

Indagini citofluorimetriche nella vitalità e morte cellulare. II. Studio di altre funzioni cellulari

Barbara Canonico¹, Francesca Luchetti¹, Marcella Arcangeletti¹, Massimo Valentini², Stefano Papa¹

¹Dipartimento di Scienze dell'Uomo, Ambiente e Natura, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo", Urbino

²Azienda Ospedaliera "San Salvatore", Pesaro

ABSTRACT

Flow cytometry assays for viability and cell death. II. Evaluation of other cellular functions. In this second companion paper, we review some advances in application of flow cytometry to evaluate calcium flux, cell membrane, lysosome compartment, mitochondrial membrane mass and potential, giving some general information and reporting operative protocols.

INTRODUZIONE

La citometria a flusso è una metodologia per differenziare e contare cellule e microparticelle. Le cellule in sospensione vengono fatte passare con un flusso capillare in una cuvetta. La zona di interazione è il punto di intersezione tra il flusso del campione ed il raggio luminoso (laser, lampada) o il campo elettrico. I segnali ottici (scatter, fluorescenza) o elettrici vengono generati in sequenza da ogni singola particella e vengono poi misurati e mostrati per l'analisi della distribuzione cellulare.

Con la citometria a flusso si ottengono informazioni dimensionali e funzionali per un'ampia tipologia di cellule. Ad esempio, lo strumento è in grado di distinguere le cellule morte (che si colorano in rosso con ioduro di propidio o la 7-amino-actinomicina D) da quelle vive (che li escludono) e quindi fornisce la percentuale di cellule vive, indice della vitalità cellulare della coltura ed, ovviamente, la percentuale di cellule morte, indice della mortalità cellulare. Grazie al citometro a flusso è adesso possibile riuscire ad identificare simultaneamente numerose caratteristiche di una cellula nel suo punto di non ritorno, ovvero il momento nel quale una cellula, dopo un certo trattamento sperimentale in vitro o una terapia del paziente, decide se può continuare a vivere o deve morire. Utilizzando la citometria a flusso è inoltre possibile caratterizzare alcuni aspetti inesplorati del processo di morte cellulare, grazie alla analisi simultanea di diversi parametri, quali ad esempio il contenuto intracellulare di antiossidanti, la carica energetica dei mitocondri e le alterazioni della membrana cellulare.

In un precedente lavoro abbiamo discusso i processi di morte cellulare, la valutazione dell'apoptosi e la progressione apoptosi/necrosi (1). In questo forniremo informazioni circa l'applicazione di sonde fluorescenti per valutare particolari risposte cellulari relative a pH intracellulare (pHi), contenuto intracellulare di calcio, "burst" ossidativo, fagocitosi, funzionalità di organelli (mitocondri, endosomi e apparato di Golgi), reazioni ossidative (livello di glutazione, di anione superossido e di perossido di idrogeno), polarizzazione e potenziale di membra-

na e perossidazione lipidica (Figura 1). Protocolli dettagliati saranno forniti in particolare per quei metodi che vengono utilizzati ordinariamente nel nostro laboratorio.

STUDIO DEI MITOCONDRI E DELLA LORO FUNZIONALITÀ

Il programma apoptotico si avvale di molecole specifiche, i cui geni sono altamente conservati. I prototipi di tali geni furono osservati per la prima volta nel nematode *Caenorabditis elegans*, la cui importanza per la comprensione dell'embriologia può essere paragonata a quella della *Drosophila melanogaster* per la genetica (a Brenner, Horvitz e Sulston, che descrissero per la prima volta tali meccanismi, fu assegnato nel 2002 il Premio Nobel). Come quasi sempre accade, l'evoluzione ha però complicato il meccanismo sostituendo negli organismi più complessi ad un gene prototipo tutta una famiglia di geni con proprietà simili, ma non del tutto sovrapponibili. Studi condotti su *Caenorabditis elegans* permisero di suddividere il processo di apoptosi in tre fasi: induzione; esecuzione; riconoscimento e fagocitosi. Negli eucarioti superiori, la fase di induzione è regolabile e reversibile, in quanto vede un colloquio incrociato ("cross-talk") tra stimoli contrastanti (segnali di sopravvivenza e segnali di morte). I diversi stimoli ed eventi apoptogeni seguono due (o forse più) distinte vie di segnalazione: una attivata da "segnali di morte", che giungono a specifici recettori di superficie, l'altra attivata da segnali endogeni e regolata dal mitocondrio (via recettoriale e via mitocondriale). La segnalazione specifica dell'apoptosi si avvale per lo più di interazioni tra domini omotipici e non richiede in genere attivazione genica, né sintesi proteica di novo. Entrambe le vie convergono nell'attivazione di proteasi specifiche, dette caspasi (Figura 2).

La sopra menzionata via di segnalazione mitocondriale, che si può considerare alternativa alla via di segnalazione recettoriale (anche se può essere da questa attivata in seconda battuta) porta alla formazione di un complesso analogo a quello che si costituisce a livello del dominio intracellulare dei recettori di membrana

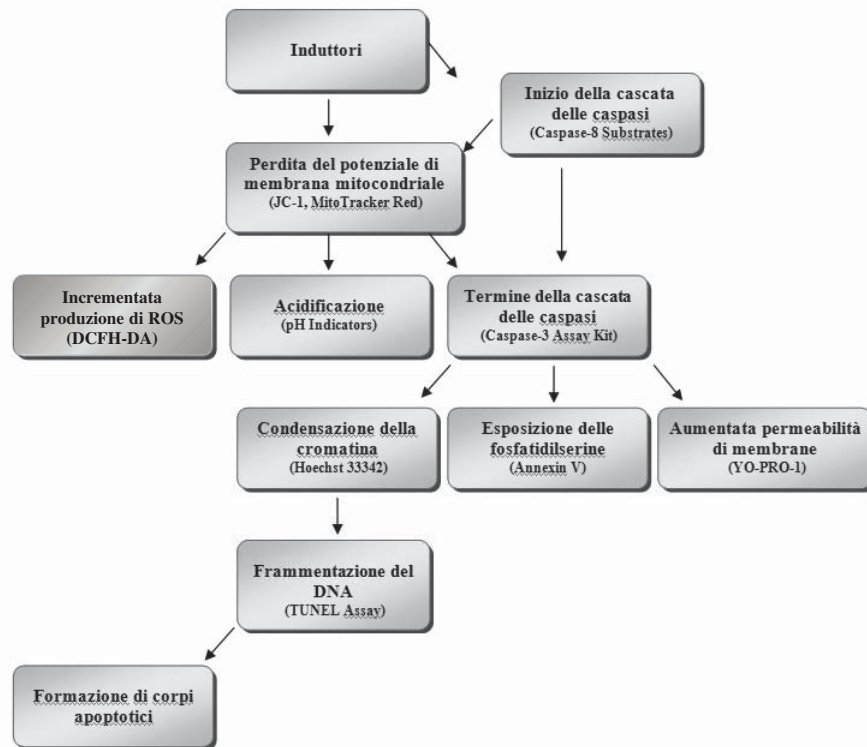


Figura 1
 Schema degli eventi apoptotici chiave e dei "probe" utilizzabili per la loro rilevazione. ROS, specie reattive dell'ossigeno.

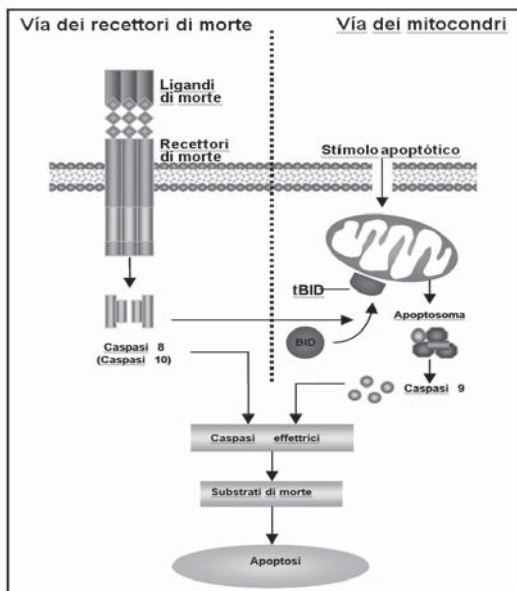


Figura 2
 Schema rappresentativo delle principali vie di induzione dell'apoptosi, la via estrinseca e quella intrinseca.

tor-1" (APAF-1), e una pro-caspasi iniziatrice, la pro-caspasi 9; tali molecole interagiscono grazie ad un dominio CARD, che entrambe possiedono (2). Il complesso di origine mitocondriale (denominato apoptosoma) comprende anche una molecola di citocromo c e una di ATP o di dATP. APAF-1 e il citocromo c fuoriescono dal mitocondrio quando i fattori che ne modulano l'integrità di membrana favoriscono il formarsi di pori a livello della membrana esterna. La preponderanza di modulatori anti-apoptotici manterrà integra la membrana mitocondriale, mentre la preponderanza di modulatori pro-apoptotici determinerà nel mitocondrio l'apertura di megapori, che causeranno la caduta del potenziale mitocondriale ($\Delta\psi$) e la fuoriuscita di sostanze pro-apoptotiche (3). La superficie del mitocondrio è quindi al tempo stesso sede dell'integrazione dei segnali e di un meccanismo di innescamento dell'apoptosi.

Attraversando i megacanaloni della membrana mitocondriale esterna, passano nel citoplasma i già nominati adattatore APAF-1 (una ATPasi) e il citocromo c, che contribuiranno alla formazione dell'apoptosoma, e due endonucleasi, ENDO G e "apoptosis-inducing factor" (AIF). Fuoriescono dal mitocondrio anche alcune molecole, come Smac/Diablo, che inattivano gli inibitori delle caspasi, e inoltre ioni calcio, radicali liberi e glutazione. Per motivi diversi, la fuoriuscita di ciascuna di queste molecole è in grado di amplificare il segnale.

Il mitocondrio è interessato dai fenomeni di apoptosi

attivati. Anche il complesso di origine mitocondriale comprende un adattatore, "apoptotic protease activating fac-

anche se il segnale parte dai recettori di membrana, in quanto la caspasi iniziatrice attiva un modulatore proapoptotico, BID, che si localizza sul mitocondrio (4).

Quando si studia la funzione mitocondriale occorre tenere presente che diversi fluorocromi sono substrato della pompa P 170 e/o di altri meno caratterizzati sistemi di estrusione e quindi suscettibili ad essere espulsi dalla cellula; diversi fluorocromi sono carichi elettricamente e quindi risentono del potenziale della membrana plasmatica oltre che di quello mitocondriale; in popolazioni eterogenee il compartimento mitocondriale può comportarsi in maniera eterogenea. La necessità di mantenere l'integrità cellulare sconsiglia l'uso di tecniche di fissazione e/o permeabilizzazione quando si utilizzino fluorocromi la cui permanenza a livello mitocondriale dipende dal metabolismo mitocondriale stesso. Risulta quindi utile l'utilizzo di marcatori di integrità cellulare (bromuro d'etidio, ioduro di propidio, ecc.).

La caduta del potenziale di membrana mitocondriale è uno degli eventi precoci della cascata apoptotica ed è un evento reversibile (5). L'analisi citometrica della funzione mitocondriale può essere eseguita con numerosi fluorocromi.

Potenziale di membrana mitocondriale

La caduta del potenziale di membrana può essere rilevata, sia al citofluorimetro che in microscopia a fluorescenza e confocale, mediante l'utilizzo di coloranti cationici lipofilici [es. 5, 5', 6, 6'-tetracloro-1, 1', 3, 3'-tetraetil-benzimidazolcarbocianina ioduro (JC-1)].

Nelle cellule vitali con elevato potenziale di membrana, JC-1 si localizza a livello della membrana mitocondriale sotto forma di aggregati che danno fluorescenza rossa (gli aggregati-reversibili si formano in presenza di un elevato numero di molecole vicine). Al contrario, nelle cellule dove è avvenuta una caduta del potenziale di membrana, il colorante rimane in forma monomerica a livello citoplasmatico, dando una fluorescenza verde diffusa.

I vantaggi legati all'utilizzo del JC-1 sono i seguenti: non è necessaria fissazione; l'esame è molto rapido; infine, rende possibile una variazione di emissione con la stessa eccitazione a 488 nm. Tra gli svantaggi si annovera una elevata fluorescenza verde di fondo che può rendere difficile la valutazione della forma rossa aggregata e vi è, come già detto, necessità di lettura in doppia fluorescenza con conseguente settaggio dello strumento. Può essere utile utilizzare reagenti (es. carbonil cianide m-clorofenidrazone, carbonil cianide p-trifluorometoxifenilidrazone, valinomicina) che causano un collasso del potenziale di membrana di tutti i mitocondri, in modo da localizzare le cellule depolarizzate nel "dot plot".

La sospensione cellulare ($0,5-1 \times 10^6$ cellule/mL) viene incubata in mezzo completo per 10 min a temperatura ambiente al buio con 5 µg/mL JC-1. Alla fine del periodo di incubazione le cellule sono lavate due volte in PBS, risospese in un volume totale di 400 µL ed analizzate. Per controllare la depolarizzazione della membrana mitocondriale ed avere un controllo negativo, in alcu-

ni esperimenti campioni analoghi di cellule sono incubati 10 min a 37 °C con dosi graduali di valinomicina, uno ionoforo per il K⁺, (100 nM-10 mM) ed analizzati.

La funzionalità mitocondriale è valutata misurando la fluorescenza "verde" e la fluorescenza "arancione". Un esempio dell'utilizzazione di JC-1 per la valutazione del potenziale di membrana mitocondriale durante l'apoptosi indotta da staurosporina è riportato nella Figura 3.

Molti altri coloranti possono essere utilizzati per l'analisi della funzionalità mitocondriale, sebbene diano informazioni un po' diverse tra loro e siano più o meno applicabili a campioni freschi e/o fissati. Un lavoro pubblicato da Macho et al. (6) ha descritto l'utilizzo di Mitotracker red CMX-Ros (clorometil-X rosamina) come "probe" per la valutazione della perdita del potenziale di membrana mitocondriale su campioni fissati. In seguito a fissazione, tra le cellule normali fissate con mitocondri polarizzati e le cellule apoptotiche con mitocondri depolarizzati non si riscontra una buona risoluzione e quindi la discriminazione tra queste due tipologie cellulari (apoptotiche e vitali) non è possibile per un tempo protratto. Il CMX-Ros (Mitotracker red) è di fatto una molecola fluorescente efficace per l'analisi del potenziale di membrana mitocondriale nelle cellule intatte, ma solo nel caso in cui le cellule siano colorate ed analizzate immediatamente. Non si consiglia quindi l'uso di CMX-Ros nella citometria multiparametrica di cellule fissate (7). I campioni possono essere marcati con il CMX-Ros per l'analisi simultanea del potenziale di membrana mitocondriale ed altri parametri, come quelli relativi alla morte cellulare, ovvero l'esposizione della fosfatidilserina sulla plasmamembrana (che viene legata dall'annessina V) o di antigeni di membrana (8). A tale scopo, 500.000 cellule/mL vengono incubate in mezzo completo con Mitotracker red 50 nM per 30 min al buio a temperatura ambiente, lavate due volte in tampone fosfato (PBS), risospese per 10 min in "binding buffer" (10 nM HEPES/NaOH pH 7,4; 140 nM NaCl; 2,5 mM CaCl₂) contenente annessina V coniugata con il fluorocromo isotiocianato di fluorescina (FITC) oppure contenente differenti anticorpi monoclonali in un volume totale di 300 µL, ed infine analizzate.

La nostra esperienza si è estesa anche al 8-(48-clorometil)fenil-2, 3, 5, 6, 11, 12, 14, 15-octaidro-1H, 4H, 10H, 13H-dichinolizino-8H-xantene (CM-H₂XRos) per determinare la formazione di ossidanti lipofilici durante

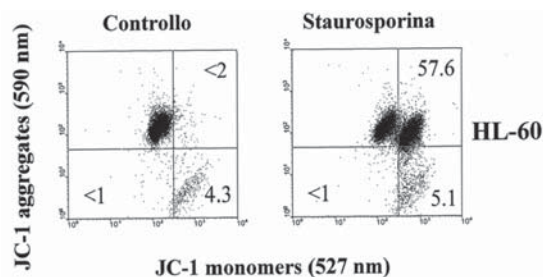


Figura 3

Linea tumorale HL-60 (leucemia promielocitica) trattata con il trigger apoptotico staurosporina.

l'attività respiratoria mitocondriale. CM-H₂XRos è la forma ridotta, non fluorescente del Mitotracker red ed emette fluorescenza in seguito ad ossidazione. Questo colorante è in grado di colorare i mitocondri nelle cellule vive ed il suo accumulo dipende dal potenziale di membrana. Ha il vantaggio di essere efficace anche in seguito a fissazione aldeidica.

Altri fluorocromi potenziometrici di nuova sintesi per determinare il potenziale mitocondriale sono rappresentati da specifiche molecole, quali la 3,3'-diesilossicarbonina ioduro (DiOC₆) (9), che si accumulano nella matrice mitocondriale secondo il gradiente elettrochimico. Il DiOC₆ ha un'elevata capacità di legarsi ad altre membrane (non solo quelle mitocondriali) ed ha una modesta sensibilità agli agenti in grado di depolarizzare questi organelli: è stato quindi usato per studi sul potenziale di membrana mitocondriale più in passato che nei tempi attuali (10).

La scoperta che la rodamina 123 (Rh123) è un colorante vitale specifico per i mitocondri è avvenuta diversi anni fa, quando certe tipologie tumorali, per lo più di origine epiteliale, hanno mostrato sia un aumentato "uptake" che una ritenzione prolungata di Rh123 all'interno dei mitocondri. Questo fenomeno sembrerebbe correlare con la tossicità selettiva dimostrata da Rh123 per certi tipi cellulari in vitro. Si è poi giunti a concludere che la F₀F₁-ATPasi fosse il sito primario della tossicità di Rh123 (11). Occorre comunque specificare che in tutte le cellule il potenziale di membrana pre-concentra la quantità di colorante in relazione all'ambiente extracellulare, modificando in questo modo la quantità di colorante disponibile ad accumularsi nei mitocondri. La didorodamina 123 (DHR) è un derivato non fluorescente capace di attraversare la membrana plasmatica dove, in seguito alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed in particolare di H₂O₂, viene convertito in Rh123, una molecola fluorescente verde (529 nm), con un meccanismo simile a quello della 2,7-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) (vedi paragrafo "Stress ossidativo"). È noto in letteratura che la Rh123 si lega alle membrane cellulari e quindi il segnale fluorescente emesso è esclusivamente localizzato all'interno della cellula.

La tetrametilrodamina etil estere (TMRE) è un derivato della tetrametilrodamina, un colorante cationico che dà un forte segnale di fluorescenza, esibendo un modesto legame, indipendente dal potenziale di membrana (aspecifico), e bassa tossicità. Il TMRE è un marcatore solubile alle membrane e si accumula all'interno dei mitocondri in base al loro ΔΨ, quindi è in grado di definire il loro stato funzionale. Il TMRE, eccitato a 488 nm, emette fluorescenza a 580 nm (12).

Spesso, per le analisi sul potenziale di membrana mitocondriale, JC-1 e TMRE vengono affiancati: il motivo di questa duplice indagine è dovuta al fatto che il JC-1 sembra non rispettare la legge di Nernst, non rispondere a potenziali più bassi di 100 mV e marcare una limitata porzione di mitocondri cellulari, al contrario del TMRE (13).

Un altro fluorocromo utilizzabile per queste applicazioni è l'estere metilico della tetrametilrodamina (TMRM). Le proprietà spettrali del TMRM limitano l'utiliz-

zo di questo fluorocromo cationico all'analisi di cellule intatte mediante epifluorescenza o microscopia confocale, in quanto il TMRM modifica l'intensità ma non lo spettro di emissione in risposta al ΔΨ. Dal momento che le proprietà spettrali non consentono la misurazione del ΔΨ nelle cellule integre mediante spettrofluorimetria o citometria a flusso, l'accorgimento che è stato usato da molti autori è quello di permeabilizzare la membrana plasmatica (ad es. con basse concentrazioni di digitonina): in questo modo il TMRM può essere utilizzato anche per analisi citometriche (14).

Massa mitocondriale

Questo parametro deve essere studiato in quanto è un marcatore dell'integrità della cellula e deve rimanere costante durante le analisi. Esistono anche in questo caso più sonde fluorescenti da poter applicare, una di queste è rappresentata dall'arancio di nonil-acridina (NAO), capace di legare i mitocondri indipendentemente dallo stato energetico e dal loro potenziale di membrana mitocondriale (15). Le cellule sono incubate con 10 μM di NAO per 10 min al buio, lavate due volte con PBS freddo ed analizzate.

Il Mitotracker Green FM (MT) è un colorante che si diffonde passivamente attraverso la membrana plasmatica e si accumula all'interno dei mitocondri attivi, misurando la massa dei mitocondri; esibisce una fluorescenza verde. MT ha la caratteristica di essere sostanzialmente non fluorescente in soluzione acquosa ma di emettere fluorescenza una volta accumulatosi nell'ambiente lipidico mitocondriale.

pH INTRACELLULARE

Come detto, il fenomeno apoptotico è finemente regolato da una serie di proteine cellulari; ad esempio, la proteina Bcl-xL svolge un ruolo positivo nella sopravvivenza cellulare, poiché tiene sotto controllo la proteina Bim che a sua volta è un potente pro-apoptotico. Uno studio recente di Zhao et al. (16) ha dimostrato che l'induzione dell'apoptosi può avvenire grazie a modificazioni chimiche che trasformano residui di asparagina (Asn) della proteina Bcl-xL in residui di acido aspartico (Asp), determinando così la perdita della capacità di Bcl-xL di controllare Bim, con conseguente ingresso in apoptosi.

Questi autori hanno stabilito che la trasformazione dell'Asn in Asp (deamidazione) è la causa e non l'effetto dell'apoptosi: utilizzando cellule derivanti dal timo di animali da esperimento, hanno dimostrato che, pur bloccando artificialmente l'apoptosi, l'esposizione ad agenti che causano danneggiamento al DNA non blocca la deamidazione, che avviene normalmente da 3 a 6 ore dopo l'esposizione. Successivamente, hanno stabilito che isoforme di Bcl-xL resistenti alla deamidazione non vengono degradate in seguito all'esposizione ad agenti che causano danneggiamento al DNA e tale mancata degradazione mantiene bassi i livelli di Bim e di altre proteine con ruolo pro-apoptotico. Gli autori hanno poi dimostrato che, nei timociti prelevati da lesioni precancerose di topi

da esperimento, l'aumento forzato del pH (alcalinizzazione) induce deamidazione con conseguente aumento dell'apoptosi. Il danneggiamento del DNA determina un aumento della produzione di una proteina di membrana chiamata "pompa sodio-idrogeno", che scambia gli ioni sodio presenti all'esterno della cellula con gli ioni idrogeno presenti all'interno della cellula, determinando così un aumento del pH; l'alcalinizzazione, a sua volta, sarebbe responsabile della deamidazione di Bcl-xL e del conseguente ingresso in apoptosi. Questa scoperta ha dei risvolti pratici estremamente promettenti, dal momento che suggerisce che l'induzione di un cambiamento di pH nel microambiente tumorale potrebbe indurre in apoptosi le cellule maligne.

L'utilizzo di marcatori fluorescenti per misurare il pH è influenzato dalla capacità delle cellule di mantenere attivo il colorante all'interno del compartimento citoplasmatico; inoltre, la stabilità della misurazione è fortemente condizionata dalla temperatura, dal tipo cellulare e dall'uso di inibitori di trasporto per prevenire la sostanziale fuoriuscita del marcatore dalle cellule. I fluorocromi impiegati per la determinazione del pH sono gli acetosimetil esteri (AM) della 2,7,bis-carbossietil-5(6)carbossifluoresceina (BCECF) e del carbossi-seminaftorodafluoro (SNARF-1); sono acidi deboli con pK intorno a 7,0 e le loro forme protonate presentano diversi spettri di emissione della base coniugata. Misurando il rapporto tra le due emissioni risultanti si ottiene un segnale proporzionale al pH e indipendente dal contenuto intracellulare di fluorocromo. Le forme AM di BCECF e SNARF-1 entrano nelle cellule intatte, dove rimangono intrappolate, e vengono idrolizzate da esterasi aspecifiche intracellulari, creando la forma acida che presenta la risposta fluorescente pH-dipendente. SNARF-1 viene utilizzato per determinare i cambiamenti di pH nell'intervallo tra 6,3 e 8,6. BCECF presenta un gruppo laterale legato alla fluoresceina ed essendone un derivato, la sua intensità di fluorescenza pH-dipendente diminuisce all'aumentare dell'acidità. Con BCECF, la fluorescenza eccitata a 450 nm è pH-indipendente, mentre quella eccitata a 500 nm è pH-dipendente.

Forse i coloranti più utili per la misurazione del pH sono la famiglia di composti chiamati SNARF (SemiNaftoRodaFluor) e SNAFL (SemiNaftoFluorescein). Questi "probe" sono stati sviluppati dai ricercatori della Molecular Probes e rappresentano i primi coloranti specifici per il pH con caratteristiche di fluorescenza veramente utili. SNARF-1 è il reagente più adatto per l'utilizzo in citometria a flusso: viene eccitato a 488 nm ed emette a 575/670 nm (Figura 4) (17).

OMEOSTASI INTRACELLULARE DEL CALCIO

Lo ione calcio (Ca^{2+}) funziona da secondo messaggero in quanto trasmette alla macchina biochimica della cellula i segnali elettrici e chimici che giungono dalla superficie della membrana plasmatica. Una variazione della concentrazione citoplasmatica del Ca^{2+} è in grado di innescare eventi biologici diversi, quali la contrazione muscolare, la secrezione ed il movimento.

La concentrazione citoplasmatica di Ca^{2+} della cellula eucariotica a riposo varia tra 60 e 200 nM, a seconda del tipo cellulare, nonostante una concentrazione extracellulare di 1-2 mM ed un potenziale di membrana, negativo verso l'interno, variabile da -10 mV a -70 mV, che porterebbero il Ca^{2+} all'equilibrio termodinamico a valori di circa 0,1-0,2 M. Il mantenimento di una tale differenza di concentrazione tra l'interno e l'esterno della cellula è il risultato dell'azione coordinata di differenti sistemi che comprendono le vie di ingresso e di efflusso del Ca^{2+} attraverso la membrana citoplasmatica, i sistemi tampone e i depositi intracellulari.

Canali del calcio sulla membrana plasmatica

L'ingresso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare avviene attraverso i canali di membrana. Tali proteine formano strutture che mettono in comunicazione il citoplasma con l'esterno della cellula. I canali possono essere divisi in più categorie in base al meccanismo che controlla la transizione dalla forma "aperta" a quella "chiusa".

Canali chemio-dipendenti. Presenti in tutte le cellule, richiedono per la loro attivazione e quindi apertura, l'esistenza di un segnale extracellulare di natura chimica. Questi canali possono a loro volta essere suddivisi in base al meccanismo di attivazione in: a) canali Ca^{2+} regolati da recettore; b) canali la cui attivazione è mediata da proteina G; c) canali attivati da un secondo messaggero; e d) canali attivati dallo svuotamento dei depositi intracellulari. Il meccanismo di attivazione di tali canali è ancora incerto.

Canali voltaggio-dipendenti. La loro presenza è stata rilevata sia in cellule eccitabili, come le cellule nervose e le fibre muscolari, sia in cellule non eccitabili, come i fibroblasti. La loro apertura è conseguente alla depolarizzazione della membrana plasmatica.

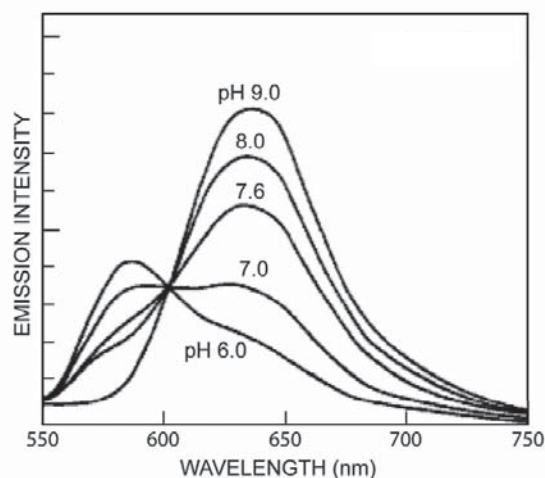


Figura 4
Spettro di emissione della fluorescenza di SNARF-1 in funzione del pH (riprodotto su permesso di R. Haugland, Molecular Probes).

Meccanismi di estrusione del calcio

I meccanismi di efflusso del Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica sono riconducibili all'esistenza di due differenti sistemi di espulsione: la pompa per il calcio ATP-dipendente (PMCA) e lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La calcio ATPasi, che si trova nella membrana citoplasmatica di tutte le cellule eucariote, rappresenta la principale via di uscita del Ca^{2+} nelle cellule non eccitabili. Essa viene attivata tramite interazione con il complesso Ca^{2+} -calmodulina. Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ rappresenta un sistema elettrogenico. Esso promuove lo scambio di Na^+ e Ca^{2+} secondo un rapporto stechiometrico 3:1, alterando di conseguenza la distribuzione di carica ai due lati della membrana. Rispetto alla calcio ATPasi è un sistema a minor affinità ed è quindi logico supporre che esso abbia un ruolo rilevante nell'espulsione del Ca^{2+} solo ad elevate concentrazioni citoplasmatiche di quest'ultimo.

Depositi di calcio intracellulari

L'aumento della concentrazione citoplasmatica di Ca^{2+} è determinato dall'ingresso di Ca^{2+} dal mezzo esterno e dal rilascio dello ione da organuli intracellulari (depositi). I mitocondri sono caratterizzati da un potenziale di membrana di circa -180 mV rispetto al citosol, negativo all'interno, che produce una elevata "driving force" per l'accumulo di Ca^{2+} . Questo potenziale porterebbe la concentrazione di Ca^{2+} mitocondriale all'equilibrio ad un valore di circa 0,1 M. Tale valore, incompatibile con la vita di questo organello, è prevenuto dall'azione coordinata di sistemi di ingresso e di efflusso dello ione. A livello della membrana mitocondriale interna è presente un sistema uniporto che induce un rapido ingresso di Ca^{2+} solo quando la sua concentrazione citoplasmatica raggiunge valori micromolari. Di conseguenza, in condizioni di riposo, i mitocondri non accumulano grandi quantità di Ca^{2+} perché la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare è di circa 50-100 nM. La liberazione dello ione dai depositi cellulari è mediata dal sistema degli inositolo fosfati. Esistono depositi intracellulari di Ca^{2+} , come il complesso del Golgi, le vescicole secretorie e altri organuli citoplasmatici (insensibili agli inositolo fosfati) che, benché contengano una quantità consistente di Ca^{2+} , non sono in equilibrio dinamico con il citosol e quindi svolgono un ruolo marginale nel controllo del Ca^{2+} intracellulare (18).

Sistemi tampone per il calcio

Oltre ai depositi appena illustrati, all'interno della cellula eucariote esistono sistemi in grado di "tamponare" ampi aumenti della concentrazione citosolica di Ca^{2+} . Sono costituiti da un insieme di proteine estremamente eterogeneo per affinità e capacità di legare il Ca^{2+} , che nella cellula svolgono un'azione enzimatica Ca^{2+} -dipendente o regolatoria. Una di queste è la calmodulina che, oltre a svolgere un ruolo importante nella modulazione di processi fisiologici (regolando, ad esempio, l'attività della calcio ATPasi), rappresenta anche la proteina citoplasmatica più importante in grado di legare Ca^{2+} , in virtù

della sua elevata concentrazione e della presenza in essa di quattro siti di legame per questo ione.

Ione calcio e proliferazione

Il Ca^{2+} è un secondo messaggero che controlla numerose funzioni, comprese la crescita, la differenziazione e la proliferazione cellulare. Il segnale Ca^{2+} consiste in un incremento della concentrazione citosolica dello ione libero in seguito all'apertura dei canali Ca^{2+} presenti sulla superficie cellulare o sulla membrana del reticolo sarco-endoplasmatico (19).

La proliferazione cellulare è sostenuta da un incremento della concentrazione di Ca^{2+} associato alla variazione dell'espressione di proteine trasportatrici di Ca^{2+} e all'attivazione dei fattori di trascrizione come la proteina che lega l'elemento responsivo all'AMPc (20) o il fattore nucleare che attiva i linfociti T, entrambi coinvolti nel controllo del ciclo cellulare (21).

Analisi del calcio intracellulare

Svariati "probe" possono essere utilizzati per la determinazione del Ca^{2+} intracellulare in citometria a flusso, a seconda della lunghezza d'onda della sorgente di eccitazione e del modello cellulare. La Tabella 1 ne riporta un elenco. In particolare, sono molto utilizzati fluorocromi come Indo1-AM, Fura e Fluo-3 (22).

Indo1-AM è un estere acetilossimetile, che si diffonde all'interno passivamente attraverso la membrana plasmatica. Le esterasi intracellulari tagliano i gruppi acetili rendendo l'Indo-1 impermeabile. Viene eccitato nella regione UV ed emette fluorescenza a diverse lunghezze d'onda, a seconda se sia legato al Ca^{2+} (420 nm) o sia libero (510 nm); il rapporto delle due lunghezze d'onda indica i cambiamenti della concentrazione dello ione. La concentrazione ottimale di Indo-1 varia con il tipo di cellule, andando da 1 a 10 mM; gli ionofori, principalmente la ionomicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), vengono utilizzati come controllo positivo, mentre i chelanti del Ca^{2+} , come l'"ethylene glycol-bis(β -aminoethylether)-N, N, N', N',-tetraacetic acid" (EGTA) (8 mM), servono da controllo negativo.

Fura Red viene eccitato a 488 nm ed emette fluorescenza ad una lunghezza d'onda di 650 nm; a seguito del legame con il Ca^{2+} diminuisce l'intensità di fluorescenza emessa.

Fluo-3 viene eccitato a 488 nm e presenta uno spettro di emissione a 526 nm; a differenza del Fura Red, aumenta l'intensità di fluorescenza emessa dopo il legame con il Ca^{2+} . Rispetto agli altri due marcatori, Fluo-3 risponde in maniera più sensibile a bassi ed alti valori della concentrazione di Ca^{2+} . Dopo essere entrato, le esterasi intracellulari desacetilano il Fluo-3 e lo rendono incapace di attraversare la membrana plasmatica ed uscire dalla cellula. È utile non usare terreni contenenti siero dal momento che quest'ultimo contiene attività esterasica che potrebbe convertire il reagente nella sua forma impermeabile al di fuori della cellula. Una certa quantità di fluorocromo è comunque capace di fuoriuscire dalla cellula, specialmente dopo il lavaggio finale: si

Tabella 1

Coloranti per applicazioni citofluorimetriche nell'analisi del calcio intracellulare

Indicatore	Emissione in risposta ad una concentrazione elevata di calcio	Lunghezza d'onda d'eccitazione (nm)	Lunghezza d'onda di emissione (nm)	Affinità per il calcio (nm)	
				22 °C	37 °C
Indo1-AM	Cambio rapporto	325-360	420/510	-	~250
Fluo-3	Incremento	488	526	~325	~800
Fluo-4	Incremento	488	516	~345	-
Oregon Green	Incremento	488	523	~170	-
Calcium Green-1	Incremento	488	530	~190	-
Calcium Orange	Incremento	550	575	~185	-
Calcium Crimson	Incremento	590	610	~185	-
Fura Red	Decremento	488	650	~400	-
Fluo-3/Fura Red	Cambio rapporto	488	530/660	~400	-

consiglia quindi di non attendere oltre 1 ora prima di effettuare le misure. Inoltre, la presenza di popolazioni cellulari di diversa dimensione può costituire un problema poiché il tracciante si accumula anche in funzione della massa citoplasmatica.

Protocollo di colorazione con Indo1-AM

Sospendere 10-20 x 10⁶ cellule in 1 mL di "cell loading medium" (CLM) (terreno di coltura RPMI, 2% siero fetale di vitello (FCS), 25 mM HEPES (pH 7,4)).

Marcare le cellule con Indo-1 alla concentrazione finale di 1,5 µM ed incubare per 45 min a 37 °C al buio.

Lavare 2 volte le cellule con "Dulbecco's minimal essential medium" (DMEM) + 2% FCS, risospendere delicatamente (non vortexare) in CLM a 2,5 x 10⁶ cellule/mL; conservare le cellule per 1 ora al buio a temperatura ambiente.

Diluire le cellule a 1 x 10⁶/mL con CLM; incubare al buio a 37 °C per 30-60 min.

Analizzare al citometro a flusso.

Protocollo di colorazione con Fura Red

Sospendere le cellule in 1,5 mL di apposito tampone* a 5-7 x 10⁶/mL.

Aggiungere Fura Red alla concentrazione finale di 50 nM ed incubare per 30 min a 37 °C.

Lavare le cellule in tampone.

Risospendere alla concentrazione di 1-2 x 10⁶/mL in tampone e conservare immediatamente in ghiaccio.

Riscaldare a 37 °C prima della lettura in citometria.

Protocollo di colorazione con Fluo-3

Incubare 5 x 10⁶ cellule/mL con una concentrazione finale 2 µM Fluo-3 per 25 min a 37 °C in 6% di CO₂ in agitazione costante.

Lavare due volte con tampone* e centrifugare (200 g per 10 min).

Risospendere le cellule in tampone e conservare i campioni a temperatura ambiente al buio fino al momento della lettura.

STRESS OSSIDATIVO

Sebbene necessario per la sopravvivenza degli organismi aerobi, l'ossigeno è un biradiale che acquistando elettroni può generare molecole tossiche, quali O₂⁻ (anione superossido), H₂O₂ (perossido di idrogeno) e OH[•] (radicale idrossilico), altamente reattive. Queste molecole, per successive reazioni, possono generare metaboliti reattivi dell'ossigeno, causando danno ossidativo alle macromolecole biologiche (23).

Le cellule di un organismo cresciute in condizioni aerobie sono continuamente esposte a ROS formati come sottoprodotto del metabolismo respiratorio, la principale fonte di ROS essendo la catena di trasporto degli elettroni. Un aumento dell'attività mitocondriale si riflette in un aumento della produzione di ROS. Le ROS possono essere prodotte anche in seguito all'esposizione delle cellule a diversi stress esterni come radiazioni, shock termico, etanolo, agenti ossidanti, alta osmolarità, e si accumulano nelle cellule madri come prodotti di una respirazione che diventa progressivamente meno efficiente. Allo stesso tempo le ROS sono utili negli organismi superiori poiché utilizzate nel sistema immunitario come difesa da patogeni. In condizioni fisiologiche, i danni cellulari sono impediti da difese antiossidanti che neutralizzano le ROS (difese primarie) e riparano le molecole da esse danneggiate (difese secondarie). Tuttavia, in condizioni di stress eccessivo, la quantità di ROS prodotta supera le capacità antiossidanti della cellula, la quale subisce così il danno ossidativo.

L'attivazione cellulare spesso suscita risposte funzionali come il "burst" ossidativo, in cui si ha rilascio di ROS

*L'esatta composizione del tampone è ottenibile, su richiesta, dagli autori (e-mail: barbara.canonico@uniurb.it)

da parte della cellula. Le ROS sono molecole o porzioni di molecole che possiedono un elettrone spaiato nel loro orbitale di valenza e lo stato carente di un elettrone le rende altamente reattive in modo da poter danneggiare le molecole adiacenti, sequestrando o donando un elettrone (24).

I metodi più utilizzati per misurare il "burst" respiratorio si basano sulle capacità delle ROS rilasciate di cambiare l'assorbanza o le proprietà fluorescenti di specifici substrati, come la DCFH-DA e la DHR. L'intensità di fluorescenza misurata viene rapportata a controlli negativi e positivi costituiti rispettivamente da cellule non marcate e da cellule trattate con molecole ossidanti in grado di produrre radicali, come menadione o tert-butil idroperossido (t-but-OOH), entrambi alla concentrazione finale di 100 μM .

DCFH-DA è una molecola non polare, diffonde facilmente all'interno delle cellule e viene idrolizzata dalle esterasi intracellulari che rimuovono i gruppi acetati rendendola polare e quindi impermeabile. Il nuovo composto polare DCFH viene ossidato a livello intracellulare dalle ROS prodotte dando origine alla formazione di 2,7-diclorofluoresceina (DCF), una molecola altamente fluorescente che emette ad una lunghezza d'onda di 532 nm (Figura 5). Dati recenti indicano che l'ossidazione di DCFH è dovuta principalmente a H_2O_2 o a perossidasi di basso PM generate dalle cellule; per questo l'intensità di fluorescenza emessa viene considerata proporzionale alla quantità di H_2O_2 prodotto dalle cellule (25).

Protocollo di colorazione con DCFH-DA

Le cellule vengono marcate con DCFH-DA ad una concentrazione finale da 1 μM a 20 μM ed incubate a 37 °C al buio per 30 min; segue il trattamento con l'eventuale induttore del "burst" ossidativo per i tempi richiesti; infine le cellule vengono raccolte, lavate in PBS ed analizzate mediante citometria a flusso.

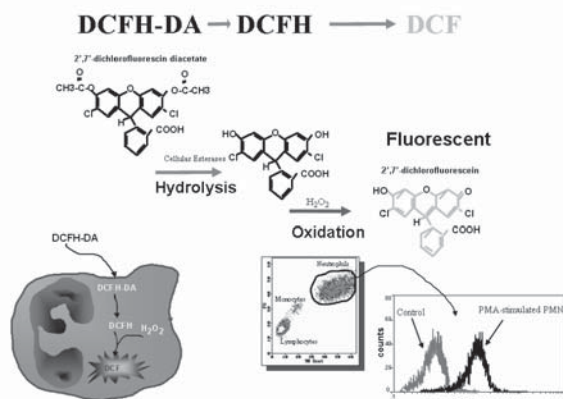


Figura 5

Schema relativo alla emissione di fluorescenza da parte di 2,7-diclorofluoresceina di acetato (DCFH-DA) in seguito ad ossidazione ad opera delle specie reattive dell'ossigeno (in particolare H_2O_2) intracellulari.

RedoxSensor Red CC-1 è un marcatore fluorescente che si localizza preferibilmente tra i mitocondri e i lisosomi, riflettendo il potenziale redox citosolico della cellula. Una volta all'interno della cellula, la molecola non fluorescente, se non viene ossidata nel citoplasma in un composto fluorescente rosso (assorbimento/emissione massima 540/600 nm), si accumula nei mitocondri o viene trasportata ai lisosomi dove è ossidata. La diversa distribuzione del prodotto ossidato tra i mitocondri e i lisosomi sembra dipendere dal potenziale redox del citoplasma; nelle cellule proliferanti predomina la marcatura mitocondriale, mentre nelle cellule inibite da contatto la colorazione è principalmente lisosomiale. Per discriminare le due distribuzioni è possibile effettuare una misura biparametrica utilizzando un marcatore fluorescente specifico per i mitocondri, come il MT; in questo modo i mitocondri esibiranno sia la fluorescenza verde che rossa, mentre nei lisosomi predominerà la fluorescenza rossa (26).

Protocollo di colorazione con RedoxSensor Red

Incubare le cellule a 37 °C per 30 min con RedoSensor Red CC-1 ad una concentrazione finale di 1-5 μM e analizzare mediante citometria a flusso.

REAZIONI OSSIDATIVE

Le ROS, come il radicale idrossile e l'anione superossido, sono fisiologicamente prodotte dalle cellule come conseguenza del metabolismo aerobico e giocano un ruolo importante in una varietà di processi biologici, incluse funzioni omeostatiche, difesa immunologica e sistema di trasduzione del segnale cellulare. Questi radicali liberi generano successivamente H_2O_2 e perossidi di lipidi, che sono componenti relativamente stabili. Essi reagiscono rapidamente con molte macromolecole biologiche inducendo danni ai nucleotidi, ai legami DNA-proteina, rottura del DNA a doppio e singolo filamento, perossidazione di lipidi, degradazione delle proteine e danno mitocondriale. Fortunatamente, gli organismi sono dotati di una serie di agenti che possono detossificare direttamente i radicali, come la forma ridotta del glutathione (GSH), o associarsi a loro (scavenger di radicali liberi) o metabolizzarli in molecole innocue, tramite enzimi antiossidanti. La sensibilità della cellula allo stress ossidativo dipende quindi dal suo sistema antiossidante.

Il diidroetidio (DHE) è un marcatore specifico per la determinazione delle specie radicaliche dell'ossigeno, in particolare per l'anione superossido. Una volta ossidato all'interno della cellula si trasforma in etidio (HE), esibendo fluorescenza nel rosso ad una lunghezza d'onda di 605 nm. Lo spostamento dell'intensità di fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di O_2^- contenuto nelle cellule (27).

Protocollo di colorazione con DHE

Incubare le cellule con DHE 1,5 μM -20 μM per 30 min a 37 °C; centrifugare e risospesondere in PBS; acqui-

sire il campione preparato mediante citometria a flusso.

Il monoclorobimano (MCB) è un composto non fluorescente utilizzato per determinare i livelli intracellulari di GSH. MCB diffonde nelle cellule dove viene coniugato al GSH tramite la glutatione S-transferasi, inducendo la formazione del coniugato fluorescente bimano-glutazione; l'intensità di fluorescenza emessa è proporzionale alla quantità di GSH presente nella cellula. La fluorescenza viene misurata mediante citometro a flusso dotato di laser UV perché lo spettro di eccitazione del coniugato è di 340 nm e di emissione di 460 nm (28).

Protocollo di colorazione con MCB

Incubare le cellule con MCB 40 μ M, disciolto in PBS, per 20 min; bloccare la reazione con FCS 50%; eseguire un lavaggio in PBS e risospendere; acquisire il campione.

La 5-clorometilfluoresceinadiacetato (CMFDA) è un altro marcatore tio-reattivo fluorescente in grado di determinare i livelli intracellulari di GSH. CMFDA è una molecola non fluorescente capace di entrare nel compartimento intracellulare e reagire con le esterasi in modo da permettere al CMF prodotto di rimanere intrappolato all'interno della cellula (29). L'interazione del CMF con il gruppo tiolo del GSH provoca l'emissione di fluorescenza ad una lunghezza d'onda di 516 nm. Al contrario dell'MCB, CMFDA viene misurato con un citometro a flusso dotato di laser ad argon in quanto presenta uno spettro di eccitazione a 492 nm.

Protocollo di colorazione con CMFDA

Incubare le cellule per 30 min a 37 °C con CMFDA ad una concentrazione finale di 30 μ M; centrifugare e risospendere in PBS; acquisire il campione mediante citometria a flusso.

ANALISI DELLA FAGOCITOSI

Lo studio della fagocitosi in citometria viene eseguito attraverso numerose metodiche essenzialmente comparabili e la scelta, di conseguenza, è determinata dalle specifiche esigenze dell'operatore. Diversi protocolli prevedono la stimolazione del fagocita con batteri o altre particelle opportunamente opsonizzate e misurano poi la produzione di radicali dell'ossigeno che consegue all'interazione fagocita/bersaglio. Questo tipo di approccio fornisce in molti casi le stesse indicazioni pratiche dei metodi che misurano effettivamente l'internalizzazione del bersaglio. L'analisi più attendibile della fisiologia della fagocitosi richiede tuttavia una diretta valutazione del processo di internalizzazione.

L'analisi richiede l'utilizzo di sangue intero fresco eparinizzato:

- 1) vortexare la provetta contenente il sangue e mettere 100 μ L in provette da 5 mL facendo attenzione a non lasciarne delle tracce sui bordi;

- 2) mettere i campioni di sangue in ghiaccio per 15 min per raggiungere una temperatura di 0 °C;
 - 3) aggiungere 20 μ L di batteri *E. Coli* (precedentemente marcati, raffreddati e vortexati);
 - 4) vortexare nuovamente tutte le provette, lasciare il controllo in ghiaccio, e incubare gli altri campioni per 10 min a 37 °C in un bagno termostato, agitando frequentemente (il tempo di incubazione, la frequenza dell'agitazione e la temperatura devono essere monitorati con attenzione; il bagnetto termostato deve essere chiuso e preriscaldato);
 - 5) alla fine dell'incubazione, mettere i campioni in ghiaccio per bloccare la fagocitosi, aggiungere 100 μ L di "quenching solution" ghiacciata e vortexare;
 - 6) aggiungere 3 mL di "washing solution" ghiacciata e centrifugare per 5 min a 250g a 4 °C;
 - 7) eliminare il soprannatante, risospendere il pellet in 3 mL di "washing solution" e centrifugare per 5 min a 240g a 4 °C;
 - 8) aggiungere 2 mL di "lysing solution" a temperatura ambiente e incubare per 20 min. Centrifugare per 5 min a 250g a 4 °C;
 - 9) lavare i campioni con 3 mL di "washing solution" fredda (5 min a 250g a 4 °C);
 - 10) aggiungere 100 μ L di DNA "staining solution", vortexare e incubare per 10 min a 0 °C al buio.
- Analizzare i campioni al citometro entro 30 min.

ANALISI DEL POTENZIALE DI MEMBRANA PLASMATICA

Si utilizza DiBac4(5) [bis-(1,3-dibutilbarbiturato) trimetina oxonolo] diluito in dimetilsolfossido alla concentrazione finale di 10 mM. È un fluorocromo anionico e pertanto escluso dai mitocondri (eccitazione 493 nm, emissione 516 nm).

L'analisi citometrica deve essere eseguita nel minor tempo possibile dopo la preparazione del campione, avendo cura di mantenere stabili le condizioni di temperatura.

È opportuno sottolineare che all'aumentare del potenziale di membrana, cioè ad una maggiore elettro-negatività, corrisponde una minore incorporazione dei traccianti e quindi un segnale di fluorescenza più basso.

FUNZIONALITA' DI ORGANELLI

Lisosomi

I lisosomi, vescicole (0,05-0,5 μ m) che si formano nell'apparato del Golgi, sono essenzialmente sacchetti membranosi (delimitati da una membrana a doppio strato lipidico) che racchiudono enzimi idrolitici in grado, nella digestione intracellulare, di tagliare in maniera specifica e controllata grosse molecole.

Il LysoTracker Probe è un marcatore fluorescente utilizzato per la determinazione e localizzazione degli organelli acidi nelle cellule vitali (30). È costituito da un fluoroforo legato ad una base debole, parzialmente protonata a pH neutro, permeabile alle membrane cellulari, e

tende a concentrarsi tipicamente negli organelli sferici.

L'arancio di acridina (AO) presenta uno spettro di assorbimento favorevole alla sua eccitazione con il laser ad argon (488 o 514 nm), la sorgente tipica di eccitazione dei citometri a flusso più comuni, dispone di una buona efficienza quantica e, soprattutto, fornisce contemporaneamente la stima di due parametri come DNA e RNA (1, 31). Con l'utilizzo di AO, il citoplasma ed il nucleo presentano una colorazione verde brillante e debolmente rossa, mentre è rossa nei compartimenti acidi (come i lisosomi). L'intensità della fluorescenza rossa è proporzionale al grado di acidità e al volume dei compartimenti acidi cellulari. Inoltre, comparando il rapporto tra l'intensità media di fluorescenza rossa e quella verde all'interno di popolazioni cellulari differenti è possibile misurare il cambiamento nel grado di acidità e/o la frazione di volume dei loro compartimenti acidi.

Apparato di Golgi

L'apparato del Golgi è formato da sacche membranose impilate le une sulle altre, che modificano proteine e lipidi, sintetizzano carboidrati e "impacchettano" le molecole che devono essere trasportate all'esterno della cellula. Anche se può variare leggermente a seconda delle cellule studiate, in linea di massima la sua struttura è pressoché uniforme: è formato da dittiosomi, strutture formate a loro volta da sacculi appiattiti e da piccole formazioni cave, le vescicole golgiane. I sacculi sono impilati strettamente gli uni agli altri e possono trovarsi singolarmente nel citoplasma o associati nei cosiddetti corpi golgiani. I sacculi che si trovano localizzati in prossimità del nucleo sono detti inferiori o prossimali e costituiscono la regione *cis* del dittiosoma. I sacculi che invece si trovano localizzati in prossimità della superficie cellulare sono detti superiori o distali e costituiscono la regione *trans* dello stesso dittiosoma.

L'apparato di Golgi è una struttura subcellulare funzionalmente eterogenea implicata nella sintesi, maturazione e selezione di glicoproteine di nuova sintesi. Le lectine sono proteine che legano i carboidrati e glicolipidi nel lume della rete *trans* del golgi. L'uso di lectine fluorescenti in citofluorimetria permette di studiare e quantificare, sia in cellule intere che in organelli isolati, le glicoproteine di superficie che legano le lectine. Possono inoltre essere marcate specifiche proteine mediante anticorpi monoclonali (es. golgina 97).

BIBLIOGRAFIA

- Luchetti F, Canonico B, Biagiarelli L, et al. Indagini citofluorimetriche nella vitalità e morte cellulare. I. Necrosi, apoptosi e proliferazione cellulare. *Biochim Clin* 2009; 33:83-92.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91:479-89.
- Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D et al. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *Faseb J* 2004;18:869-71.
- Green D, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
- Lizard G, Miguet C, Bessede G et al. Impairment with various antioxidants of the loss of mitochondrial transmembrane potential and of the cytosolic release of cytochrome c occurring during 7-ketocholesterol-induced apoptosis. *Free Rad Biol Med* 2000;28:743-53.
- Macho A, Decaudin D, Castedo M, et al. Chloromethyl-X-rosamine - A fluorochrome for the determination of the mitochondrial transmembrane potential. *Cytometry* 1996; 25:333-40.
- Gilmore K, Wilson M. The use of chloromethyl-X-rosamine (Mitotracker red) to measure loss of mitochondrial membrane potential in apoptotic cells is incompatible with cell fixation. *Cytometry* 1999;36:355-8.
- Poot M, Gibson LL, Singer VL. Detection of apoptosis in live cells by MitoTracker™ Red CMXRos and SYTO dye flow cytometry. *Cytometry* 1997;27:358-64.
- Korchak HM, Rich AM, Wilkenfeld C, et al. A carbocyanine dye, DiOC6(3), acts as a mitochondrial probe in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 108:1495-501.
- Salvioli S. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters* 1997;411:77-82.
- Lampidis TJ, Bernal SD, Summerhayes IC, et al. Selective toxicity of rhodamine 123 in carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 1983;43:716-20.
- Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 2002;47:236-42.
- Poppe M, Reimertz C, Düßmann H, et al. Dissipation of potassium and proton gradients inhibits mitochondrial hyperpolarization and cytochrome c release during neural apoptosis. *J Neuroscience* 2001; 21:4551-63.
- Floryk D, Houstek J. Tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) is suitable for cytofluorometric measurements of mitochondrial membrane potential in cells treated with digitonin. *Bioscience Reports* 1999;19:27-34.
- Petit PX, Lecoeur H, Zorn E, et al. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biology* 1995;130:157-67.
- Zhao R, Oxley D, Smith TS, et al. DNA damage-induced Bcl-xL deamidation is mediated by NHE-1 antiport regulated intracellular pH. *PLoS Biology* 2007;5:39-53.
- Ormerod MG, ed. Third edition Flow cytometry, Practical approach. Oxford: University Press, 2000.
- Carafoli E, Brini M. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol* 2000;4:152-61.
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, et al. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature* 1997;386:855-8.
- Arnould T, Vankoningsloo S, Renard P, et al. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *Embo J* 2002;21:53-63.
- Baksh S, Widlund HR, Frazer-Abel AA, et al. NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell* 2002;10:1071-81.
- Huang G, Kim JY, Dehoff M, et al. Ca^{2+} signaling in microdomain: Homer1 mediates the interaction between RyR2 and Cav1.2 to regulate E-C coupling. *J Biol Chem* 2007; 282:14283-90.
- Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem* 2004;11:1105-12.

24. Hashiguchi N, Chen Y, Rusu C, et al. Whole-blood assay to measure oxidative burst and degranulation of neutrophils for monitoring trauma patients. *Eur J Trauma* 2005;4:379-88.
25. Trinei GM, Migliaccio M, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:722-8.
26. Hu X, Roberts JR, Apopa PL, et al. Accelerated ovarian failure induced by 4-vinyl cyclohexene diepoxide in Nrf2 null mice. *Mol Cell Biol* 2006;26:940-54.
27. Guo AM, Arbab AS, Falck JR, et al. Activation of vascular endothelial growth factor through reactive oxygen species mediates 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced endothelial cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321:18-27.
28. Hammond CL, Marchan R, Krance SM, et al. Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins. *J Biol Chem* 2007;282:14337-47.
29. Pan MH, Hsieh MC, Kuo JM, et al. 6-Shogaol induces apoptosis in human colorectal carcinoma cells via ROS production, caspase activation, and GADD 153 expression. *Mol Nutr Food Res* 2008;52:527-37.
30. Yuan XM, Li W, Dalen H, et al. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Science* 2002;99:6286-91.
31. Vale-Silva LA, Buchta V. Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: is it the future? *Mycoses* 2006;49:261-73.