



Fast and fluo: high processing flow cytometry techniques for green biotech, the environment and the food chain

Salone dei Convegni ENEA Sede Lungotevere Thaon di Revel, 76 Roma

15 aprile 2019



L'analisi a flusso di microparticelle: mission impossible (o...quasi)

Andrea Fattorossi, Lab. Immunologia e Citometria, Polo Scienze della Salute della Donna e del Bambino, Fondazione Policlinico Gemelli- IRCCS Roma

Abstract

Andrea Fattorossi

La citometria a flusso viene sempre più utilizzata in vari ambiti di ricerca per lo studio di particelle biologiche di dimensioni nanometriche. Nel settore della biomedicina le particelle più studiate sono di dimensioni variabili tra i 50 nm e i 1000 nm, molto sommariamente e genericamente definite rispettivamente esosomi (50-100 nm) e microvescicole (>100 nm).

Purtroppo la citometria delle microparticelle, e soprattutto la loro fenotipizzazione per scarsità degli epitopi di superficie, non è di facile esecuzione ed è di ancor più difficile interpretazione proprio per le ridotte dimensioni che generano segnali di scatter e di fluorescenza al limite (in realtà ben al di sotto del limite) delle possibilità analitiche dello strumento.

I principali problemi sono rappresentati dall'eccesso di coincidenze (swarming) che, interpretati erroneamente come particelle singole inducono a conclusioni non corrette.

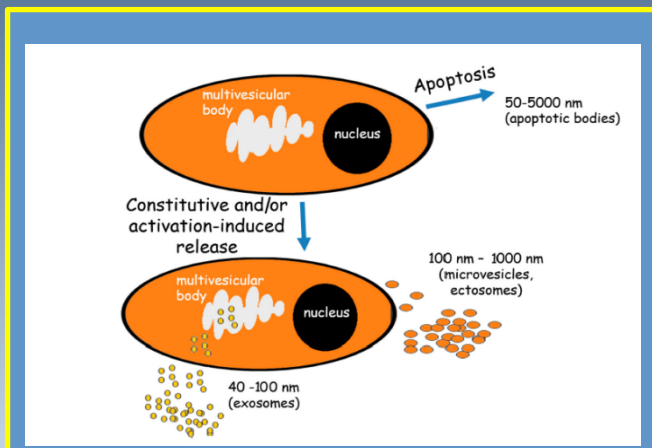
Sono stati prodotti citometri ottimizzati per la misura delle microparticelle che in parte risolvono i problemi di sensibilità, ma le problematiche insite nella debolezza dei segnali ottenibili sono lontane dall'essere superate completamente.



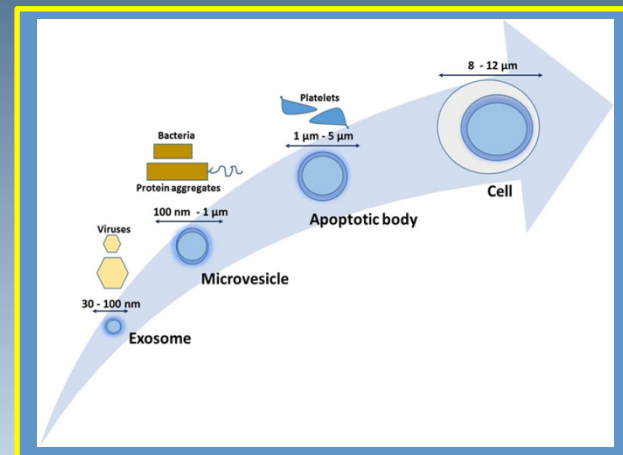
Vescicole extracellulari: definizione

Extracellular vesicles are small membrane vesicles derived from cells upon activation or apoptosis. The classification of extracellular vesicles is frequently based on their size, composition and most importantly on their process of release.

- **Exosomes (50–100 nm in diameter)** are stored in cells and are liberated by exocytosis of multivesicular bodies.
- **Microparticles (aka microvesicles) (100–1000 nm in diameter)** are produced by plasma membrane budding during cell activation*
- Apoptotic bodies (1000–5000 nm in diameter) are produced by plasma membrane budding during apoptosis



*se di derivazione tumorale chiamate anche oncosomi





Vescicole extracellulari: modalità di analisi

Technique	What Is Measured	Information Acquired
Flow cytometry	Scattered and fluorescent lights	Particles' * phenotype, absolute number and size (with limitations)
Dynamic light scattering (DLS)	Intensity of scattered light as a function of time	Particles' size typically in the submicron scale, size distribution
Nanoparticle tracking analysis (NTA)	Scattered light	Particles' size, size distribution, concentration, phenotype (with limitations)
Scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM)	Scattered electron beam	Morphology, particles' size
Atomic force microscopy (AFM)	Interaction forces between the probing tip and surface	Particles' three-dimensional (3D)topography, diameter

Azataneh R et al. Int J Mol Sciences, 2017

E inoltre (anche se meno usati): Raman spectroscopy, Resistive pulse sensing, Fluorescence correlation spectroscopy, Pulse laser activated cell sorter, X-ray microscopy, Stimulated emission depletion microscopy, and Enzyme-linked immunosorbent assays.



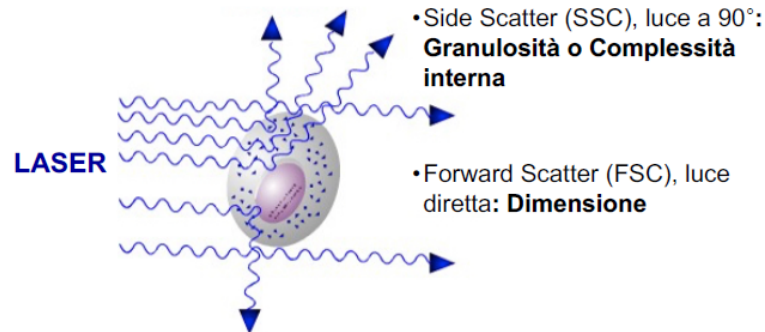
Vescicole extracellulari: analisi citometrica

Gran parte delle misure citometriche parte dalla identificazione degli eventi di interesse sulla base delle caratteristiche fisiche della particella che, come noto, generano segnali di diffusione della luce noti come forward e side scatter (FSC, SSC)

La luce diffusa rilevata sarà quella:

- diretta (**Forward Scatter**)
- ortogonale (**Side Scatter**)

L'angolo di raccolta dipende dallo strumento



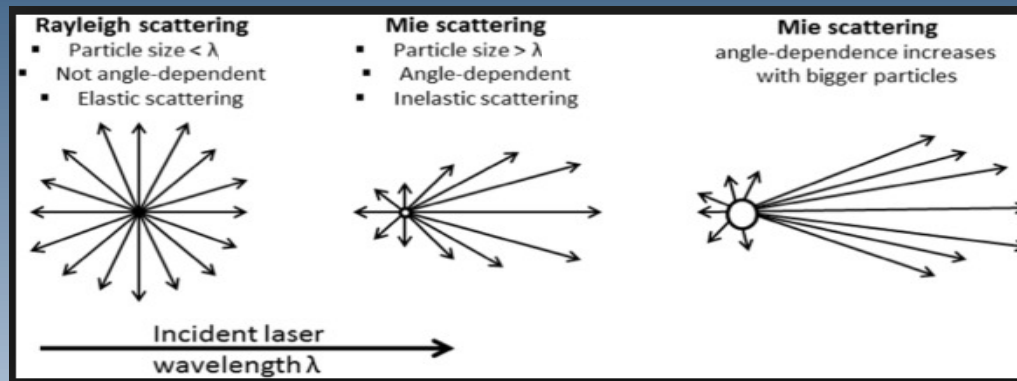


Vescicole extracellulari: FSC e SSC

Un breve riepilogo sulla generazione dei segnali di FSC e SSC

FSC e SSC dipendono (oltre naturalmente dalle dimensioni della particella) da:

- Lunghezza d'onda della sorgente luminosa*
- Angolo di raccolta
- Indice di rifrazione (IR) della particella, del fluido di trasporto e dello sheath fluid*



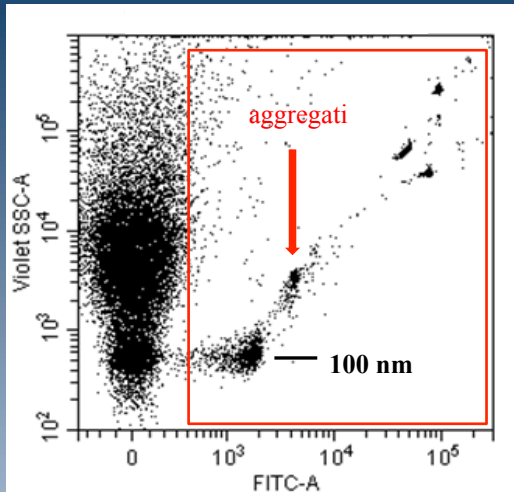
* parametri controllabili dall'utilizzatore



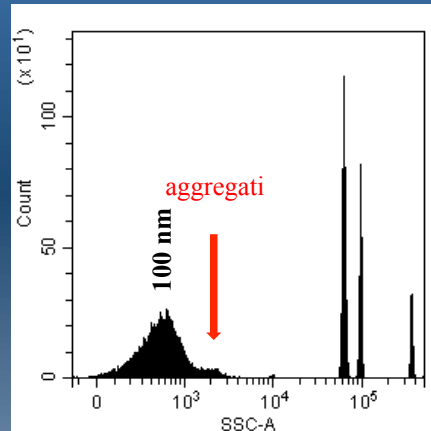
Microbiglie: SSC a 488 (e FSC) e 405 nm

Lunghezza d'onda della sorgente luminosa: tanto più è piccola rispetto alla particella (nanometrica) tanto più precisa è la misura. SSC del laser viola (405) meglio del SSC del laser blu (488).

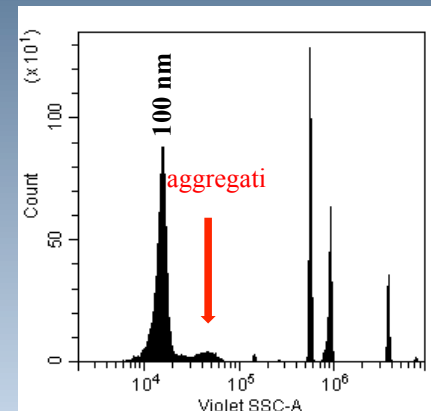
Megamix-Plus: 100, 300, 500, 900 nm



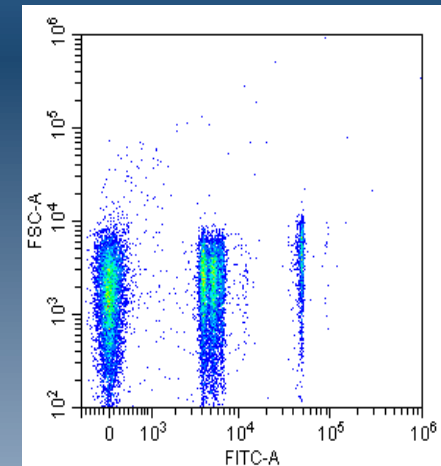
SSC: 488 nm (blue)



SSC: 405 nm (violet)



FSC: 488 nm

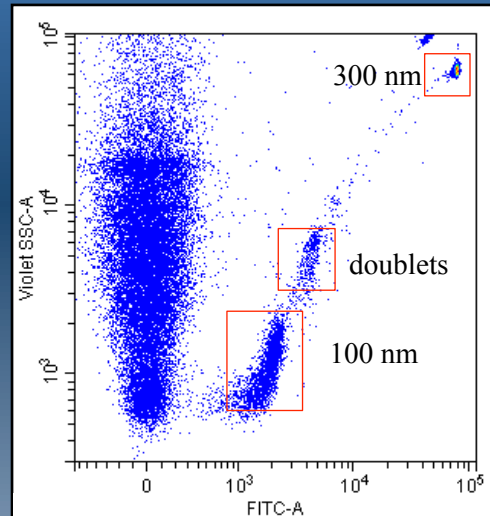


I dati citometrici mostrati in questa presentazione sono stati generati utilizzando un citometro CytoFLEX S, Beckman Coulter



La soglia di acquisizione: da dove inizio a raccogliere gli eventi?

Biglie di calibrazione e indice di rifrazione (IR)



Ogni tipo di materiale è associato ad un IR. Poiché l' IR di una biglia di polistirolo in acqua/PBS (tipicamente 1.59) è molto diverso da quello di una particella biologica (tipicamente ca. 1.4) una biglia «scattererà» ca. 20 volte più luce di una particella biologica di pari dimensioni. Ne consegue che, p.es. una biglia di 400 nm equivarrà ai ca. 1000 (!) nm di una particella biologica.



Identificazione tramite fluorescenza con un colorante generale: Calcein-AM

Esosomi

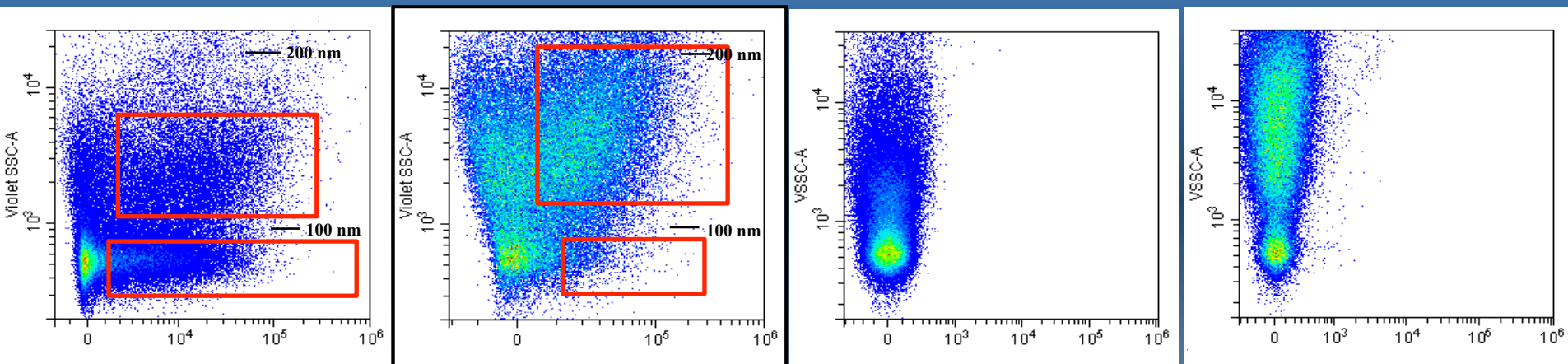
Microvescicole

Microvescicole*

TRITON X-100

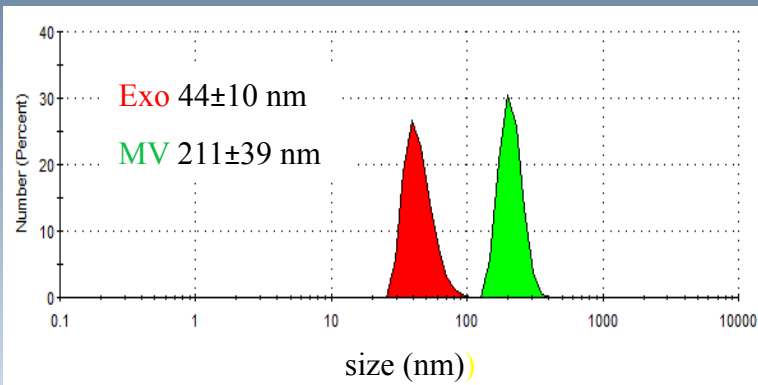
37°C

4°C



Calcein-AM

DLS



- La calceina identifica le vescicole extracellulari intatte poiché solo in queste può avvenire la trasformazione della forma non fluorescente in quella fluorescente mediata dalle esterasi
- Sono evidenti, a parità di dimensioni, le differenze tra biglia e particelle biologiche nelle proprietà di scatter della luce.

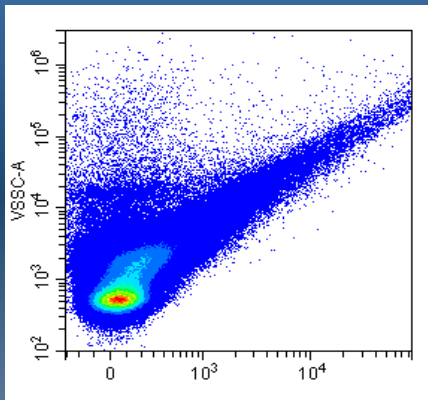
*I risultati sono identici quando si analizzano gli esosomi



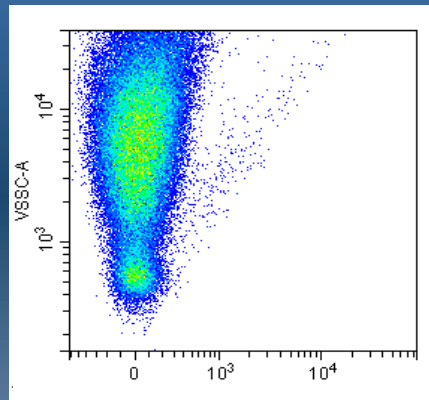
Identificazione tramite fluorescenza con un colorante generale: CellTrace Violet

Esosomi

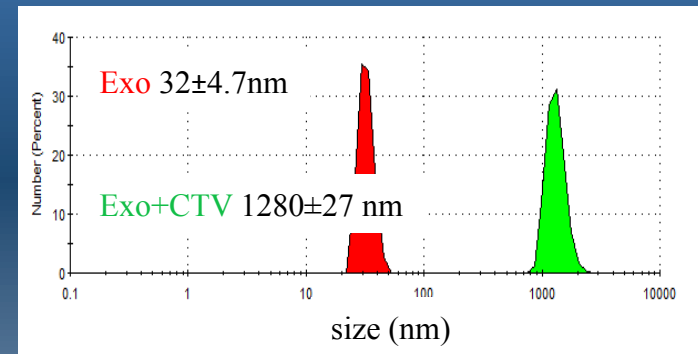
CellTrace Violet



CellTrace Violet+triton



DLS



CellTrace Violet



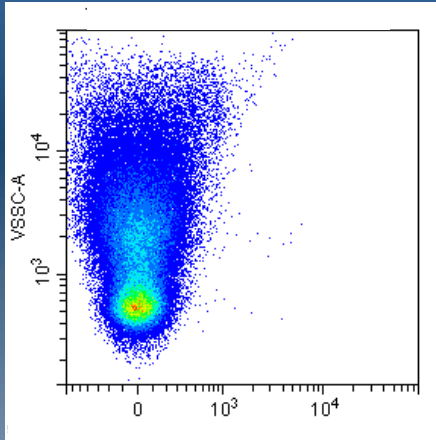
Il CellTrace Violet non identifica selettivamente le vescicole extracellulari intatte poiché non richiede trasformazione da parte delle esterasi per diventare fluorescente, ma si lega alle amine sia intra che extracellulari (frammenti, contaminanti ecc).

Legandosi alle amine extracellulari genera aggregati.

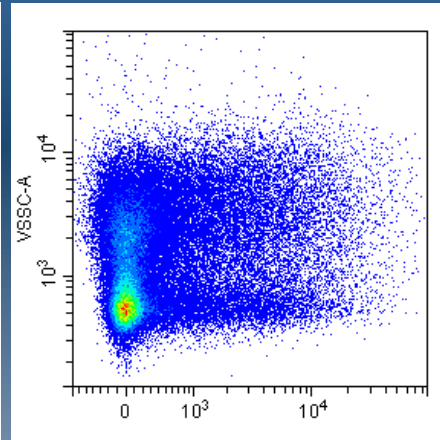


Sembra tutto semplice

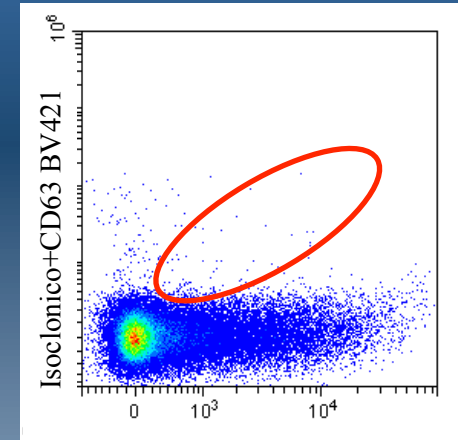
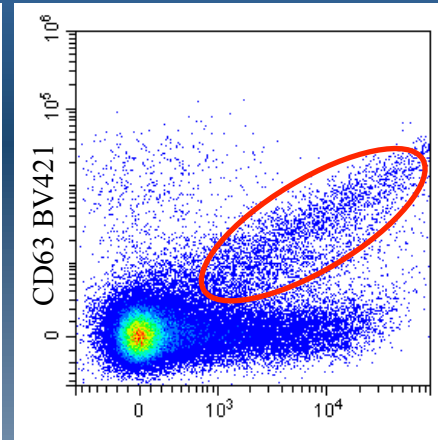
Esosomi



FITC-none



Calceina

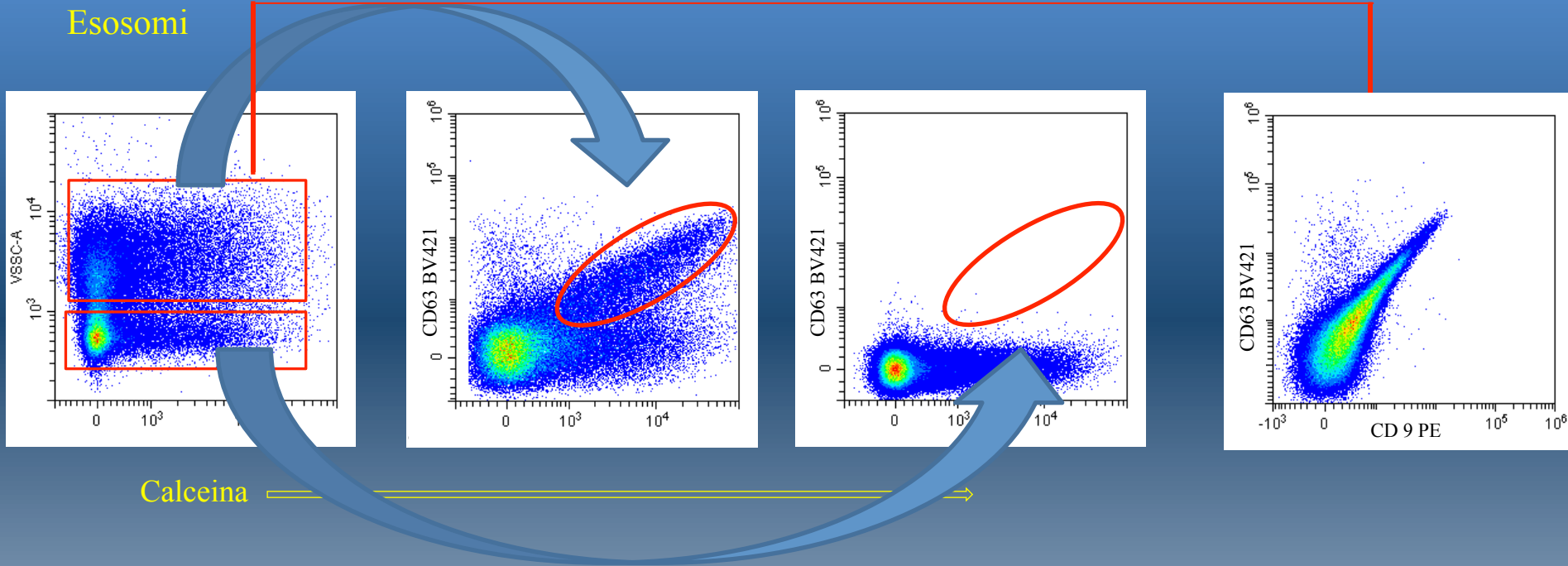


Incidentalmente: validità del controllo isoclonico anche per le vescicole extracellulari



Varie perplessità (2)

Esosomi



La mancata espressione di CD63 (e CD9, non mostrato) sugli eventi più piccoli:

- Gli eventi più piccoli non sono esosomi (!): improbabile data l'attività esterasica
- Non ci sono sufficienti epitopi CD63 e CD9 sugli eventi più piccoli per produrre un segnale misurabile*

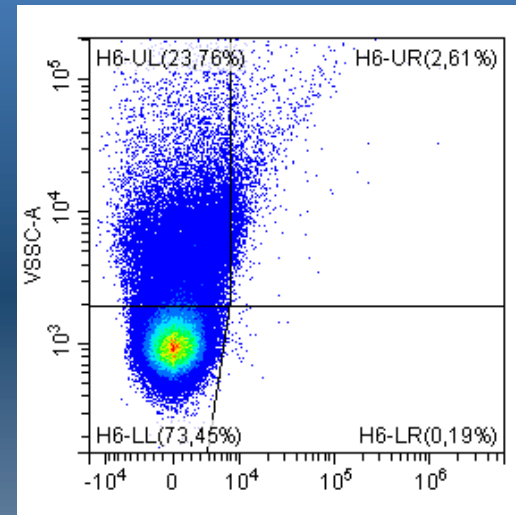
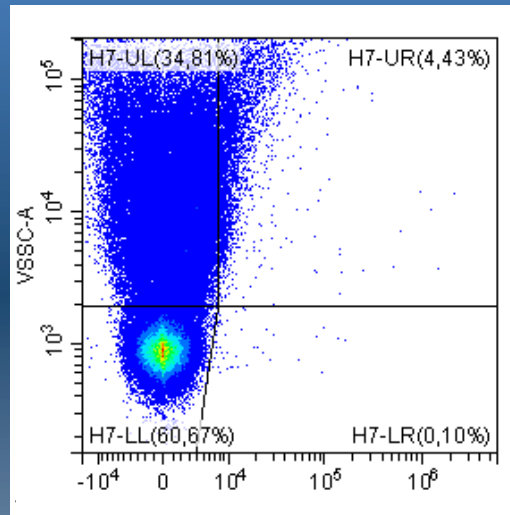
* The majority of EVs express only tens of copies of a protein due to their small diameter, unlike cells which express thousands of copies. *Welsh JA et al, Front Cell Dev Biol, 2017*



Varie perplessità (3)

PBS

Microbiglie 50 nm



FITC IgG isotipo (topo) →

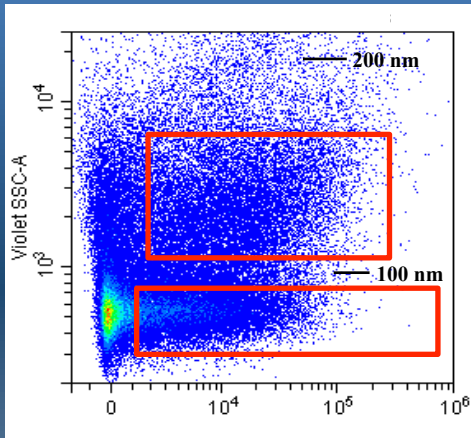
La mancata espressione di CD63 e CD9 sugli eventi più piccoli:

➤ Non ci sono sufficienti epitopi CD63 e CD9 per produrre un segnale misurabile



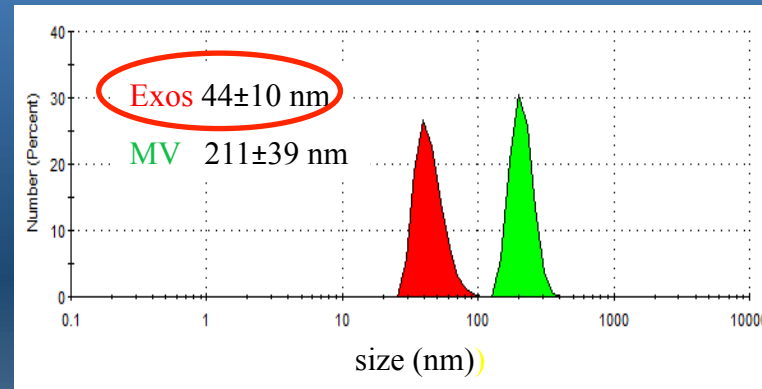
Rivalutiamo il tutto...

Esosomi



Calcein-AM

DLS



Perché osservo una popolazione di vescicole al di sopra della soglia dei 100 nm (chiaramente più grande dei ca. 50 nm degli esosomi) in un campione che non dovrebbe contenerne? Ma anche al di sotto della soglia 100 nm sono troppo grandi! (ricordiamo IR). E allora?

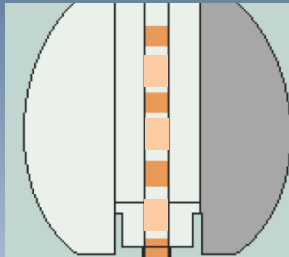


...Allora ci sono gli aggregati e soprattutto c'è lo swarming effect

- Aggregati (spontanei e/o indotti dalla manipolazione del campione, tipicamente i passaggi in ultracentrifuga). Oppure, molto più frequentemente..., uno...
- Swarming effect (eccesso di coincidenze)

Swarming effect

laser

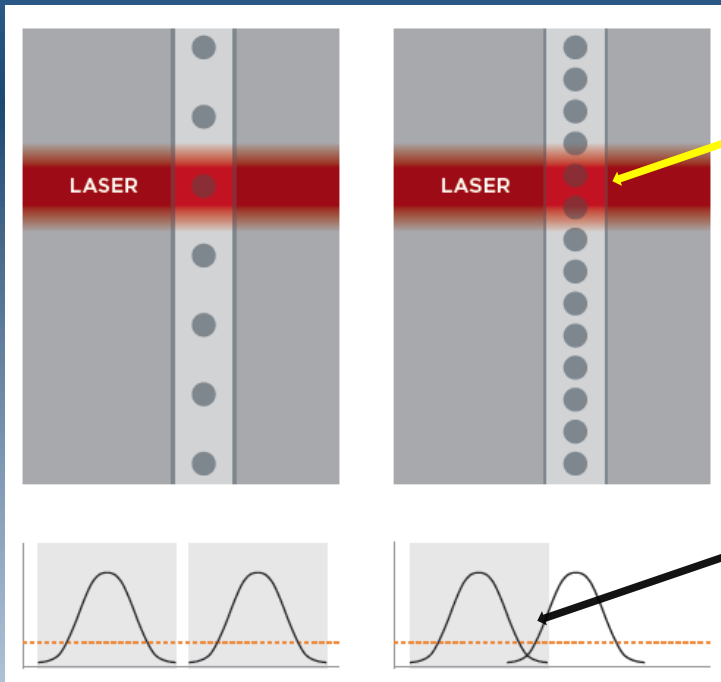


Molte vescicole extracellulari illuminate contemporaneamente dal laser saranno interpretate dalla macchina come un'unica particella abbastanza grande/fluorescente da essere visibile.



...lo swarming effect e gli aborti

Swarming effect (eccesso di coincidenze)



eventi coincidenti

zona di incertezza: il segnale è abortito

La percentuale di aborti può arrivare al 50% e non scende mai a livelli accettabili (sempre oltre 5-6%) anche diluendo il campione



Continuiamo con lo swarming effect

...soluzioni certe per lo swarming? Nessuna!

- Si legge (!) che diluendo il campione le coincidenze diminuiscano (non c'è dubbio)....
- Ma poi gli eventi, passando singolarmente, diventano troppo piccoli/poco fluorescenti per essere visti...
- ...anche se le corse citometriche dovranno (ovviamente) sempre essere condotte alla minima velocità disponibile per, quanto meno, limitare il fenomeno dello swarming....
-oltre che per consentire la migliore focalizzazione idrodinamica e prolungare al massimo il tempo di raccolta del debole segnale derivato dalla particella.

In un dato campione gli eventi misurati dal citometro saranno sempre il risultato di una combinazione di particelle singole, le più grandi/fluorescenti, e le coincidenze, oppure SOLO LE COINCIDENZE, se nessuna particella è sufficientemente grande/fluorescente da superare i segnali di background



Ancora sullo swarming

- Se le vescicole extracellulari illuminate contemporaneamente dal laser e interpretate dalla macchina come un'unica particella sono marcate con anticorpi differenti, si creano dei falsi doppio positivi....
- Se il citometro non identifica le vescicole extracellulari sotto una certa dimensione/scatter/ fluorescenza ed è sottoposto all'effetto swarming, la conta delle stesse sarà inevitabilmente di molto inferiore a quella reale di vari ordini di grandezza. Col citometro vediamo solo la punta dell'iceberg...





Conclusioni, con anche con un minimo di ottimismo

Tuttavia, poiché comunque gli stessi problemi interpretativi si incontrano in materiale proveniente da fonti diverse (es. donatori sani e pazienti) la correlazione (es. con la patologia) o comunque con la fonte resta sufficientemente affidabile.

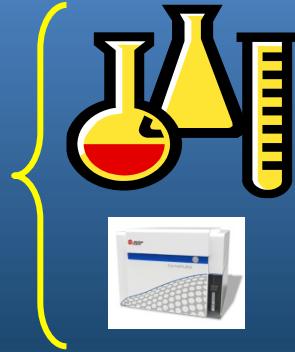
Riassumendo: usiamo pure il citometro per studiare le vescicole extracellulari, ma valutiamo sempre molto criticamente i risultati.

P.S.: si può usare il citometro anche per studiare le vescicole extracellulari dopo immobilizzazione su biglie. Ma questa è un'altra storia....



People instrumental to the present work

Laboratory people



- ◆ D. Lucchetti (Ist. Patol. Gen)
- ◆ Lo speaker (!)

Useful criticism by



- ◆ A. Sgambato (Ist. Patol. Gen)
- ◆ A. Battaglia

The director (Ist. Patol. Gen)



- ◆ R. De Maria