

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



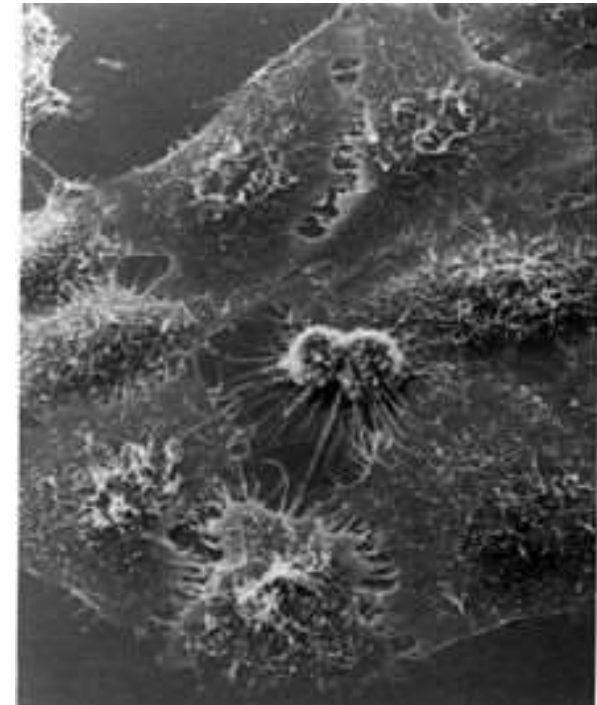
Neutrophil



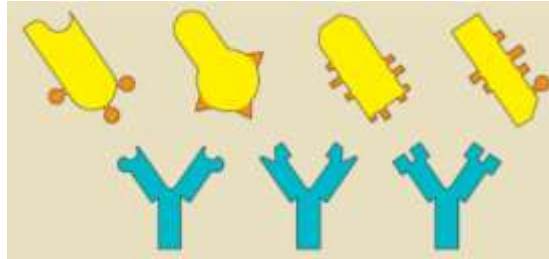
Eosinophil



Basophil



Rozdelenie imunologických laboratórnych metód



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



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



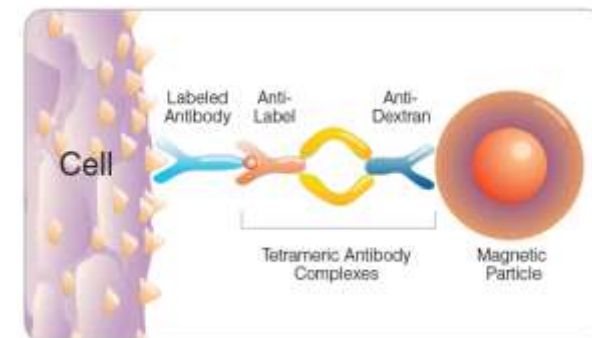
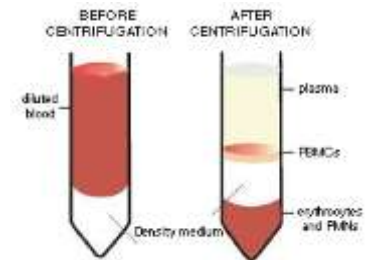
Eosinophil



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

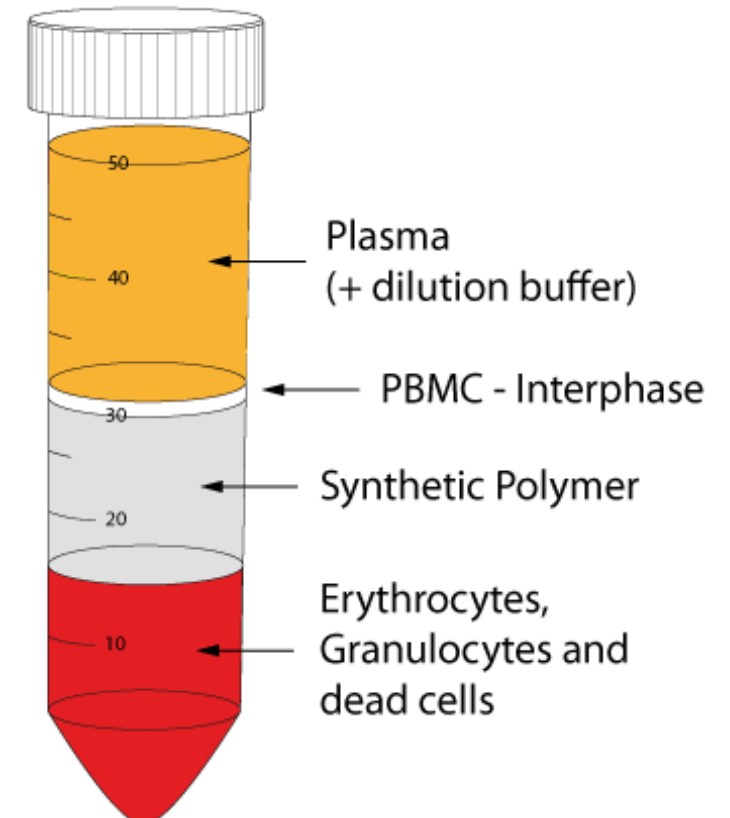
1. Izolace PBMC

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

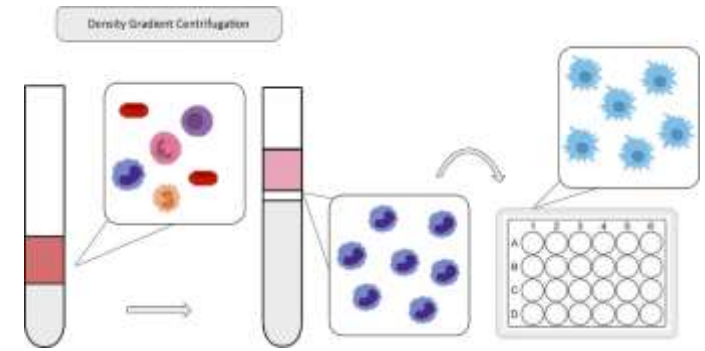


1. Izolace PBMC

- 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
- Spočítání PBMC na analyzátoru → ředění buněk pro funkční test



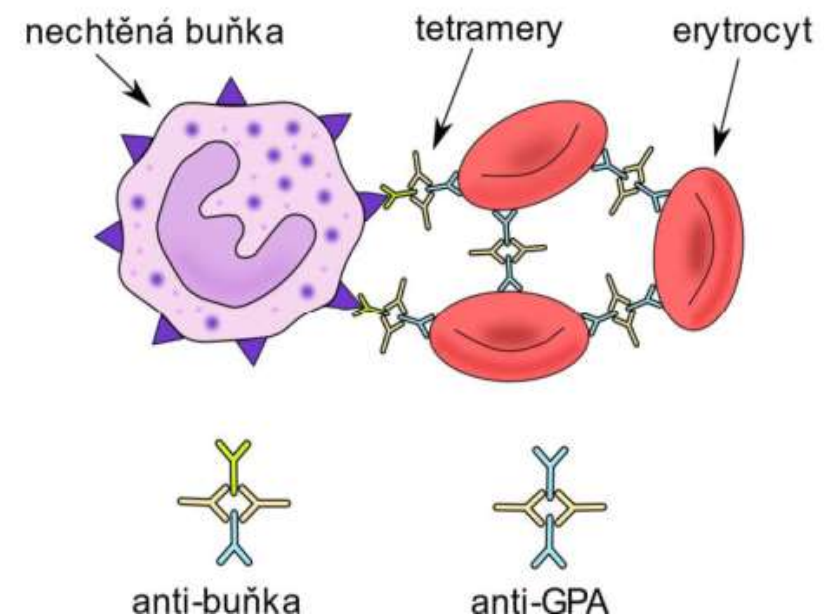
2. Adherence na plastový povrch



- 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

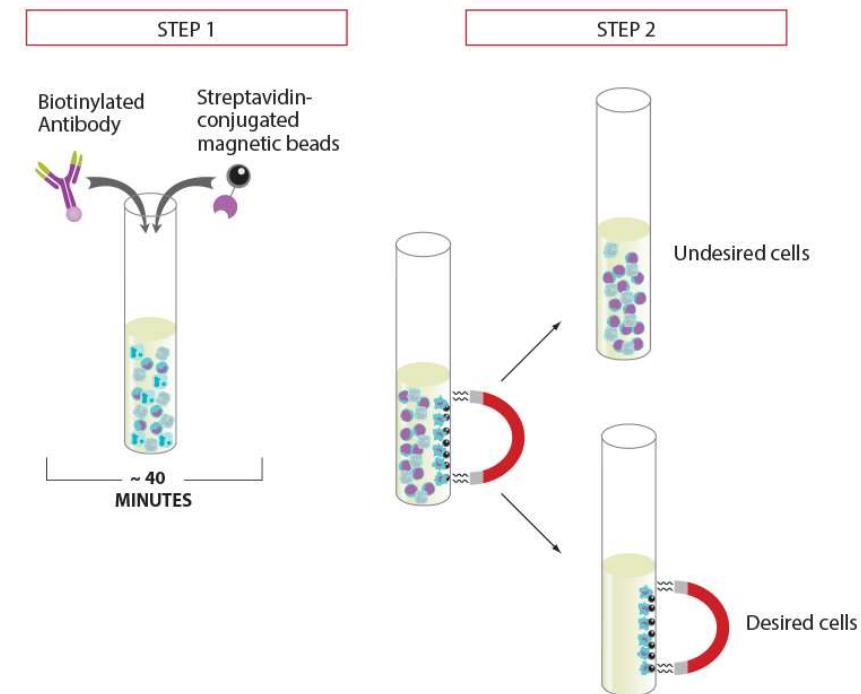
3. Rozetové separace

- 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)



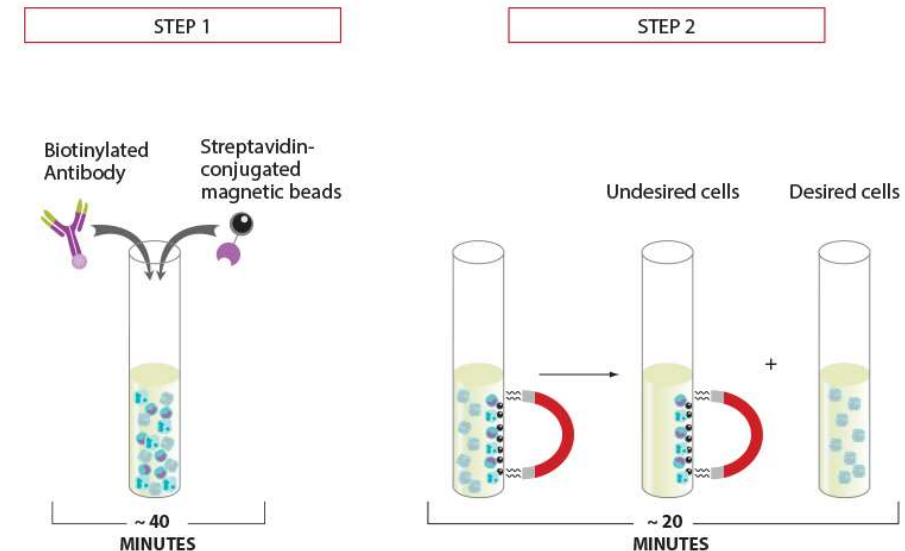
4. Magnetická selekce

- 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

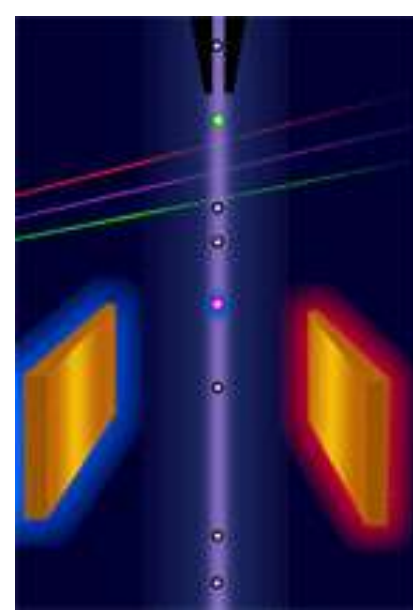
- **Negativní selekce:**
- Koktejl monoklonálních protilátek namířený vůči všemu v krvi/PBMC kromě populace kterou požadujeme
- Nechtěné buňky jsou přidrženy pomocí magnetu
- Cílové buňky zůstávají v roztoku – odsátí do nové zkumavky
- Výhoda: **izolované buňky nejsou ovlivněny vazbou protilátek – výhodné 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)



5. Sortování

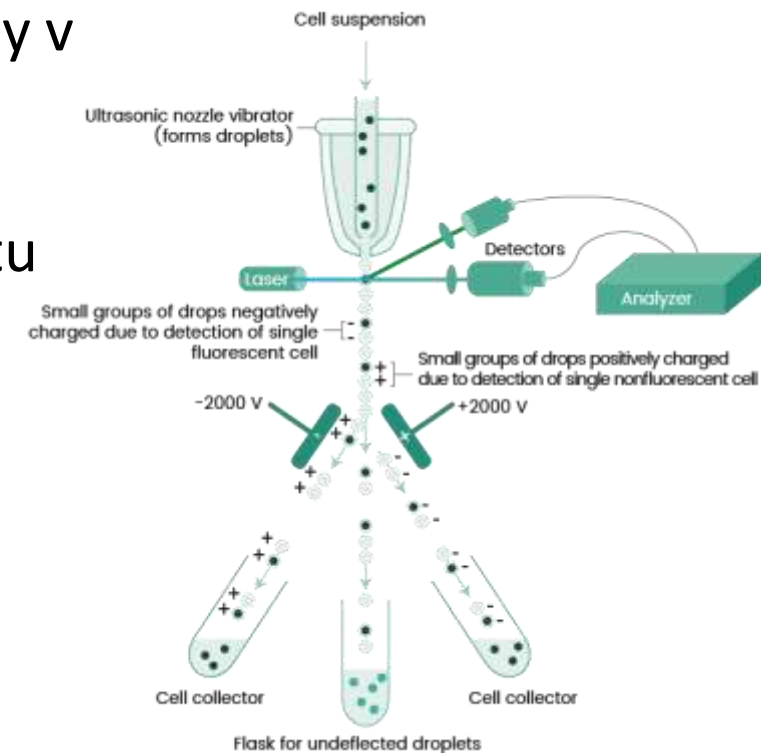
- Princip: průtoková cytometrie

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 v 1 kapce byla 1 buňka
4. Každé kapce je přiřazen + nebo - náboj → vychýlení kapky s cílovou buňkou do zkumavky pomocí magnetu



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 aktivačních znaků pomocí průtokové cytometrie

Funkčné testy lymfocytov

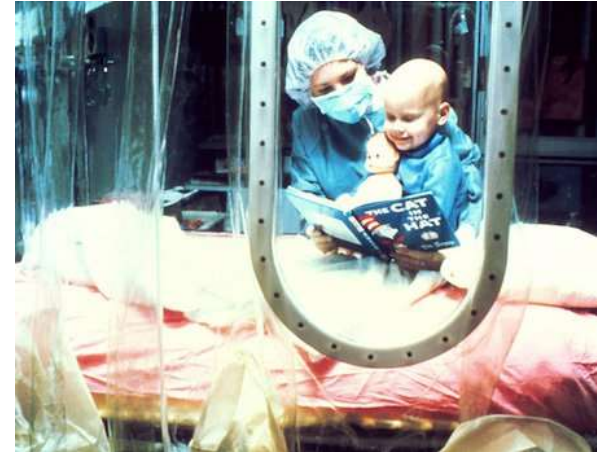
- test PROLIFERÁCIE lymfocytov (test blastickej transformácie) – sleduje sa schopnosť delenia lymfocytov po stimulácii

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**
- **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 bublině celý svoj život – 12 let

Obecné schéma zpracování vzorku na proliferaci

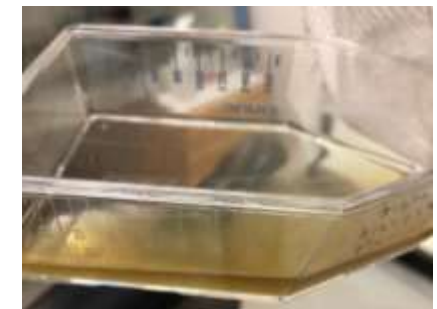
1. Izolace PBMC nebo odběr plné krve do heparinu
2. Umístění leukocytů do sterilního živného média
3. Stimulace leukocytů – přidáme polyklonální mitogen
4. Inkubace několik dní (3-4) – buňky se dělí po reakci na mitogen
5. Detekce proliferace (různé metody)
6. Vyhodnocení

Kultivácia lymfocytov in vitro



RPMI médium -
čerstvé

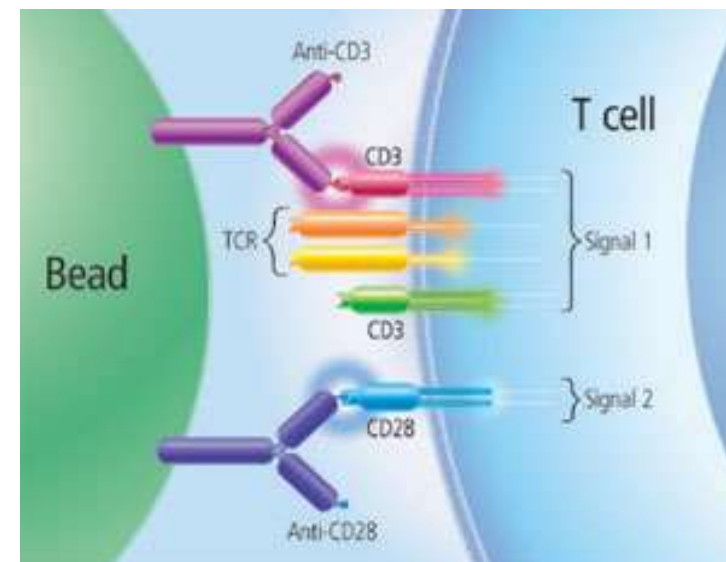
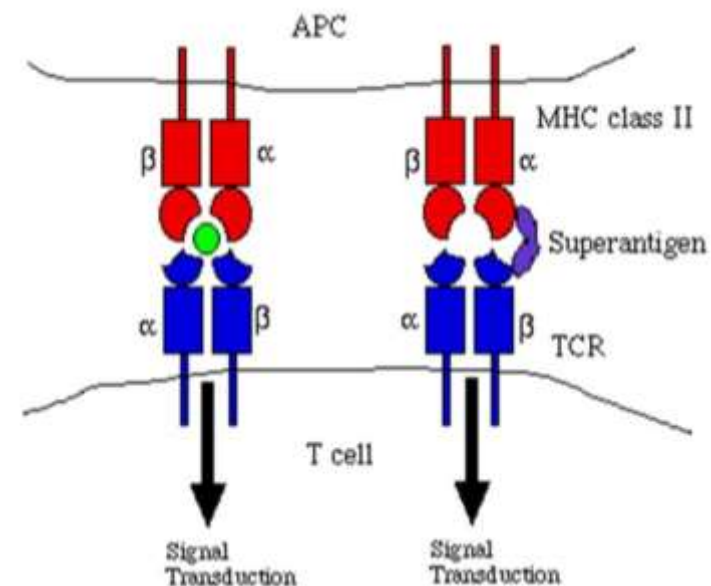
- Pestovanie prebieha v definovanom bazálnom médiu RPMI – obsahuje cukry, AMK, vitamíny, stopové prvky atd. (+ ATB – penicilín, streptomycín) pri 37°C, 5% CO₂, 95% vlhkosť
- Obsahuje také acidobazický indikátor - fenolovou červeň (je zodpovedná za rúžové zbarvení média)
- V průběhu dělení buňky spotřebovávají živiny a tvoří kyselé metabolity → posun pH do kyselé oblasti → změna barvy fenolové červeně z rúžové na žlutou
- Žlutá indikuje vyčerpané médium – nutno vyměnit za nové!!



RPMI médium – buňky vyčerpaly živiny → nutnosť výměny média

Stimulancia

- Rastlinné lektíny - **PHA** (phytohaemagglutinin)
ConA (Concanavalin A)
- monoklonálne protilátky proti receptorom a koreceptorom (**anti-CD3,+ anti-CD28**)
- bakteriálne antigény – **tetanický toxoid**,
tuberkulin
- Stimulancia fungujú jako **polyklonální mitogeny!**
- Aktivace velkého počtu lymfocytů nezávisle na jejich antigenní specifitě!



Metody detekce proliferace

```
graph TD; A[Metody detekce proliferace] --> B[Bez využití průtokové cytometrie]; A --> C[S využitím průtokové cytometrie]; B --> D[Inkorporace H³ thymidinu]; B --> E[DELFI A]; C --> F[CFSE]; C --> G[Detekce Ki-67];
```

Bez využití průtokové cytometrie

Inkorporace H³ thymidinu

DELFI A

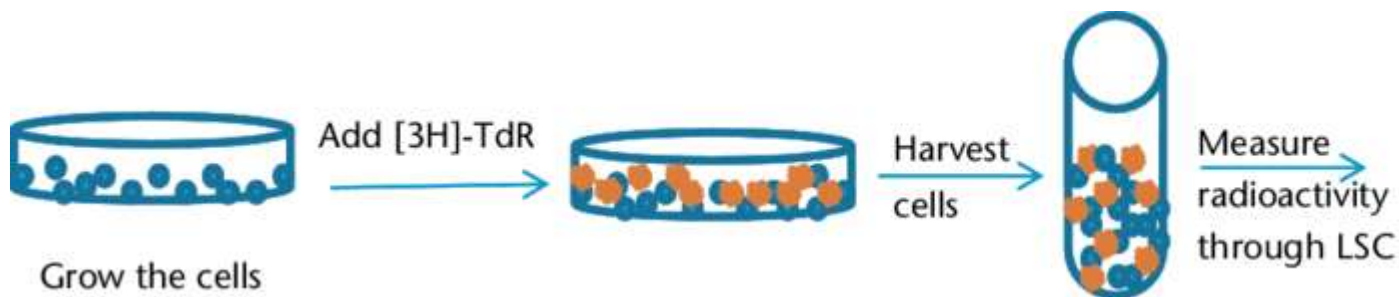
S využitím průtokové cytometrie

CFSE

Detekce Ki-67

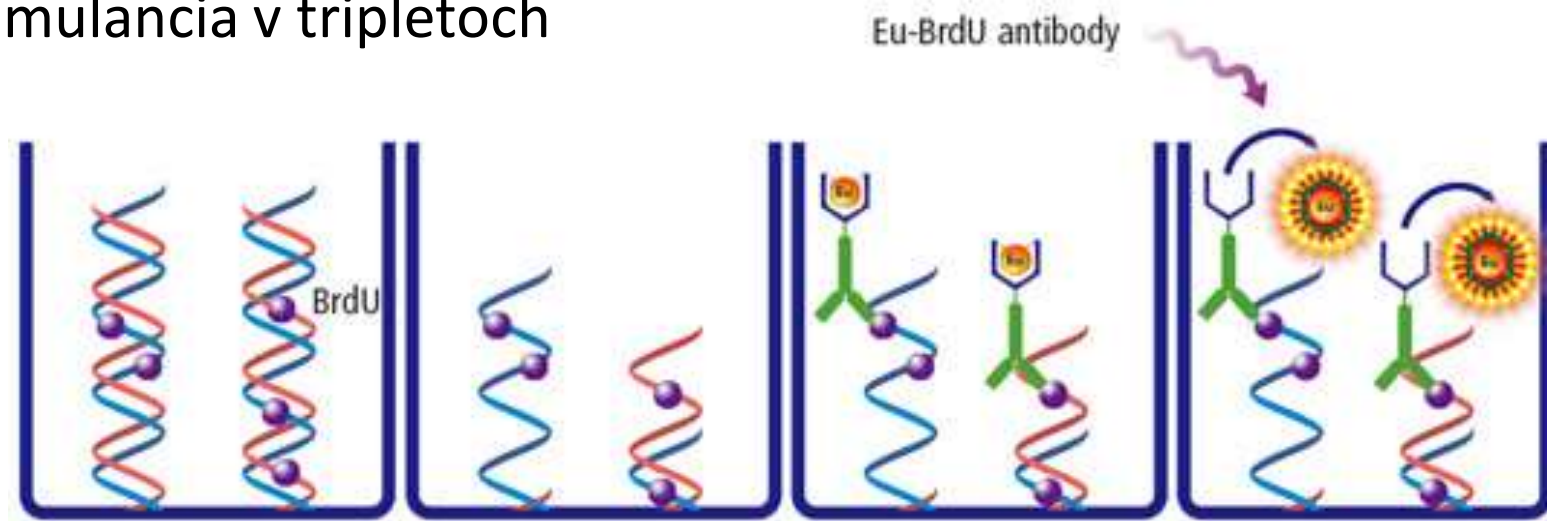
Metódy – 1. Inkorporace ^3H thymidinu

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



2. DELFIA (PerkinElmer)

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



Detekce - TRF- Time resolved fluorescence

Časově modulované měření fluorescence

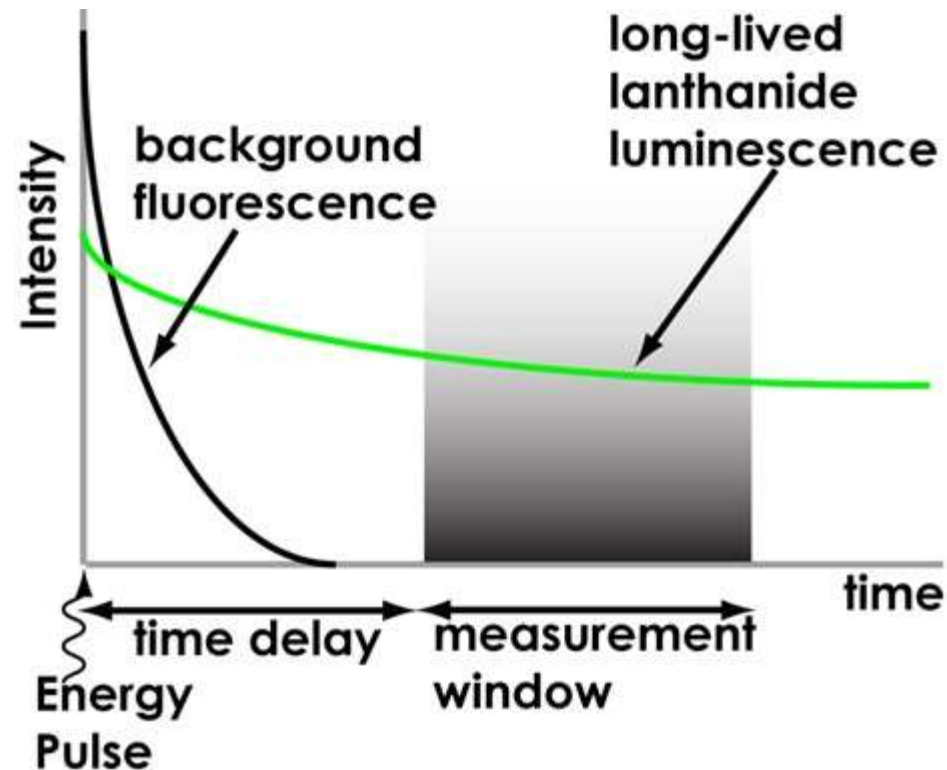


Výhoda:

Cheláty lathanidů mají dlouhou dobu fluorescence a velký rozdíl mezi excitační a emisní vlnovou délkou

Pulzní excitace chelátu lathanidu →

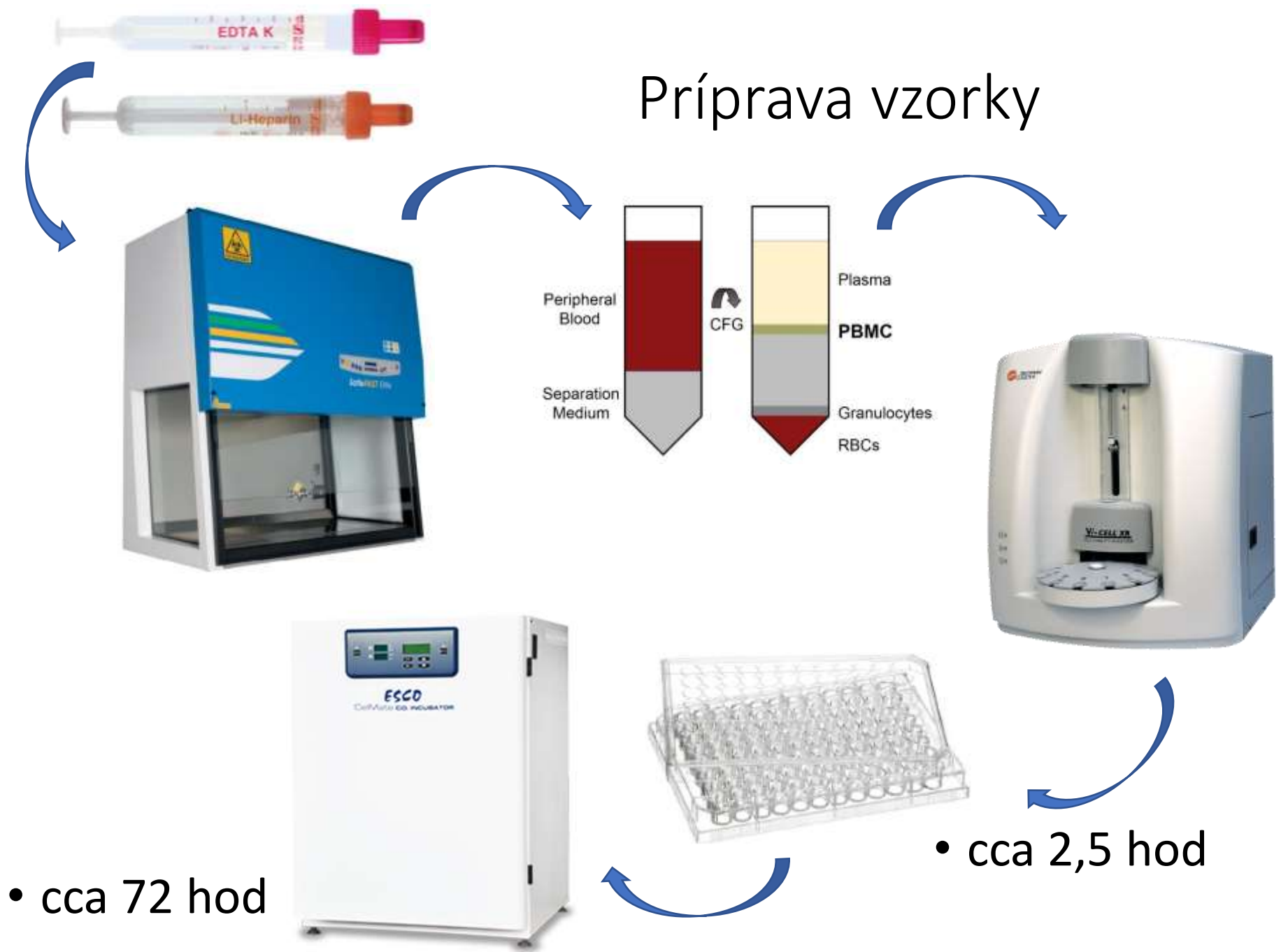
Měření fluorescence se zpožděním – v době, kdy již pominula nespecifická fluorescence pozadí → vysoká přesnost a citlivost metody



Výsledek DELFIA – počet záblesků v každé jamce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	295	320	415	270	345	440	405	525	345	255	310	445
		Pacient			Kontrola			Pacient				
B	N 270	1785	1700	1510	1505	2790	2200	365	425	485	480	325
C	CD3 535	108820	92780	99960	115415	112115	108790	375	390	475	325	430
D	PHA 5 450	32295	26635	24970	105190	109035	90855	355	320	380	415	370
E	PHA 2 320	7185	6475	4490	50205	47085	45995	435	300	345	365	405
F	ConA 2,5 305	48050	48670	46200	131800	115575	100390	F 8 445	290	500	455	450
G	ConA 1 365	25230	23305	19890	86205	78885	80965	480	425	610	300	370
H	330	455	440	375	385	385	380	465	500	425	490	450

Príprava vzorky



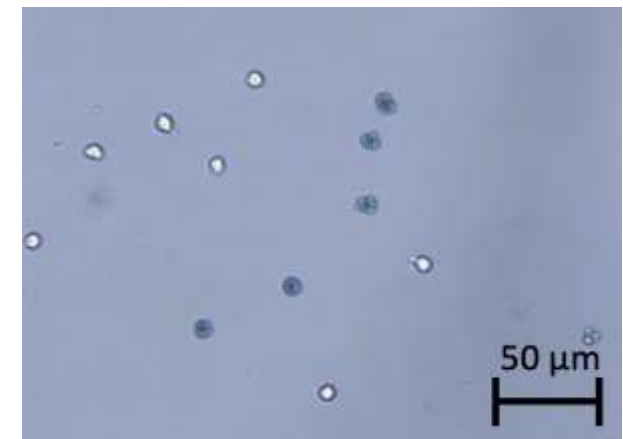
• cca 72 hod

• cca 2,5 hod

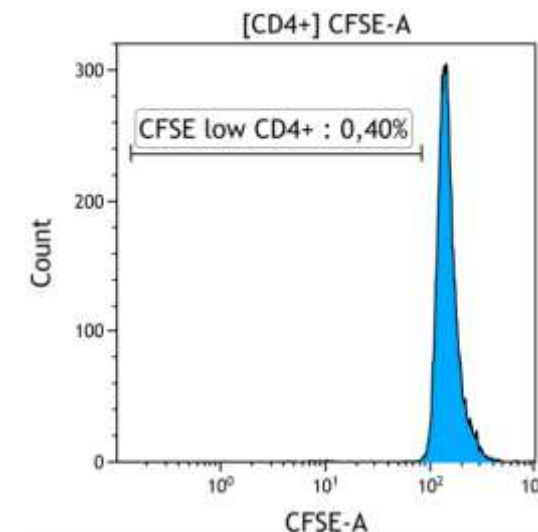
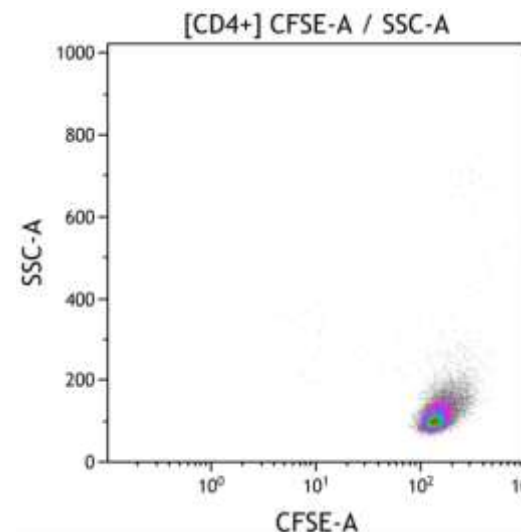
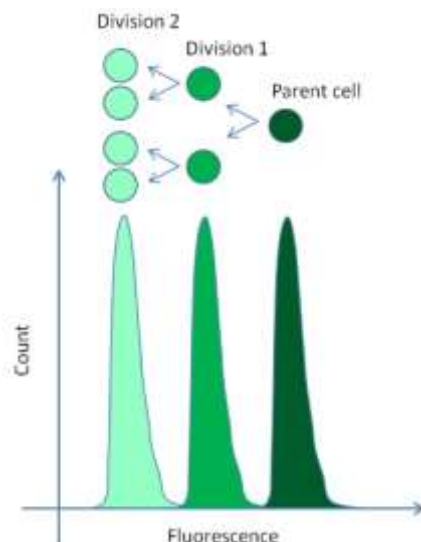
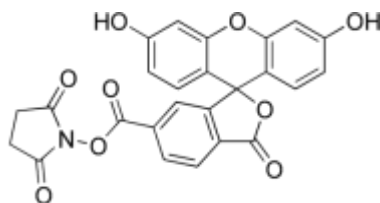
Počítání buněk – přístroj Vicell XR



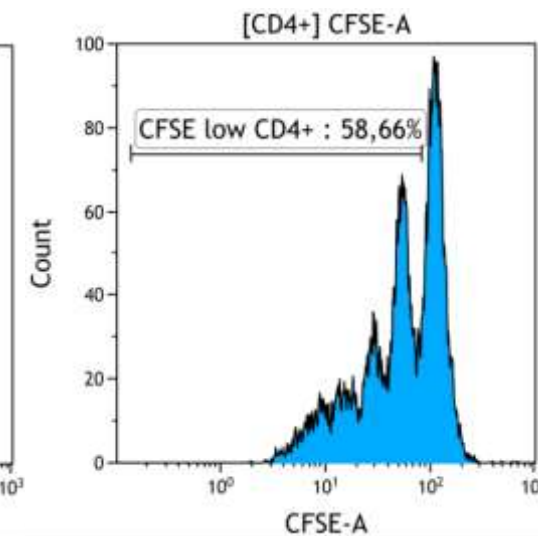
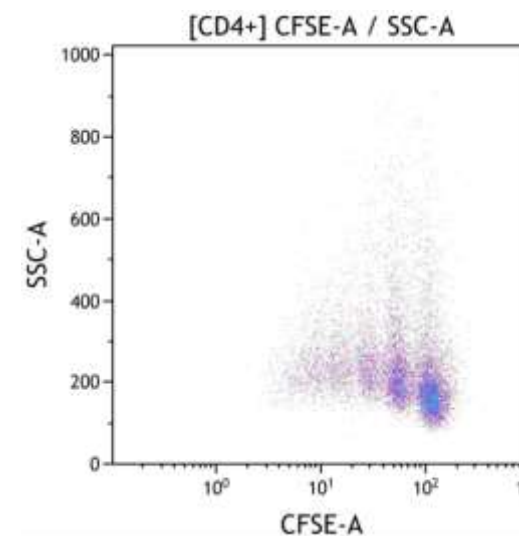
- Vitální barvení trypanovou modří
- Živé buňky – barvivo skrze membránu nepronikne – aktivní metabolismus (jsou průhledné)
- Mrtvé buňky – průnik barviva skrze porušenou membránu (modré zbarvení)
- Stroj vyfotí 50 zorných polí – informace o % viability + výdej výsledku o počtu buněk – miliony na 1 ml
- Cílovou koncentraci buněk pro proliferaci nutno dopočítat a příslušně naředit



3. CFSE



- Cytometrická detekcia pomocou fluorescenčného farbiva **CFSE** (karboxyfluoresceinsukcinimidylester), ktoré sa viaže nešpecificky na rôzne štruktúry v bunkách, sleduje sa pokles fluorescence po delení buniek
- S každou nově vzniklou generáciou buněk **klesá** intenzita fluorescence
- Informace nejen o proliferaci, ale také o počtu proběhlých buněčných cyklů



4. Cytometrické stanovenie – Ki-67 – in house metoda

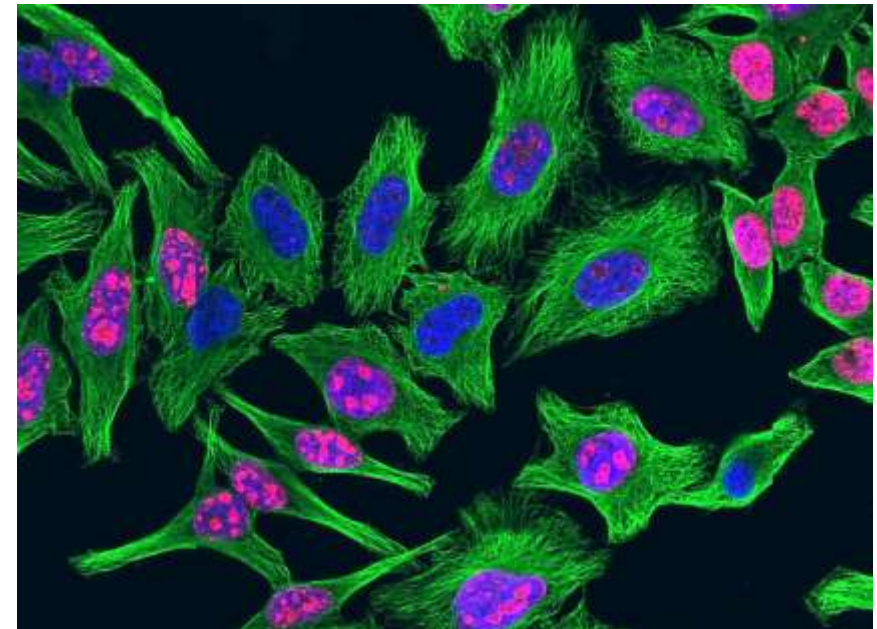
- Ki-67 - jadrový proteín
- asociovaný (možno nevyhnutný) s bunečnou proliferáciou a s transkripciou rRNA
- interfáza- bunečné jadro
- mitóza- povrch chromozómov
- prítomnosť G1, S, G2, mitóza
- absencia G0

HeLa cells

Ki-67 proteín (červená)

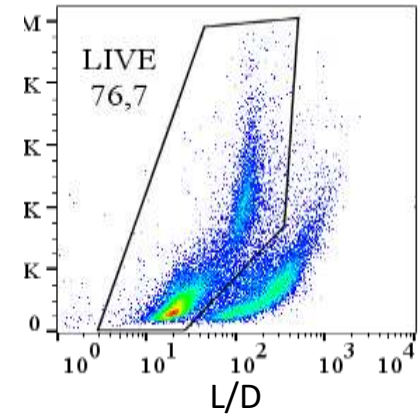
tubulín (zelená)

DNA (modrá)

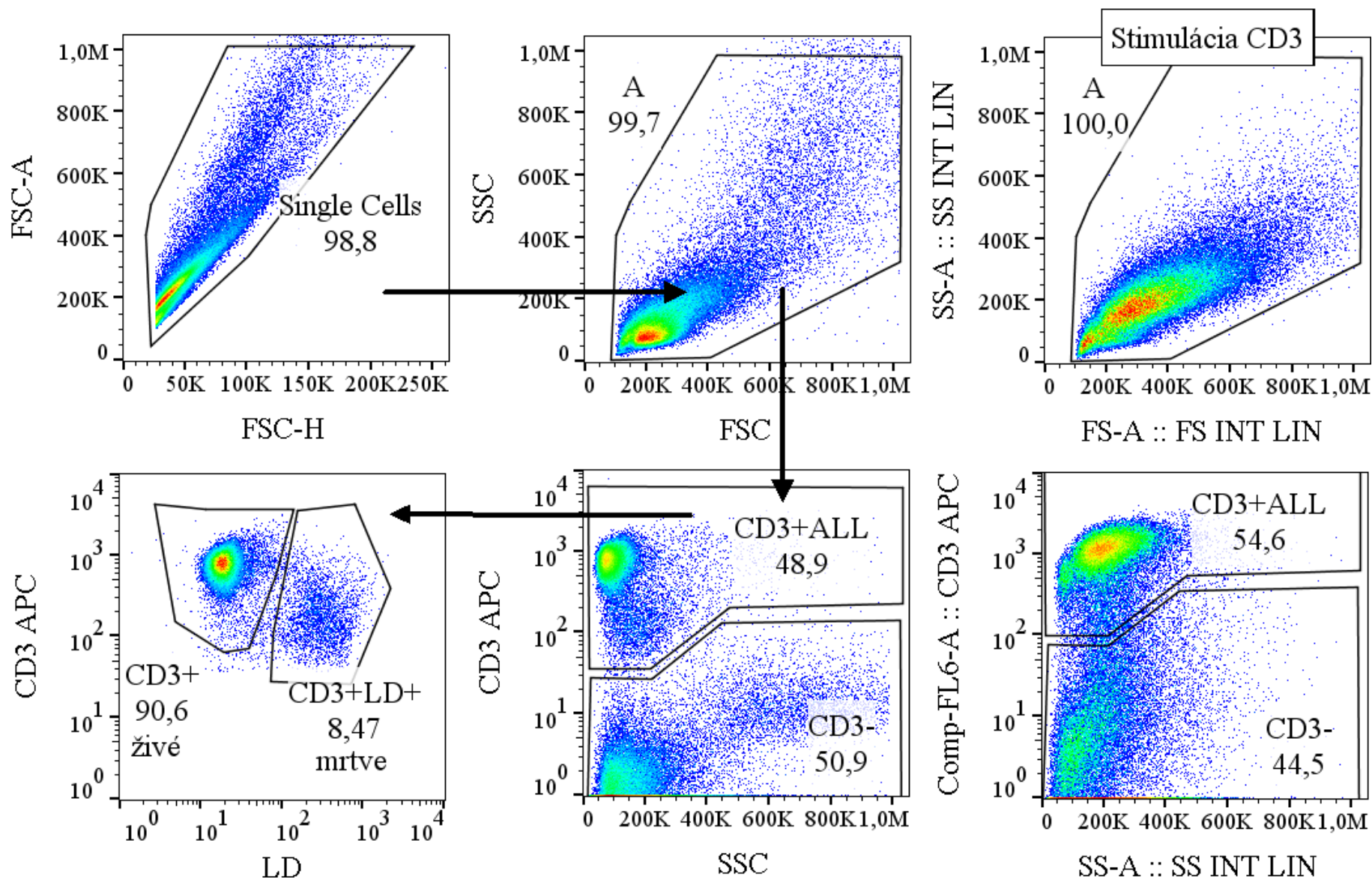


Spracovanie

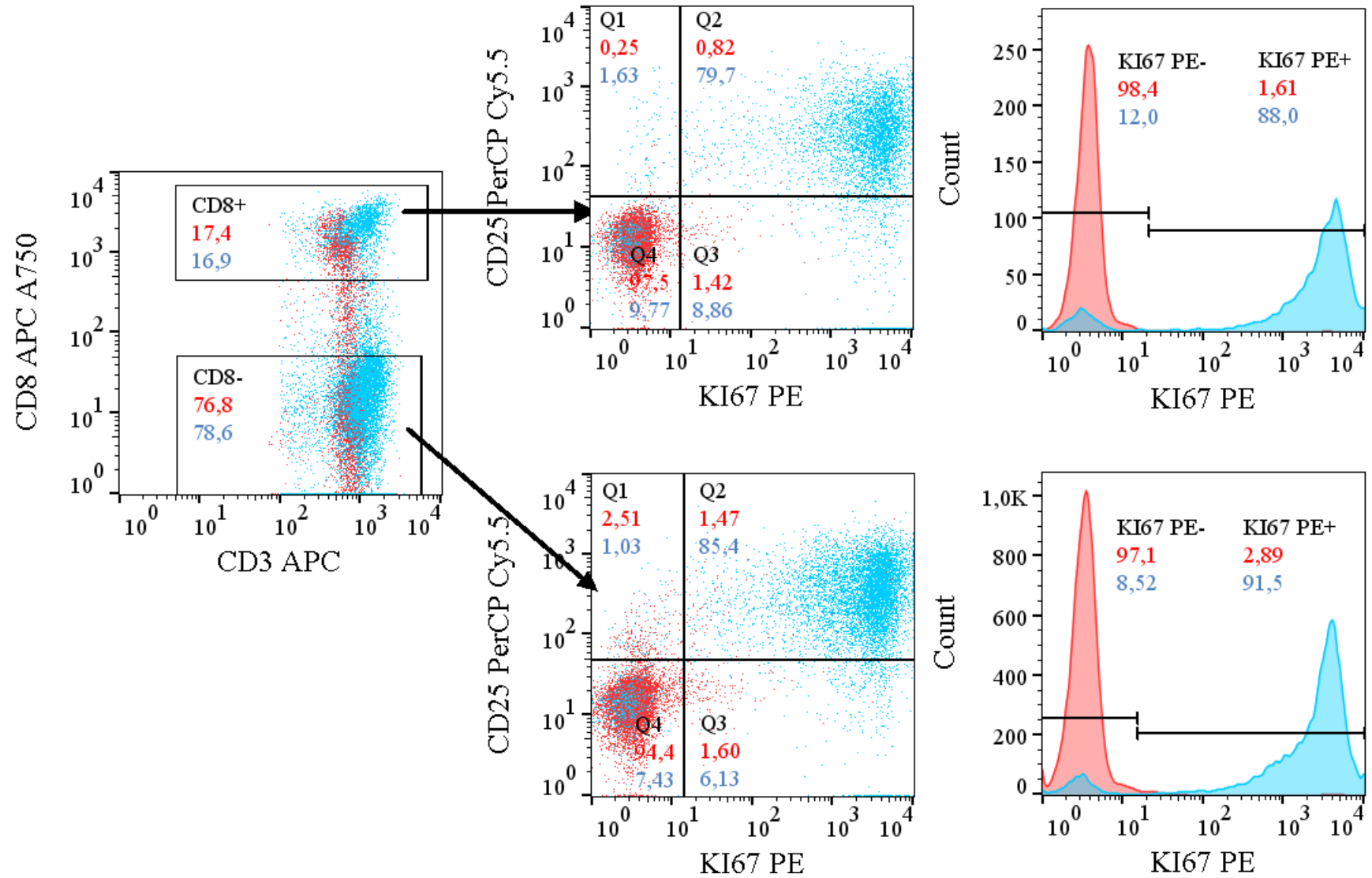
- značenie živé mrtvé buňky - L/D- 30 min
 - Live/dead barvička – váže sa na aminoskupiny na buňkách – živé jsou pozitivní slabě (barvička je pouze na povrchu buněk, mrtvé jsou pozitivní silně – porušenou membránou barvivo proniklo dovnitř buňky a navázalo se také na aminoskupiny proteinů vyskytujících se intracelulárně)
- extracelulárne značenie (anti-CD25, anti-CD8)- 30 min
 - CD25- súčasť receptoru pre IL-2 (α reťazec)
- fixácia (paraformaldehyd)- 60 min – zafixuje buňky – zabránení rozpadu
- permeabilizácia – vytvoření pórů do buněčné a jaderné membrány, umožní průnik protilátek
- intracelulárne značenie (anti-CD3, anti-Ki-67)- 30 min



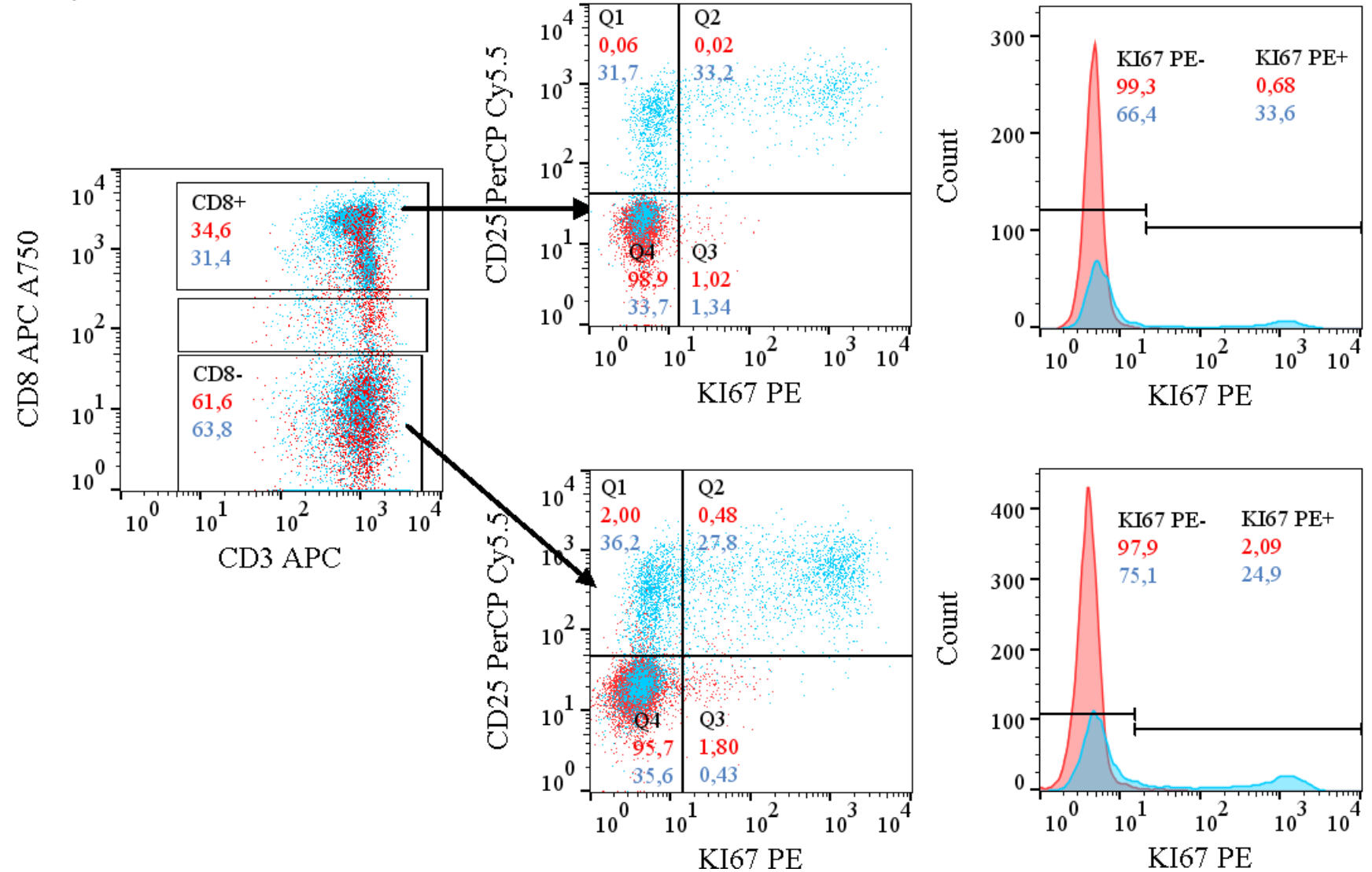
Gatovacia stratégia



Gatovacia estratégia



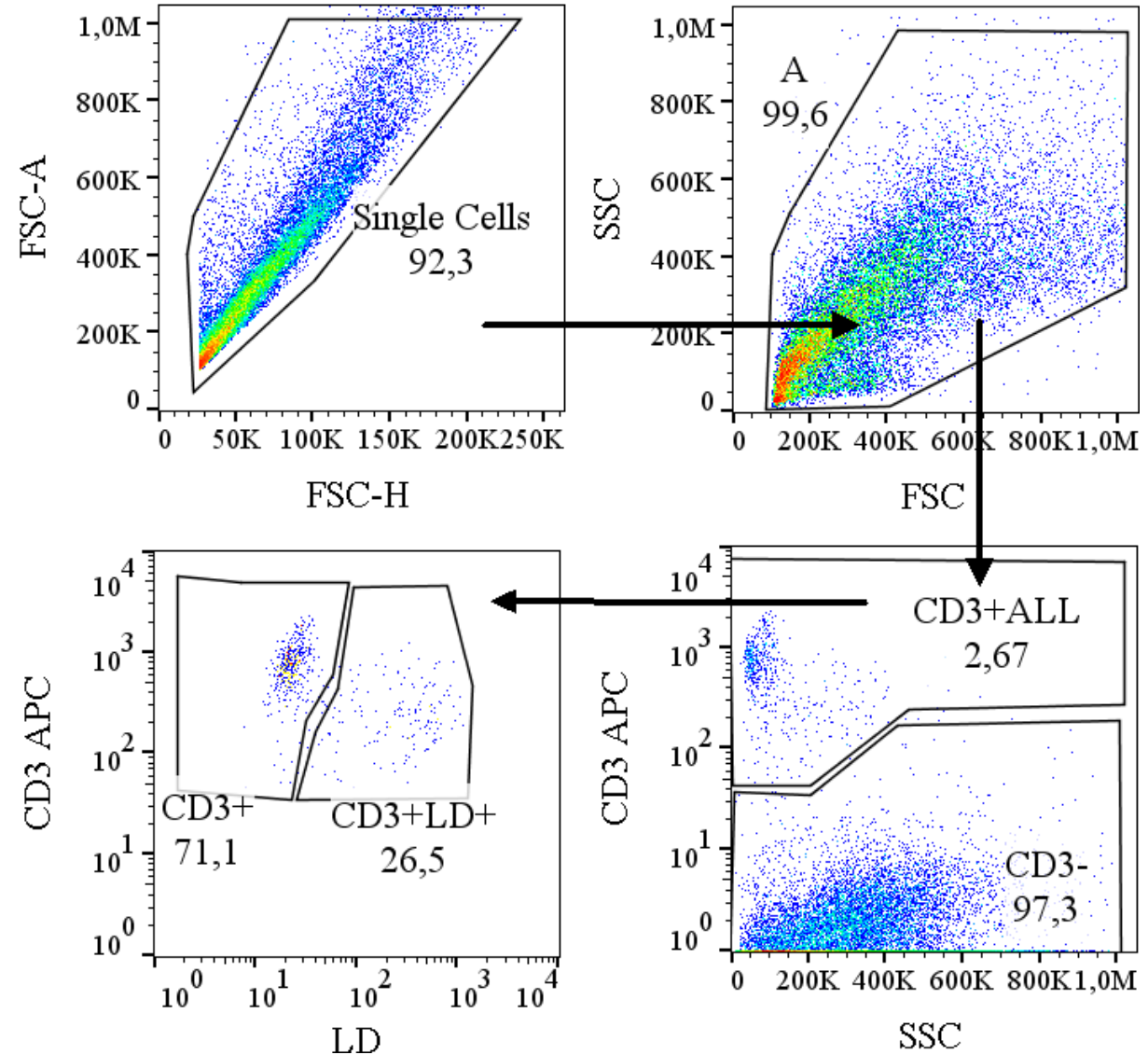
Patient 1: ↓ expresia Ki-67



Pacient 2:

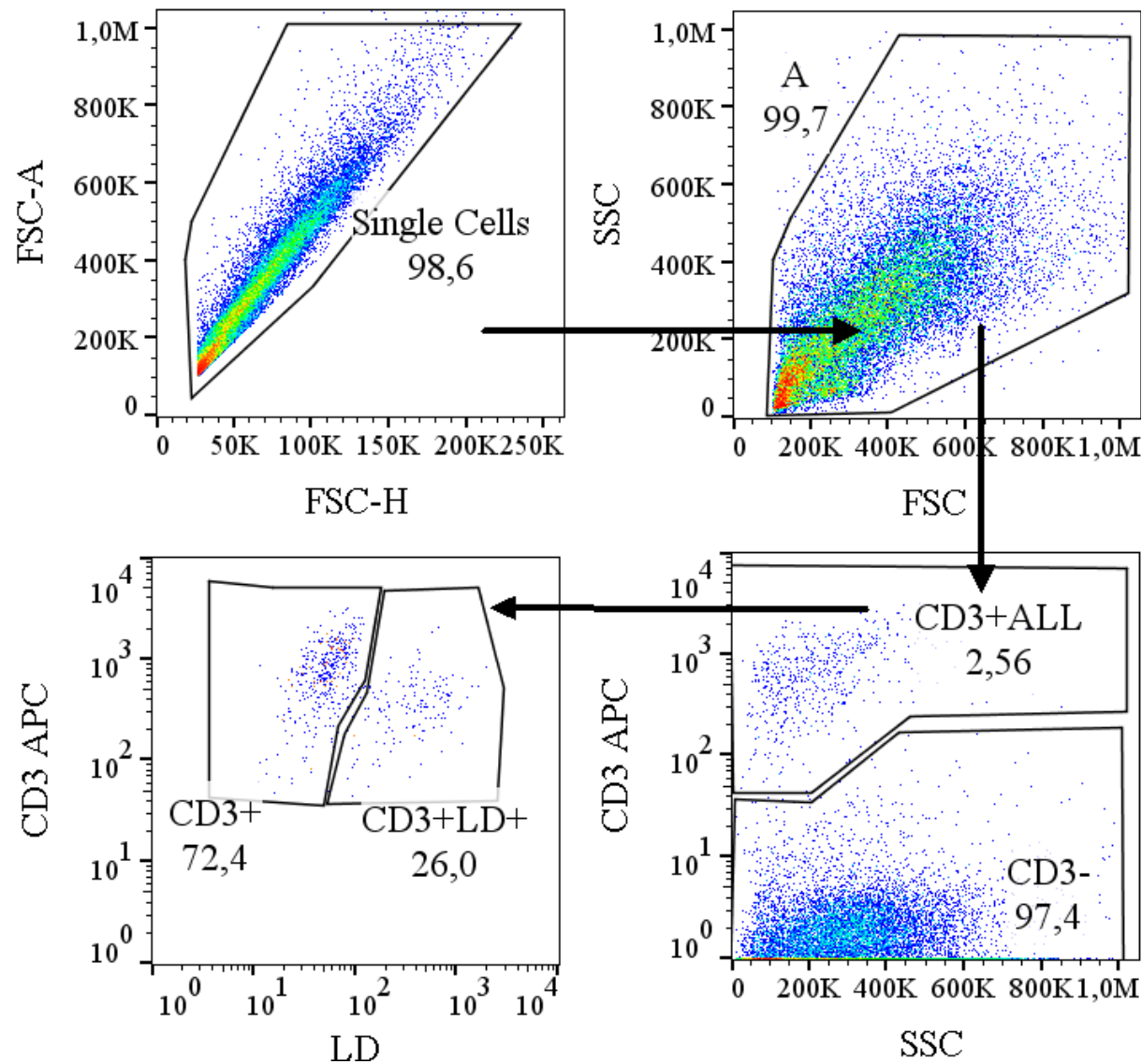
↑ apoptóza buniek

• nestimulované

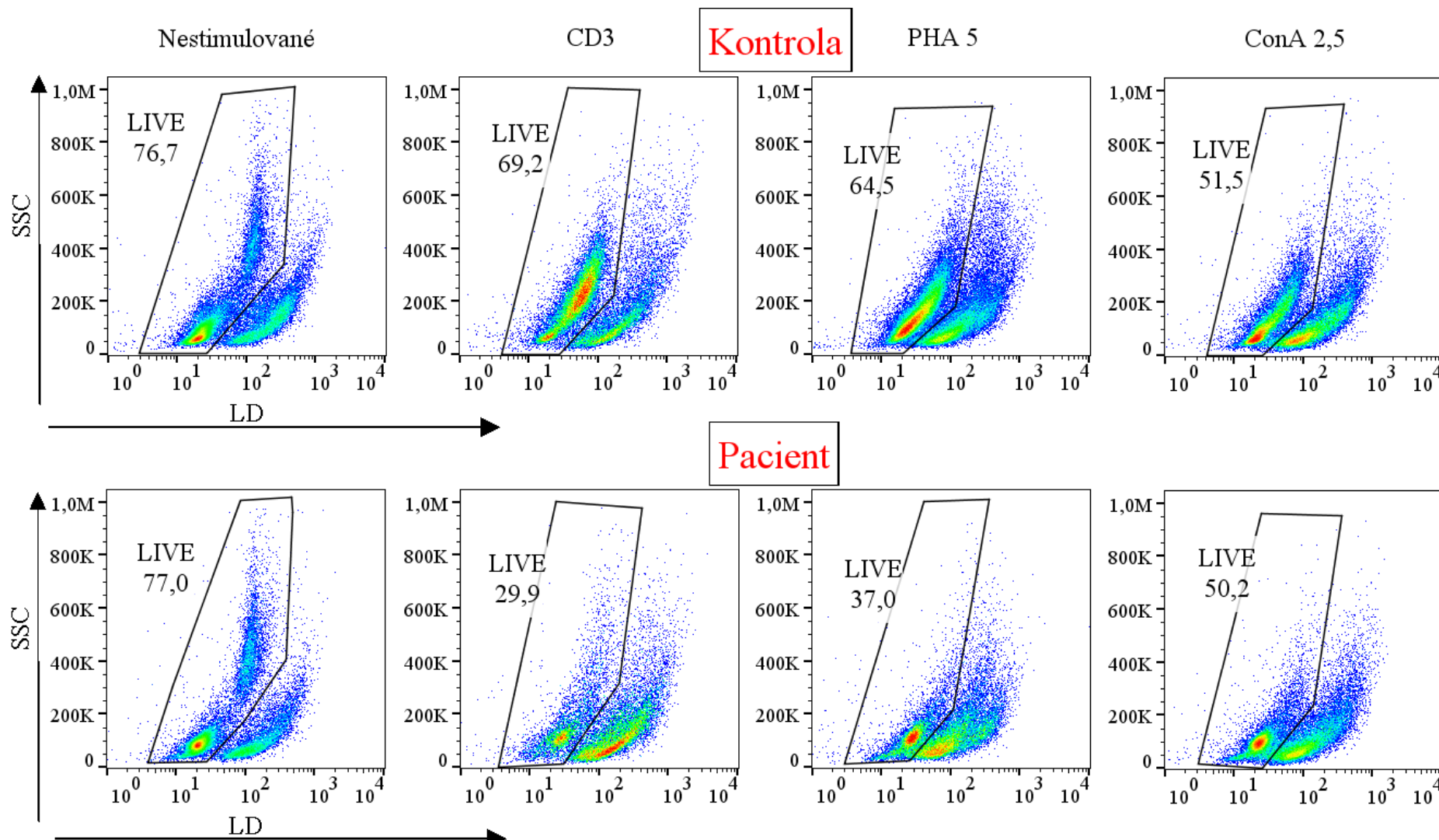


Pacient 2:
↑ apoptóza buniek

- stimulácia aCD3



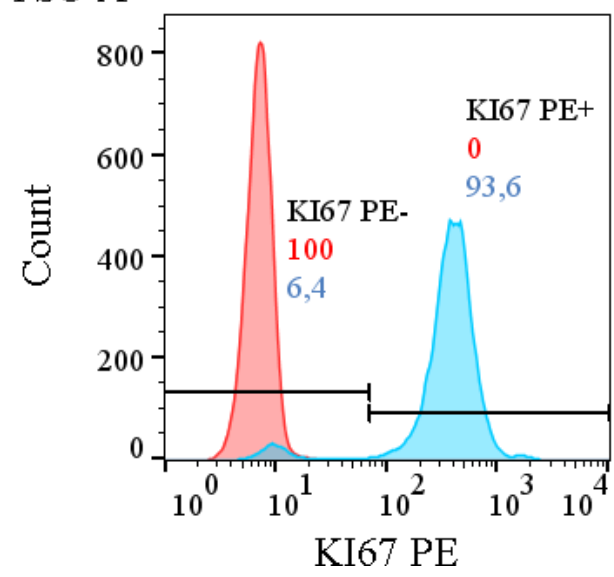
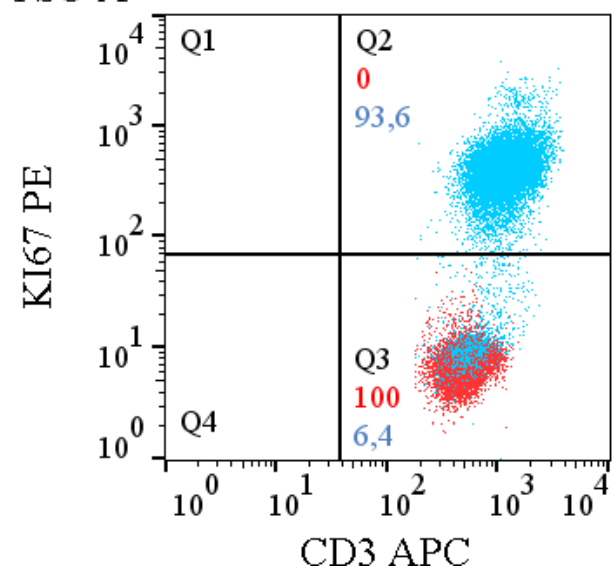
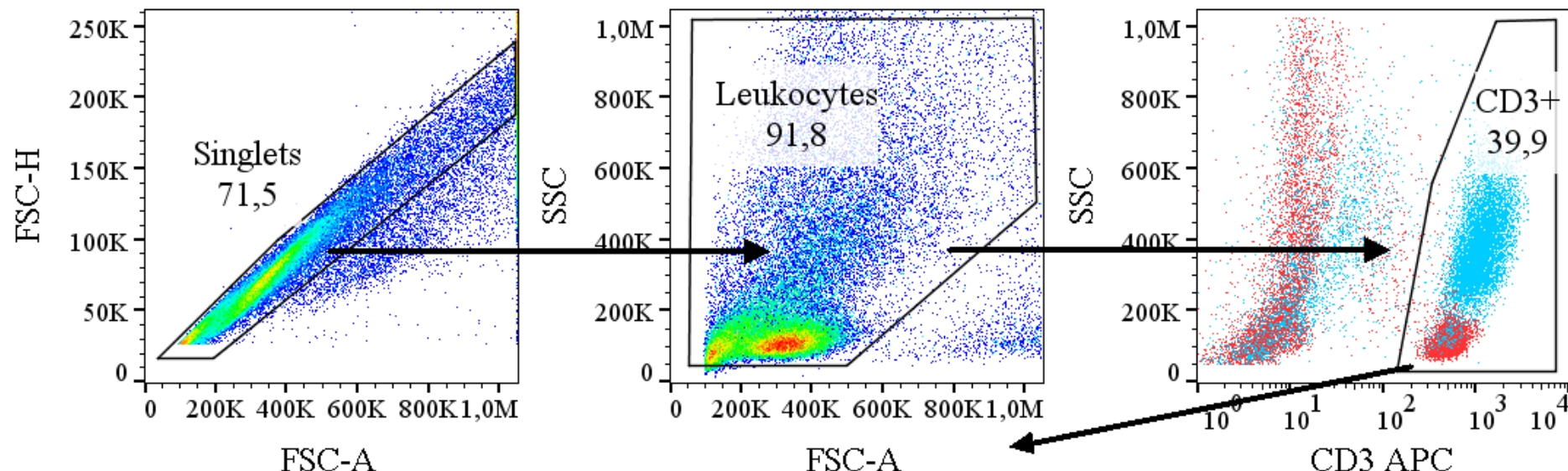
Pacient 3: silnejšia stimulácia → zvýšená úmrtnosť bb



EXBIO Ki-67 KIT – metoda certifikovaná firmou

- Stimulancia lyofilizované v skúmavkách
- Krv odobraná do heparínu
- Všetky potrebné reagensie prítomné v sete
- Detekcia: CD3 + Ki67
- Štandardizovaný a testovaný postup:
 - Zkumavka obsahuje vysušený mitogen →
 - Pridáme 45ul plné krve + 500ul RPMI média
 - Inkubace 3 dny
 - Značení anti-CD3 na povrchu
 - Fixace a permeabilizace buněk →
 - Značení anti-Ki-67 uvnitř jádra buněk





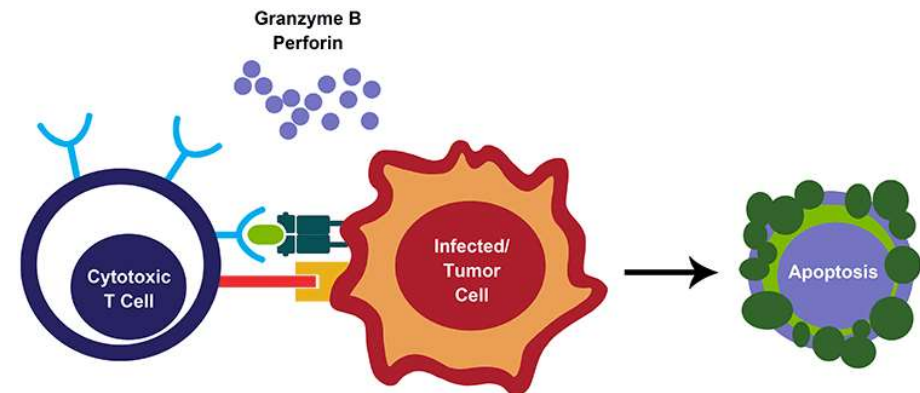
Gatovacia stratégia

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

Cytotoxický test

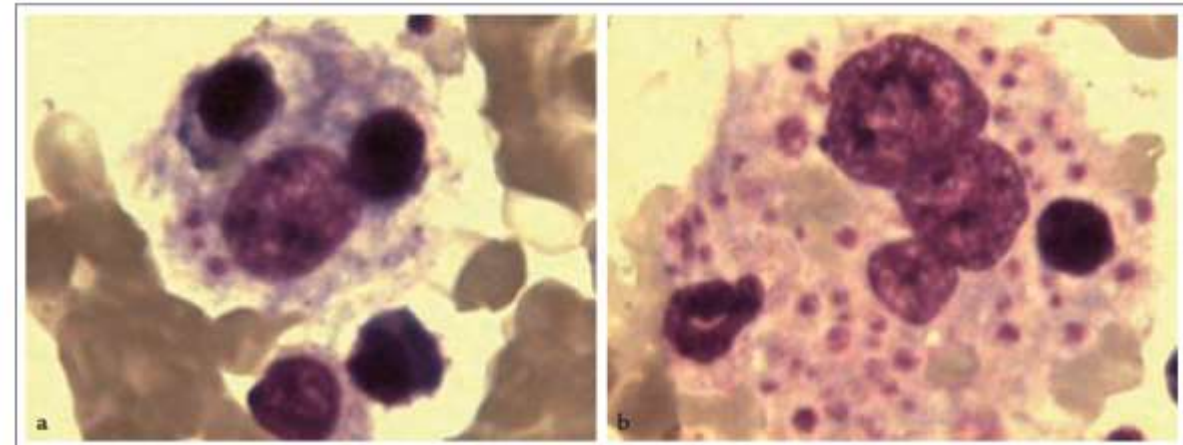
- Schopnost **CD8 T-lymfocytů a NK buněk** zabít jiné buňky pomocí systému **granzym/perforin**
- Provedení:
- V testu musí být kromě pacienta zpracována i zdravá kontrola! (aby bylo pacienta s čím srovnat)
 1. Izolace CD8 T-lymfocytů/NK buněk pacienta a kontroly
 2. Aktivace *in vitro* pomocí polyklonální 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 - 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*

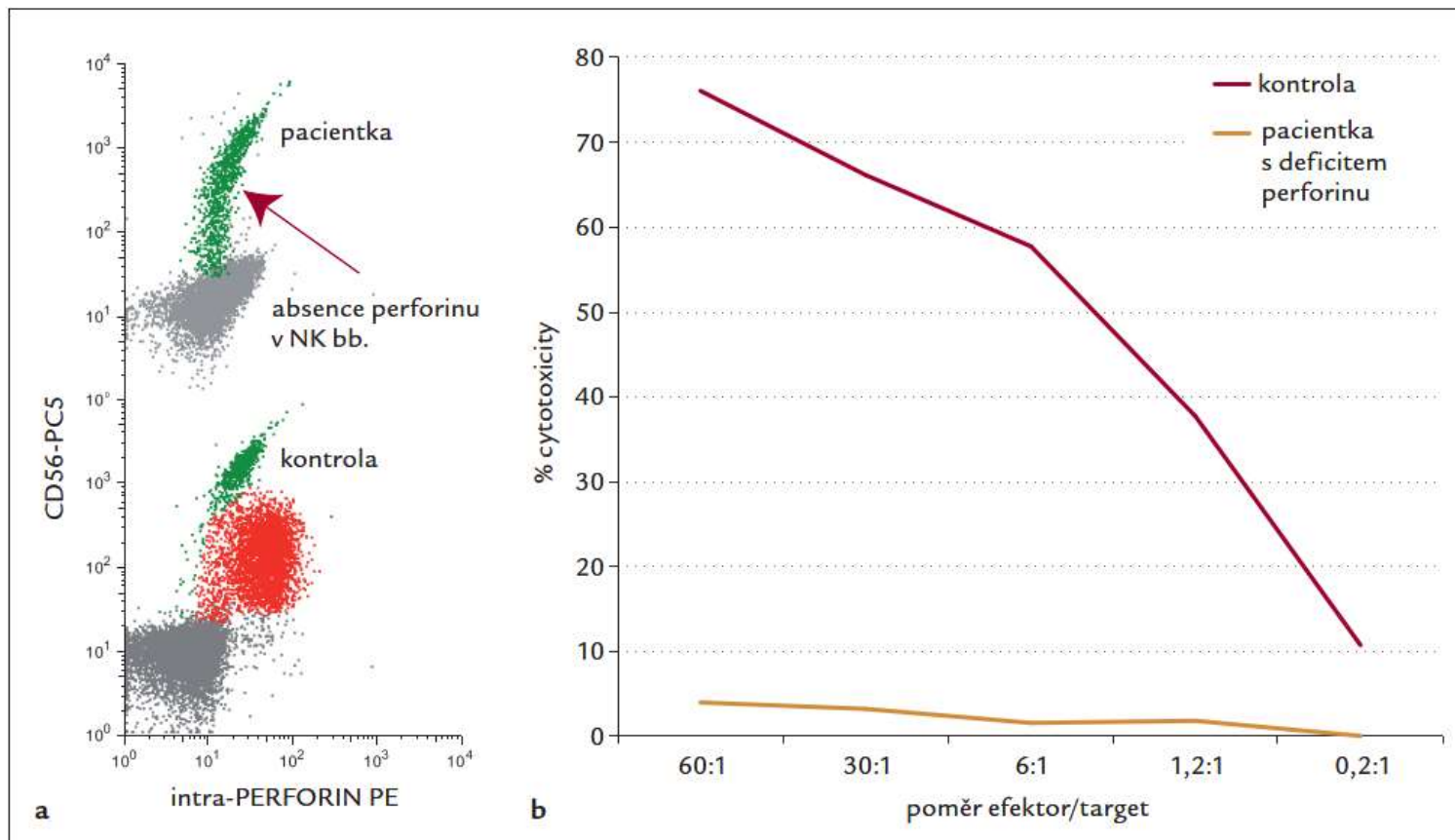
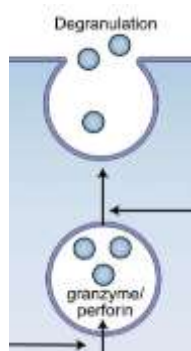


Makrofágy v KD s pohlcenými RBC, jádry buněk a trombocyty

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)



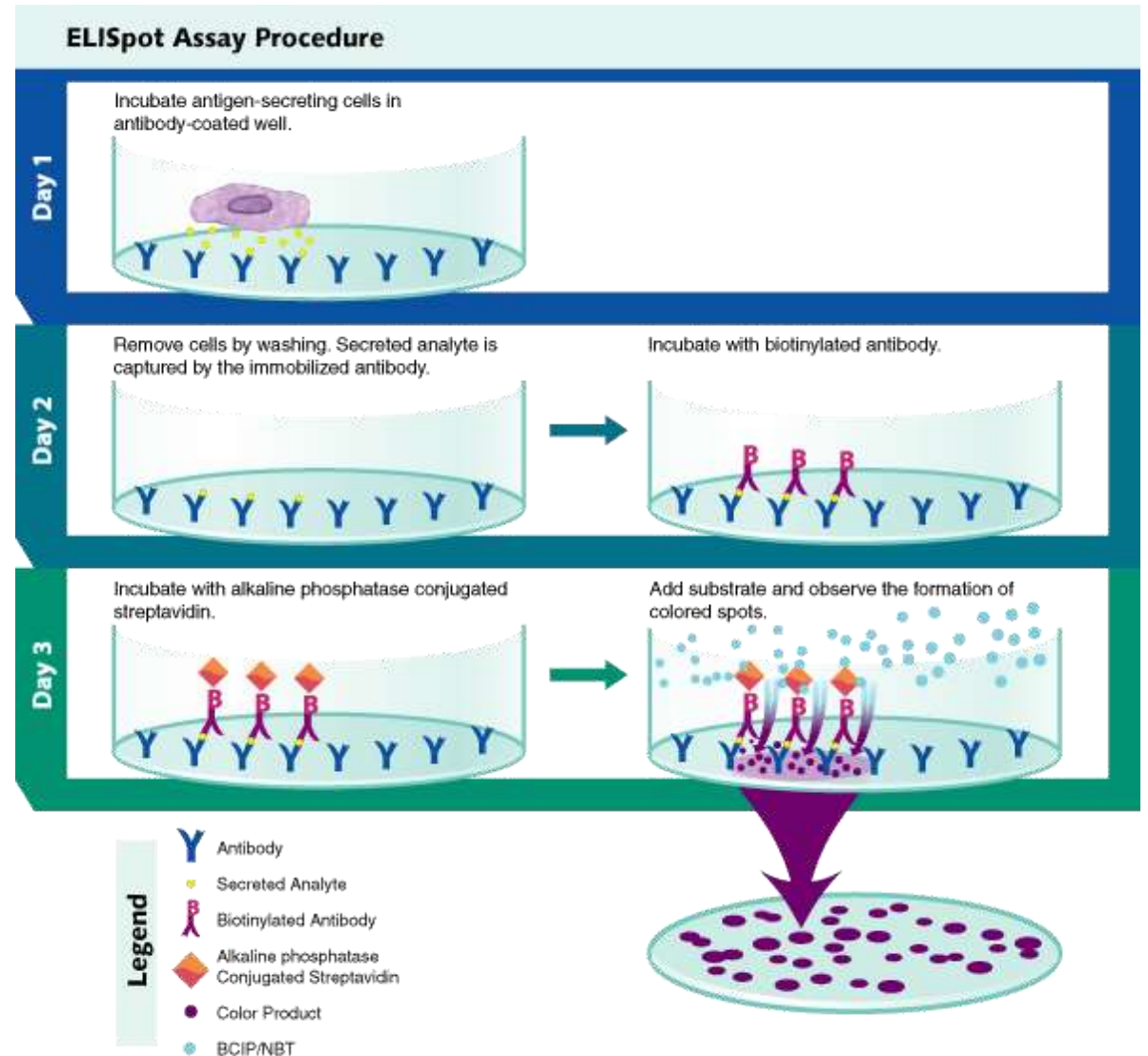
Obr. 6. FHL – imunologická diagnostika.

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

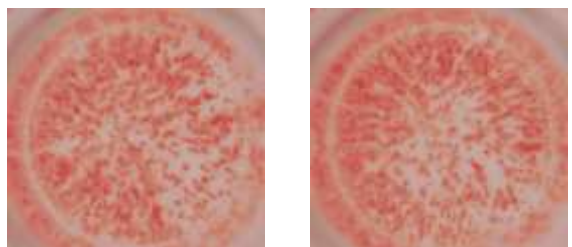
- Sledování produkce cytokinů T-lymfocyty a cytokinů a protilátek B-lymfocyty
- Analýza na úrovni 1 buňky
- Princip:
 - Stimulace izolovaných buněk
 - Nasazení buněk do ELISPOT destičky, její dno je pokryto protilátkou proti hledanému analytu
 - Buňka produkuje cytokin → jeho zachycení protilátkou v 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)



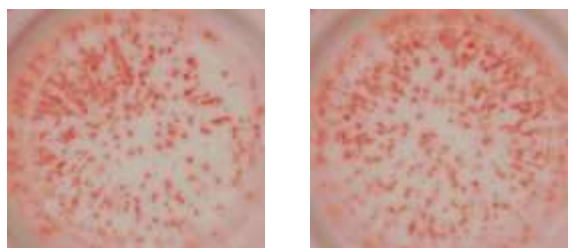
ELISPOT



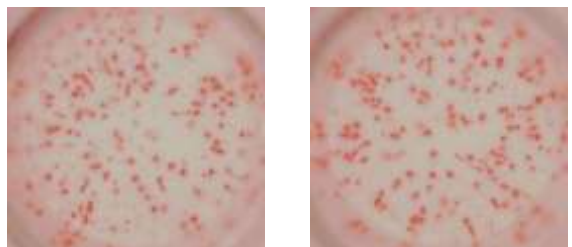
5×10^5 7 dní po očkovaní



$2,5 \times 10^5$



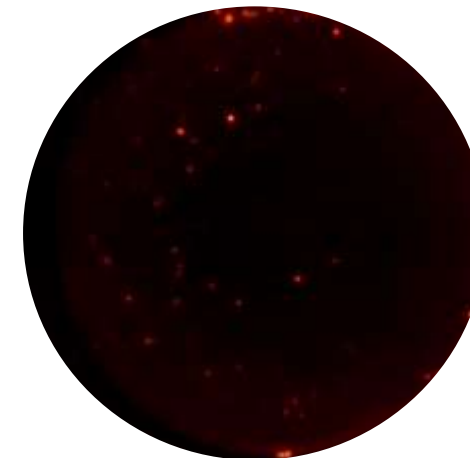
$1,25 \times 10^5$



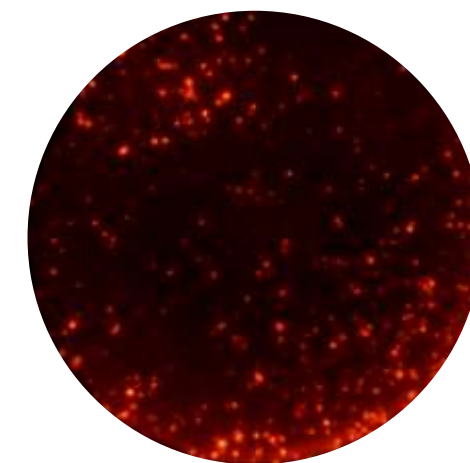
$0,63 \times 10^5$

Produkcia IL-10 B lymfocytmi

TNFR2-
B cells



TNFR2+
B cells

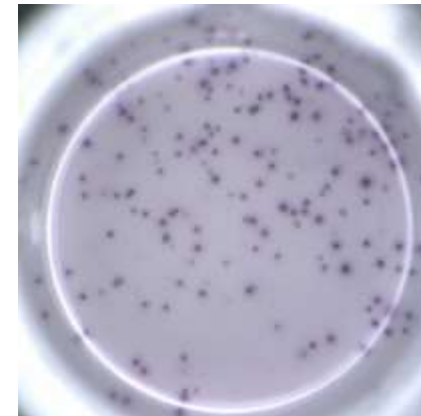


Využití ELISPOTu/FLUOROSPOTu

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

Kontrola



Pacient CVID

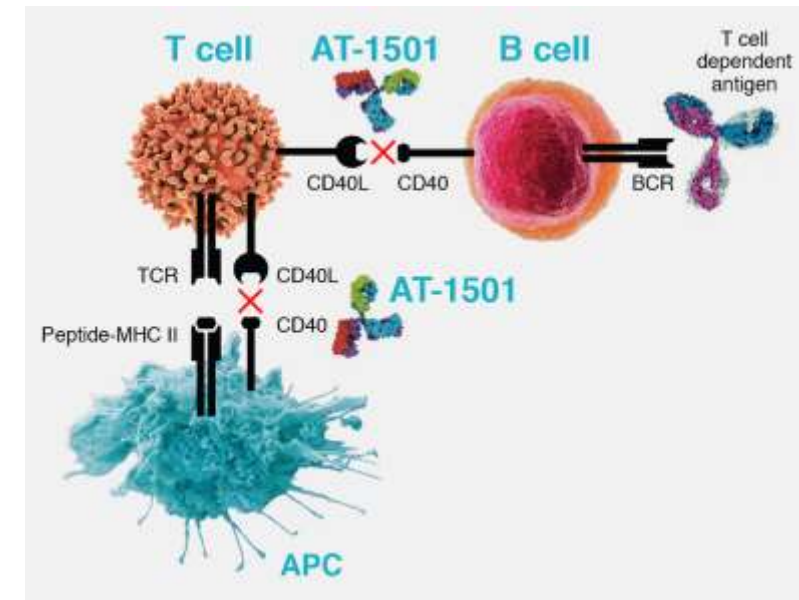


Pacient CVID vakcinován tetanickým toxoidem → sledování produkce specifických protilátek ve třídě IgG po 14 dnech od vakcinace

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

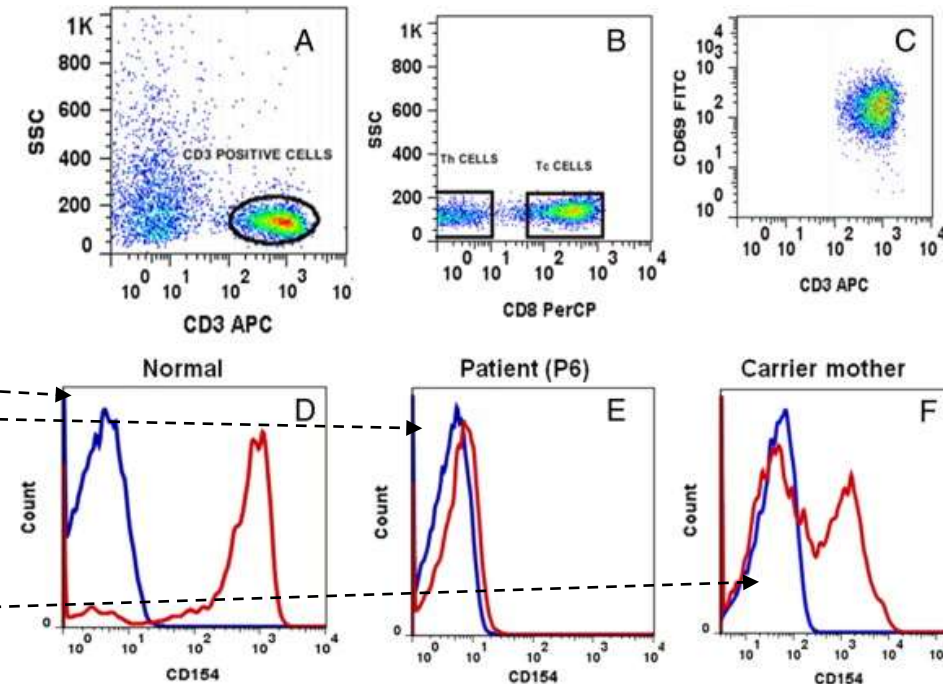
diagnostika X-vázaného hyper-IgM syndromu

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)



Protokol

- Z naměřené koncentrace buněk spočítejte, jak si PBMC naředíte v RPMI médiu tak, aby v 1 jamce mikrotitrační destičky bylo 200.000 buněk v objemu 190ul
- Celkem potřebujeme 5 jamek
- Jak naředíte stimulantia PHA (zásobní roztok 1mg/ml) a ConA (zásobní roztok 1mg/ml) aby v jamce destičky byla koncentrace:
 - PHA: 5ug/ml
 - ConA: 2ug/ml
- V jamce máme již 190ul buněk → počítejte tak, aby konečný objem v jamce i se stimulancii byl 200ul