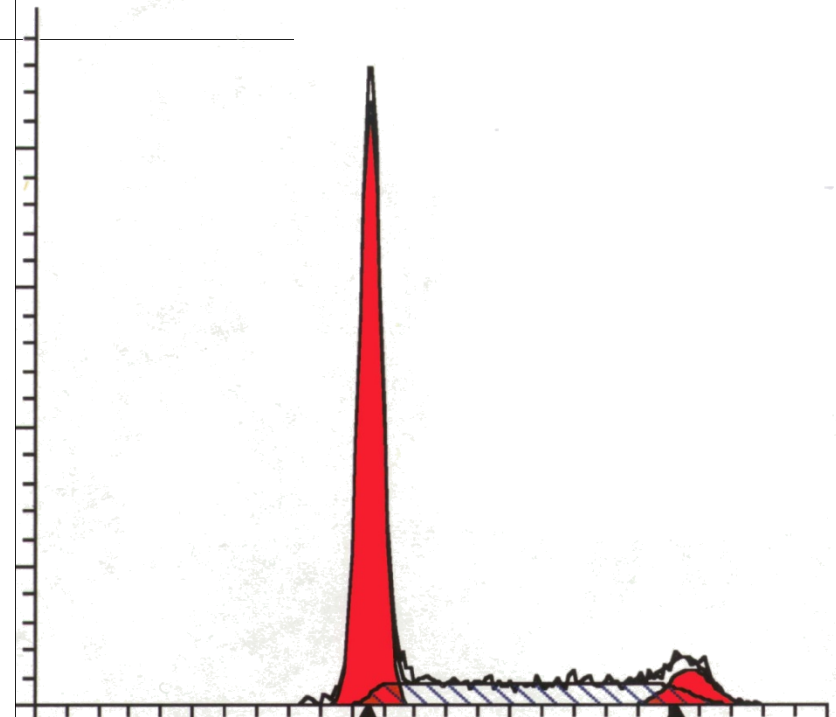


Histogram Statistics

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

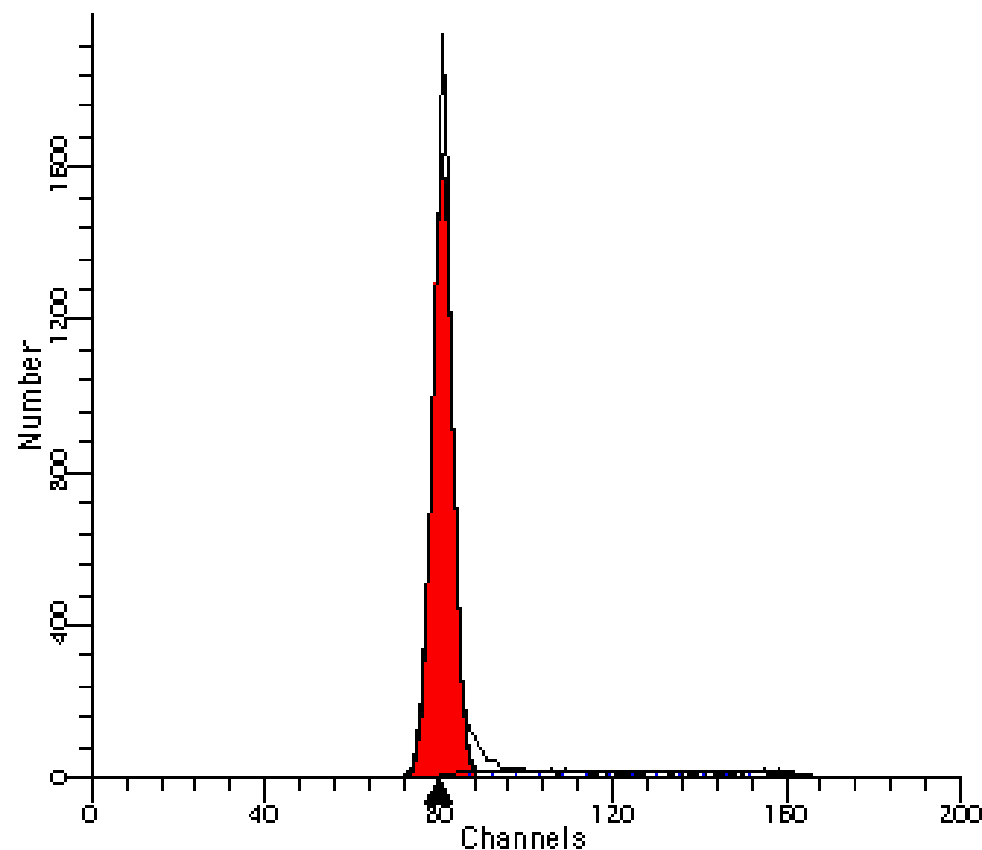


Date acquired: 1-Apr-2
 File: jem040102.004
 Source: 60min stain
 Case: PATIENT ID
 Analysis type: Automatic analysis

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

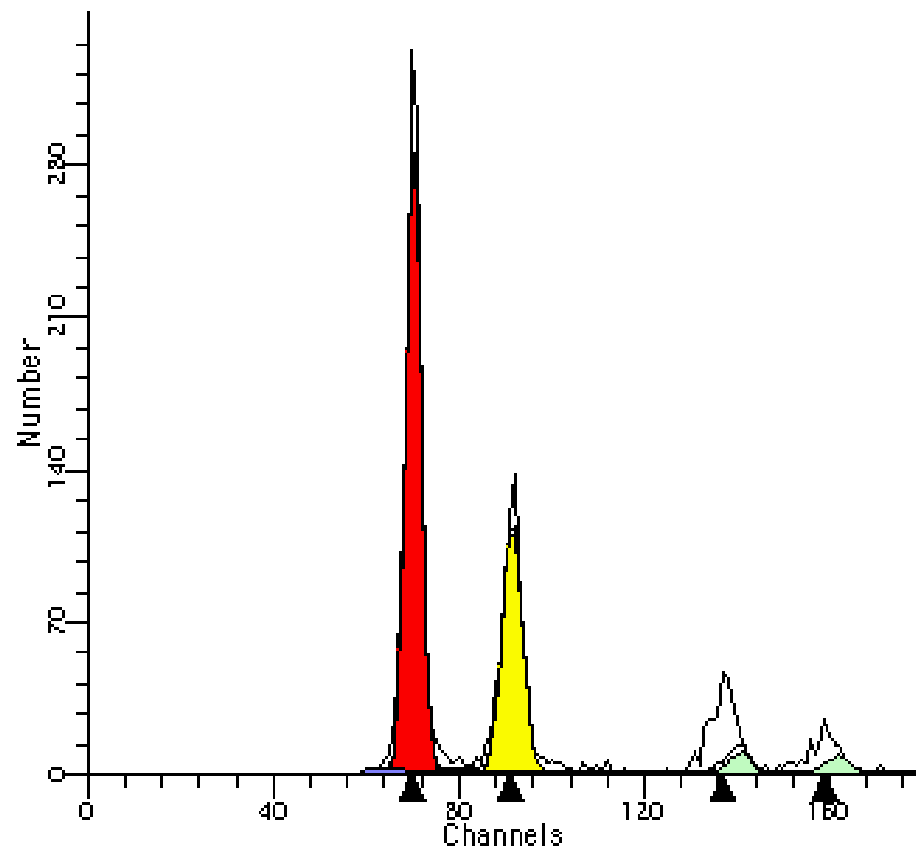
DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 89.40 % at 80.77
Dip G2-M: 0.00 % at 161.53
Dip S: 10.60 % G2/G1: 2.00
Dip %CY: 2.80

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 %CY: 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 %CY: 2.32
 An1 DI: 1.30

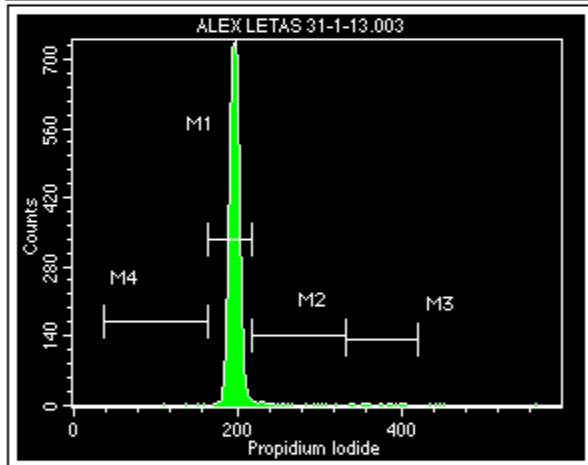
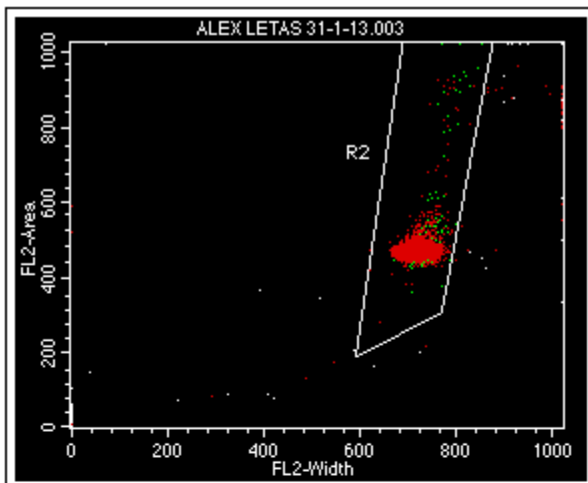
Total S-Phase: 6.17 %

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 %



Histogram Statistics

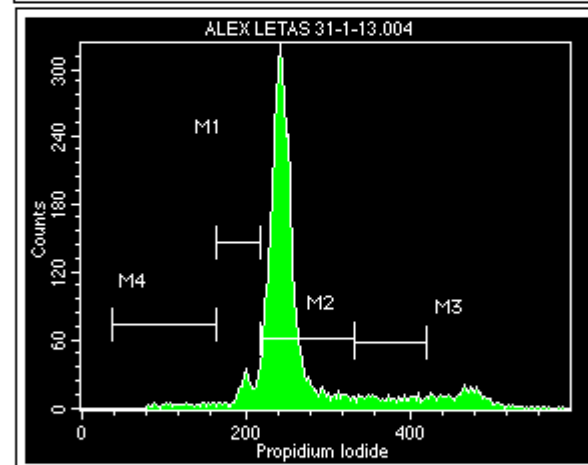
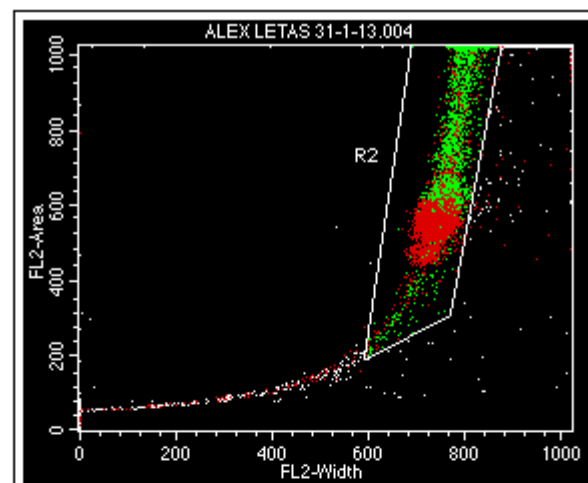
File: ALEX LETAS 31-1-13.003

Sample ID:

Acquisition Date: 31-Jan-13

X Parameter: Propidium Iodide (Linear)

Marker	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	SD	CV	Median	Peak	Peak Ch
All	100.00	98.60	197.18	196.84	13.79	6.99	196.00	737	197
M1	98.47	97.09	196.08	196.00	5.51	2.81	196.00	737	197
M2	1.12	1.11	235.08	234.27	20.68	8.80	229.00	11	218
M3	0.31	0.30	375.29	374.64	22.10	5.89	382.00	3	382
M4	0.05	0.05	141.80	140.65	19.21	13.55	151.00	1	110



Histogram Statistics

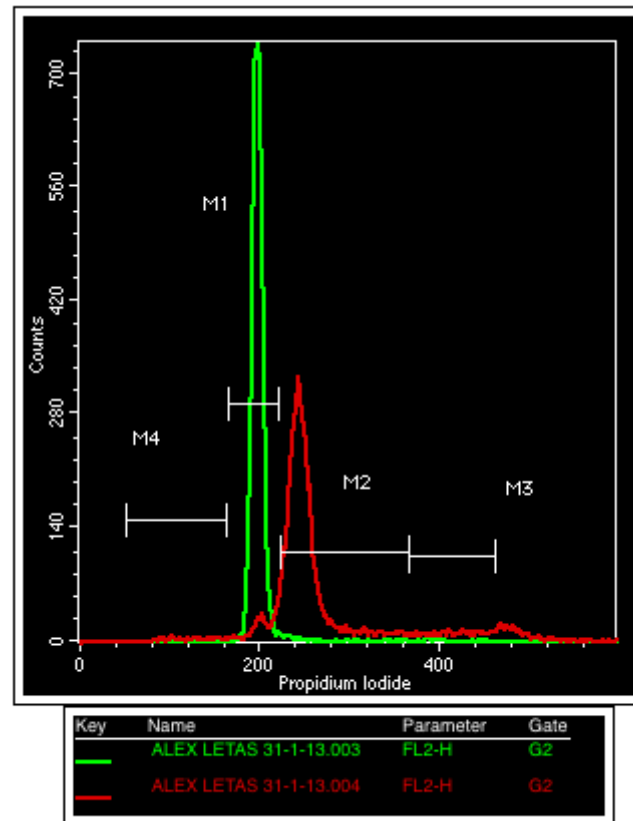
File: ALEX LETAS 31-1-13.004

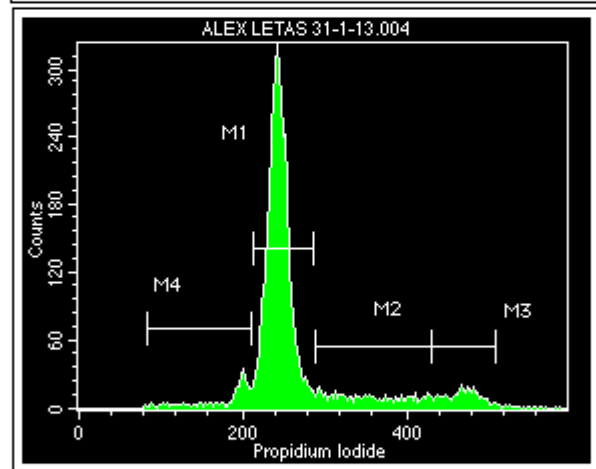
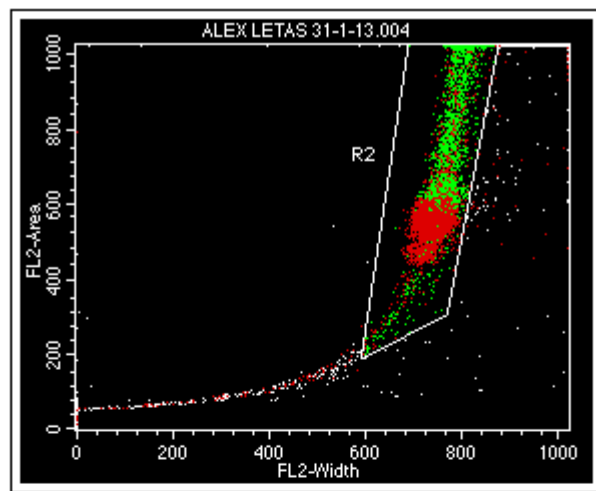
Sample ID:

Acquisition Date: 31-Jan-13

X Parameter: Propidium Iodide (Linear)

Marker	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	SD	CV	Median	Peak	Peak Ch
All	100.00	87.22	266.16	258.64	72.47	27.23	244.00	323	241
M1	5.69	4.96	201.54	201.20	11.44	5.68	202.00	34	200
M2	80.56	70.26	246.53	245.88	18.70	7.58	243.00	323	241
M3	5.32	4.64	374.59	373.67	26.27	7.01	373.00	14	408
M4	1.17	1.02	125.17	122.74	24.28	19.40	126.00	5	102





Histogram Statistics

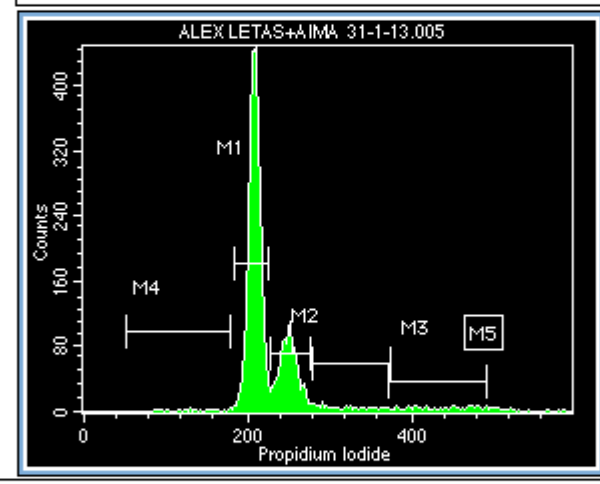
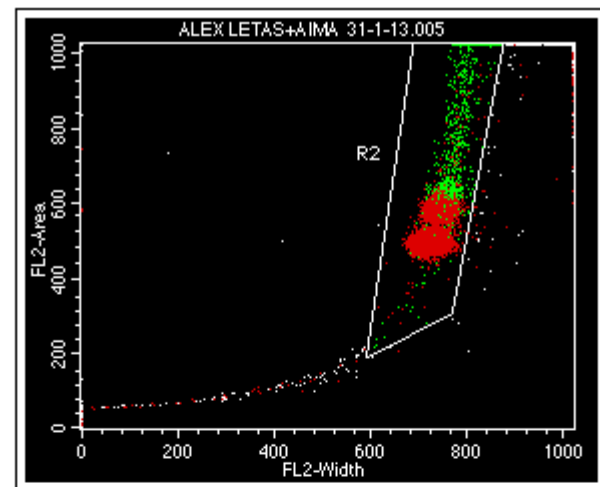
File: ALEX LETAS 31-1-13.004

Sample ID:

Acquisition Date: 31-Jan-13

X Parameter: Propidium iodide (Linear)

Marker	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	SD	CV	Median	Peak	Peak Ch
All	100.00	87.22	266.16	258.64	72.47	27.23	244.00	323	241
M1	77.86	67.91	243.03	242.69	12.88	5.30	242.00	323	241
M2	9.65	8.42	354.56	351.95	43.15	12.17	350.00	18	293
M3	6.10	5.32	466.56	466.17	19.02	4.08	467.00	20	466
M4	5.37	4.68	182.27	178.73	31.89	17.50	197.00	34	200



Histogram Statistics

File: ALEX LETAS+AIMA 31-1-13.005

Sample ID:

Acquisition Date: 31-Jan-13

X Parameter: Propidium iodide (Linear)

Marker	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	SD	CV	Median	Peak	Peak Ch
All	100.00	91.94	228.63	224.67	51.31	22.44	211.00	448	209
M1	69.51	63.90	207.71	207.60	6.71	3.23	208.00	448	209
M2	23.50	21.61	249.35	249.13	10.49	4.21	249.00	108	250
M3	2.68	2.47	319.38	318.09	28.92	9.06	317.00	10	291
M4	0.36	0.33	132.42	129.53	27.30	20.62	131.50	3	129
M5	2.82	2.59	440.08	438.69	34.75	7.90	447.00	7	395

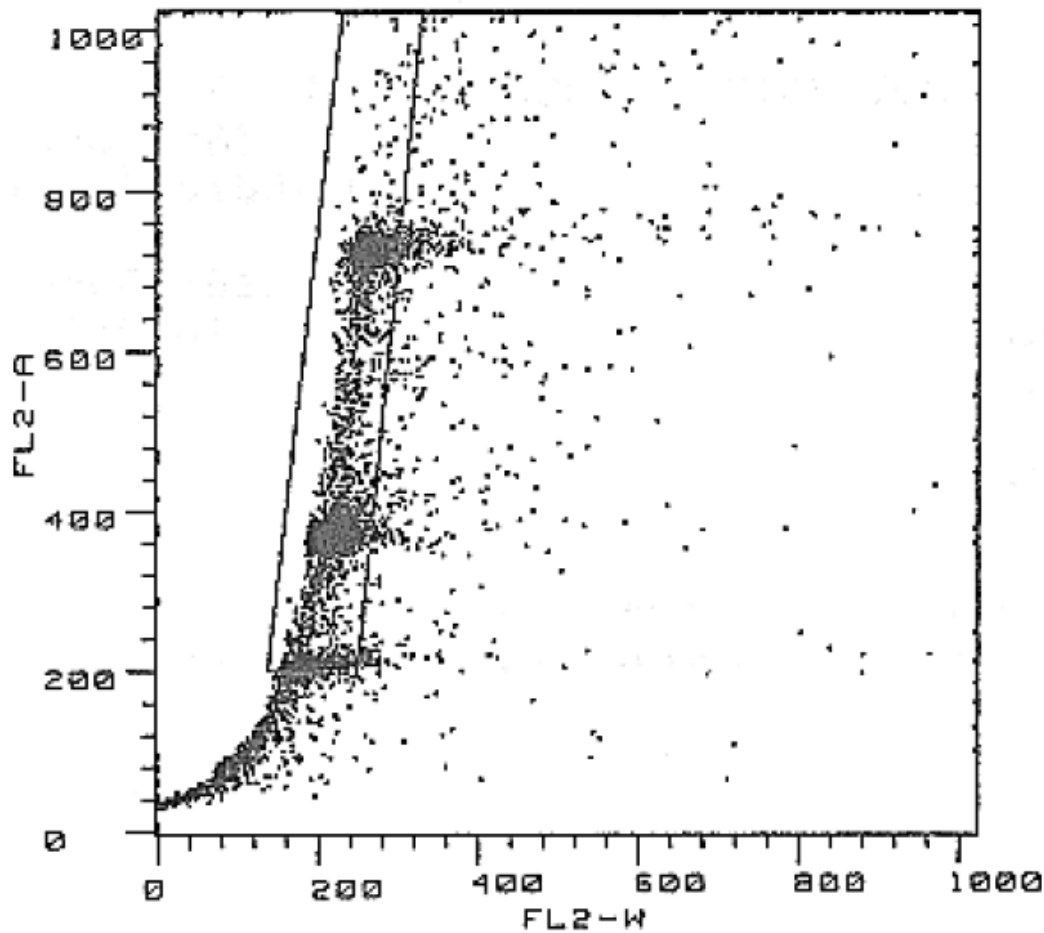


Figure 3. Breast tumor tissue: FL2-Width versus FL2-Area dot plot showing a singlet gate, which excludes aggregates.

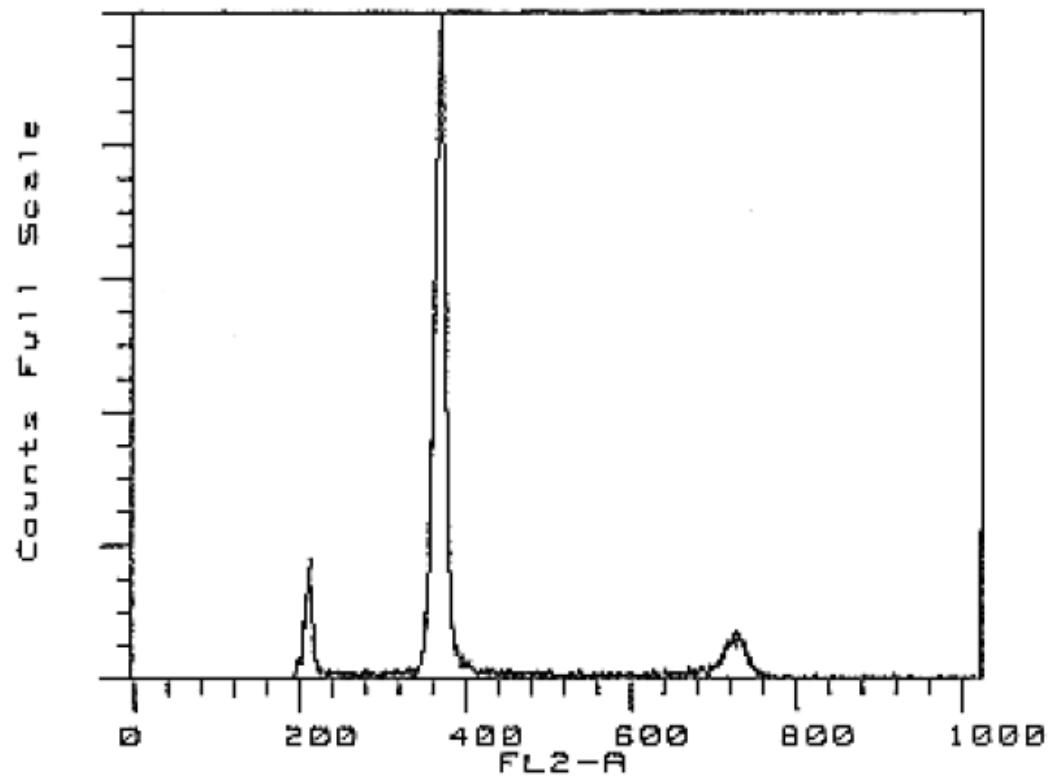


Figure 4. FL2-A DNA histogram of breast tumor tissue, prepared by in vitro FNA, which has been gated to exclude aggregates.