

Aktivace lymfocytů v klinické laboratoři



Veronika Kanderová

CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague) - Cytometrie

Klinika dětské hematologie a onkologie

2. LF UK a FN v Motole

Disclaimer

Přednáška zazněla na edukační sekci Klinická cytometrie v rámci konference ČSAC 2017 a doporučení z ní plynoucí není oficiálním doporučením ČSAC.

Proč?

Detekce T-lymfocytární aktivace je jedním z klíčových vyšetření v laboratořích klinické imunologie/hemato-onkologie.

Výsledky se platňují

- v transplantologii (akutní rejekce)
- u infektů (virových, bakteriálních, ...)
- u autoimunitních onemocnění
- u hemofagocytujících onemocnění (HLH)
- v onkologii
- mohou vypovídat o geneticky podmíněné (nebo jinak ovlivněné) imunitní nedostatečnosti (primární a sekundární imunodeficity)

Nejčastěji se hodnotí aktivace T-lymfocytů

(v některých případech i B-lymfocytů a NK buněk)

Čím a jak aktivovat T-lymfocyty?

3 typy lymfocytárních aktivačních testů :

- 1) **Detekce povrchových aktivačních znaků.**
- 2) Stanovení schopnosti proliferovat *in vitro*.
- 3) Diferenciace a produkce cytokinů.

LEKTINY : vazba na glykoproteiny/glykolipidy

phytohemagglutinin (**PHA**) (*Fazole zahradní*)

concanavalin A (**ConA**) (*Jack Bean*)

pokeweed mitogen (**PWM**) (*Líčidlo americké*)



BAKTERIÁLNÍ TOXINY (superantigeny)

staphylococcal enterotoxin A, B (**SEA, SEB**)

CHEMICKÉ KOMPONENTY

Phorbol 12-myristate 13-acetate (**PMA**)

Ionomycin

PROTILÁTKY

anti-CD3 (+ anti-CD28 + anti-CD49d)

klony OKT3, UCHT1, aj.

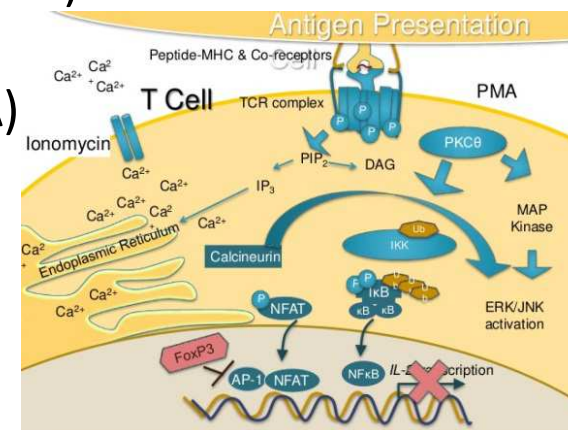
klon MEM-57 + FastImmune CD28/CD49d

MEM-57 adsorbovaný na povrchu mikrotitrační destičky + solubilní CD28/CD49d

anti-CD3/28 beads (Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28)

buňky : kuličky = 1 : 1

CYTOKINY Inflammatory Cytokines as a Third Signal for T Cell Activation, Curr Opin Immunol. 2010



Čím a jak aktivovat T-lymfocyty?

SPECIFICKÉ ANTIGENY : vazba na HLA antigeny APC

Candida albicans antigen

PPD (tuberculin, Mycobacterium tuberculosis)

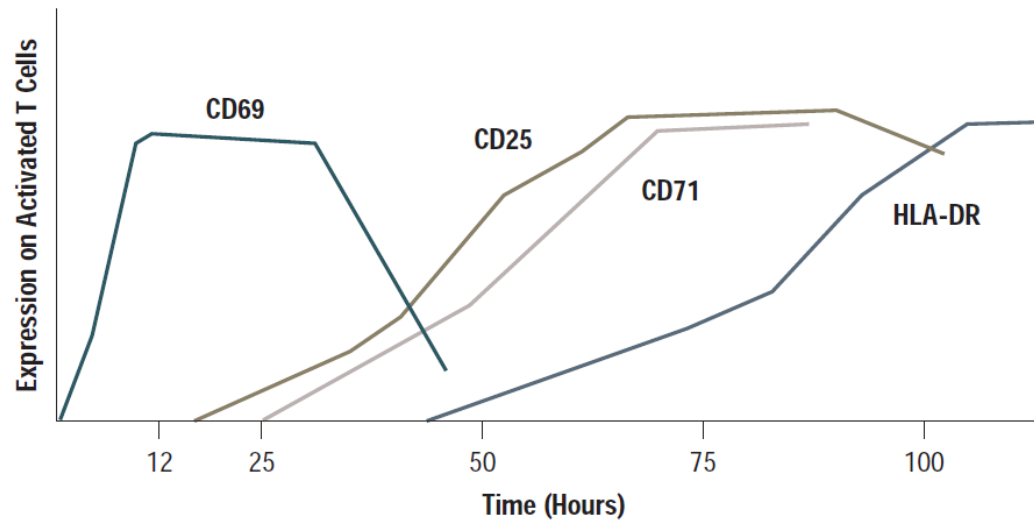
Streptokinase-streptodornase (Streptococcus)

CMV peptidy, EBV peptidy ...

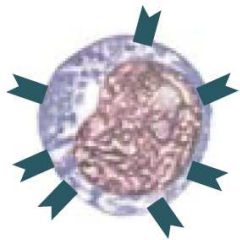
! nutno mít v kultuře živé monocyty a DCs (PBMCs) !

→ aktivace (CD40L), proliferace, produkce cytokinů (IFN γ , IL-2, ...)

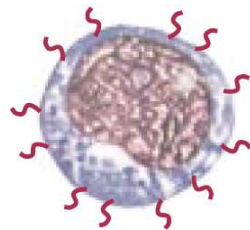
Kinetika exprese aktivačních molekul



Resting T-cell

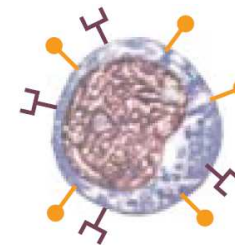


Early-activated T-cell



CD69
C-Type Lectin
Early Lymphocyte Activation Ag
2-8h

Late-activated T-cell



CD25
IL2RA

CD38
<24h

CD71
Transferrin receptor
24-48h

CD95
FAS
24-48h

CD25 (IL2R)
HLA-DR
DNA syntéza
3-10 dní

Kde najít radu?

Larbi and Fulop, **From “truly naïve” to “exhausted senescent” T cells: When markers predict functionality.** Cytometry A 2013

Quarona et al., **CD38 and CD157: A long journey from activation markers to multifunctional molecules.** Cytometry B 2013

Shipkova, et al., **Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation.** Clin Chim Acta 2012

Chattopadhyay and Roederer, **Good Cell, Bad Cell: Flow Cytometry Reveals T-cell Subsets Important in HIV Disease.** Cytometry A 2010

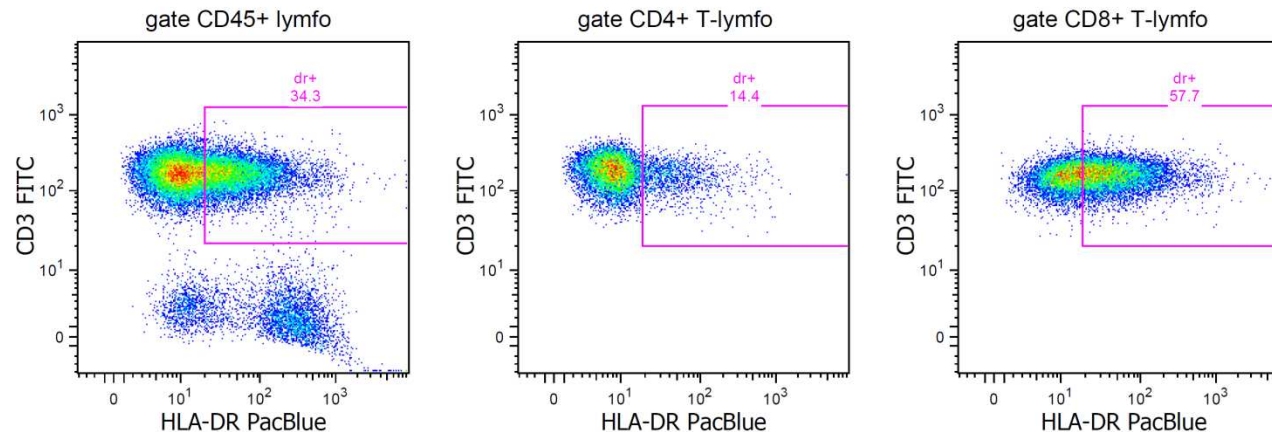
Reddy M, et al., **Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function.** J Immunol Methods 2004

Caruso et al., **Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation.** Cytometry 1997

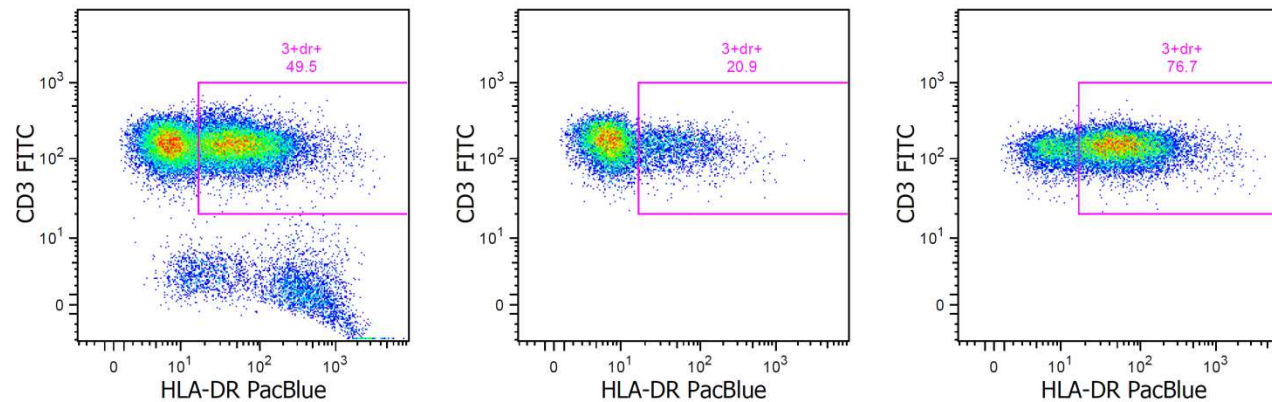
Biselli R, et al., **Multiparametric flow cytometric analysis of the kinetics of surface molecule expression after polyclonal activation of human peripheral blood T lymphocytes.** Scand J Immunol 1992.

Stanovení HLA-DR na T-lymfocytech

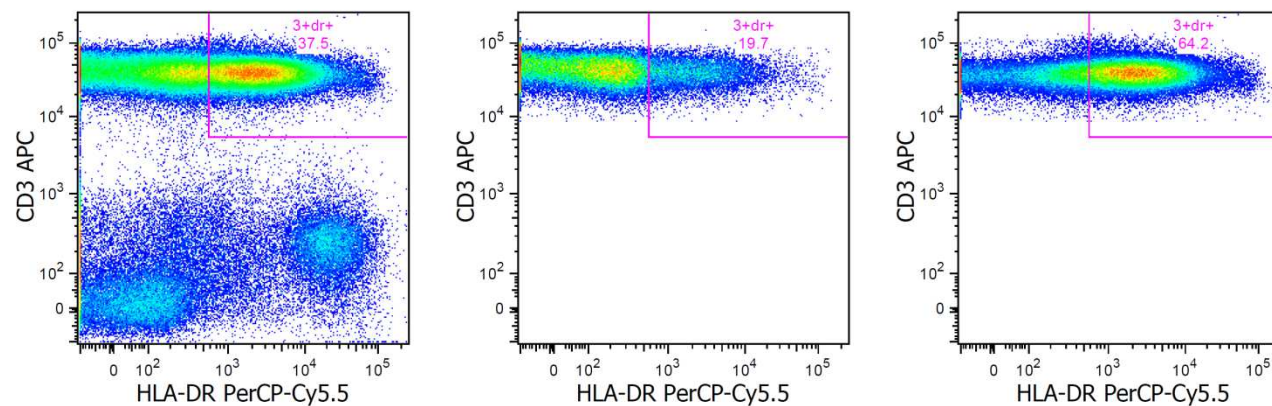
Pacific Blue
Klon **L243**



Pacific Blue
Klon **Immu-357**

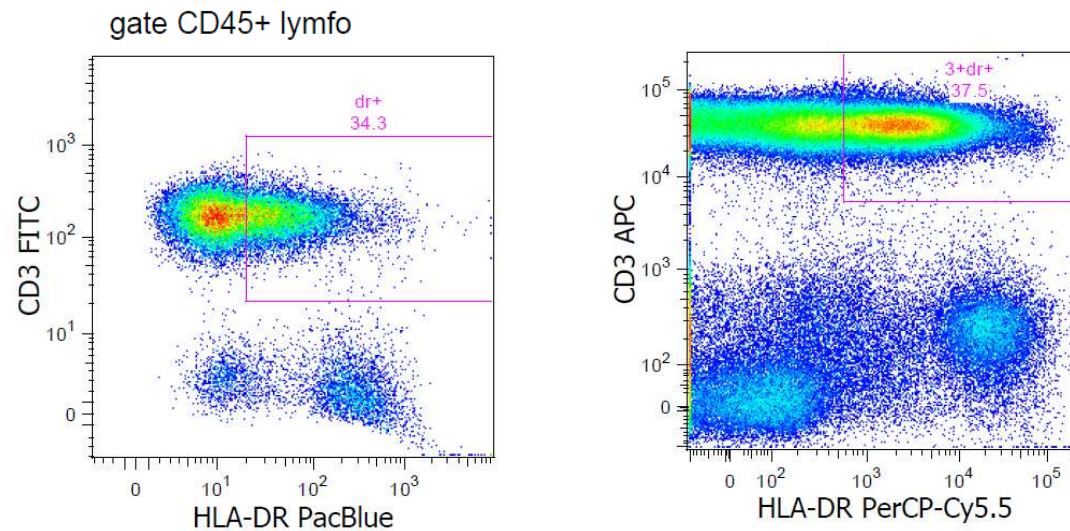


PerCP-Cy5.5
Klon **L243**

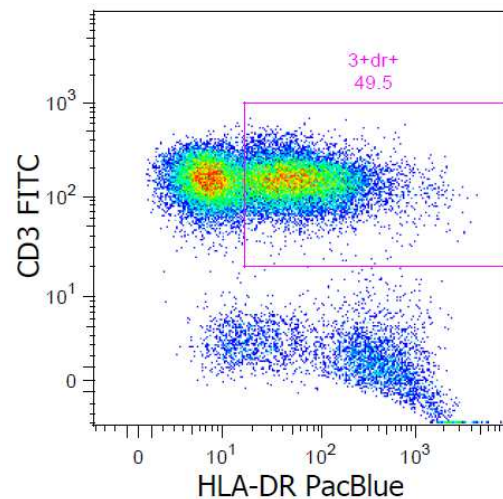


Stanovení HLA-DR na T-lymfocytech

klon **L243**: současný „zlatý standard“ v IVD testech



klon **Immu-357** : dává nám mírně odlišná %, ale je spolehlivý



Stanovení HLA-DR na T-lymfocytech

Doporučení:

- 1) Zjistěte si klon (+ fluorochrom + firmu), který používáte
- 2) Zjistěte, jakým klonem (a od které firmy) byla měřena referenční data, ke kterým vaše výsledky vztahujete

Cytometry PART A
Journal of the International Society for Advancement of Cytometry

2014, HLA-DR PE (BD)

Lymphocytes Subsets Reference Values in Childhood

F. Tosato,^{1*} G. Bucciol,² G. Pantano,¹ M. C. Putti,² M.C. Sanzari,¹ G. Basso,² M. Plebani¹

European Journal of Haematology ISSN 0902-4441

ORIGINAL ARTICLE 2008, HLA-DR FITC Immu-357

Age-matched lymphocyte subpopulation reference values in childhood and adolescence: application of exponential regression analysis

Sabine Huenecke¹, Michael Behl², Carla Fadler¹, Stefanie Y. Zimmermann¹, Konrad Bochenek¹, Lars Tramsen¹, Ruth Esser¹, Dieter Klarmann¹, Martina Kamper¹, Alexandra Sattler¹, Dorothee von Laer³, Thomas Klingebiel¹, Thomas Lehrnbecher¹, Ulrike Koehl¹

Clinical Immunology (2009) 133, 95–107

2009, HLA-DR FITC L243

available at www.sciencedirect.com

Clinical Immunology

ELSEVIER

www.elsevier.com/locate/yclim

CIS Clinical Immunology Society

Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments

R. van Gent^{a,1}, C.M. van Tilburg^{b,1}, E.E. Nibbelke^b, S.A. Otto^a, J.F. Gaiser^a, P.L. Janssens-Korpela^a, E.A.M. Sanders^b, J.A.M. Borghans^a, N.M. Wulffraat^b, M.B. Bierings^c, A.C. Bloem^a, K. Tesselaar^{a,*}

The Journal of Pediatrics 1997, HLA-DR L243

Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood

Reference values for lymphocyte subpopulations

W. Marieke Comans-Bitterl MSc, Ronald de Groot, MD, PhD,
René van den Beemd, MSc, Herman J. Neijens, MD, PhD,
Wim C. J. Hop, MSc, Kees Groeneveld, PhD, Herbert Hooijkaas, PhD,
and Jacques J. M. van Dongen, MD, PhD

From the Department of Pediatrics, Sophia Children's Hospital/University Hospital Rotterdam, the Department of Immunology, University Hospital Rotterdam, and the Department of Epidemiology and Biostatistics, Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands

Čím a jak aktivovat B-lymfocyty?

LEKTINY : vazba na glykoproteiny/glykolipidy
pokeweed mitogen (**PWM**)

LIGANDY TLR

CpG - vazba na TLR9

PROTILÁTKY a REKOMBINANTNÍ PROTEINY

anti-IgM (+ **CD40L**/anti-CD40)

anti-IgD (+ **CD40L**/anti-CD40)

CYTOKINY IL-21, IL-4, IL-10 aj.

- CD69, CD25, CD23, CD80, CD86, diferenciace
- produkce protilátek, cytokinů, ...

Další specializované aktivační testy

DEGRANULACE NK buněk

Chiang et al., **Comparison of primary human cytotoxic T-cell and natural killer cell responses reveal similar molecular requirements for lytic granule exocytosis but differences in cytokine production.** Blood 2013

Bryceson et al., **Functional Analysis of Human NK cells by Flow Cytometry.** Methods Mol Biol 2010

NK AKTIVACE/EXPANZE

přes NKp46 and NKp30 receptory nebo kombinací cytokinů IL-2, IL-12, and IL-15

INDUKCE APOPTÓZY

SIGNALIZAČNÍ PROCESY

PRODUKCE CYTOKINŮ ...

veronika.kanderova@lfmotol.cuni.cz

Poděkování za pomoc a konzultaci

Pavla Luknárová

Marcela Vlková

Jolana Vosáhlová

Miro Benko