

Funkční testy

Principy a pravidla

RNDr. Veronika Kanderová, Ph.D.

Klinika dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol
Childhood Leukaemia Investigation Prague



CLIP - Cytometrie

V Úvalu 84

150 06 Praha 5

tel: (00420) 22443 6487

<http://clip.lf2.cuni.cz/>

Hypotéza a plán

Proč?

Co chci dokázat?

Jaký materiál mám k dispozici?

Jaké buňky použiju?

Jaké funkce budu testovat?

Jak?

Kdy? Jak dlouho?



➤ vědecké myšlení + literární rešerše + požadavky z klinického prostředí

Typy funkčních testů v klinických laboratořích

Imunologie

- Produkce **protilátek** (sérum, tkáňový supernatant)
- Produkce **cytokinů** (sérum, plazma, tkáňový supernatant, intracelulární detekce)
- **Aktivace lymfocytů/monocytů** (aktivační antigeny CD69, CD25, HLA-DR, CD71, aj.)
- **Aktivace bazofilů** (basoflow)
- **Oxidativní vzplanutí** (burst test)
- Testy **fagocytární aktivity** (fagoflow)
- Testy **proliferace**
- Testy **apoptózy**
- Testy **chemotaxe**, aj.

Hemato-onkologie

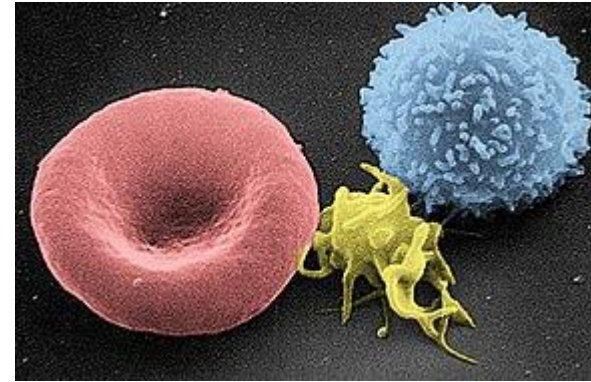
- Aktivace lymfocytů
- Produkce cytokinů
- Testy proliferace
- Testy diferenciac
- Testy apoptózy
- **Detekce Ag - specifických buněk (CMV a jiné viry)**
- **Degranulace NK buněk**
- Testy cytotoxicity
- Testy intracelulární buněčné signalizace (fosfo-flow)

Validace - principy a pravidla

Jak vytvořit, optimalizovat a validovat funkční test

Jaký mám materiál a kolik ho mám?

Periferní krev
Kostní dřeň
Výpotek
Buffy coat
Transformovanou buněčnou linii, ...



Wikipedia

Jaké buňky potřebuji testovat?

Jak je budu izolovat? – metody izolace v následující přednášce

Budu je vůbec izolovat? Nepotřebují k dané funkci kontakt ostatních buněk?

Testy v plné krvi
Testy na izolovaných PBMC
Testy na izolovaných lymfocytech, monocytech aj.

Jaké podmínky *ex-vivo* nebo *in-vitro* tyto buňky potřebují?

Kultivační médium a supplements:

RPMI 1640 + FBS + Antibiotika/Antimykotika (linie, PBMC, T-lymfocyty, ...)

DMEM + FBS + Antibiotika/Antimykotika (linie)

IMDM + FBS, esenciální aminokyseliny, transferin, insulin, glutathion, L-glutamin, beta-merkaptoethanol (B-lymfocyty)

Ex-vivo 15 + human serum + antibiotika/antimykotika pro subtypy T-lymfocytů (Treg)

Příklad : izolovat nebo neizolovat?

Aktivace buněk specifickými antigeny pro detekci **Ag-specifických T-lymfocytů**:

Candida albicans antigen

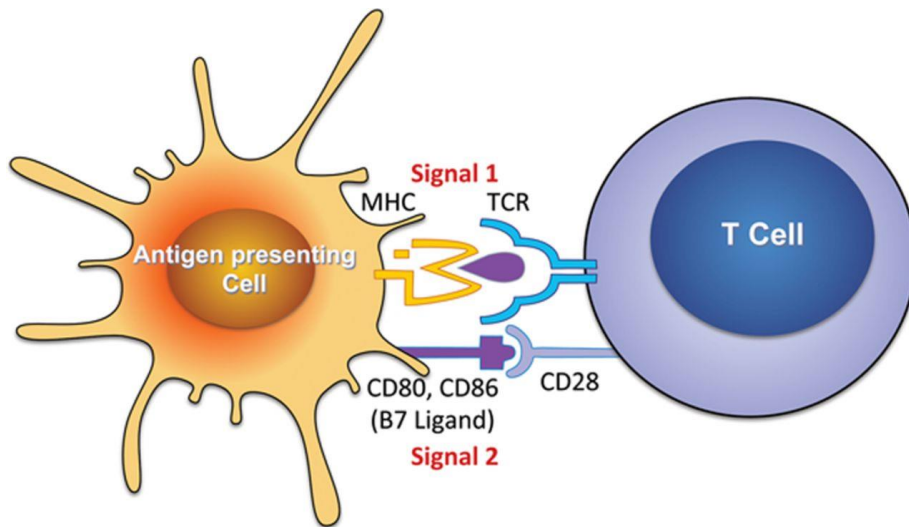
PPD (tuberculin, Mycobacterium tuberculosis)

Streptokinase-streptodornase (Streptococcus)

CMV peptidy, EBV peptidy, BKV, Adenoviry, ...

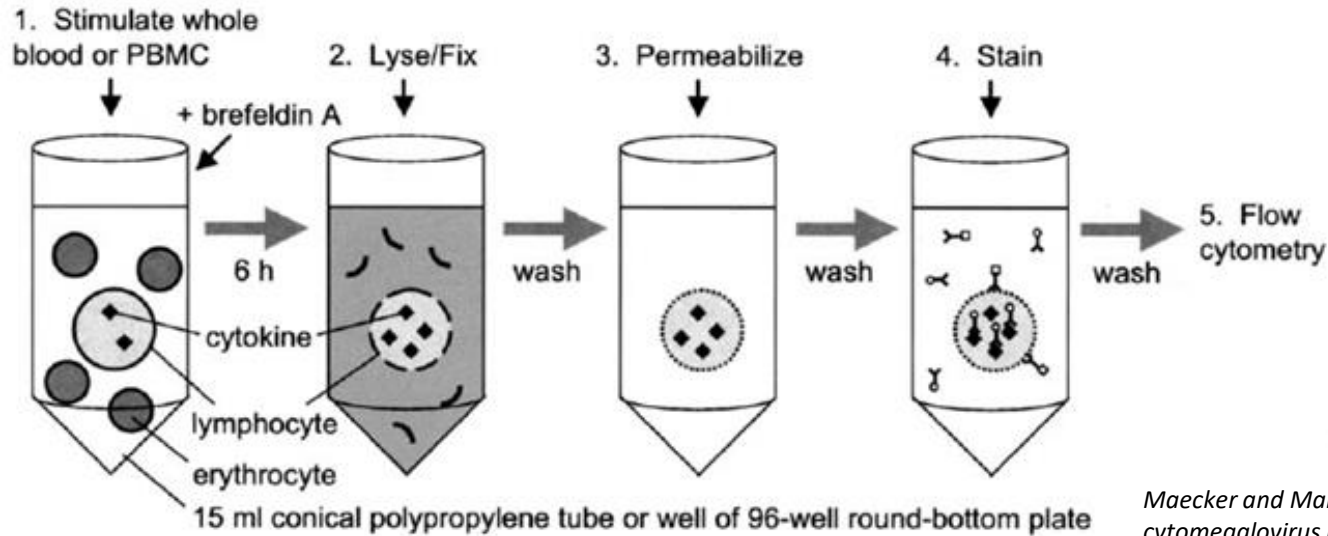
- nebudu izolovat pouze T-lymfocyty
- nutno mít v kultuře živé monocyty a DCs
- test provádím na izolovaných PBMC

SPECIFICKÉ ANTIGENY = vazba na HLA antigeny APC

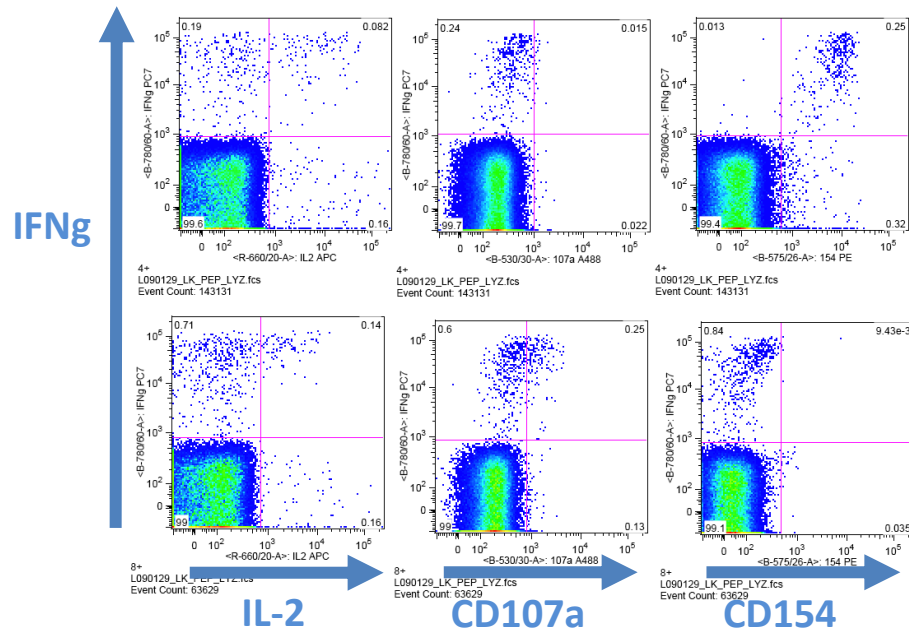


→ aktivace (CD40L), proliferace,
produkce cytokinů (IFN γ , IL-2, ...)

Příklad : izolovat nebo neizolovat?



Maecker and Maino, Analyzing T-cell responses to cytomegalovirus by cytokine flow cytometry, *Hum Immunol.* 2004

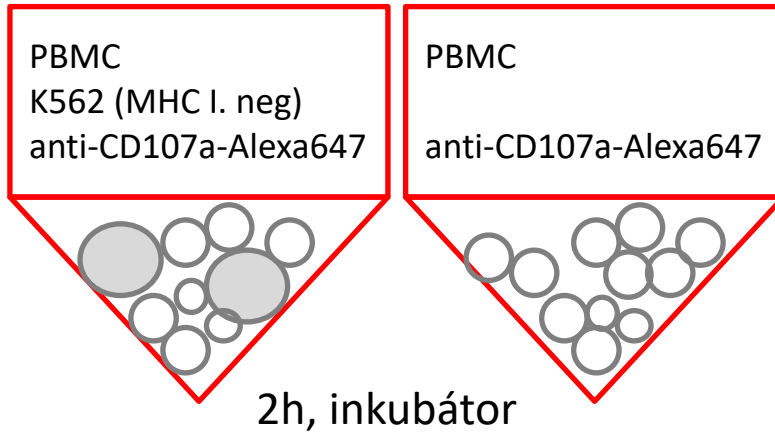


Performed by Ondřej Pelák, Tomáš Kalina

Základní podmínka funkčních testů = VIABILITA

Izolace buněk z čerstvého náběru periferní krve

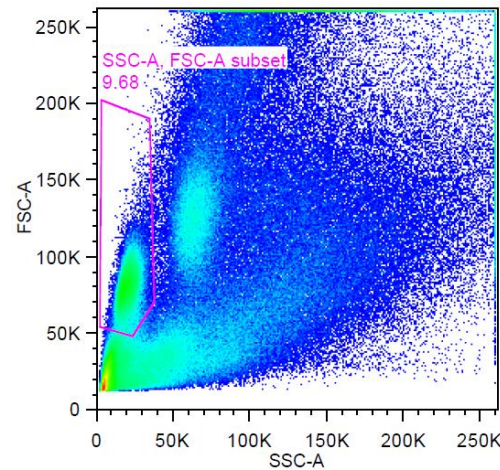
Degranulační test



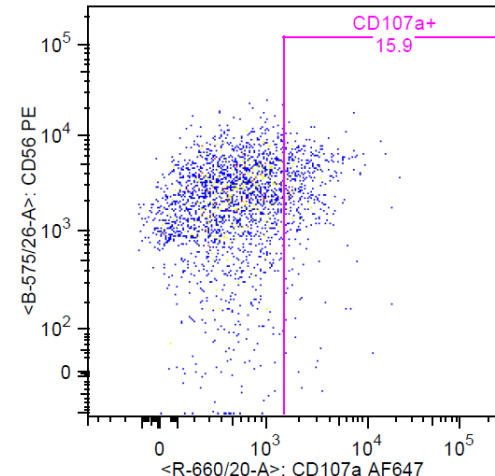
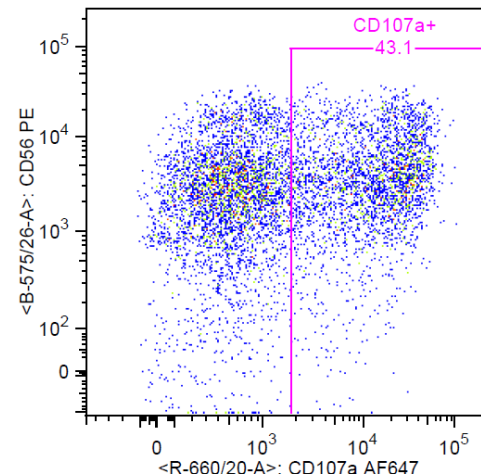
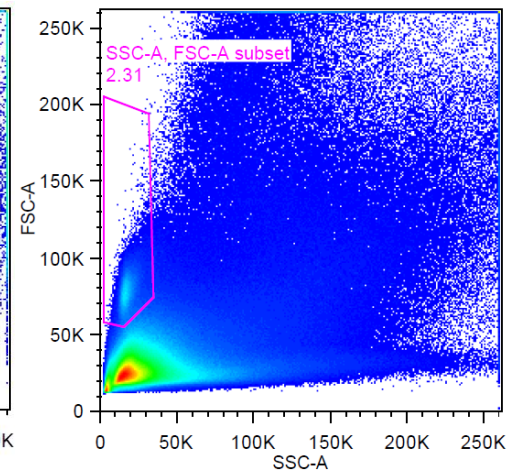
FITC	PE	PC7	Alexa 647
CD16	CD56	CD3	CD107a

Overnight rest

Optimální viabilita vzorku

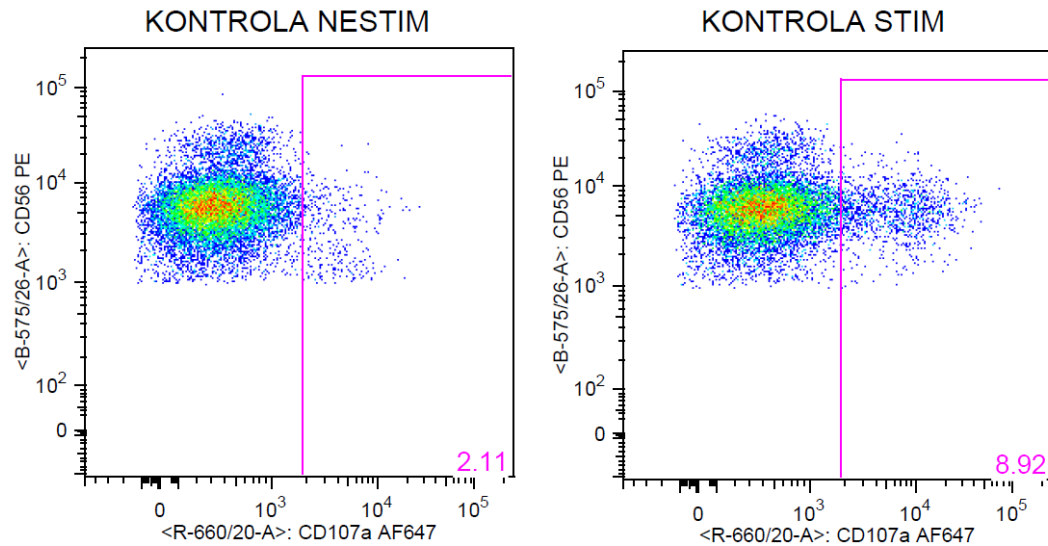


Horší viabilita vzorku

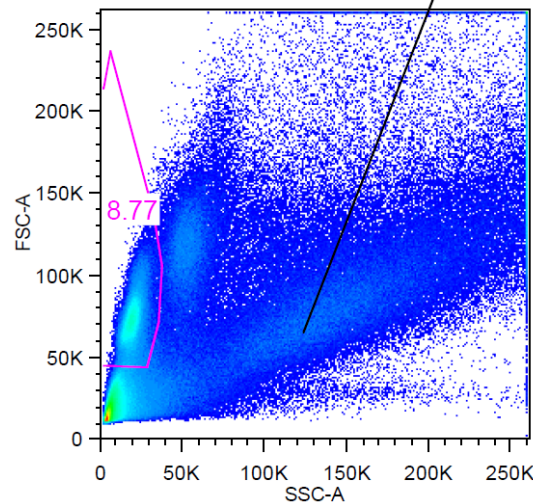


Základní podmínka funkčních testů = VIABILITA

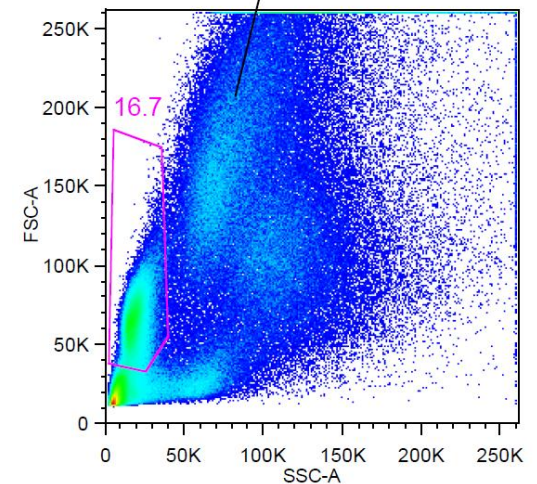
Správně kultivované buňky



duvod slabe stimulace: mrtve K562



zive K562 pro srovnani



Základní podmínka funkčních testů = VIABILITA

Detekce viability pomocí fluorescenčních prób

Před nasazením buněk do funkčního testu

V průběhu nebo po skončení funkčního testu

Viability dyes : Nefixovatelné a Fixovatelné

Selection guides for nonfixable viability dyes for flow cytometry

SYTOX DNA binding dyes Classic DNA binding dyes Esterase substrates Viability/vitality kit

SYTOX

SYTOX Blue SYTOX SYTOX Orange SYTOX AADvanced SYTOX Red SYTOX Dead Cell Stain

<https://www.biolegend.com/en-us/spectra-analyzer>

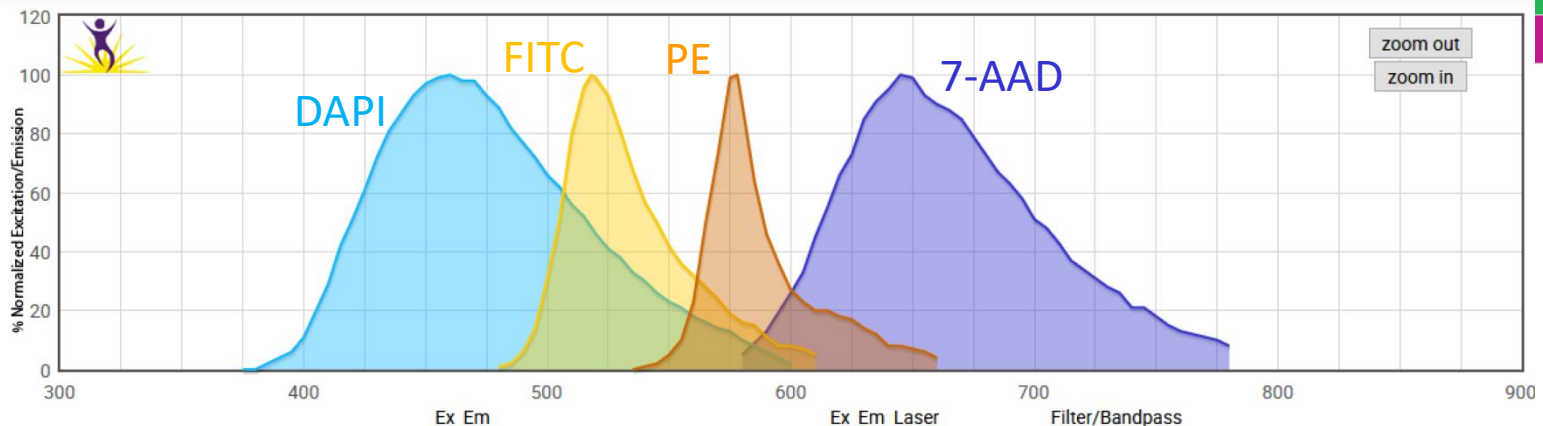
Basis of assay

Fluorescence Spectra Analyzer

Readout

Laser (nm)

Ex/Em (nm)



7-AAD ☐ ☒
DAPI ☐ ☒
FITC ☐ ☒
PE ☐ ☒

Select Fluorophore ☐ ☐
Select Fluorophore ☐ ☐
Select Fluorophore ☐ ☐
Select Fluorophore ☐ ☐

Line(nm)

325 ☐

355 ☐

405 ☐

488 ☐

0 / 0

0 / 0

0 / 0

0 / 0

Position: 378(nm), -8%

☒ Enable tooltip

Show Legend

Clear All

<https://www.thermofisher.com/>

Selection guides for nonfixable viability dyes for flow cytometry

SYTOX DNA binding dyes Classic DNA binding dyes Esterase substrates Viability/vitality kit

PI, 7-AAD, DAPI

Propidium iodide

7-AAD (7-aminoactinomycin D)

Basis of assay

Classic DNA binding dead cell dyes enter cells with compromised cell membranes and bind

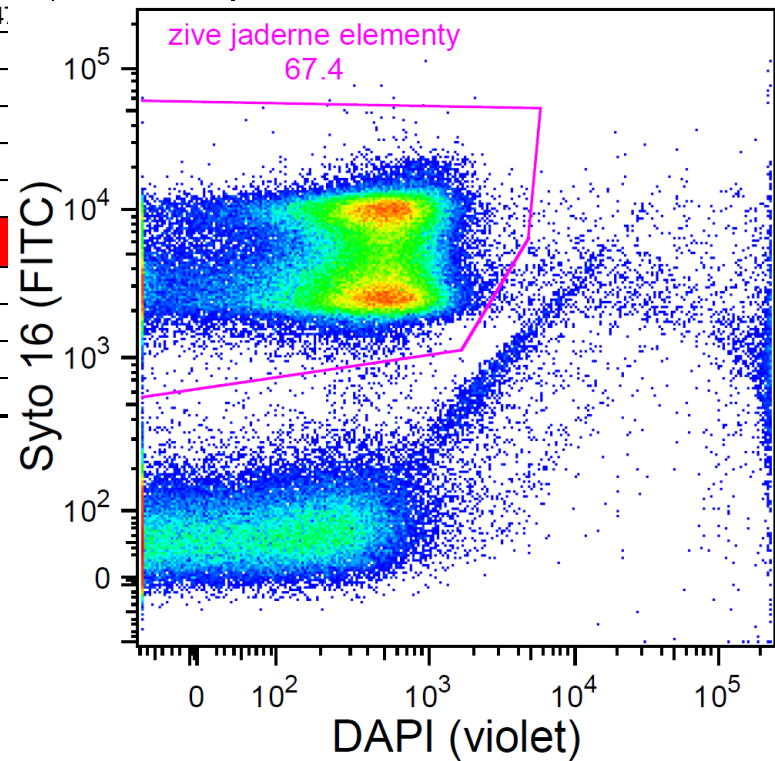
... ☐ ☒

le. May also
addition of

532

Základní podmínka funkčních testů = VIABILITA

LASER:	Detektory:				
VIOLET 405nm	450/40	525/50	610/20	670/30	780/60
(50mW)	Brilliant Violet 421	BV 510	BV605	BV711	BV785
	Pacific Blue	Pacific Orange	Qdot 605		
	Syto 41	Horizon V500	eFluor 605		
	DAPI	(DAPI)			
	ViViD				
	Dye Cycle Violet				
	Horizon V450				
	VioBlue				
BLUE 488nm	530/30	575/25	695/40	780/60	
(20mW)	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	
	Alexa 488	Propidium iodide	PE-Dy647	PC7	
	Syto16		PE-Alexa680	PE-Alexa747	
			PerCP	PE-Dy747	
			PE-Cy5		
			PC5		
			7-AAD		
RED 640nm	670/30	730/45	780/60		
(40mW)	APC	Alexa700	APC H7		
	Dy647	(Alexa680)	APC-Cy7		
	Alexa647	(Dy682)	APC-Alexa750		
			APC-Dy747		



Základní podmínka funkčních testů = VIABILITA

Viability dyes : Nefixovatelné a Fixovatelné

Selection guide for fixable viability dyes

UV & 405 nm lasers

488 & 561 nm lasers

633/635 nm laser

LIVE/DEAD
Fixable Blue
stain

LIVE/DEAD Fixable
Violet stain

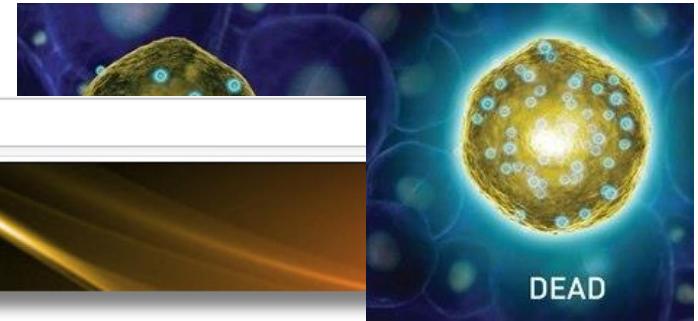
LIVE/DEAD
Fixable Aqua
stain

LIVE/DEAD Fixable
Yellow stain

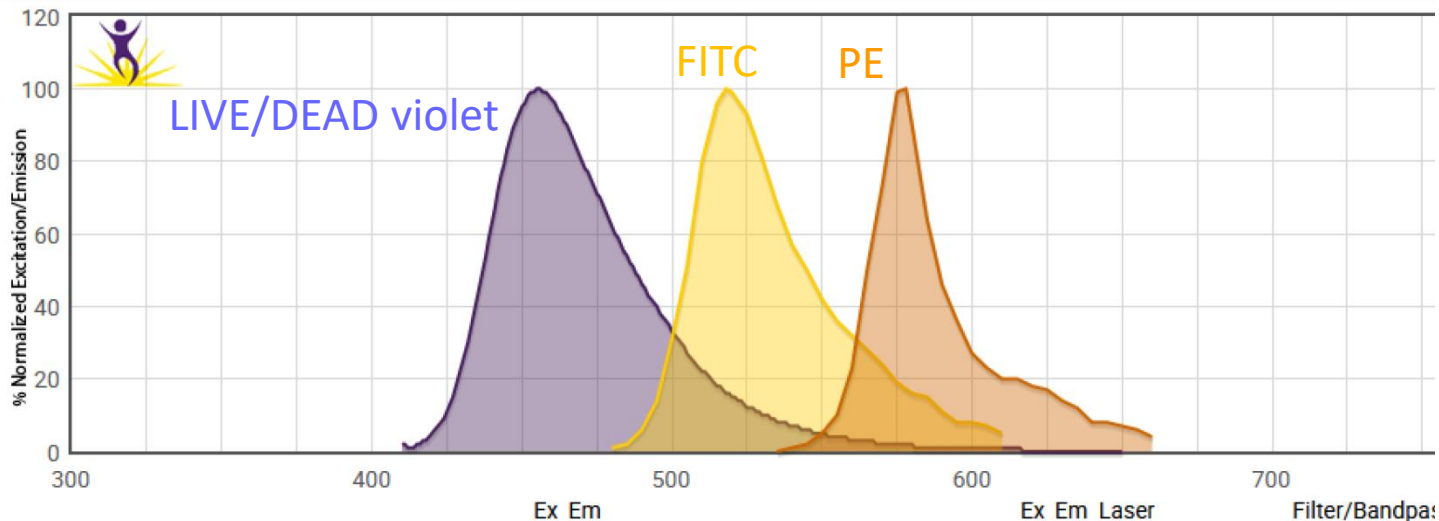
Basis of assay

LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain kits are fixable viability dyes that distinguish live cells

<https://www.biolegend.com/en-us/spectra-analyzer>



Fluorescence Spectra Analyzer



LIVE/DEAD® Fixable Violet	☐	☒	Select Fluorophore	☐	☐	325	☐	0 / 0
FITC	☐	☒	Select Fluorophore	☐	☐	355	☐	0 / 0
PE	☐	☒	Select Fluorophore	☐	☐	405	☐	0 / 0

Optimalizační kroky

Stimulace

výběr správného stimulans

typ

CYTOKINY (TNFa, IFNg, IL-2, ...) – pozor na degradaci
správné skladování
neopakovat freeze-thaw cykly

PROTILÁTKY

B-lymfo : anti-IgM/A/G (Jackson ImmunoResearch), CD40L

T-lymfo : anti-CD3/28/49d (BD, Exbio)

Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Thermo)

Apo : anti-Fas (FasL)

LEKTINY : vazba na glykoproteiny/glykolipidy

phytohemagglutinin (PHA) (*Fazole zahradní*)

concanavalin A (ConA) (*Jack Bean*)

pokeweed mitogen

BAKTERIÁLNÍ TOXINY (staphylococcal)

staphylococcal enterotoxin A (SEA)

CHEMICKÉ KOMPONENTY

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

Ionomycin

Signalizace : minuty

Aktivační molekuly : hodiny

Cytokiny : 1-3 dny

Proliferace : 6-7 dní

Diferenciace : 5-8 dní

Produkce Ig : 9-12 dní

koncentrace, teplota, čas

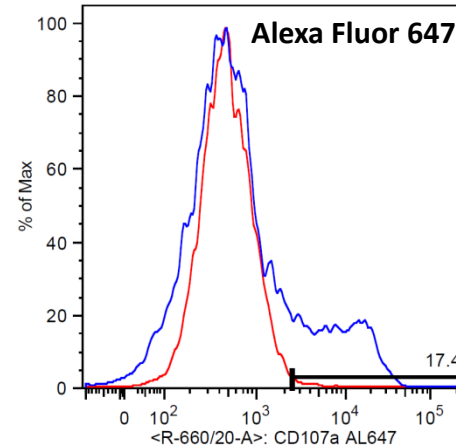
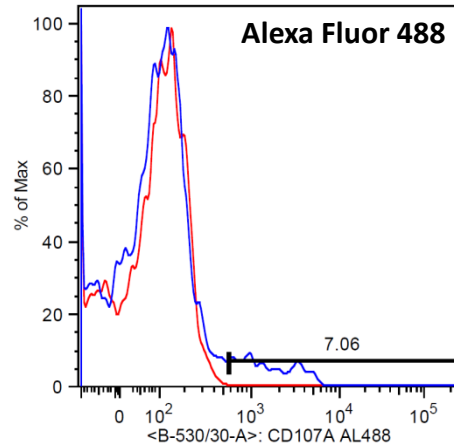
Záleží na buněčném typu a typu stimulace !

Optimalizační kroky

Detekce

výběr správných prób a protilátek (specifita, zařazení do panelu - kompenzace)

výběr fluorochromu



výběr fixativa a permeabilizační činidla

Komerční kity

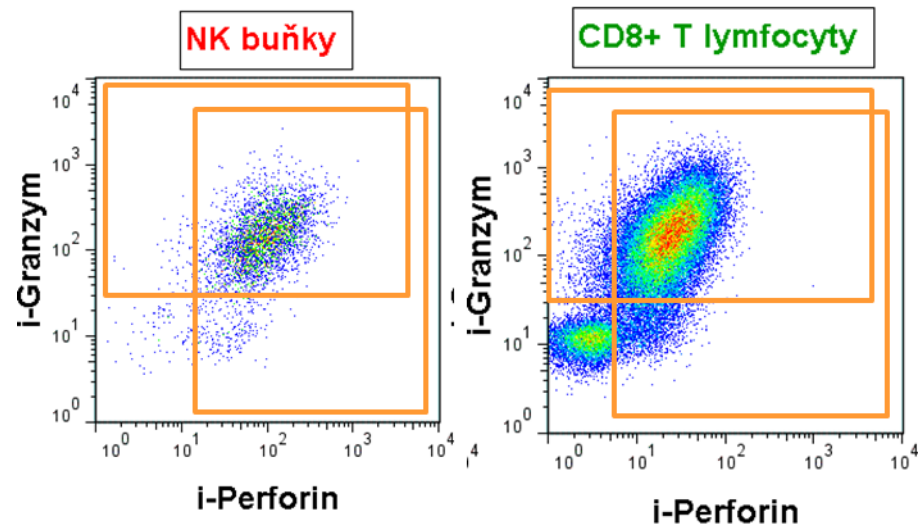


FIX&PERM® Cell Fixation and Permeabilization Kit (CE)



Catalogue number: GAS-002

Product Type	Buffers and Reagents
Units	8 x 5ml
Application	Flow Cytometry



Optimalizační kroky

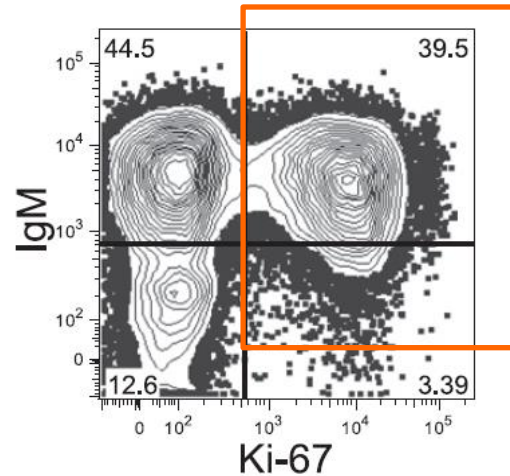
Detekce

výběr fixativa a permeabilizační činidla

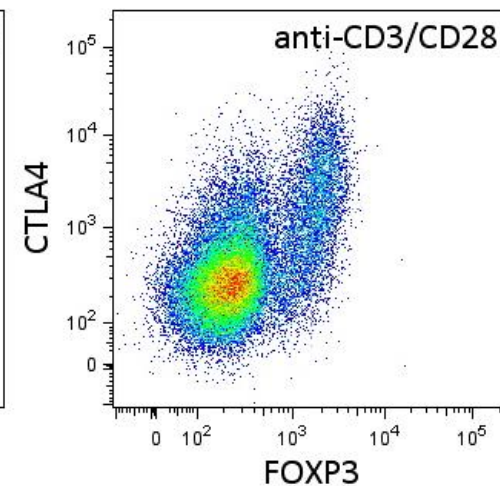
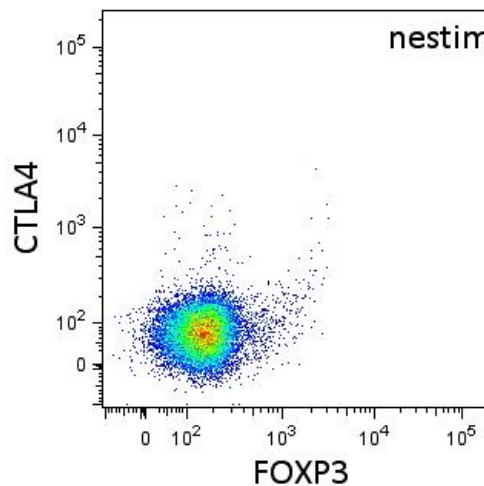
Komerční kity



BD FACS Lyse + Perm II



FOXP3 Fix/Perm Buffer Set



Optimalizační kroky

Detekce

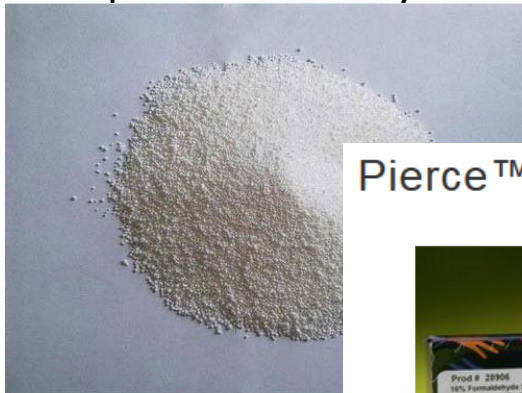
výběr fixativa a permeabilizační činidla

1,6 - 4% formaldehyd (10 min, RT) --- ředíme v PBS

0,1% Triton X-100 (15 min, 37°C - vodní lázeň) --- ředíme v PBS

ledový 80% methanol --- ředíme v dest.H₂O

paraformaldehyd



rozpustit v PBS, 70°C

Pierce™ 16% Formaldehyde (w/v), Methanol-free



Catalog number: 28906

Thermo Scientific™ Related applications: [Protein Labeling & Crosslinking](#)

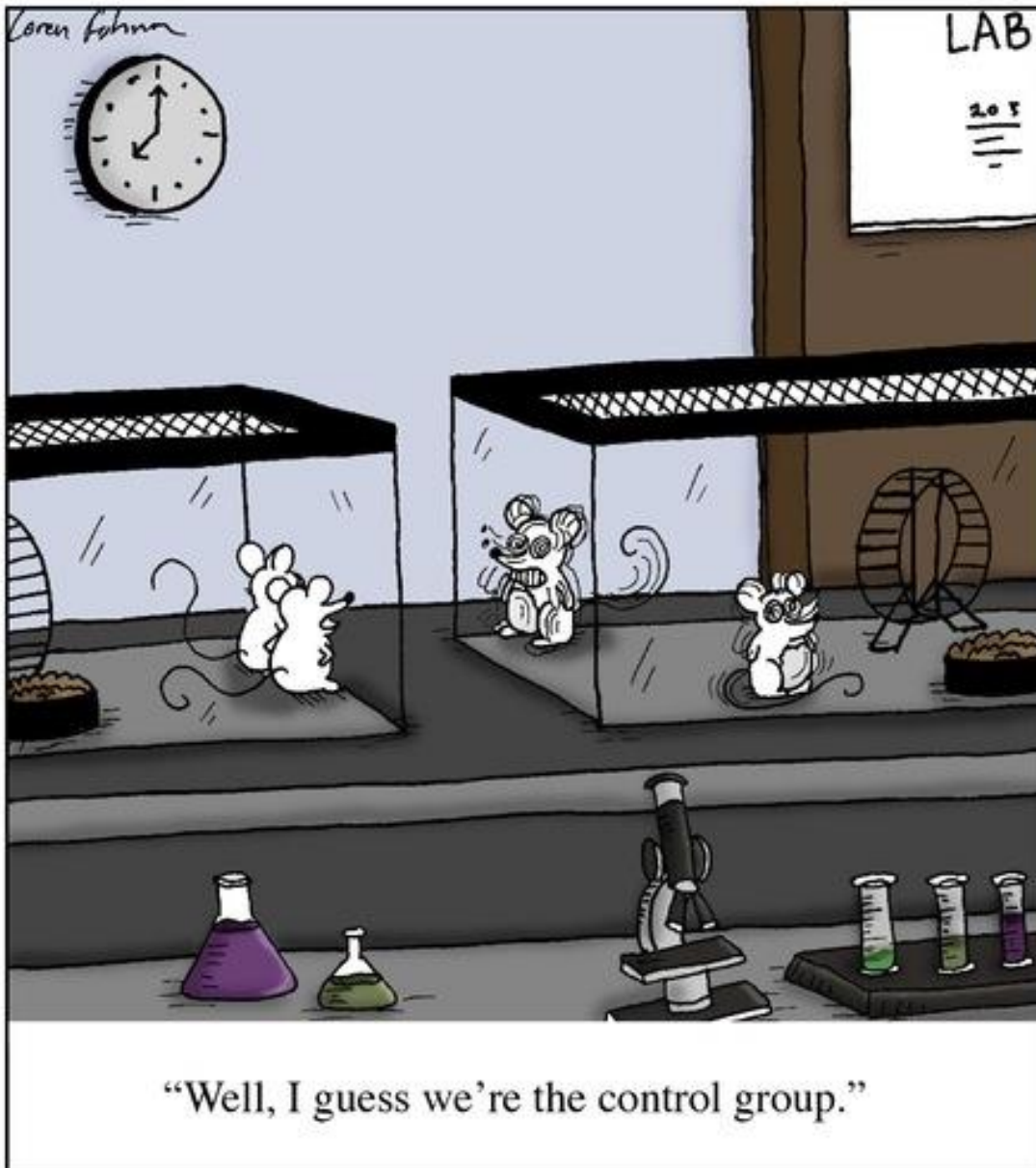
Contact us for support				
	Catalog number	Unit size	Price (CZK)	Qty
☆	28906	10 x 1 mL	1.134,00	
☆	28908	10 x 10 mL	1.640,00	

Fixace modifikuje detekované epitopy - vazba protilátky může být ovlivněna

Antibodies to Human Cell-Surface Markers Tested for BD Phosflow Protocols

<https://www.biolegend.com/en-us/fixation>

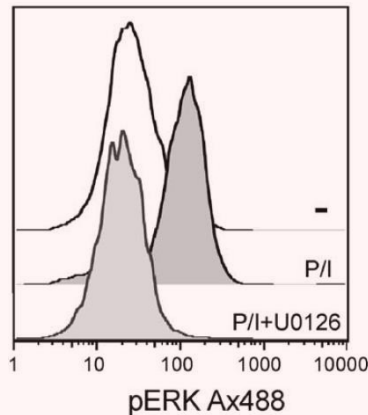
Správné kontroly



- Pacientský vzorek
x kontrolní vzorek
- Stimulovaný
x nestimulovaný
- Pozitivní kontrola
- Negativní kontrola
- Kontroly značení =
FMO, izotypové
kontroly

Správné kontroly

- Pacientský vzorek x kontrolní vzorek
 - Stimulovaný x nestimulovaný
 - Pozitivní kontrola
 - Negativní kontrola
- Podobný věk x rodinný příslušník
 - Nabrané současně
 - Cestují spolu (čas, teplota)



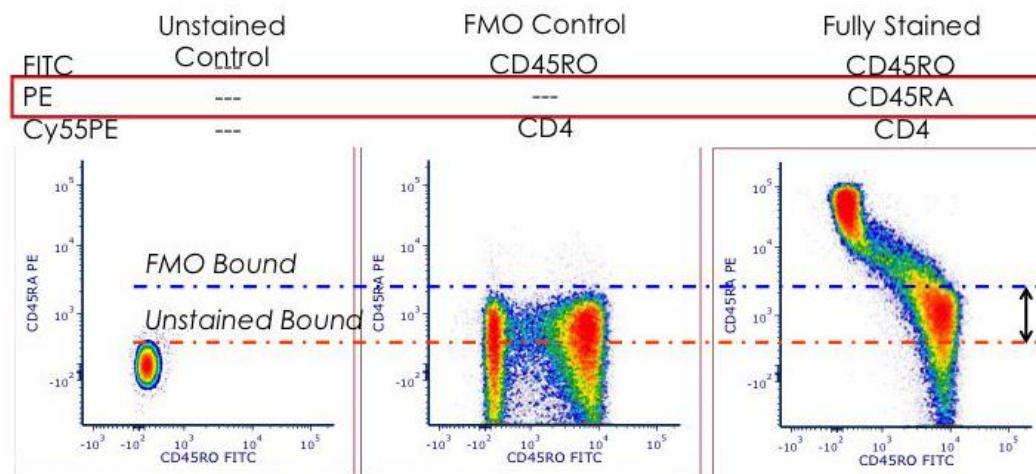
Kontroly, zda test funguje:

pozitivní kontrola = nespecifická stimulace
(PMA + ionomycin, vanadát sodný nebo H_2O_2 , anti-CD3, ...)

negativní kontrola = specifický inhibitor, overnight
rest v bezsérovém médiu, ...

Kontroly značení

FMO = fluorescence minus one



EXCYTE
EXPERT CYTOMETRY

- nastavit FMO na nestimulovaném i stimulovaném vzorku

Izotypová kontrola

- zejména pro intracelulární značení

Stejný izotyp (např. IgG2a)
Stejný zdroj (např. mouse)
Stejný fluorochrom
Stejný výrobce
Stejná koncentrace

- blokace v 0,5% BSA s non-immune imunoglobuliny (10 min, RT, wash)

Take - home message

Průtoková cytometrie má nezastupitelnou úlohu ve funkčním testování buněk (nejen) imunitního systému

- současnou detekcí povrchových a intracelulárních molekul můžeme sledovat funkční odpověď (exprese cytokinů, aktivačních znaků, fosforylace kináz, proliferace, apoptóza, ...) na úrovni jednotlivých buněk a v různých (i velmi malých) buněčných subpopulacích heterogenního vzorku

Funkční testy (a nejen ty) musí být velmi dobře kontrolované na všech stupních, od **pre-analytické fáze** (tj. podmínky transportu vzorku do laboratoře = čas od odběru, teplota, VIABILITA)

přes **analytickou fázi** (tj. optimalizovaný postup, denní kontrola nastavení průtokových cytometrů, ZAŘAZENÍ VHODNÝCH KONTROL, VIABILITA)

až **post-analytickou fázi** (tj. kompenzace, správná gejtovací strategie, správná interpretace)

obzvláště v případech, kdy mají vaše výsledky pomocnou či rozhodovací úlohu v léčebných strategiích