



News in Bibliografia

a cura di "Marty DV."



Mechanism of Fcγ Receptor-Mediated Trogocytosis-Based False-Positive Results in Flow Cytometry

Sakiko Masuda, Sari Iwasaki, Utano Tomaru, Juri Sato, Ai Kawakami, Kana Ichijo, Sayuri Sogo, Tomohisa Baba, Kazuaki Katsumata, Masanori Kasahara, Akihiro Ishizu
PLOS ONE December 2012 Volume 7 | Issue 12 | e52918

Falsi positivi in Citometria dovuti al meccanismo di trogocitosi FcγR-mediata

La trogocitosi è un meccanismo cellulare che prevede il trasferimento di molecole di superficie dalla membrana di una cellula ad un'altra e può avvenire attraverso due differenti meccanismi "adhesion molecule-mediated" e "FcγR-mediated". La trogocitosi FcγR-mediata si verifica quando anticorpi monoclonali (AcMo) si pongono a ponte tra gli antigeni espressi sulla superficie cellulare e gli FcγR espressi da alcune cellule leucocitarie, tra cui i monociti ed i granulociti. Gli autori propongono il meccanismo della trogocitosi FcγR-mediata come un fenomeno biologico che può determinare falsi positivi in citometria a flusso. La metodica di lisi degli eritrociti del sangue periferico è un protocollo comunemente usato per la preparazione dei campioni in citometria. Tale metodica, semplice e veloce permette di utilizzare un piccolo volume di sangue dal campione di partenza, non modificando la frazione dei leucociti, e non necessita di effettuare il blocco degli FcγR perché considerati verosimilmente già occupati dalle IgG umane: questo dovrebbe prevenire il legame del frammento Fc degli anticorpi con le cellule che esprimono FcγR.

In questo studio è stata dimostrata la presenza di falsi positivi dovuti alla trogocitosi FcγR-mediata su granulociti esaminati con questo metodo. In questo studio è stata osservata la positività dei granulociti per il CD15 e il CD8. Per dimostrare l'ipotesi che la positività osservata per il CD8 rispecchiasse un artefatto dovuto ad un falso positivo, i granulociti sono stati purificati, incubati con e senza linfociti T ed analizzati sia in citometria che con RT-PCR per CD8 mRNA. Poiché non era stata rilevata la presenza di molecole CD8 su granulociti purificati incubati senza linfociti T e poiché i granulociti CD15 positivi purificati non avevano prodotto RNAm per la molecola

CD8, gli autori conclusero che la positività osservata per la molecola del CD8 fosse un falso positivo, dovuto al meccanismo della trogocitosi mediata dal recettore Fcγ. Analogamente, gli autori, avevano dimostrato la rilevanza della trogocitosi in uno studio pregresso, riguardante i monociti che risultavano positivi per il CD8. Questo lavoro merita di essere tenuto presente nell'interpretazione dei dati citometrici specie quando su popolazioni note compaiono positività inattese per antigeni altrimenti estranei. Sarebbe interessante approfondire se il fenomeno della trogocitosi FcγR-mediata possa coinvolgere il trasferimento di altre molecole antigeniche differenti dalla molecola CD8 (per esempio CD56, CD19).

Martina De Vita

martina.devita@libero.it

Valentina Catzola

valentinacatzola@yahoo.it



Merging high-quality biochemical fractionation with a refined flow cytometry approach to monitor nucleocytoplasmic protein expression throughout the unperturbed mammalian cell cycle

Margit Rosner, Katharina Schipany & Markus Hengstschläger
Nature Protocols, 2013, 8(3), 602-626; doi:10.1038/nprot.2013.011

Un approccio citometrico "raffinato" nel monitoraggio delle proteine nucleocitoplasmatiche

Questi autori dell'istituto di Genetica Medica dell'Università di Vienna propongono un interessante protocollo denominato "approccio citometrico "raffinato" che mette in evidenza le potenzialità della flow cytometry applicata a una qualsiasi problematica biologica. L'obiettivo è quello di ottimizzare l'identificazione di patterns spazio-temporali dell'espressione proteica durante la progressione del ciclo cellulare. Normalmente gli approcci tradizionali per studiare gli eventi legati al ciclo cellulare richiedono una sincronizzazione delle cellule, che si ottiene utilizzando composti chimici, processi meccanici o strategie ambientali per i quali è stata spesso dimostrata l'induzione di stress cellulare e di perturbazioni dello stato stazionario cellulare.

Il principio su cui si basa l'approccio proposto impiega

la relazione esistente fra la grandezza di una cellula (a sua volta strettamente proporzionale alla grandezza del nucleo) e la sua specifica posizione nel ciclo cellulare. Combinando le analisi in citometria a flusso del DNA e della grandezza cellulare viene stabilita una mappa ad alta risoluzione della progressione continua delle cellule attraverso il ciclo cellulare, al quale è correlata l'espressione proteica, valutata a sua volta mediante colorazione simultanea delle proteine. In seguito ad un frazionamento biochimico nuclei intatti e cellule intere derivate dallo stesso pool cellulare vengono colorati per il DNA e per una particolare proteina di interesse. Dopo l'acquisizione al citometro, i set di dati ottenuti sono analizzati con una procedura suddivisa in quattro stadi sfruttando le potenzialità della tecnologia di *flow cytometry*:

- i) gating iniziale per i subsets cellulari nelle fasi del ciclo (G1, S e G2/M);
- ii) specifica dissezione usando i parametri *forward scatter* (FSC) per le fasi G1 e G2/M, e DNA per la fase S, per stabilire la mappa continua di progressione attraverso il ciclo cellulare;
- iii) correlazione dei subsets di dati FSC/DNA con i corrispondenti segnali dello *staining* proteico;
- iv) sottrazione dei dati nucleari da quelli della cellula *in toto* per ottenere i dati finali sulla corrispondente regolazione citoplasmatica.

Il pattern finale d'espressione proteica così ottenuto è rappresentativo della specifica distribuzione spazio-temporale delle proteine durante il ciclo cellulare. L'impiego della citometria a flusso fornisce diversi vantaggi fra cui il basso numero di cellule necessario per l'analisi, la quantificazione dei segnali citometrici che essendo acquisiti con una scala logaritmica non mostrano saturazione, la possibilità di eseguire misure simultanee di più parametri. L'approccio utilizzato è evoluto ed il protocollo molto particolareggiato e quindi facilmente riproducibile. Ad ogni step e per ogni reagente sono riportate le criticità e le cauzioni da prendere, nonché le possibili cause di problemi.

Igea D'Agnano
igea.dagnano@cnr.it



A Trigger Channel Threshold Artifact in Nanoparticle Analysis

John P. Nolan, Samuel A. Stoner
Cytometry Part A 83A: 301–305, 2013

Citometria a flusso nelle nano-scienze:
analisi di nanoparticelle

La citometria a flusso costituisce una metodologia sempre più applicata per l'analisi multiparametrica di

microrganismi (es. batteri, virus) e di microparticelle di origine biologica (es. vescicole extracellulari) di dimensioni molto ridotte.

Lo sviluppo tecnologico sta migliorando la capacità risolutiva degli strumenti recentemente commercializzati, al punto che diverse case produttrici garantiscono l'identificazione citometrica di nanoparticelle con dimensioni superiori ai 20nm, aprendo la strada a numerose ed innovative possibilità di utilizzo.

Questo articolo identifica i limiti tecnici della citometria a flusso applicata alle nanoparticelle descrivendo alcune procedure di controllo del potere risolutivo, basate sull'utilizzo di nano-beads fluorescenti (microsfere di Nile Red da 530 nm diameter e 110 nm di diametro).

L'impostazione di un valore di soglia sui segnali di scatter del raggio laser non permette la reale e riproducibile quantificazione delle biglie fluorescenti rispetto al rumore di fondo, vincolando le misure al potere risolutivo dello strumento utilizzato. Inoltre, fenomeni di coincidenza di più nanoparticelle nella camera di flusso può generare una popolazione di eventi di fatto inesistente. La semplice diluizione seriale della soluzione standard ha permesso di dimostrare chiaramente che i valori soglia devono essere impostati sui segnali di fluorescenza.

I risultati di questo studio sono particolarmente importanti perché dimostrano in modo semplice ed innovativo che, con le dovute accortezze metodologiche, la citometria a flusso può avere un ruolo a pieno titolo nelle nano-scienze, consentendo nuove possibilità di sviluppo ad uno degli ambiti scientifici attualmente di maggiore interesse.

Stefano Amalfitano
amalfitano@irsa.cnr.it