

Aplikace průtokové cytometrie v klinické imunologii a hematologii

Lukáš Kubala
kubalal@ibp.cz

Laboratoř patofyziologie volných radikálů
BFÚ AV ČR

Imunologie - Stanovení statusu imunitního systému

- Vrozené nebo získané imunodeficience
 - monitorování HIV pozitivních pacientů a stanovení efektivity terapie
 - monitorování efektivity imunosupresivní terapie u transplantovaných pacientů
- Monitorování autoimunitních onemocnění a efektivity terapie

Hematologie

- Diagnóza maligních onemocnění
- Stanovení funkčních vlastností trombocytů

Metodologické přístupy

- Imunofenotypizace

Stanovení zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů (obecně krevních elementů v krvi nebo kostní dřeni)

- Funkční testy

- **Aktivace lymfocytů**

Změna exprese vybraných povrchových markerů (většinou receptory nezbytné pro funkci daného lymfocytu)

Indukce proliferace (stanovení buněčného cyklu)

Produkce cytokinů

Stanovení cytotoxicity NK buněk a cytotoxických lymfocytů

- **Aktivace fagocytů (mikrobicidní aktivita)**

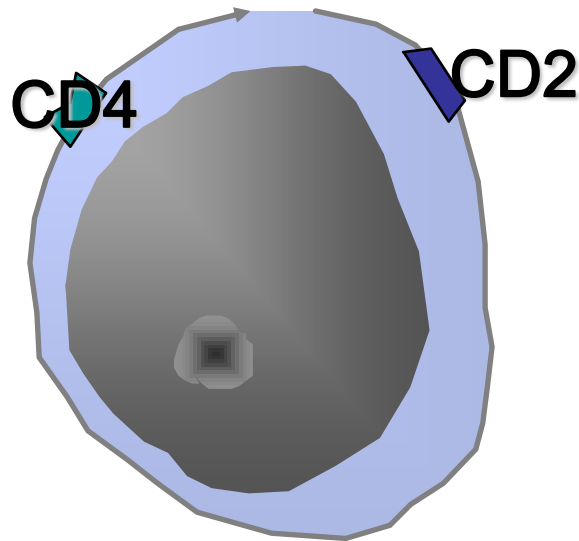
Produkce volných radikálů fagocyty

Fagocytární aktivita

- **Stanovení funkčních vlastností trombocytů**

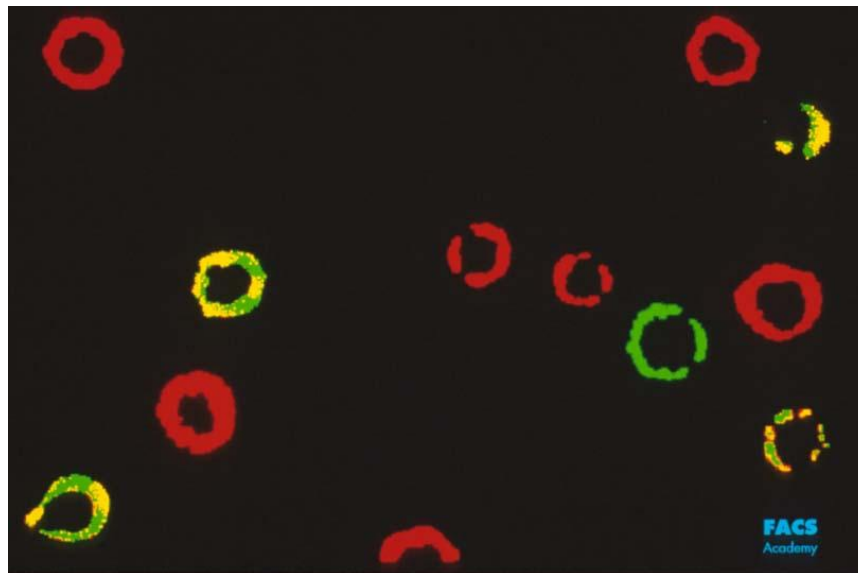
Imunofenotypizace

- Stanovení zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů na základě exprese vybraných povrchových antigenů případně v kombinaci s intracelulární produkcí cytokinů a expresí intracelulárních antigenů



Imunofenotypizace

- Na základě rozptylu světla jsou buněčné populace rozděleny podle velikosti a granularity
- Specifické monoklonální protilátky označené různými fluorochromy proti kombinaci vybraných antigenů umožňující rozdělení populací



CD Antigeny

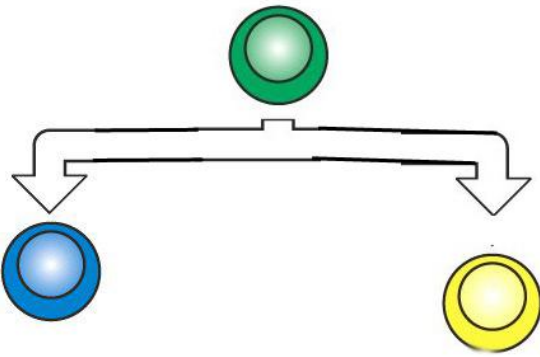
- Systém označení povrchových molekul leukocytů
- Většina má alternativní názvy vztahující se k jejich funkci nebo struktuře
- Dodnes definovány CD1 až CD350
- Některá CD jsou skupinami příbuzných molekul, a jednotlivé molekuly se označují písmeny (např. CD62L, CD62P, CD62E)
- Zdroj informací o CD nomenklatuře – učebnice imunologie, www např. PROW www.Ncbi.nlm.nih.gov/prow/

Expresie vybraných povrchových znaků během vývoje B lymfocytů

Vývojové stádium	Expresie vybraných povrchových znaků
Kmenová buňka	CD34
Časný pro-B lymf.	CD34; CD45R; IL-7R; CD10; CD19; CD38
Pozdní pro-B lymf.	CD45R; IL-7R; CD10; CD19; CD38; CD20; CD40
Velký pre-B lymf.	CD45R; IL-7R; CD19; CD38; CD20; CD25 (rec. IL-2); CD40
Malý pre-B lymf.	CD45R; CD19; CD38; CD20; CD40

Vývojové stádium	Expresie vybraných povrchových znaků
Nezralý B lymf.	CD45R; CD19; CD20; CD40
Zralý naivní B lymf.	CD45R; CD19; CD20; CD21; CD40
Lymfoblast	CD45R; CD19; CD20; CD21; CD40
Paměťová buňka	CD45R; CD19; CD20; CD21; CD40
Plasmatická buňka	CD135; CD38

Nezralé CD3-(jen v cytoplasmě)4-8-
dvakrát-negativní tymocyty



$\gamma:\delta^+ CD3^+ 4^- 8^-$

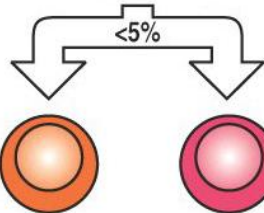
$pT\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^+$
velké dvakrát-
pozitivní tymocyty



$\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^+$
malé klidové dvakrát-
pozitivní tymocyty



>95%



$\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^-$ $\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^- 8^+$
malé jedenkrát-
pozitivní tymocyty



Export do periferie

Vývoj T-lymfocytů

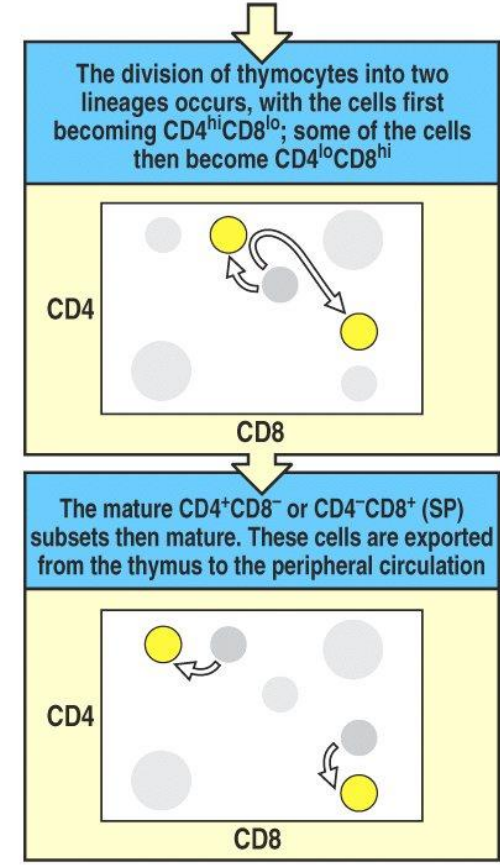
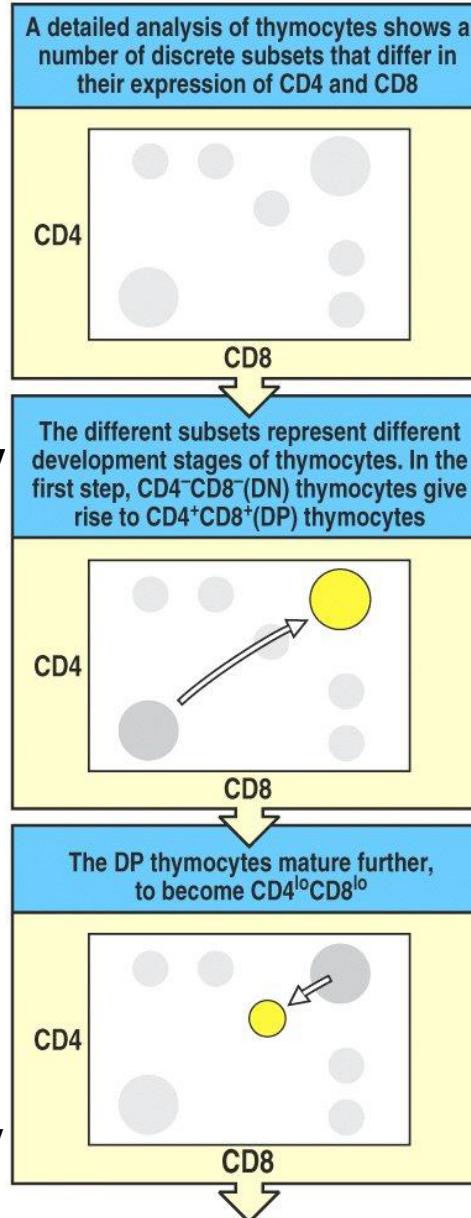
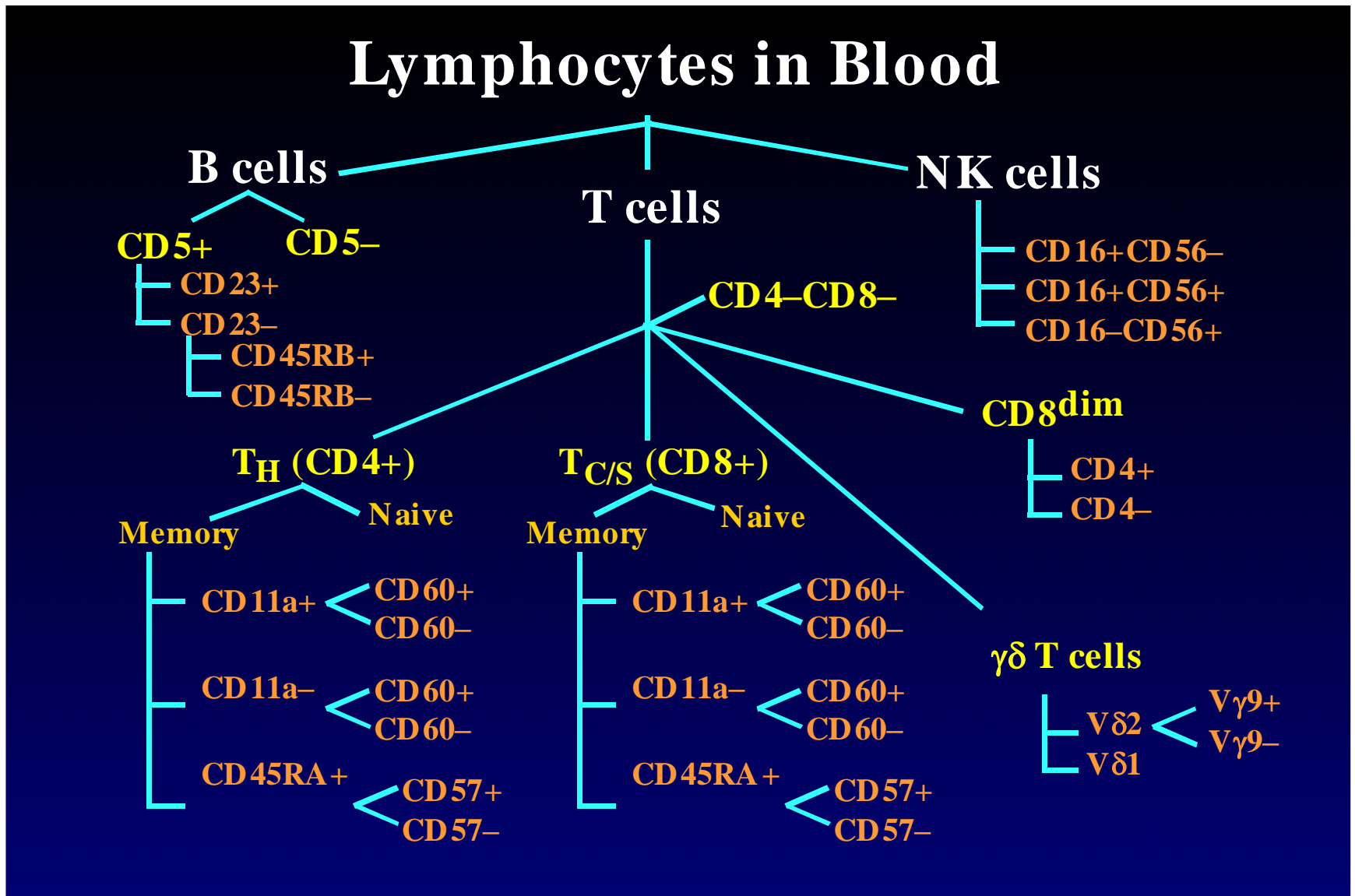


Figure 7-31 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

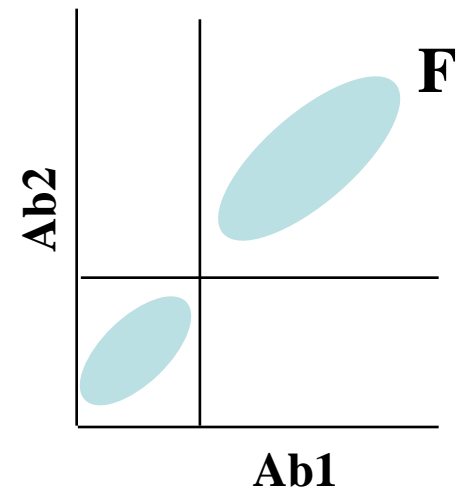
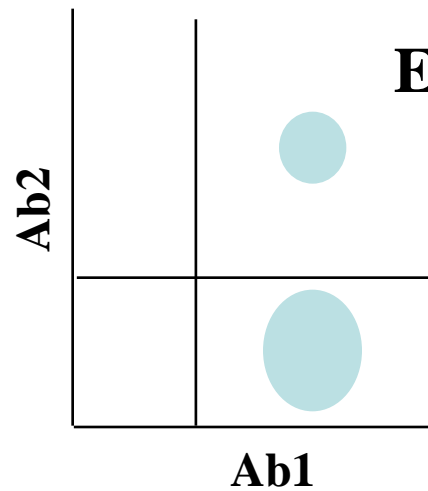
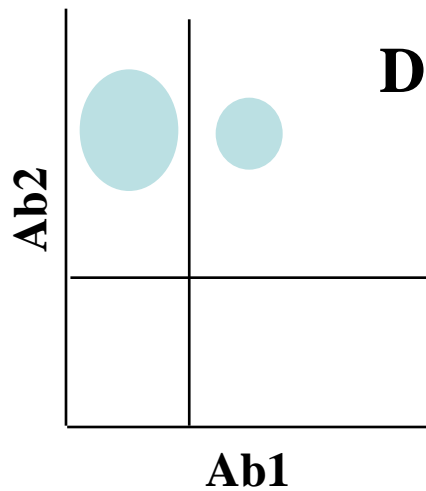
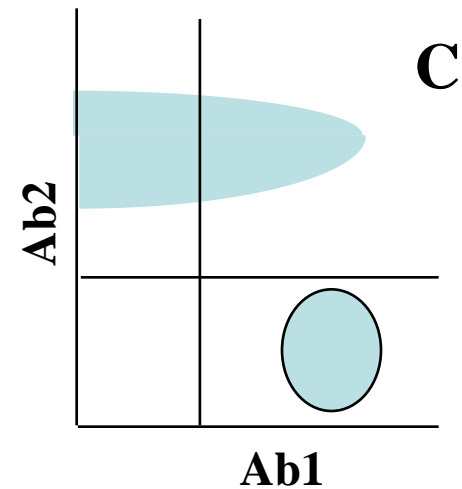
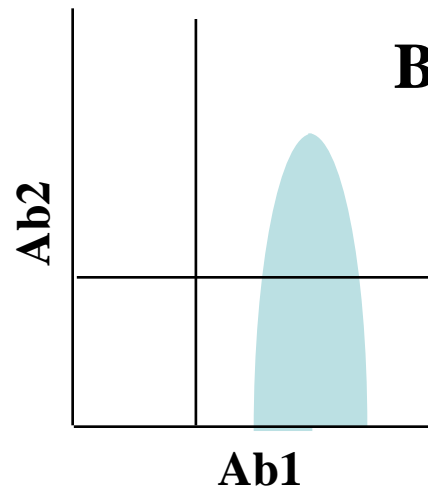
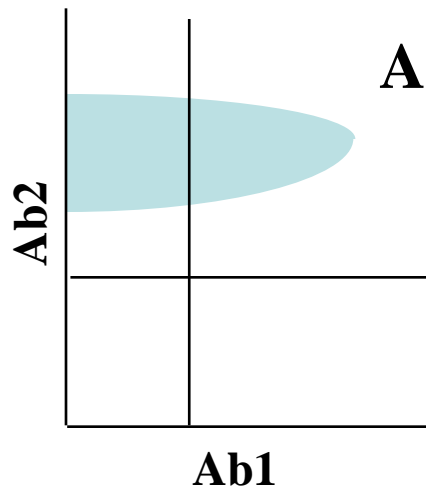
Možné rozdělení jednotlivých subpopulací lymfocytů podle exprese vybraných povrchových antigenů



Vybrané povrchové molekuly charakteristické pro různé typy leukocytů (“markery” jednotlivých typů)

Buněčný typ	Charakteristické povrchové molekuly
Leukocyty (všechny)	CD53, CD45, CD43
Hematopoetické prekurz.	CD34, CD117, CD137
T lymfocyty	CD2, CD3, CD5, CD6, CD7, CD27, CD28, CD96, TCR
T pomocné I. (Th)	CD4
T cytotoxické I. (Tc)	CD8
B lymfocyty	CD19, CD20, CD22, CD37, CD39, CD40, CD79, BCR
Pre-B lymfocyty	CD9, CD10, CD138
Plasmatické buňky	CD28, CD138
NK lymfocyty	CD2, CD11b, CD16b, CD56, CD57, Cd94, CD158
Neutrofilní granulocyty	CD11b, CD15, CD87
Monocyty	CD14, CD33, CD64, CD87, CD89
Dendritické buňky	CD83, Cd86, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209

Možnosti exprese antigenu v rámci dané populace



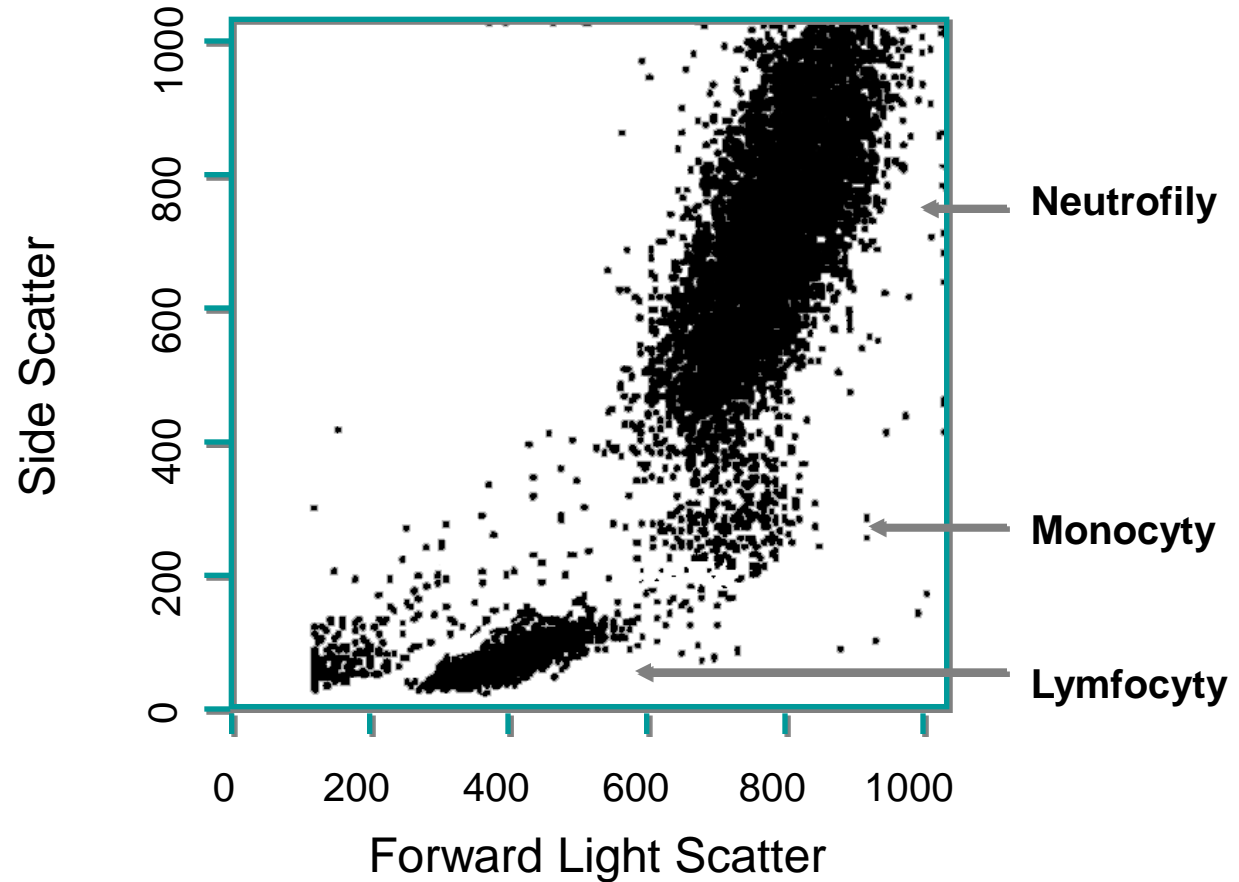
Příklad určení počtu jednotlivých subpopulací lymfocytů v periferní krvi při použití dvojího značení

Izotypová kontrola	Monoklonální protilátky stejné třídy proti irelevantním antigenům
CD45	Všechny leukocyty, lymfocyty silněji
CD14	Monocyty
CD3	Všechny T lymfocyty
CD19	Všechny B lymfocyty
CD4	Pomocný T lymfocyt
CD8	Cytotoxický T lymfocyt
CD56	NK lymfocyt

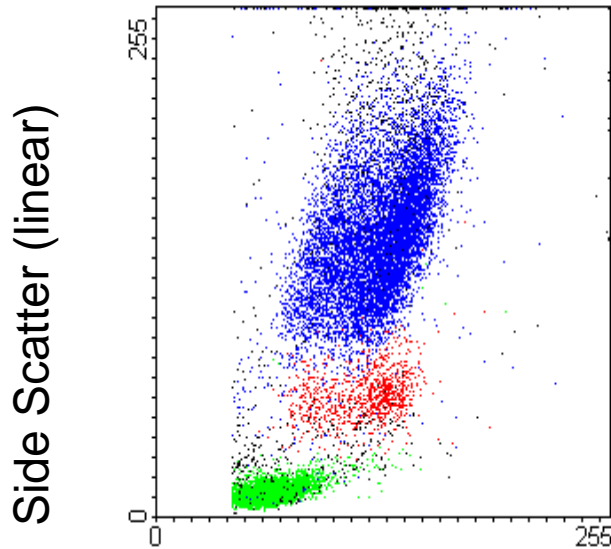
Kombinace jednotlivých protilátek

Zkumavka	FITC	PE	Stanovení
1	CD45	CD14	%lymfocytů v ohraničení pro lymfocyty
2	Iz.kont.	Iz. kont.	Nespecifická vazba – autofluorescence
3	CD3	CD4	Pomocné (Th) lymfocyty
4	CD3	CD8	Cytotoxické (Tc) lymfocyty
5	CD3	CD19	Celkové B- lymfocyty
6	CD3	CD56	NK buňky

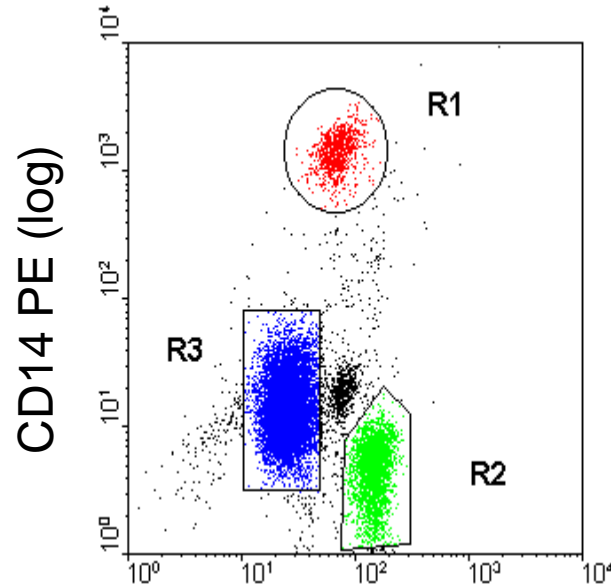
SS a FS leukocytů získaných z plné krve po lyzaci erytrocytů



Kontrola "čistoty" lymfocytárního ohraničení na základě FS a SS



Forward Scatter (linear)



CD45 FITC (log)

R1=monocyty (CD14+)

R2=lymfocyty (CD45>monocyty)

R3=granulocyty (CD45<monocyty)

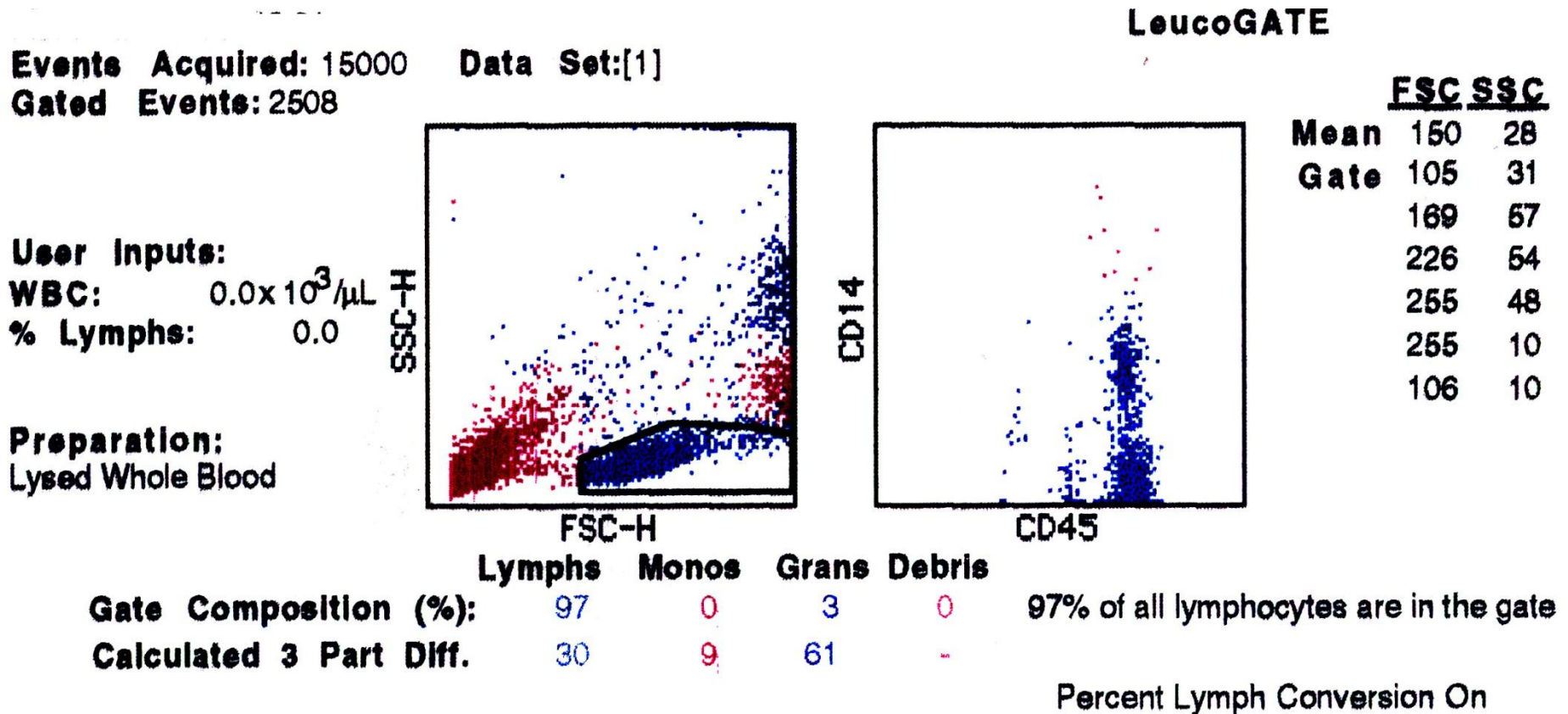
Vzorek akceptovatelný pokud

- minimálně 90% fenotypově CD14- a CD45+ lymfocytů je v SS-FS ohraničení pro lymfocyty
- v SS-FS ohraničení pro lymfocyty je maximálně 15% buněk které nejsou fenotypově lymfocyty (CD14- a CD45+)

Imunofenotypizace v programu Simulset

Krok 1 - ověření čistoty lymfocytárního gatu

FITC CD45 PE CD14



An automatic gate was found, a manual override gate is in use.

Imunofenotypizace v programu Simulset

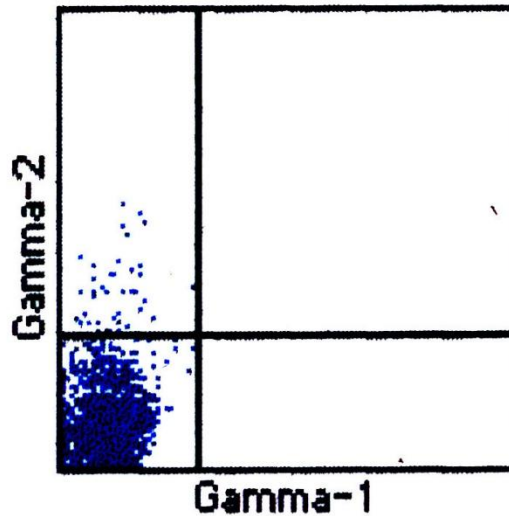
Krok 2 - izotypové kontroly

FITC – monoklonální protilátka proti irelevantnímu antigenu

PE - monoklonální protilátka proti irelevantnímu antigenu

Events acquired:14000
Gated Events:2295

Data set:[1]



	<u>FSC</u>	<u>SSC</u>
Means:	150	28
	<u>FL1</u>	<u>FL2</u>
Marker	76	73

	Control	IgG1/IgG2	Conv
Q	Cell Type		%L
Q1	NSS	PE	2
Q2	NSS	++	0
Q3	Unstained		98
Q4	NSS	FITC	0

Fluorescence markers were found. Manual override markers are in effect.

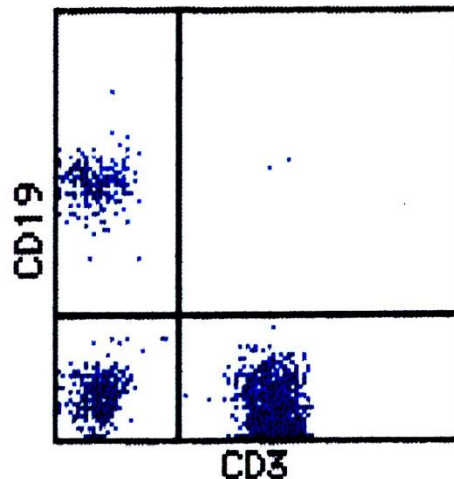
Imunofenotypizace v programu Simulset

Krok 3 - Stanovení T- a B- lymfocytů

FITC CD3 PE CD19

Events acquired: 14000
Gated Events: 2251

Data set: [1]



FSC SSC
Means: 149 27
FL1 FL2
Marker 76 73

CD3/CD19		Conv
Q	Cell Type	%L
Q1	CD3- CD19+	10
Q2	CD3+ CD19+	0
Q3	CD3- CD19-	12
Q4	CD3+ CD19-	78

Subset Name	Conv
	%L
Total T (CD3+) Lymphocytes	78
Total B (CD19+) Lymphocytes	10

OK
OK

Operator defined markers are in effect.

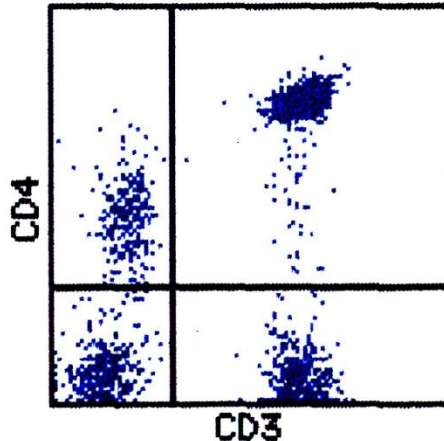
Imunofenotypizace v programu Simulset

Krok 4 - Stanovení pomocných T-lymfocytů

FITC CD3 PE CD4

Events acquired:14000 Data set:[1]
Gated Events:2206

	<u>FSC</u>	<u>SSC</u>
Means:	150	28
	<u>FL1</u>	<u>FL2</u>
Marker	76	73



CD3/CD4		Conv
Q	Cell Type	%L
Q1	CD3- CD4+	12
Q2	CD3+ CD4+	43
Q3	CD3- CD4-	12
Q4	CD3+ CD4-	34

Subset Name	Conv %L
Total T (CD3+) Lymphocytes	77
T Helper (CD3+, CD4+) Lymphocytes	43

OK
OK

Operator defined markers are in effect.

Imunofenotypizace v programu Simulset

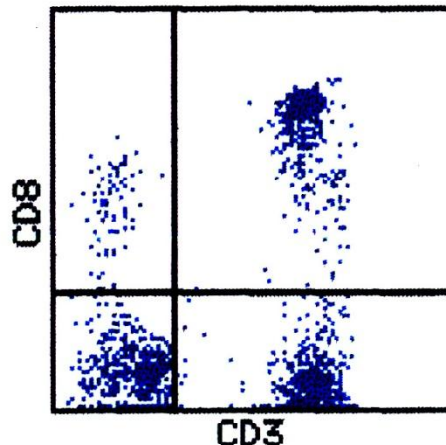
Krok 5 - Stanovení cytotoxických T-lymfocytů

FITC CD3 PE CD8

Events acquired:14000
Gated Events:2105

Data set:[1]

	<u>FSC</u>	<u>SSC</u>
Means:	151	28
	<u>FL1</u>	<u>FL2</u>
Marker	76	73



CD3/CD8		Conv
Q	Cell Type	%L
Q1	CD3- CD8+	4
Q2	CD3+ CD8+	29
Q3	CD3- CD8-	20
Q4	CD3+ CD8-	47

Subset Name	Conv
	%L
Total T (CD3+) Lymphocytes	76
T Cytotoxic (CD3+,CD8+) Lymphs	29

OK
OK

Operator defined markers are in effect.

Imunofenotypizace v programu Simulset

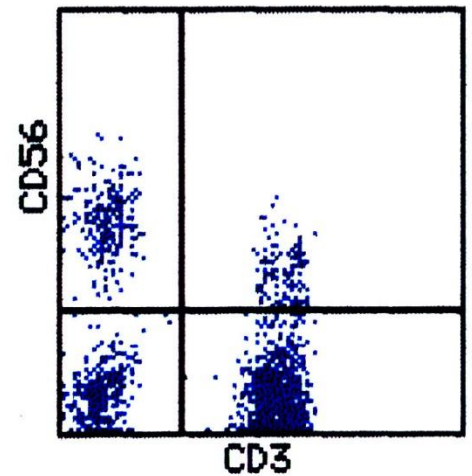
Krok 6 - Stanovení NK-lymfocytů

FITC CD3 PE CD56

Events acquired:14000
Gated Events:2077

Data set: [1]

FSC SSC
Means: 151 28
FL1 FL2
Marker 76 73



CD3/CD56		Conv
Q	Cell Type	%L
Q1	CD3- CD56+	12
Q2	CD3+ CD56+	6
Q3	CD3- CD56-	12
Q4	CD3+ CD56-	70

Subset Name	Conv %L
Total T (CD3+) Lymphocytes	76
Total NK (CD56+)Lymphocytes	12

OK
OK

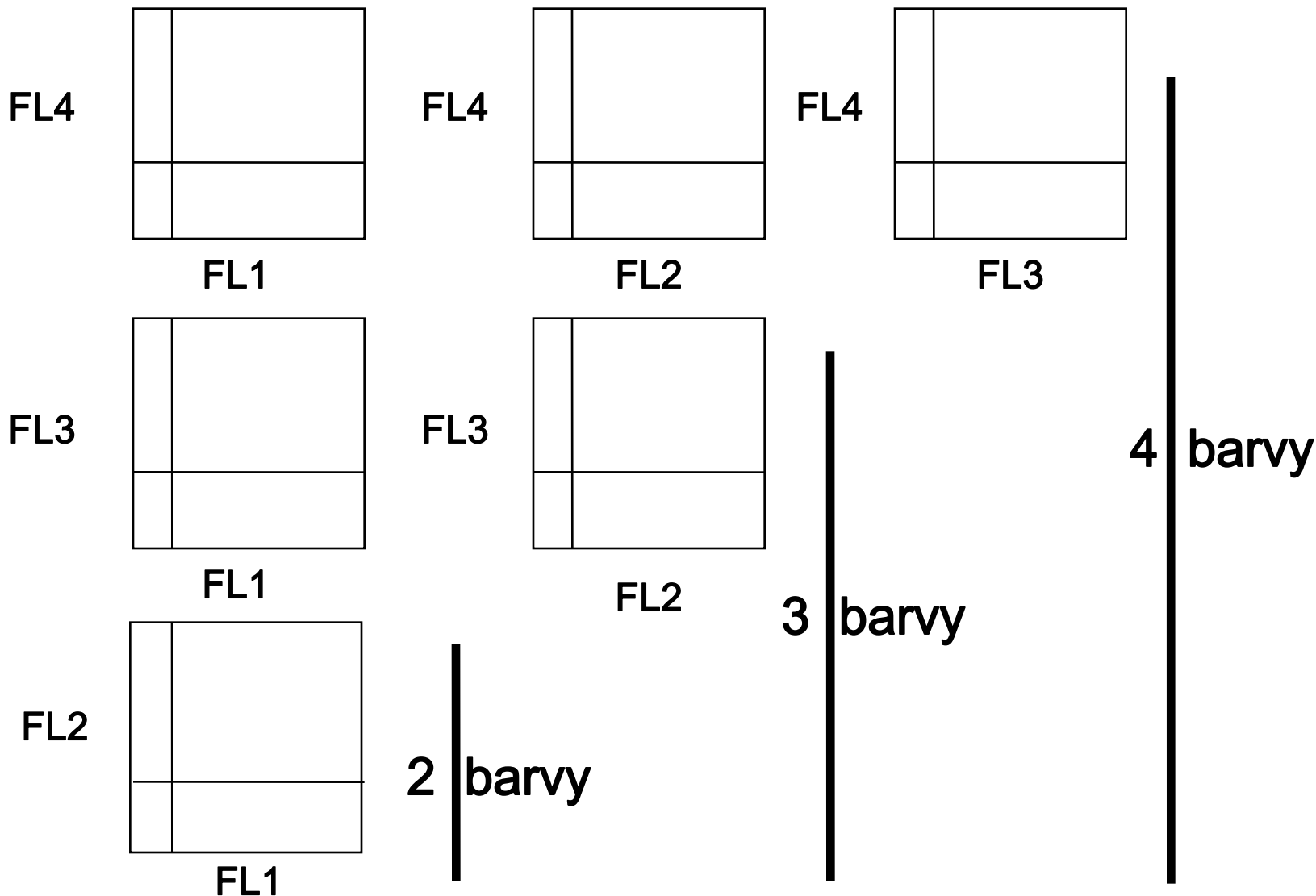
Operator defined markers are in effect.

Příklad panelu antigenů stanovovaných při detekci plasmatických buněk

CD138	Plasma cells
CD38	Plasma cells, Activated T-cells
CD56	Natural Killer Cells
CD45	Human Leukocytes
cKappa	Cytoplasmic light chain
cLambda	Cytoplasmic light chain

Více barevná imunofenotypizace

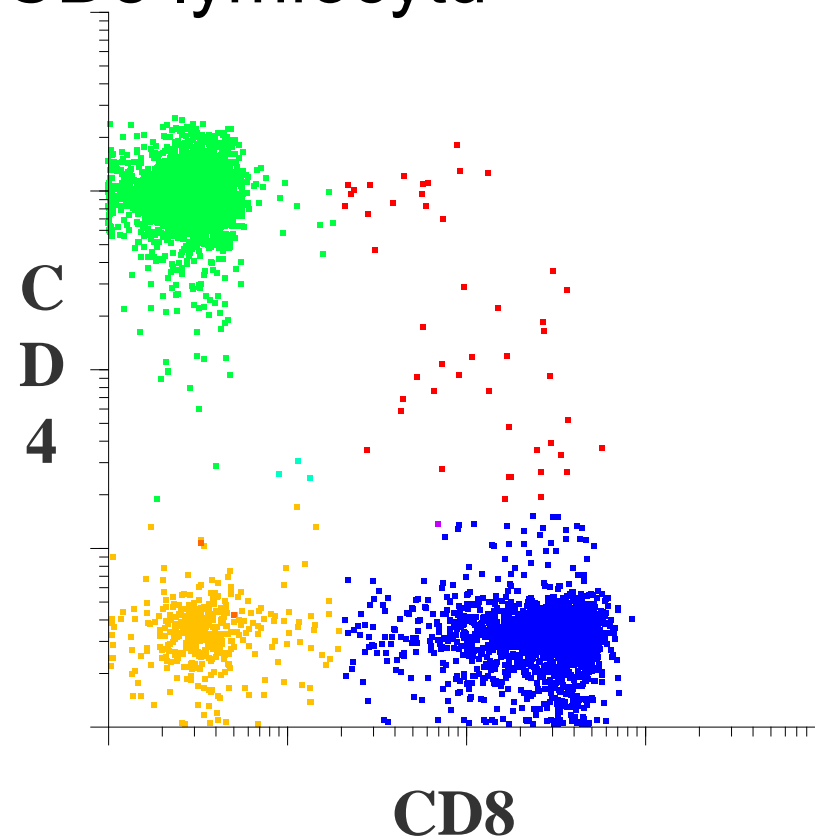
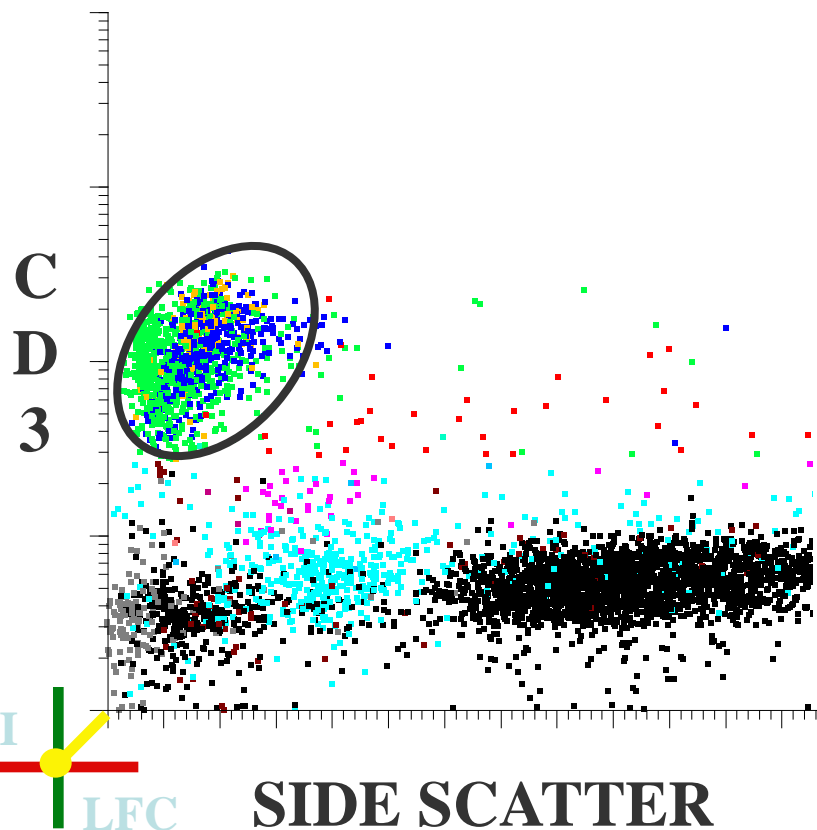
Vizualizace jednotlivých populací



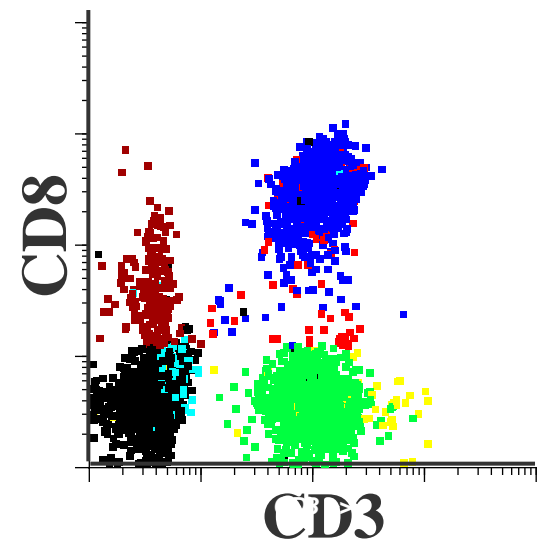
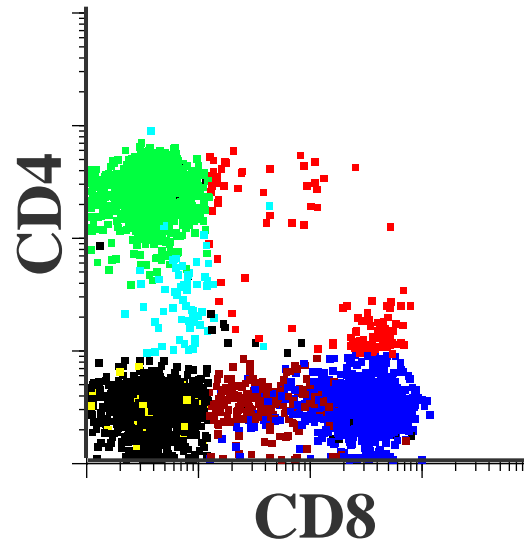
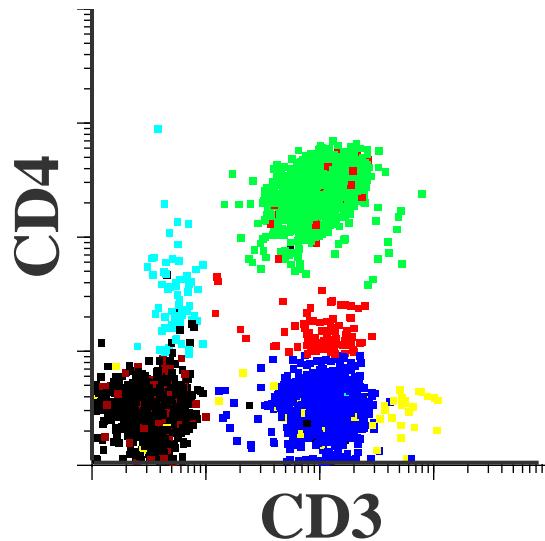
Tří barevná imunofenotypizace

Kombinace protilátek značených FITC, PE a třetí protilátkou značenou např. Texas Red, Per CP, ALEXA barvy od Molecular Probes.

Stanovení CD4 a CD8 lymfocytů



Tří barevná imunofenotypizace CD3, CD4, CD8



CD3-CD4-

CD3-CD4+

CD3-CD8+

CD3+CD4+ Th lymf

CD3+CD8+ Tc lymf

CD3+CD4-

Čtyřbarevná imunofenotypizace

Antibodies labeled with FITC

Antibodies labeled with PE

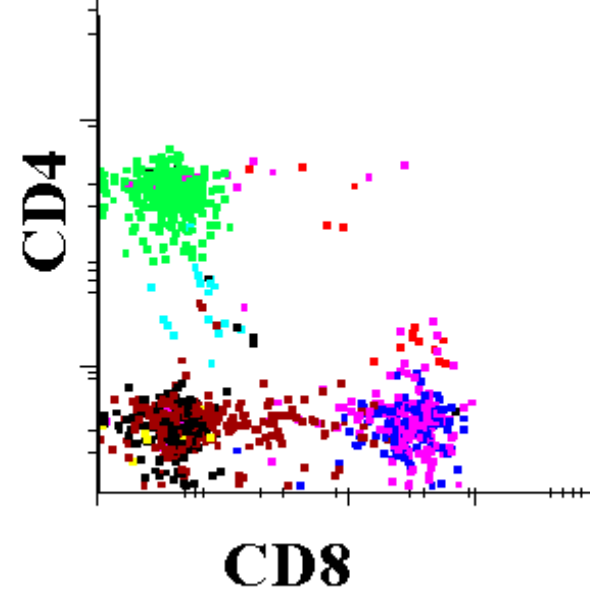
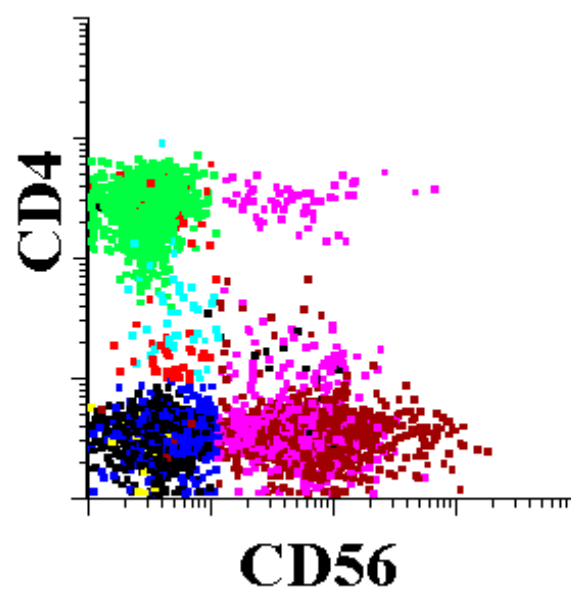
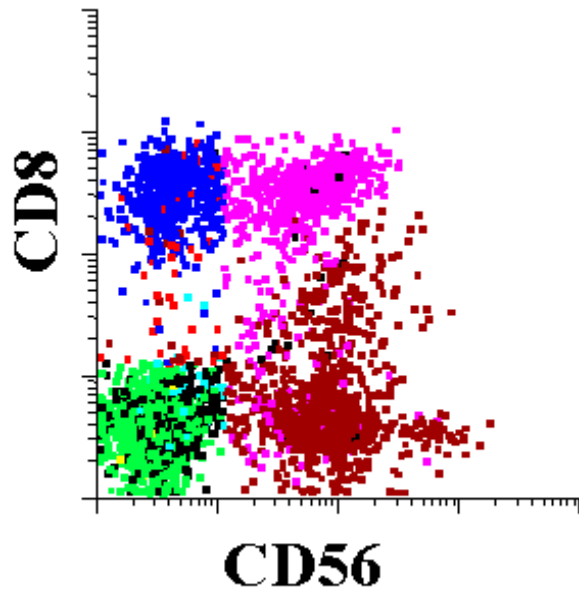
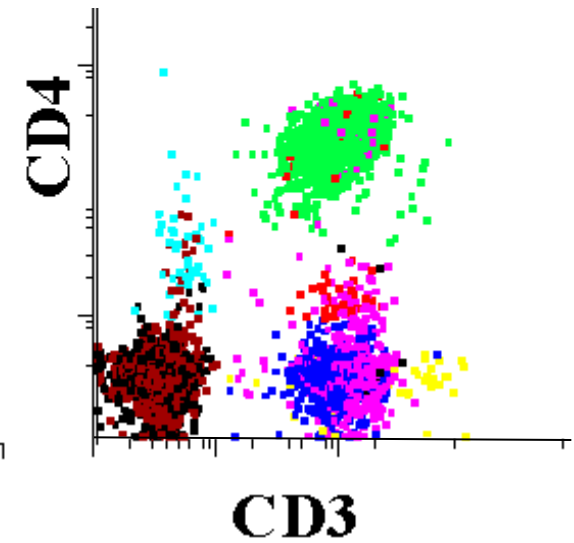
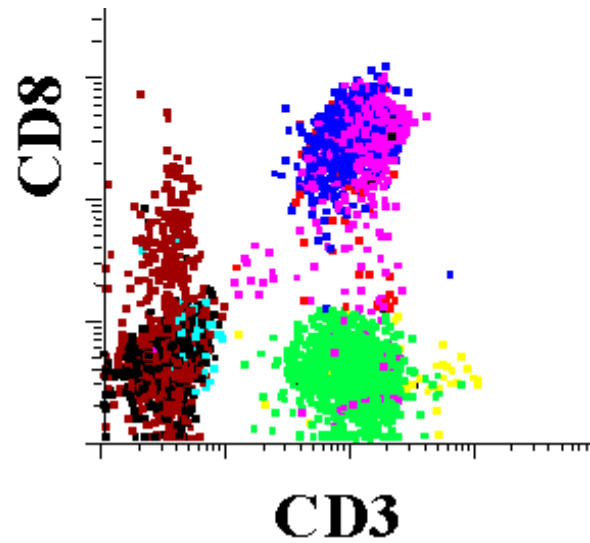
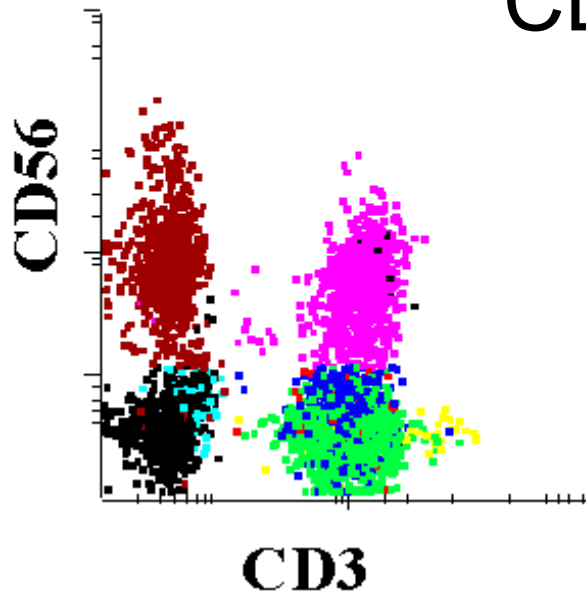
Antibodies labeled with complex PE/Texas Red

Antibodies labeled with complex PE/CY5 or PerCP

Antibodies labeled with complex APC, CY5 or CY7

Antibodies labeled with ALEXA dyes from
Molecular Probes

Čtyř barevná imunofenotypizace CD3, CD4, CD8, CD56



Příklad osmi barevná imunofenotypizace

8-color Antigen-Specific Immunophenotyping

Ab Conjugate	Laser	
CD28 PerCP-Cy5.5	488	Surface staining
CD45RA PE-Cy7	488	
CD27 APC	633	
CD8 APC-Cy7	633	
CD3 Pacific Blue	405	
CD4 AmCyan	405	
Anti-IFN γ FITC	488	Intracellular staining
Anti-IL-2 PE	488	

Příklad 17 barevná imunofenotypizace

Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system

Stephen P. Perfetto, Pratip K. Chattopadhyay and Mario Roederer

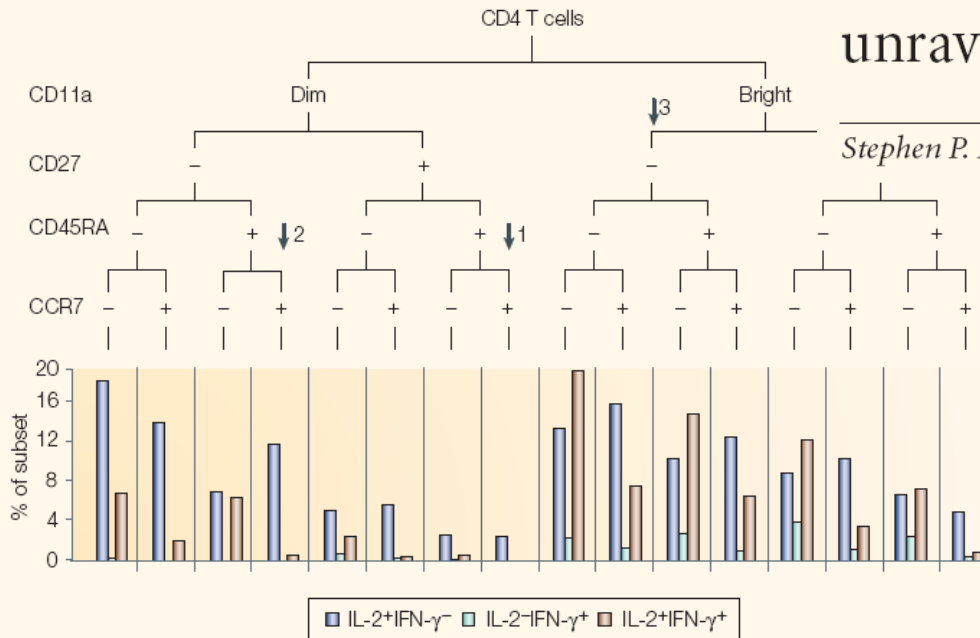
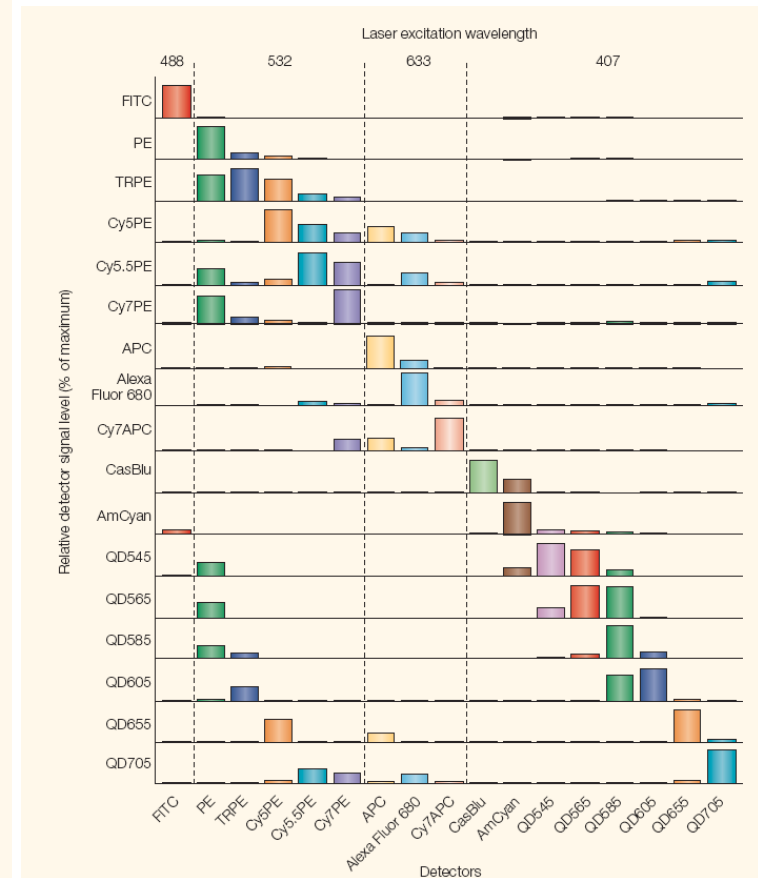


Figure 6 | Visualization of polychromatic data using hierarchical trees. The data shown in this hierarchical tree were obtained from peripheral-blood mononuclear cells stimulated with staphylococcal enterotoxin B (for 6 hours in the presence of brefeldin A). The cells were subsequently permeabilized and stained for various cell-surface markers and intracellular cytokines. Branches of the tree segregate based on the expression level (for example, positive versus negative or bright versus dim) of a particular marker, and each terminal branch represents one fully gated subset. So, reading from the top, the branch below arrow 1 represents cells that are CD3⁺CD4⁺CD11a^{dim}CD27⁺CD45RA⁺CC-chemokine receptor 7 (CCR7)⁺. The frequency histogram below the tree indicates the relative proportion of cells in each subset that express interleukin-2 (IL-2) (blue bars), interferon- γ (IFN- γ) (green bars) or both (red bars). So, the CD11a^{dim}CD27⁺CD45RA⁺CCR7⁺ cell population indicated by arrow 1 expresses only IL-2, which is consistent with a naive phenotype. Interestingly, IL-2 is expressed by a greater fraction of a naive-like subset (CD11a^{dim}CD27⁻CD45RA⁺CCR7⁺ cells), in which cells have lost expression of CD27 but not other markers (arrow 2). In contrast, high expression of IFN- γ is mainly observed in CD11a^{bright}CD27⁻ cells (arrow 3), a phenotype previously associated with effector memory T cells. Graphical representations such as this offer many options for data exploration, especially when the hierarchy can be rearranged to bring patterns into view.



Hematologie

Použití imunofenotypizace pro detekci hematologických onemocnění

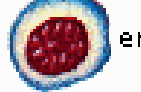
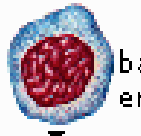
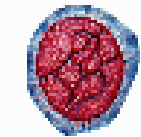
- Stanovení zastoupení jednotlivých buněčných linií
- Stanovení stupně diferenciacce
- Stanovení monoklonální populace (B-lymfocyty)

Haematopoéza



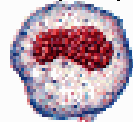
Uncommitted stem cell gives rise to committed cells

proerythroblast



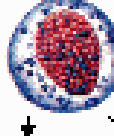
erythrocyte

megakaryoblast

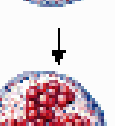
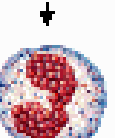


platelets

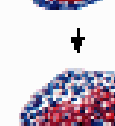
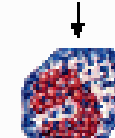
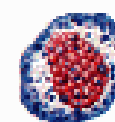
myeloblast



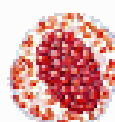
promyelocyte



neutrophil



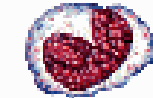
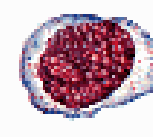
basophil



eosinophil

granulocytes

monoblast



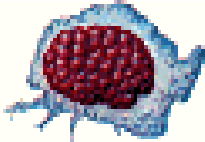
monocyte

lymphoblast



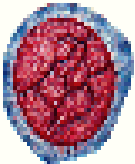
lymphocyte

Příklad identifikace buněk myeloidních linií



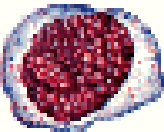
Uncommitted stem cell gives rise to committed cells

proerythroblast



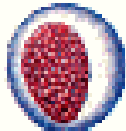
CD34+
CD13-
(CD36+)

monoblast

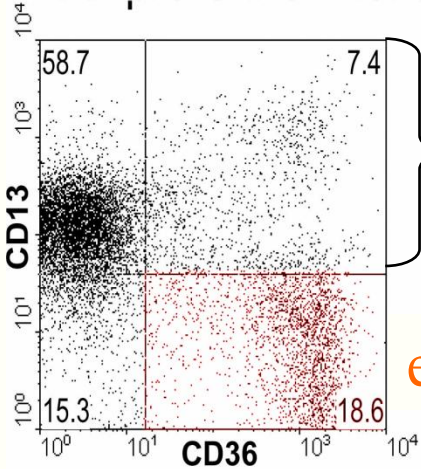


CD34+
CD13+
CD115+

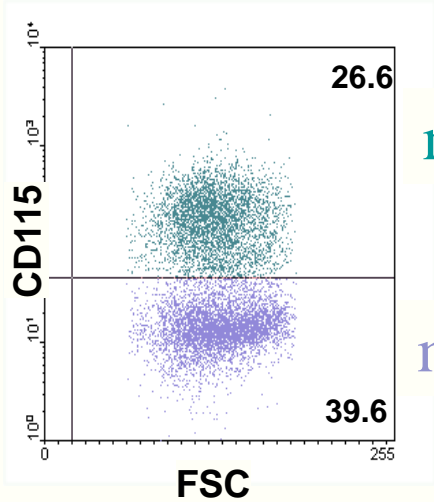
myeloblast



CD34+
CD13+
CD115-



erythroid



monoblasts

myeloblasts

Příklad panelu CD antigenů stanovovaných při detekci lymfomů

CD45	Human Leukocytes
CD3	Pan T Lymphocytes
CD5	Pan T Lymphocytes
CD7	Pan T Lymphocytes
CD4	T-helper Lymphocytes
CD8	T-suppressor/cytotoxic Lymphocytes
CD10	B-cells
CD19	Pan B-cells
CD20	Mature B-cells
FMC7	Activated B-cells
CD23	Activated B-cells
CD38	Plasma cells, activated T-cells
CD103	T and B Lymphocytes
CD11c	T and B cells, NK cells, monocytes
CD25	Activated B-cells
CD22	B-cells
Kappa	Light chains
Lambda	Light chains

Příklad panelu
CD antigenů
stanovovaných
při detekci
leukemií

CD45	Human Leukocytes
CD5	Pan T Lymphocytes
CD10	B Lymphocytes
CD19	Pan B Lymphocytes
CD20	Mature B Lymphocytes
HLA-DR (I3)	Activated T and B Lymphocytes
CD34	Progenitor Cell
CD117	Progenitor Cell
CD15	Monocytes/Granulocytes
CD33	Myelocyte/Monocyte
CD56	Natural Killer Cells
CD14	Monocyte
CD13	Myelocyte/Monocyte
CD64	Monocytes
cMPO	Myeloperoxidase
c79a	B Cells
C3	Cytoplasmic CD3 T Cells
cTDT	Immature Lymphocytes/thymocytes

Detekce fyziologických funkcí leukocytů a trombocytů

Změna povrchové exprese antigenu (receptoru) charakteristického pro aktivovaný stav dané buněčné subpopulace.

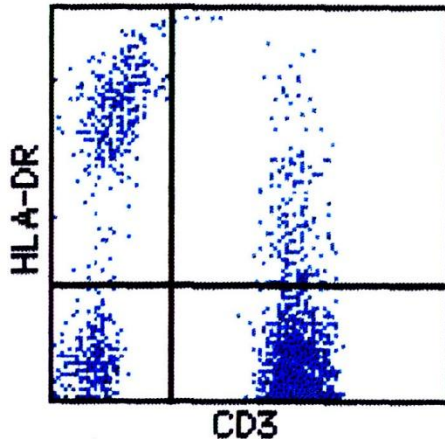
Příklady:

- CD11b - aktivace polymorfonukleárních granulocytů a monocytů
- HLA-DR - aktivace T-lymfocytů
- CD69 - aktivace lymfocytů
- CD62L - aktivace krevních destiček

Např. současně s imunofenotypizací v programu Simulset jako krok č. 7 - Stanovení aktivace T-lymfocytů

Events acquired: 14000 Data set: [1]
Gated Events: 2369

Means: FSC 149 SSC 27
FL1 76 FL2 73
Marker



CD3/HLA-DR		Conv %L
Q	Cell Type	
Q1	CD3- DR+	15
Q2	CD3+ DR+	8
Q3	CD3- DR-	9
Q4	CD3+ DR-	68

Subset Name	Conv %L
Total T (CD3+) Lymphocytes	76
Activated T (CD3+) Lymphocytes	8

OK
N/A

Operator defined markers are in effect.

Tube Name/ Consistency	Ck	Subset Name/ Ck Name	Conv. Percent Lymphs	
Average CD3		Total T (CD3+) Lymphocytes	77	OK
Sum of Cells		T + B + NK	99	OK
Ratio		T Lymph H/S CD3,CD4/CD3,CD8 Ratio	1.48	OK

Detekce fyziologických funkcí leukocytů a trombocytů

- Produkce volných radikálů fagocyty
(detekce chronické granulomatózní choroby)

- Stanovení fagocytární aktivity
(detekce poruch fagocytovat patogeny)

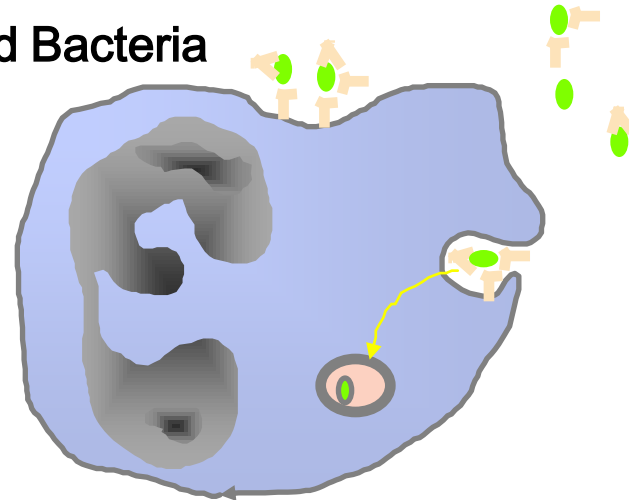
Detekce fagocytární aktivity

- Pohlcení fluorescenčně značených částic (např. latexové částice, zymosanové částice, obarvené bakterie)
- Oponizace částice – porovnání s neopsonizovanou částicí udává informaci o expresy a funkčnosti opsoninových receptorů

Postup:

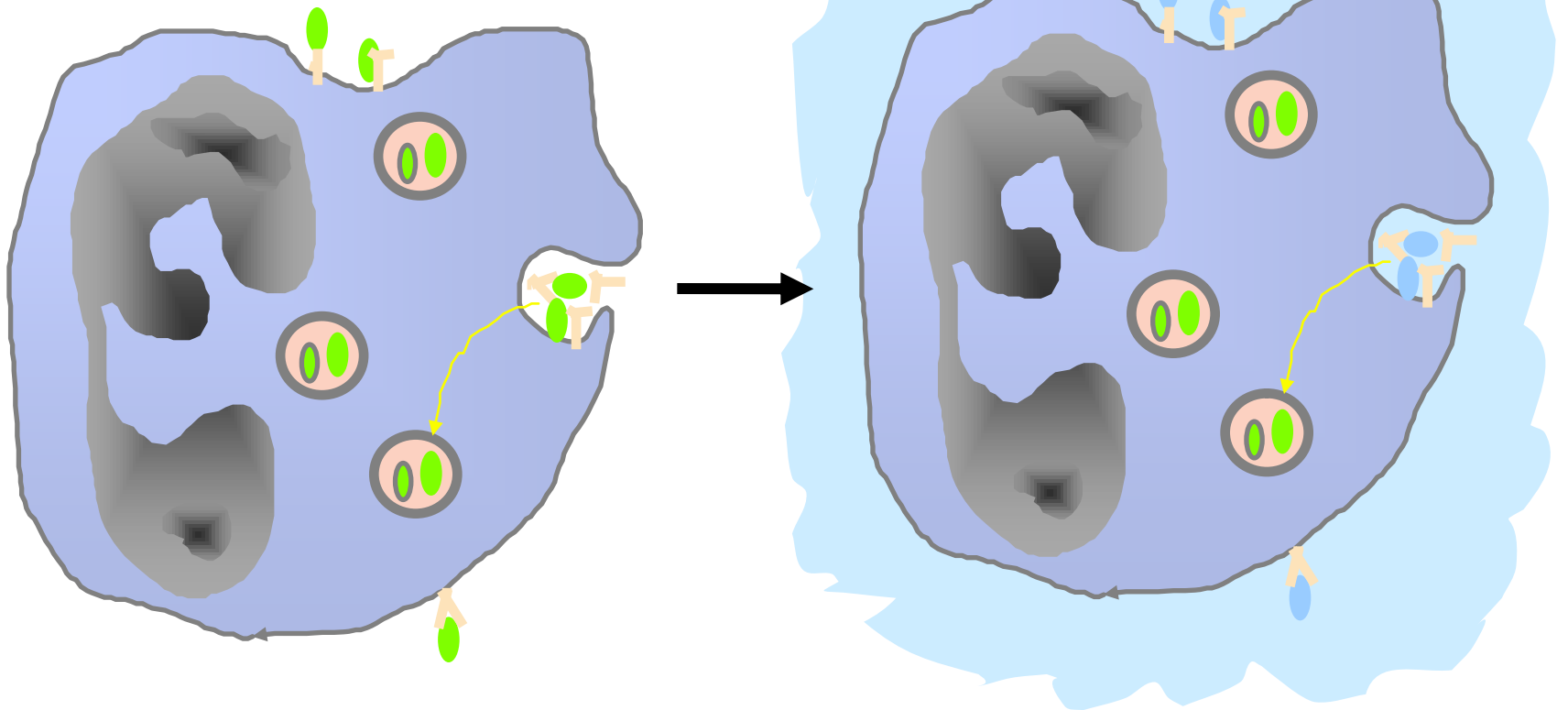
- Značení částice fluorescenční próbou
- Oponizace částic vybranými opsoníny (např. IgG, C3) nebo kompletním sérem daného druhu
- Izolované leukocyty jsou inkubovány dohromady s částicemi při teplotě fyziologické pro daný druh

FITC-Labeled Bacteria



- Rozlišení pohlcení částice do uzavřeného fagozómu od adherence na povrch fagocyty – aplikace trypanové modři (neprostupuje do živých buněk), která má zhášecí vlastnosti pro FITC

FITC-Labeled Bacteria

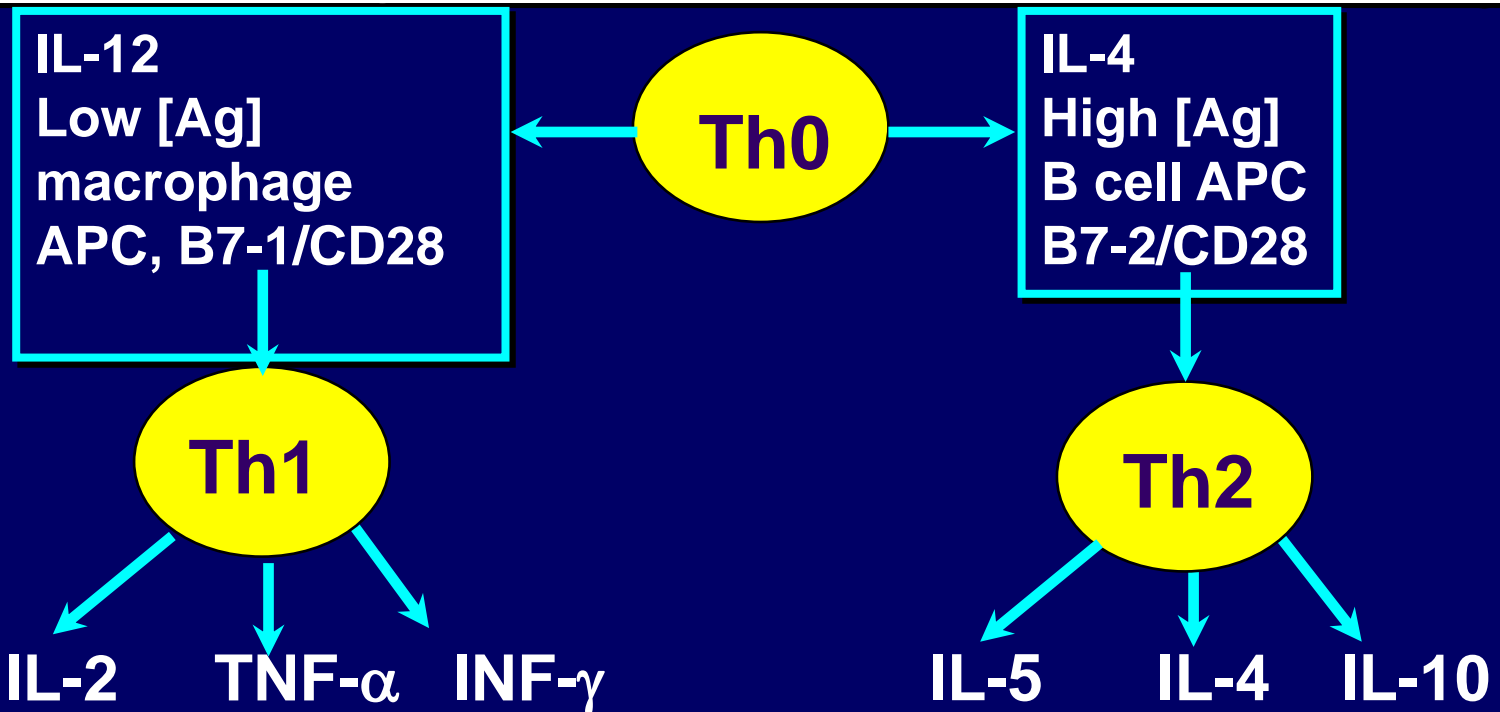


Detekce intracelulární produkce cytokinů

- Charakterizace různých subpopulací leukocytů, které lze rozlišit na základě rozdílné produkce cytokinů
- Charakterizace funkčních vlastností buněk odpověď na vybraný stimul

Cytokiny produkované TH1 a TH2 lidskými lymfocyty

Factors influencing development of Th1 and Th2 cell subtypes



BD FastImmune™ Cytokine Flow Cytometry Protocol

1. Stimulate

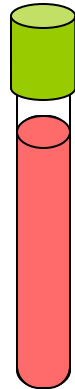
whole

blood or PBMC



6 h

+ Brefeldin A



2. Lyse/Fix

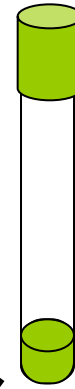
3. Permeabilize

4. Stain

Wash



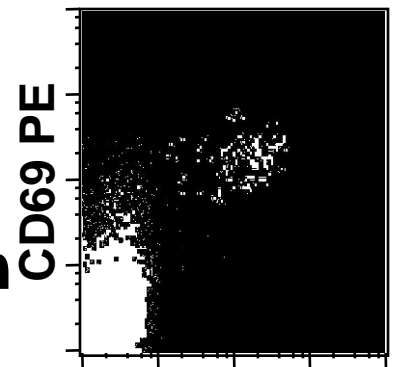
Wash



Wash

Optional: cool to 18°C O/N

Optional: freeze directly in
BD FACS Lysing Solution



5. Flow
cytometry

Shrnutí přednášky příklady aplikace průtokové cytometrie v klinické imunologii a hematologii

- **Imunofenotypizace**
- **Funkční testy**
 - Změna exprese vybraných povrchových markerů (většinou receptory nezbytné pro funkci daného lymfocytu)
 - Indukce proliferace (stanovení buněčného cyklu)
 - Produkce cytokinů
 - Stanovení cytotoxicity NK buněk a cytotoxických lymfocytů
 - Produkce volných radikálů fagocyty
 - Fagocytární aktivita