

CITOFUORIMETRIA (CITOMETRIA A FLUSSO)

Come analizziamo il campione biologico?



Analisi delle caratteristiche
biochimico/fisiche dei singoli
componenti, mantenendo
intatto il campione



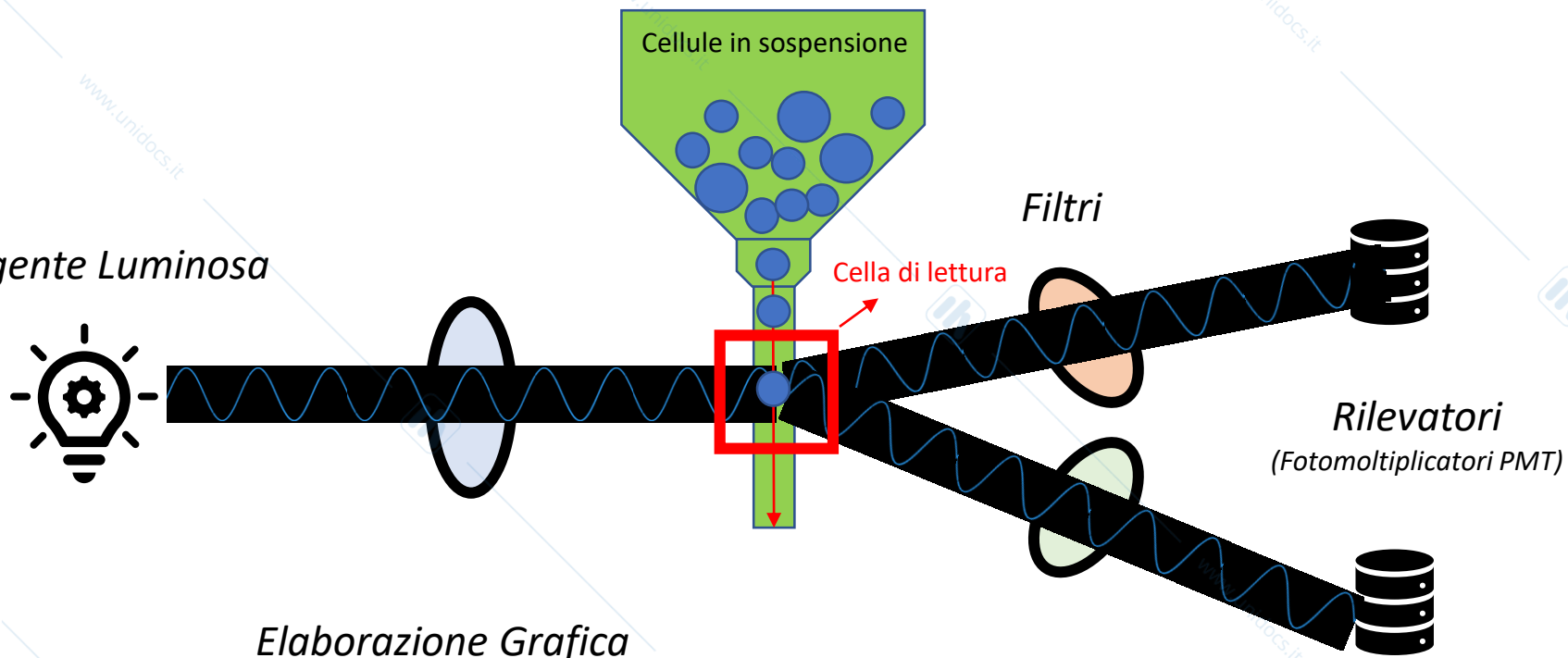
Analisi dell'intero campione
→ mediante l'analisi dell'espressione
di determinate caratteristiche, si risale
ai singoli componenti che costituiscono
il campione originale

CITOFUORIMETRIA (CFM)

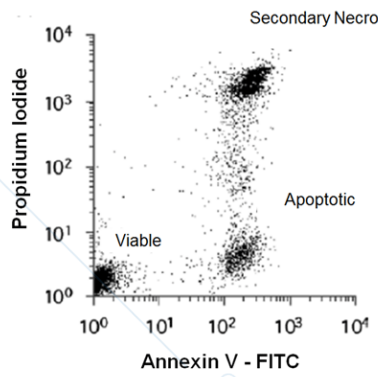
- Metodica che consente la misurazione e la caratterizzazione multiparametrica di singole cellule in sospensione immerse in un fluido;
- Permette di ottenere informazioni sulle proprietà fisiche e/o biochimiche di ogni singola cellula presente nella sospensione;
- *Multiparametrica o multidimensionale*: consente di misurare più di un parametro contemporaneamente (sia morfologici che associati a marcatori fluorescenti) → *analisi policromatica*;
- Nasce a partire dagli anni '70 come evoluzione del microscopio: inizialmente consentiva la misurazione di pochi parametri (uno morfologico e uno fluorescente, sfruttando reazioni enzimatiche tipiche di alcune popolazioni cellulari che possono produrre un composto fluorescente);
- Grazie poi allo sviluppo e alla commercializzazione di anticorpi e di fluorocromi via via più efficienti e selettivi, è diventata una tecnica largamente impiegata sia nella ricerca biomedica che nella pratica clinica;

Principi di CFM

Sistema Microfluidico



Elaborazione Grafica



Computer

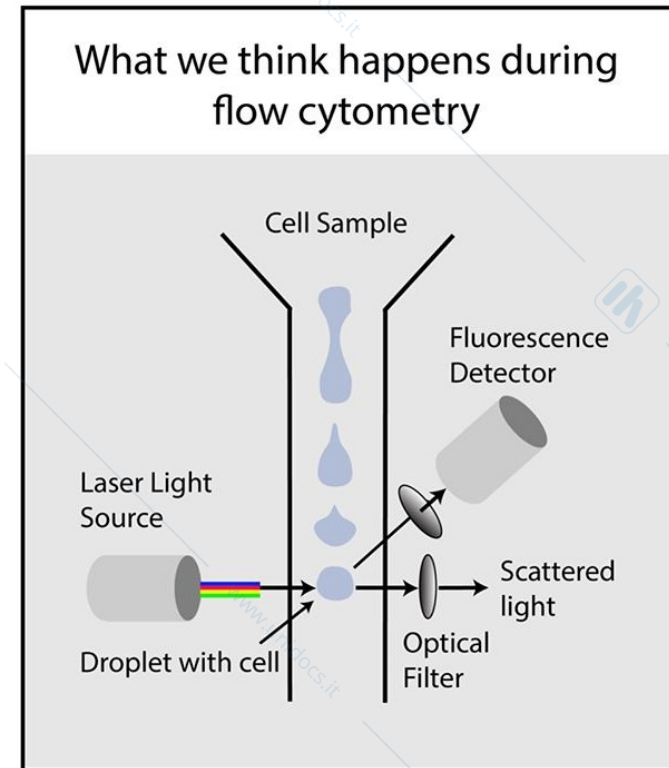


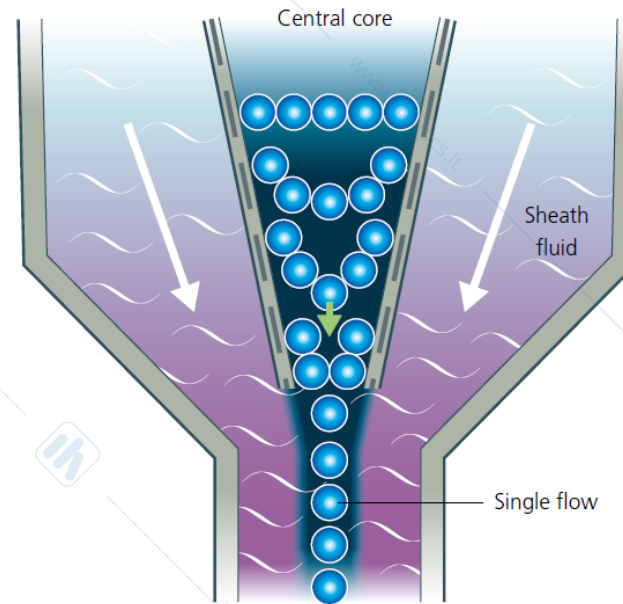
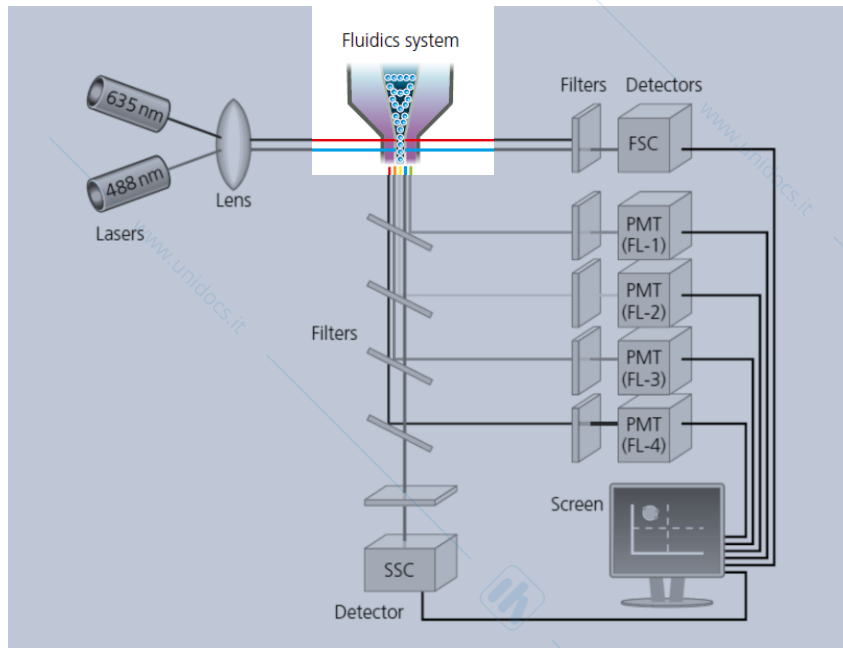
Conversione segnale luminoso → segnale elettrico

FOCALIZZAZIONE IDRODINAMICA → Una sospensione cellulare monodispersa viene iniettata in un sistema fluidico che consente, in opportune condizioni idrodinamiche, di trasportare le cellule in maniera separata e ordinata fino alla cella di misurazione dove incontra il fascio di luce focalizzata proveniente dalla sorgente luminosa;

LIGHT SCATTERING e FLUORESCENZA → L'incontro tra il raggio di luce e ogni singola cellula presente nel flusso genera segnali luminosi, che correlano alle caratteristiche fisiche della cellula e/o alla presenza di marcatori fluorescenti.

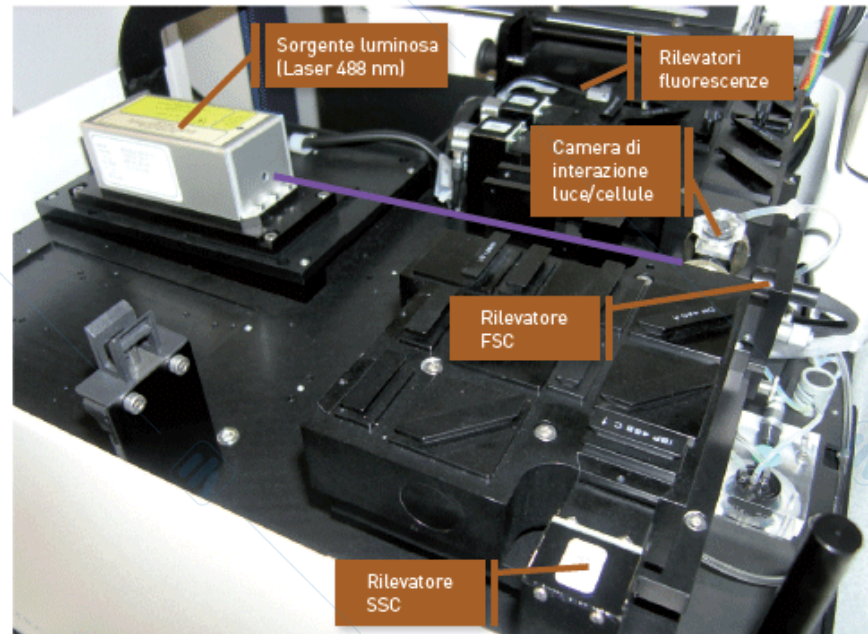
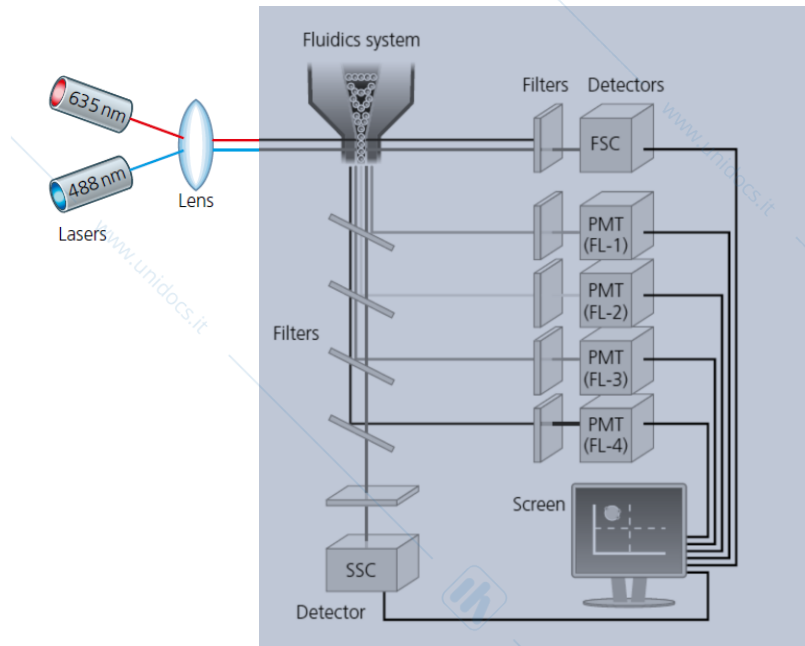
REGISTRAZIONE e CONVERSIONE del SEGNALE → I segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. Successivamente, tali segnali elettrici, opportunamente amplificati e digitalizzati, sono inviati ad un analizzatore di dati che provvede alla loro visualizzazione su monitor, rappresentazione grafica, e definizione statistica.





Il principio su cui si fonda l'analisi CFM è la **FOCALIZZAZIONE IDRODINAMICA**:

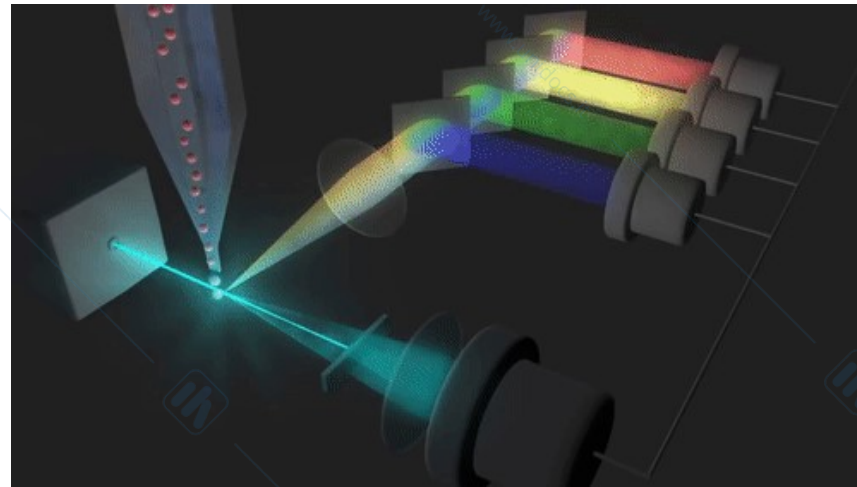
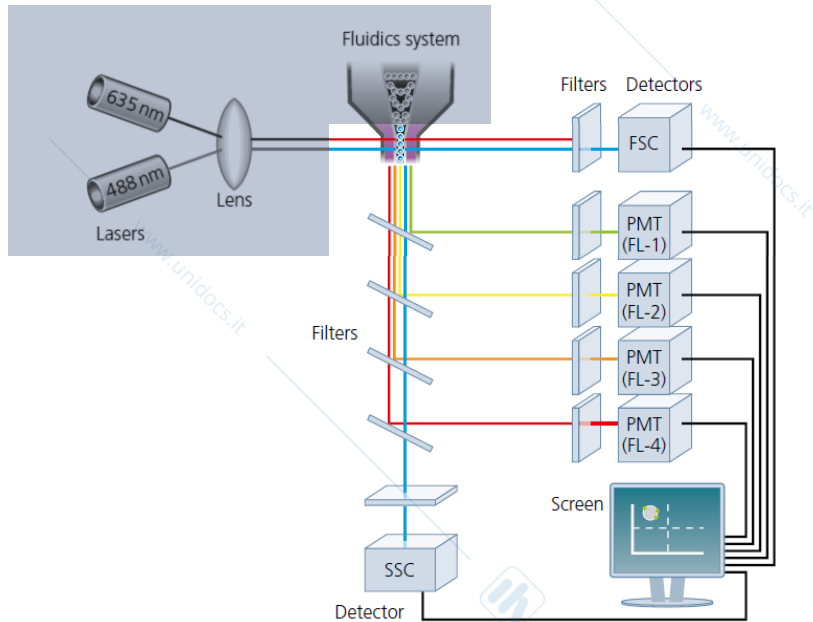
- le cellule vengono iniettate in una camera di flusso, diluite ed allineate attraverso un sistema fluidico;
- in questo modo, le cellule passano ad elevata velocità e intersecano il raggio luminoso della sorgente di eccitazione, venendo così «interrogate» singolarmente;
- senza focalizzazione, il capillare (che ha un diametro tipicamente di 70 μm) si bloccherebbe e non sarebbe possibile analizzare le cellule singolarmente;



L'**ottica di eccitazione** consiste di:

- Una o più sorgenti luminose:
 - **laser**: sorgenti monocromatiche, costose ma estremamente stabili e precise; ottime sorgenti per eccitare fluorocromi; nella maggior parte dei citofluorimetri moderni si utilizza un laser a ioni di Argon che emette luce alla lunghezza d'onda di 488 nm (altri laser molto utilizzati sono ad Elio, Neon, Krypton);
 - **lampade a vapori di mercurio o xenon (arc lamp)**: più economiche rispetto ad un laser, producono luce a differenti lunghezze d'onda che necessitano quindi di opportuni filtri per selezionare determinate componenti;
- Lenti di focalizzazione per collimare il fascio luminoso prima del punto di interrogazione

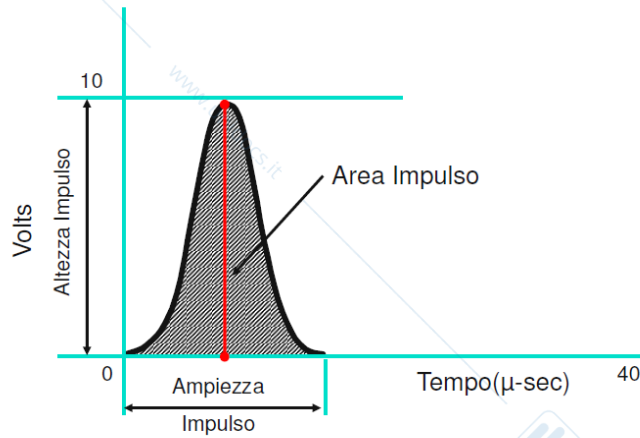
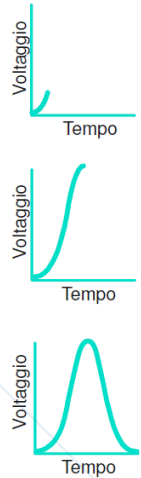
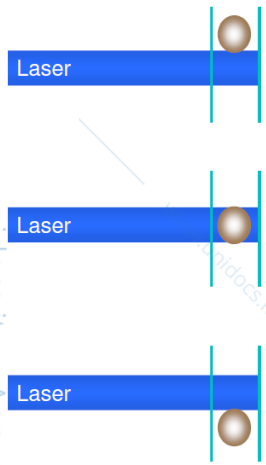
Il Sistema Ottico



L'*ottica di rilevazione* comprende:

- Una lente di collezione che raccoglie i segnali generati dall'interazione del fascio luminoso con la singola cellula;
- Un sistema di specchi e filtri ottici (di solito posizionati ortogonalmente al fascio di eccitazione), in grado di separare le specifiche lunghezze d'onda che devono essere raccolte dai differenti rivelatori o fotomoltiplicatori (PMT), sensori elettronici che trasformano il segnale OTTICO (analogico) in segnale ELETTRICO (digitale);

Misurazione e Rappresentazione del Segnale

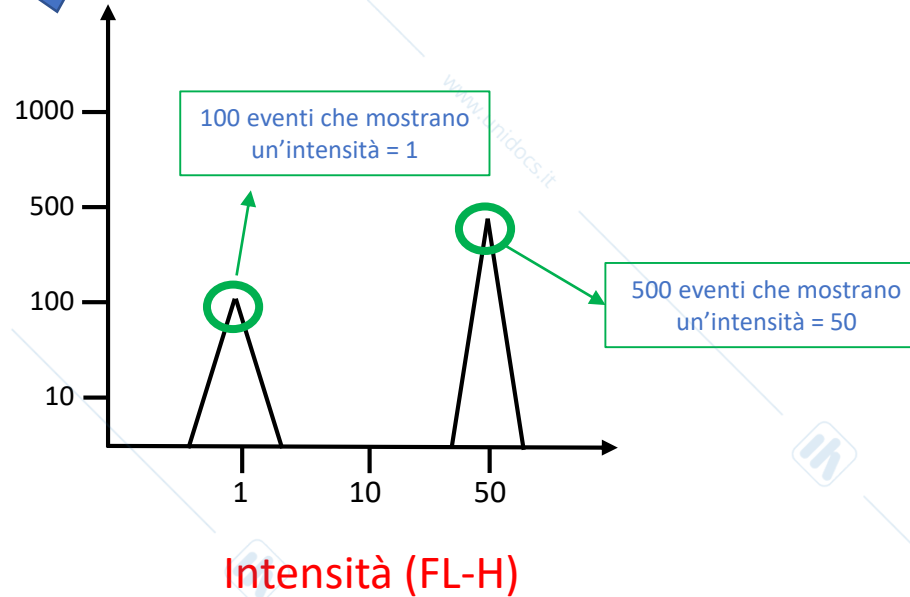


Nel processo di conversione del segnale analogico (luminoso) in segnale digitale (elettrico), il parametro che viene considerato per descrivere discretamente l'impulso (*intensità del segnale*) è l'**ALTEZZA (H, height)** del picco; per tale motivo, nella rappresentazione grafica si trova la sigla FL-H

N Eventi (cellule)
n 1
n 2
n 3
n 4
n 5
n 6
n 7
n 8
...
fino a 20.000!

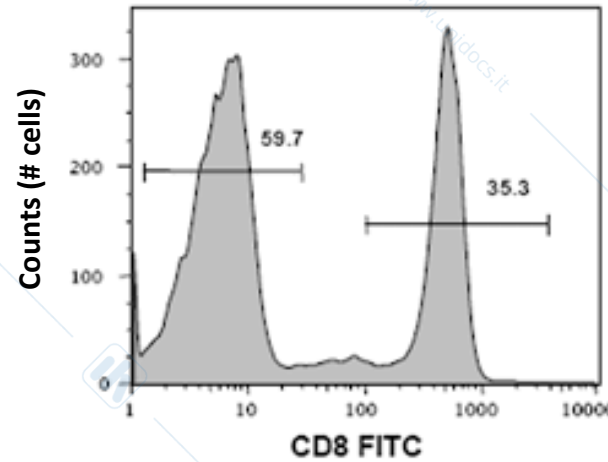
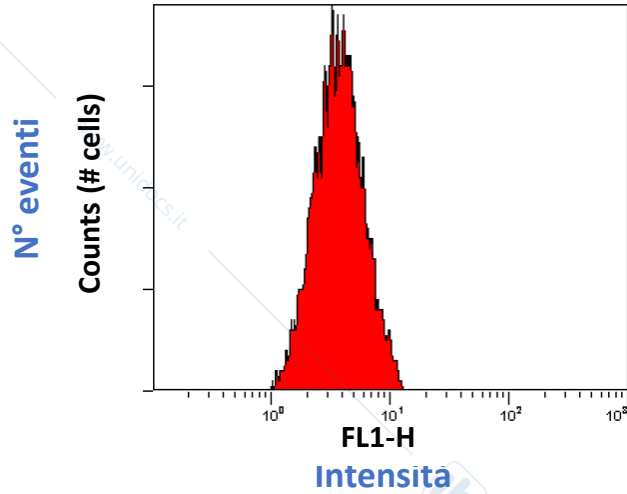
Intensità
1
1
10
1
10
10
1
1
...
1

Rappresentazione Monoparametrica

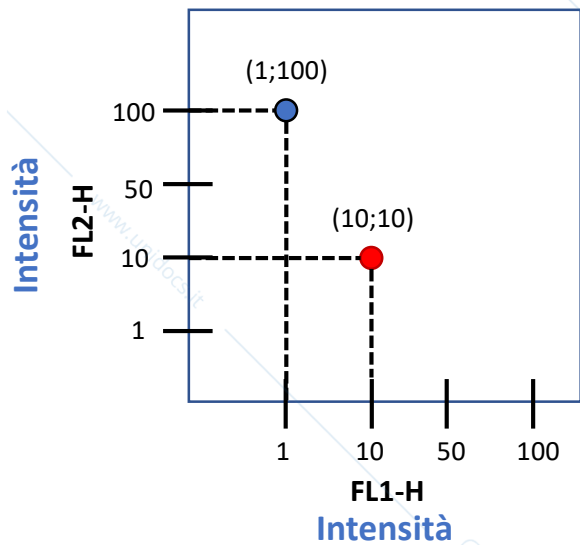


Misurazione e Rappresentazione del Segnale

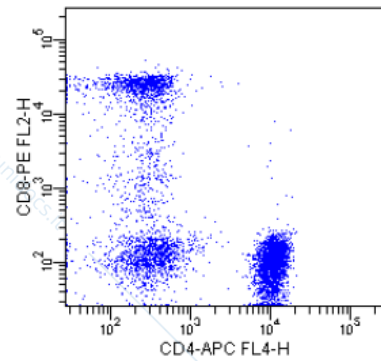
Monoparametrica



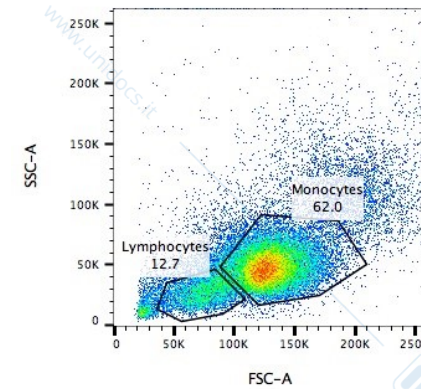
Biparametrica



Correlano 2 parametri per ogni singola cellula analizzata



Dot plot
ogni punto rappresenta una cellula



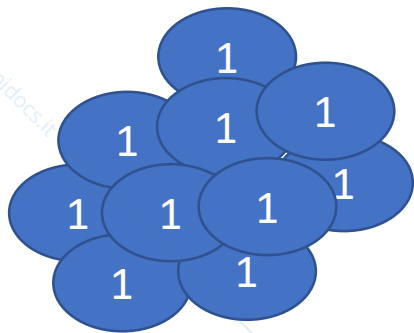
Density plot
i colori della «nuvola»
rappresentano la densità dei punti

Capacità Descrittiva della CFM



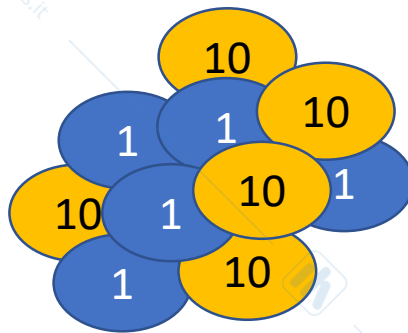
Campione Biologico

n=10



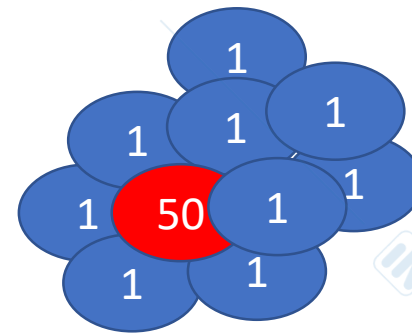
1

n=10

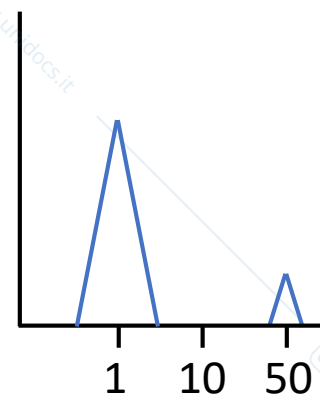
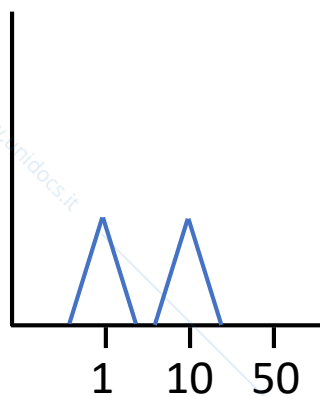
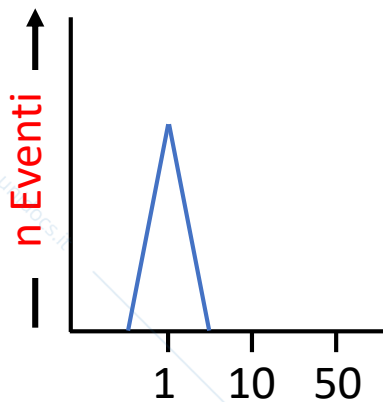


~5

n=10



~5

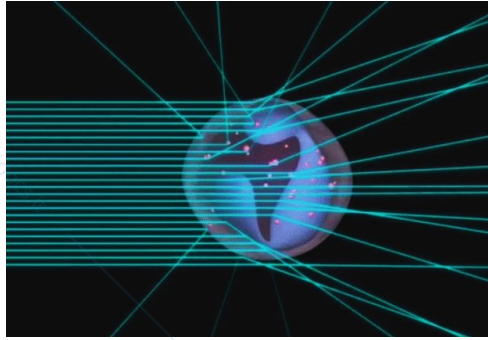


Intensità Fluorescenza

Quali parametri vengono misurati?

Light scattering

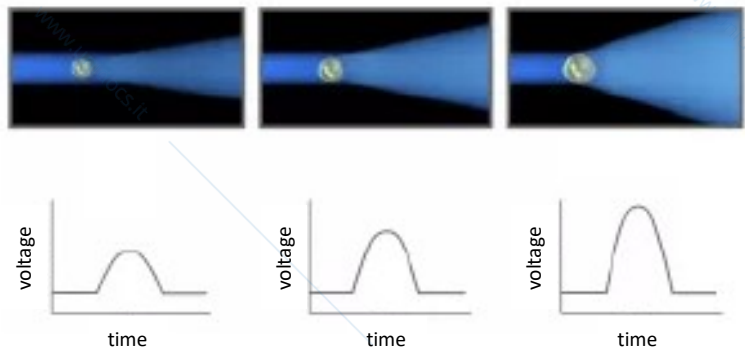
Luce diffusa dalla cellula



Forniscono informazioni sulle caratteristiche della cellula

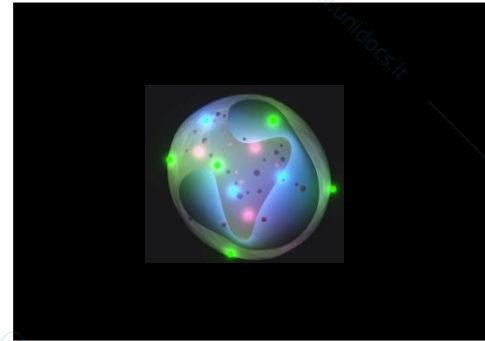


Dimensione delle cellule e complessità citoplasmatica

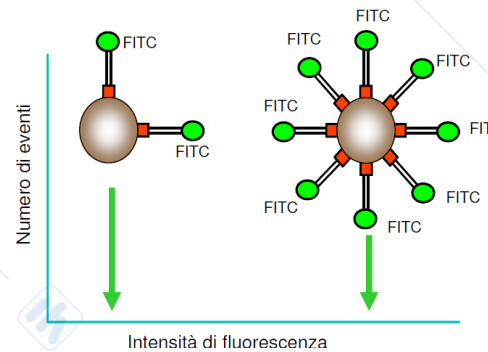


Emissione Fluorescente

(se le cellule sono state opportunamente marcate)

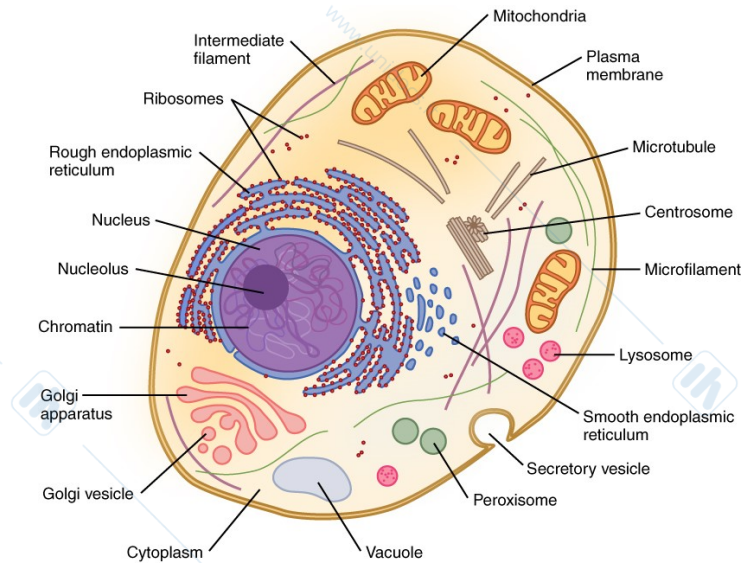
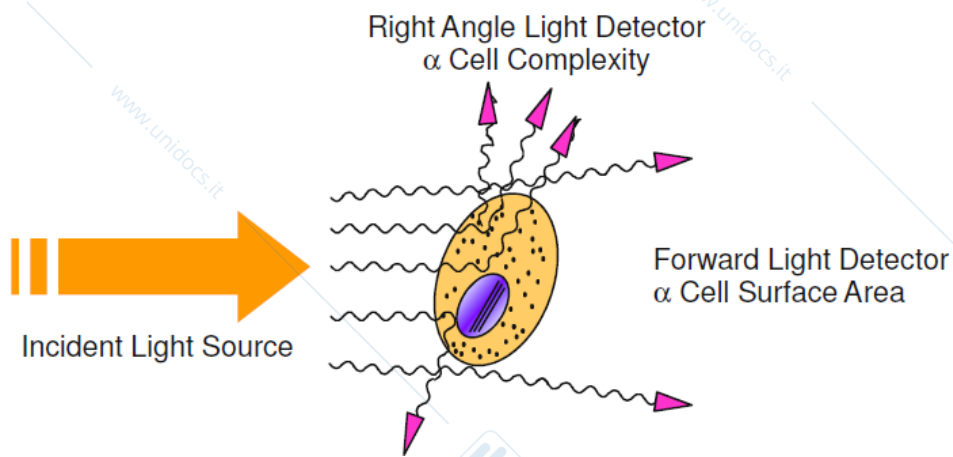


Intensità della fluorescenza è proporzionale alla presenza di siti di legame (antigene)



Parametri Morfologici

Forward scatter (FSC) e Side Scatter (SSC)



Forward Scatter FSC

- Parametro morfologico, proporzionale al diametro (dimensione) della cellula, dovuto principalmente alla luce diffusa attorno alla cellula;
- viene registrato davanti alla sorgente luminosa;

Side Scatter (SSC)

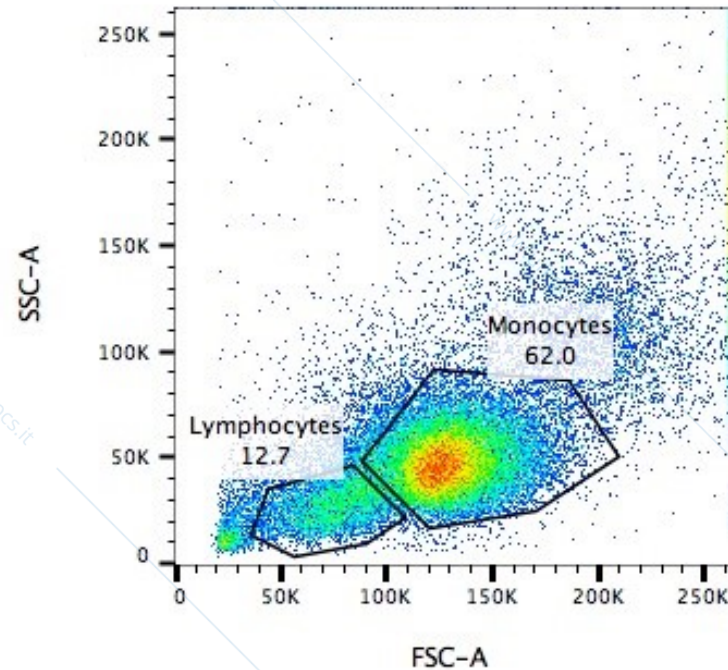
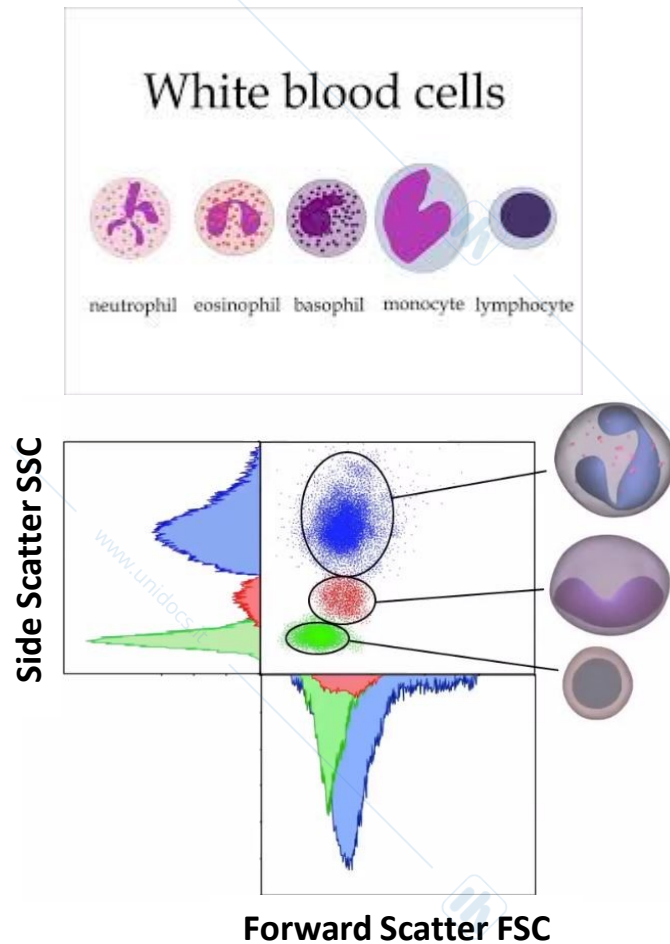
- Parametro morfologico di «complessità» citoplasmatica, che correla con forma e numero di vescicole, organelli, etc;
- viene registrato a 90° rispetto alla luce incidente sulla cellula;

Parametri Morfologici

Forward scatter (FSC) e Side Scatter (SSC)

FSC e SSC vengono classicamente utilizzati per discriminare le cellule del Sistema Immunitario, che presentano diverse caratteristiche morfologiche:

- ▶ dimensione monociti > dimensione linfociti → ↑ FSC
- ▶ i granulociti hanno un citoplasma ricco di granuli secretori → ↑ SSC



Fluorocromi

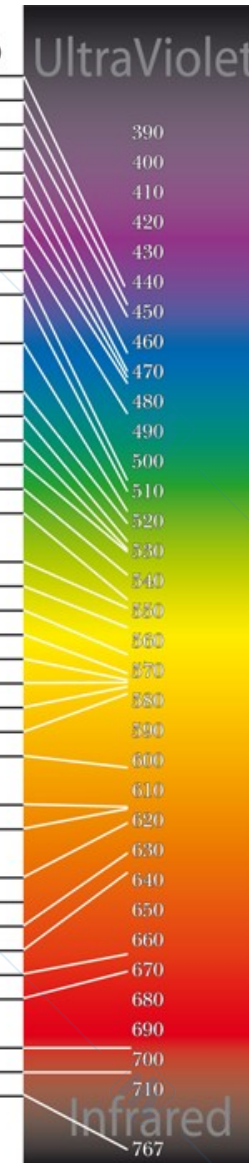
► Oltre alla misurazione dei parametri morfologici (FSC e SSC), il vero potere mutliparametrico della CFM è reso possibile dall'elevata disponibilità in commercio di **FLUOROCROMI**;

► Sono molecole che assorbono luce ad una determinata lunghezza d'onda (λ *Eccitazione, Ex*) per poi emettere luce ad una lunghezza d'onda maggiore (λ *Emissione, Em*);

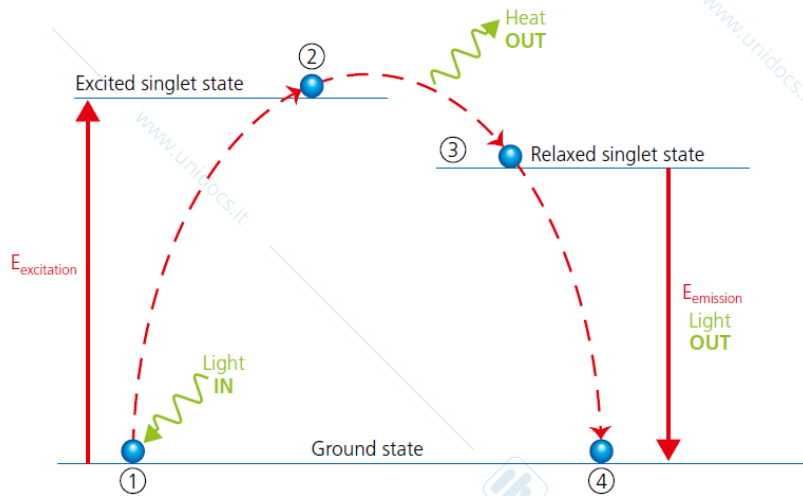
► Vengono coniugati ad anticorpi in grado di riconoscere specifici antigeni cellulari, consentendo così al CFM di rilevare, per ogni singola cellula analizzata, un segnale fluorescente (se è presente l'antigene specifico) e di correlarne l'intensità alla sua quantità;

► Esistono inoltre sonde fluorescenti, la cui fluorescenza correla con determinati parametri cellulari (es potenziale di membrana mitocondriale, contenuto DNA, etc)

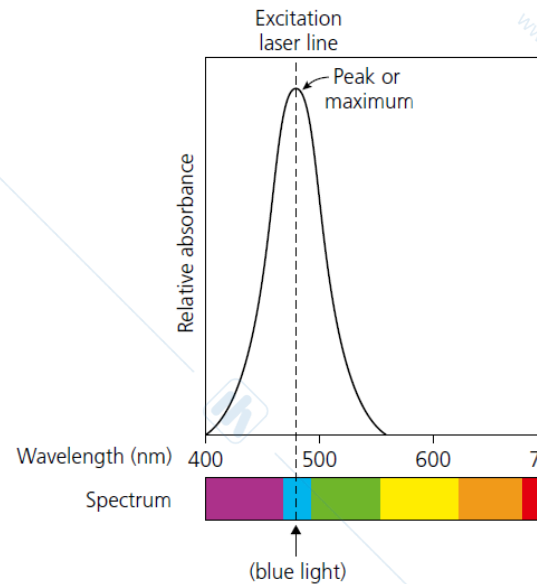
Fluorophore	Absorption (nm)	Emission (nm)
Fast Blue	360	440
Alexa Fluor® 350	346	445
AMCA	350	450
Bisbenzamide	360	461
Aequorin	Ca ⁺⁺ photoprotein	469
Hoechst 33258	360	470
ACMA UV	412, 430	471, 474
Hoechst 33342	343	483
Cy2	489	506
GFP Wild type Non UV ex.	475	509
GFP Wild type UV ex.	395	509
Alexa Fluor® 488	494	517
Calcein	496	517
Fluorescein (FITC/DTAF)	495	520
Fluoro-Jade® B	480	525
Lucifer yellow	425	528
JC-1	514	529
Fluoro-Gold (Hydroxystilbamidine)	361	536
Alexa Fluor® 430	430	545
Eosin	524	545
6-JOE UV	520	548
Alexa Fluor® 532	530	555
Cy3	548	562
Alexa Fluor® 546	554	570
Alexa Fluor® 555	555	571
TRITC	547	572
B-phycoerythrin	545, 565	575
R-phycoerythrin	480, 545, 565	578
Rhodamine	539, 574	602
Alexa Fluor® 568	578	602
Texas Red®	589	615
Alexa Fluor® 594	590	617
Propidium Iodide (PI)	536	617
Ethidium Bromide	493	620
Feulgen (Pararosanoline)	570	625
Acid Fuchsin	540	630
Alexa Fluor® 633	621	639
Alexa Fluor® 647	649	666
Cy5	650	670
PE-Cy5 conjugates	480, 565, 650	670
Alexa Fluor® 660	668	698
Alexa Fluor® 680	684	707
PE-Cy7 conjugates	480, 565, 743	767
Cy7	743	767



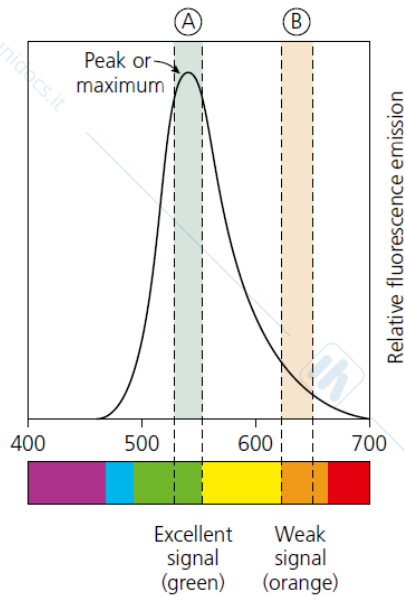
Eccitazione ed Emissione



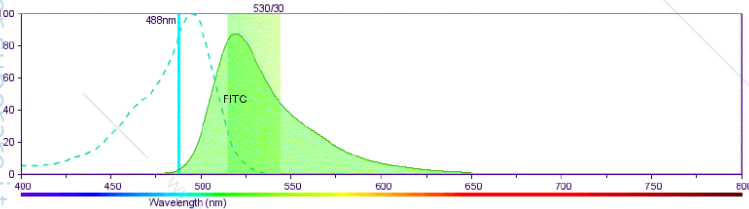
Spettro di Eccitazione



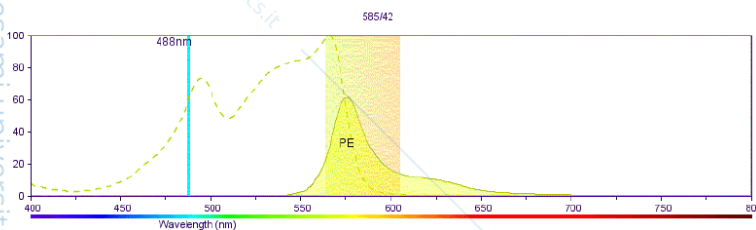
Spettro di Emissione



FITC



PE



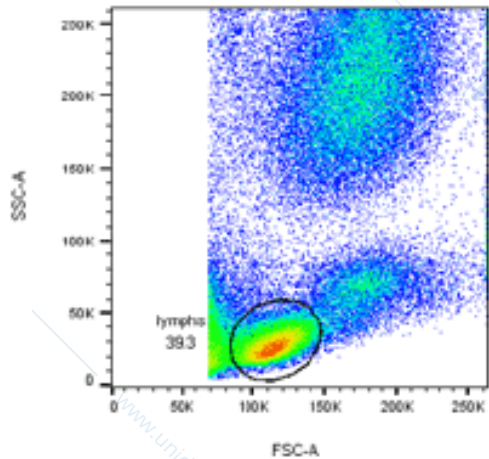
► Con un unico laser, che emette luce a 488 nm, si è in grado di eccitare contemporaneamente i 2 fluorocromi, che assorbono entrambi a quella specifica lunghezza d'onda, ma emettono luce a lunghezze d'onda diverse;

► tramite il sistema ottico di acquisizione, il CFM è così in grado di separare la fluorescenza dovuta al FITC (verde, 530/30 nm) da quella del PE (585/42 nm);

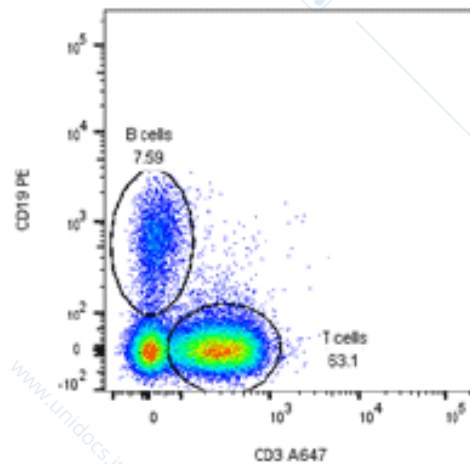
► più separati sono i picchi di emissione di 2 fluorocromi è meglio è!

► se sono parzialmente sovrapposti, bisogna COMPENSARE;

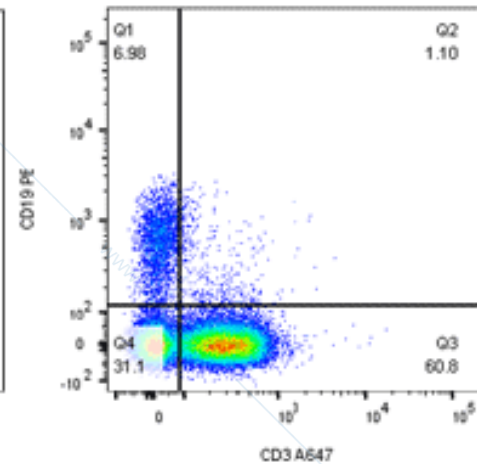
- ▶ L'analisi multiparametrica, uno dei punti di forza della CFM, consente di affrontare i problemi biologici della eterogeneità cellulare;
- ▶ **Gating**: utilizzando una finestra elettronica, permette di isolare una determinata popolazione da tutte le altre cellule e di analizzare i parametri successivi solo all'interno della popolazione selezionata (*gated*), dividendola così in ulteriori subpopolazioni;



Tramite FSC e SSC, si selezionano i linfociti...



... e successivamente si analizzano le marcature per CD19 (antigene dei linfociti B) e CD3 (antigene dei linfociti T), che consentono di discriminare tra i 2 sottotipi di linfociti

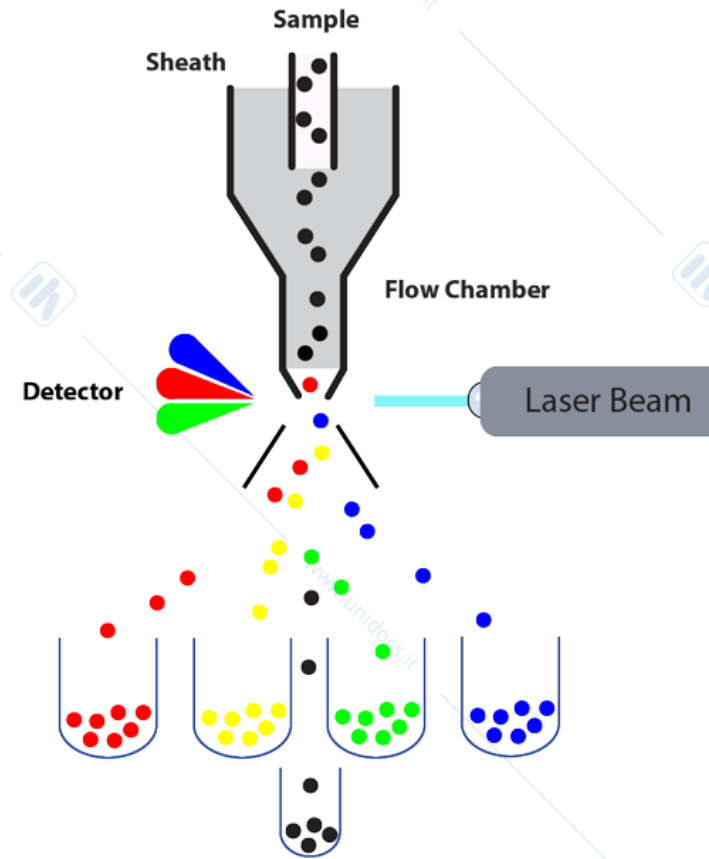


- ▶ Il gating è una separazione «virtuale», ma si può eseguire anche una separazione reale delle cellule: il **Sorting**

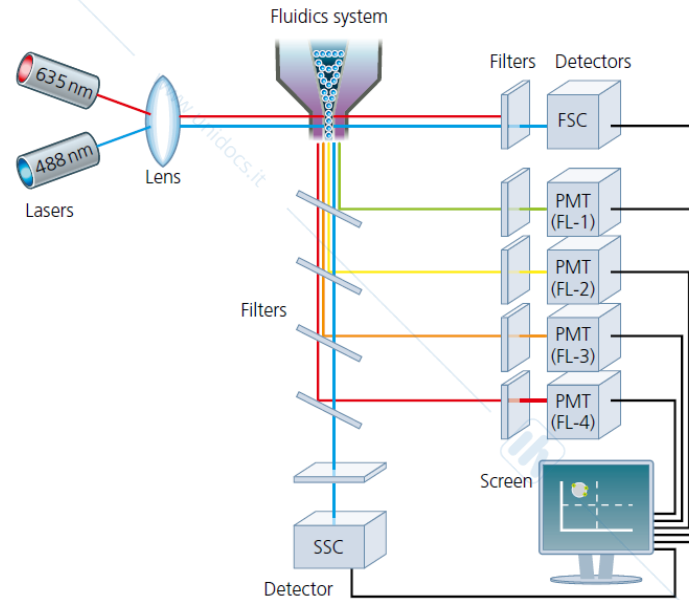
Sorting

Fluorescent-Activated Cell Sorter

- ▶ consente di raccogliere fisicamente le popolazioni che sono state preventivamente selezionate in base a determinati parametri;
- ▶ tramite il *gating*, si impostano delle finestre di selezione per identificare le popolazioni di interesse che verranno separate e raccolte in provette distinte;
- ▶ se una cellula possiede le caratteristiche corrette che rispettano i criteri decisi dall'operatore (es FSC, SSC, marcatura fluorescente specifica) viene caricata elettricamente;
- ▶ poco più a valle, alcune piastre cariche elettricamente deviano il flusso in base alla carica e separano così le cellule;
- ▶ Le cellule mantengono la vitalità dopo il sorting!



Esempio di equipaggiamento di un citofluorimetro



LASER	EXCITATION LASER LINE (nm)	FILTRO	CANALE
ARGON (LASER1)	488	488/10	Foward Scatter – FSC
		488/10	Side Scatter – SSC
		530/30	FL1
		585/42	FL2
		670LP	FL3
RED DIODE (LASER 2)	635	661/16	FL4

CITOFUORIMETRIA (CFM)

VANTAGGI

- analisi multiparametrica;
- rapidità analisi (10.000 cellule/secondo);
- numerosità del campione analizzato (riproducibilità e affidabilità statistica delle letture);
- vitalità cellulare preservata: possibilità di recuperare il campione per ulteriori analisi;
- non solo cellule: separazione e quantificazione di vescicole (esosomi), biglie fluorescenti, etc;
- la riduzione dei costi e della complessità nell'utilizzo dello strumento;

SVANTAGGI

- difficoltà di analizzare popolazioni molto rare, che possono confondersi con il rumore di fondo;
- necessità di lavorare con cellule in sospensione;
- non si sa come le cellule sono marcate → incapacità di descrivere forme e strutture cellulari marcate (questo svantaggio in parte è superato in alcuni citofluorimetri di nuova generazione in grado di fotografare le cellule che passano nel capillare);

Flow Cytometry

<https://www.youtube.com/watch?v=EQXPJ7eesQ>

Multiparametric Assay

<https://www.youtube.com/watch?v=B2zreF2dnWk>

What is flow cytometry?

https://www.youtube.com/watch?v=itAboLzjB_c

Alcune applicazioni....



www.unidocs.it

www.unidocs.it

www.unidocs.it

www.unidocs.it

www.unidocs.it

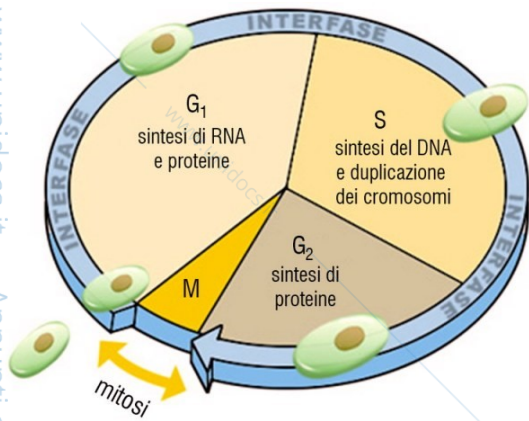
www.unidocs.it

www.unidocs.it

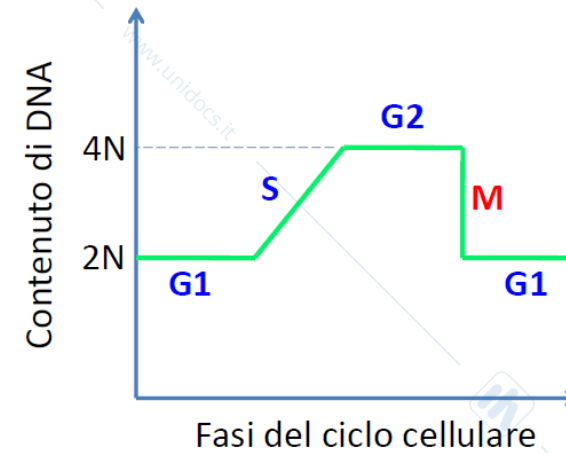
www.unidocs.it

www.

Ciclo Cellulare

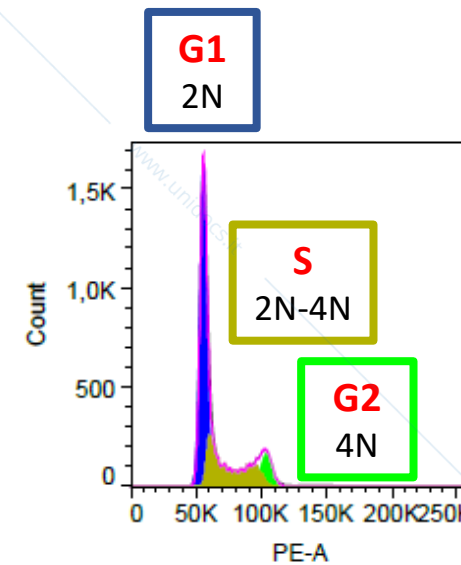


- ▶ **G₁**: contenuto DNA diploide (2N)
- ▶ **S**: contenuto DNA variabile tra 2N e 4N
- ▶ **G₂**: contenuto DNA tetraploide (4N)
- ▶ **M**: la cellula si divide in due cellule figlie, il contenuto di DNA diploide (2N);



Propidio Ioduro (PI)

- ▶ Intercalante fluorescente del DNA (**Ex 488 nm, Em 625 nm**);
- ▶ PI non può penetrare le membrane cellulari, perciò entra esclusivamente nelle cellule permeabilizzate o morte;
- ▶ prima della lettura, le cellule vengono quindi fissate e permeabilizzate, in modo che il PI possa legarsi al DNA contenuto nei nuclei;
- ▶ l'intensità di fluorescenza misurata è proporzionale al contenuto di DNA della singola cellula;

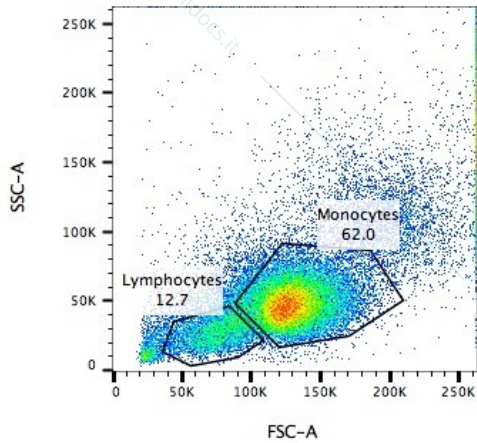


Intensità doppia del picco «G₂» (verde, ~100K) rispetto al picco «G₁» (blu, ~50K)

Tipizzazione Cellule Sistema Immunitario

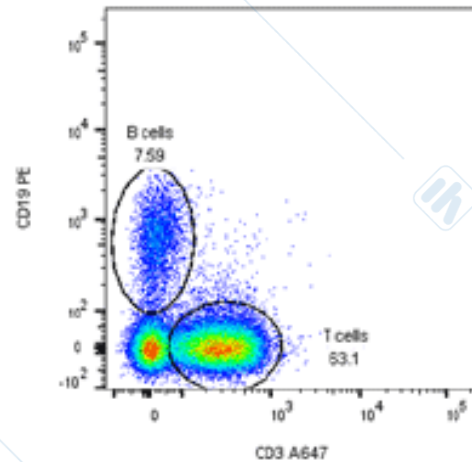
Da una prima caratterizzazione morfologica....

Analisi per FSC/SSC



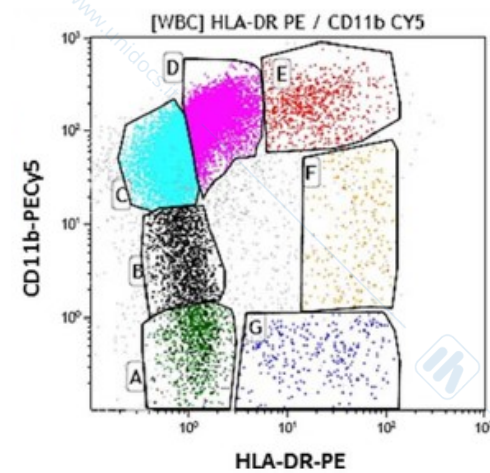
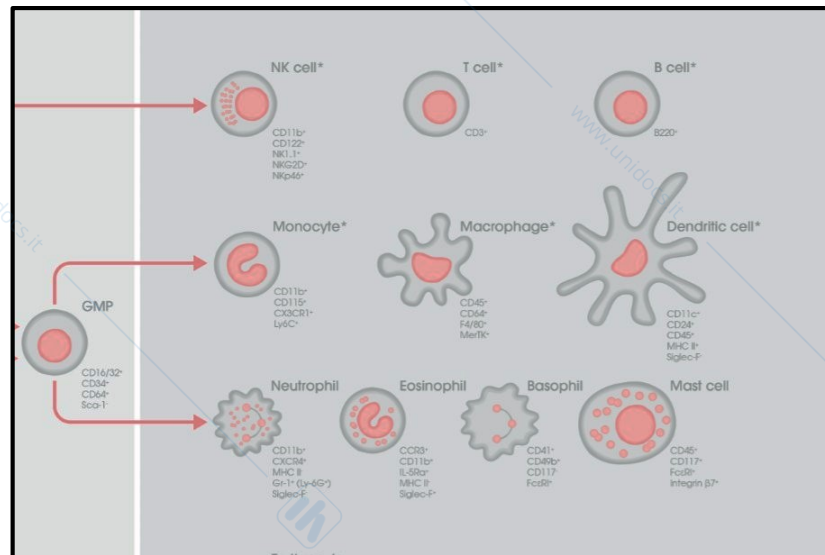
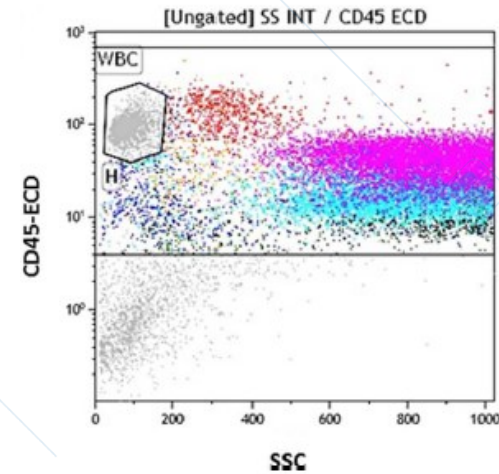
... alla marcatura di antigeni specifici di determinate popolazioni....

Linfociti B/Linfociti T



... alle strategie di gating più complesse!

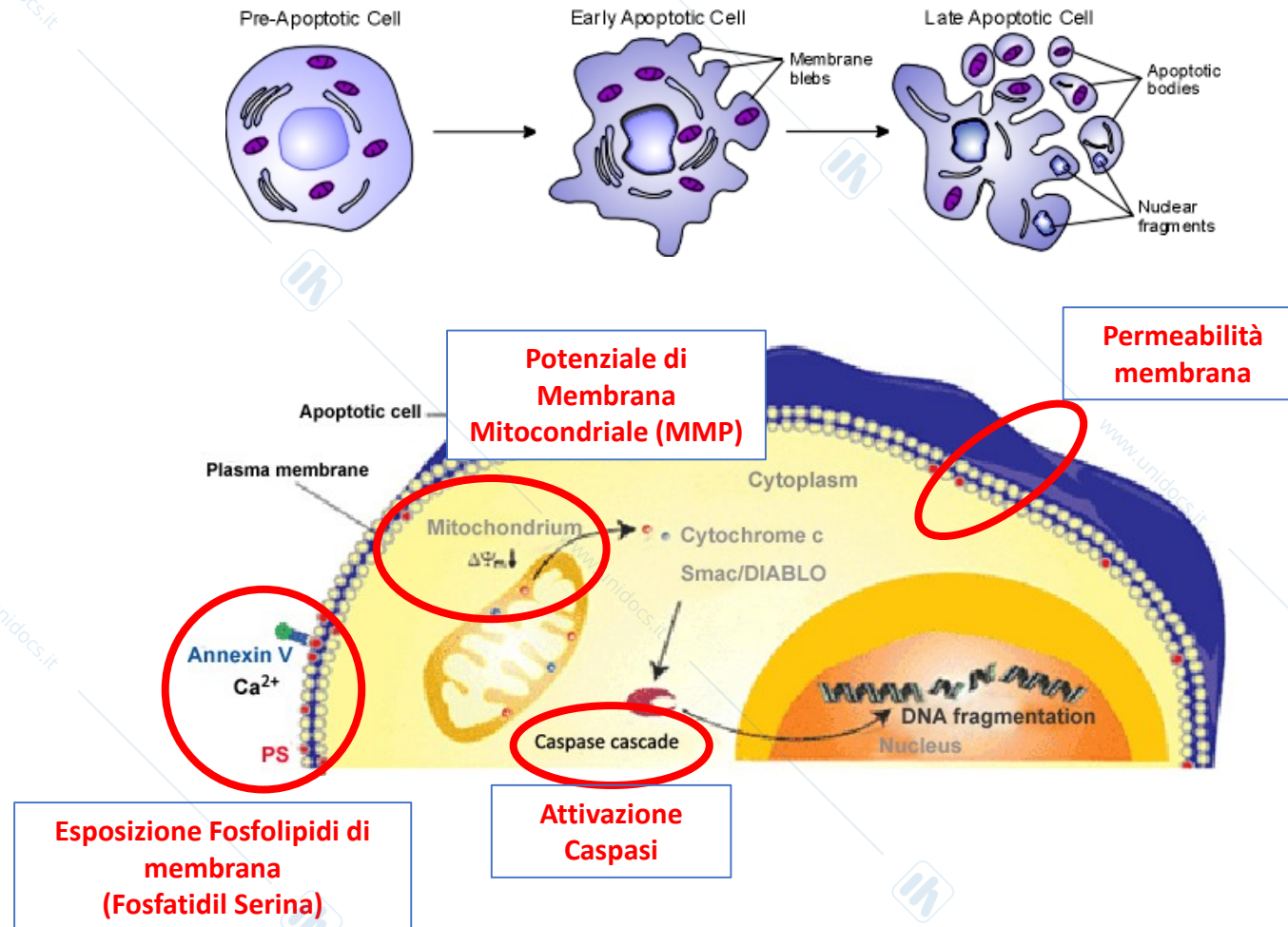
Differenziamento Monociti



Lambert et al, Cytometry Part B 2017

Apoptosi

- ▶ Meccanismo di “morte cellulare programmata”, coinvolto in numerose condizioni patologiche;
- ▶ Processo mediato da diverse vie biochimiche di segnale (sia extracellulari che intracellulari), che coinvolgono organelli (mitocondri) e proteine enzimatiche (caspasi) e che via via amplificano il segnale originale, conducendo la cellula irreversibilmente alla morte;



Biparametric AnnexinV / PI

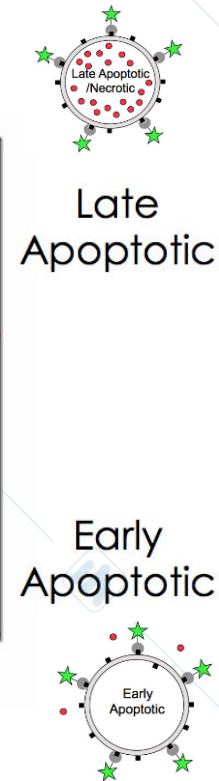
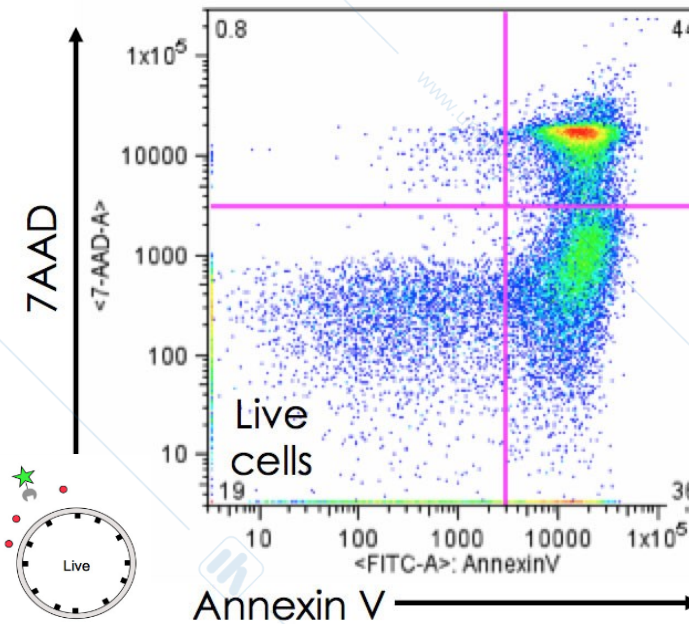
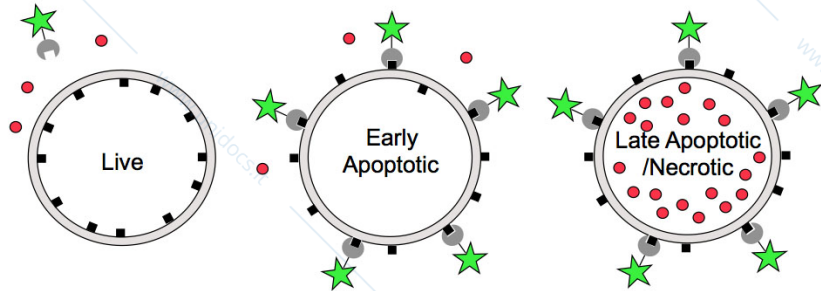
- ▶ L'esposizione di PS sul foglietto esterno della membrana citoplasmatica è un evento molto precoce nella cascata che conduce alla morte cellulare per via apoptotica;
- ▶ Solo più tardivamente avviene la permeabilizzazione della membrana plasmatica, che porta all'ingresso nel citoplasma di molecole che normalmente non vengono assorbite dalla cellula (o comunque ne vengono escluse da trasportatori di membrana);
- ▶ AnnexinV è una molecola che presenta un'elevatissima affinità di legame per PS;
- ▶ La permeabilizzazione della membrana plasmatica può essere valutata mediante l'uso di sonde fluorescenti che si intercalano con il DNA (Propidio Ioduro PI, 7-Aminoactinomicina D 7-AAD), che normalmente vengono escluse da una cellula viva;



■ Phosphatidyl Serine (PS)

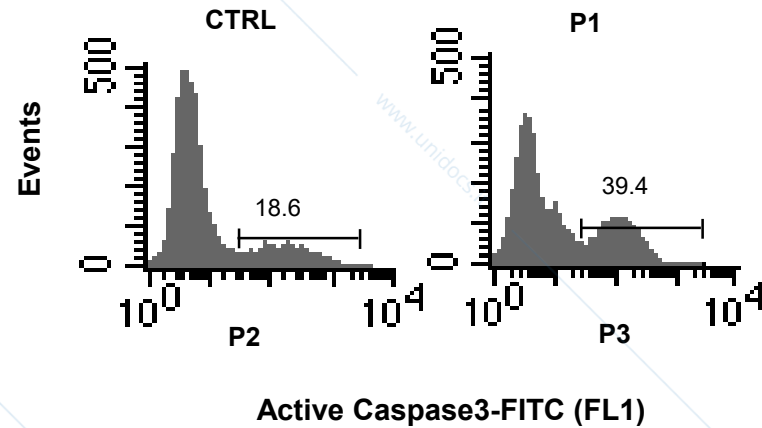
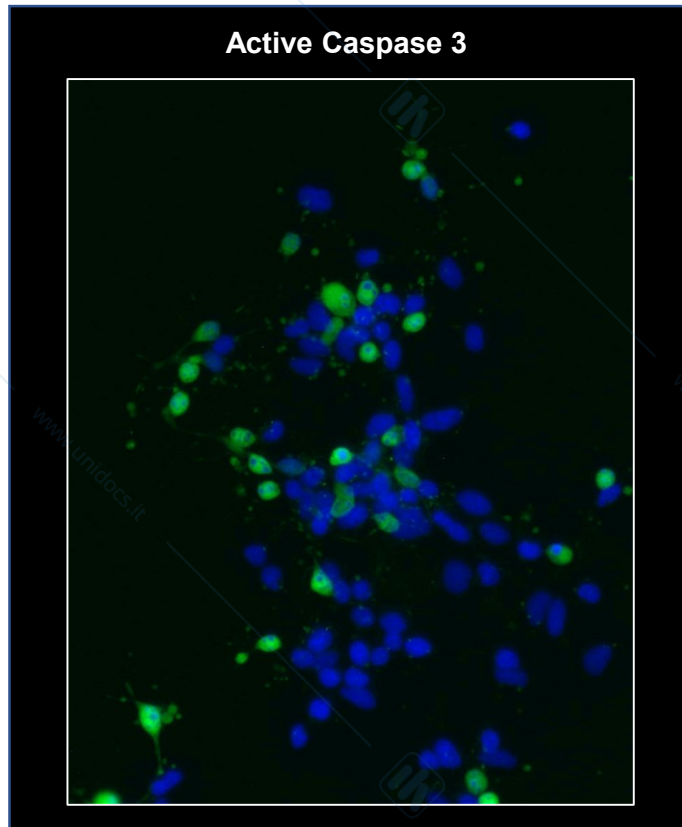
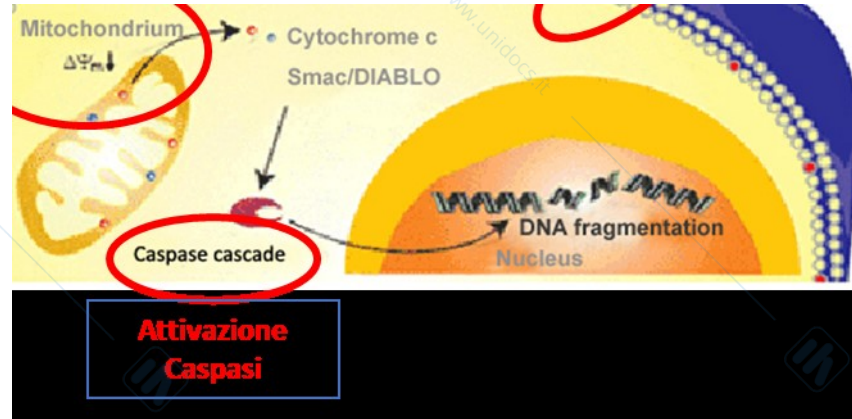
● PI (7-AAD)

★ AnnexinV coniugata con fluoroforo

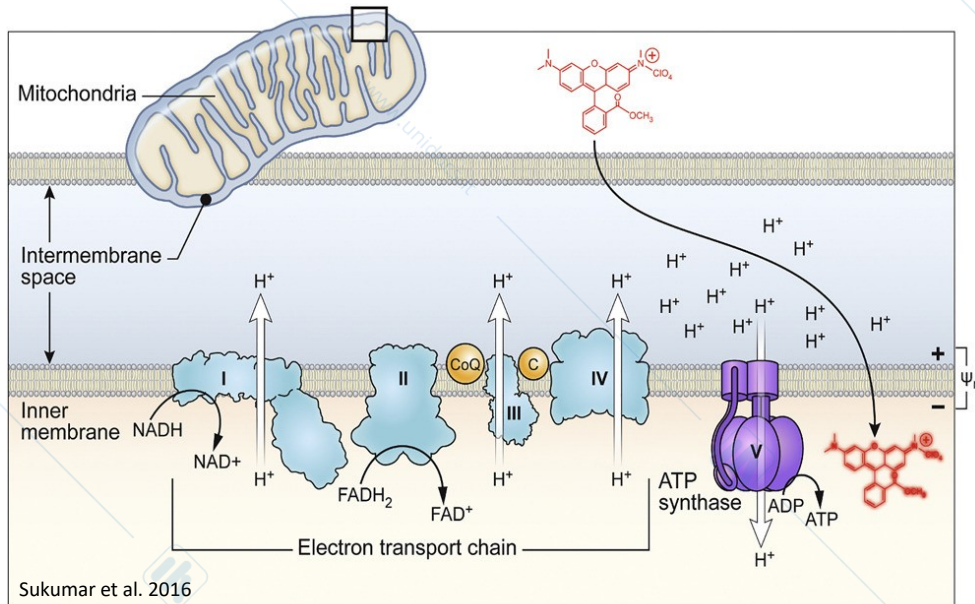


Attivazione Caspasi 3

► Nella valutazione del meccanismo dell'apoptosi, è importante valutare l'espressione delle caspasi, in particolare della caspasi effettrice 3, che quando attiva, innesca una serie di fenomeni biochimici irreversibili;

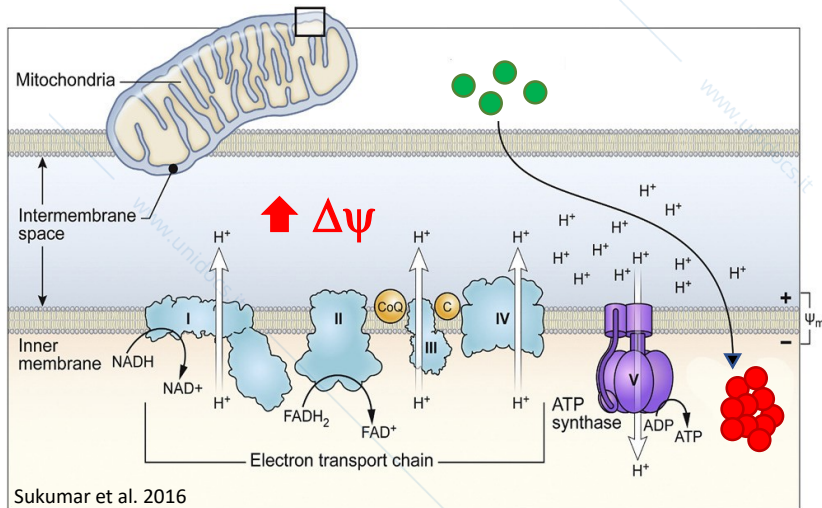


Potenziale di Membrana Mitochondriale $\Delta\psi$



- ▶ Il potenziale di membrana mitocondriale (o gradiente elettrochimico $\Delta\psi$) è un importante parametro di funzionalità mitocondriale;
- ▶ Viene mantenuto attivamente dagli enzimi della catena respiratoria della membrana interna mitocondriale che «pompano» ioni H^+ nello spazio intermembranario;
- ▶ Questo gradiente viene sfruttato dall'ATP sintasi per produrre ATP e generare quindi energia;
- ▶ Disfunzioni della catena respiratoria o più in generale alterazioni mitocondriali possono alterare il $\Delta\psi$;
- ▶ Esistono in commercio diverse sonde fluorescenti in grado di marcare i mitocondri sulla base del loro potenziale elettrochimico (JC1, TMRM);

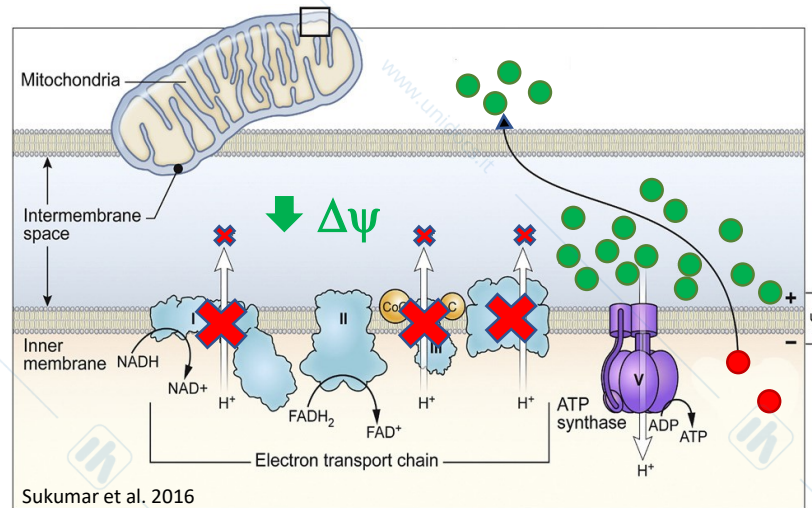
Potenziale di Membrana Mitochondriale $\Delta\psi$



JC-1 aggregato $E_m \sim 590 \text{ nm}$

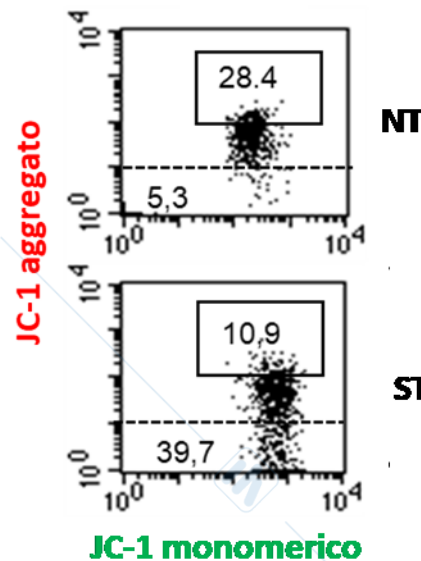
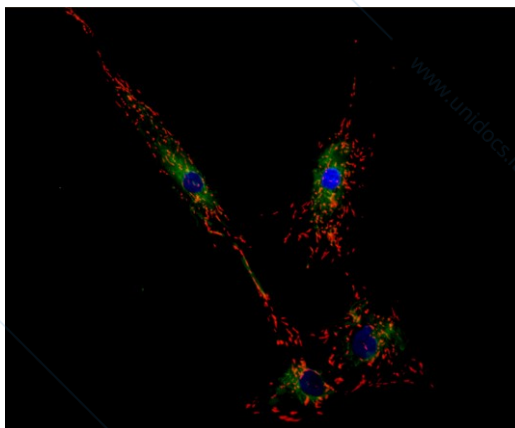
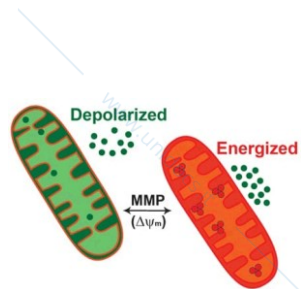
In presenza di un $\Delta\psi$ elevato, JC-1 si accumula nei mitocondri in forma aggregata, emettendo una fluorescenza rossa

JC-1



JC-1 monomero $E_m \sim 525 \text{ nm}$

In presenza di un danno mitocondriale, il $\Delta\psi$ crolla e il JC-1 si disperde in forma monomero, emettendo una fluorescenza verde



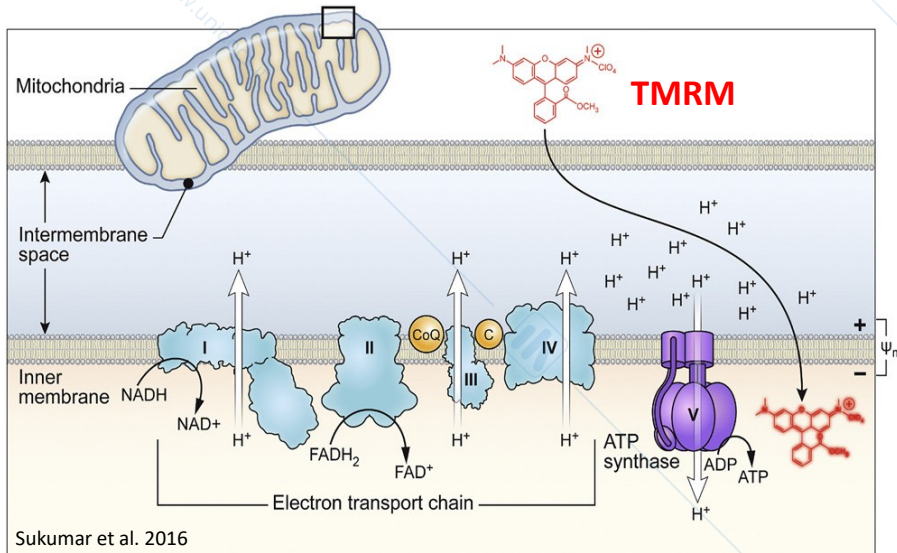
→ dopo stimolo apoptotico (Staurosporina, STS) diminuisce la percentuale di cellule con mitocondri polarizzati (< JC-1 aggregato) rispetto alle cellule in condizioni basali (NT)

Potenziale di Membrana Mitochondriale $\Delta\psi$

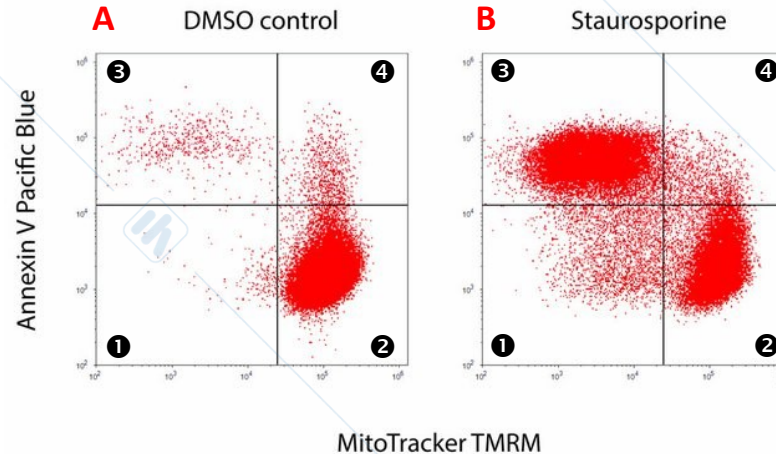
TMRM (Tetramethylrhodamine)

Ex 548/ Em 574

► sonda che emette fluorescenza rosso-arancione, attraversa le membrane cellulari e si accumula nei mitocondri polarizzati;

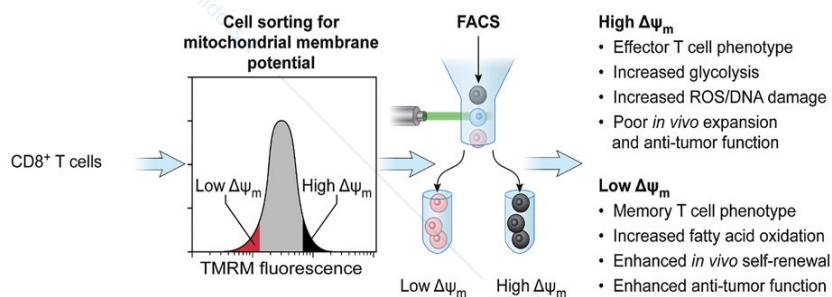


Apoptosi



A. In condizioni basali, la maggior parte delle cellule presenta mitocondri polarizzati (2 e 4) e poche cellule positive all'Annexin V (3);
B. Dopo stimolo pro-apoptotico, una elevata percentuale di cellule mostra bassi valori di fluorescenza al TMRM (↑ depolarizzazione mitocondriale, 1 e 3); molte di queste cellule sono anche positive all'Annexin V (→ cellule apoptotiche, 3);

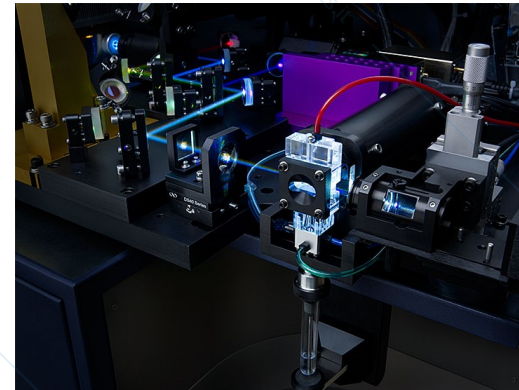
«Sortare» Linfociti T in base al $\Delta\psi$



Sortare i linfociti CD8+ in base al loro potenziale di membrana mitocondriale, che correla a diverse caratteristiche fenotipiche

Sukumar et al. Mitochondrial Membrane Potential Identifies Cells with Enhanced Stemness for Cellular Therapy. Cell Metabolism 2016 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.002>

Becton Dickinson LSRFortessa X-20



- ▶ Citometro a flusso da banco dotato di tre laser (488nm-blu, 640nm-rosso e 405 nm), con la possibilità di essere equipaggiato con 5 laser;
- ▶ Acquisizione contemporanea di 14 parametri di fluorescenza, oltre a 2 parametri fisici (analisi policromatica);
- ▶ Dotato di sistema di acquisizione automatica per la lettura di piastre a 96-384 pozzetti per analisi high-throughput;

Becton Dickinson FACS Aria Fusion



- ▶ Separatore cellulare ad alte prestazioni, dotato di cinque laser (488nm, 561nm, 640nm, 405 nm e 355 nm), permette l'analisi simultanea di 18 parametri (16 di fluorescenza e 2 morfologici);
- ▶ Utilizzato per separare fisicamente fino a 4 diverse popolazioni cellulari simultaneamente, sulla base di analisi fenotipiche e/o funzionali multidimensionali;
- ▶ Le popolazioni cellulari separate (con purezza fino al 100%) sono vitali e possono essere coltivate e/o utilizzate per successive analisi genomico-funzionali;