

Izolácie buniek a funkčné testy lymfocytov

Peter Slanina (peter.slanina@fnusa.cz)
Ústav klinické imunologie a alergologie
FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU



Monocyte



Lymphocyte



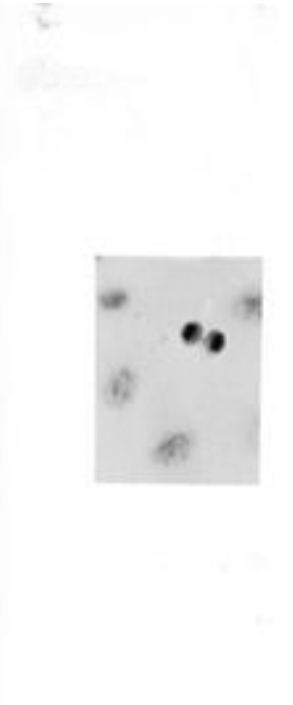
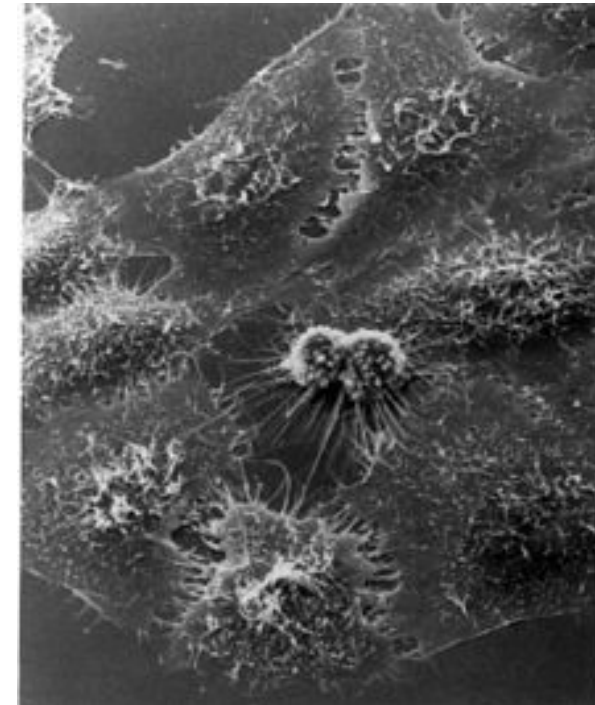
Neutrophil



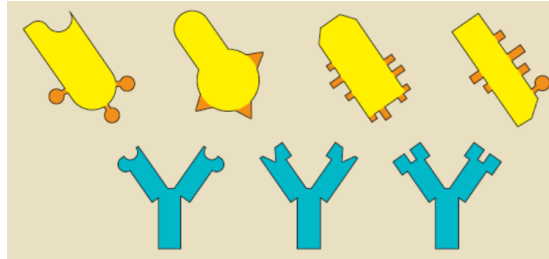
Eosinophil



Basophil



Rozdelenie imunologických laboratórnych metód



Metódy $\left\{ \begin{array}{l} \text{serologické (humorálne)- detekcia antigénov a protilátok,} \\ \text{preukázanie tvorby protilátok proti infekčnému agens} \\ \text{bunčné- počty a funkcie jednotlivých typov leukocytov} \end{array} \right.$



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



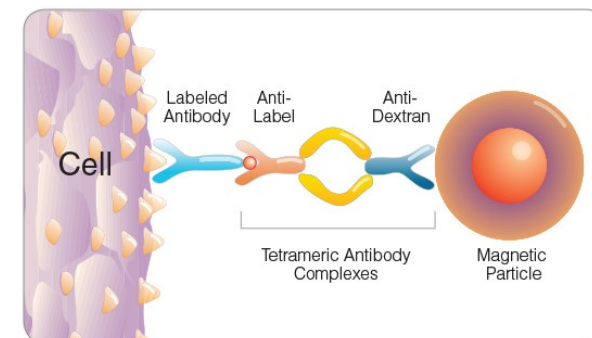
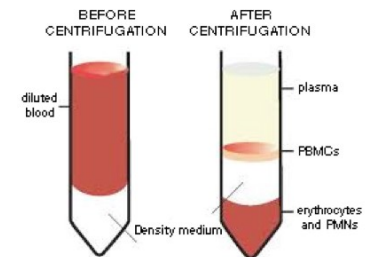
Eosinophil



Basophil

Separace leukocytů - obecný přehled

- Pro provedení funkčních testů *in vitro* je většinou nutná separace leukocytů z plné krve
- Výběr separační metody záleží na:
 - O jaký typ leukocytů máme zájem
 - Jak velký stres při izolaci buňka vydrží (viabilita)
 - Jaký potřebujeme **výtěžek a čistotu** izolované suspenze buněk!
 - Finanční nákladnost



Separace leukocytů - obecný přehled

1. Izolace PBMC (peripheral blood mononuclear cells)
2. Adherence na plastový povrch
3. Rozetové separace
4. Magnetická selekce
5. Modifikace průtokové cytometrie - sorting

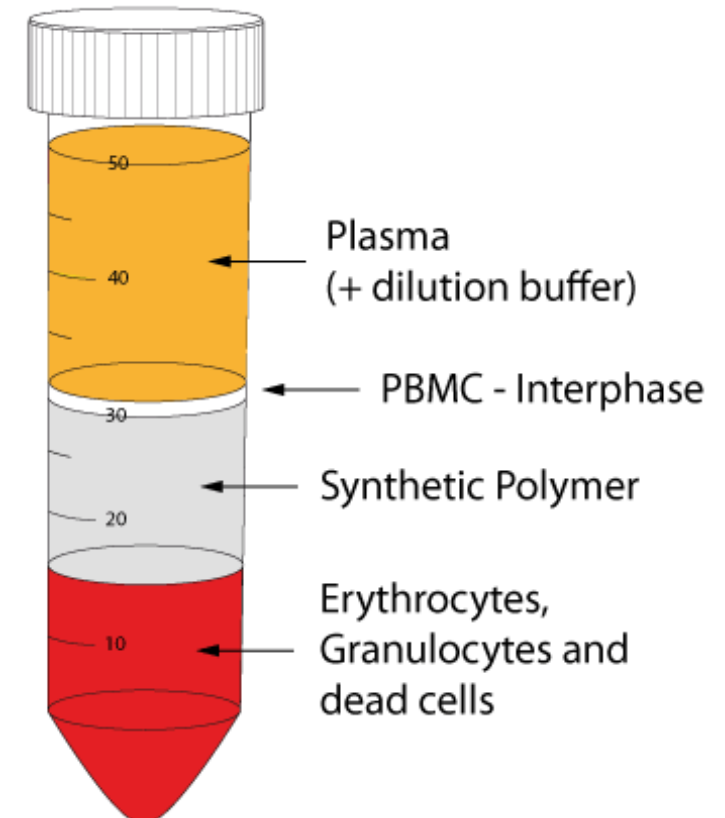
1. Izolace PBMC

PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells = **lymfocyty+monocyty**

- Izolácia PBMC pomocou gradientovej centrifugácie

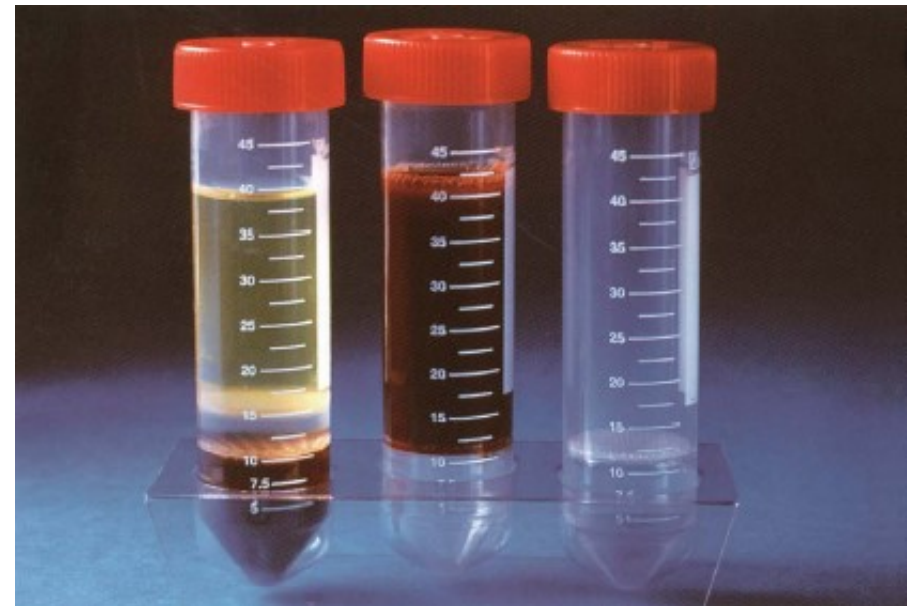
Krv sa navrství na separačné médium

Pri centrifugácii sa oddelia jednotlivé vrstvy na základe odlišnej vznášivej hustoty – hore je plazma, medzi plazmou a médiom je vrstva PBMC, na dno klesnú erytrocyty a granulocyty



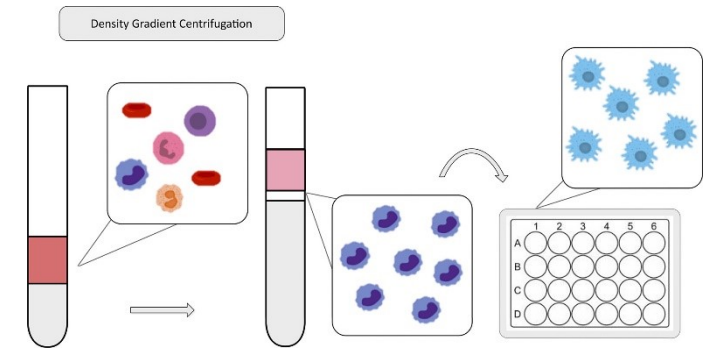
1. Izolace PBMC

- Odoberie sa plazma
- Naberie sa vrstva PBMC pozorovateľná ako biely prstenec na rozhraní plazmy a média
- PBMC sa premyje v PBS (opakované stočenie, odliatie supernatantu, rozsuspendovanie peletu v PBS)
- Získavame koncentrovanú suspenziu mononukleárov
- Spočítaní PBMC na analyzátoru → ředění buněk pro funkční test



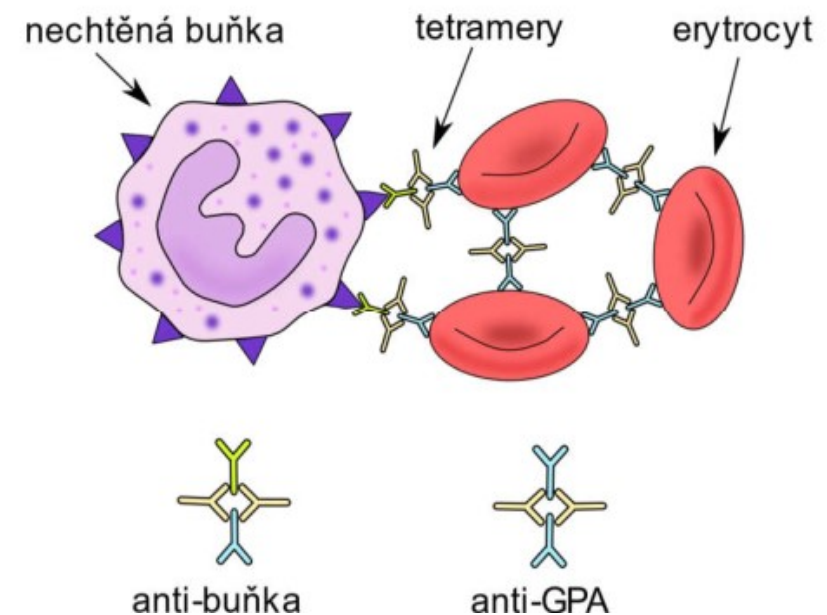
2. Adherence na plastový povrch

- Slouží k izolaci monocytů
- Využívá jejich přirozené schopnosti adherovat na plastové povrchy
- Provedení:
 - Izolace PBMC
 - Izolované PBMC se inkubují několik hodin na plastové misce
 - Monocyty postupně adherují ke dnu, lymfocyty ne
- Nevýhoda – nízká čistota (70-80%) a výtěžnost (získáme kolem 50% monocytů ze vzorku)
- Výhoda – levná a málo pracná izolace



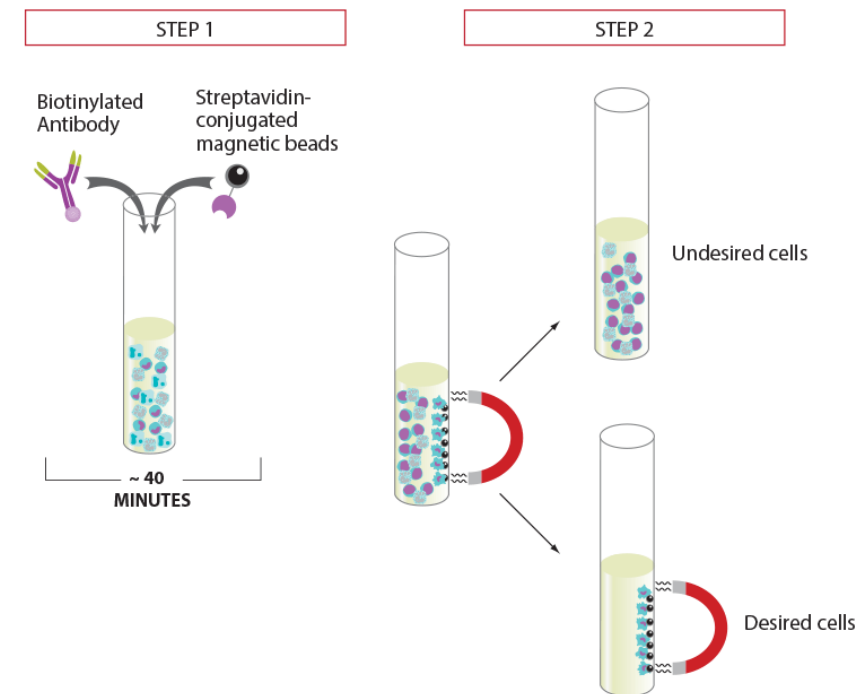
3. Rozetové separace

- Využívá monoklonálních protilátek spojených do 2 typů tetramerů
- Plná krev - pomocí tetramerů se prováží RBC s leukocyty, kterých je nutné se zbavit
- Následuje klasická izolace na hustotním gradientu
- Nechtěné buňky klesnou ke dnu s RBC
- Chtěné buňky zůstanou v prstenci na rozhraní plazmy a separačního média, (tedy ty buňky, vůči kterým nebyly tetramery namířeny)



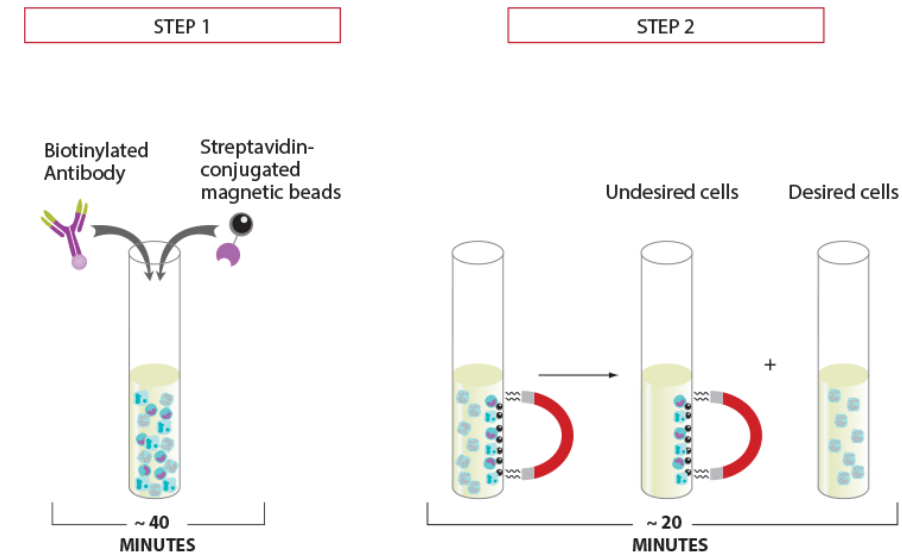
4. Magnetická selekce

- Využívá monoklonálních protilátek navázaných na magnetické kuličky
- 2 druhy selekce: pozitivní a negativní
- **Pozitivní:** protilátka namířena vůči specifickému znaku požadované populace (např. pomocí anti-CD4 izolujeme CD4 T-lymfocyty)
- Požadovaná populace je pomocí magnetu zachycena ve zkumavce
- Vše ostatní je v dalším kroku odmyto
- Nevýhoda: vazba protilátky může izolované buňky nespecificky aktivovat, magnetické částice zůstávají v suspenzi spolu s buňkami u některých kitů



4. Magnetická selekce

- **Negativní selekce:**
- Koktejl monoklonálních protilátek namířený vůči všemu v krvi/PBMC kromě populace kterou požadujeme
- Nechtěné buňky jsou přidrženy pomocí magnetu
- Cílové buňky zůstávají v roztoku – odsátí do nové zkumavky
- Výhoda: **izolované buňky nejsou ovlivněny vazbou protilátek – výhodné pro výzkum**
- Nevýhoda: nutné dodržet poměr přidávaných protilátek a suspenze buněk – pokud se buněk přidá moc, protilátka nestačí a výsledná suspenze buněk je kontaminovaná (nízká čistota)



4. Magnetická selekce

Způsoby zpracování

Ruční izolace – magnet ve zkumavce

Výhoda – nejlevnější varianta magnetické izolace, lze modifikovat poměr protilátka/buňky
Nevýhoda – pracné při větším množství vzorků

Automat Robosep – izolace magnetem identickým s ruční metodou

Výhoda – ušetří manuální práci
Nevýhoda – dražší izolace – nutnost kupovat speciální zkumavky a špičky, nelze měnit poměr protilátka/buňky
Pořizovací cena stroje

AutoMACS Milteney – izolace pomocí magnetické průtokové kolony

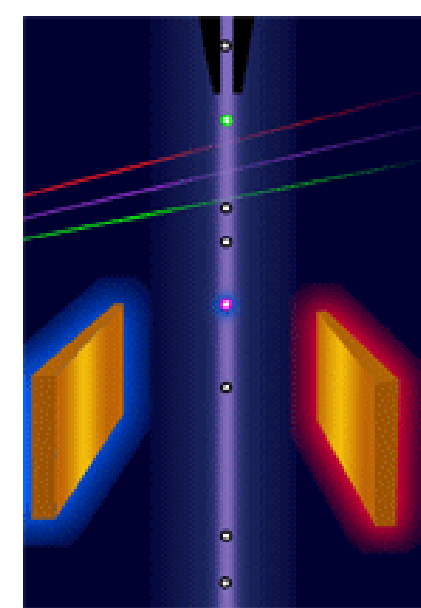
Výhoda – ušetří manuální práci, velmi vysoká čistota a viabilita buněk
Nevýhoda – nejdražší typ magnetické izolace
Nutnost po určitém počtu izolací měnit kolonu



5. Sortování

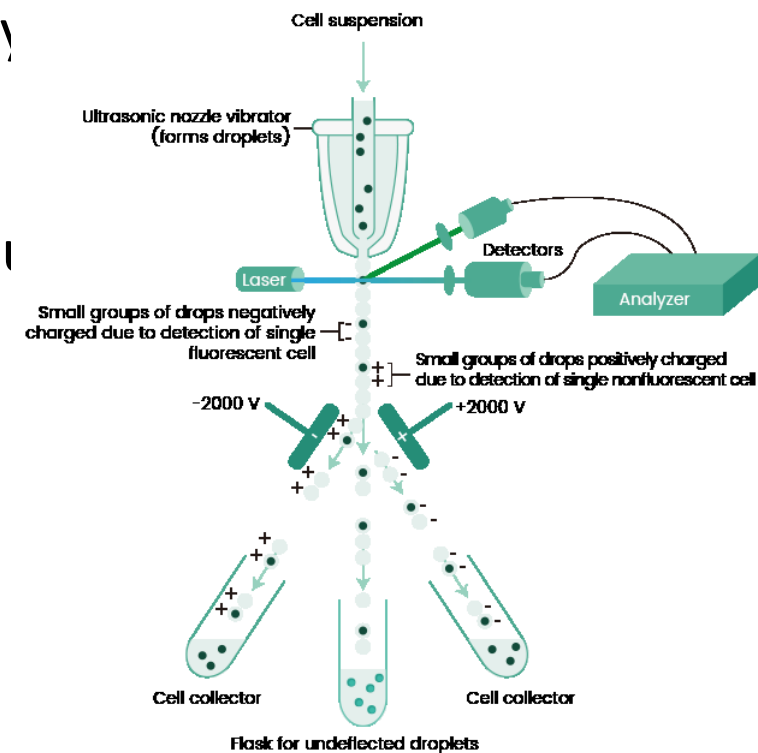
- Princip: průtoková cytometrie

1. Buňky jsou označeny pomocí monoklonálních protilátek
2. Analýza buněk na cytometru → cílová populace se zagatuje v pc
3. Příklad rozdělí buňky tak, aby v proudu nosné kapaliny 1 kapce byla 1 buňka
4. Každé kapce je přiřazen + nebo - náboj → vychýlení kapky s cílovou buňkou do zkumavky pomocí magnetů



Výhoda: Nejvyšší čistota buněk

Nevýhoda: Velmi drahé, zdlouhavé, nižší viabilita



Funkční testy lymfocytů - přehled

- Rutinní
 - **Proliferace** (blastická transformace)
- Výzkumné
 - Test cytotoxicity
 - ELISPOT a FLUOROSPOT
 - Detekce transkripčních faktorů, aktivačních znaků

Funkčné testy lymfocytov

- test PROLIFERÁCIE lymfocytov (test blastickej transformácie) – sleduje sa schopnosť delenia lymfocytov po stimulácii

Definícia: nárast počtu buniek ako výsledok bunečného rastu a bunečného delenia

- bujnenie, novo-tvorenie, rast
- lat. *prolifero* prinášať potomstvo: *proles* deti; *fero* niesť
- dve významné úlohy (role)
 - embryonálny vývoj
 - dospelé telo (napr. krvotvorba, obnova tkanív)
- typy: symetricky, asymetricky, **diferenciačné delenie**

Kedy indikovať test proliferácie???

- podozrenie na SCID
- vývoj ochorenia – zástava proliferácie?
- odpoveď na liečbu (farmaceutika)



SCID

Severe Combined Immunodeficiency

- skupina ochorení, ktoré vykazujú poruchu vo vývoji lymfoidnej rady – niekedy iba porucha vývoja T-lymf., niekedy kombinácia s B-lymf. a s NK bunkami (záleží na genetickej poruche)
- klinické prejavy - thymus se nevyvíja normálne (úplne/redukcia), veľmi nízke počty cirkulujúcich lymfocytov (lymfopénia) a T-lymfocytov
- lymfocyty nereagujú na stimuláciu mitogénmi – tzn. nemôžu proliferovať v odpovedi na antigény
(myeloidná a eryteroidná rada je v počtoch a funkcii neovplyvnená)

SCID

- existuje asi 7 variant, ktoré sú AR, jedna X viazaná
- väčšinou ide o defekt v gama reťazci IL-2R (X-viazaná forma), tento reťazec je aj súčasťou receptorov IL-4, -7, -9, 15

Syndrom	T-bb	B-bb	NK-bb	Dědičnost
Retikulární dysgeneze	-	-	-	AR
ADA deficit	-	-	-	AR
RAG 1,2 deficit	-	-	+	AR
C γ C deficit	-	+	-	XL
JAK3 deficit	-	+	-	AR
IL-7R α deficit	-	+	+	AR
Omennův syndrom	+	-	+	AR
ZAP-70 deficit	CD4+	+	+	AR

SCID

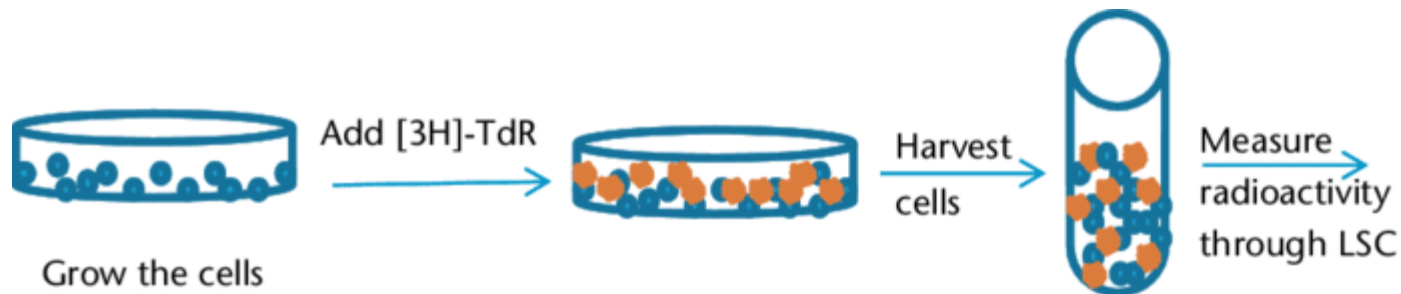
- Predĺženie života vyhnutím sa kontaktu s potenciálne nebezpečnými patogénmi – musia žiť v sterilním prostredí!!!
- Musia sa vyhýbať kontaktu s ľuďmi a nefiltrovaným vzduchom, všetkým s čím prídu tieto deti do styku – vrátane jedla!



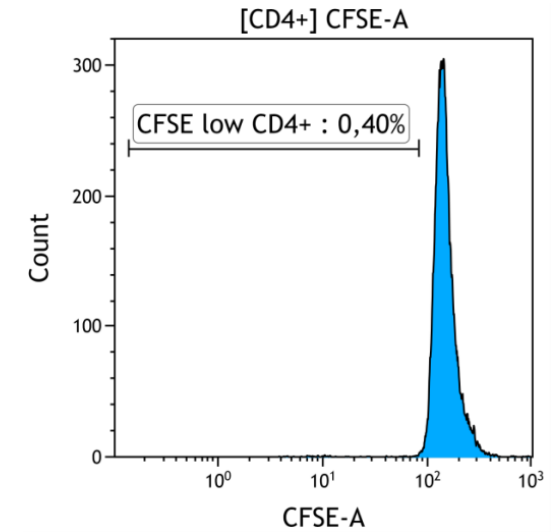
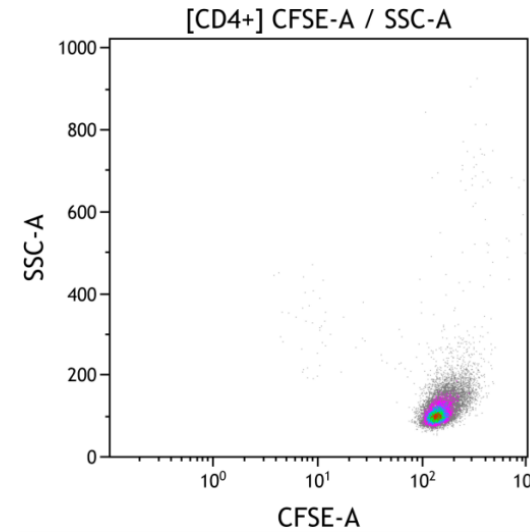
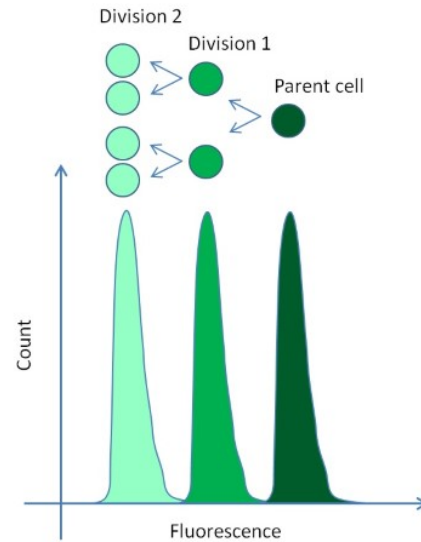
David, Bubble boy – strávil v izolačnej bubline celý svoj život – 12 let

Metódy – 1. Inkorporace ^3H thymidinu

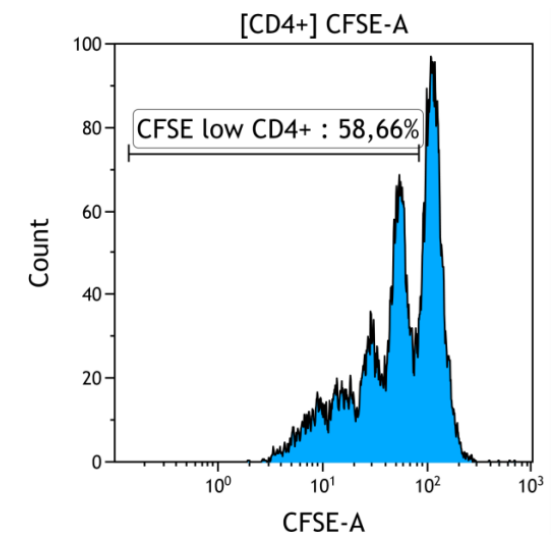
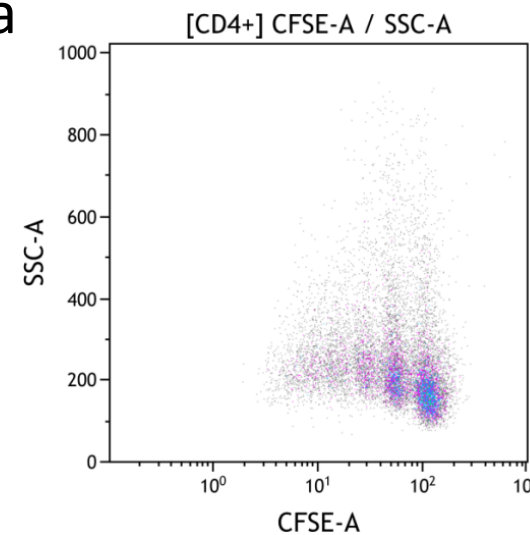
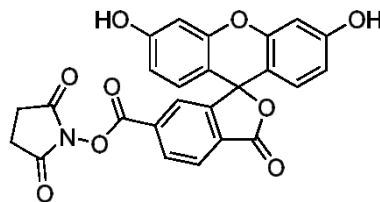
- Nejstarší metodika – inkorporace ^3H thymidinu
- Detekcia novo syntetizovanej DNA pomocou **thymidínu** značeného radioaktívne (**trícium**), ktorý se zabuduje do nově syntetizované DNA
- Meranie na beta-counteru (scintilačný detektor)
- Zastaralá metodika – dnes se již rutinně nepoužívá



Metódy- 2. CFSE

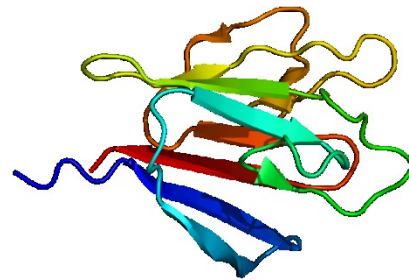
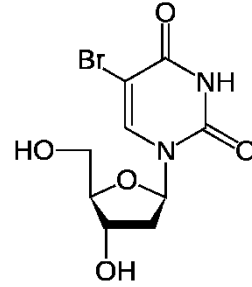


- Cytometrická detekcia pomocou fluorescenčného farbiva **CFSE** (karboxyfluoresceinsukcinimidylester), ktoré sa viaže nešpecificky na rôzne štruktúry v bunkách, sleduje sa nárast fluorescence po delení buniek
- S každou nově vzniklou generácií buněk klesá intenzita fluorescence
- Informace o počtu buň. Cyklů

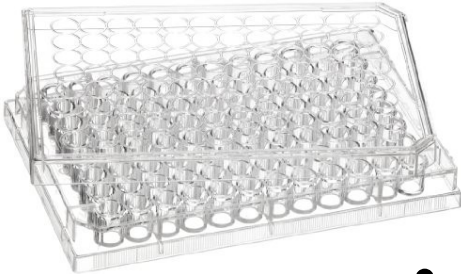
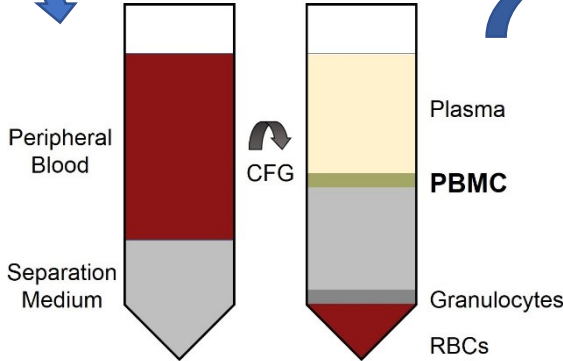


Metódy

- Proliferačný set DELFIA (BrDU)
- Detekcia proteínu Ki-67



Príprava vzorky



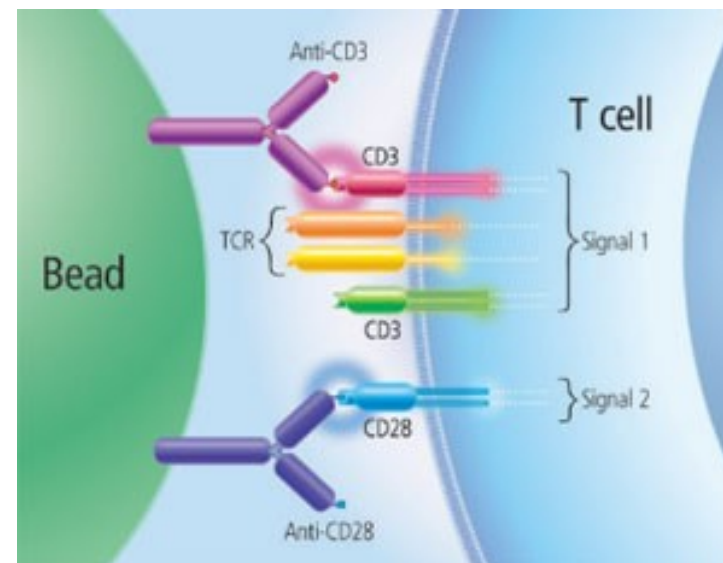
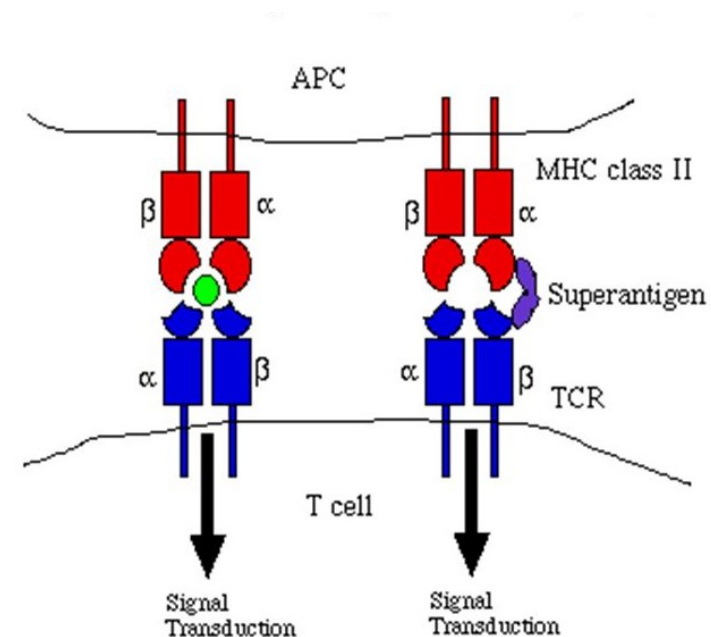
• cca 72 hod



• cca 2,5 hod

Stimulancia

- Rastlinné lektíny - **PHA** (phytohaemagglutinin)
ConA (Concanavalin A)
- monoklonálne protilátky proti receptorom a koreceptorom (**anti-CD3,+ anti-CD28**)
- bakteriálne antigény – **tetanický toxoid**,
tuberkulin



Kultivácia lymfocytov in vitro



- Pestovanie prebieha v definovanom bazálnom médiu – obsahuje cukry, AMK, vitamíny, stopové prvky atd. (+ ATB – penicilín, streptomycín) pri 37°C, 5% CO₂, 95% vlhkosť
- Normálne bunky majú obmedzenú dĺžku života- obmedzený počet delení
- Pomocou karcinogénnych látok alebo vírus (SV40, EBV) môžeme dosiahnuť transformáciu buniek na nesmrteľné a vytvoriť tzv. bunkové línie

Jurkat- ľudské leukemické bunky produkúce IL-2

HL-60- ľudské bunky odvodené od myeloidných leukemických buniek

- Cesta, ktorou bolo objavených mnoho funkcií cytokínov a rast.faktorov



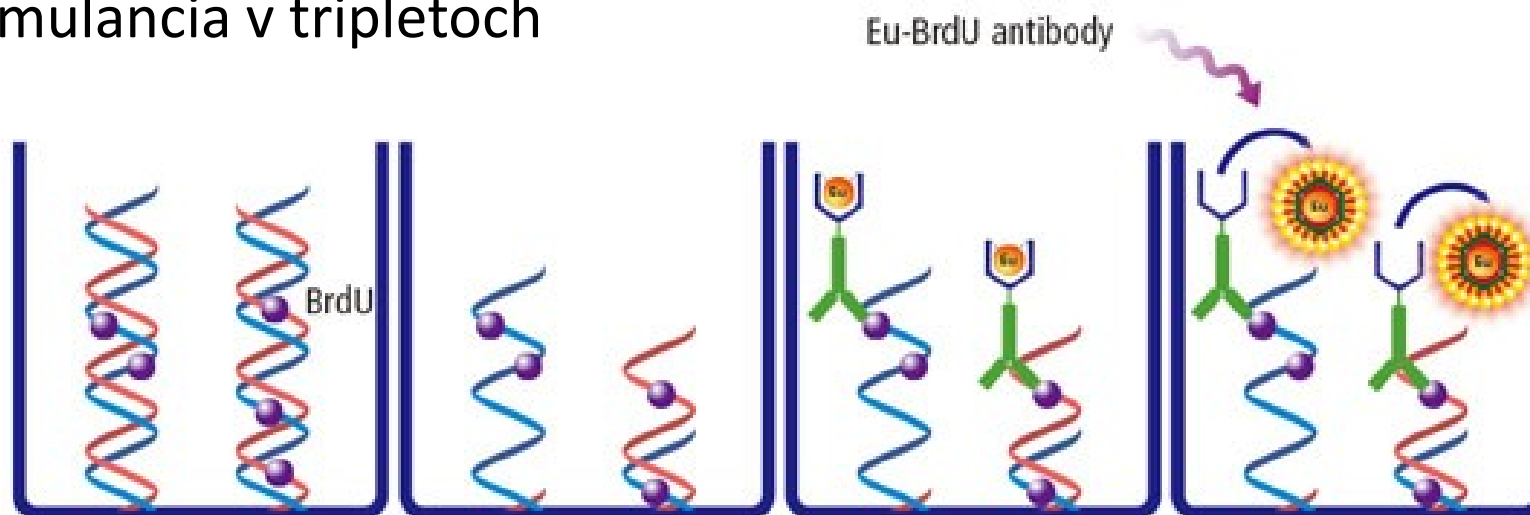
3. DELFIA (PerkinElmer)

- BrDU- **B**romo**D**eoxy**U**ridin
 - analóg Tymidínu

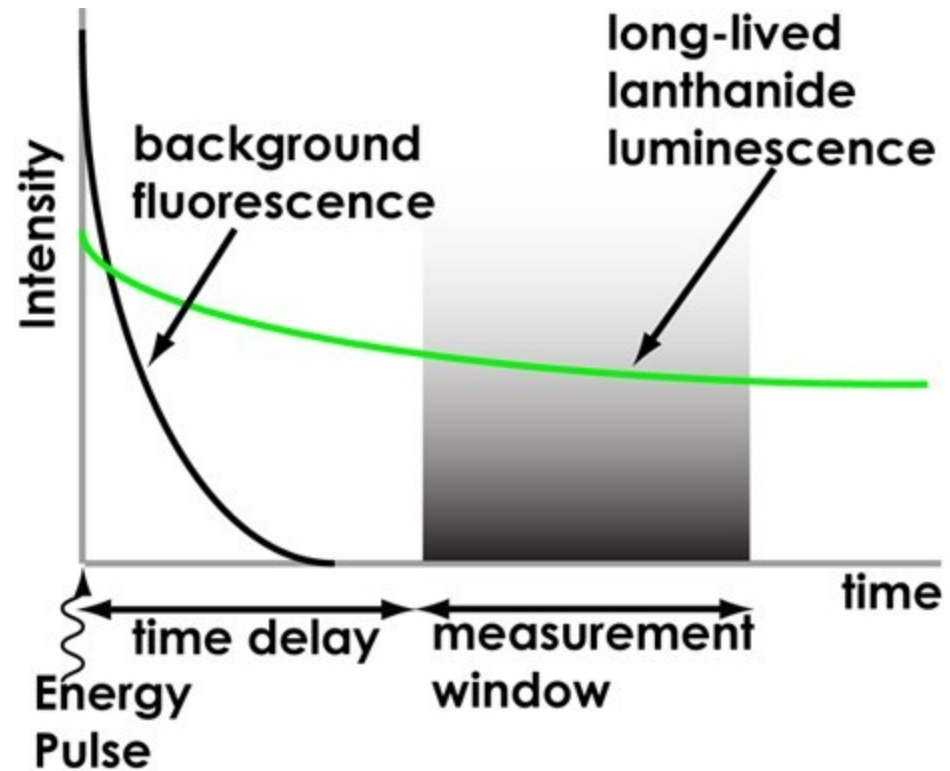
- Eu- Európium

- Detekcia novo syntetizovanej DNA pomocou BrDU, začlení sa do novo vznikajúcej DNA, BrdU je potom detekované pomocou protilátky anti-BrdU značenej Eu

- jednotlivé stimulancia v tripletoch



TRF- Time resolved fluorescence



Výsledok DELFIA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	316	390	490	475	510	400	446	595	470	335	470	466
B	N	2000	2080	2610	1940	1995	1885	465	620	595	465	546
C	CD3	140195	151035	123360	106725	118625	118470	300	610	600	475	610
D	PHA 5	62790	100765	98380	55570	54025	64945	665	470	445	520	440
E	PHA 2	43145	47365	36225	11460	9575	12840	470	425	375	520	605
F	ConA 2,5	61915	68675	55965	78825	58865	89805	625	640	525	570	555
G	ConA 1	30045	30015	29490	36655	43865	44170	490	375	460		
H		425	495	475	345	310	545	530	535	365		

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	295	320	415	270	345	440	405	625	345	255	310	445
B	N	1785	1700	1510	1505	2790	2200	365	425	485	400	325
C	CD3	108820	92780	66960	116415	112115	108760	375	390	475	325	430
D	PHA 5	32295	29635	24970	106190	106035	90865	365	320	380	415	370
E	PHA 2	7185	6475	4490	50205	47085	45995	435	300	345	365	405
F	ConA 2,5	48050	49670	46200	161830	116675	100380	445	290	500	455	450
G	ConA 1	25230	23305	19890	96295	78885	60965	460	425	610	300	370
H		330	455	440	375	385	380	465	500	425	490	450

4. Cytometrické stanovenie – Ki-67

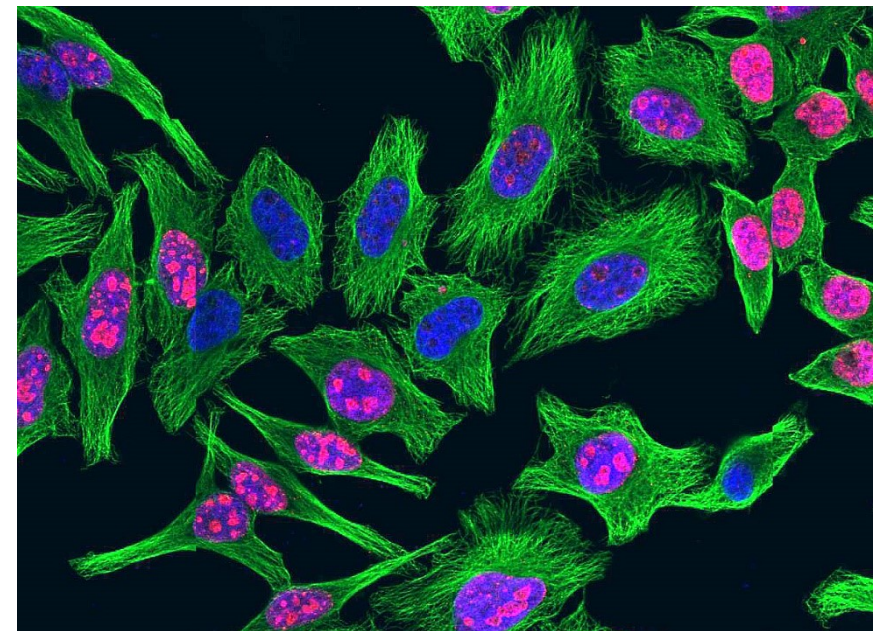
- Ki-67 - jadrový proteín
- asociovaný (možno nevyhnutný) s bunečnou proliferáciou a s transkripciou rRNA
- interfáza- bunečné jadro
- mitóza- povrch chromozómov
- prítomnosť G1, S, G2, mitóza
- absencia G0

HeLa cells

Ki-67 proteín (červená)

tubulín (zelená)

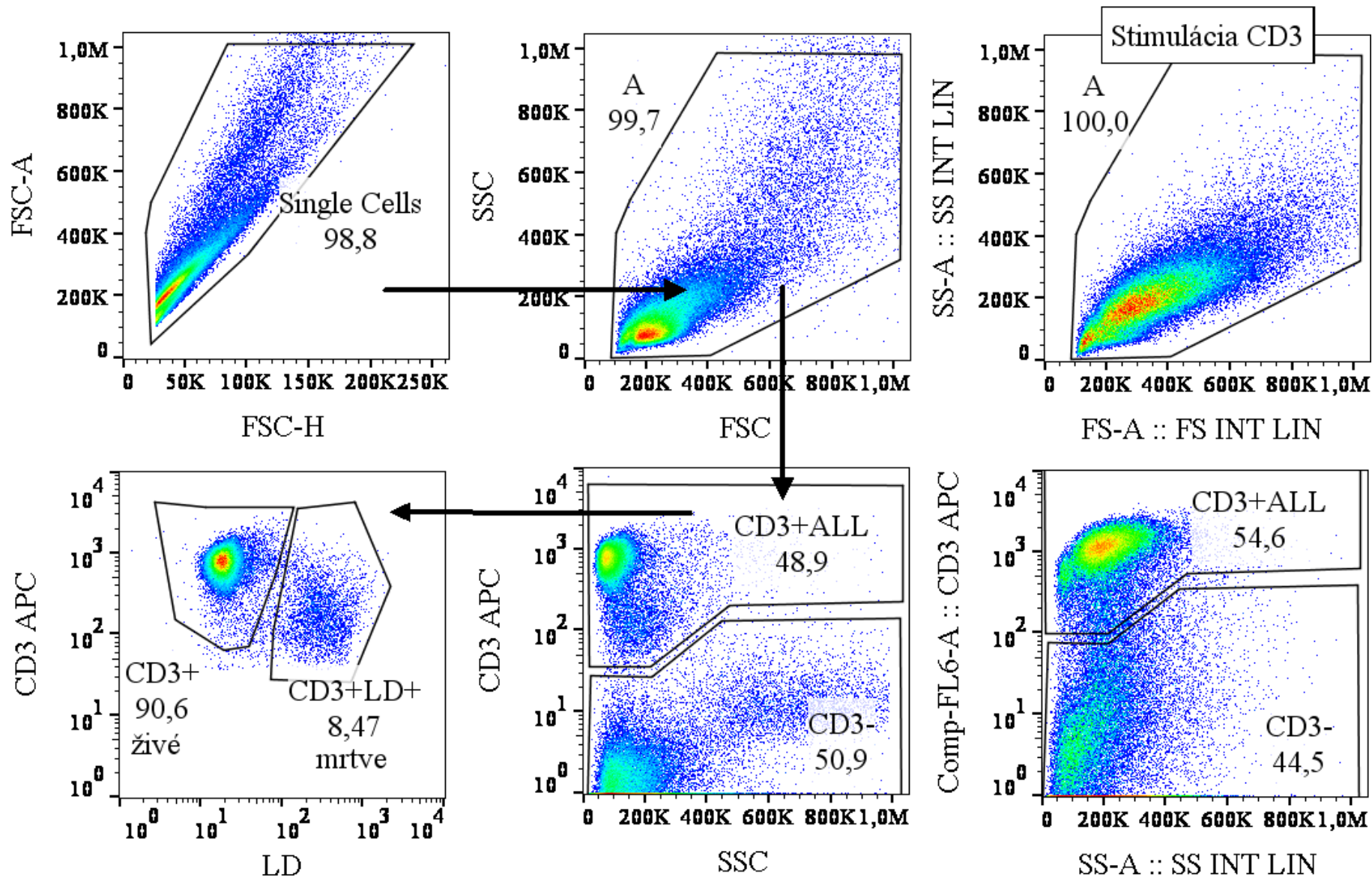
DNA (modrá)



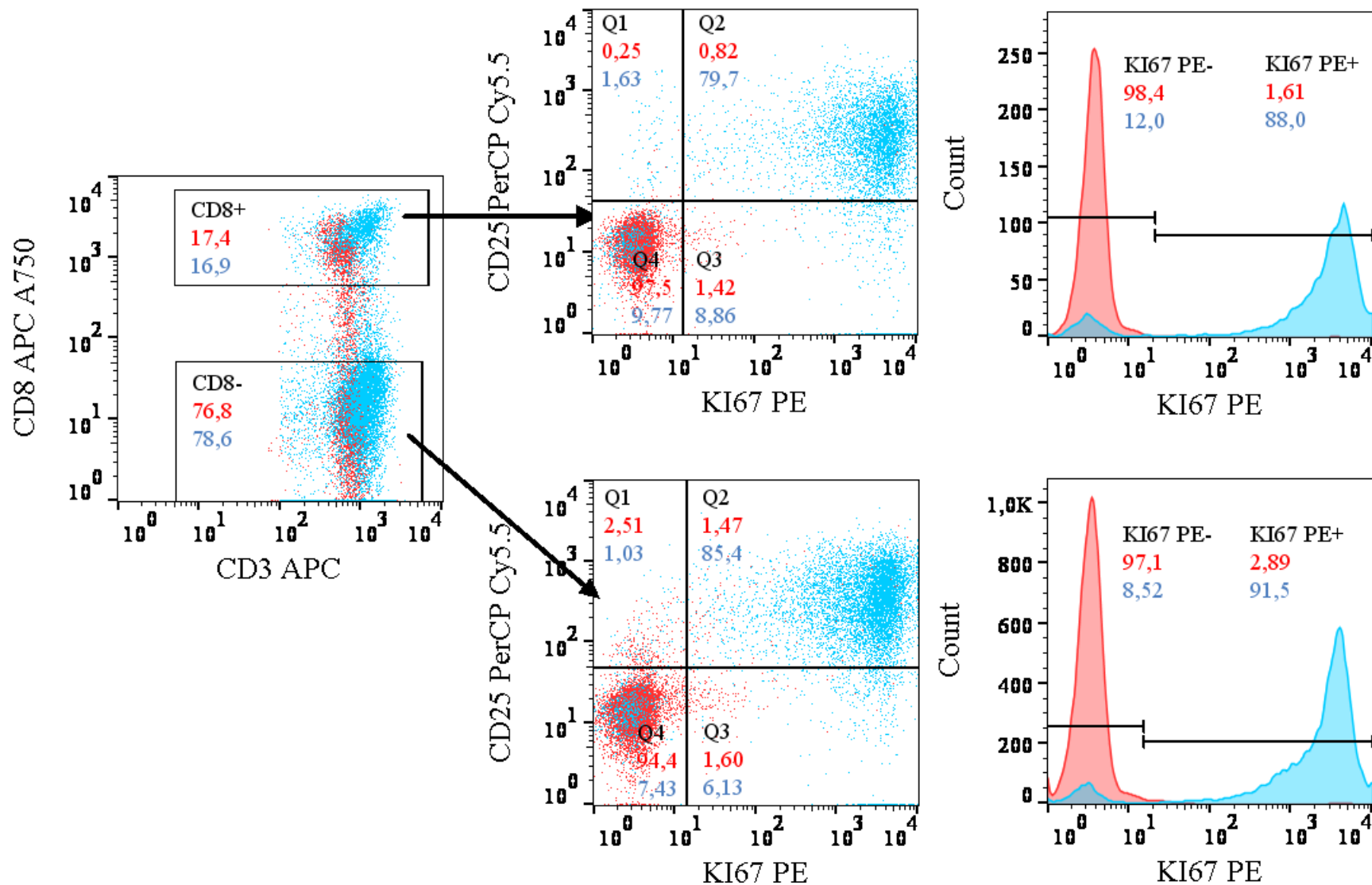
Spracovanie

- značenie L/D- 30 min
- extracelulárne značenie (CD25 PerCP Cy5.5, CD8 APC A750)- 30 min
 - CD25- súčasť receptoru pre IL-2 (α reťazec)
- fixácia (paraformaldehyd)- 60 min
- permeabilizácia (metanol?) + intracelulárne značenie (CD3 APC, Ki-67 PE)- 30 min

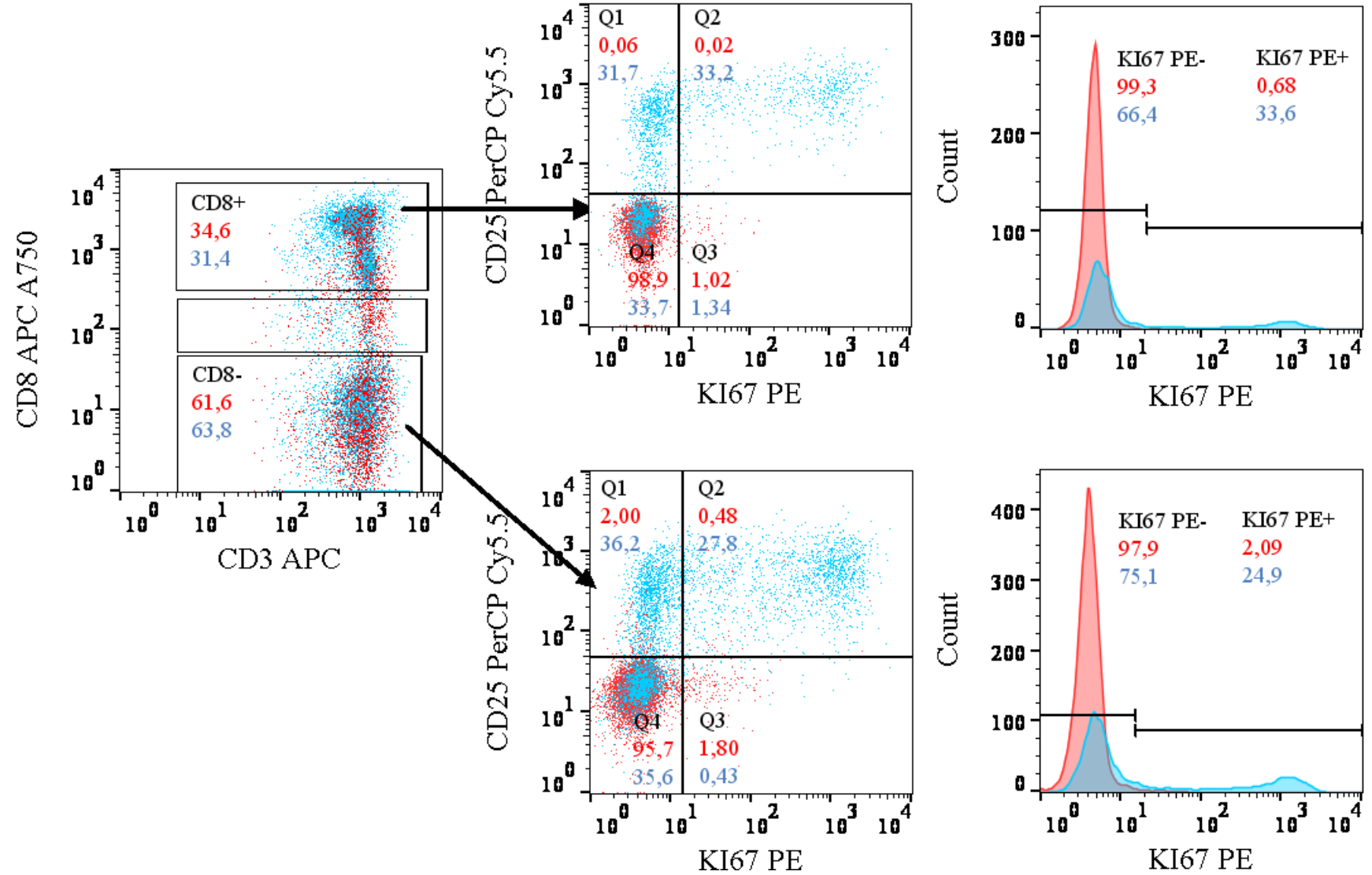
Gatovacia stratégia

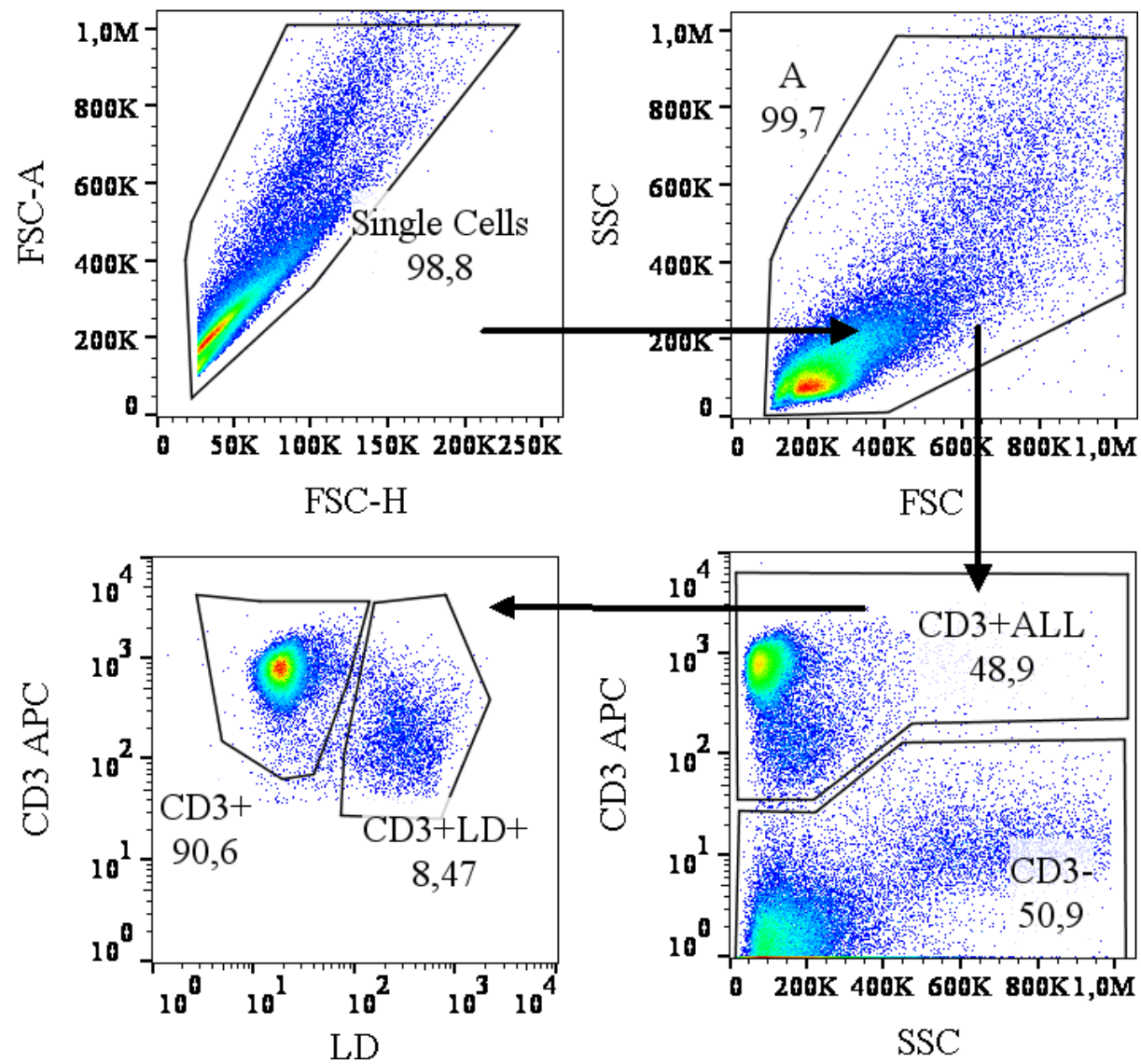


Gatovacia estratègia



Patient 1: ↓ *expression* Ki-67

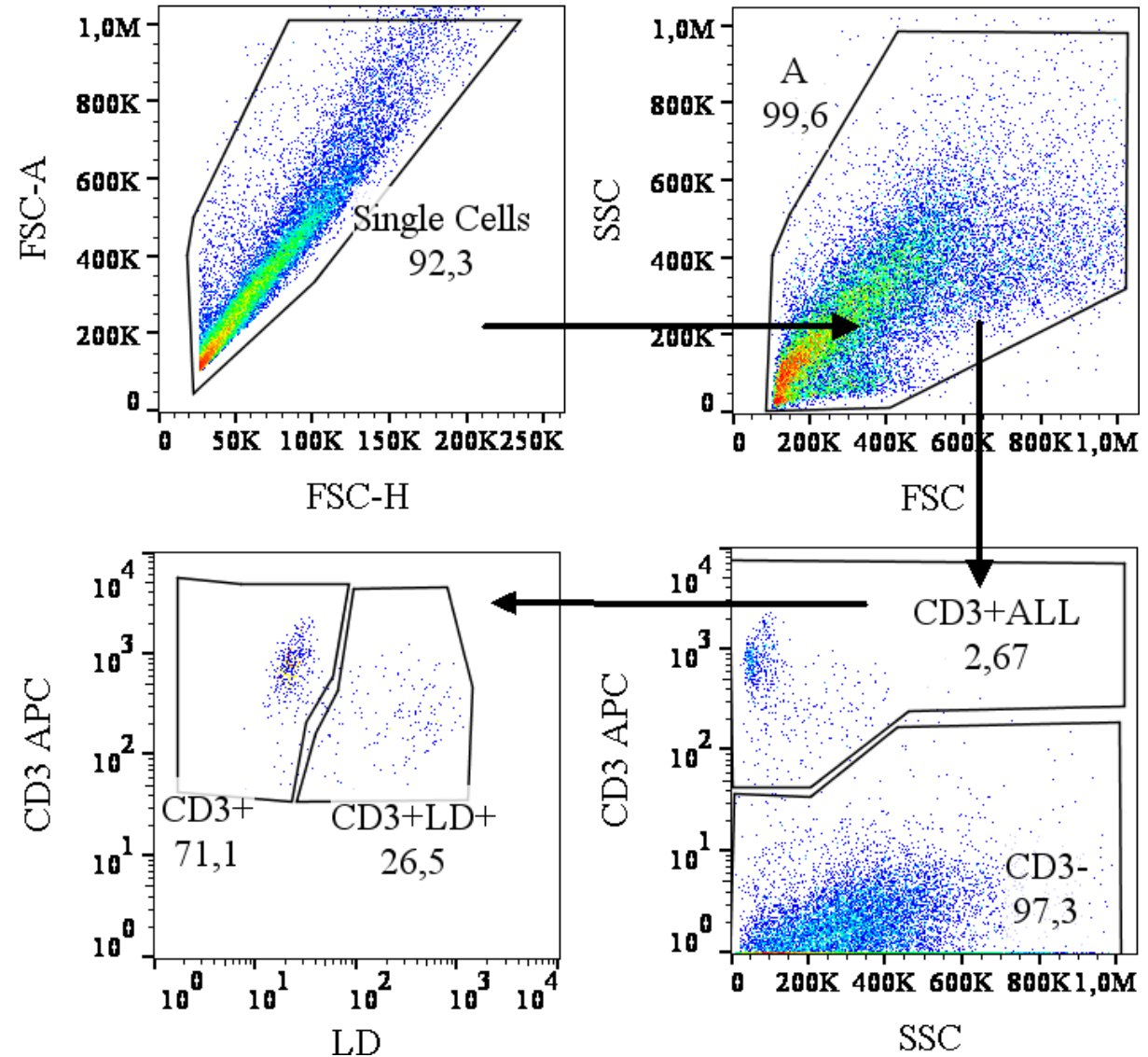




Pacient 2:

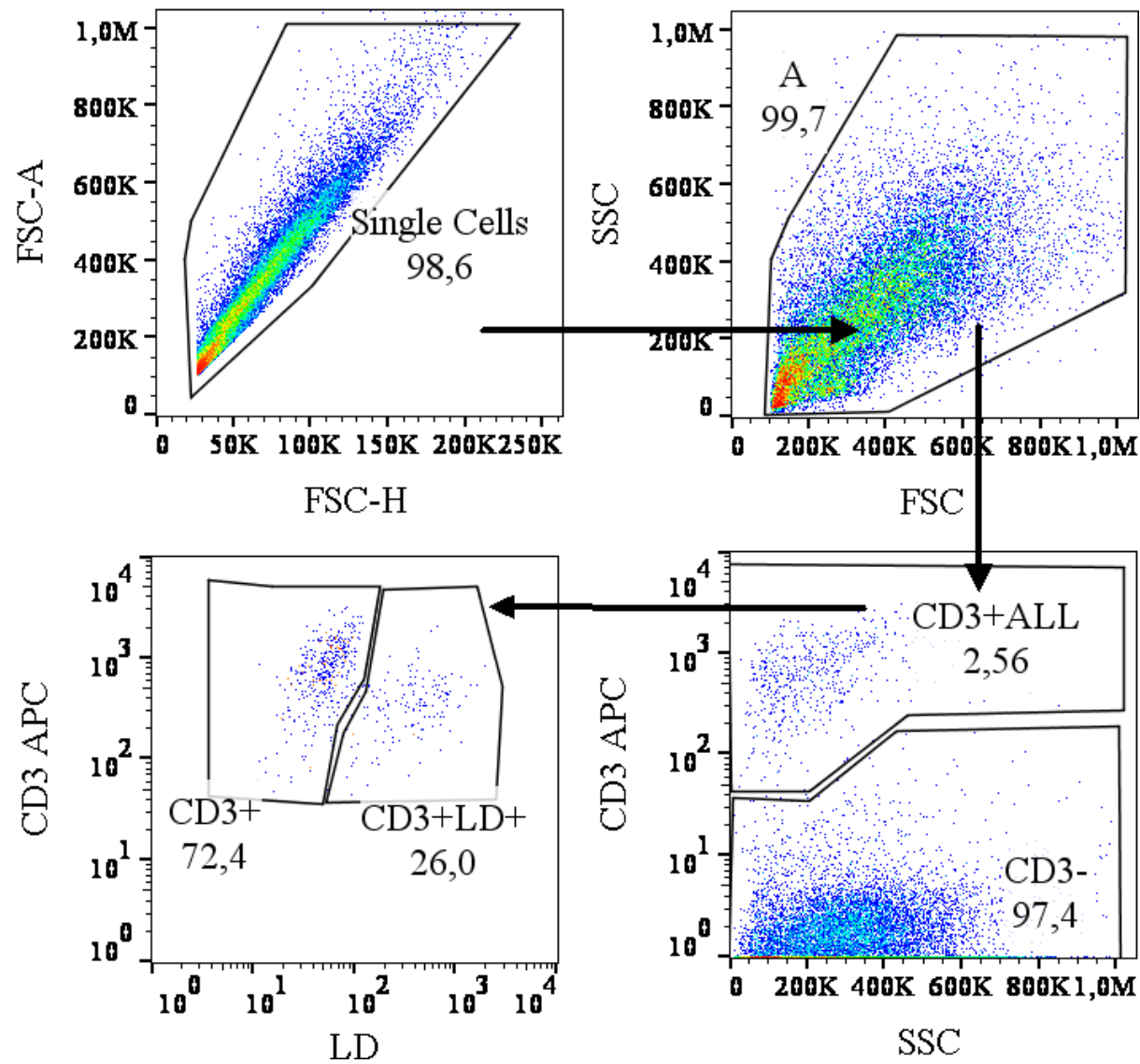
↑ apoptóza buniek

• nestimulované

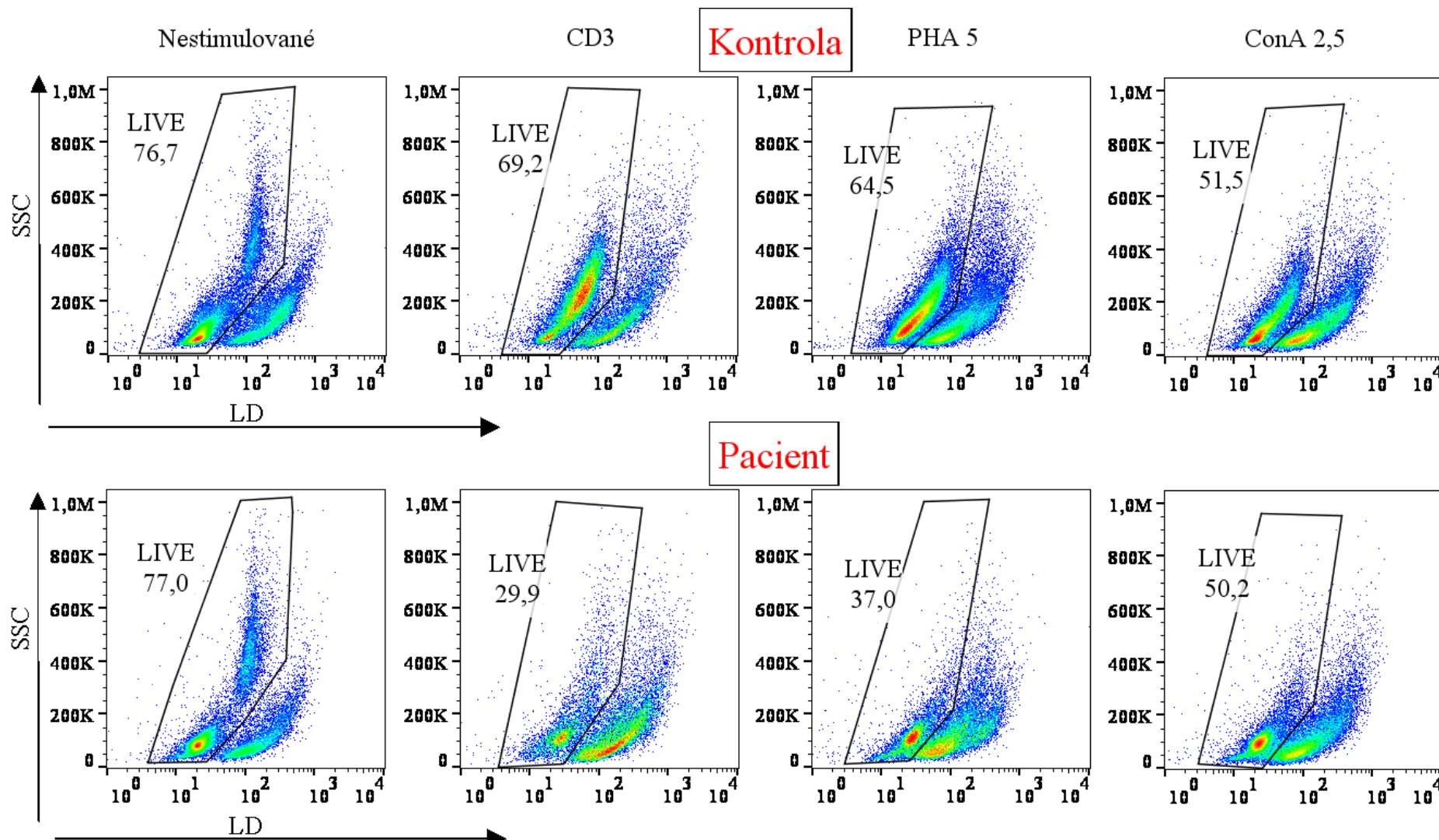


Pacient 2:
↑ apoptóza buniek

- stimulácia aCD3



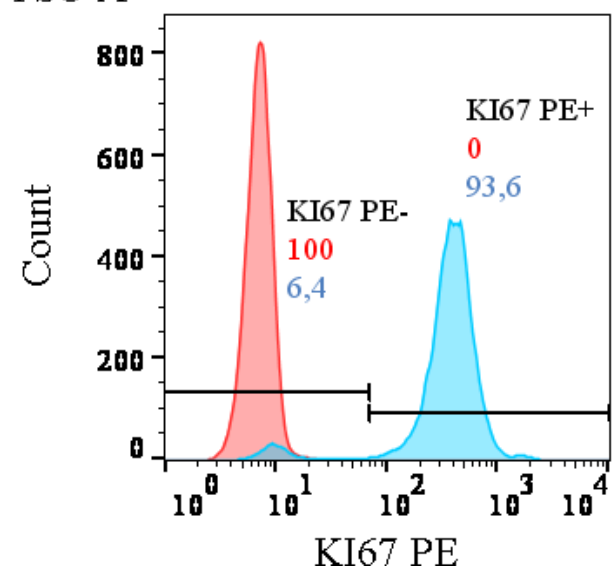
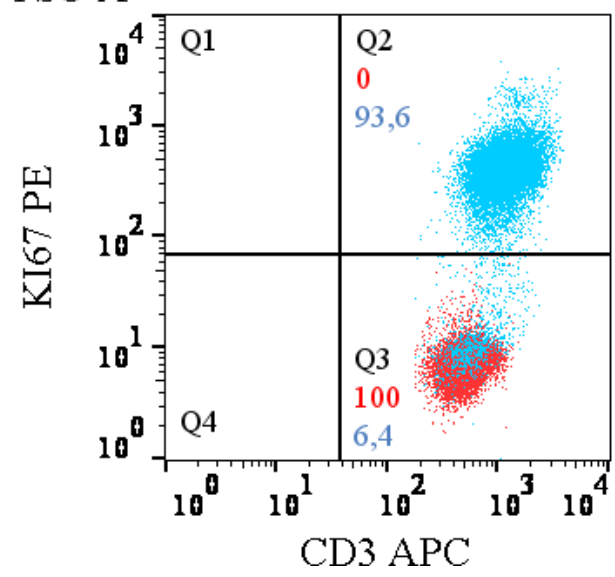
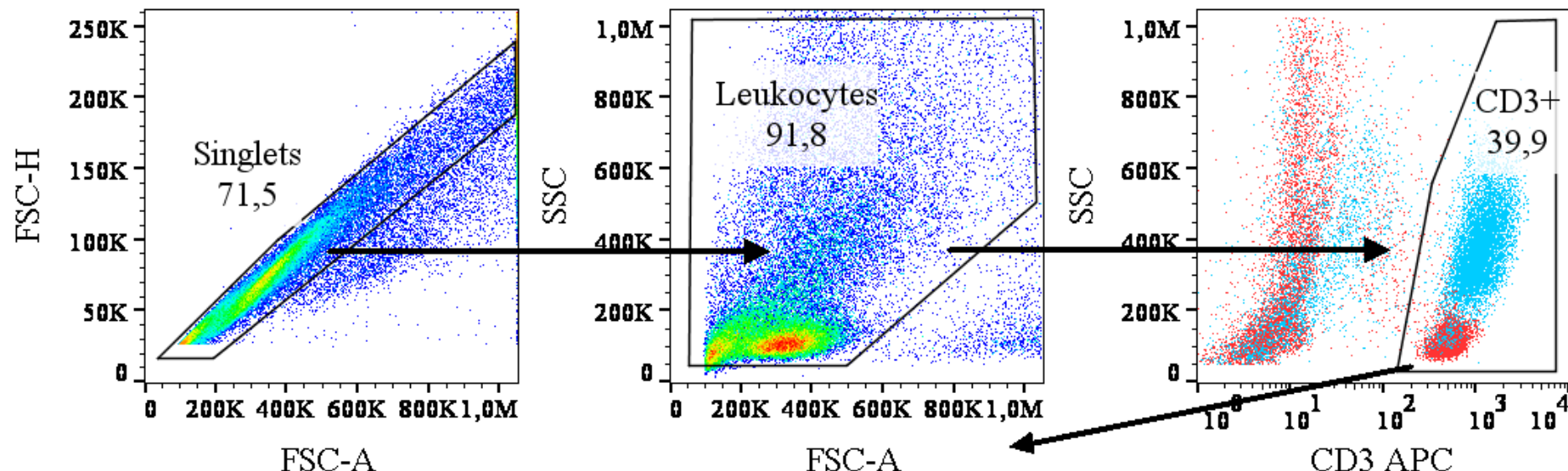
Pacient 3: silnejšia stimulácia → zvýšená úmrtnosť bb



EXBIO Ki-67 KIT

- Stimulancia lyofilizované v skúmavkách
- Krv odobraná do heparínu
- Všetky potrebné reagensie prítomné v sete
- Detekcia: CD3 + Ki67
- Štandardizovaný a testovaný postup





Gatovacia su alogia

Porovnanie metód

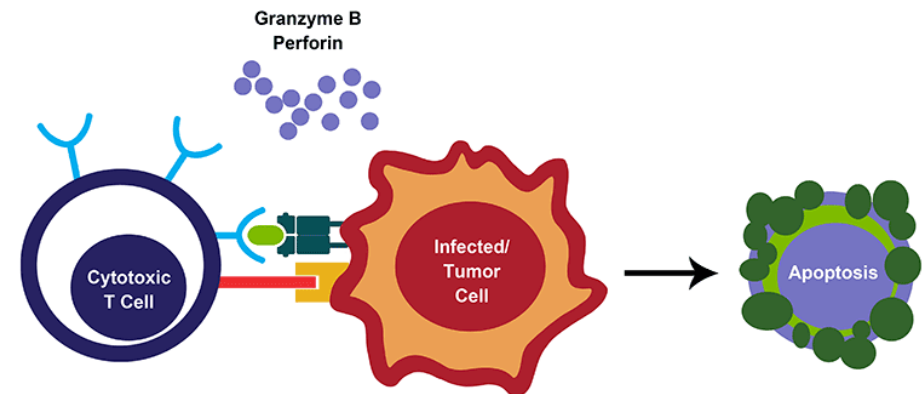
Test	Čas			Cena	Výhoda	Nevýhoda
	nasadenia	spracovania	merania			
DELFIG	2,5 hod	2,5 hod	15 min	1500 Kč	cena	náročnosť
Ki-67	2,5 hod	3 hod	1 hod	2500 Kč	informácie	cena
EXBIO	15 min	1,5 hod	1 hod	1450 Kč	cena a čas	?

Proliferačné vyšetrenie

- Výsledok: porovnanie kontrola vs. pacient
 - počet zábleskov (DELFI)
 - % Ki67⁺ buniek (cyt. stanovenie)
- Kontrola prevedenia: odber?, viabilita buniek po izolácii PBMC?, spotrebované médium?,
- Cytometer: dostatok buniek na analýzu, veľkosť FSC vs. SSC, L/D, % Ki67⁺ CD3⁺ buniek
- Neg. výsledok = overenie a následné monitorovanie stavu (častejšie kontroly)

Cytotoxický test

- Schopnost **CD8 T-lymfocytů a NK buněk** zabít jiné buňky pomocí systému **granzym/perforin**
- Provedení:
- V testu musí být kromě pacienta zpracována i zdravá kontrola! (aby bylo pacienta s čím srovnat)
 1. Izolace CD8 T-lymfocytů/NK buněk pacienta a kontroly
 2. Aktivace *in vitro* pomocí polyklonální stimulace (PHA) + namnožení (IL-2) → efektorové buňky
 3. Příprava cílových buněk – označení nádorových buněk pomocí radioaktivně značeného ^{51}Cr
 4. Smíchání konstantního množství cílových a efektorových buněk → pokud je systém granzym/perforin funkční, dojde k apoptóze rakovinných buněk a ^{51}Cr se uvolní do supernatantu
 5. Měření gama záření v supernatantu



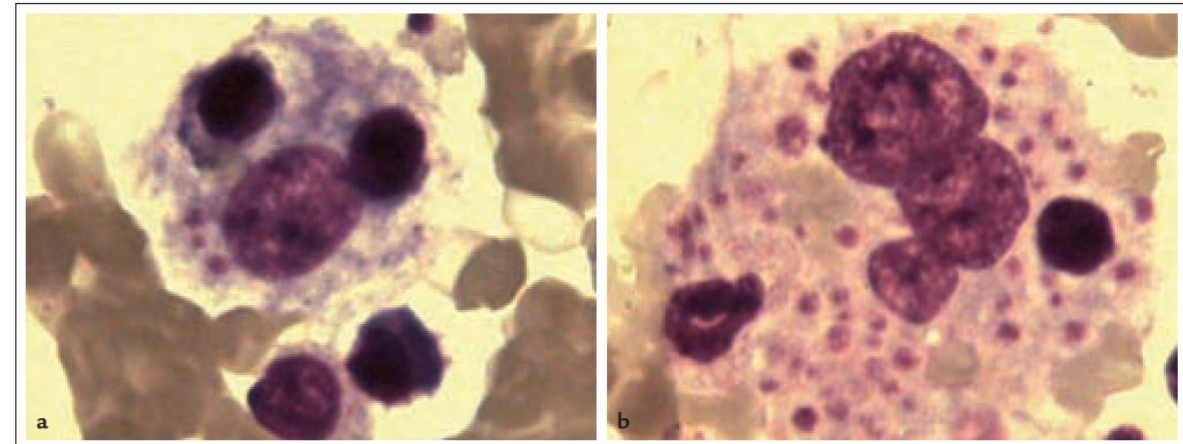
Cytotoxický test

- Nevýhody
 - Aktivace a namnožení buněk trvá dlouho (týdny) – nutné po celou dobu držet sterilní podmínky
 - ^{51}Cr se z rakovinných buněk uvolňuje i spontánně, zdlouhavá příprava
 - Práce s radioaktivitou – pouze určitá pracoviště

Cytotoxický test - uplatnění

- Diagnostika **familiární hemofagocytující lymfohistiocytózy (HLH)**

- Nejčastější příčina - mutace v genu pro perforin
- CD8 T-lymfocyty a NK buňky nejsou schopny cytotoxicky likvidovat virem napadené buňky, ale mají zachovalou schopnost aktivace, proliferace a produkce cytokinů
- Virová infekce – nejčastěji EBV → nadměrná produkce INF- δ → aktivace makrofágů → nadměrná proliferace a produkce IL-6, IL-1, TNF → cytokinová bouře → horečka, splenomegalie, hemofagocytóza v kostní dřeni
- Test cytotoxicity – výrazné snížení/absence schopnosti cytotoxicky likvidovat cílové buňky
- Léčba – transplantace KD
- *Expresi perforinu lze vyšetřit i pomocí průtokové cytometrie – intracelulární detekce pomocí fluochromem značené mono-klonální Ab proti perforinu*

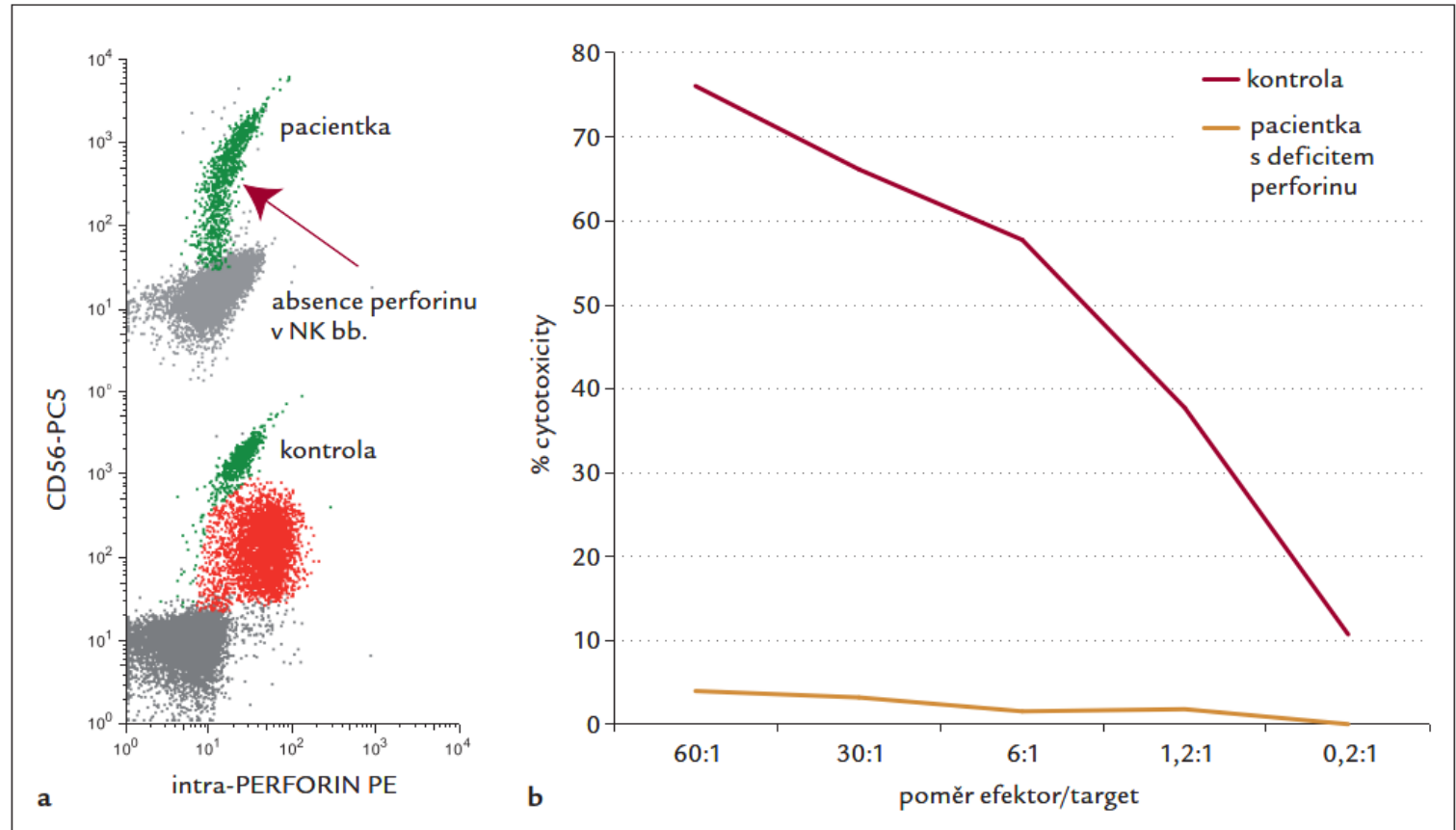
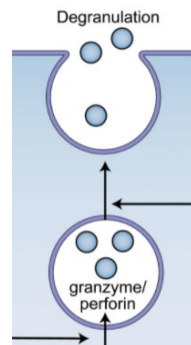


Makrofágy v KD s pohlcenými RBC, jádry buněk a trombocyty

Cytotoxický test - uplatnění

Detekce perforinu v CD8/NK buňkách pomocí průtokové cytometrie:

- Nejprve je nutné buňky **fixovat** (4% formaldehyd) a **perforovat** buněčnou membránu (saponin, triton X-100)
- Poté protilátka značená fluorochromem pronikne skrze membránu a naváže se na perforin intracelulárně (v granulích)



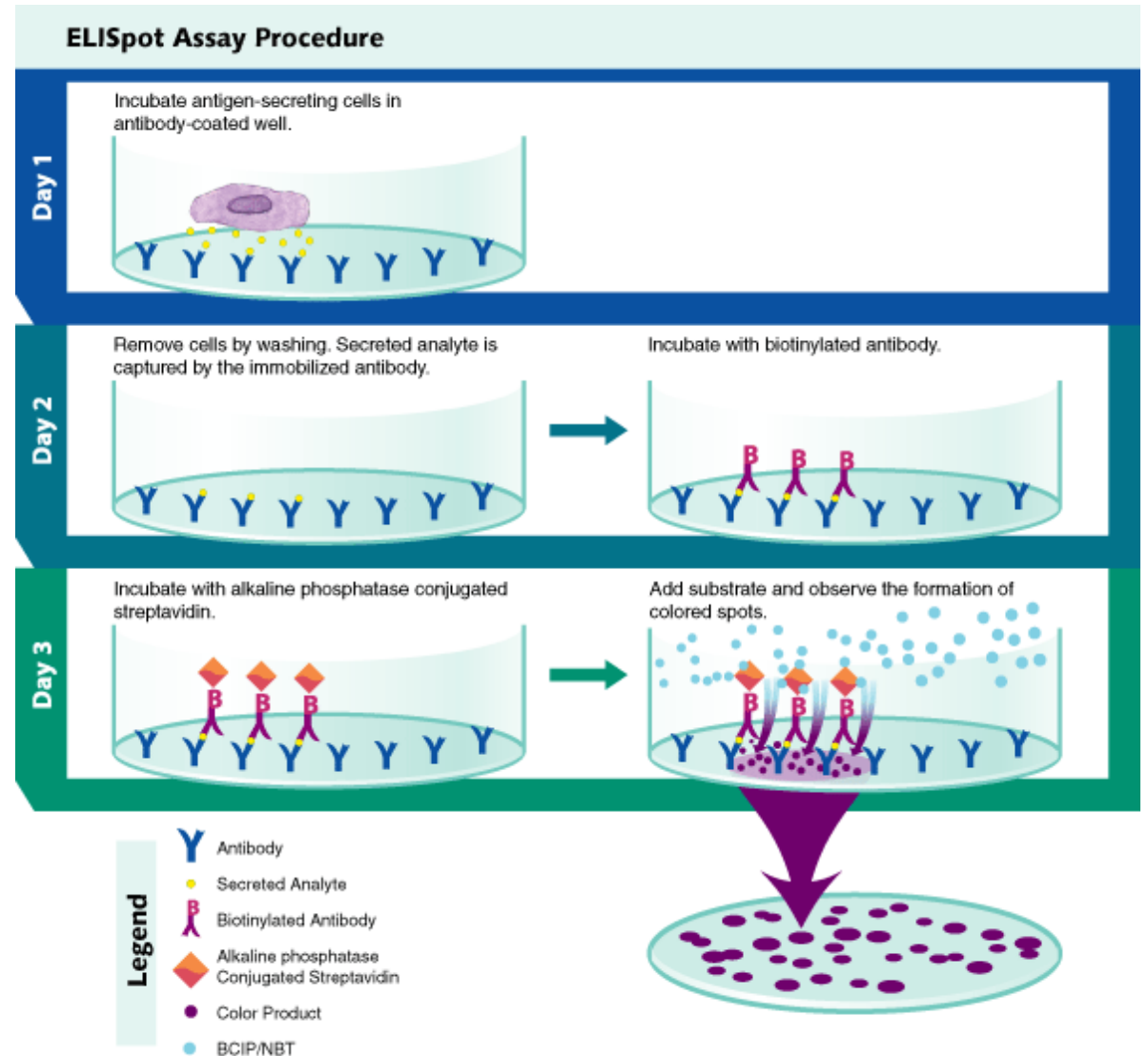
Obr. 6. FHL – imunologická diagnostika.

6a: Průkaz deficitu perforinu v NK buňkách metodou FACS – absence signálu při dvoubarevné CD analýze u pacientky s FHL (řádek 1) ve srovnání se zdravou kontrolou (řádek 2).

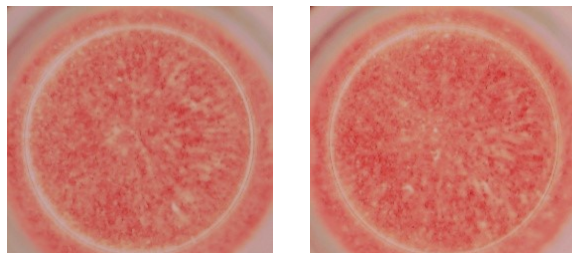
6b: Patologický test cytotoxické funkce T lymfoblastů – významně deficitní odpověď u pacientky č. 1 ve srovnání se zdravou kontrolou.

ELISPOT a FLUOROSPOT

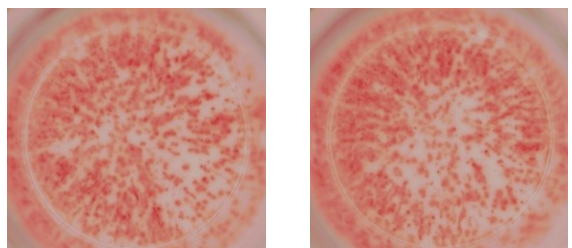
- Sledování produkce cytokinů T-lymfocyty a cytokinů a protilátek B-lymfocyty
- Analýza na úrovni 1 buňky
- Princip:
 - Stimulace izolovaných buněk
 - Nasazení buněk do ELISPOT destičky, její dno je pokryto protilátkou proti hledanému analytu
 - Buňka produkuje cytokin → jeho zachycení protilátkou v bezprostředním okolí buňky
 - Detekce cytokinu pomocí detekční protilátky značené:
 - U ELISPOTU enzymem → substrát → barevný produkt na dně membrány (spoty)
 - U FLUOROSPOTU fluorochrom → osvit excitačním zářením → světelná emise (svítící spoty na černém pozadí)



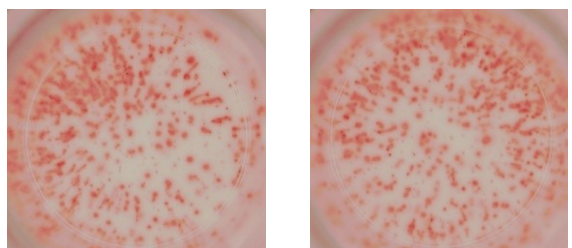
ELISPOT



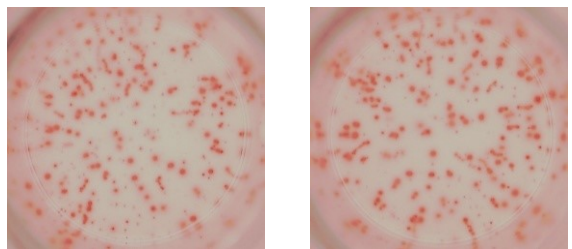
5×10^5 7 dní po očkovaní



$2,5 \times 10^5$



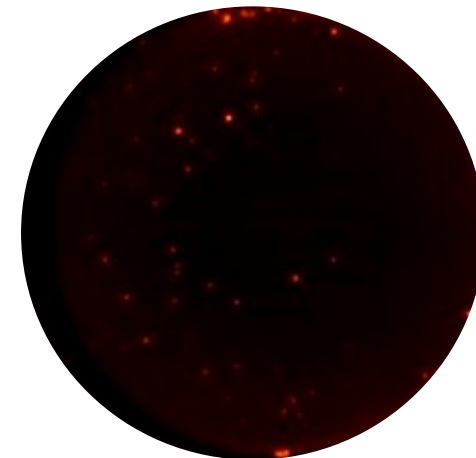
$1,25 \times 10^5$



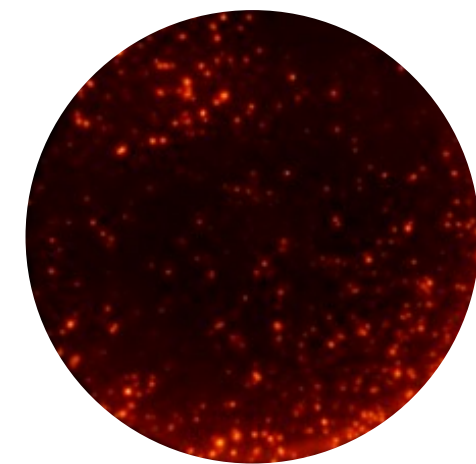
$0,63 \times 10^5$

Produkcia IL-10 B lymfocytmi

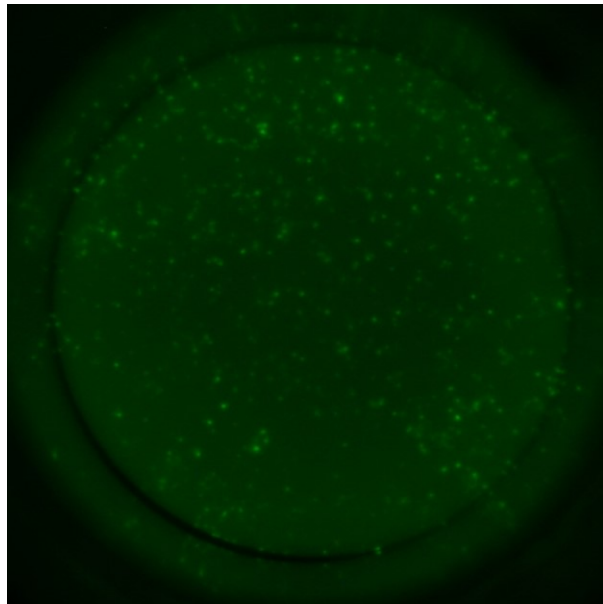
TNFR2-
B cells



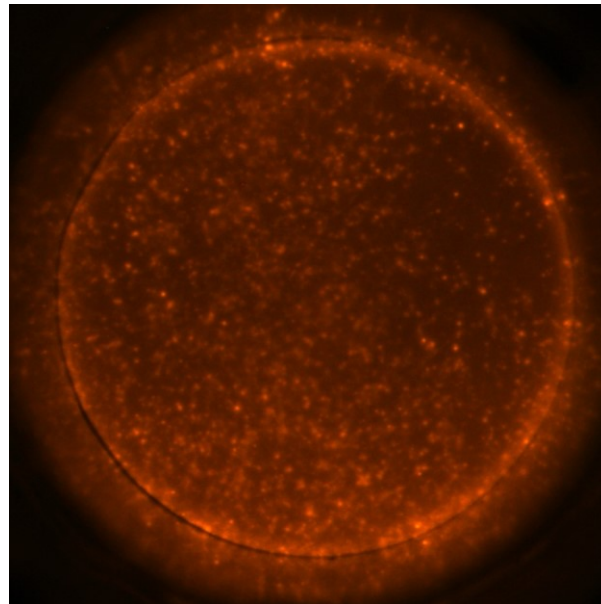
TNFR2+
B cells



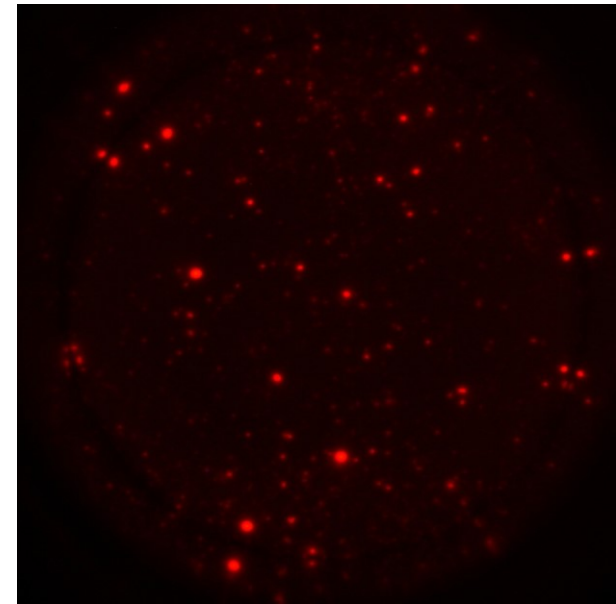
FluoroSpot – B- lymfocyty



FITC – IgG



Cy3 – IL10



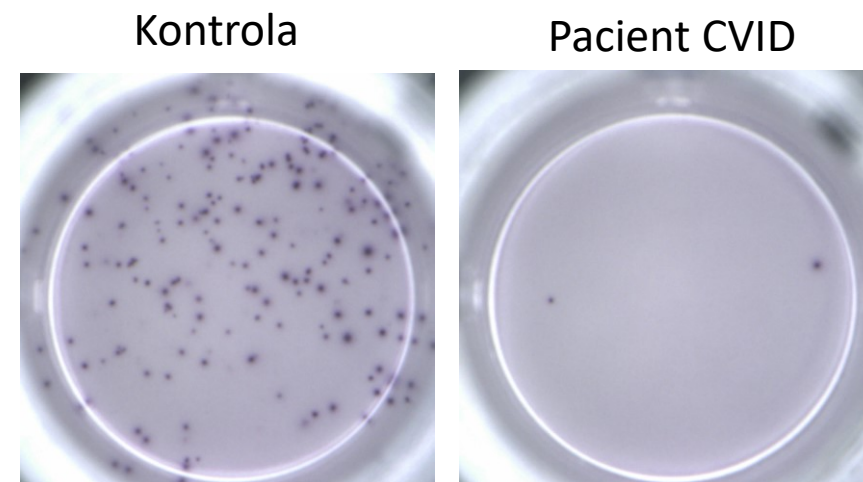
Cy5 – IgM

Po stimulácii CpG ODN

Využití ELISPOTu/FLUOROSPOTu

Doplňková diagnostika protilátkových imunodeficitů:

- CVID → pacienti přijímají intravenózní Ig → při rutinním nefelometrickém stanovení měříme hladinu Ig z infuze, ne jejich vlastní Ig
- Nevíme, zda a kolik Ig tvoří samotné B-lymfocyty pacientů (např. jsou schopni pacienti reagovat na vakcinaci?)
- Vakcinace pacientů/izolace B-lymfocytů a stimulace *in vitro* → nasazení B-lymfocytů na ELISPOT
- Sledování odpovědi na úrovni 1 buňky

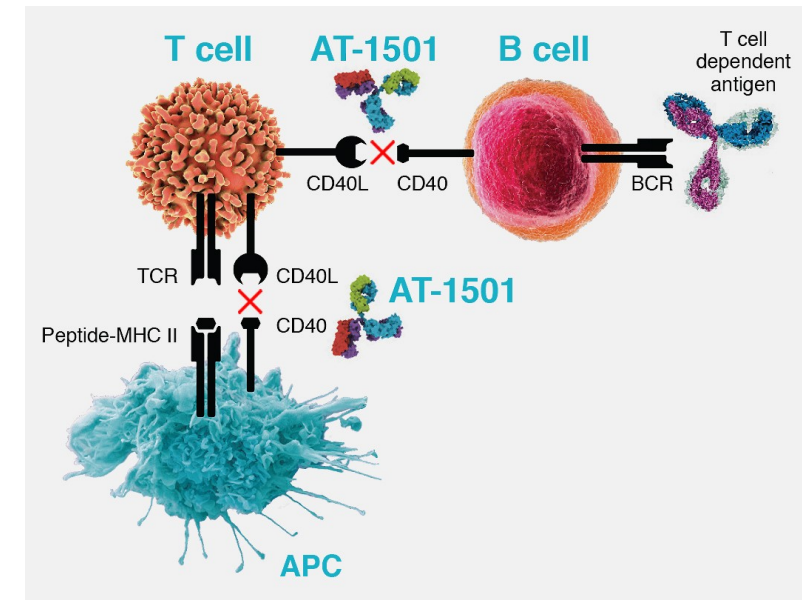


Pacient CVID vakcinován tetanickým toxoidem → sledování produkce specifických protilátek ve třídě IgG po 14 dnech od vakcinace

X-vázaný Hyper-IgM syndrom

Defekt CD40L

- Příčina – mutace v genu pro CD40L → deficit → selhává izotypový přesmyk v B-lymfocytech, tvoří se pouze IgM
- Klinický obraz:
 - Od časného dětství recidivující respirační infekce (oportunní patogeny - *Pneumocystis jiroveci*, CMV, mykobakteria)
 - Chronické průjmy (kryptosporidiová infekce)
 - Neutropenie
 - Zvýšené riziko malignit
- Diagnostika:
 - Nefelometrie – vyšetření hladin IgG, IgA, IgE (snížené), IgM (norma, zvýšené)
 - Průtoková cytometrie – B lymfocyty - většina je naivních, paměťové formy téměř chybí
 - **Průtoková cytometrie – stanovení exprese CD40L na CD4 T-lymfocytech**
 - Genetické vyšetření – potvrzení mutace v genu pro CD40L
- Léčba – intravenózní imunoglobuliny



Stanovení upregulace CD40L na T-lymfocytech

diagnostika X-vázaného hyper-IgM syndromu

Provedení:

1. Izolace PBMC
2. Stimulace lymfocytů pomocí PMA+ionomycin (4 h, 37 stupňů, 5 % CO²) → lymfocyty se aktivují a zvyšují expresi CD40L (CD154) na svém povrchu
3. Označení lymfocytů pomocí monoklonálních protilátek (anti-CD3, CD8, CD25, CD69, CD40L)
4. Promytí
5. Měření na průtokovém cytometru

Interpretace:

- **Negativní kontrola** - nestim. bb. - modrá – nízký signál, pík vlevo – v pořádku)
- **Zdravá kontrola** po stimulaci CD40L navýšila
- **Pacient** po stimulaci CD40L nezvýšil (srovnatelný s negat. kontrolou)
- **Matka pacienta** – dvojitá populace lymfocytů – jedna populace CD40L po stimulaci zvýšila, druhá ne → matka je přenašečkou mutace (X chromozom → postižení muži)

