



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Fluxu-zitometria bidez sagu-
laginak immunofenotipatzeko lan-
fluxuaren diseinua**

*Uxue García Uriaque,
Alejandro Maestre Guillén,
Ainhoa Iglesias-Ara eta
Ana M. Zubiaga*

169-176 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.20>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



Fluxu-zitometria bidez sagu-laginak immunofenotipatzeko lan-fluxuaren diseinua

Uxue García Uriaque*, Alejandro Maestre Guillén*, Ainhoa Iglesias-Ara, Ana M. Zubiaga
*Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia
Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)*

**Egile hauen parte-hartzea berdina izan da
uxue.garcia@ehu.eus*

Laburpena

Azken urteetako emaitzek eta deskribatutako $E2f2^{-/-}$ saguen fenotipoak iradokitzen dute E2F transkripzio-faktoreek immunitate-erantzunaren erregulazioan dihardutela. Alabaina, ez da identifikatu $E2f2^{-/-}$ saguen fenotipoaren erantzule den mekanismo immunologikoa. Fluxu-zitometria bidezko immunofenotipatzeak ahalbidetzen du prozesu patologikoetan eta erantzun terapeutikoetan parte hartzen duten zelulak identifikatzea. Hala ere, ez dago sagu-laginak immunofenotipatzeko estandarizatutako metodorik. Lan honetan diseinatu dugu saguetatik erauzitako hainbat organo zein ehunen immunitate-zelulen populazioak karakterizatzeko estrategia. Diseinatutako estrategia horrek ahalbidetzen du hainbat egoera esperimentaletan $E2f2^{-/-}$ saguetan gertatzen den immunitate-erantzuna aztertzea.

Hitz gakoak: Fluxu-zitometria, immunologia, transkripzio-faktoreak, immunofenotipatzea.

Abstract

Recent studies, along with the described $E2f2^{-/-}$ mice phenotype, suggest that E2F transcription factors play a key role in the regulation of the immune response. Nevertheless, the immune mechanism responsible for the phenotype of $E2f2^{-/-}$ mice remains elusive. Immunophenotyping by flow cytometry allows for the identification of cells implicated in pathological processes and therapeutic responses. However, no standardized workflow is designed to immunophenotype mice-derived samples. In the present work, we developed a strategy for characterizing immune cell populations from different mouse organs and tissues to establish a reliable approach for their analysis. The designed strategy allows for the study of the immune response in $E2f2^{-/-}$ mice in different experimental conditions.

Keywords: Flow cytometry, immunology, transcription factors, immunophenotyping

1. Sarrera eta motibazioa

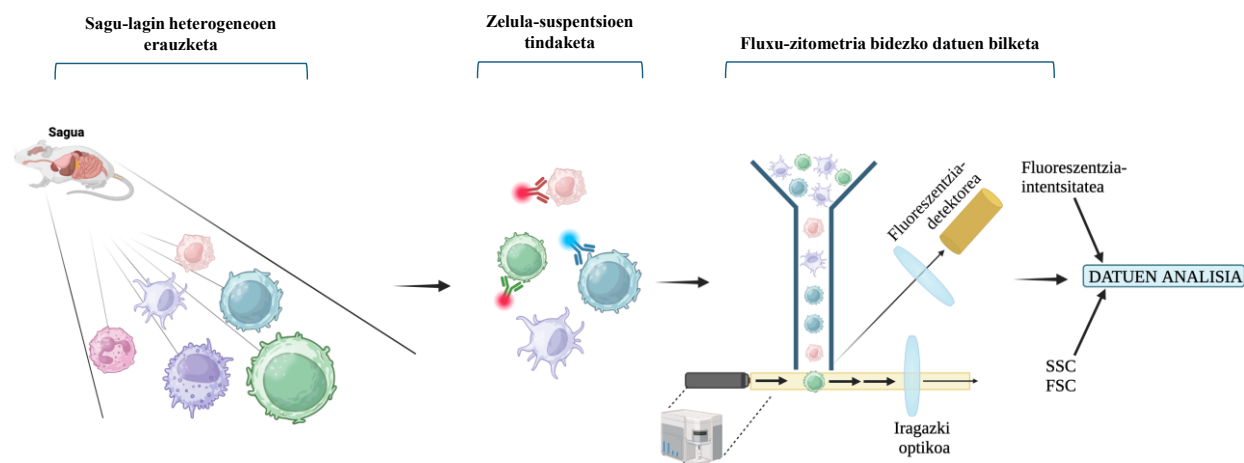
Gorputzeko homeostasia mantentzeko, funtsezkoa da aberrazioak edota eraldaketak azaltzen dituzten zelulak deuseztatzea. Zelula horien adibide dira mikroorganismoek infektatutako zelulak eta minbizi-zelulak. T linfzitoetan oinarritutako immunitate-sistemak eraldatutako zelula horien kudeaketan jarduten du. Zelulen deuseztatze hori gertatzeko, beharrezkoa da aurretiko zelulen arteko ezagutza gertatzea. Ezagutza hori oinarritzen da zelula-mintzean ageri diren hartzaile eta aurkeztzen diren antigenoetan. Zehazki, T linfzitoetan oinarritutako immunitate-sistema erregulatzeko erabiltzen dira T linfzitoen hartzailea (TCR) eta peptidoen histobateragarritasunerako konplexu nagusia (MHC) (Sun et al., 2018). Zelulen ezagutza-prozesu horretan zehar seinale koestimulatzaile eta koinhibitzaileek hainbat transkripzio-faktore aktibatzen dituzte. Transkripzio-faktore horiek gidatzen dituzten seinaleztapen ur-jauziek erregulatzen dute T linfzitoen aktibazio/desaktibazioa eta, beraz, immunitate-erantzunaren iraupena eta ahalmena (Padhan eta Varma, 2010). Ondorioz, aktibatzen diren transkripzio-faktore horiek identifikatzea eta funtzionamendua ulertzea oinarritzkoa da minbiziaren edo infekzio batek sortutako hanturaren aurrean immunitate-erantzuna nola garatzen den ulertzeko.

E2F2 transkripzio-faktoreak immunitatean duen eragina $E2f2^{-/-}$ saguan agerikoa da. Izan ere, $E2f2^{-/-}$ saguaren karakterizazioan ikusi zen autoimmunitate-ezaugarri berantiarrak garatzen direla. Ezaugarri horien artean daude esplenomegalia, hainbat organotako hantura-infiltratuak, glomerulonefritisa, eta

serumaren anti-DNA antigorputzak (Murga et al., 2001). Gainera, E2f2rik gabeko T linfozitoek TCR bidezko emendatutako aktibazioa aurkezten dute eta, ondorioz, T linfozitoen metaketa geratzen da. Halaber, E2f2 apoptosiaren erregulatzaile negatibotzat hartzen da T linfozitoetan (Murga et al., 2001; Mustafa et al., 2021). Hala ere, *E2f2*^{-/-} saguetan gertatzen den T linfozitoen metaketaren mekanismoa oraindik ez da aurkitu. *E2f2*^{-/-} saguetan ikusitako ezaugarri horiek guztiek iradokitzen dute E2F2ren gabeziak immunitate-sistemaren gainaktibazioa eragiten dutela eta ondorioz, ehun-kalteak eragin hantura egoeran. Aitzitik, gainaktibazio hori onuragarria izan liteke tumore-mikroingurunean. Ondorio horiek guztiak analizatu ahal izateko, hantura/minbizi egoeretan hainbat immunitate-zelula motaren azterketa egitea oinarritzkoa da. Bide horretatik, saguen genotipoaren arabera immunitate-erantzunen jarraipena egiten da. Azterketa horiek egiteko, immunitate-zelulak immunofenotipatzeko teknikak erabili behar dira.

Immunofenotipatzea da zelula-suspentsio nahasketa heterogeneo batetik zelulak karakterizatzea eta motaren arabera sailkatzea. Nahasketa heterogeneo hori odola, likido sinobiala edo ehun solidoak izan daitezke, esaterako. Immunofenotipatzeari esker, azken urteetan immunitate-sistemaren inguruko ezagutza emendatu da (de Graaf eta Arens, 2023). Izan ere, berezko eta hartutako immunitate-sistemaren zelula motak detektatzeko aukera eskaintzen du. Zelula mota bakoitzarentzat espezifikoak diren geneen adierazpena erabiltzen da zelulen karakterizazioa eta motaren arabera sailkapena egiteko (Maecker et al., 2012). Hori guztia dela eta, laborategi klinikoetan ohikoa da laginak immunofenotipatzea. Are gehiago, prozedura hori erabilgarria da paziente-laginek gaixotasun baten edo batzuen espezifikoak diren immunitate-zelulak dituzten zehazteko. Horren adibide dira leuzemiak eta linfomak detektatzeko egiten direnak, baita medikuntza-tratamenduekiko erantzunak aztertzeke egiten direnak ere (Cossarizza et al., 2017).

1. irudia. Sagu-laginak fluxu-zitometria bidez immunofenotipatzeko prozesuaren eskema. Behin sagu-lagin heterogeneoak saguetatik erauzita, zelula-suspentsioa fluorokromo desberdinak dituzten antigorputzekin tindatzen dira. Tindatutako zelula horiek fluxu-zitometrotik igaroarazten dira datuak biltzeko. Bildutako datu horien artean daude SSC, FSC eta fluoreszentiaren intentsitatea. Azkenik, datu horien analisisa eta immunitate-zelulen bereizketa egiten da.



Fluxu-zitometria da zelulak immunofenotipatzeko erabiltzen den teknikarik ohikoena (ikusi 1. irudia). Izan ere, zelula bakoitzaren hainbat ezaugarri neurtzea ahalbidetzen du. Teknika horretan, zelula-suspentsioa heterogeneoa tindatzen da. Tindaketa hori egiten da zelula mota bakoitzarentzat espezifikoak diren proteinak ezagutzen dituzten antigorputzekin. Fluxu-zitometria bidez immunofenotipatzeko tindatzen diren proteina horiek zelula-mintzean ageri diren markatzaileak izan ohi dira. Tindaketetan erabiltzen diren antigorputzek, fluorokromo edo tindatzaile fluoreszenteak dituzte lotuta eta, horri esker, proteina-markatzaile espezifikoak dituzten zelulak detekta daitezke (Maecker et al., 2012). Ostean, tindaturiko zelula-suspentsioa fluxu-zitometrotik igaro eta hainbat laserrekin argizatzen da. Ondorioz, antigorputzei lotuta dauden tindatzaile fluoreszenteak kitzikatu eta, emititzen

дутен seinalea, fluxu-zitometroaren detektagailuan neurtzen da. Emititutako seinale horrek korrelazioa du zelula bakoitzaren ezaugarri estrukturalekin, esaterako, pikortasun edo konplexutasun (alboko dispertsioarekin, SSC-ari lotuta) eta tamainarekin (aurreranzko dispertsioarekin, FSC-ari lotuta), baita tindatutako proteina-markatzaile espezifikoaren adierazpenarekin ere. Fluoreszentzia-emisioetan sor daitezkeen gainjartze potentzialak matematikoki zuzentzen dira zitometria-softwareak erabiliz, konpentsazio deritzon prozedurari esker (de Graaf eta Arens, 2023).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Fluxu-zitometria baliagarria da immunologia-ikerketan eta immunologia bidezko monitorizaziorako. Haren abantailen artean daude aldi berean parametro anitzeko neurketak egiteko aukera eskaintzen duela eta zelulak banan-banan aztertzen direla. Modu horretan, fluxu-zitometriaren bidez zelula multzoen fenotipoa eta funtzioa iker daiteke. Beste teknika batzuek, aldiz, ez dute horrelako azterketa baimentzen, esaterako, Western blot, *microarray* edo ELISAk (Maecker et al., 2012). Fluxu-zitometriaz gain beste teknika batzuk erabiliz immunofenotipa daiteke. Teknika horien adibide dira mikroskopia edo zelula bakarreko RNA-seq esperimenduak (Yeo et al., 2022). Hala ere, aurrekoekin alderatuta fluxu-zitometroek aukera ematen dute aldi bereko parametro anitzen ikerketa egitea. Ondorioz, datu multzo aberatsak lortzen dira denbora-tarte laburrean. Beraz, informazio zehatza eta anitza denbora-tarte laburrean sortzeko gaitasuna dela eta, fluxu-zitometria da immunofenotipatzeko teknikarik erabiliena.

Fluxu-zitometria hainbat aplikaziotarako erabil daitekeen arren, ohikoena da immunofenotipatzeko erabiltzea. Immunofenotipatzean aldakortasunak murriztu eta analisiak arintzeko, tindaketak, datuen bilketak eta *gating* estrategiak estandarizatzea oinarritzkoa da (Finak et al., 2016). *Gating* estrategia horien helburua da immunitate-zelulen populazioak hautatzea eta emaitzak filtratzea. Hori dela eta, Giza Immunologia Proiektuan immunofenotipatzeko prozedura estandarizatzeko ahaleginak egin dira (Maecker et al., 2012). Saguen kasuan, hantura edota autoimmunitate egoeretan monozitoen eta zelula dendritikoen populazioak ezberdintzeko metodoak optimizatu dira (Dong et al., 2016). Hala ere, ez dago sagu-laginetatik erauzitako immunitate-zelulen populazio orokorrak immunofenotipatzeko estandarizatutako metodorik.

Horren guztiaren ondorioz, lan honen helburua izan da sagu-organo zein ehunak immunofenotipatzeko estrategiaren diseinua egitea. Modu horretan, E2F2 ezabatzeak immunitate-erantzunean dituen ondorioak azter litezke. Immunofenotipatzea egiteko, lan honek bi azpi helburu izan ditu. Alde batetik, immunitate-zelulen analisisien fidagarritasuna bermatzeko protokolo sendo eta erreplikagarria garatzea. Beste aldetik, saguetatik datozen zelula-nahaste heterogeneoaren karakterizazioa egitea, aurrerantzean hainbat ehun eta organotako immunitate-zelulen populazioen dibertsitatea aztertu ahal izateko egoera experimental ezberdinetan.

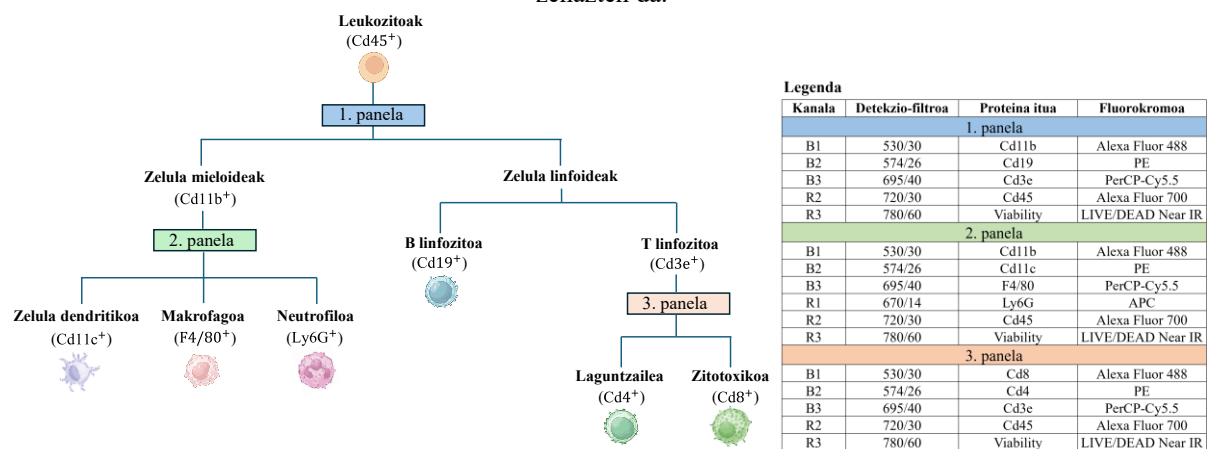
3. Ikerketaren muina

3.1. Fluxu-zitometria bidezko immunofenotipatzea egiteko panelen diseinua eta balioztatzea

Immunofenotipatzeko prozedura eraikitzeke lehenengo pausoa izan da fluxu-zitometriarako panelak diseinatzea. Fluxu-zitometriarako panelak dira proteina-markatzaile espezifikoetan oinarrituz immunitate-populazioak bereizteko aukera eskaintzen duten antigorputzen konbinaketak. Diseinu horretan, kontuan hartu dira immunitate-zelulen populazio bakoitzaren espezifiko diren proteina-markatzaileak. Markatzaile horiek izan dira immunitate zeluletan ageri diren eta fluxu-zitometrian aztertu ohi diren zelula-mintzeko proteinak. Kontuan hartu da, beraz, sagu-laginen analisirako erabili ohi diren proteina-markatzaileak, ezberdintasunak baitaude kasu batzuetan gizakietan erabiltzen direnekin alderatuz. Oro har, immunitate-zelulen populazio nagusienak sailkatzeko hurrengo markatzaileak hautatu dira: Cd45 leukozito mota guztietan, Cd11b zelula mieloideentzat, Cd19 B linfozitoentzat, Cd3e T linfozitoentzat, Cd8 T linfozito zitotoxikoentzat, Cd4 T linfozito

laguntzaileentzat, Cd11c zelula dendritikoentzat, F4/80 makrofagoentzat eta Ly6G neutrofiloentzat. Hautatutako markatzaile horiek 3 zitometria-panel nagusitan sailkatu dira (ikusi 2. irudia). Lehenengo panelean barneratu da immunitate-populazioen sailkapen nagusia: zelula mieloide eta linfoideen bereizketa (Cd11b, Cd19 eta Cd3e markatzaileak). Bigarren panelean bereizi dira zelula mieloideen immunitate-populaziorik nagusienak: makrofagoak, neutrofiloak eta zelula dendritikoak (Cd11b, F4/80, Ly6G eta Cd11c markatzaileak). Hirugarrenen panelean bereizi dira bi T linfotzito mota nagusienak: zitotoxiko eta laguntzaileak (Cd3e, Cd8 eta Cd4 markatzaileak). Nahiz eta 3 panel independente izan, bakoitzean 5-6 kolore aldi berean detektatuz, panelen analisisiek integratu dituzte hiruren emaitzak. Horrek baimendu izan du bai populazio zein azpipopulazioak bereiztea.

2. irudia. Diseinatutako panelen bidez bereizitako leukozitoen hierarkiaren eskema. Panel bakoitzak hierarkia horretako immunitate-populazioak bereizteko aukera eskaintzen du adierazitako proteina-markatzaileak erabiliz. Antigorputz bakoitzaren kanala, detekzio-filtroa, proteina itua eta fluorokromoa eskemaren legendan zehazten da.



Panelen diseinuan, proteina-markatzaile espezifikoaren hautaketa egiteaz gain, kontuan hartu dira markatzaile horien tindaketarako antigorputzen fluorokromoen kitzikatzeko/emisio uhin-luzeren bateragarritasuna. Horrela, panel bakoitzean barneratu dira euren artean bateragarriak diren fluorokromorekin tindatutakoak (ikusi 2. irudia, legenda). Bateragarritasun horiek egiaztatu dira *Flow Cytometry Panel Builder* (Thermo Fisher Scientific) zerbitzua eta erreminta erabiliz, laborategian daukagun Attune NxT Blue 488 nm (B1-B4 kanalak) Red 637 nm (R1-R3 kanalak) zitometroarentzat. Gainera, antigorputz bakoitzaren espezifikotasuna egiaztatu da antigorputz bakoitzarentzat positibo diren zelula-lerro zein zelulen hazkuntza primarioak erabiliz.

3.2. Sagu-ehunen laginen tratamendua eta mintzeko proteina-markatzaileen tindaketa anizkoitza

Sagu-laginak C57BL/6:129/Sv hondo genetikodun saguetatik erauzi dira. Erauzketa horiek hainbat organo zein ehunetatik egin dira, esaterako, barea, peritoneoa, eta hezur-muina. Organoen kasuan, zelulak organoetatik erauzi dira autoklabatutako bi portarekin zelula-disgregazioa eginez. Peritoneoari dagokionez, kirurgia-guraize esterilekin mozketatik egin da abdomenean zehar, peritoneoko pareta agerian utzi, eta 5 mL PBS hotz peritoneoan injeztatu eta berreskuratu dira 20-G orratza erabiliz. Hezur-muinaren kasuan, zelulak tibiako eta femurreko hezur-muinetatik erauzi dira. Horretarako, hezurak belauenezurraren edo errotularen parean apurtu dira, eta 27-G orratzia hezur bakoitzaren diafisiaren muin-kanalean sartuz 5 mL DMEM (1X) + GlutaMAX™ (Gibco™) pasarazi dira.

Zelulen tindaketarako, $3 \cdot 10^5$ zelula/lagin zentrifugatu dira 400-600 x g-tan 5 minutuz giro-tenperaturan, eta jalkinaren Fc guneetako Cd16 (Fcγ III hartzailea) eta Cd32 (Fcγ II hartzailea) blokeatu dira interakzio ez-espezifikoak saihesteko. Izan ere, gune hauek afinitate baxuko IgG guneak dira. Horretarako, % 1 behi sero-albumina (BSA) PBSan diluitutako sagu Cd16/Cd32 aurkako inkubazioa egin da 15-20 minutuz giro-tenperaturan. Fluorokromodun antigorputzen 3 nahasketekin tindatu dira laginak, 3 paneletan ageri diren antigorputzak baita bideragarritasunerako (*viability*) amina askeak lotzen dituen

molekula koloreztatua kontuan hartuz (ikusi 2. irudiko legenda), fabrikatzaileak gomendaturiko kontzentrazioetan. Antigorputzen nahasketarekin 30 minutuzko inkubazioa egin da ilunpetan 2-8 °C-tan eta, ostean, garbiketak egin dira % 1 BSA-dun PBS erabiliz. Tindatutako zelula-jalkina % 2 paraformaldehidotan (PFA) fixatu da.

3.3. Konpentsazio prozeduraren finkapena fluxu-zitometroaren laser-seinaleen doiketaren eta konpentsazio-matrizearen sorreraren bidez

Fluxu-zitometrotik laginak igaro aurretik, konpentsaziorako prozedura ezarri da. Horretarako lehenengo pausoa izan da UltraComp eBeads™ (01-2222-41, Thermo Fisher Scientific) eta ArC™ Amine Reactive Beads (A10346, Thermo Fisher Scientific) konpentsazio-bihien tindaketa egitea. UltraComp eBeads™ bihien kasuan, bihi-tanta bat tindatu da fluorokromodun antigorputz bakoitzaren gomendaturiko kontzentrazioarekin, eta ArC™ Amine Reactive Beads bihien kasuan bideragarritasunerako amina taldeekiko molekula errektiboarekin. Ostean, 30 minutuz ilunpetan inkubatu dira 2-8 °C-tan, 2 mL PBS gehitu, 400-600 x g-tan zentrifugatu 5 minutuz giro-tenperaturan, eta jalkinean 200 µL PBS gehitu dira. Hori eta gero, bideragarritasunerako tindatutakoen kasuan, ArC™ bihi negatiboan tanta bat gehitu da.

Attune NxT softwarean sortutako esperimendu bakoitzean, panel horri dagokion proteina markatzaile bakoitzarentzako histograma bat sortu da. Histograma horretan, y ardatzean positibotasunaren ehunekoa irudikatu da x ardatzean ageri den antigorputz bakoitzaren fluorokromoaren seinalearekiko. Organo zein ehun bakoitzetik erauzitako eta tindatu gabeko zelulak zitometrotik igaro dira, bakoitza esperimendu independente batean, eta zitometroaren kanal bakoitzaren laserren potentzia doitu da positibotasunaren ehunekoaren maximoa 10^2 azpira egokitu arte. Behin laser guztien potentzia egokituta, tindaturiko konpentsazio-bihiak zitometrotik pasa dira, eta antigorputz bakoitzaren positibotasun eta negatibotasuna zehaztu (ikusi 3. irudia, konpentsazioa). Horren ostean, konpentsazio-matrizea sortu eta zitometrotik igaroko diren lagin guztietan aplikatu da.

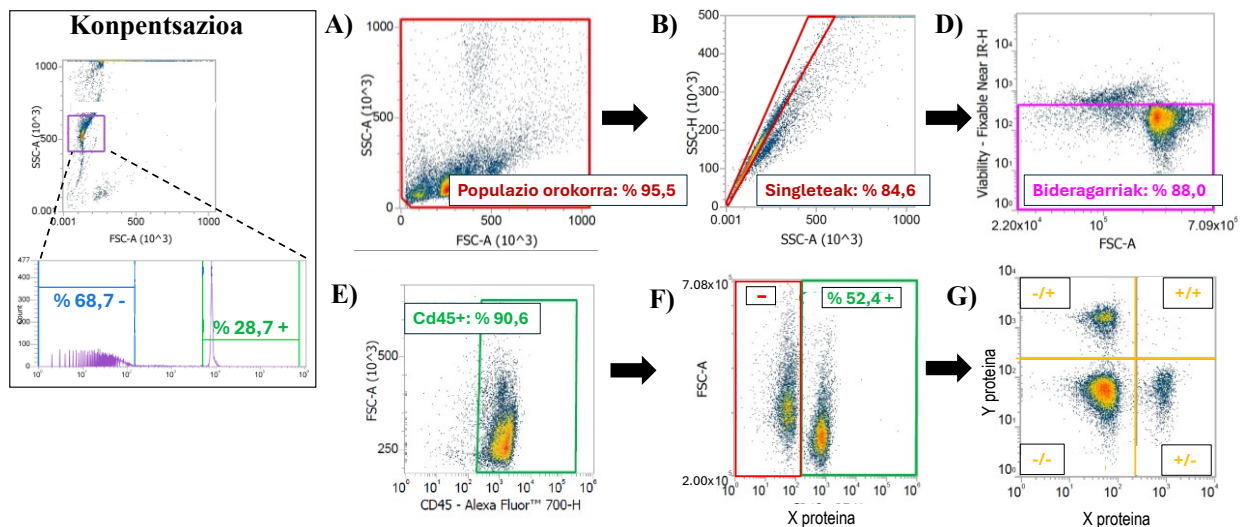
3.4. Immunitate-zelulen populazioak hautatzeko eta emaitzak filtratzeko *gating* estrategiaren garapena

Tindatutako eta PFA-n fixatutako zelulak zitometrotik igarotzeko *gating* estrategia garatu da. Modu horretan, interesezko immunitate-zelulen populazioak hautatu eta emaitzak filtratu dira. Horretarako, 5 pauso nagusi finkatu dira eta Attune NxT softwarean (Thermo Fisher Scientific) puntu-diagramak irudikatuz aurrera eraman dira. 5 pauso horiek filtratzeko baliabide gisa erabili dira, hau da, puntu-diagrama bakoitzaren interesezko zonaldea (ingelesezko *gate*) hautatu da, eta hurrengo pausorako abiapuntutzat erabili da. Lehenengo pausoa SSC-A/FSC-A irudikatu da, hau da, konplexutasunaren eta tamainaren azalera islatzen duen puntu-diagrama (ikusi 3. irudia, A). Lehenengo pauso horrek baimendu du lagin bakoitzean dauden immunitate-zelulen populazioak bereiztea eta, hortik, interesezkoak direnak hautatzea. Bigarren pausoa SSC-H/SSC-A irudikatu da, hau da, alboko dispersioaren altuera (H) eta azalera (A) islatzen duen puntu-diagrama (ikusi 3. irudia, B). Pauso horrek ahalbidetu du singleteak, hau da, banan-banan pasatzen diren zelulak hautatzea. Bereziki garrantzitsua da singleteak hautatzea eta dobleteak aukeraketatik kanpo uztea proteina-markatzaileentzat positibo bikoitzak diren zelulak oker ez sailkatzeko.

Hirugarren pausoa bideragarritasunerako tindaketa eta FSC-A aztertu dira, eta bideragarriak diren zelulak hautatu (ikusi 3. irudia, D). Hautaketa hori egiteko fluoreszentsia maila baxuagoko populazioa hautatu da. Izan ere, hildako zeluletan bideragarritasunerako tindaketak duen aminaren koloratzaile errektiboak mintza zeharkatu eta zelula barneko aminekin lotu daiteke. Ondorioz, hildako zelulek fluoreszentsia intentsitate altuagoa dute. Laugarren pausoa, leukozitoak hautatu dira Cd45⁺ diren zelulak aukeratuz (ikusi 3. irudia, E). Bukatzeko, bosgarren pausoa, FSC-A eta fluorokromodun antigorputz bakoitzaren seinalea aztertu da. Azterketa horrek baimendu du proteina-markatzaile

espezifikoaientzat positiboa den populazioa zehaztea (ikusi 3. irudia, F). Gainera, azpipopulazioak zehazteko markatzaile ezberdinak aldi berean aztertzeke puntu-diagramak eraiki dira eta, horrela, positibo bikoitzak diren zelulak sailkatu (ikusi 3. irudia, G). Osotara, 3 esperimentu sortu dira Attune NxT softwarean *gating* estrategia hau ezarriz organo edo ehun bakoitzarentzat, bat antigorputzen panel bakoitzarentzat.

3. irudia. Immunitate-zelula populazioak bereizteko konpentsazioa eta *gating* estrategia. Konpentsazioan, antigorputz bakoitzaren positibotasuna (berdea) eta negatibotasuna (urdina) zehaztu da. *Gating* estrategian sakabanatze-parametroetan eta markatzaile espezifikoetan oinarritutako iragazki sekuentzialak aplikatu dira (A-G) intereseko zelulak hautatzeko. Panel bakoitzak *gating*aren progresioa erakusten du, eta immunitate-populazioak identifikatzeko eta sailkatzeko aukera ematen du.

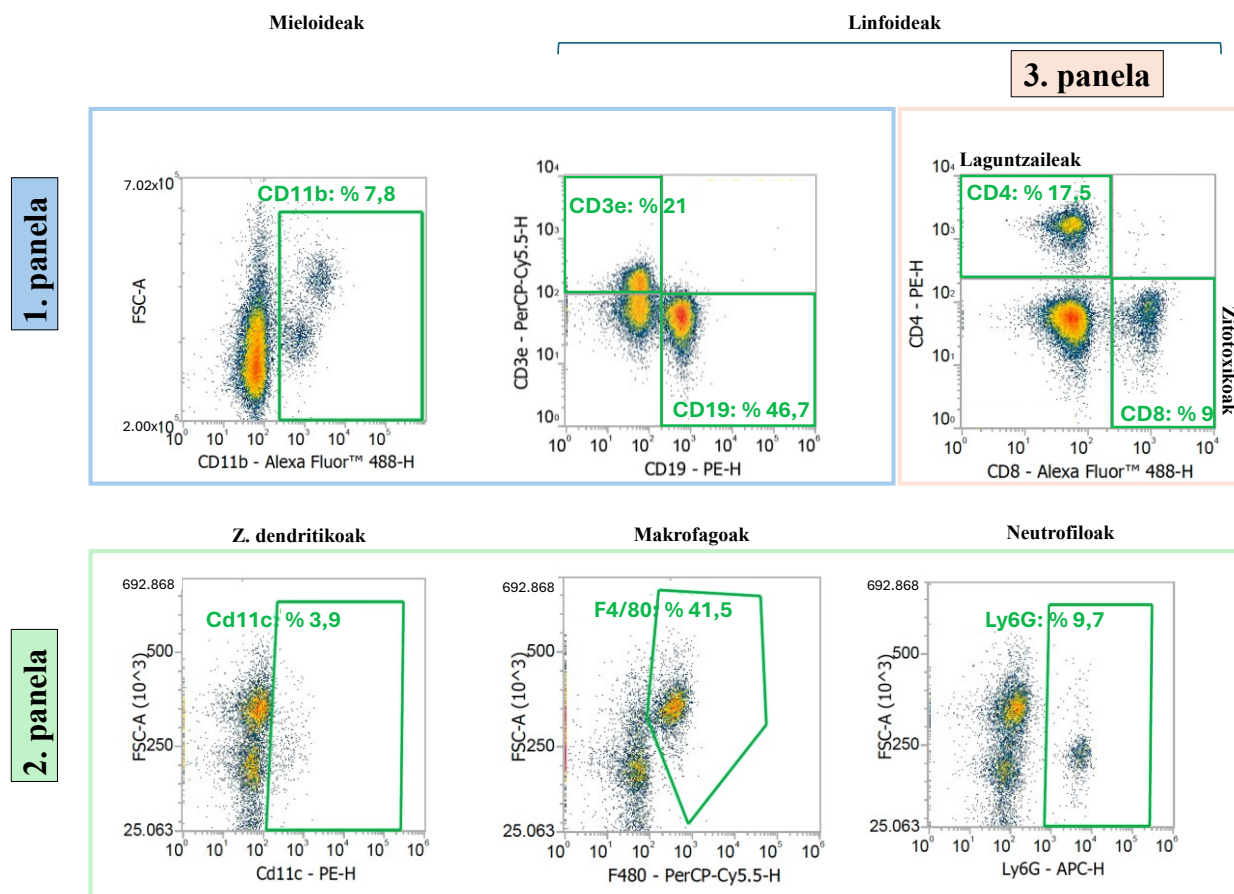


3.5. Seinalearen positibotasunaren analisia eta sagu-genotipoaren arabera emaitzen immunofenotipoaren alderaketa

Behin aurretik azaldutako prozesuak eginda, tindaturiko lagin guztiak zitometrotik igaro dira. Prozedura hori egin da Attune NxT softwarean sortutako dagokion esperimentuan, lagin motaren eta panelaren arabera. Lagin bakoitza bere tindatu gabekoarekin edo isotipo kontrolarekin alderatu da. Modu horretan, populazio positiboa eta negatiboa zein den zehaztu da. Konpentsazioaren egokitasuna eta, ondorioz, antigorputzen seialearen positibotasuna baieztatu da bai tindaketa sinpleek (antigorputz bakarria dutenak) eta antigorputzen nahasketadunek proteina-markatzaileen emaitza bera dutela egiaztatzearen bidez.

Fluxu-zitometriako emaitzak lortu ostean, sagu-genotipoen arteko alderaketak egiteko hiru aukera daude. Lehenengo aukera da puntu-diagrametan ageri diren immunitate-zelula populazioen ehunekoak konparatzea (ikusi 4. irudia). Aukera horren helburua da egindako proteina-markatzaile espezifikoaren tindaketarako positibo diren zelulen ehunekoak alderatzea. Estrategia honen bidez WT saguan lortutako ehunekoak bat datoz sagu-barean (1. eta 3. panelak) eta -peritoneoan (2. panela) esperotako ehunekoekin (Pinchuk et al., 2008). Bigarren aukera da Attune NxT softwareak eskaintzen duen populazio positibo horren *X mean*, hau da, populazioaren batez besteko fluoreszentziaren balioa konparatzea. Hirugarren aukera da SSC eta FSC datuak kontuan hartuz eta puntu-diagrametan ageri diren populazioen agerpen edo desagertzearen arabera alderaketak egitea.

4. irudia. Sagu-laginak fluxu-zitometria bidez immunofenotipatzearen emaitzak. Zitometriako 3 panelen emaitzak ageri dira (1. eta 3. paneletan barea eta 2. panelean peritoneoa), baita panelen konbinaketek ahalbidetzen duten saguen immunitate-zelula nagusien sailkapena ere, ehunekotan kuantifikaturik.



4. Ondorioak

Fluxu-zitometria teknika baliagarria da immunofenotipatzeko eta, ondorioz, immunitate-zelulen populazioak bereiztu eta identifikatzeko. Bide horretatik, lan honetan fluxu-zitometriaren bidez sagu-laginak immunofenotipatzeko estrategia diseinatu da. Zehazki, saguetatik erauzitako hainbat organo eta ehunen immunitate-zelulak immunofenotipatzeko prozedura ezarri da. Modu horretan, estandarizatutako tindaketek, datu bilketak eta *gating* estrategiak emaitzen aldakortasunak murriztu eta analisiak arindu ditu. Ondorioz, immunitate-zelulen analisisien fidagarritasuna bermatu dira. Prozedura horri esker, zitometriarako hiru panelen bidez immunitate-zelulen populazio nagusienak bereizi dira. Bereizketa eta sailkapen hori egin da proteina-markatzaile espezifikoak identifikatzearen bitartez. Hortaz, saguetatik datozen zelula-nahaste heterogeneoen karakterizazioa egitea lortu da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan diseinatutako immunofenotipatzeko estrategiak ahalbidetzen du hainbat analisi experimental egitea saguetan. Estrategia horri esker, sagu basati (WT) eta *E2f2*^{-/-} saguetan hainbat egoeratan gertatzen diren immunitate-erantzunak azter daitezke. Zehazki, *E2f2*^{-/-} saguen immunitate-gainaktibazioaren ondorioak iker daitezke bai hantura bai minbizi egoeretan immunitate-zelula mailan. Maila horretan, immunitate-zelulen populazio-dibertsitatea azter liteke egoera experimental ezberdinetan. Modu horretan, saguen genotipoaren arabera immunitate-erantzunen jarraipena egin daiteke. Jarraipen hori hainbat ehun zein organotan, baita *in vitro* aktibatutako zeluletan egin liteke. Ondorioz, garatutako estrategiak ahalbidetzen du E2F2 inaktibatzeak immunitate-erantzunean dituen ondorioak aztertzea.

6. Erreferentziak

- Cossarizza, A., Chang, H., Radbruch, A., Akdis, M., Andrä, I., Annunziato, F., Bacher, P., Barnaba, V., Battistini, L., Bauer, W. M., Baumgart, S., Becher, B., Beisker, W., Berek, C., Blanco, A., Borsellino, G., Boulais, P. E., Brinkman, R. R., Büscher, M., . . . Zimmermann, J. (2017). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European Journal Of Immunology*, 47(10), 1584-1797. <https://doi.org/10.1002/eji.201646632>
- de Graaf, J. F., eta Arens, R. (2023). Immunophenotyping beyond the limits of time. *Cell reports methods*, 3(10), 100612. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2023.100612>
- Dong, M. B., Rahman, M. J., eta Tarbell, K. V. (2016). Flow cytometric gating for spleen monocyte and DC subsets: differences in autoimmune NOD mice and with acute inflammation. *Journal of immunological methods*, 432, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.08.015>
- Finak, G., Langweiler, M., Jaimes, M., Malek, M., Taghiyar, J., Korin, Y., Raddassi, K., Devine, L., Obermoser, G., Pekalski, M. L., Pontikos, N., Diaz, A., Heck, S., Villanova, F., Terrazzini, N., Kern, F., Qian, Y., Stanton, R., Wang, K., Brandes, A., . . . McCoy, J. P. (2016). Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium. *Scientific reports*, 6, 20686. <https://doi.org/10.1038/srep20686>
- Maecker, H. T., McCoy, J. P., eta Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature reviews. Immunology*, 12(3), 191–200. <https://doi.org/10.1038/nri3158>
- Murga, M., Fernández-Capetillo, O., Field, S. J., Moreno, B., Borlado, L. R., Fujiwara, Y., Balomenos, D., Vicario, A., Carrera, A. C., Orkin, S. H., Greenberg, M. E., eta Zubiaga, A. M. (2001). Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity*, 15(6), 959–970. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00254-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00254-0)
- Mustafa, N., Mitxelena, J., Infante, A., Zenarruzabeitia, O., Eriz, A., Iglesias-Ara, A., eta Zubiaga, A. M. (2021). E2f2 Attenuates Apoptosis of Activated T Lymphocytes and Protects from Immune-Mediated Injury through Repression of Fas and FasL. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 311. <https://doi.org/10.3390/ijms23010311>
- Padhan, K., eta Varma, R. (2010). Immunological synapse: a multi-protein signalling cellular apparatus for controlling gene expression. *Immunology*, 129(3), 322–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03241.x>
- Pinchuk, L. M., eta Filipov, N. M. (2008). Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immunity & ageing : I & A*, 5, 1. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-5-1>
- Sun, C., Mezzadra, R., eta Schumacher, T. N. (2018). Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity*, 48(3), 434–452. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.014>
- Yeo, A. T., Rawal, S., Delcuze, B., Christofides, A., Atayde, A., Strauss, L., Balaj, L., Rogers, V. A., Uhlmann, E. J., Varma, H., Carter, B. S., Boussiotis, V. A., eta Charest, A. (2022). Single-cell RNA sequencing reveals evolution of immune landscape during glioblastoma progression. *Nature immunology*, 23(6), 971–984. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01215-0>

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa-proiektu hau finantzatu da MCIU/AEI/FEDER, UE (RTI2018-097497-B-100, PID2021-122922OB-I00 eta RED2022-134792-T) dirulaguntzen bidez. Gainera, A. Maestre ikertzaileak doktorego aurreko PRE2022-103378 FPI beka dauka. Horretaz gain, saguekin loturiko prozedura guztiek Euskal Herriko Unibertsitateko Etika Batzordearen onarpena jaso dute.