

Indagini citofluorimetriche nella vitalità e morte cellulare. I. Necrosi, apoptosi e proliferazione cellulare

Francesca Luchetti¹, Barbara Canonico¹, Letizia Biagiarelli¹, Lucia Bucci¹, 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. I. Necrosis, apoptosis and cell proliferation. Today, several assays and antibodies are available for the analysis of apoptosis, cell cycle and DNA repair, cell viability and vitality, proliferation, migration, adhesion, endo- and exocytosis. Many of the assays are fluorescence- or colorimetric-based, offering sensitivity, practicability, as well as safety. These reagents have been validated on multiple instrument platforms, including microscopy and flow cytometry analysers. Here we describe some advances in application of flow cytometry particularly related to cell cycle analysis and cell proliferation studies, giving some general information and reporting protocols currently used in laboratories. Particularly, fluorescent probes have been organized into categories based on different aspects of apoptosis, necrosis and cell proliferation.

INTRODUZIONE

Le colture cellulari si distinguono principalmente in colture primarie (da cellule isolate dai tessuti di un organismo e coltivate in vitro) e linee cellulari o colture secondarie (da cellule immortalizzate in vitro attraverso diversi passaggi) con caratteristiche omogenee. Le linee cellulari di solito originano da cellule tumorali, ma, diversamente da queste, cessano di proliferare quando crescendo aderenti alla piastra vengono in contatto tra loro (inibizione da contatto delle cellule confluenti); inoltre, mantengono abbastanza costanti le loro caratteristiche nel tempo. Alcune cellule si adattano a crescere in sospensione (cellule in sospensione), altre esigono una superficie solida (normalmente la superficie di materia plastica della piastra di coltura) sulla quale crescere e moltiplicarsi (cellule aderenti). In appropriate condizioni la maggior parte delle cellule è in grado di sopravvivere, moltiplicarsi e anche differenziare in una piastra di coltura. In questo modo si possono isolare popolazioni omogenee di cellule sulle quali valutare gli effetti di singole molecole. Il grande vantaggio è appunto quello di esaminare isolatamente singoli tipi di cellule (un tessuto è sempre composto da più tipi cellulari) e quindi semplificare il modello di studio. Le osservazioni ottenute in queste condizioni, rigorosamente definite e controllate, andranno successivamente confrontate e avvalorate dal comportamento cellulare in vivo, cioè nel loro ambiente naturale.

Normalmente le cellule in coltura in parte muoiono spontaneamente ed in parte sopravvivono, proliferando e/o differenziando. Su queste cellule possono essere valutati gli effetti di varie sostanze che possono alterarne la vitalità, la morte, la proliferazione ed il differenziamento. La metodica classica di valutazione della vitalità cel-

lulare è la tecnica di esclusione di un colorante, il trypan blu. Questa tecnica utilizza questo colorante per distinguere le cellule morte, che vengono colorate in blu, da quelle vitali, che lo escludono. La valutazione della vitalità in questo caso viene eseguita mediante conta delle cellule vive e morte al microscopio ottico.

La morte cellulare è un aspetto essenziale del normale funzionamento di organismi pluricellulari. Questo processo può essere sia un avvenimento fisiologico che patologico (Figura 1). La necrosi è un evento accidentale e si verifica in risposta ad un'ampia varietà di agenti aggressivi, di natura chimico-fisica, batteriologica-virale e patologica. Essa è un fenomeno acuto che si completa in alcuni minuti e, fino ad un certo punto, può regredire, permettendo alla cellula di recuperare le sue funzioni. L'apoptosi è un meccanismo fisiologico, definito anche morte cellulare programmata, diverso dalla morte passiva o necrosi, poiché è la cellula stessa che, non riuscendo a riparare gli innumerevoli danni subiti, decide di autodistruggersi in forma geneticamente controllata. Questo meccanismo di morte cellulare programmata è un processo irreversibile, che per attuarsi richiede dei tempi relativamente lunghi a causa della fine regolazione del processo in tutte le sue fasi a livello genico (1). Un'altezza nella regolazione dei geni implicati nella morte cellulare per apoptosi può essere la causa dello sviluppo di diverse neoplasie, malattie autoimmuni, infezioni virali e malattie neurodegenerative (2-4). La morte cellulare programmata è un fenomeno che interessa singole cellule, o un ristretto gruppo di esse in modo asincrono, a differenza della necrosi che coinvolge gruppi rilevanti di cellule fino ad interessare interi tessuti o organi. È stato dimostrato che l'apoptosi è presente nel codice genetico di tutti gli organismi eucarioti pluricellulari; in questi orga-

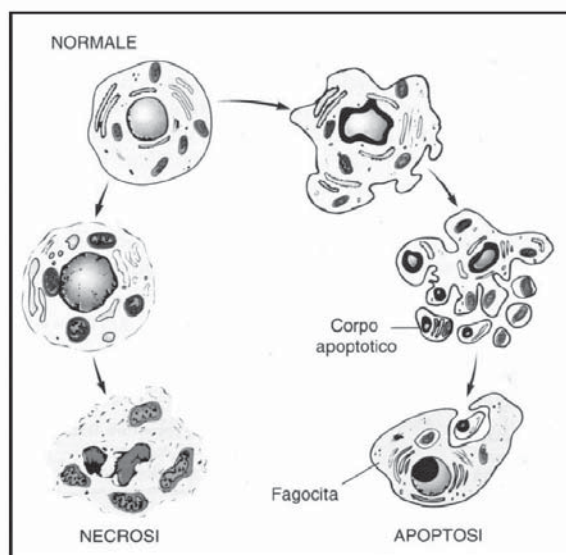


Figura 1
Morfologia della cellula nel corso del processo di morte cellulare.

nismi la maggior parte delle cellule ha la capacità di autodistruggersi mediante il meccanismo dell'apoptosi, al quale sembrano fare eccezione solo le cellule particolarmente specializzate, quali quelle del muscolo cardiaco e del tessuto nervoso. Recentemente, l'esistenza di fenomeni in certa misura comparabili all'apoptosi sono stati descritti anche in organismi unicellulari ed in cellule di procarioti sottoposte a diversi tipi di insulti (1).

NECROSI

La cellula che va incontro a necrosi perde la selettività ionica del sistema delle membrane cellulari, la quale determina il rigonfiamento del citoplasma e degli organuli cellulari (mitocondri, reticolo endoplasmatico, lisosomi) con conseguente perdita della loro organizzazione strutturale. Le alterazioni a livello nucleare sono più tardive e si esprimono dapprima con la comparsa di picnosi (nucleo più piccolo, con cromatina addensata) seguita dalla frammentazione in zolle della cromatina ed infine si verifica la scomparsa del nucleo stesso per espulsione o dissoluzione nel citoplasma. La conseguenza di questa dissoluzione nucleare e di questo rigonfiamento abnorme è la lisi cellulare, con rilascio nei tessuti del contenuto intracellulare. Il materiale cellulare così disperso nell'area circostante una risposta infiammatoria, che può arrivare nel tempo ad innescare anche reazioni autoimmuni, nel caso di ripetuti episodi di necrosi.

APOPTOSI

L'apoptosi, al contrario della necrosi, determina un danno minimo delle cellule e dei tessuti circostanti, in quanto tale fenomeno non provoca una risposta infiam-

matoria perché non si ha versamento del materiale citoplasmatico nell'ambiente extracellulare, dato che esso rimane confinato all'interno di vescicole rivestite da membrana plasmatica (1). Infatti, a differenza della cellula necrotica, quella apoptotica perde rapidamente volume, si stacca dalle cellule vicine perdendo i contatti sia con le cellule circostanti che con la matrice extracellulare ed assume una forma sferica (Figura 1).

Dal punto di vista morfologico, nelle fasi precoci del processo apoptotico, la cellula mantiene la propria organizzazione interna; infatti, gli organuli cellulari, come mitocondri, reticolo endoplasmatico, lisosomi, appaiono intatti finché il processo non raggiunge uno stadio avanzato (2-4). A livello nucleare, invece, si osserva la disgregazione del/dei nucleolo/i e la condensazione ed il taglio della cromatina in frammenti di 180-200 paia di basi. Nelle fasi più tardive dell'apoptosi si formano delle vescicole sulla superficie cellulare che si staccheranno dando origine ai corpi apoptotici che verranno fagocitati dai macrofagi e che contengono organelli, porzioni del citoplasma e della cromatina frammentata.

L'apoptosi può essere suddivisa in tre diverse fasi successive: 1) fase di induzione, 2) fase effettrice e 3) fase di rimozione del materiale apoptotico.

La fase di induzione è regolabile e reversibile; infatti è regolata da segnali di sopravvivenza e segnali di morte. L'apoptosi avviene per mezzo di due distinte "pathway": una attivata da "segnali di morte" ("tumor necrosis factor- α ", "TNF-related apoptosis-inducing ligand", "Fas-ligand") che giungono a specifici recettori di membrana (via recettoriale o estrinseca), l'altra attivata da segnali endogeni (come agenti citotossici, radiazioni UV, deprivazione di citochine e di fattori di crescita) e regolata dai mitocondri (via mitocondriale o intrinseca). Entrambe le vie convergono nell'attivazione di proteasi specifiche (le caspasi); tale evento segna l'inizio della fase di esecuzione. L'attivazione delle caspasi è determinata da un evento proteolitico e determina a sua volta un'ulteriore cascata di eventi proteolitici e nucleolitici, che amplificano il segnale e portano alle tipiche modificazioni morfologiche dell'apoptosi. La fase di esecuzione richiede energia e, nel caso che l'ATP disponibile non sia sufficiente per completare il processo di apoptosi, questa può non proseguire e sfociare in necrosi. L'ultima fase dell'apoptosi è quella di rimozione del materiale apoptotico, dove i corpi apoptotici vengono fagocitati dai macrofagi e dalle cellule parenchimali che riconoscono le strutture presenti sulla membrana cellulare come la fosfatidilserina (PS), la quale di norma è localizzata nello strato citosolico della membrana plasmatica e durante l'apoptosi viene trasferita sullo strato esterno del plasmalemma con un meccanismo di "ribaltamento" (a flip-flop) (5). Queste modificazioni sono percepite da monociti e macrofagi grazie a numerosi recettori di superficie, tra cui molecole di tipo lectinico.

METODI DI VALUTAZIONE

E' intuitiva l'estrema importanza di valutare in una col-

tura cellulare la percentuale di cellule vive, apoptotiche e necrotiche. Di seguito sono descritte le principali metodologie utilizzate.

Valutazione del picco ipodiploide dopo colorazione con ioduro di propidio

Lo ioduro di propidio (3,8-diammino-5diethylmetil aminopropil-6fenilfenantridin diioduro) (PI) è un colorante sintetico caratterizzato da una bassa fluorescenza (rosso-arancio), in grado di legarsi selettivamente agli acidi nucleici. Il PI instaura essenzialmente due tipi di legame con DNA o con RNA a doppia elica: un legame primario, quando il colorante si lega a due coppie di basi adiacenti dell'acido nucleico, ed un legame secondario, esterno alla doppia elica.

Una volta intercalato nei siti "primari" tra le coppie di acidi nucleici, il PI incrementa di 20 volte rispetto al colorante libero la sua efficienza quantica di fluorescenza, mentre per il colorante legato nei siti "secondari" questo non si verifica. Questo effetto è probabilmente il risultato dell'immersione del colorante nel mezzo idrofobico del sito di intercalazione e rende il PI un ottimo "marker" fluorescente degli acidi nucleici in doppia elica, che possiedono siti primari.

Un parametro che viene sfruttato per valutare le cellule apoptotiche è il taglio internucleosomico del DNA della cellula apoptotica. Per valutare l'avvenuto taglio internucleosomico tipico delle cellule apoptotiche viene utilizzata la metodica d'analisi del ciclo cellulare. Il PI, legandosi stechiometricamente alla doppia elica del DNA (o al RNA a doppia elica) fornisce un'informazione sulla quantità di DNA contenuta nelle cellule, in relazione all'intensità di fluorescenza (maggiore è il contenuto di DNA maggiore sarà la fluorescenza). È noto che il contenuto di DNA varia a seconda della fase del ciclo in cui si trova una cellula. In particolare, la fase G2 e la mitosi (M) hanno una quantità di DNA doppia rispetto alla fase G1, mentre durante la fase di sintesi del DNA (fase S), la cellula ha una quantità di DNA intermedia tra il contenuto in G1 e G2. Poiché le cellule apoptotiche, una

volta risospese in un appropriato tampone, perdono i piccoli frammenti di DNA, è possibile osservare in esse una riduzione della fluorescenza del PI (correlata alla diminuzione del contenuto di DNA). In questo modo è possibile valutare la percentuale di cellule apoptotiche che si posizionano nel cosiddetto picco ipodiploide e, oltre a questo, è possibile valutare la percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare: G0/G1, S e G2/M (6,7) (Figura 2).

Protocollo di colorazione con PI

Per effettuare la colorazione con il PI è necessario ottenere una lisi della membrana citoplasmatica poiché il PI non è in grado di colorare in maniera stechiometrica le cellule con la membrana integra. Le cellule vengono fissate in etanolo freddo al 70% per almeno 30 min a 4 °C, lavate in tampone fosfato (PBS), incubate per 30 min a 37 °C con 20 µg/mL di PI, 100 µg/mL di RNAasi tipo XII-A in una soluzione di citrato (0,71 g Na₂HPO₄, 0,735 g C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O, 100 µL Triton X-100, pH 7,8). L'uso dell'RNAasi si rende necessario per eliminare il RNA a doppia elica che potrebbe legare il PI e quindi influenzare la colorazione specifica del DNA.

Annessina V

L'annexina V appartiene alla superfamiglia di proteine denominate annexine, così chiamate in quanto la loro principale proprietà è di legarsi ("annex") alla membrana cellulare in maniera Ca²⁺-dipendente. Le annexine sono delle proteine ubiquitarie in numerosi organismi, mammiferi, piante e sono implicate in diversi aspetti della biologia cellulare. Un dominio "core" conservato, che contiene da quattro a otto unità ripetute di 70 amminoacidi ognuna, rappresenta la caratteristica strutturale delle annexine. Tali unità ripetute sono responsabili dell'abilità delle annexine di legare i diversi fosfolipidi, mentre la specificità di legame di ogni annexina è probabilmente legata alla regione N-terminale che differisce nelle varie proteine.

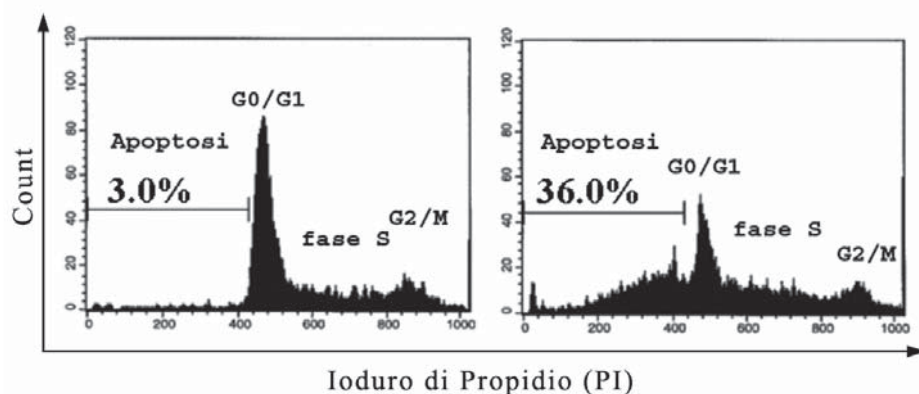


Figura 2

Valutazione del picco ipodiploide dopo colorazione con ioduro di propidio. L'istogramma a sinistra mostra il controllo (linea cellulare SK-N-MC). A destra è riportata la percentuale delle cellule apoptotiche (picco ipodiploide, 36%) e delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare (G0/G1, S, G2/M) dopo trattamento con raggi ultravioletti.

Durante la morte cellulare si verificano alterazioni della membrana plasmatica che comportano la perdita della sua integrità; nei primi stadi del processo apoptotico si vengono a creare modificazioni al doppio strato lipidico che “segnalano” ai macrofagi lo stadio apoptotico della cellula e ne inducono la fagocitosi. Mano a mano che il processo apoptotico progredisce, la permeabilità della membrana cellulare aumenta progressivamente; quello che si verifica è un cambiamento conformazionale della membrana plasmatica e precisamente della sua composizione asimmetrica in fosfolipidi. Il mantenimento di tale asimmetria è un processo che avviene con dispendio energetico e che coinvolge enzimi chiamati flippasi, la cui attività nelle cellule apoptotiche è però bloccata da un altro enzima, detto floppasi che – con un meccanismo ‘flip-flop’ – fa passare le molecole di fosfatidilserina (PS) dallo strato interno della membrana a quello esterno. L’esternalizzazione della PS avviene nelle prime fasi dell’apoptosi.

L’annexina V è una proteina con elevata affinità per la PS; poiché l’esposizione della PS sulla membrana esterna è stata associata all’inizio del processo apoptotico, il saggio con annexina V è considerato un metodo di rilevazione delle fasi precoci dell’apoptosi (7).

L’annexina V può essere coniugata a diversi fluorocromi che conferiscono fluorescenza alla cellula apoptotica. Questo consente di quantificare l’apoptosi mediante citometria a flusso e di osservare le cellule apoptotiche al microscopio a fluorescenza. La marcatura delle cellule con annexina V è rapida (circa 10 min) e non è richiesta la fissazione. Il saggio è in genere molto sensibile e permette di rilevare anche un numero esiguo di cellule marcate.

La traslocazione di PS sulla superficie cellulare esterna non avviene unicamente nell’apoptosi, ma anche durante la necrosi. La differenza consiste nel fatto che nelle fasi iniziali di apoptosi la membrana cellulare rimane intatta, mentre nel momento in cui si verifica la necrosi la membrana cellulare perde la sua integrità.

Per distinguere le cellule vive da quelle apoptotiche e

necrotiche, l’annexina V viene spesso utilizzata in doppia marcatura con il PI a bassa concentrazione (1-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In questo caso la bassa concentrazione di PI colora solo le cellule necrotiche e consente di distinguere le cellule necrotiche da quelle apoptotiche (entrambe positive per l’annexina V) (Figura 3).

Protocollo di colorazione con annexina V e PI

Le cellule prelevate da ogni pozzetto sono diluite in PBS, centrifugate e risospese in 200 μL di “binding buffer” (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , pH 7,4) alla concentrazione di 10^6 cellule/mL. Successivamente sono aggiunti 5 μL di annexina V-FITC e 5 μL di PI alla concentrazione di 1 mg/mL (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ finale). Dopo un’incubazione di 10 min a temperatura ambiente, la sospensione è portata a volume di 0,6 mL con “binding buffer” e letta al citofluorimetro.

Colorazione con PI sopravvitalo

Un altro metodo usato per individuare lo stato apoptotico delle cellule utilizza il PI ad alta concentrazione (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) per tempi relativamente lunghi (30 min): questo metodo viene definito come “propidio sopravvitalo”. Le parziali modificazioni della permeabilità della membrana plasmatica che si presentano durante le prime fasi del processo apoptotico consentono al PI (grossa molecola carica positivamente) di penetrare solo parzialmente per diffusione passiva all’interno delle cellule in apoptosi precoce. Nelle cellule necrotiche o in necrosi secondaria l’entrata del PI è invece totale ed in relazione alla quantità di DNA presente nella cellula. Utilizzando questa metodica, le cellule vitali non presenteranno nessuna fluorescenza (PI-), quelle apoptotiche mostreranno una debole fluorescenza rosso-arancio (PI^{dim}) e quelle in tarda apoptosi (o necrosi secondaria) emetteranno una forte fluorescenza rosso-arancio (PI^{bright}). L’esposizione sopravvitalo al PI permette quindi l’analisi simultanea delle cellule vive, apoptotiche e necrotiche.

Questo esame con opportuni accorgimenti, contra-

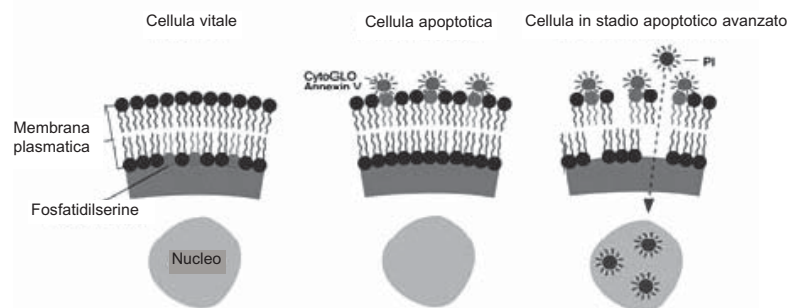


Figura 3

Rappresentazione schematica della colorazione con annexina V.

Le fosfatidilserine, costituenti tipici dello strato interno della membrana plasmatica, vengono esposte all'esterno della membrana durante le fasi iniziali dell'apoptosi. In presenza di ioni Ca^{2+} , l'annexina V ha un'alta affinità per le fosfatidilserine e se coniugata con un fluorocromio marca le cellule apoptotiche. Lo ioduro di propidio (PI) a bassa concentrazione entra e marca solo le cellule necrotiche.

riamente all'annexina V, può essere impiegato anche nel caso in cui si utilizzino cellule aderenti, quali ad es. linea di neuroblastoma SK-N-MC.

La completa sovrapposizione delle cellule annexina V⁺ con la popolazione PI^{dim} dimostra che la tecnica di marcatura con il PI sopravvitalente consente di individuare l'apoptosi tanto precocemente quanto l'annexina V. Quest'ultima, pur essendo largamente usata, presenta dei limiti. Infatti, residui di PS possono essere presenti sulla superficie di cellule che non sono in apoptosi, per es. sugli eritrociti invecchiati, sulle piastrine attivate o dopo stimolazione, o sulla superficie di cellule leucemiche. Il legame dei residui di PS con annexina V genera cellule annexina V⁺ che impediscono una corretta quantificazione delle cellule apoptotiche. Inoltre, nelle cellule aderenti la valutazione dell'apoptosi con l'annexina V non è realizzabile, poiché la tripsinizzazione o lo "scraping" danneggiando le cellule, portano a stimare un numero più elevato di cellule non apoptotiche annexina V⁺, determinando la comparsa di falsi positivi.

Poiché si è visto che molti farmaci chemioterapici sono in grado di indurre apoptosi o necrosi a seconda delle loro concentrazioni, la valutazione dell'apoptosi rispetto alla necrosi è un importante parametro per distinguere tra l'efficacia e la tossicità del trattamento. Quindi la tecnica del PI sopravvitalente, basata sulla differente permeabilità di membrana delle cellule apoptotiche e necrotiche, permettendo la simultanea analisi delle cellule vive, apoptotiche e necrotiche, rappresenta un esame attendibile in molti modelli apoptotici, compresi quelli che utilizzano cellule aderenti.

Per quanto riguarda l'analisi simultanea dell'apoptosi e dell'immunofenotipo di cellule in sospensione, il protocollo da seguire è il seguente: circa 200.000 cellule vengono risospese in 200 µL di PBS ed incubate con PI (50 µg/mL) ed il rispettivo anticorpo monoclonale, diretto contro l'antigene di interesse, per 30 min al buio e a 4 °C; le cellule vengono quindi sottoposte ad un lavaggio ed analizzate al citometro.

Protocollo di colorazione con annexina V e PI sopravvitalente

Per quanto riguarda l'analisi simultanea del PI sopravvitalente e dell'annexina V, dopo l'induzione di apoptosi, il protocollo da seguire è il seguente: le cellule non permeabilizzate vengono incubate per 30 min a temperatura ambiente e al buio con 50 µg/mL di PI, per essere poi lavate in PBS e risospese in 200 µL di "binding buffer". Prima dell'analisi al citometro le cellule vengono quindi marcate con 5 µL di annexina V-FITC per 10 min.

Calceina-AM

Oltre al PI e all'annexina esistono altri coloranti che permettono di distinguere cellule vive, apoptotiche e necrotiche. La calceina-AM è un composto idrofobico in grado di attraversare facilmente la membrana cellulare e portarsi nel citoplasma. L'idrolisi della calceina-AM ad opera di esterasi endogene produce calceina, un com-

posto idrofilico fortemente fluorescente che viene trattenuto all'interno del citoplasma. Il segnale di fluorescenza ottenuto è proporzionale al numero di cellule vive presenti nella sospensione cellulare, infatti la calceina-AM viene trattenuta molto bene dalle cellule vive.

La calceina-AM risulta essere un ottimo "probe" per lo studio dell'integrità di membrana cellulare, per gli studi di citotossicità e per la quantificazione del numero cellulare (9). La colorazione con calceina-AM è particolarmente indicata per cellule che crescono adese al substrato. Va sottolineato inoltre che, al fine di ottenere una buona colorazione, è necessario rimuovere tracce del terreno di coltura, in quanto il "phenol red" e il siero fetale comunemente presenti nel terreno di coltura possono interferire con l'accuratezza della colorazione (10).

Marcatura delle caspasi

Le caspasi rappresentano i veri e propri effettori dell'apoptosi. Sono enzimi proteolitici, il cui centro reattivo è caratterizzato da una cisteina, che tagliano proteine a valle di una breve sequenza di quattro amminoacidi, l'ultimo dei quali è un residuo di acido aspartico. Infatti, il termine caspasi origina da C di Cisteina, ASP di ASPartico ed ASI di proteASI.

Le caspasi, presenti in forma di proenzimi nel citoplasma, durante il processo apoptotico si attivano attraverso un meccanismo a cascata; infatti, ognuna di esse è attivata dalla precedente fino ad arrivare al taglio dei substrati finali. Uno dei più importanti bersagli delle caspasi effettrici è ICAD, l'inibitore di CAD ("caspase activated DNase"), un'endonucleasi specifica dell'apoptosi. Una volta liberatasi dall'inibitore grazie all'azione delle caspasi, CAD effettua tagli a doppio filamento nella regione internucleosomica (stabilizzata dall'istone H1 – zona "linker") della cromatina, rendendosi così responsabile della frammentazione del DNA tipica dell'apoptosi.

Nell'uomo sono state identificate almeno 10 di tali proteine, fra queste la caspasi-3 è considerata una proteasi chiave in quanto è attivata durante i primi stadi dell'apoptosi. La caspasi-3 attiva è costituita da un eterodimero di due subunità di 17 e 12 kDa, che derivano dal proenzima di 32 kDa. Esistono in commercio anticorpi coniugati con diversi fluorocromi che sono in grado di riconoscere le forme attive della caspasi-3 presenti nelle cellule apoptotiche. Questi anticorpi sono perciò utilizzati in citometria a flusso per identificare le cellule in apoptosi. Permeabilizzando le cellule con una soluzione di triton X-100 è possibile marcare la caspasi 3 citoplasmatica e valutarne lo stato di attivazione (11).

Va comunque ricordato che la caspasi-3 può essere attivata anche in modelli non apoptotici, come ad esempio durante il differenziamento eritroide e megacariocitario, perciò la sua attivazione non è sempre sinonimo di apoptosi.

Attualmente esistono in commercio dei kit che sono in grado di valutare l'attivazione delle caspasi in "toto". Questi kit si basano sull'utilizzo di un substrato coniugato ad un fluorocromo in grado di legarsi alle caspasi atti-

vate, determinando così uno spostamento d'intensità di fluorescenza rispetto ad un campione in cui le caspasi non sono attivate. I kit in commercio suggeriscono i protocolli da seguire che fundamentalmente sono molto semplici. Di seguito ne riportiamo un esempio: dopo 3 ore dall'induzione dell'apoptosi, le cellule vengono seminate a 1×10^6 cellule/mL; successivamente sono sottoposte ad un lavaggio in PBS, vengono risospese in 300 μ L di terreno con l'aggiunta di 1 μ L di substrato fluorescente e vengono incubate per 40 min a 37 °C in 5% di CO₂. Alla fine dell'incubazione le cellule sono centrifugate e risospese in 500 μ L di un appropriato tampone; a questo punto vengono effettuati due lavaggi, vengono risospese in 300 μ L di tampone ed acquisite al citofluorimetro.

Arancio di acridina

L'arancio di acridina (AO) è un fluorocromo vitale appartenente alla famiglia delle acridine, specifico per gli acidi nucleici (DNA/RNA). Questo colorante presenta uno spettro di assorbimento favorevole alla sua eccitazione con il laser ad argon (488 o 514 nm), dispone di una buona efficienza quantica e, soprattutto, fornisce contemporaneamente due parametri analitici. La sua caratteristica peculiare è infatti quella di intercalarsi nella doppia elica del DNA ed in questa situazione (molecole spaziate fra di loro ed inserite tra le coppie di basi nucleotidiche) emette fluorescenza verde; contemporaneamente si può legare all'esterno della singola elica dell'RNA (in particolare messaggeri e transfer) con legame covalente formando catene di fluorocromo, ed in quest'altra condizione (molecole vicine fra loro) emette fluorescenza rossa. Questa particolarità è stata inizialmente sfruttata in numerose applicazioni in campo emato-oncologico, dove il rapporto DNA/RNA è particolarmente significativo per lo studio di alcune leucemie.

L'AO è un colorante che quando lega il DNA è spettralmente simile alla fluoresceina con una eccitazione massima a 502 nm e una emissione massima a 525 nm (emissione verde), mentre quando lega l'RNA l'eccitazione massima si sposta a 460 nm (blu) e la sua emissione massima si sposta a 650 nm (rosso) (12).

Protocollo di colorazione con AO

Le cellule sono incubate con AO alla concentrazione finale di 1 μ g/mL per 15-20 min; viene poi eseguito un lavaggio e le cellule sono sospese in PBS. Il campione è poi analizzato in citometria a flusso.

Laser Dye Styryl (LDS) 751

LDS 751 è un colorante fluorescente (rosso) del DNA a doppia elica che ha la caratteristica di penetrare all'interno delle cellule vive senza la necessità di permeabilizzazione o fissazione (colorante vitale). LDS 751 viene eccitato dalla lunghezza d'onda classica (luce blu a 488 nm) ed è particolarmente utile nelle analisi multiparametriche in quanto la lunghezza d'onda di emissione (circa 712 nm) non si sovrappone con i tipici fluorocromi isotio-

cianato di fluoresceina (FITC) (520 nm), ficoeritrina (PE) (575 nm) e ficoeritrina-cianina5 (PE-Cy5) (650 nm).

Questo colorante viene usato per distinguere cellule nucleate da cellule non nucleate, come ad es. gli eritrociti, e viene utilizzato anche per distinguere le cellule vive da quelle in apoptosi. Le cellule apoptotiche infatti si colorano meno intensamente di quelle vive, anche senza fissazione e permeabilizzazione. Questo fenomeno non sembra essere dovuto al ridotto contenuto di DNA della cellula apoptotica (come nel caso di cellule permeabilizzate che perdono i frammenti di DNA), ma sembra invece legato allo stato del DNA e/o della cromatina. In seguito al taglio internucleosomico si forma una maggior quantità di DNA denaturato (a singola elica) che avrebbe meno affinità per il colorante (che si lega in modo specifico al DNA a doppia elica). Anche lo stato della cromatina, che nel caso del nucleo apoptotico è più compatta, potrebbe partecipare al fenomeno rendendo meno accessibile il DNA al colorante (13).

Protocollo di colorazione con LDS 751

Centrifugare le cellule e risospenderle in 0,5 mL PBS + 100 nM LDS. Incubare per 20 min a temperatura ambiente e aggiungere PI per distinguere le cellule morte.

Diamidinofenilindolo (DAPI)

Il DAPI è un colorante fluorescente specifico per il nucleo in modo analogo al PI. Essendo un colorante vitale, il DAPI è in grado di oltrepassare la membrana plasmatica intatta e colorare sia le cellule vive che quelle fissate. Questo colorante è eccitato dalla luce ultravioletta e forma complessi fluorescenti con il DNA a doppia elica, mostrando una specificità per le basi A-T. Quando il DAPI si lega al DNA, il suo assorbimento massimo è a 358 nm e la sua emissione massima è a 461 nm. La fluorescenza emessa nel blu consente di poter caratterizzare il nucleo delle cellule.

Questo colorante, essendo eccitato da luce UV, necessita per la rilevazione di un apposito laser o di una lampada a vapori di mercurio ed è per questo che viene preferenzialmente utilizzato in microscopia ottica a fluorescenza. Viene osservata la morfologia dei nuclei cellulari. I nuclei hanno un fenotipo normale quando emettono segnali luminosi omogenei, mentre i nuclei delle cellule apoptotiche vengono identificati dalla frammentazione del nucleo stesso e dalla condensazione della cromatina che si localizza alla periferia della membrana nucleare (14).

Protocollo di colorazione con DAPI

Un tipico protocollo di utilizzo del DAPI prevede che le cellule vengano sospese in PBS contenente 0,1% di triton X-100 e successivamente incubate per 10 min in ghiaccio. Le cellule vengono quindi lavate e risospese in una soluzione di PBS contenente 10 μ g/mL di DAPI alla concentrazione di 5000 cellule/ μ L. 10 μ L di questa

sospensione vengono disposti su un vetrino portaoggetti, si aggiunge una goccia di "anti-fading" per mantenere la fluorescenza nel tempo e poi il tutto viene ricoperto con un vetrino coprioggetto.

7-Aminoactinomicina D

La 7-aminoactinomicina D (7-ADD) è un colorante non vitale che viene escluso dalle cellule vive nelle quali la membrana plasmatica è perfettamente integra. Con le prime modificazioni di membrana, la 7-ADD entra all'interno della cellula dove si lega alla doppia elica degli acidi nucleici; in particolare, il colorante ha una elevata affinità per l'alternata sequenza dG-dC (15).

La 7-ADD permette di distinguere le cellule definite "early apoptotic cells"^{dim} (debole intensità di fluorescenza) e le "late apoptotic cells"^{bright} (intensità di fluorescenza elevata).

La 7-ADD viene principalmente utilizzata per separare le cellule vive dalle cellule morte. Questo colorante viene anche utilizzato per discriminare gli eritrociti e i leucociti; inoltre se combinata con diversi marcatori di superficie, come anticorpi anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, permette di isolare diverse sottopopolazioni linfocitarie. La 7-ADD è facilmente eccitabile a 488 nm con un picco di emissione a 670 nm. Il campione marcato può essere acquisito entro un'ora dal momento della marcatura, in caso contrario dovrà essere fissato. Le cellule marcate con 7-ADD possono infatti essere fissate con 1% formaldeide (la "stock solution" di formaldeide viene preparata al 2%) e analizzate in tempi successivi alla marcatura (16).

Protocollo di colorazione con 7-ADD

La "stock solution" si prepara aggiungendo a 1 mg di 7-ADD (polvere) 50 µL di etanolo assoluto freddo. Agitare bene e aggiungere 950 µL di PBS con Ca²⁺ e Mg²⁺ per raggiungere la concentrazione finale di 1 mg/mL. La soluzione così ottenuta va sonicata per 10 min a 4 °C; dopodiché la soluzione può essere conservata a 4 °C, al riparo dalla luce per alcuni mesi (17). Per controllare il buono stato della coltura cellulare, le cellule morte non devono mai superare il 4-5% dell'intera popolazione; per valutare lo stato della coltura, la 7-ADD va aggiunta a una sospensione cellulare di 1x10⁶/mL alla concentrazione finale di 20 µg/mL e incubata per 20-30 min a 4 °C.

Colorante Hoechst 33342

I coloranti Hoechst (33258, 33342, 34580) sono in grado di legarsi agli acidi nucleici; in particolare, presentano elevata affinità per le basi A-T e possono avere molteplici applicazioni, come "sorting" di cromosomi, valutazione del DNA in campioni di RNA e valutazione della vitalità cellulare in colture cellulari.

Dei vari coloranti Hoechst quello più usato per l'analisi della vitalità cellulare è l'Hoechst 33342; in particolare, viene utilizzato per fare un'analisi del ciclo cellulare in cellule non fissate. L'Hoechst 33342 viene considerato

un colorante vitale che entra nella cellula con modalità tempo e concentrazione dipendenti. La concentrazione ottimale e il tempo di incubazione sono relativi al tipo cellulare, per cui viene consigliato a ogni laboratorio di mettere a punto un proprio protocollo. In generale, la concentrazione del colorante può variare in un intervallo compreso tra 1 e 10 µg/mL e il tempo di incubazione varia da un minimo di 20 min ad un massimo di 90 min. Poiché l'Hoechst 33342 viene utilizzato su cellule non fissate è possibile usarlo in combinazione con altri coloranti come PI e 7-ADD (18).

VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

Il buono stato di una coltura cellulare non si valuta esclusivamente dalla presenza di cellule morte (apoptiche/necrotiche), ma anche valutando la capacità di proliferazione cellulare. Infatti, ogni linea cellulare presenta un proprio "doubling time". Questo è un parametro importante che la linea cellulare deve mantenere inalterato; modificazioni del "doubling time" sono indice di importanti modificazioni della linea cellulare.

Attualmente esistono diversi fluorocromi in grado di valutare la proliferazione cellulare: qui riportiamo quelli maggiormente utilizzati nei laboratori di colture cellulari.

PKH

Le PKH sono coloranti nati per lo studio del traffico cellulare. Il loro peso molecolare varia da 300 a 1000 Da; sono costituite da lunghe catene alifatiche unite a un fluorocromo e sono in grado di incorporarsi stabilmente nel doppio strato lipidico della membrana cellulare. Diversi tipi di PKH sono stati descritti in letteratura; tre di queste (PKH2, 26 e 67) sono attualmente disponibili in kit commerciali (19). Le PKH sono in grado di legarsi in maniera irreversibile alla membrana cellulare senza alterare la vitalità della cellula. Questi "probes" trovano ampia applicazione nell'ambito della biologia cellulare nello studio della proliferazione cellulare e nell'identificazione di popolazioni cellulari omogenee.

La PKH67 è un colorante che contiene una lunga coda alifatica, in grado di interpersi ai lipidi di membrana, colorando quindi la membrana plasmatica; presenta un picco di eccitazione a 490 nm e un picco di emissione a 502 nm e può essere utilizzata per studi in vitro accoppiata ad altri "probes" come il PI e la 7-ADD. La PKH67 viene utilizzata nel monitorare la proliferazione cellulare, nel valutare la frequenza di precursori cellulari (cellule staminali, cellule scarsamente differenziate), il trasferimento cellulare, l'"uptake" di esosomi e la presentazione di antigeni in un determinato "subset" cellulare (20). La colorazione con PKH, infatti, può essere accoppiata con alcuni antigeni di superficie che permettono di individuare un determinato "subset" cellulare. Le cellule colorate con la PKH67 o con la PKH26 hanno la capacità di trattenere questa colorazione per diverso tempo e di trasmetterla alle cellule "figlie", permettendo così di valutare la capacità proliferativa di una popolazione cellulare.

Questo diventa estremamente importante in una coltura, in quanto valutare il "doubling time" della coltura significa valutare il buono stato della coltura stessa. Poiché la PKH67 risulta meno stabile della PKH26 è consigliabile utilizzare la prima per studi in vitro di breve e medio termine, mentre la PKH26 può essere utilizzata anche per studi in vitro a lungo termine.

La colorazione delle cellule avviene in quanto le PKH, essendo coloranti altamente lipofili, si intercalano nella membrana cellulare; è necessario quindi, al fine di ottenere una buona colorazione, che ci sia un giusto rapporto stechiometrico tra quantità di colorante e numero di cellule; quantità elevate di colorante possono portare a una perdita dell'integrità della membrana cellulare e ad una conseguente morte.

Le PKH vengono attualmente utilizzate per marcare cellule staminali, linfociti, monociti, cellule endoteliali; è possibile colorare anche piastrine e liposomi utilizzando però una tecnica di marcatura diversa rispetto a quella utilizzata per le cellule sopracitate. Come detto in precedenza, per la PKH2, 26 e 67 esistono kit commerciali in cui le PKH sono utilizzate alla concentrazione di 10^{-3} mol; il kit fornisce anche un diluente col quale effettuare le ulteriori diluizioni dei "probes".

Protocollo di colorazione con PKH

Le cellule adese vengono trattate con tripsina al fine di ottenere una sospensione cellulare omogenea (questo step non è richiesto per cellule che crescono in sospensione). Una volta ottenuta una buona sospensione cellulare, le cellule vengono risospese in apposito diluente alla concentrazione finale di 5×10^6 /mL e a questa sospensione cellulare viene aggiunta la PKH, che deve essere preparata fresca, immediatamente prima dell'utilizzo, alla concentrazione di 5×10^{-6} mol.

Le cellule vengono incubate per 2-3 min al buio, dopodiché la colorazione viene bloccata con una eguale quantità di siero fetale e, successivamente, con una quantità di terreno di coltura pari a quella che è presente nella provetta fino a quel momento della procedura di colorazione. Le cellule vengono lavate per tre volte in terreno di coltura o in PBS.

La colorazione con PKH può essere effettuata anche in tessuti che poi vengono inclusi in paraffina; in questo caso bisogna tenere presente che i vari passaggi in solventi organici possono inficiare l'efficienza della colorazione con PKH. È consigliabile quindi utilizzare criosezioni ottenute con il seguente protocollo: prelevare il tessuto e procedere immediatamente al congelamento; tenere il tessuto a -70 °C per 24 ore prima di procedere alle sezioni; allestire il vetrino, montare con il vetrino coprioggetto ed esaminare al microscopio a fluorescenza.

Estere succinilmidilico del diacetato di carbosifluorescina (CFDA-SE)

Fra i fluorocromi, il CFDA-SE emerge come il più versatile colorante per la marcatura di cellule per studi di

proliferazione e migrazione cellulare in vivo ed in vitro a lungo termine. È stato più volte dimostrato che tale colorante, il quale è permeabile alle membrane e lega covalentemente gruppi amminici liberi di proteine citoplasmatiche, marca efficacemente vari tipi cellulari (21).

Il CFDA-SE è caratterizzato da una struttura lipofila che gli consente di diffondere passivamente all'interno della cellula. Questa molecola non emette fluorescenza finché non viene trasportata all'interno della cellula, dove saranno le esterasi intracellulari a rimuovere i gruppi acetili, lasciando il "carboxyfluorescein succinimidyl ester" (CFSE) fluorescente che lega covalentemente gli amminogruppi di macromolecole intracellulari e viene così trattenuto all'interno della cellula stessa.

Il CFSE persiste all'interno della cellula permettendo un'analisi a lungo termine delle cellule marcate e delle divisioni delle cellule prese in esame (22). Tuttavia, durante le prime ore dopo la colorazione c'è un declino del 50% nell'intensità della fluorescenza. La ragione più probabile per tale comportamento è la rapida degradazione di una frazione dei coniugati proteina-CFSE, questo perché parte delle proteine coniugate al fluorocromo hanno un "turnover" rapido, mentre altre persistono per un periodo prolungato; è anche possibile che il colorante che non è associato a macromolecole intracellulari possa uscire dalla cellula durante le prime ore di incubazione, con un calo della fluorescenza che si stabilizza dopo circa 4 ore. Inoltre, il CFSE può potenzialmente reagire all'interno della cellula con un'ampia gamma di molecole contenenti gruppi amminici ed alcuni coniugati possono ancora essere in grado di oltrepassare la membrana plasmatica. In questo modo, parte del CFSE inizialmente internalizzato dalla cellula è perso durante le prime ore dopo la marcatura. Tuttavia, rimangono all'interno della cellula quantità sufficienti di coniugati a lunga vita tali da permettere un'analisi soddisfacente.

L'efficienza di marcatura del CFDA-SE è differente secondo il tipo cellulare, probabilmente a causa delle diverse caratteristiche di ogni tipo cellulare e, soprattutto, della diversa espressione delle esterasi interessate al taglio proteolitico della molecola. Il marcatore non processato può fuoriuscire dalla cellula; perciò, il grado di espressione delle esterasi e la risultante efficienza di processazione del marcatore possono determinare l'efficienza di marcatura della cellula.

Tramite l'analisi citofluorimetrica si possono seguire fino a 8-10 divisioni cellulari. Il CFDA-SE può essere utilizzato sia in vitro che in vivo: le cellule possono essere marcate con questo colorante e lasciate crescere in coltura oppure possono essere rimosse dalla cavia, colorate con CFSE, ed inserite nell'animale donatore. Durante la divisione cellulare, ogni cellula figlia eredita una quantità di CFSE che corrisponde esattamente alla metà di quella presente nella cellula madre, quindi la sua fluorescenza ("green") sarà la metà rispetto a quella della cellula da cui deriva. Ad ogni successiva divisione, il livello di fluorescenza dimezzerà ("two fold reduction"), permettendo così di monitorare, tramite l'analisi citofluorimetrica, il numero di divisioni cellulari.

La colorazione con CFDA-SE presenta numerosi

vantaggi; in particolare, non si utilizzano sostanze radioattive, permette di studiare i livelli di proliferazione in specifiche popolazioni cellulari e permette di determinare contemporaneamente l'espressione di altri marcatori (di attivazione, di funzionalità, apoptotici, ecc.).

Protocollo di colorazione con CFDA-SE

Diluire il CFDA-SE in dimetilsulfossido (DMSO) a concentrazione 5 mM e sospendere le cellule in PBS alla concentrazione finale di 1×10^6 cellule/mL. Aggiungere un volume di colorante pari a quello della sospensione cellulare ed incubare per 10 min a 37 °C. Bloccare la reazione con siero fetale, mantenendo un rapporto 1:1 sospensione cellulare: siero fetale ed incubare per 5 min. Centrifugare le cellule ed eseguire almeno tre lavaggi in terreno di coltura (RPMI) al fine di allontanare il colorante in eccesso. Seminare le cellule e analizzare il campione al citofluorimetro.

Bromodeossiuridina

Per la valutazione della proliferazione cellulare si può anche utilizzare la metodica della bromodeossiuridina (BrdUrd). La BrdUrd non è un "probe", ma un nucleoside analogo alla timidina. Essa viene incorporata dalle cellule sintetizzanti DNA (cellule in fase S) ed in seguito viene evidenziata mediante uno specifico anticorpo monoclonale coniugato ad un fluorocromo (23).

L'incorporazione di BrdUrd ed il contenuto totale di DNA (per mezzo di un colorante, come il PI o il bromuro di etidio, che intercala le sue basi) possono essere valutati simultaneamente in modo quantitativo tramite la citometria a flusso e visualizzati in microscopia a fluorescenza. Per consentire una determinazione simultanea dell'incorporazione di BrdUrd e del contenuto totale di DNA, l'acido nucleico deve essere parzialmente denaturato in modo da favorire l'esposizione della BrdUrd incorporata all'anticorpo monoclonale (Figura 4). Il processo di denaturazione del DNA è praticamente il risultato di un compromesso, in quanto se da una parte una sufficiente quantità di DNA deve essere denaturata in modo tale che la maggior quota possibile di BrdUrd incorporata venga esposta all'anticorpo monoclonale, dall'altra una sufficiente quantità di DNA deve rimanere nella doppia elica in modo tale da poter essere intercalata dal PI.

L'utilizzo di anticorpi anti-BrdUrd permette di valutare in maniera precisa e dettagliata importanti parametri cinetici, quali i tempi delle varie fasi del ciclo. Questo è possibile trattando le cellule in coltura con BrdUrd per 15 min a 37 °C ("pulse labelling") e poi rimuovendo la BrdUrd dal terreno di coltura. In questo modo le cellule in fase S risulteranno BrdUrd positive, trovandosi tra due popolazioni che non hanno incorporato BrdUrd rappresentate da cellule in fase G0+G1 e G2+M (Figura 4). Con il trascorrere del tempo la popolazione S migrerà progressivamente verso la fase G2+M, fino alla comparsa di una popolazione G1 BrdUrd-positiva (G1 post-mitotiche ovvero cellule che avevano incorporato BrdUrd al tempo t0 e che sono passate attraverso la mitosi dividendo

dosi in due cellule figlie). In seguito, esse potranno iniziare un nuovo ciclo rientrando in fase S, sempre conservando una quota di BrdUrd incorporata al tempo t0. Valutando l'andamento delle sottopopolazioni di BrdUrd positive citate si possono ricavare i tempi delle varie fasi.

Protocollo della marcatura con anti-BrdUrd

Occorre aggiungere al campione di cellule in coltura una dose di BrdUrd alla concentrazione di 100 mM in soluzione fisiologica. Tale somministrazione deve avvenire 6-10 ore prima della raccolta e processazione delle cellule. Il campione deve essere immediatamente fissato in etanolo 70% in PBS. La procedura prosegue mediante denaturazione e riconoscimento antigenico della BrdUrd.

- 1) Centrifugare le cellule fissate e risospenderle in 1,5 mL di RNAasi (1 mg/mL in PBS) per 20 min a 37 °C.
- 2) Centrifugare, eliminare il sovrantante e risospendere in 1 mL di HCl 0,1 mol per 10 min a 0 °C (parziale estrazione degli istoni).
- 3) Aggiungere 5 mL di acqua distillata e centrifugare.
- 4) Risospendere le cellule in acqua distillata e scaldare a 90 °C: dopo 20 min immergere le provette in ghiaccio per 5 min.
- 5) Aggiungere PBS contenente 0,5% Tween 20 e centrifugare.
- 6) Risospendere le cellule in 300 µL di soluzione anti-BrdUrd (PBS + 0,5% Tween 20, 0,5% BSA + 1% anti-mouse IgG coniugato con isotiocianato di fluorescina).
- 7) Dopo 20 min a temperatura ambiente aggiungere PBS + 0,5% Tween 20 e centrifugare.
- 8) Risospendere le cellule in 1 mL di PBS contenente 0,5 µg/mL di PI.
- 9) Filtrare la sospensione attraverso filtri da 50 µm.

La fluorescenza rossa è associata al contenuto di DNA (PI intercalato), mentre la fluorescenza verde è dovuta all'isotiocianato di fluoresceina coniugato all'anticorpo anti-BrdUrd.

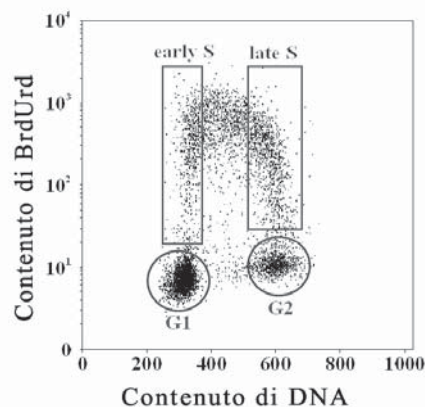


Figura 4
Analisi biparametrica al citofluorimetro del contenuto totale di DNA e dell'incorporazione della bromodeossiuridina (BrdUrd).

BIBLIOGRAFIA

1. Jaattela M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 2004; 23:2746-56.
2. Wyllie AH. The biology of cell death in tumours. *Anticancer Res* 1985;5:131-6.
3. Darzynkiewicz Z, Traganos F. Measurement of apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1998;62:33-73.
4. Favrot M, Coll JL, Louis N, et al. Cell death and cancer: replacement of apoptotic genes and inactivation of death suppressor genes in therapy. *Gene Ther* 1998;5:728-39.
5. Singhal PC, Sharma P, Kapasi AA, et al. Morphine enhances macrophages apoptosis. *J Immunol* 1998; 160:1886-93.
6. Luchetti F, Canonico B, Curci R, et al. Melatonin prevents apoptosis induced by UV-B treatment in U937 cell line. *J Pineal Res* 2006;40:158-67.
7. Luchetti F, Canonico B, Mannello F, et al. Melatonin reduces early changes in intramitochondrial cardiolipin during apoptosis in U937 cell line. *Toxicol In Vitro* 2007;21:293-301.
8. Zamai L, Canonico B, Luchetti F, et al. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis on adherent cells. *Cytometry* 2001;44:57-64.
9. Bharti AC, Takada Y, Shishodia S, et al. Evidence that receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand can suppress cell proliferation and induce apoptosis through activation of a NF-kappaB-independent and TRAF6-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2004;279:6065-76.
10. De Clerck LS, Bridts CH, Mertens AM, et al. Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *J Immunol Methods* 1994; 172:115-24.
11. Luchetti F, Betti M, Canonico B, et al. ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free Radic Biol Med* 2009; 46:339-51.
12. Traganos F, Darzynkiewicz Z, Sharpless T. Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. *J Histochem Cytochem* 1977;25:46-56.
13. Frey T. Nucleic acid dyes for detection of apoptosis in live cells. *Cytometry* 1995;21:265-74.
14. Tanious FA, Veal JM, Buczak H, et al. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 1992;31:3103-12.
15. Graves DE, Wadkins RM. 7-azidoactinomycin D: a novel probe for examining actinomycin D-DNA interactions. *The J Biol Chem* 1989;264:7262-6.
16. Swat W, Ignatowicz L, Boehmer B, et al. Clonal deletion of immature CD4+ CD8+ thymocytes in suspension culture by extrathymic antigen-presenting cells. *Nature* 1991; 351:150-3.
17. Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, et al. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Meth* 1994;170:145-57.
18. Schmid I, Sakamoto KM. Analysis of DNA content and green fluorescent protein expression. *Current Protocols in Cytometry* 2001;1:7-16.
19. Rousselle C, Barbier M, Comte V, et al. Innocuousness and intracellular distribution of PKH67: a fluorescent probe for cell proliferation assessment. *In Vitro Cell Dev Biol Animal* 2001;37:646-55.
20. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 2004;104:3257-66.
21. Weijer K, Uittenbogaart CH, Voordouw A, et al. Intrathymic and extrathymic development of human plasmacytoid dendritic cell precursors in vivo. *Blood* 2002;99:2752-9.
22. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* 2000;243:147-54.
23. Latt SA. Fluorometric detection of deoxyribonucleic acid synthesis; possibilities for interfacing bromodeoxyuridine dye techniques with flow fluorometry. *J Histochem Cytochem* 1977;25:913-2.