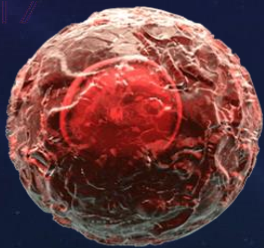


Optimální provedení a nastavení panelu pro detekci Th-17 lymfocytů

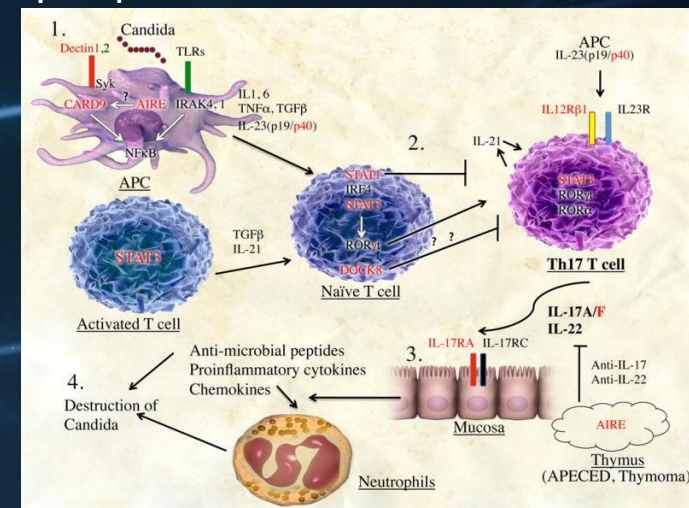
Mgr. Michal Rataj

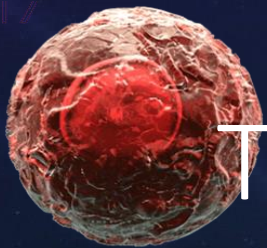
Ústav imunologie 2.LF UK a FN Motol



Th-17 lymfocyty – vývoj a aktivace

- Subpopulace Th-17 je zodpovědný za obrannou reakci proti bakteriálním a fungálním agens
- potencuje systémovou zánětlivou odpověď
- Přeměna naivního Th0 T-lymfocytu je závislá na
 - vrozené imunitě a prezentaci antigenu
 - působení produktů dendritických buněk IL-6, IL-1 β , IL-23
 - přítomnosti transformujícího růstového faktoru β (TGF β)
- Aktivace dále probíhá intracelulárně
 - 1) aktivací transkripčních faktorů STAT3 a ROR γ t a produkcí IL-21
 - 2) stabilizace působením IL-21
 - 3) produkcí cytokinů IL-17, IL-21, IL-22
- Funkce produkovaných cytokinů
 - podpora aktivace neutrofilů
 - podpora zánětu
 - zesílení produkce antimikrobiálních proteinů
 - zvýšení bariérových funkcí střeva, kůže





Th-17 lymfocyty – charakteristika a funkce

Fenotypizace

1) Povrchové markery - CD45+ buňky s jádrem

- CD3+ T-lymfocyty
- CD4+ pomocné T-lymfocyty

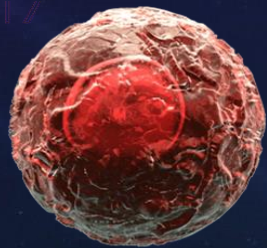
2) Produkované cytokiny - IL-17 (IL-17A - IL-17F) - skupina 6 interleukinů

- potencují migraci neutrofilních granulocytů
- podpora produkce G-CSF, IL-1 β , IL-6
- zesílení produkce antimikrobiálních proteinů (defenzinů)

- IL-22 - působení na kůži a sliznicích GIT – posílení integrity sliznic a epitelů

- IL-21 - stabilizace a podpora prolyferace nových Th-17 lymfocytů
- multipotentní účinek – podpora aktivace a diferenciaci B lymfocytů v germinálních centrech uzlin

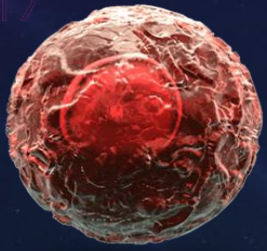
3) Funkční transkripční faktory - **STAT3, STAT1, ROR γ t** – působení IL-6 a signalizace TcR – produkce IL-17, IL-21, IL-22



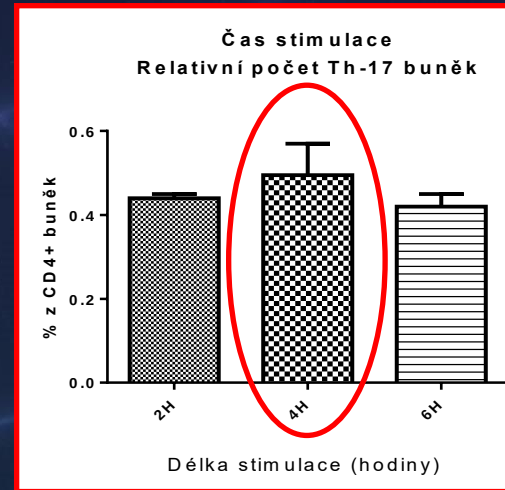
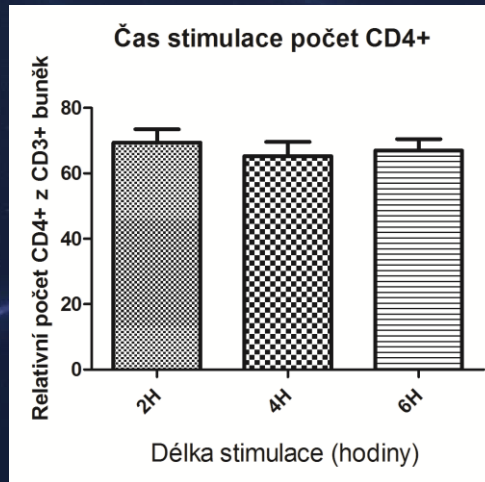
Th-17 lymfocyty – optimalizace a troubleshooting

Optimalizované kroky experimentu

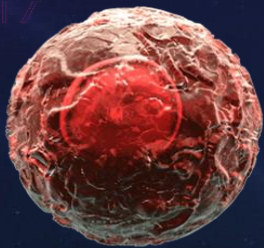
- 1) Čas stimulace po inkubaci s PMA a ionomycinem
- 2) Koncentrace PMA a ionomycinu
- 3) Délka působení brefeldinu A
- 4) Délka inkubace extracelulárního barvení
- 5) Objem protilátek při extracelulárním barvení
- 6) Délka působení fixačního a permeabilizačního činidla Fix/Perm
- 7) Délka inkubace intracelulárního barvení
- 8) Objem protilátky anti-IL-17 při intracelulárním barvení
- 9) Gatovací strategie



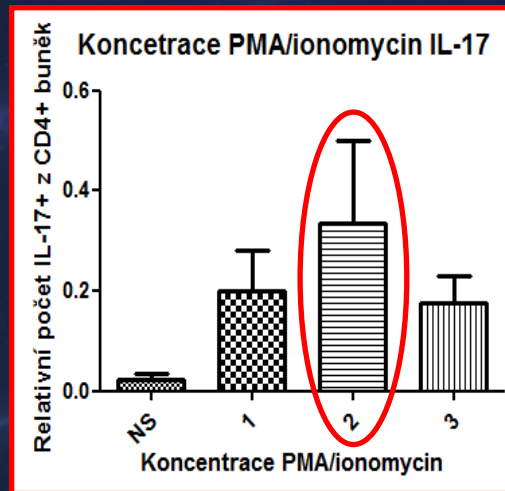
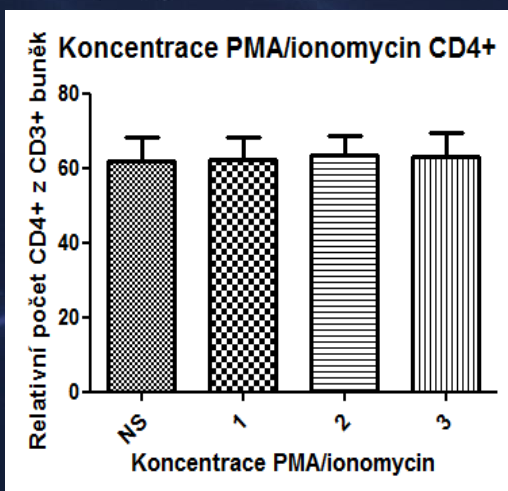
Th-17 lymfocyty – čas stimulace PMA a ionomycinem



- Troubleshooting
- 1) Dodržování časového bodu
 - 2) Kvalita stimulantů PMA a ionomycinu a jejich správné skladování
 - 3) Sterilní prostředí v průběhu stimulace
 - 4) Použití destičky s U dnem

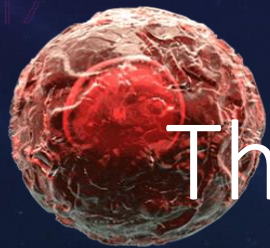


Th-17 lymfocyty – koncentrace PMA a ionomycinu

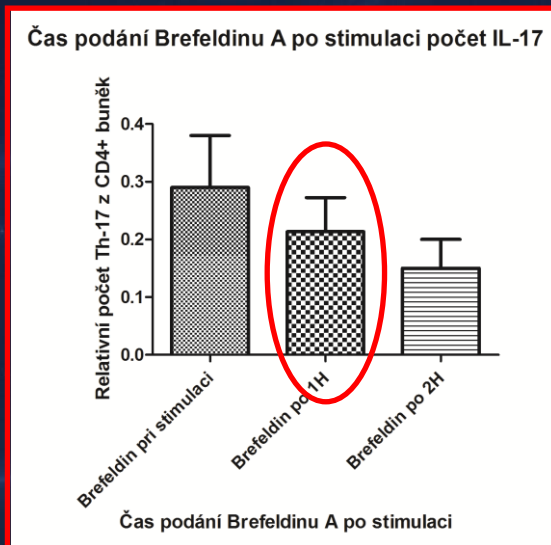
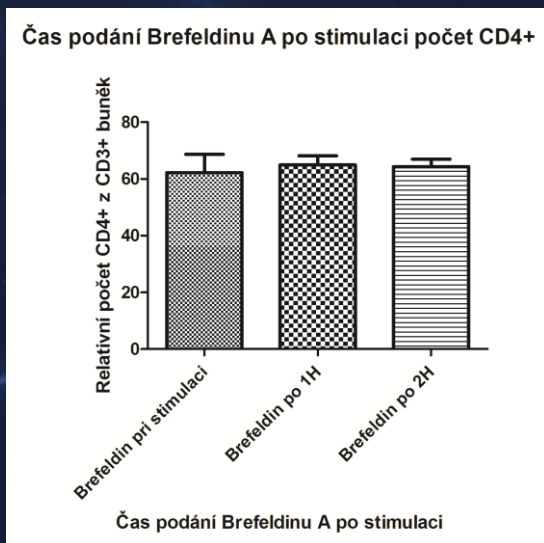


Stimulancia	Koncentrace PMA/ionomycin		
	1	2	3
PMA	200 ng/ml	2 µg/ml	20 µg/ml
Ionomycin	10 µg/ml	100 µg/ml	1 mg/ml

Troubleshooting 1) Koncentrace stimulantů PMA 2 µg/ml; ionomycin 100 µg/ml
2) Správný počet PBMC v daném objemu kompletního media

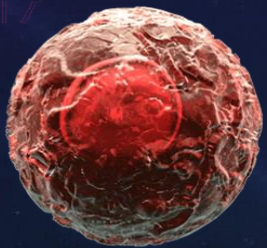


Th-17 lymfocyty - čas působení brefeldinu A

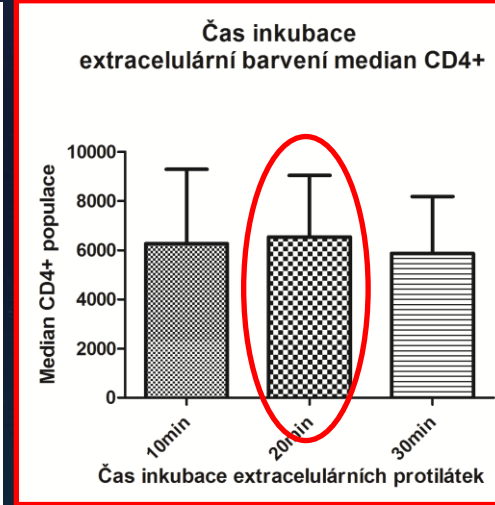
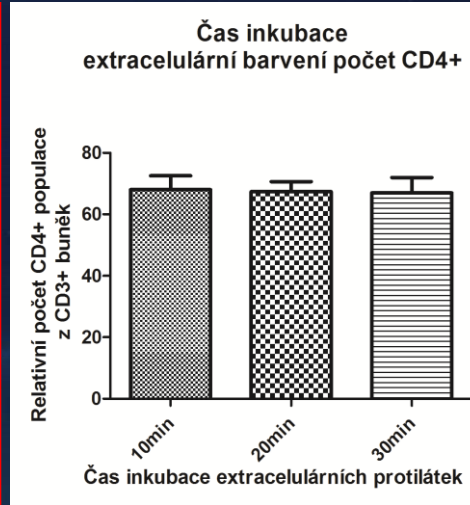
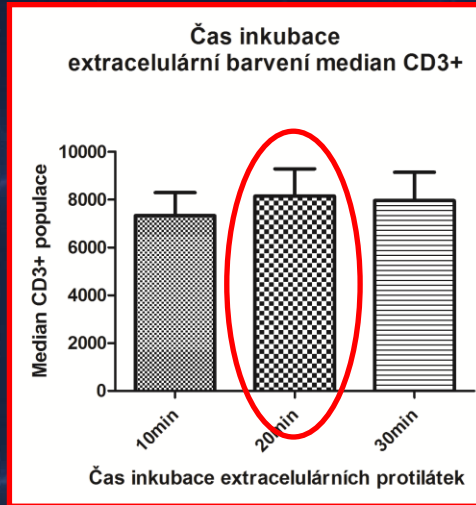
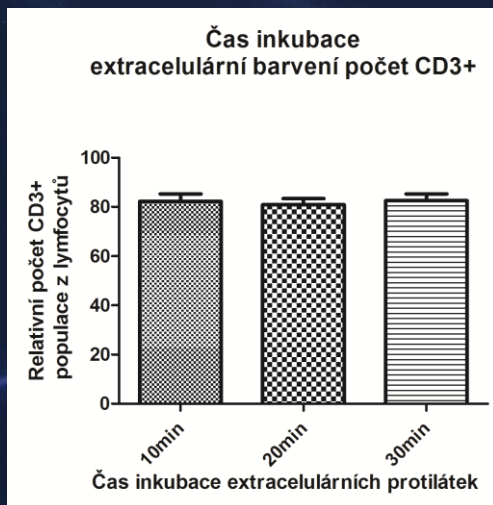


Troubleshooting

- 1) Dodržování časového bodu podání Brefeldinu A
- 2) Skladování Brefeldinu A (problémy se zmražením brefeldinu A v lednici)
- 3) Nízký objem přidávaného Brefeldinu A (nutnost naředit např.: 10x)



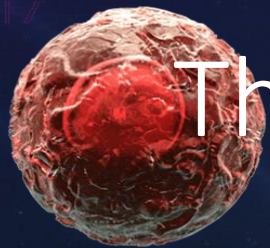
Th-17 lymfocyty – čas extracelulárního barvení



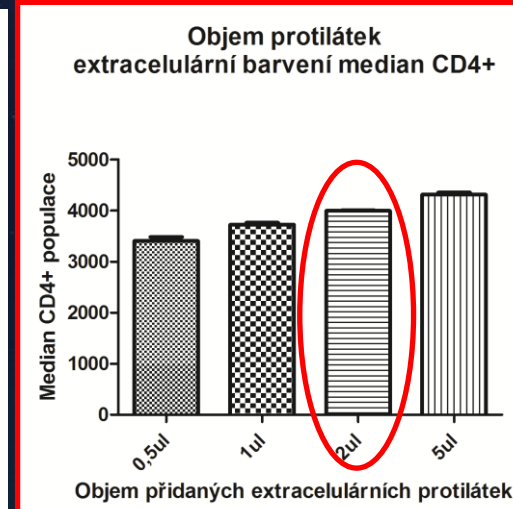
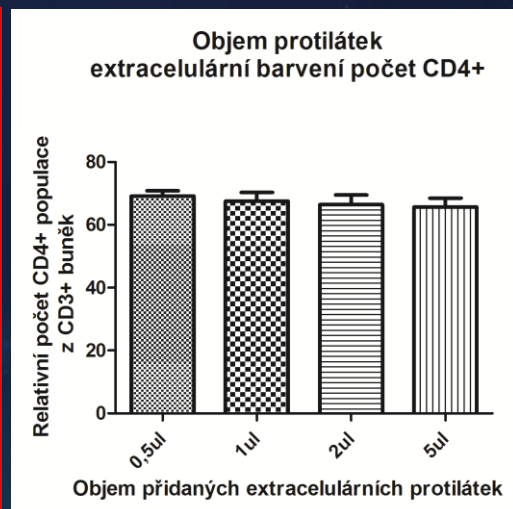
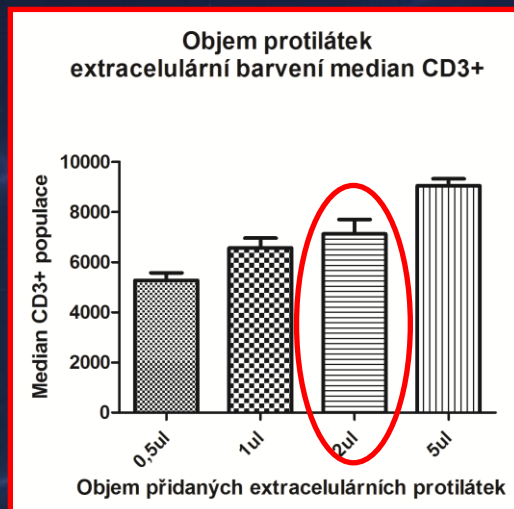
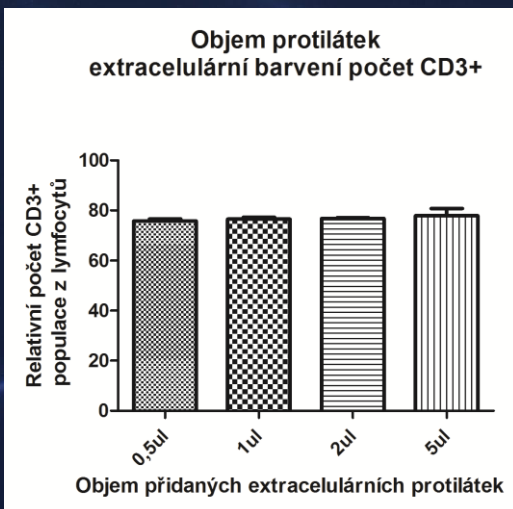
Troubleshooting

- 1) Dodržení času barvení
- 2) Rozpad tandemových flourochromů a ztráta positivity a vznik falešné positivity
- 3) Centrifugace - možné usmrcení buněk vysokými otáčkami



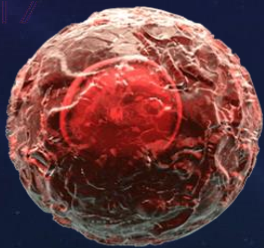


Th-17 lymfocyty – objem Ab's extracelulární barvení

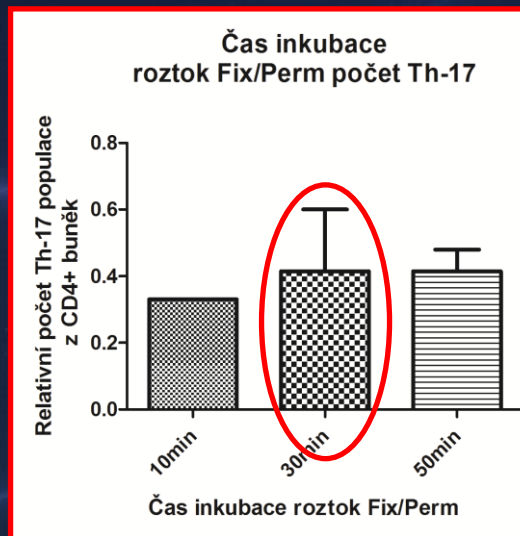
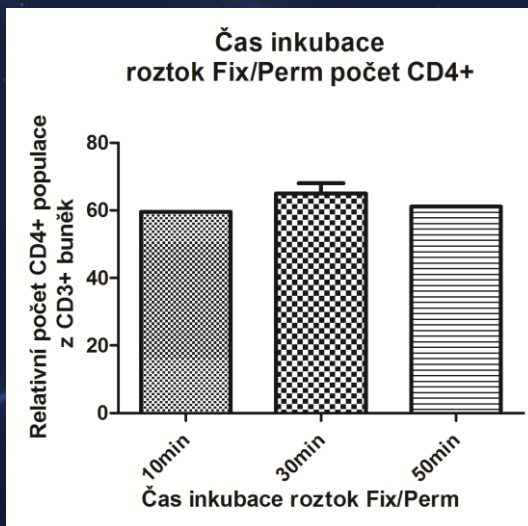


Troubleshooting

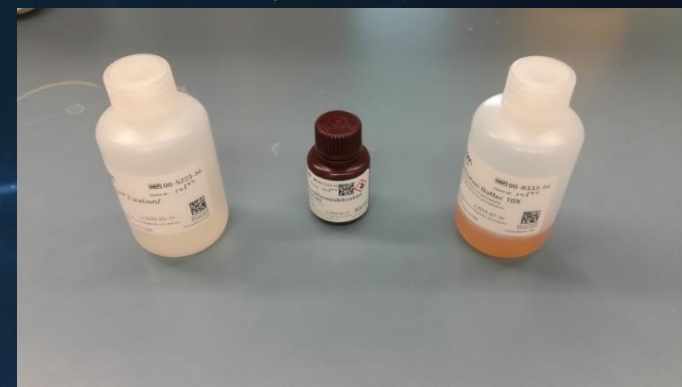
- 1) Objem protilátek přidané pipetou
- 2) Objem zbylého supernatantu u pelety před barvením – naředění protilátky
- 3) Správné odstranění supernatantu bez ztráty pelety



Th-17 lymfocyty – čas působení činidla Fix/Perm

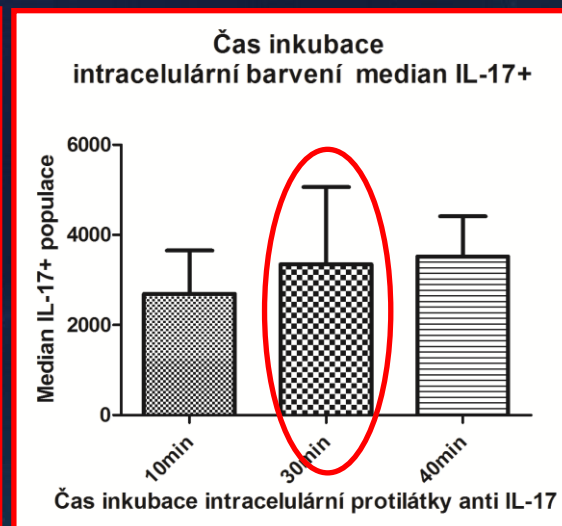
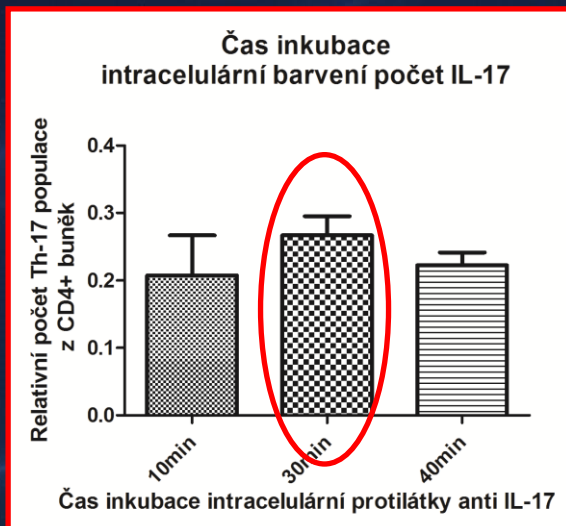
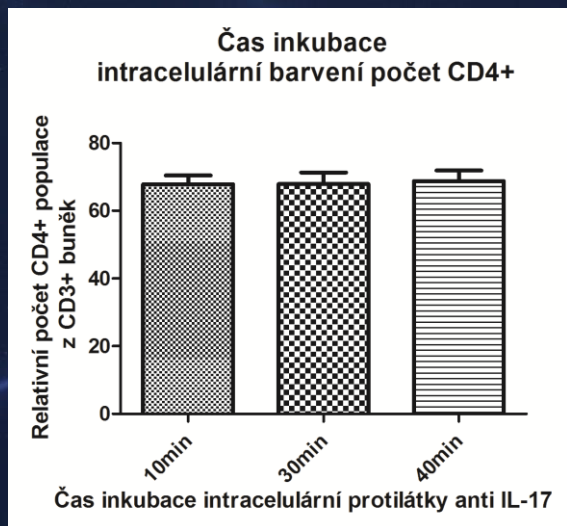


Troubleshooting 1) Dodržení času působení (při delší přítomnosti roztoku potenciální smrt buněk)

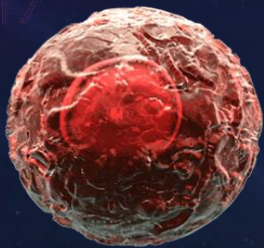




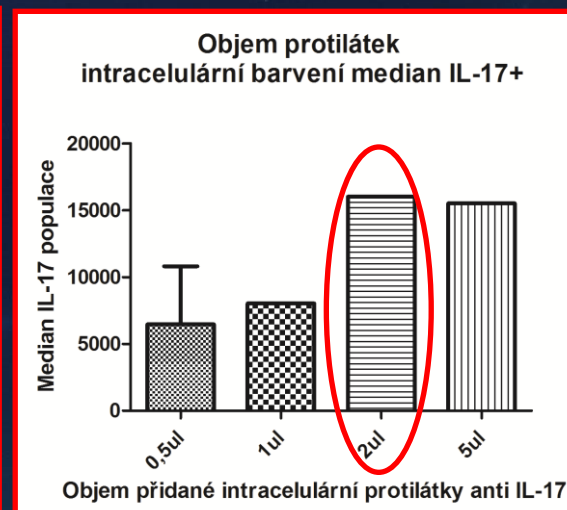
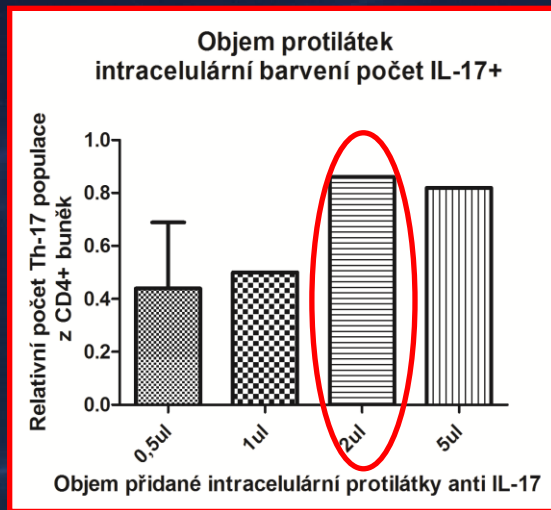
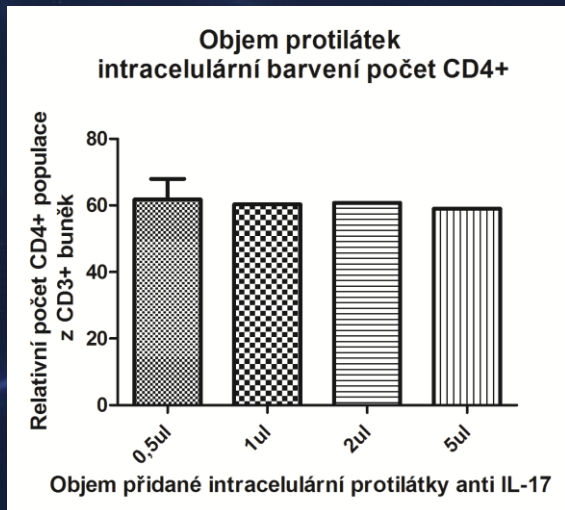
Th-17 lymfocyty – čas intracelulárního barvení



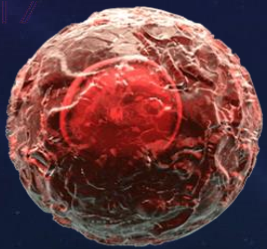
Troubleshooting 1) Komplikace při překročení času stimulace. Posun negativní populace
2) Nízký objem protilátky anti-IFN γ



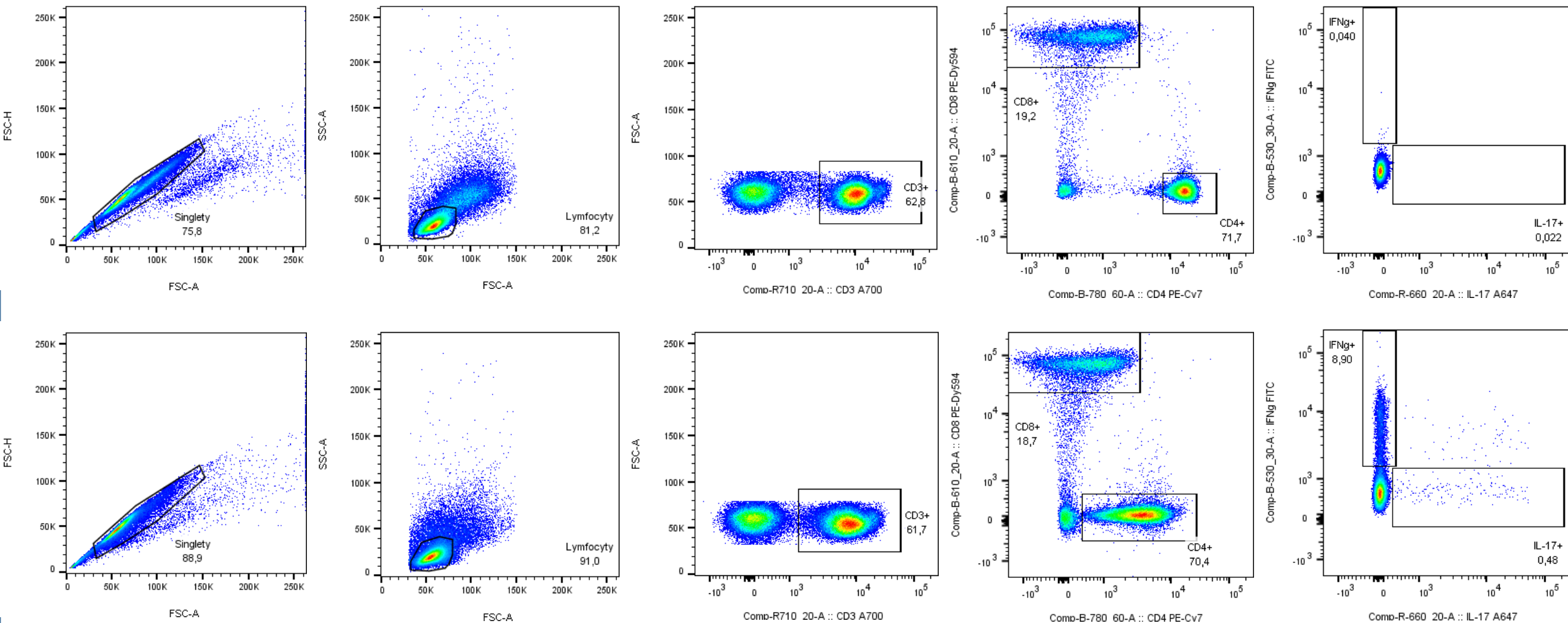
Th-17 lymfocyty – objem anti-IL-17 intracelulární barvení



- Troubleshooting
- 1) Dodržení času barvení
 - 2) Rozpad tandemových flouorchromů a ztráta positivity a vznik falešné positivity
 - 3) Potvrzení správnosti průběhu stimulace



Th-17 lymfocyty – gatovací strategie





Děkuji za pozornost

