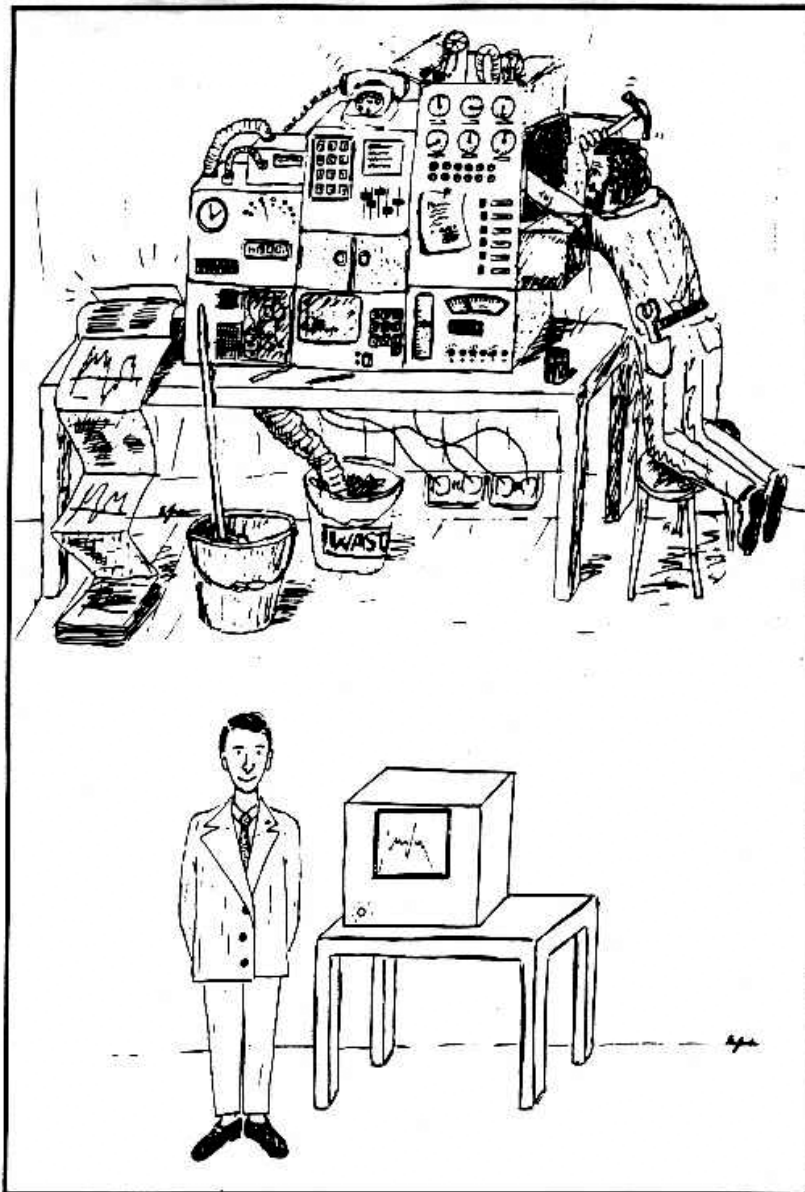


Κυτταρομετρία ροής

[Flow Cytometry]

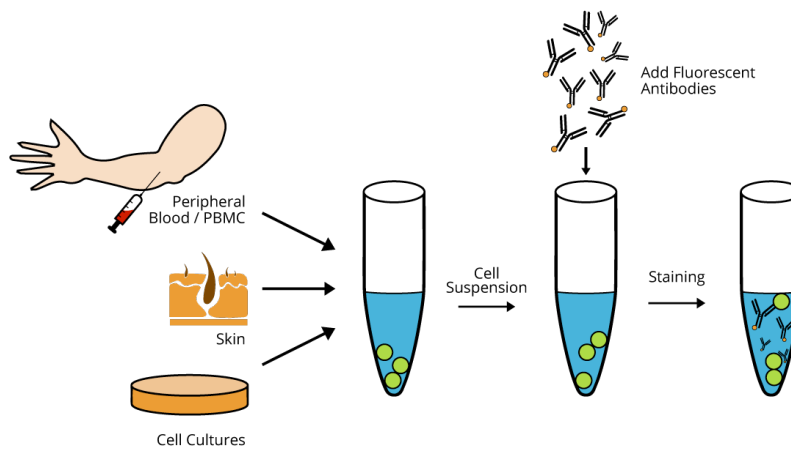


Two opposing fantasies of what flow cytometry is all about. Drawings by Ben Givan

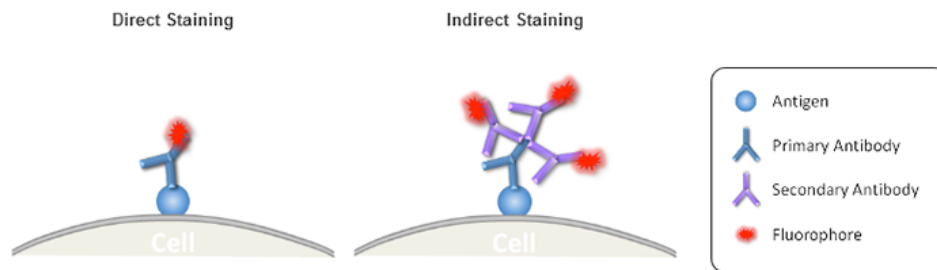
ΘΕΩΡΙΑ

Χρώση λεμφοκυττάρων [staining] με αντισώματα

Αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές, μπορούν να δένουν σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες στις κυτταρικές μεμβράνες ή στο εσωτερικό των κυττάρων. Η χρώση με αντισώματα γίνεται μέσα σε ιστονικό διάλυμα.



Η χρώση μπορεί να γίνεται είτε απευθείας, είτε μέσω ενός δεύτερου αντισώματος, το οποίο είναι συζευγμένο με φθοροχρώματα.



Κυτταρομετρία ροής

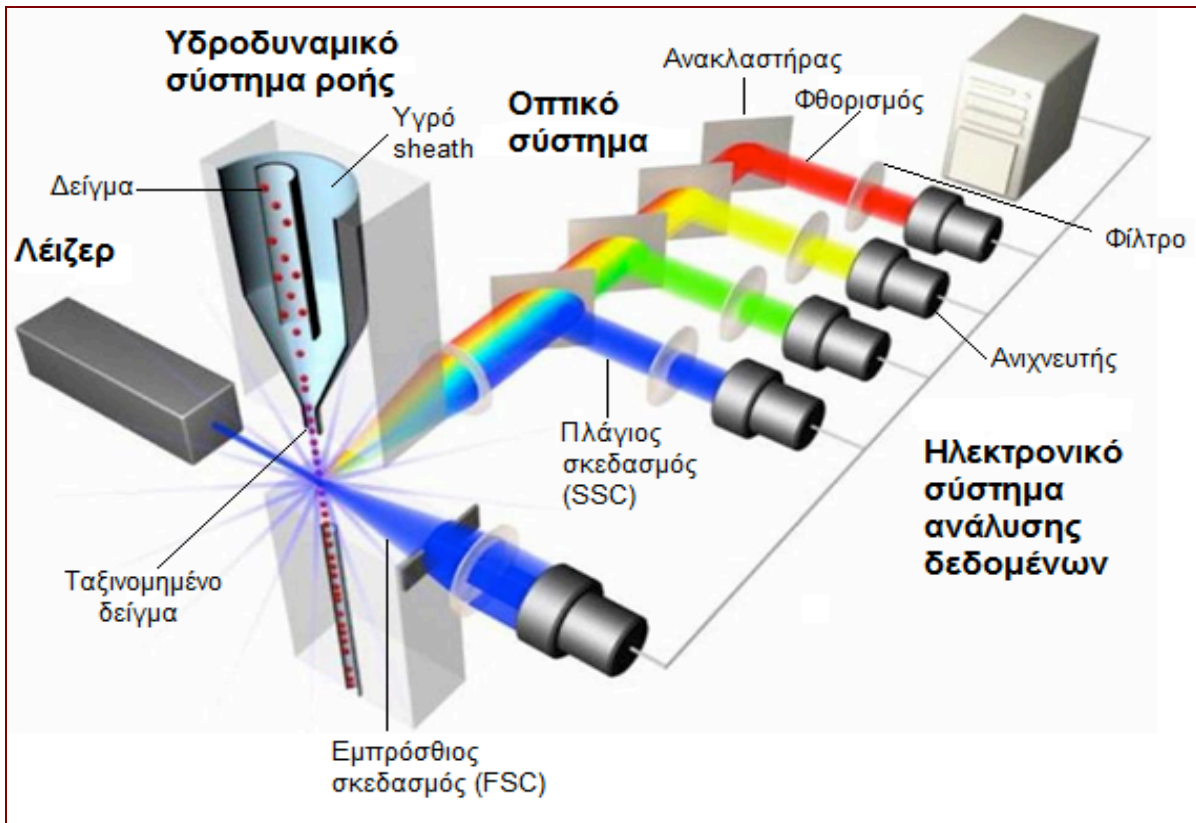
Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνολογία η οποία ταυτόχρονα μετρά και στη συνέχεια αναλύει πολλαπλά φυσικά χαρακτηριστικά μεμονωμένων σωματιδίων [π.χ. κυττάρων] καθώς αυτά ρέουν σε ένα υγρό ρεύμα μέσα από μια δέσμη φωτός. Οι ιδιότητες οι οποίες μετρώνται περιλαμβάνουν το σχετικό μέγεθος ενός σωματιδίου, τη σχετική κοκκίωση ή εσωτερική πολυπλοκότητα, και τη σχετική ένταση φθορισμού. Αυτά τα χαρακτηριστικά προσδιορίζονται με τη χρήση ενός συστήματος ζεύξης οπτικής-ηλεκτρονικής, το οποίο καταγράφει πως το κύτταρο ή το σωματίδιο σκεδάζει το προσπίπτον φως laser.

Κυτταρομετρητής ροής [Flow cytometer]

Ένας κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρία κύρια συστήματα, το υδροδυναμικό, το οπτικό και το ηλεκτρονικό.

- Το **υδροδυναμικό σύστημα** ροής μεταφέρει τα σωματίδια σε ένα ρεύμα στη δέσμη του λέιζερ [interrogation].
- Το **οπτικό σύστημα** αποτελείται από λέιζερ για το φωτισμό των σωματιδίων στο ρεύμα του δείγματος και οπτικά φίλτρα για να κατευθύνουν τα προκύπτοντα φωτεινά σήματα [σκεδαζόμενα] στους κατάλληλους ανιχνευτές.

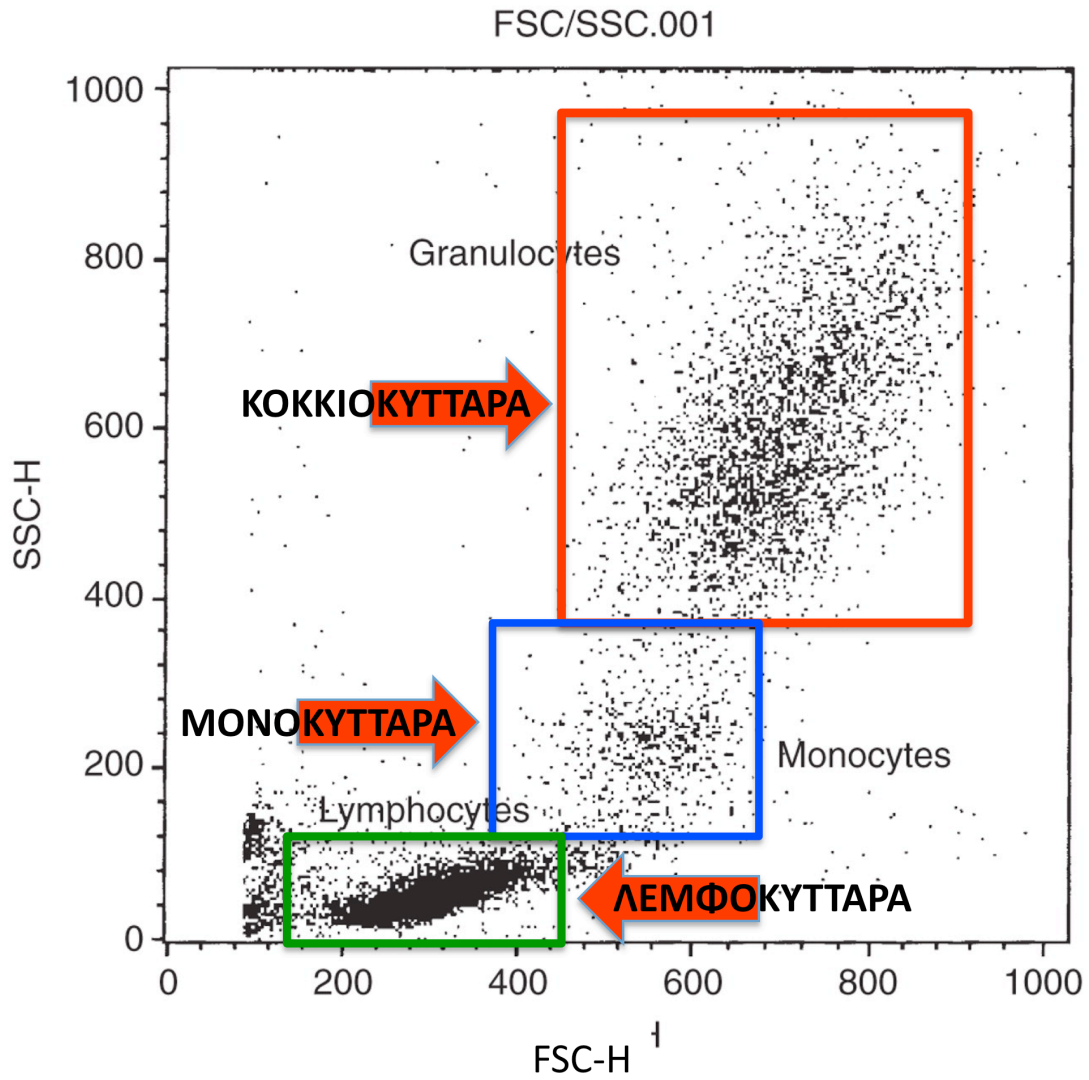
- Το ηλεκτρονικό σύστημα μετατρέπει τα σήματα φωτός που έχουν ανιχνευτεί σε ηλεκτρονικά σήματα και μπορούν να επεξεργαστούν από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.



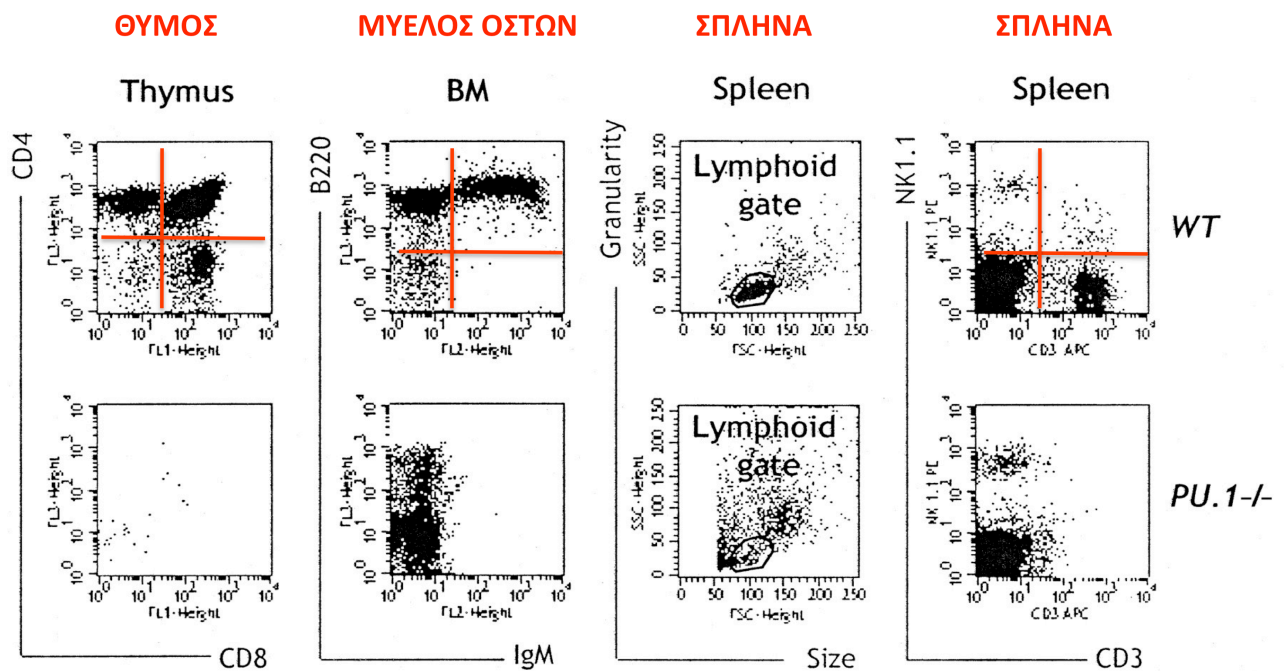
Οι φυσικές ιδιότητες όπως είναι το μέγεθος το οποίο αντιπροσωπεύεται από την εμπρόσθια σκέδαση του φωτός [**Forward Light Scatter, FSC**] και η εσωτερική πολυπλοκότητα [για παράδειγμα, σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης] που αντιπροσωπεύεται από την πλάγια σκέδαση [**Side Light Scatter, SSC**], μπορούν να καθορίσουν συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς.

Όταν σημασμένα με αντισώματα κύτταρα περνούν από μία πηγή φωτός, τα φθορίζοντα μόρια διεγείρονται και μεταβαίνουν σε μία υψηλότερη ενεργειακά κατάσταση. Με την επιστροφή τους στις καταστάσεις ηρεμίας τους, τα φθοροχρώματα εκπέμπουν φωτεινή ενέργεια σε υψηλότερα μήκη κύματος. Η χρήση πολλαπλών φθοροχρωμάτων, καθένα με παρόμοια μήκη κύματος διέγερσης και διαφορετικά μήκη κύματος εκπομπής [ή «χρώματα»], επιτρέπει να μετρηθούν ταυτόχρονα αρκετές κυτταρικές ιδιότητες. Μέσα σε έναν κυτταρομετρητή ροής, τα κύτταρα σε εναιώρημα οδηγούνται μέσα σε ένα ρεύμα, δημιουργούμενο από έναν περιβάλλοντα μανδύα ισοτονικού υγρού [υγρό sheath], το οποίο δημιουργεί γραμμική ροή επιτρέποντας στα κύτταρα να περνούν μεμονωμένα μέσω ενός σημείου [interrogation point]. Σε αυτό το σημείο, μία δέσμη μονοχρωματικού φωτός, συνήθως από ένα laser, διατέμνει τα κύτταρα. Το εκπεμπόμενο φως εκπέμπεται προς όλες τις κατευθύνσεις και συλλέγεται μέσω των οπτικών συστημάτων τα οποία κατευθύνουν το φως σε μια σειρά φίλτρων και διχρωικών καθρεπτών, τα οποία απομονώνουν συγκεκριμένου μήκους κύματος μπάντες. Τα φωτεινά σήματα ανιχνεύονται από λυχνίες φωτοπολλαπλασιασμού και ψηφιοποιούνται για ανάλυση στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η προκύπτουσα πληροφορία συνήθως

παρουσιάζεται σε ιστόγραμμα ή σε μορφή δισδιάστατου διαγράμματος σημείων [dot-plot].



ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ DOT PLOTS



WT: Wild type (κανονικό ποντίκι, αγρίου τύπου)

PU.1^{-/-}: Knock-out ποντίκι που δεν εκφράζει το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα PU.1

CD4: γλυκοπρωτεΐνη, συνυποδοχέας του TCR που εκφράζεται κυρίως στα βοηθητικά T κύτταρα

CD8: διαμεμβρανική πρωτεΐνη, συνυποδοχέας του TCR, που εκφράζεται κυρίως στα κυτταροτοξικά T κύτταρα

B220: πρωτεΐνη που εκφράζεται σε όλα τα B κύτταρα στο ποντίκι

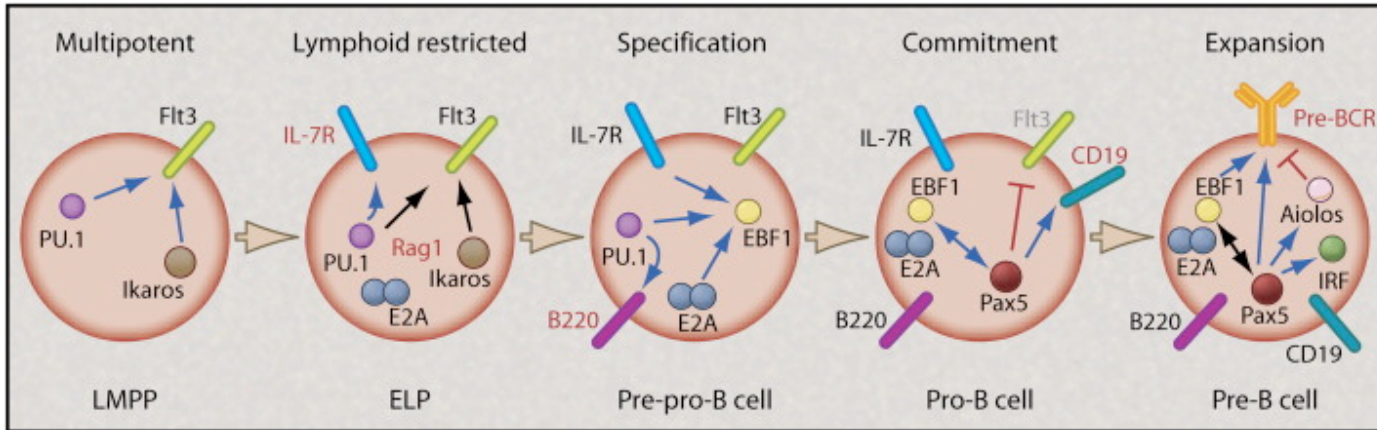
IgM: το μεγαλύτερο φυσικό αντίσωμα, που εμφανίζεται πρώτο ως απάντηση στην αρχική έκθεση στο αντιγόνο

NK1.1: τύπου II μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται κυρίως σε NK και NK-T κύτταρα

CD3: συνυποδοχέας του TCR, εκφράζεται σε T και NK-T κύτταρα.

ΠΑΡΑΔΟΤΕΑ

1. Σχεδιάστε ένα dot plot που να δείχνει την έκφραση των πρωτεϊνών B220 και IL-7R σε λεμφοκύτταρα και υποδείξτε σε ποιο τεταρτημόριο [quadrant] του dot plot βρίσκονται τα pro-B και pre-B κύτταρα σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα που δείχνει την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών.



2. Βασισμένοι στο ίδιο σχήμα, πως θα ταυτοποιούσατε τα LMPP και ELP κύτταρα.

3. Στα παρακάτω dot plots υποδείξτε τι πληθυσμούς κυττάρων έχουμε σε κάθε τεταρτημόριο.

