

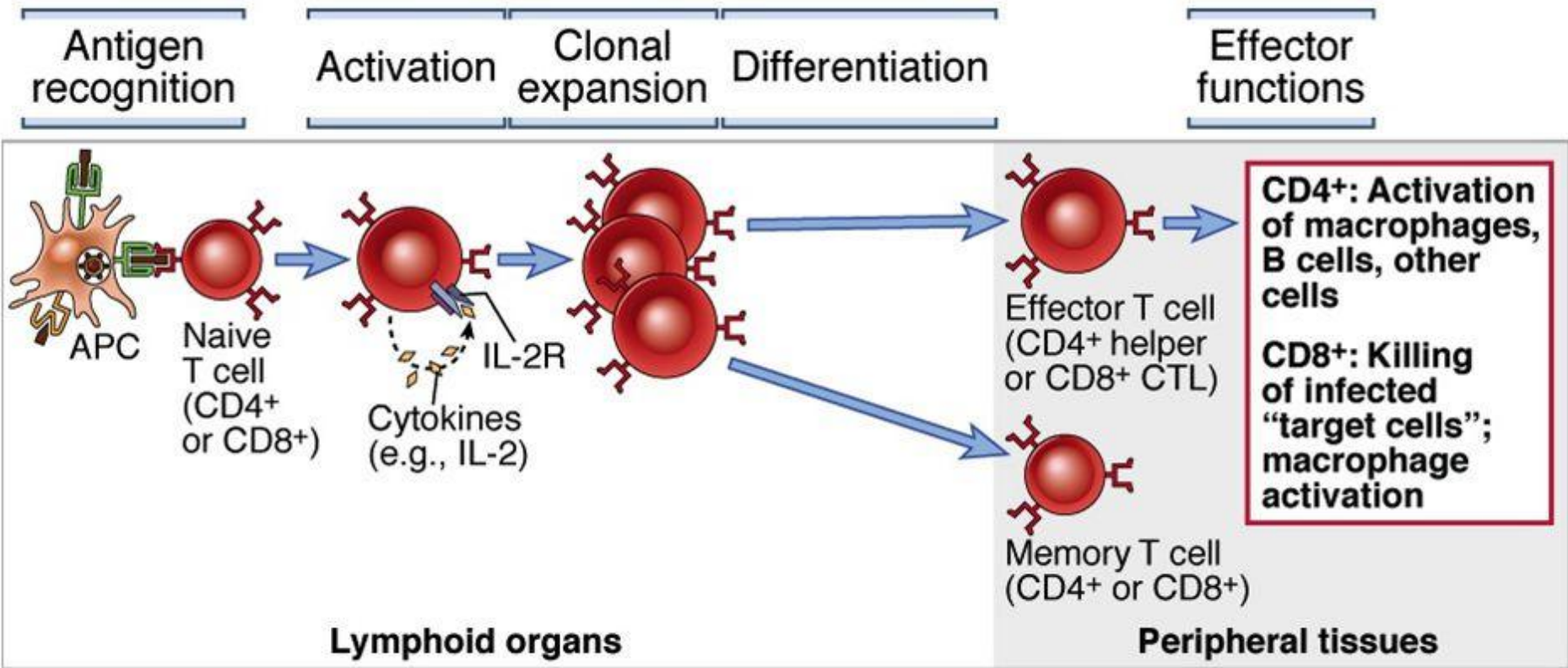
Aktywacja i funkcje efektorowe komórek odporności nabytej

Sposoby badania aktywacji i funkcji efektorowych limfocytów T

prof. dr hab. Nadzieja Drela
Wydział Biologii UW
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii
Zakład Immunologii
ndrela@biol.uw.edu.pl

Etapy aktywacji limfocytów T

Steps in the activation of T lymphocytes



Etapy aktywacji limfocytów T



T-Cell Activation and Differentiation

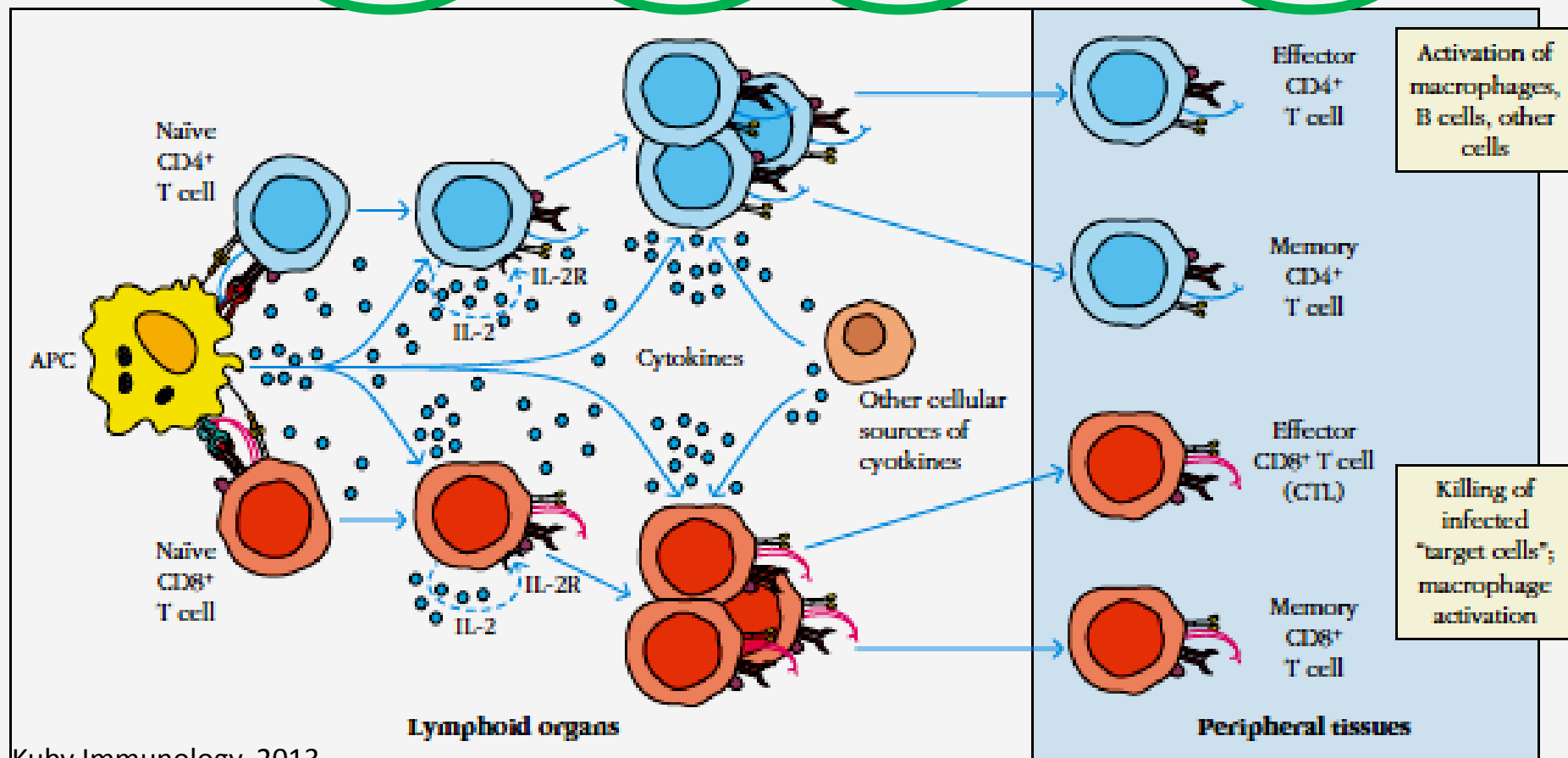
Antigen
recognition

Activation

Clonal
expansion

Differentiation

Effector
functions



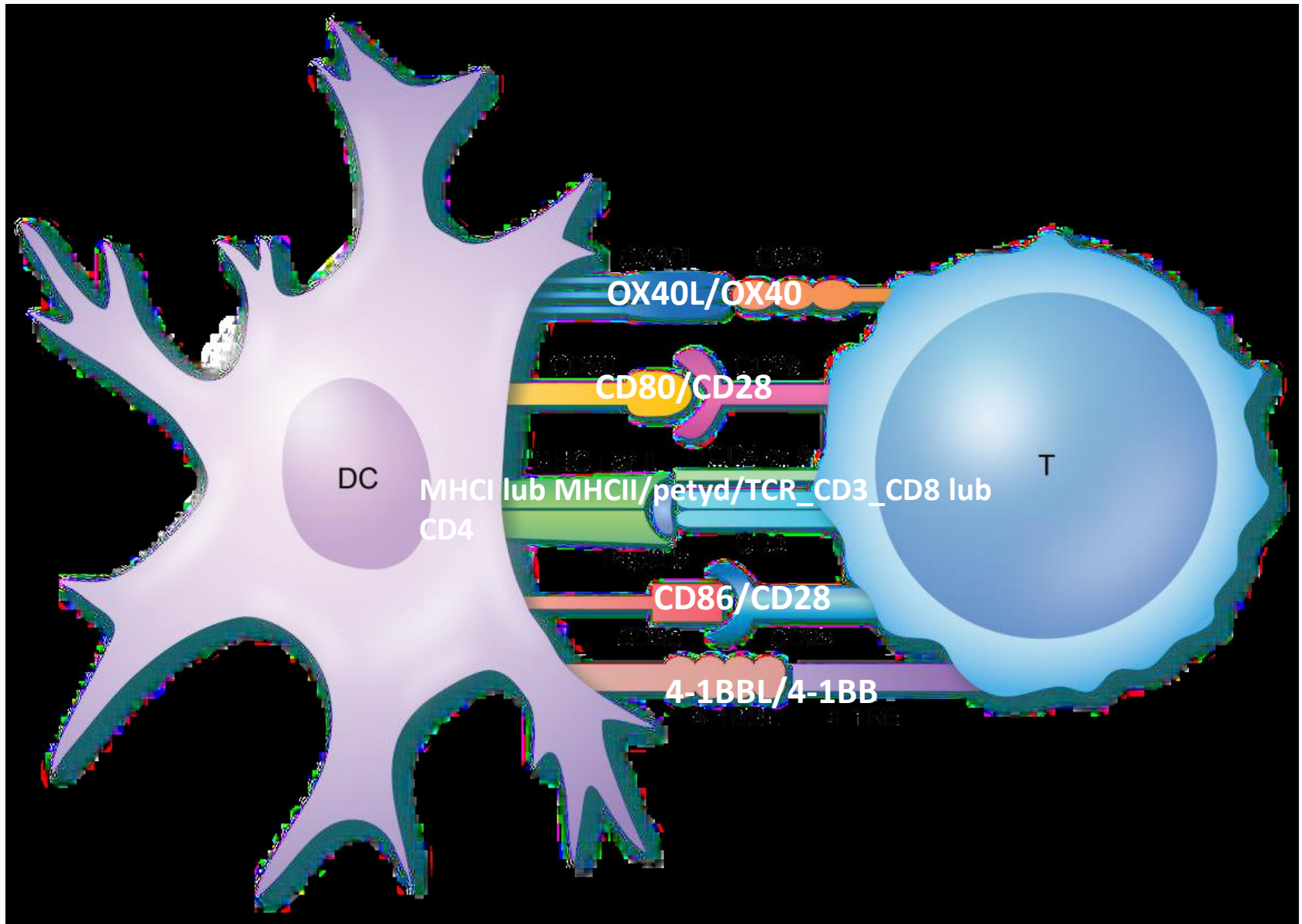
Komentarz do slajdów nr 2 i 3:

Ryciny przedstawiają etapy aktywacji limfocytów zapoczątkowane przez interakcję receptora dla antygenów limfocytów T (TCR) z kompleksem MHC/peptyd prezentowanym przez komórkę prezentującą antygen (APC). Ten etap nazywany jest skrótowo „rozpoznanie antygenów”. Aktywacja naiwnych limfocytów T wymaga prezentacji antygenów przez komórki dendrytyczne. Aktywowane naiwne limfocyty T syntezują i wydzielają cytokiny, głównie IL-2, która pełni rolę czynnika wzrostowego dla aktywowanych limfocytów T. Limfocyty T proliferują (ekspansja klonalna), następnie różnicują w limfocyty efektorowe i limfocyty pamięci. Etapy rozpoznania antygenów, aktywacji, ekspansji klonalnej i różnicowania zachodzą w obwodowych narządach limfoidalnych. Powstałe wskutek całego procesu aktywacji limfocyty efektorowe wykazują aktywność biologiczną w tkankach objętych stanem zapalnym, najczęściej wskutek infekcji patogenem.

Zalecana literatura:

Kuby Immunology, J.A. Owen, J. Punt, S.A. Stranford, wyd. W.H. Freeman and Company,
Janeway's Immunobiology, w sieci dostępne 7 wydanie
Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system, A.K. Abbas, A.H. Lichtman, wyd. Saunders Elsevier, w sieci wydanie z 2011 roku.

Aktywacja limfocytów T



Komentarz do slajdu nr 5:

Interakcje niezbędne do aktywacji naiwnych limfocytów T przez komórki dendrytyczne to :

1/MHCI lub MHCII/TCR

2/CD80 i CD86/CD28

3/ cytokiny/receptory cytokin (niewskazane na tym slajdzie).

Tu przedstawione są rzadziej omawiane w podręcznikach oddziaływanie białek błonowych limfocytów T i komórek dendrytycznych jak OX40L/OX40, które zachodzą 24-72 godzin po aktywacji limfocytów przy udziale cząsteczek wyszczególnionych powyżej (1, 2). Cząsteczka OX40L, ligand dla OX40 nie występuje na spoczynkowych komórkach dendrytycznych, lecz dopiero wskutek ich aktywacji. Oddziaływanie OX40L/OX40 nie ma wpływu na proliferację aktywowanych limfocytów T podczas 3 pierwszych dni po aktywacji. Po tym czasie, gdy ekspresja obu cząsteczek jest duża, interakcja między nimi utrzymuje żywotność aktywowanych limfocytów T poprzez regulację ekspresji białek Bcl-2, Bcl-XL i surviviny, a także indukcję syntezy cytokin przez aktywowane limfocyty T.

Interakcja 4-1BBL/4-1BB nasila proliferację, syntezę IL-2, aktywność cytotoksyczną limfocytów T CD8+ (potencjalna możliwość wykorzystania jako celu w terapii nowotworów).

Najczęściej badane skutki aktywacji

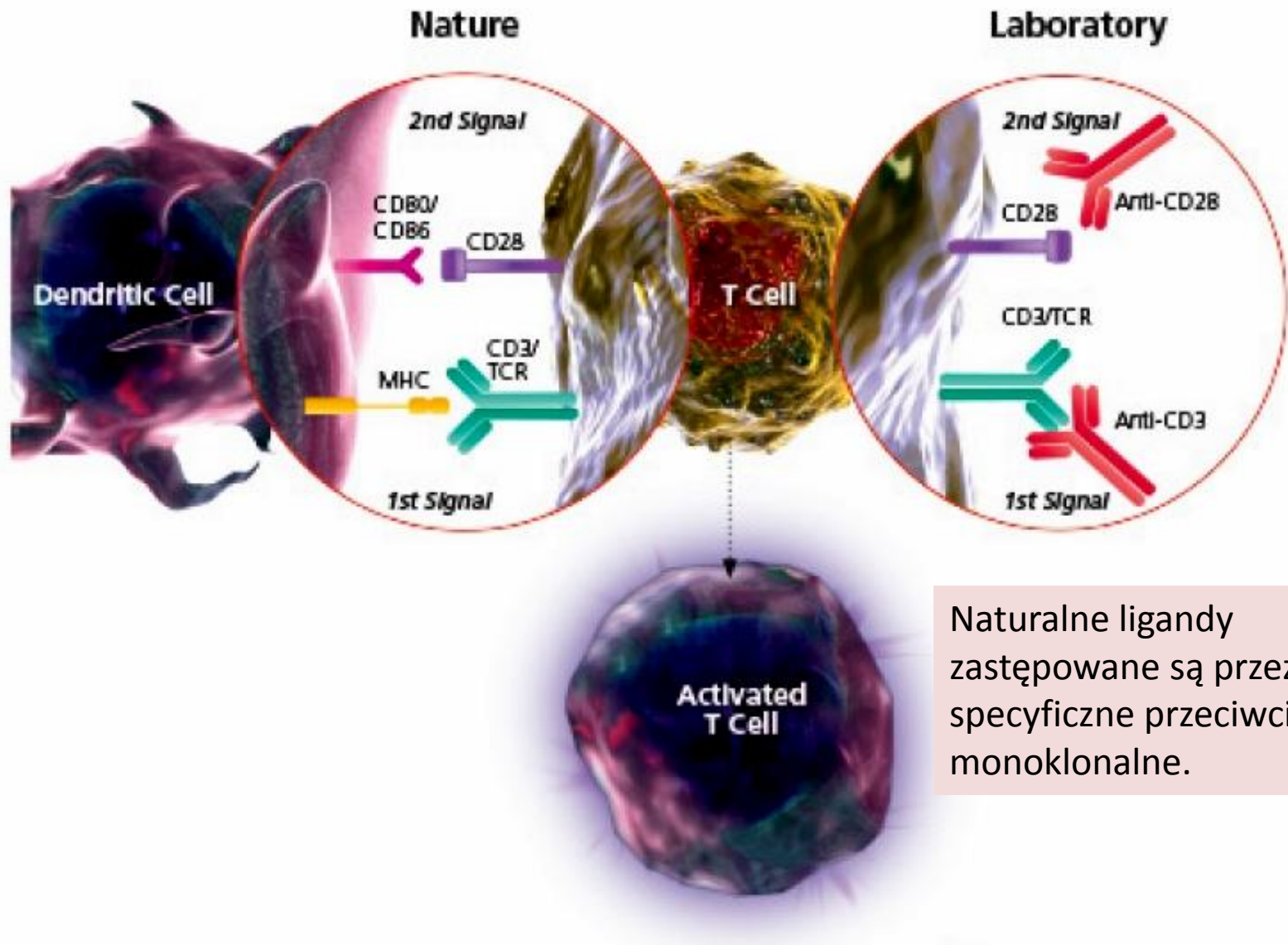
1. Ekspresja markerów aktywacji
2. Klonalna ekspansja limfocytów
3. Różnicowanie efektorowych limfocytów T
4. Indukcja cytotoksyczności
5. Synteza cytokin
6. Indukcja apoptozy
7. Inne funkcje efektorowe

Czynniki indukujące aktywację stosowane w laboratorium

Table 1. Stimulation reagents.

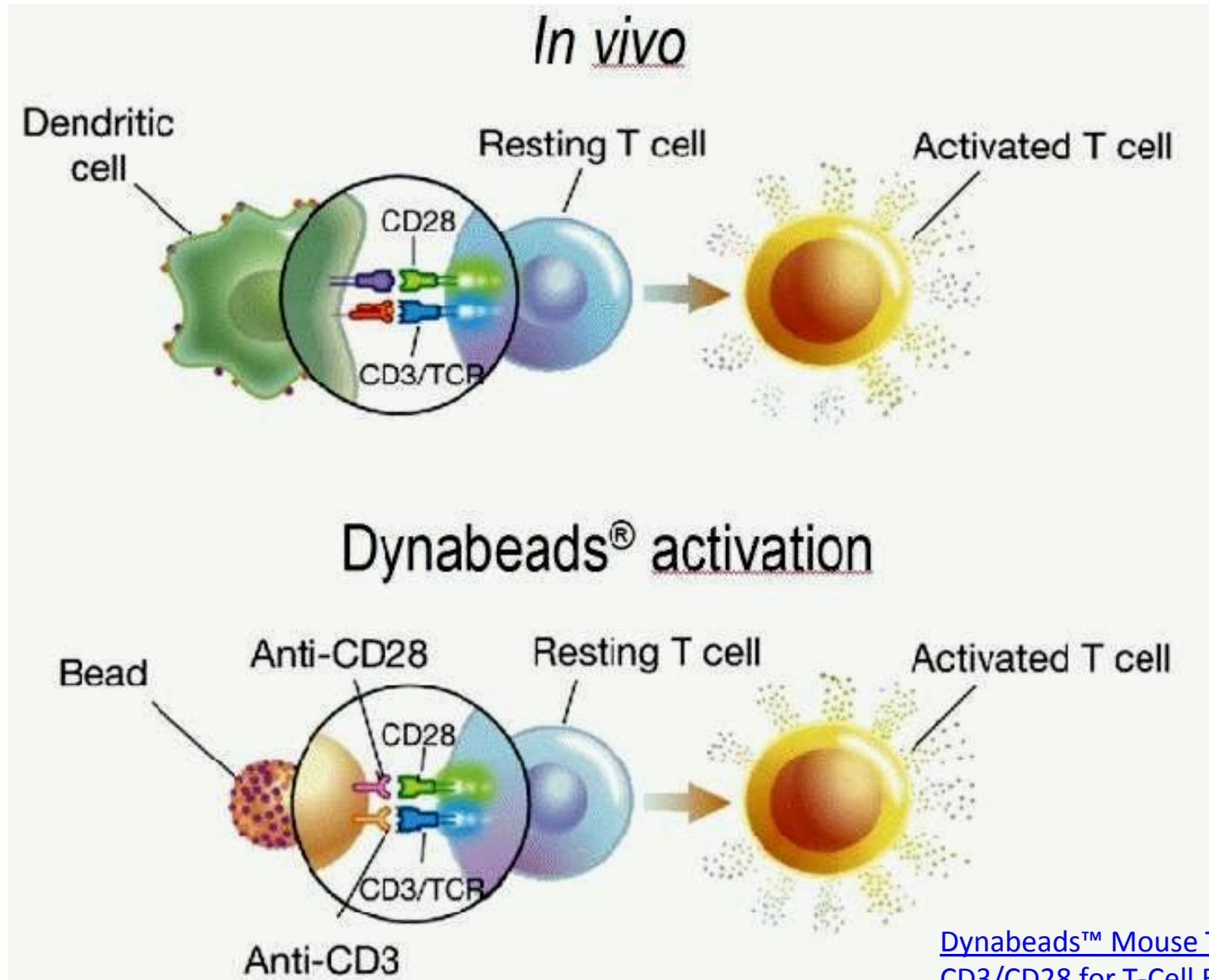
Reagent	Cells	Conc.	Mode of Action
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Human, mouse, rat	1-10 ng/ml	Activation of protein kinase C, use with ionomycin
Ionomycin	Human, mouse, rat	200-500 ng/ml	Calcium ionophore, use with PMA
Phytohaemagglutinin	Human, mouse, rat	1-5 µg/ml	Indirect TCR cross-linking, requires antigen presenting cells
Concanavalin A (Con A)	Mouse, rat	1-10 µg/ml	Indirect TCR cross-linking, requires antigen presenting cells

Symulacja warunków fizjologicznych



Naturalne ligandy zastępowane są przez specyficzne przeciwciała monoklonalne.

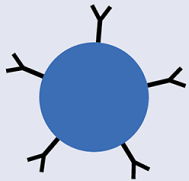
Przeciwciała stymulujące na nośniku



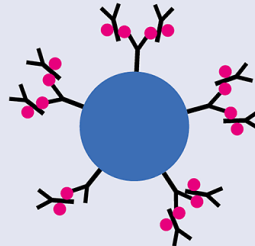
[Dynabeads™ Mouse T-Activator
CD3/CD28 for T-Cell Expansion and ...
thermofisher.com](https://www.thermofisher.com)

Przeciwciała stymulujące na nośniku

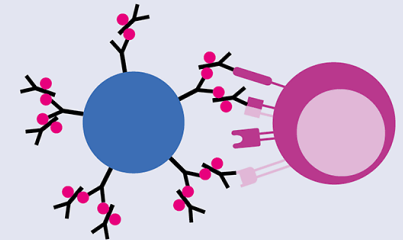
Anti-Biotin MACSiBead Particles have Anti-Biotin antibodies conjugated to their surface.



MACSiBead Particles are loaded with biotinylated CD2, CD3, and CD28 antibodies under slow continuous rotation, for example, by using the MACSmix Tube Rotator.



T cells bind to the loaded MACSiBead Particles and get activated by the stimulation of CD2, CD3, and CD28. The loaded MACSiBead Particles mimic antigen-presenting cells and cause efficient stimulation of T cells.



 Anti-Biotin antibody conjugated to a MACSiBead Particle

 Biotinylated CD2, CD3, or CD28 antibody

 CD3
 CD2

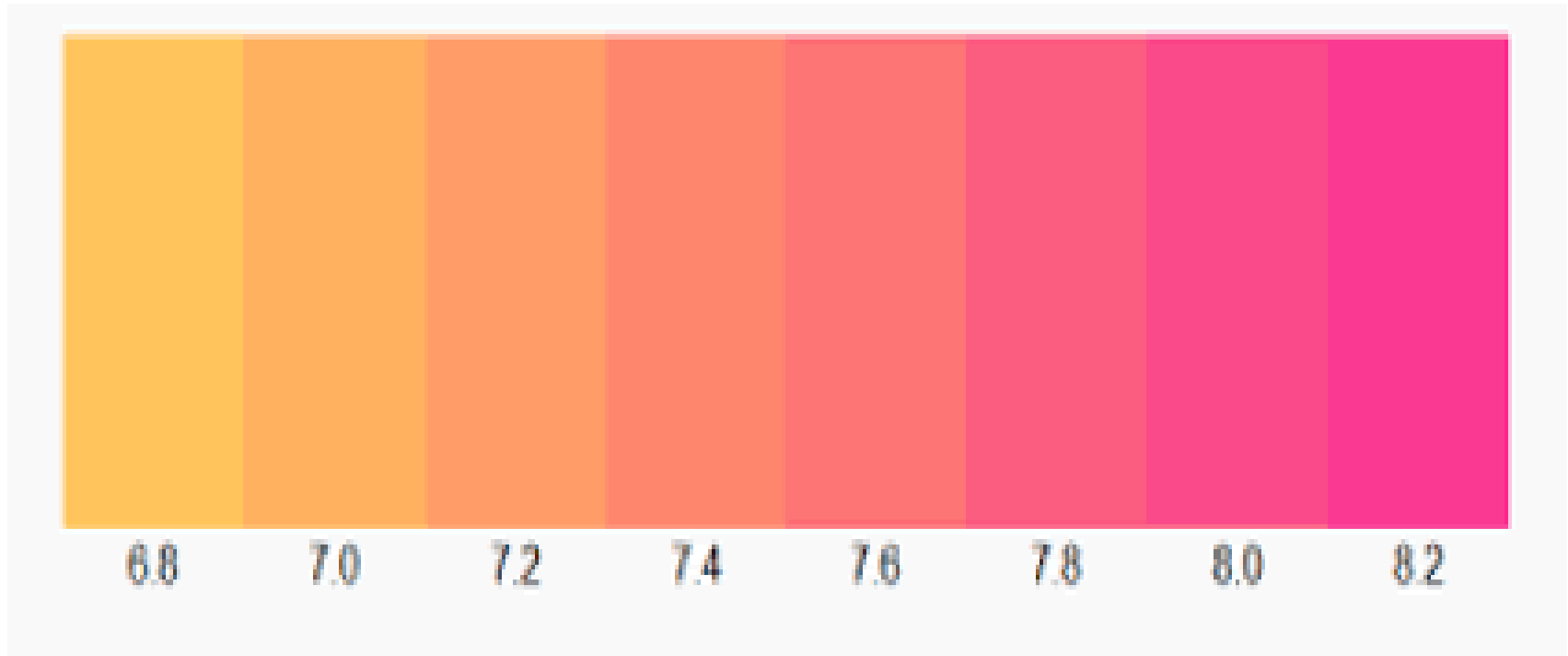
 CD28
 T cell receptor

Składniki podłoża do hodowli limfocytów

Component	Function
Sodium Bicarbonate (NaHCO_3)	A non-toxic natural buffer commonly included in stem cell medium to stabilize changes in pH within a CO_2 incubator.
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid)	A zwitterion that acts as an organic buffer to stabilize changes in pH in a more robust manner compared to sodium bicarbonate.
Phenol Red	A visual pH indicator. It is yellow when media pH is below pH 6.8 and fuchsia above pH 8.2.
Protein	Proteins can act as carriers, offer media stability, and provide protection of cells against physical damage. The most commonly added proteins are albumin, transferrin, fibronectin and insulin.
Amino acids	Supplemented in cell culture media to replace those depleted during logarithmic growth phase. They are building blocks required for protein synthesis in cells.
Carbohydrates	Carbohydrates are the main energy source for cells in culture media. Glucose is the important for T cell proliferation.
Lipids	Lipids are necessary for cell membrane synthesis and activate important signaling pathways.
Inorganic Salts	Inorganic salts in the media help maintain osmotic balance and regulate membrane potential by providing sodium, potassium, and calcium ions.
Trace Elements	Trace elements such as zinc, copper, selenium and tricarboxylic acid intermediates are commonly added to culture media. They serve as enzyme cofactors.
Vitamins	Vitamins cannot be synthesized in sufficient quantities by cells and are necessary supplements in culture media for cell growth and proliferation.
β -mercaptoethanol	β -mercaptoethanol (β -ME or 2-ME) is an antioxidant that reduces oxidative stress through removal of free radicals from the culture environment. Required for growing murine T cells.
Growth Factors	Interleukin-2 (IL-2) is an important cytokine for T-cell proliferation and is often added to T cell media.

Ocena pH podłoża w hodowli

Acidic  Basic

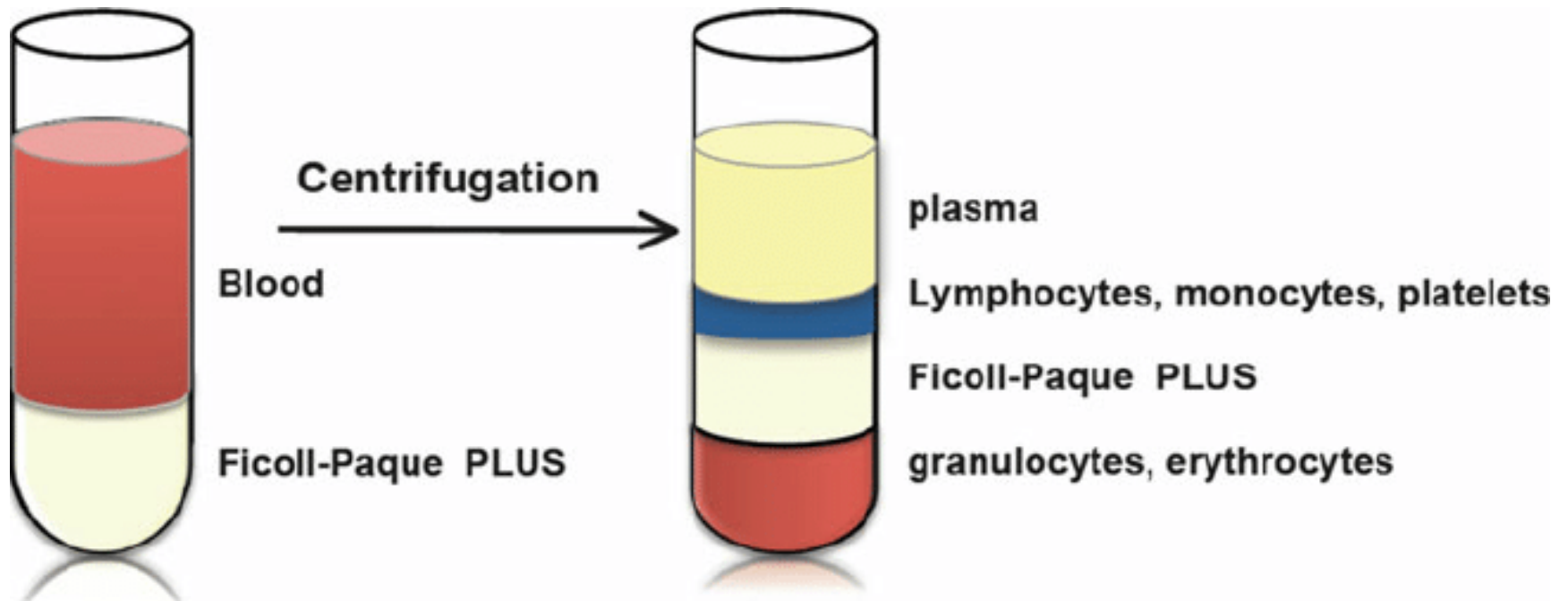


Czerwień fenolowa pH 6.8 - 8.2.

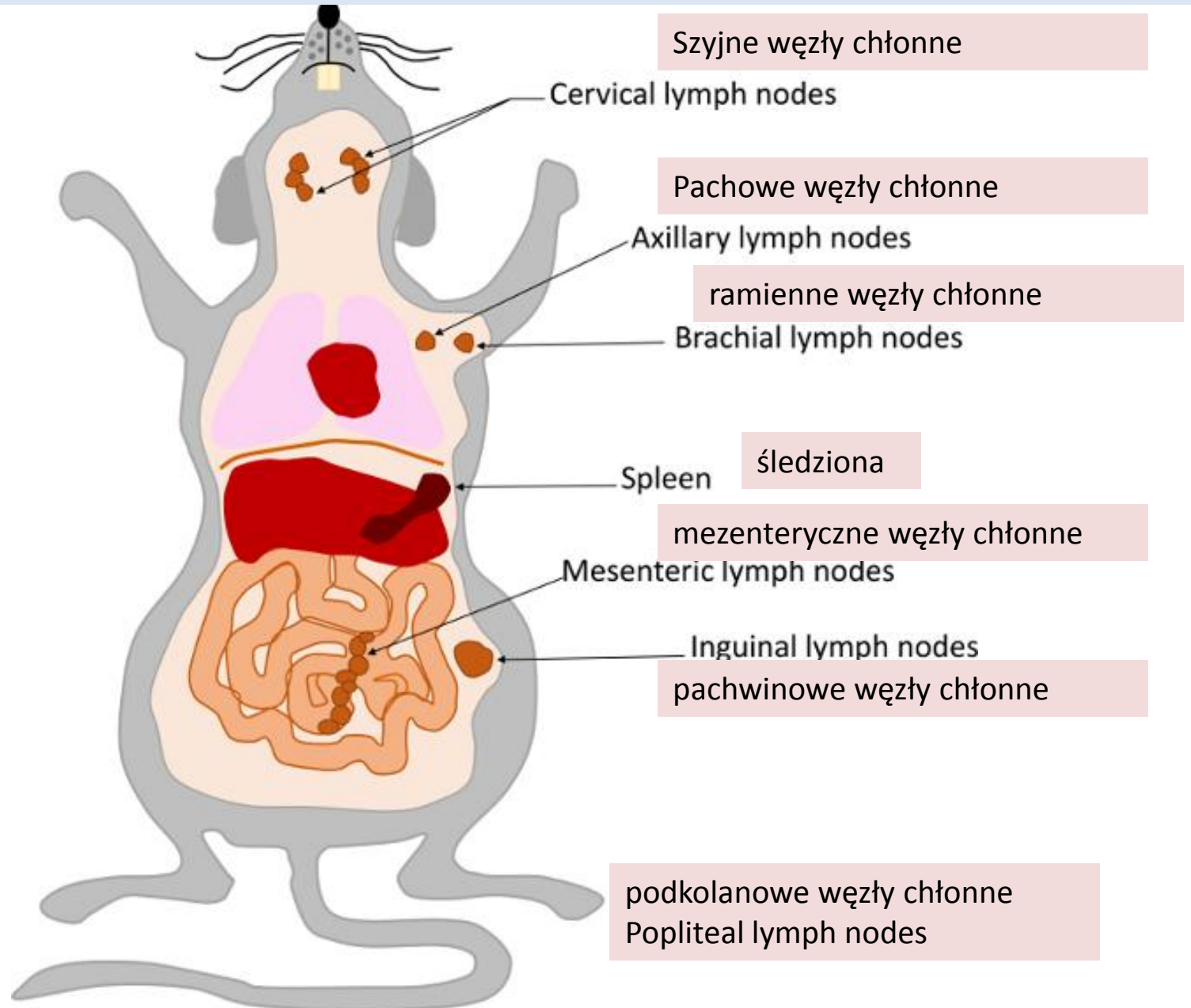
Rodzaje podłoży do hodowli

Media Type	Description
Serum-containing	Serum-containing media contains serum or plasma, which contains nutrients required for cell survival and growth including growth factors, hormones, macromolecules, and adhesion factors. The most commonly used serum is fetal bovine serum (FBS).
Serum-free	Serum-free media does not contain serum or plasma though it may contain components derived from serum or plasma. It may contain animal-derived components such as bovine serum albumin (BSA).
Xeno-free	Xeno-free media does not contain any animal-derived (non-human) components. Xeno-free medium may contain human-derived components, such as human serum, growth factors or insulin.
Chemically-defined	Chemically-defined media has components that are of a known chemical structure and concentration.

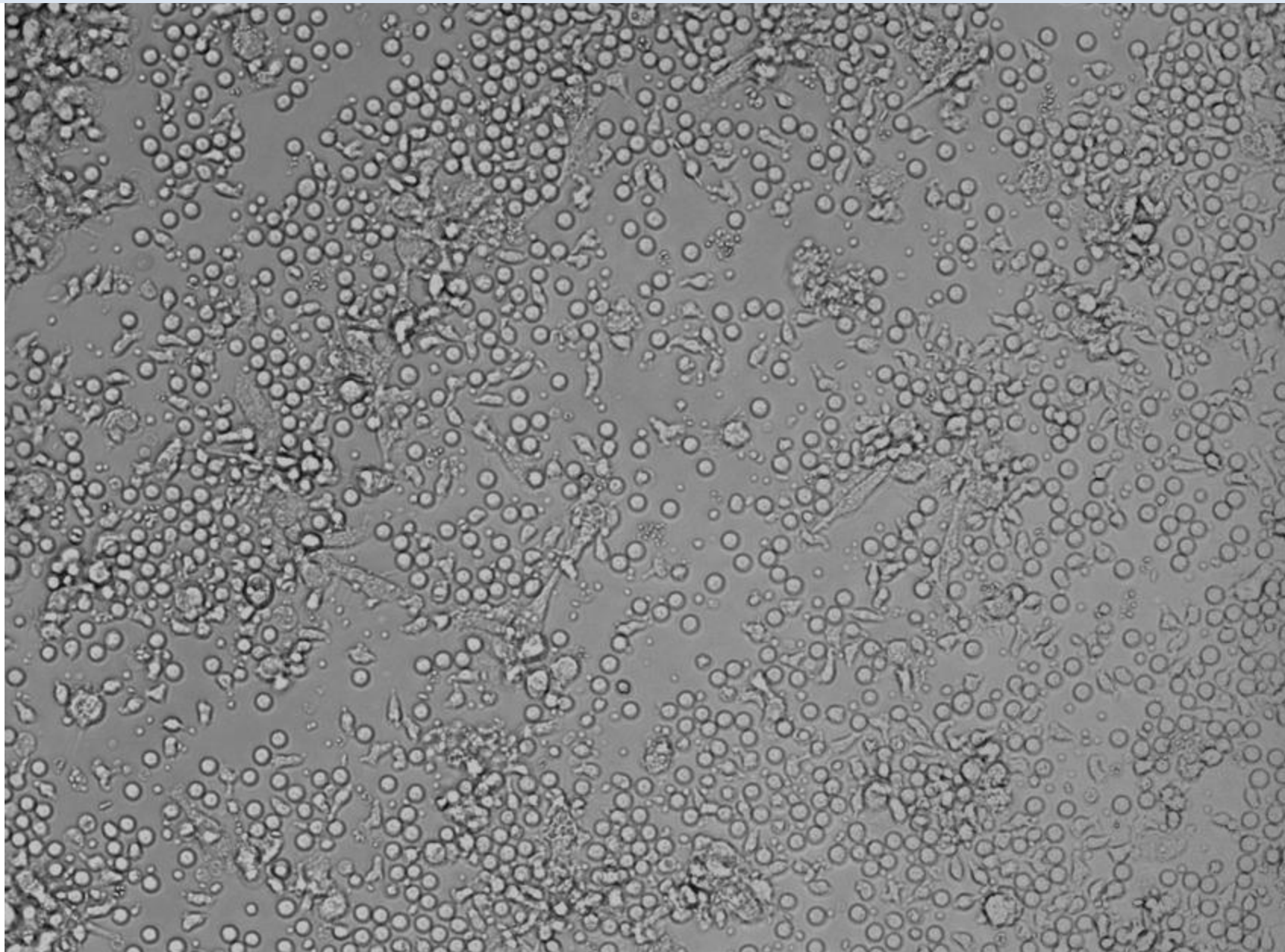
Materiał do badań



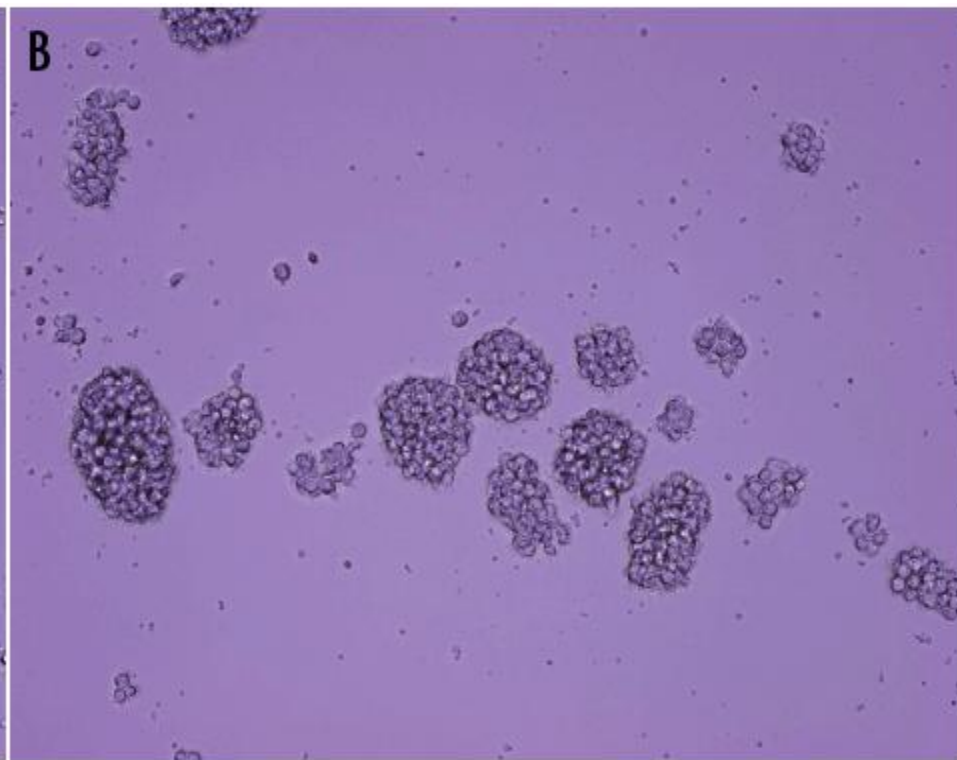
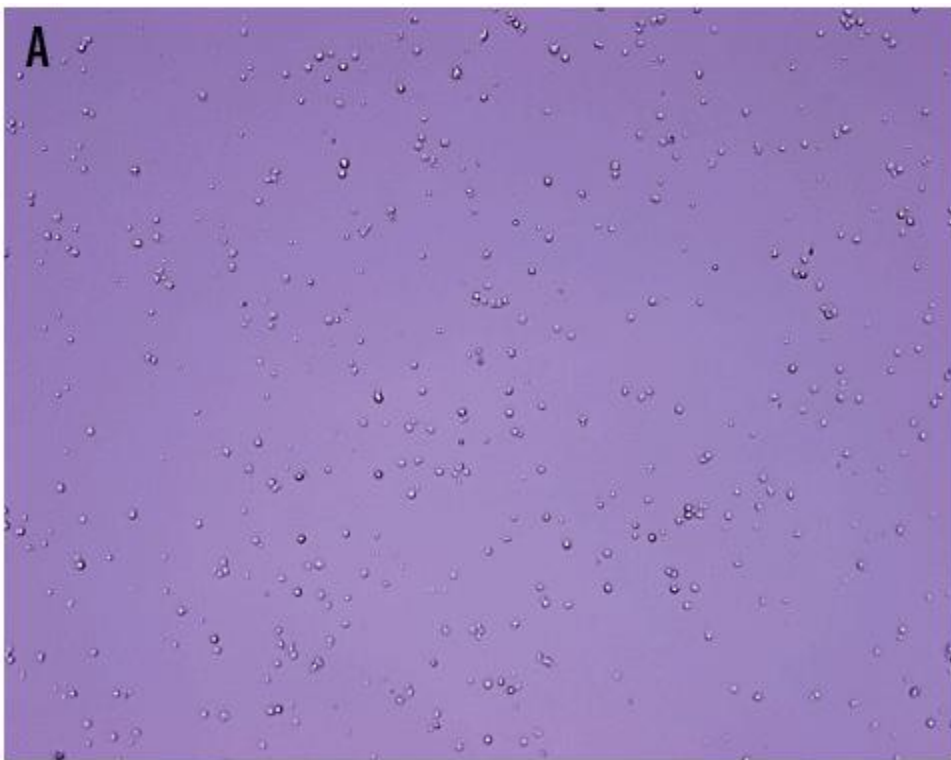
Materiał do badań



Limfocyty w hodowli



Limfocyty w hodowli

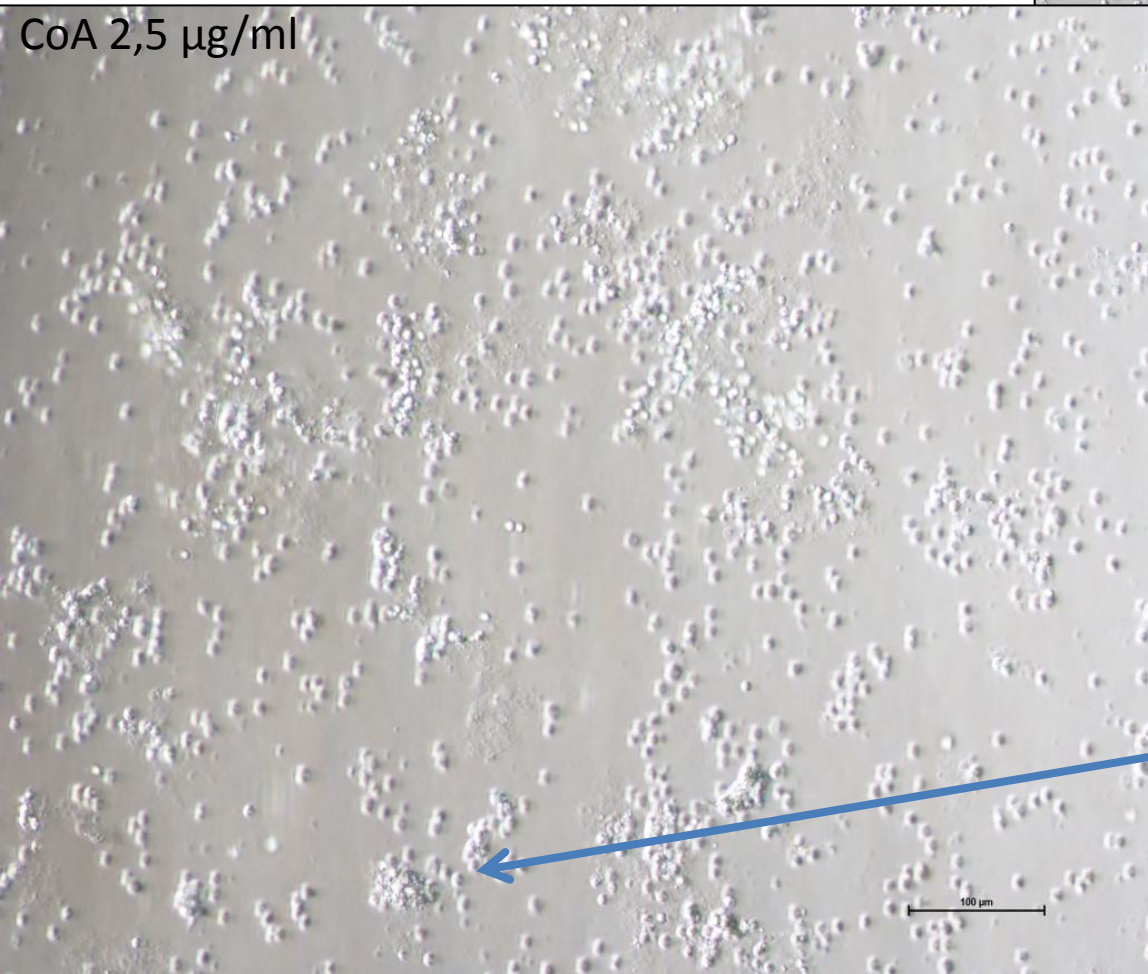


Dzień 1 hodowli

kontrola

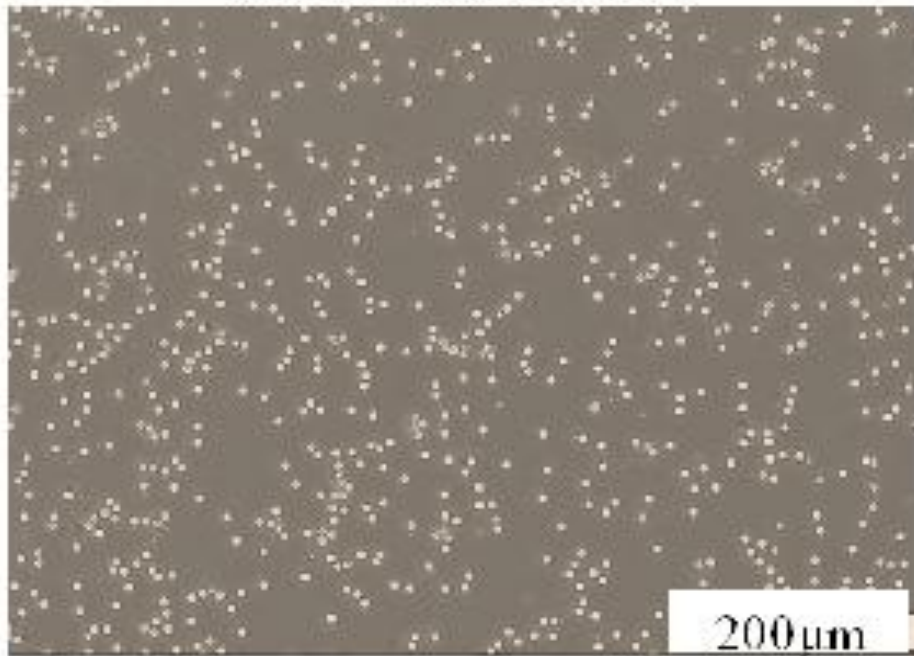


CoA 2,5 µg/ml

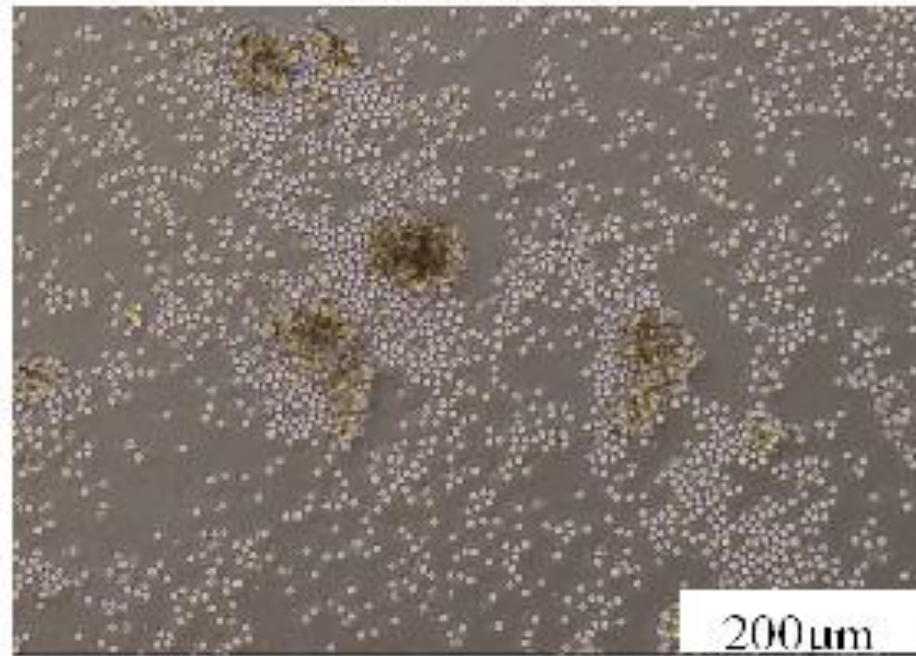


Skupisko limfocytów:
efekt proliferacji. Nie
widzimy takich
skupisk w hodowli
kontrolnej, która nie
zawiera czynnika
aktywującego
limfocyty T.

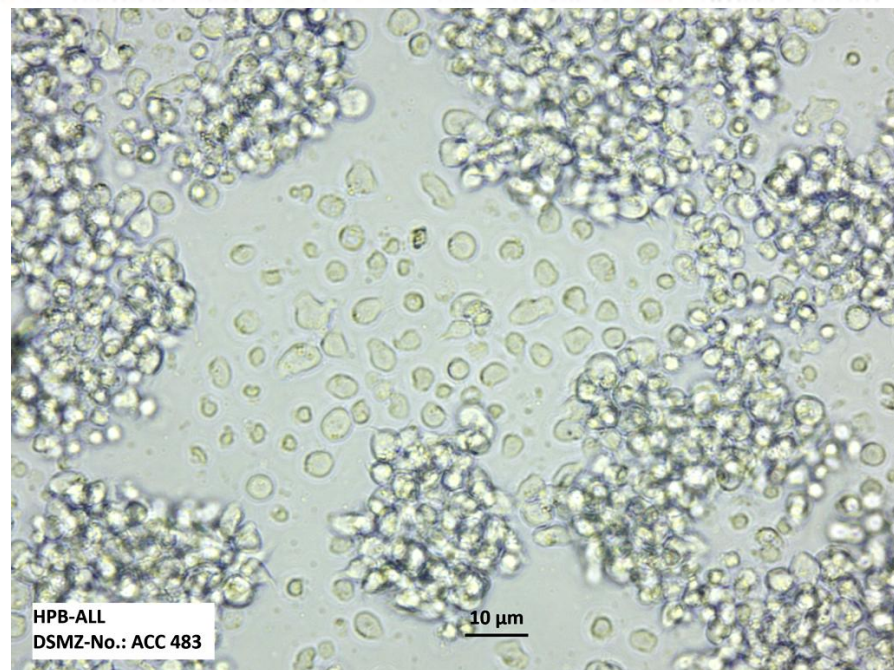
Non-activated



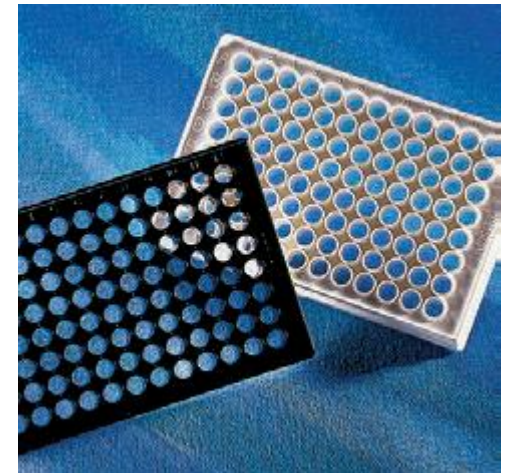
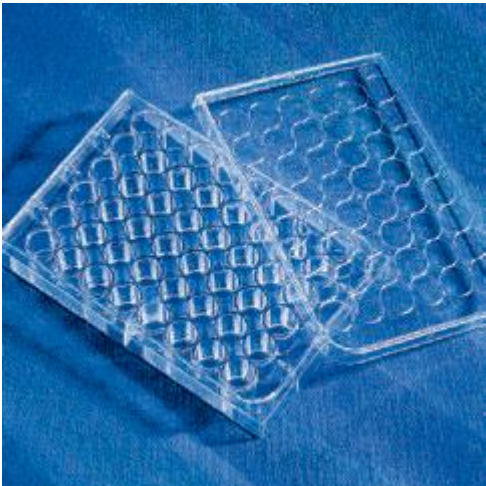
Activated



Dzień 3 hodowli



Płytki do hodowli



Objętość hodowli

P96: 0.1 ml – 0.2 ml

P48: 0.25 ml – 0.5 ml

P24: 0.5 ml – 1.0 ml

P12: 1 ml – 2 ml

P6: 2 ml – 4 ml

Suggested working volumes for Ultra-Low Attachment surface products:

w 96-well plate: 0.1 mL to 0.2 mL/well

w 24-well plate: 0.4 mL to 0.6 mL/well

w 6-well plate: 1.9 mL to 2.9 mL/well

w 60 mm dish: 4.2 mL to 6.3 mL/dish

w 100 mm dish: 11.0 mL to 16.5 mL/dish

w 25 cm² flask: 5 mL to 7.5 mL/flask

w 75 cm² flask: 15 mL to 22.5 mL/flask

w 636 cm² chamber: 127 mL to 191 mL/flask

Inserty w hodowli

TWO COCULTURING METHODS

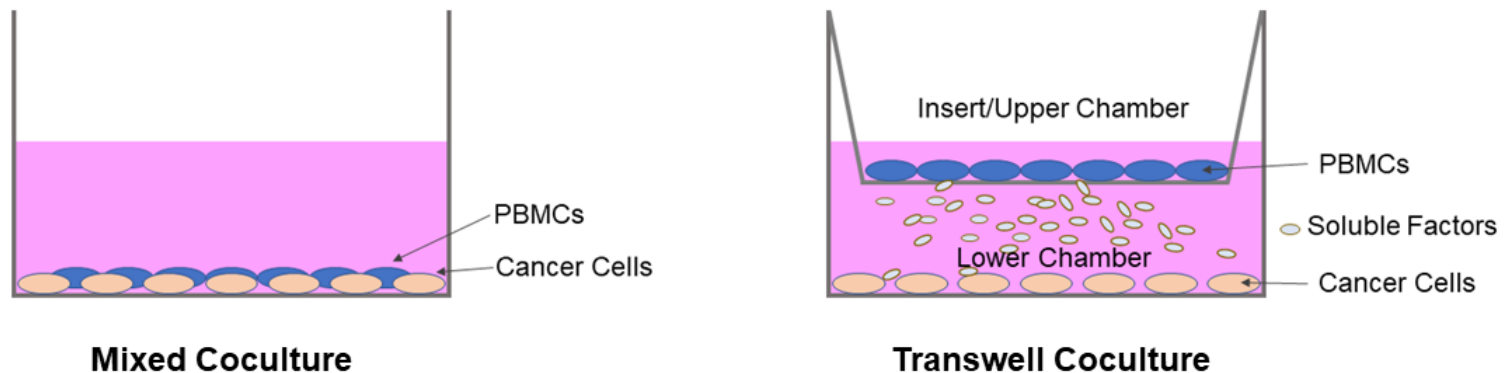
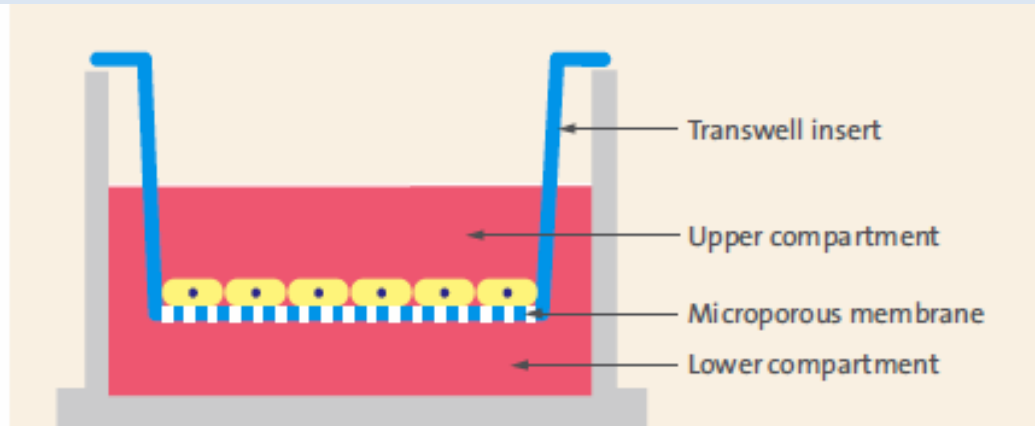


Figure 1: Two Methods for Coculturing Cancer and Immune Cells

The mixed coculture (*left*) allows peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), namely lymphocytes and monocytes, to physically interact with cancer cells. In contrast, in a transwell coculture (*right*), the two cell populations are physically separated; cells are exposed to only soluble factors secreted into the media.

Inserty w hodowli: wybór membrany



1. Select a Membrane

Permeable supports are available in three materials of construction:

PC (Polycarbonate)

Transwell® Permeable Supports are available in a broad range of pore sizes from 0.4 to 8.0 μm . This high pore density membrane is suitable for a variety of applications. It allows for maximum diffusion when studying transport, secretions, or drug uptake.

PET (Polyester or Polyethylene Terephthalate)

Transwell-Clear inserts permit sufficient optical transparency for visualization of cell outlines by phase contrast microscopy.

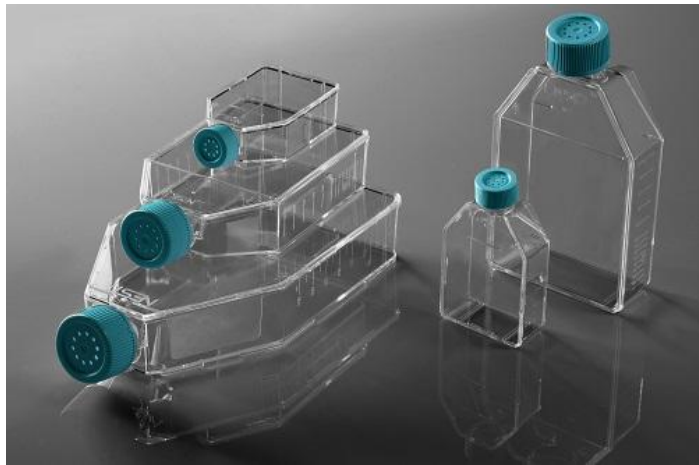
PTFE (Polytetrafluoroethylene)

Collagen-coated PTFE membranes are available in limited pore sizes (0.4 μm and 3.0 μm). These coated membranes promote cell attachment and allow cells to be visualized during culture.

Inserty w hodowli: wybór średnicy porów

Application	Cell Type	Pore Size (μm)
Angiogenesis	Endothelial, hmvect, huvec	3.0
Co-culture	Stem, neuronal, and various others	0.4, 1.0
Epithelial Cell Polarity	Epithelial cells	0.4
Migration	Endothelial, HUVEC, HMVEC	3.0
	Neutrophils, PMNs	3.0
	Lymphocytes, macrophages, monocytes	3.0, 5.0
	Neuronal cells	3.0
	Dendritic cells	3.0, 5.0, 8.0
	Neurite outgrowth	1.0, 3.0
	Epithelial fibroblasts	8.0
	Leukocytes	3.0, 5.0
	Smooth muscle	8.0
Invasion	Melanoma	8.0
	Glioma	8.0
	Lymphoma, Jurkat	5.0, 8.0
	Osteoblasts	8.0
	Breast cancer	5.0, 8.0
	Endothelial	3.0, 5.0, 8.0
Tissue Engineering	Human skin model	0.4, 3.0
Toxicity Testing	Mouse fibroblasts	3.0
	Human lung	0.4
Transport and Permeability Studies	Caco-2	0.4, 1.0
	MDCK	0.4, 1.0

Butelki do hodowli



Butelki do hodowli

Flask Neck Styles



Straight neck flasks are ideal for larger medium volumes since this design reduces medium sloshing into the cap.



Canted neck flasks allow easier pouring and improved access to the flask for pipetting or scraping. The canted neck design was a Corning innovation that first appeared in 1974.



Angled neck flasks improve pipet access and reduce medium sloshing into the neck. This design was a Corning innovation that first appeared in 1988.

Objętość hodowli i liczba komórek w hodowli

Corning and Costar® Flasks	Approximate Growth Area (cm ²)	Average Cell Yield ^a	Recommended Medium Volume (mL)
25 cm ²	25	2.5 x 10 ⁶	5 - 7.5
75 cm ² canted neck	75	7.5 x 10 ⁶	15 - 22.5
75 cm ² straight neck	75	7.5 x 10 ⁶	15 - 22.5
100 cm ²	100	1.0 x 10 ⁷	20 - 30
150 cm ²	150	1.5 x 10 ⁷	30 - 45
162 cm ²	162	1.6 x 10 ⁷	32 - 48
175 cm ²	175	1.75 x 10 ⁷	35 - 52.5
225 cm ²	225	2.25 x 10 ⁷	45 - 67.5
235 cm ²	235	2.35 x 10 ⁷	47 - 70.5
1720 cm ²	1720	2.5 x 10 ⁸	565

Rodzaje powierzchni płytek i butelek

	Cell Culture Formats							
	Flasks	Dishes	Multiple Well Plates	Microplates	Corning CellSTACK®	Corning HYPERFlask® Chambers	Cell Culture Tubes	Self-coating
Corning Cell Culture Surfaces								
For enhancing cell attachment:								
Original Tissue Culture (TC) surface	■	■	■	■	■		■	
Corning CellBIND surface	■	■	■	■	■	■		
Poly-D-Lysine-coated surface				■				
For reducing or preventing cell attachment:								
Ultra-Low Attachment surface	■	■	■	■	■			
For specialized cell needs:								
Corning Osteo Assay surface			■	■				
Corning Synthemax surface								■

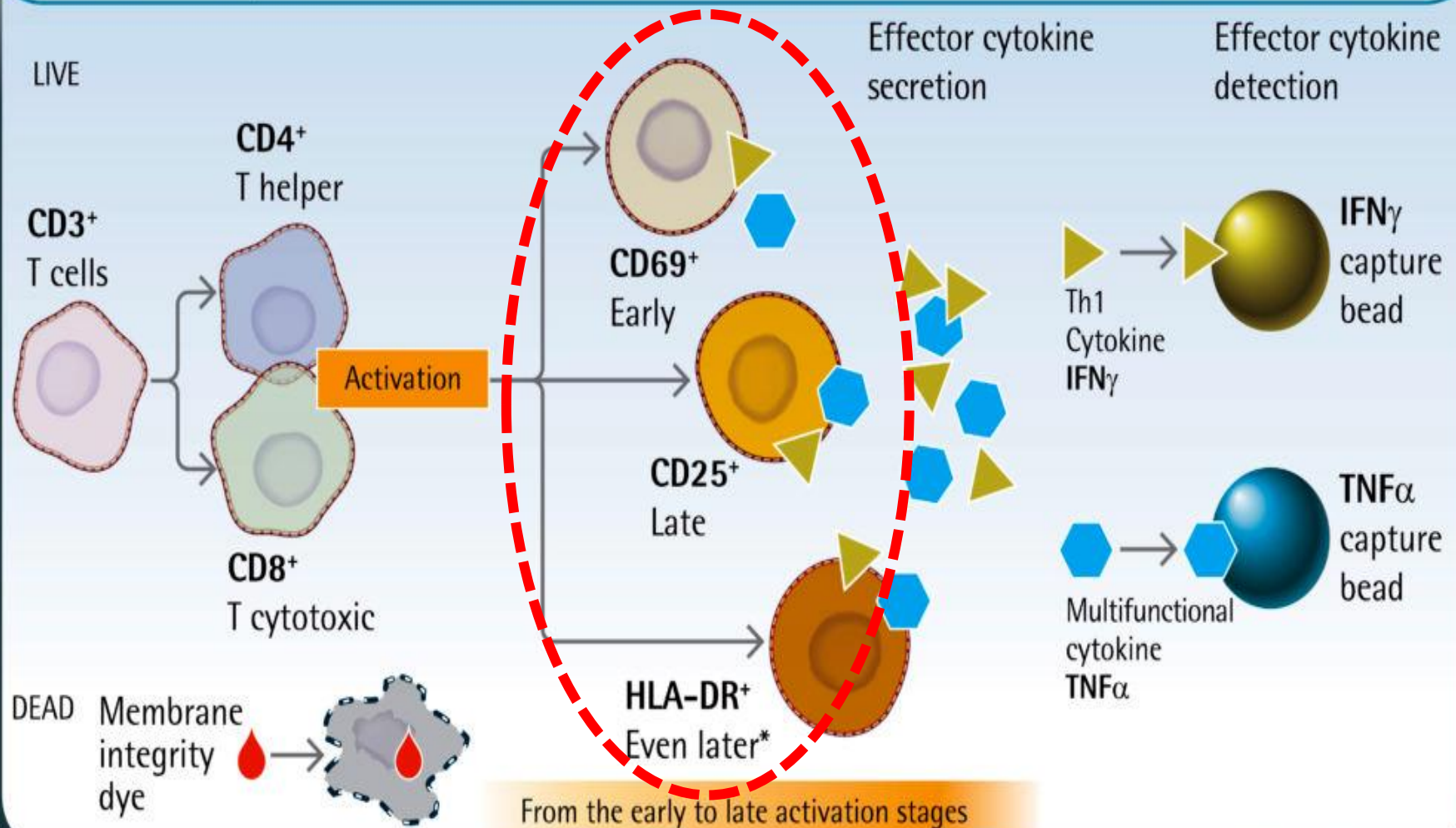
Markery aktywacji limfocytów T

Markery aktywacji limfocytów T

1. Proliferation and cell viability

2. Phenotyping probe/dye via markers of activation

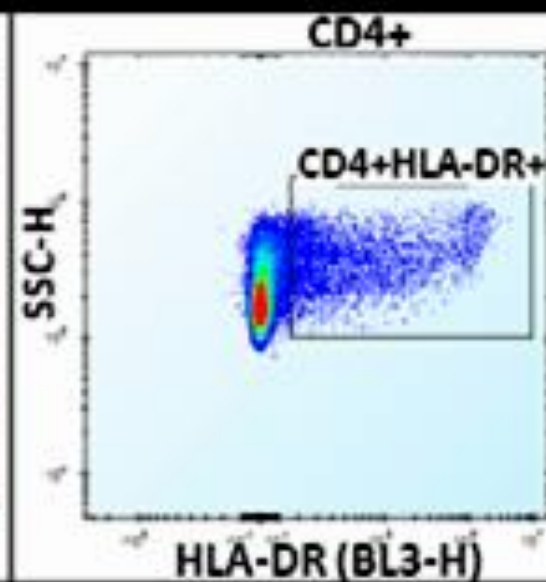
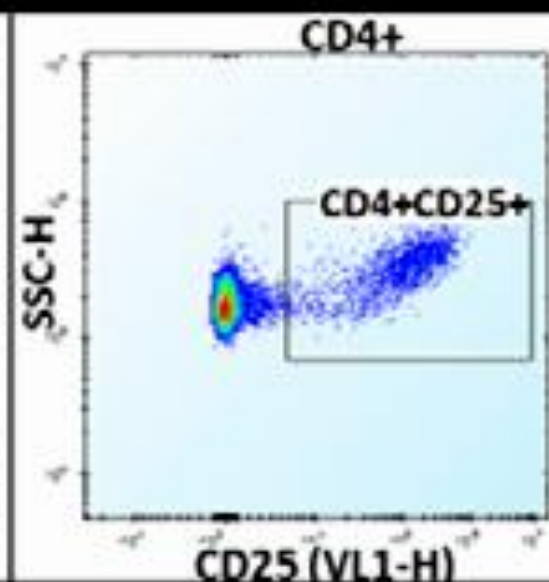
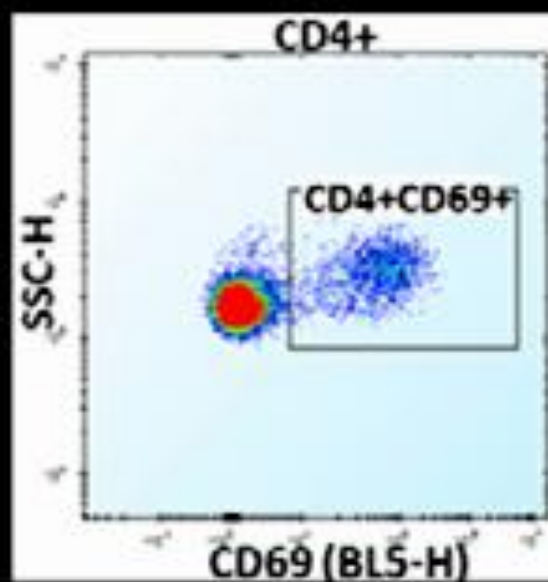
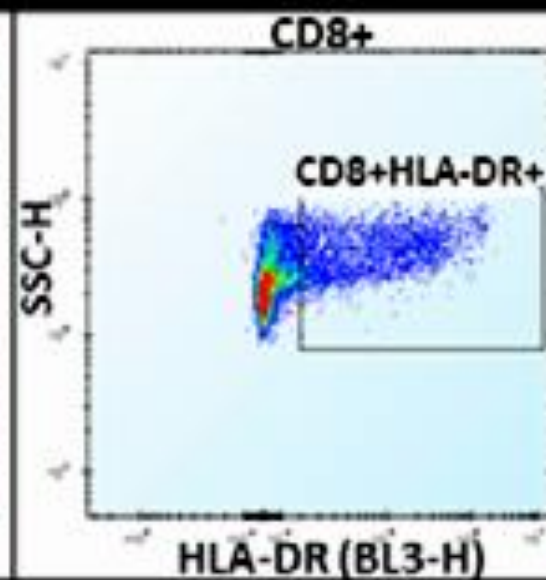
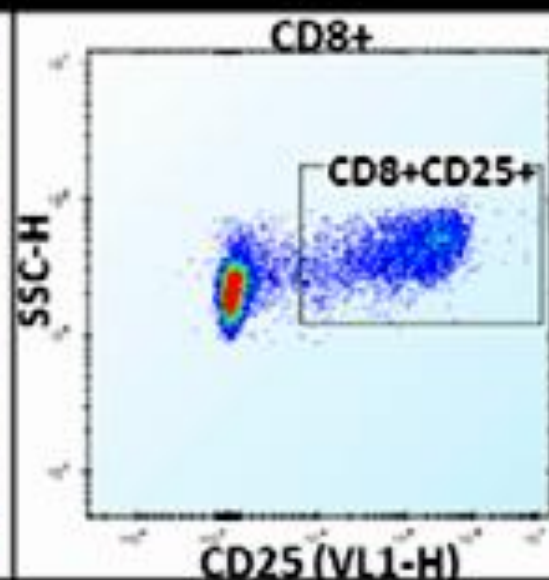
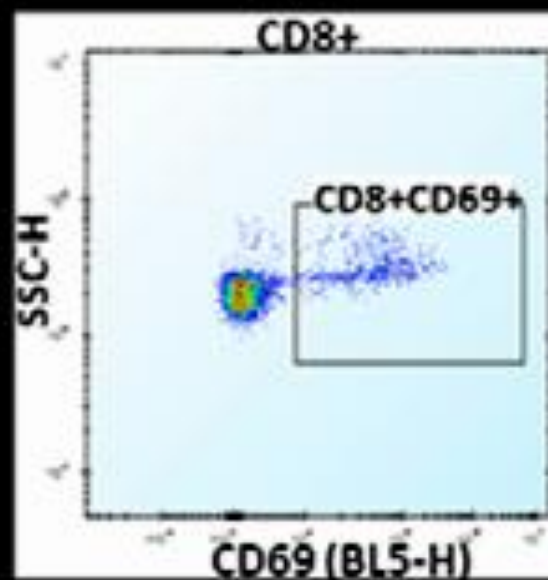
3. Measure cytokine secretion with beads

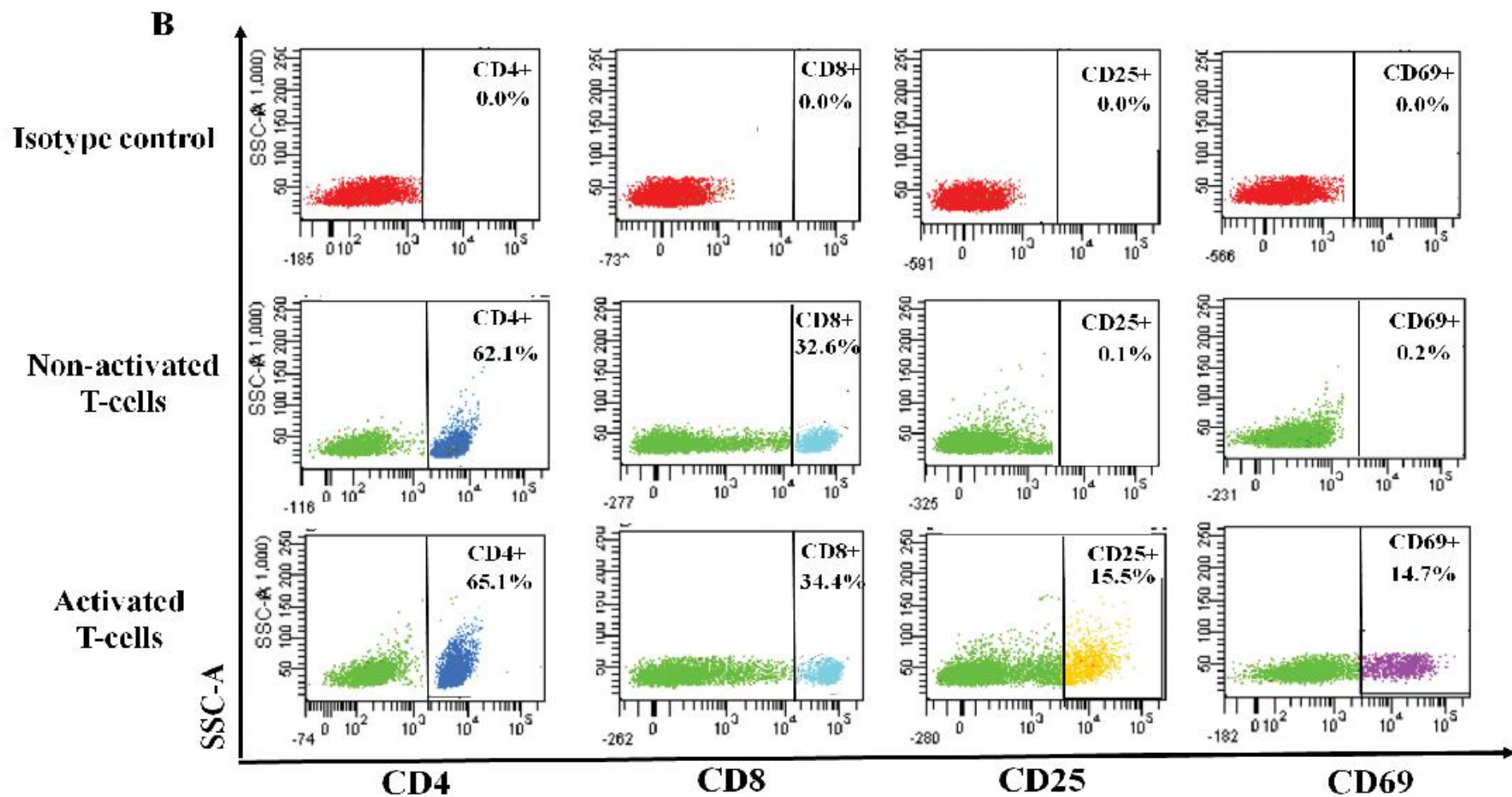
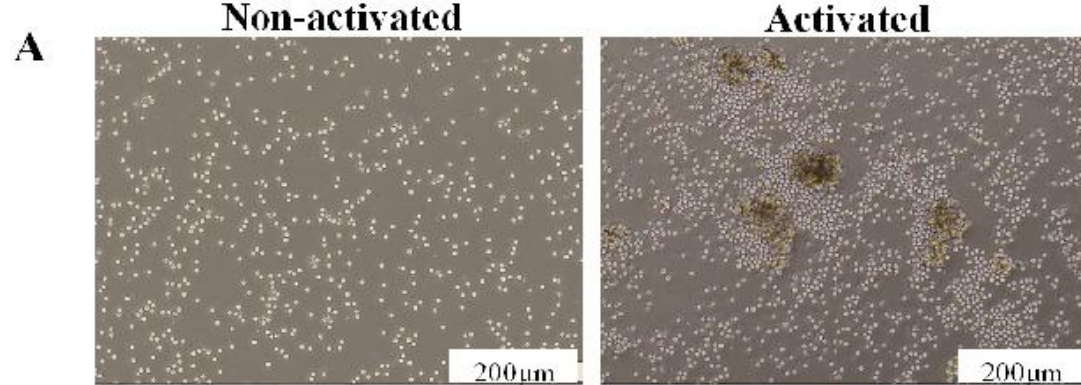


Komentarz do slajdu nr 31:

W hodowli limfocytów uzyskiwanych z obwodowych narządów limfoidalnych (najczęściej wykorzystywane źródło limfocytów zwierząt laboratoryjnych), krwi (najczęściej pobierany materiał do badań człowieka) znajdują się zarówno limfocyty T jak i B. Limfocyty T charakteryzują się ekspresją powierzchniowych cząsteczek CD3 (wszystkie limfocyty T), CD4 (limfocyty T CD4+), CD8 (limfocyty T CD8+). Wyznakowanie tych cząsteczek przeciwciałami monoklonalnymi sprzężonymi z fluorochromami umożliwia ich rozróżnienie techniką cytometrii przepływowej. Najczęściej badane markery aktywacji limfocytów T (człowieka i myszy) to CD69 ulegający ekspresji kilka godzin po aktywacji i CD25 (podczas aktywacji jego ekspresja zwiększa się aż do osiągnięcia stałego poziomu). Za późny marker aktywacji limfocytów T człowieka uznawane jest białko HLA-DR, które jest typowe dla komórek prezentujących antygeny (komórki dendrytyczne, makrofagi, limfocyty B). Markery aktywacji wykrywamy techniką cytometrii przepływowej po uprzednim wyznakowaniu komórek przeciwciałami monoklonalnymi anty-CD69 i anty-CD25 (czy też anty-HLA-DR) sprzężonymi z fluorochromami. Aktywowane limfocyty T CD4+ jak również CD8+ wykazują ekspresję tych markerów wykrywanych w różnym czasie po aktywacji. Obecność aktywowanych limfocytów T w hodowli ilustrują kolejne dwa slajdy (33 i 34).

SSC-H





Komentarz do slajdu nr 34:

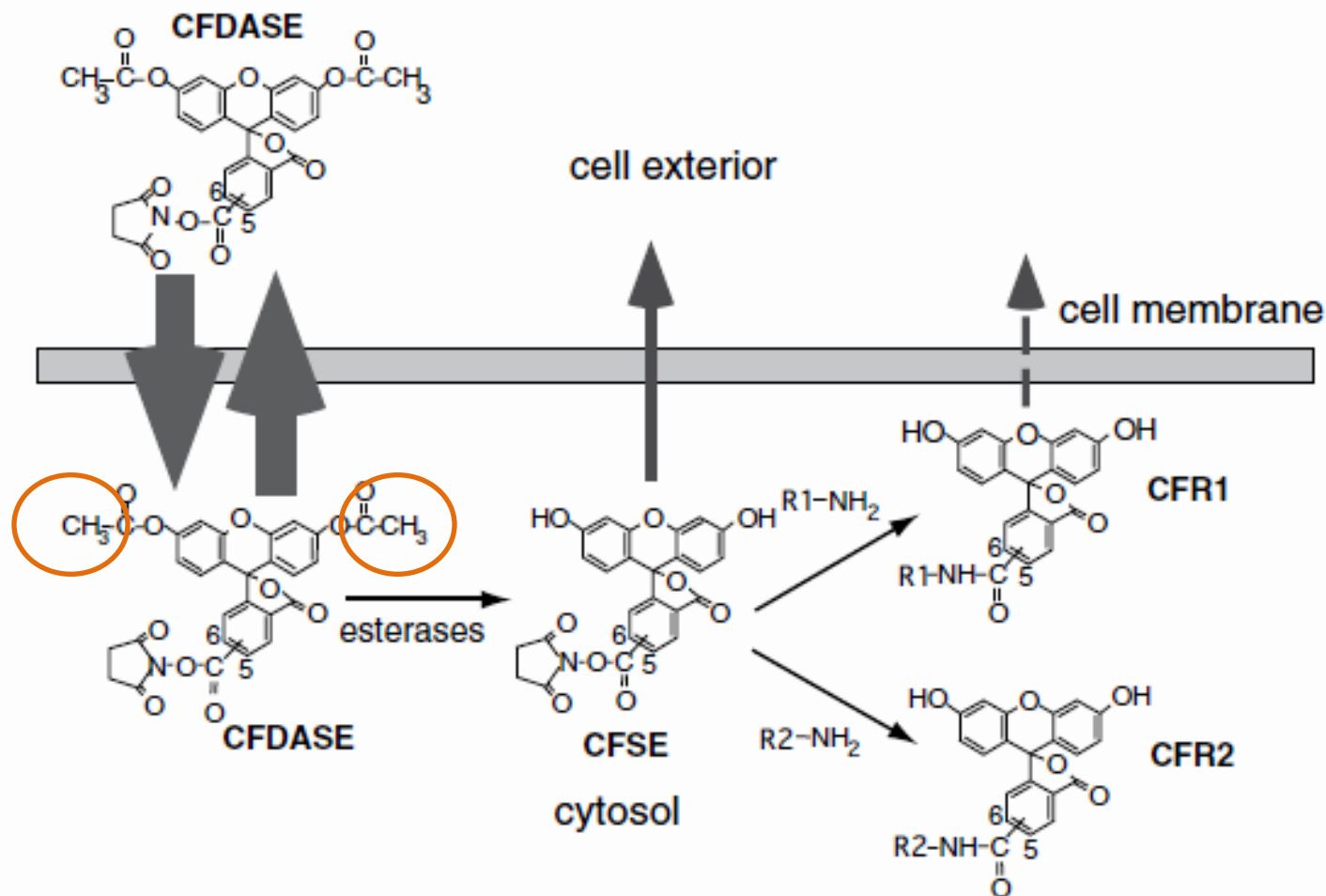
Proszę zwrócić uwagę, że ekspresja markerów charakterystycznych dla limfocytów T helperowych i cytotoksycznych (odpowiednio CD4 i CD8) nie ulega zmianie wskutek aktywacji. Skutkiem aktywacji jest synteza białek CD69 i CD25.

Klonalna ekspansja (proliferacja)

Rzadziej stosowane metody badania proliferacji

- (1) najczęściej w tym celu stosuje się wbudowywanie prekursorów syntezy DNA, trytowana tymidyna – [H3] tymidyna i pomiar scyntylacyjny promieniowania β .**
- (2) alternatywą jest bromodeoksyurydyna (ang. bromodeoxyuridine, BrdU) syntetyczny analog nukleozydu tymidyny. Pomiaru dokonuje się za pomocą specyficznego przeciwciała sprzężonego z enzymem oraz reakcji enzymatycznej powyższego enzymu z chromogennym substratem pozwalającym na kolorymetryczną analizę. Stosuje się także przeciwciało sprzężone z fluorochromem, a analizuje się komórki za pomocą cytometru przepływowego.**

Zastosowanie CFDA-SE do badania proliferacji

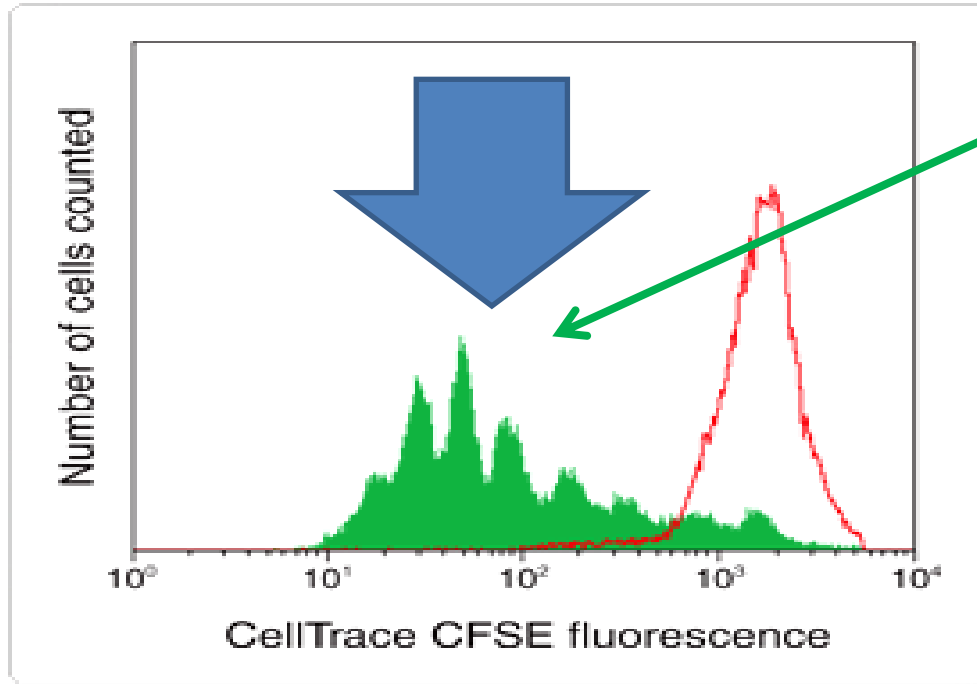


- CFDA-SE carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (lipofilowy o słabej fluorescencji)
- CFSE carboxyfluorescein succinimidyl ester (emituje silną fluorescencję)

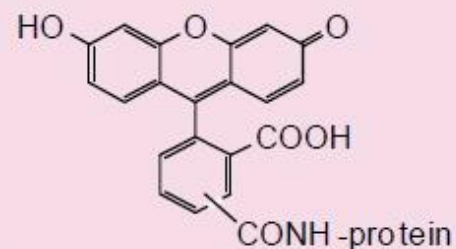
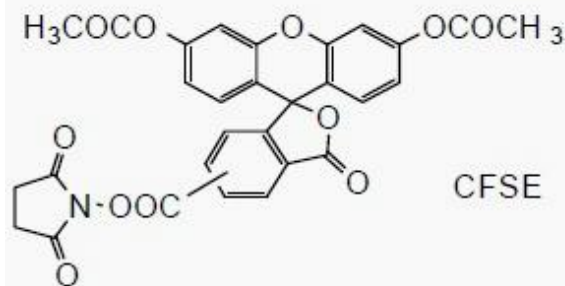
Komentarz do slajdu nr 38:

CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) jest cząsteczką lipofilową o bardzo słabym poziomie fluorescencji. W żywej komórce esterazy odcinają grupy acetylowe i cząsteczka zaczyna emitować fluorescencję pod wpływem światła. Pozostaje ester CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester), który kowalencyjnie wiąże się z białkami i trwale utrzymuje się w komórce.

Analiza proliferacji c.d.



Emisja fluorescencji przez limfocyty dzielące się jest mniejsza od początkowej.



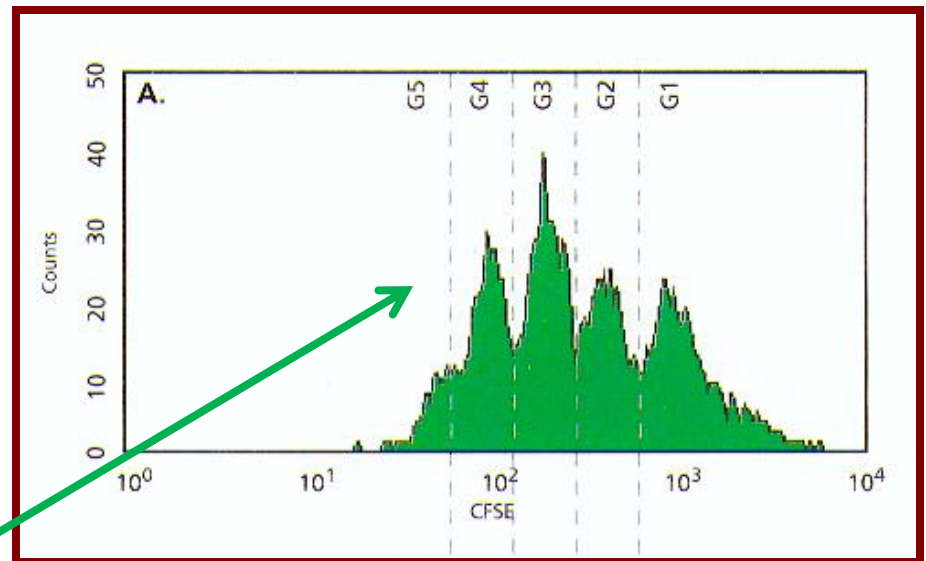
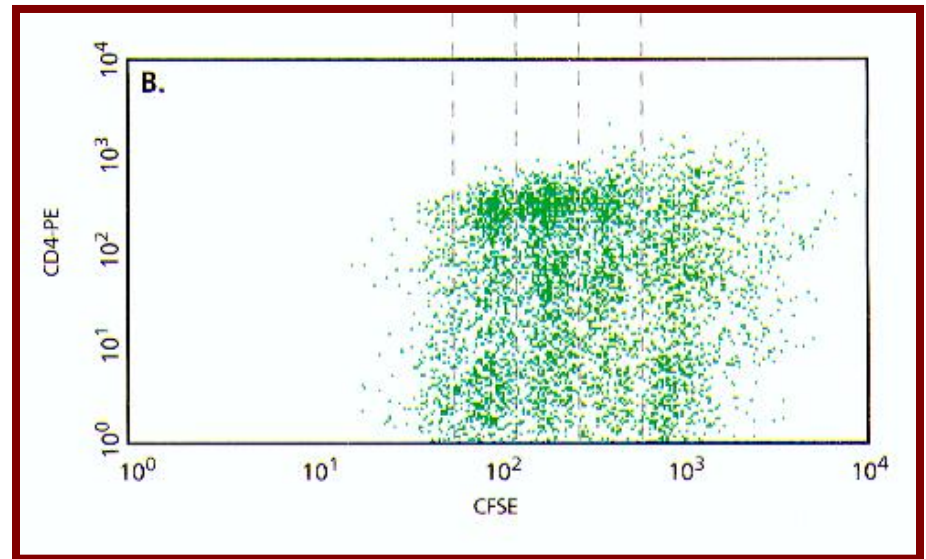
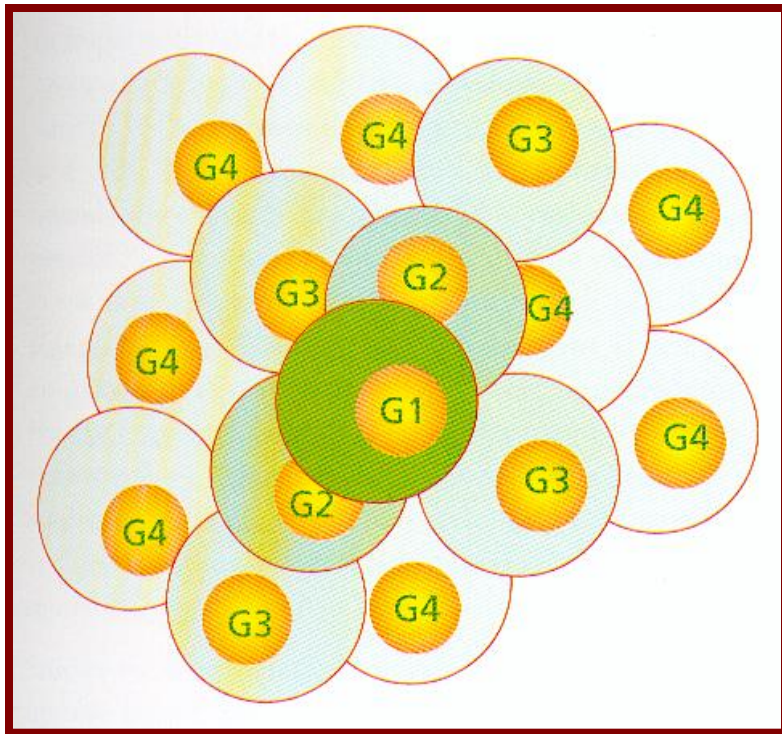
protein-conjugated
fluorescein
green fluorescence

viable cell

Komentarz do slajdów nr 42 i 43:

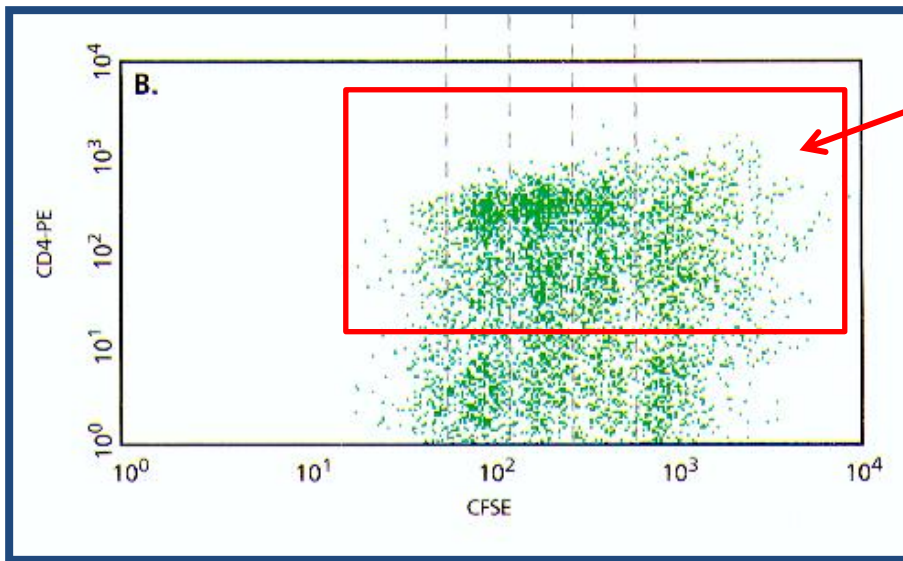
Opisana metoda badania proliferacji umożliwia określenie liczby kolejnych podziałów, a dodatkowe wyznakowanie charakterystycznych markerów limfocytów (na slajdzie CD4) umożliwia analizę wybranej populacji (CD4+, CD8+).

Test CFSE



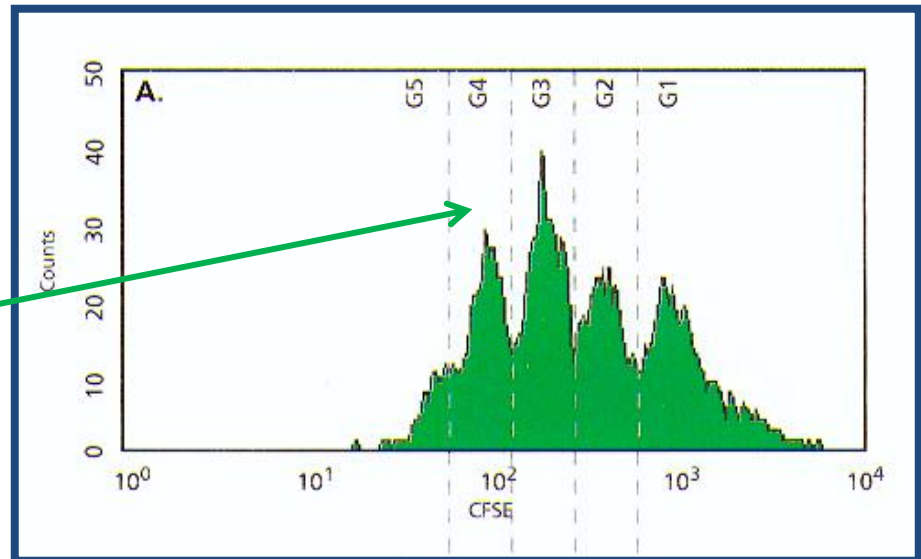
Widoczne kolejne rundy podziałów
G2, G3, G4 itd

Analiza proliferacji limfocytów Th



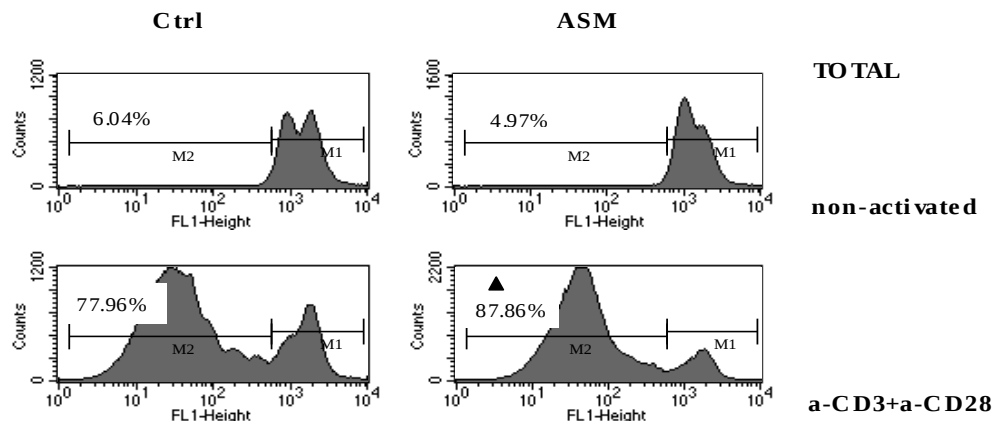
Prostokątem zaznaczono limfocyty T CD4+

Widoczne kolejne rundy podziałów G2, G3, G4 itd. W populacji limfocytów T CD4+

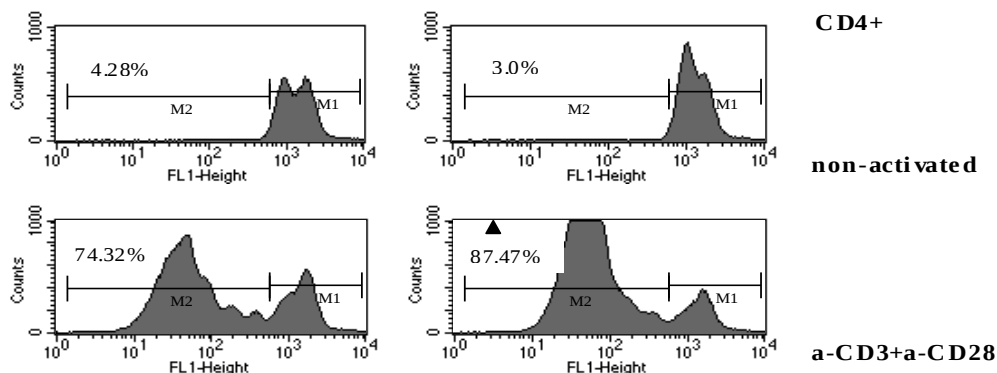


Aktywacja limfocytów T z węzła chłonnego

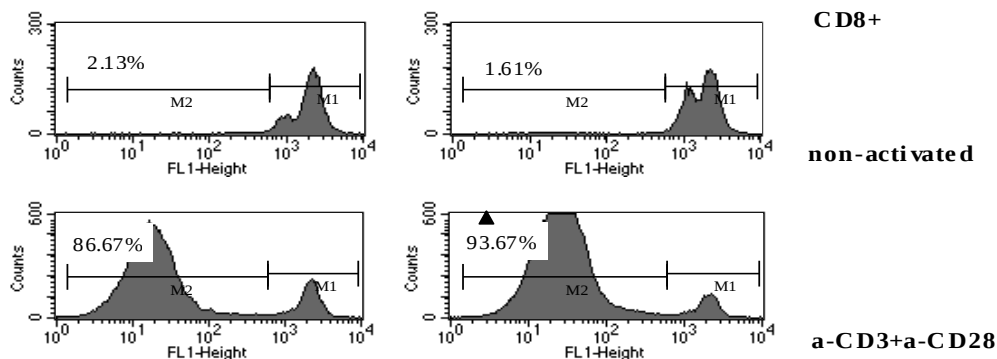
A



B



C



CFSE

Przykład określenia odsetka
limfocytów proliferujących w
hodowli aktywowanej
przeciwciałami anti-CD3 + anti
CD28:

A/ w odniesieniu do całej
populacji limfocytów

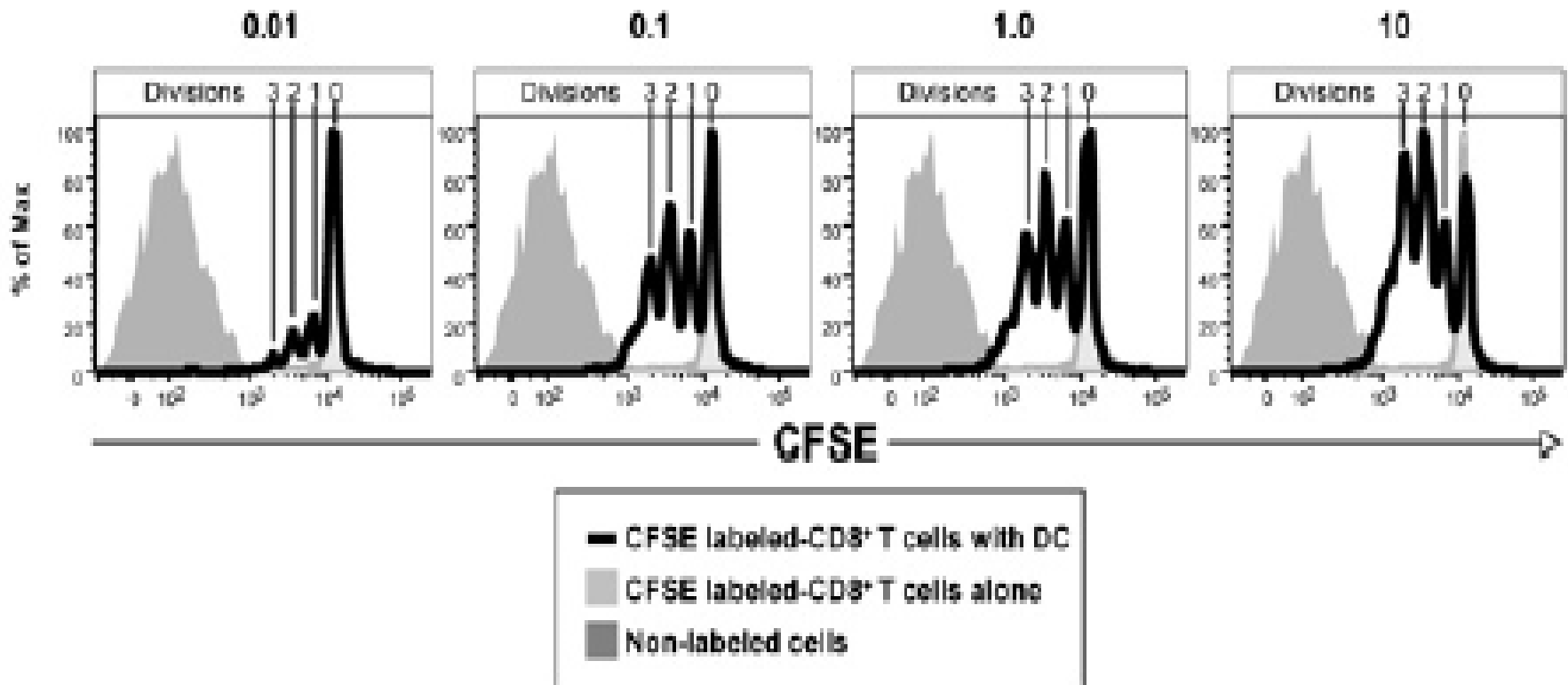
B/ w populacji limfocytów T CD4+

C/ w populacji limfocytów T CD8+

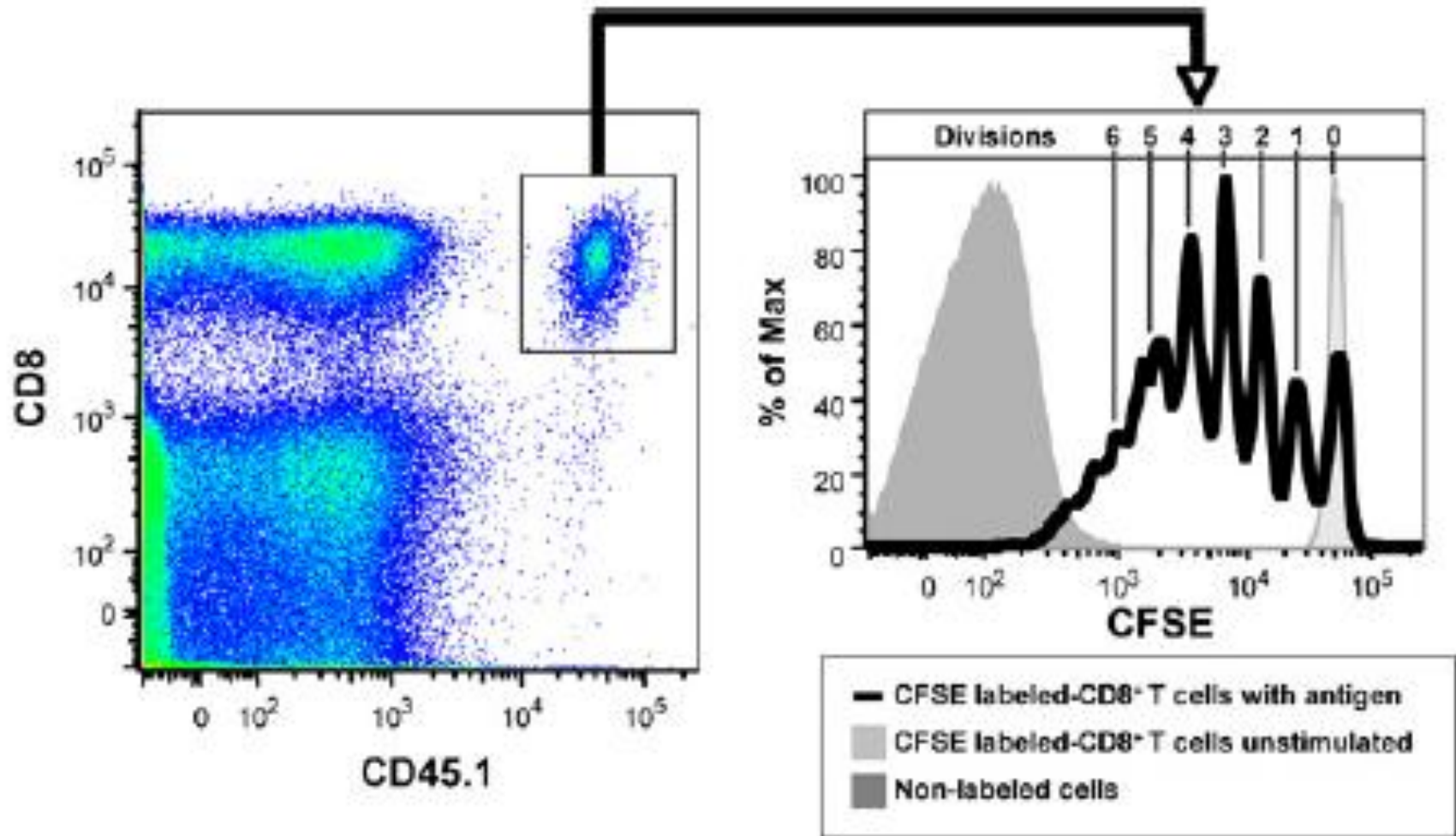
Aktywacja Ag-swoista limfocytów T

Do hodowli dodano zwiększające się stężenia roztworu owoalbuminy. Widoczne są trzy rundy podziałowe i zwiększające się liczby limfocytów T po każdym podziale zależnie od stężenia antygeny w podłożu.

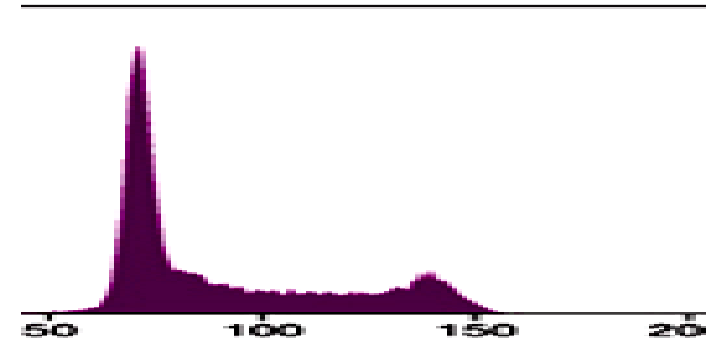
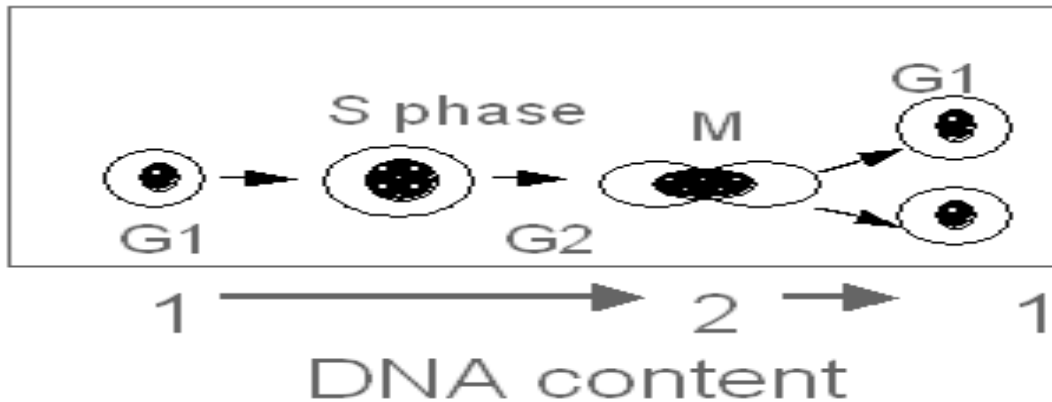
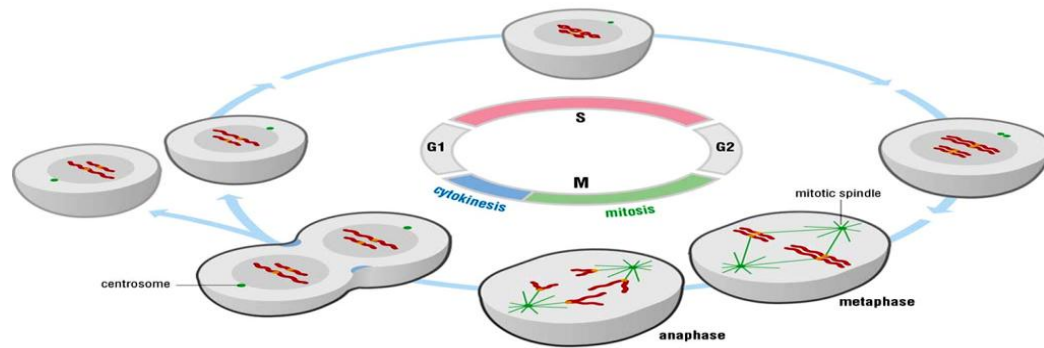
OVA ($\mu\text{g/ml}$)-pulsed DC



Aktywacja Ag-swoista limfocytów T po adoptywnym transferze do biorcy allogenicznego

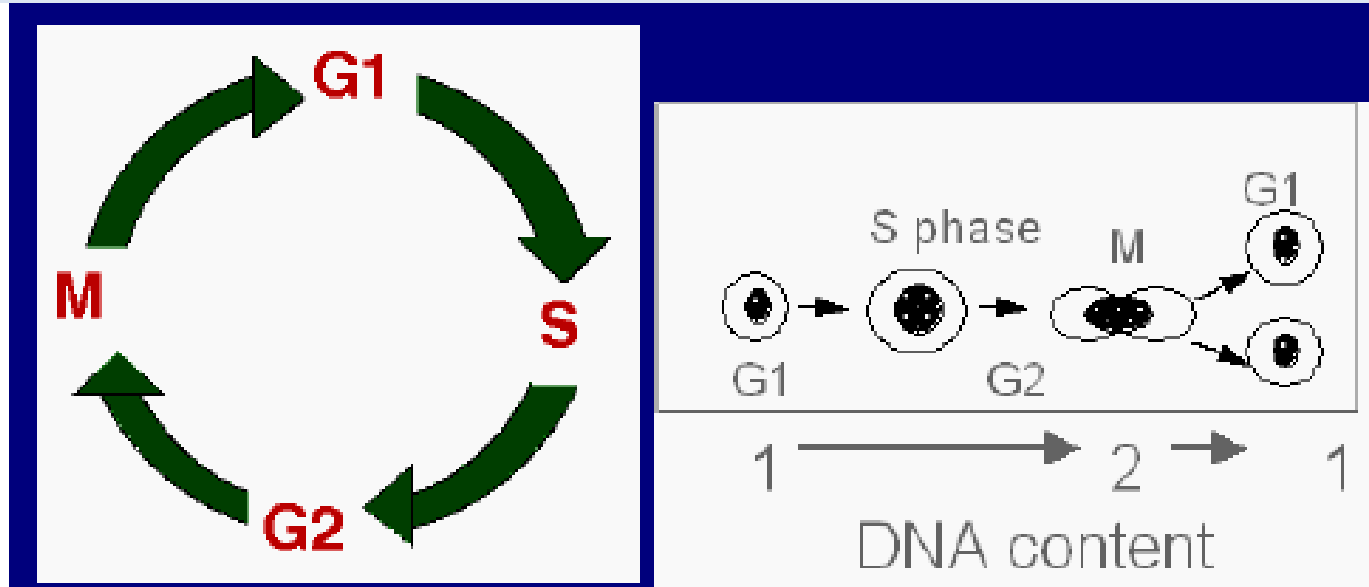


Analiza cyklu komórkowego



Do badania cyklu komórkowego techniką cytometrii przepływowej służą fluorochromy, które wiążą się z DNA i emitują fluorescencję, której intensywność jest proporcjonalna do zawartości DNA.

Oznaczanie zawartości DNA



DAPI, PI, 7-AAD bezpośrednio łączą się z DNA

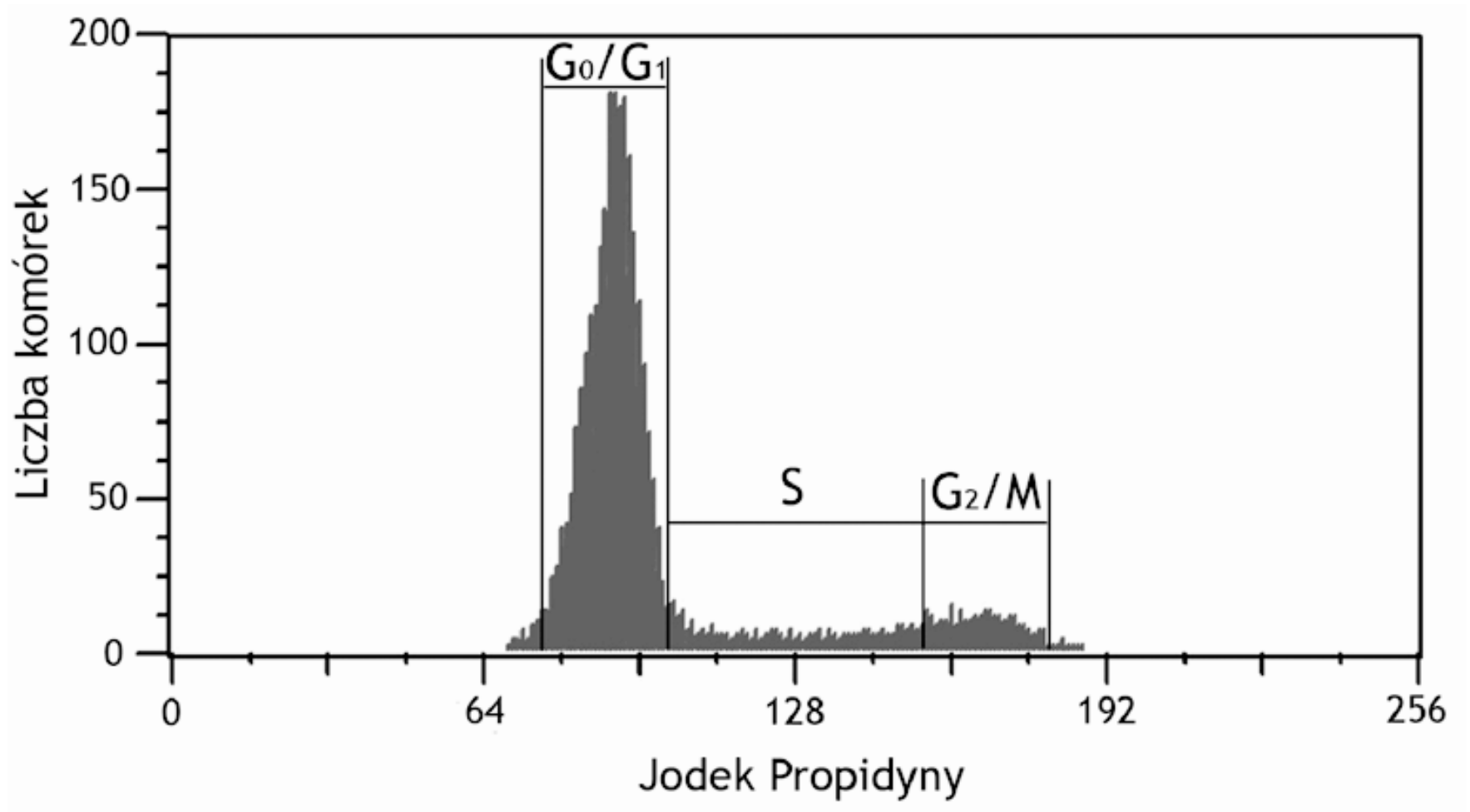
DAPI (4',6-diamidyno-2-fenyloindol) –przenika przez błony żywych i utrwalonych komórek, fluorescencja wzbudzana przez UV.

PI (jodek propidyny) – nieprzepuszczalny dla błon żywych komórek (w komórkach roślinnych znakuje ścianę komórkową), wzbudzenie fluorescencji 535 nm/617 nm

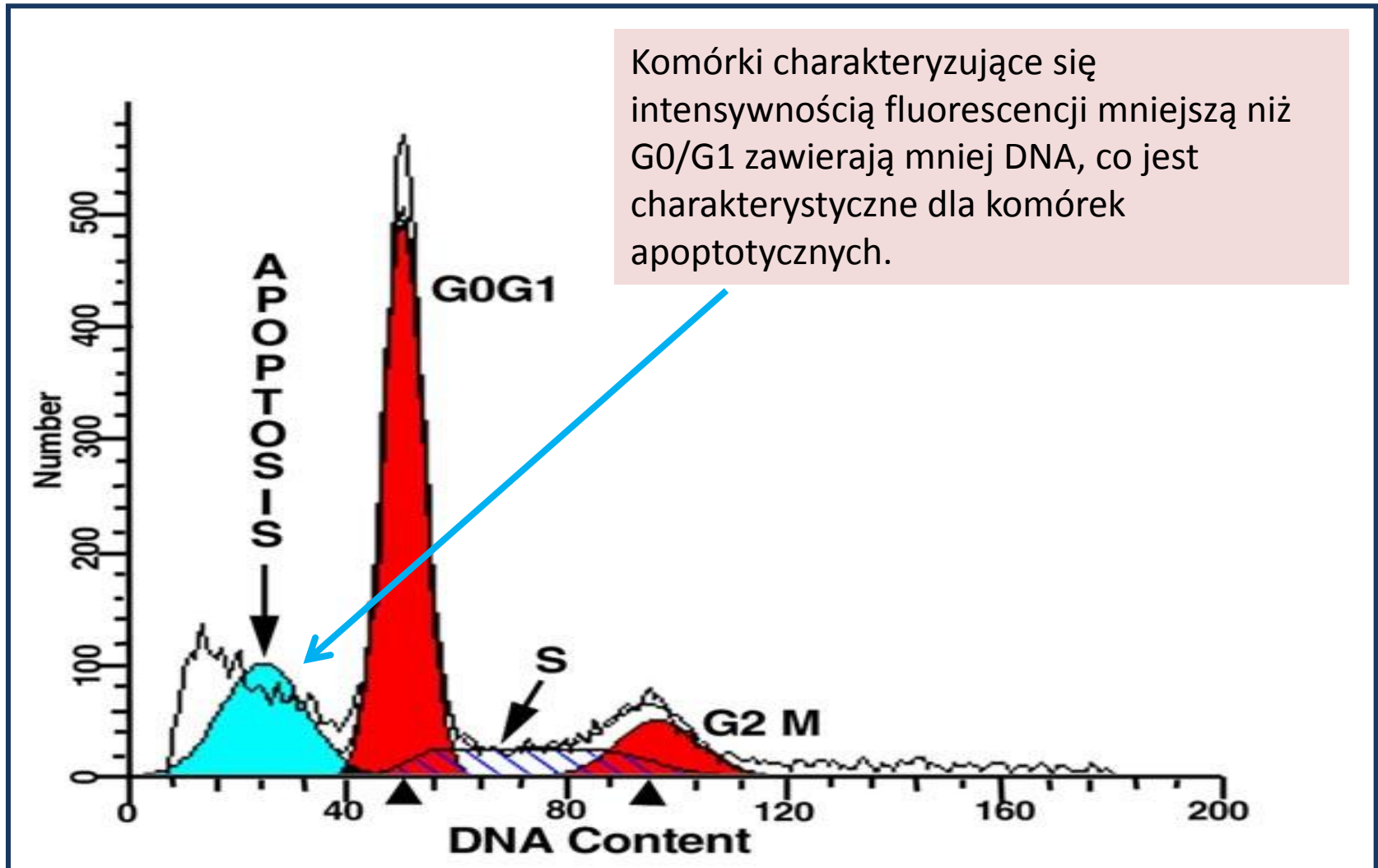
7-AAD, (7-aminoactinomycin D), duże powinowactwo do regionów GC, nie przenika przez błony żywych komórek, wzbudzenie fluorescencji 546 nm/647 nm

Hoechst – bis-benzimidazole, przenika przez nienaruszone błony komórek, UV, 345 nm/ 485 nm

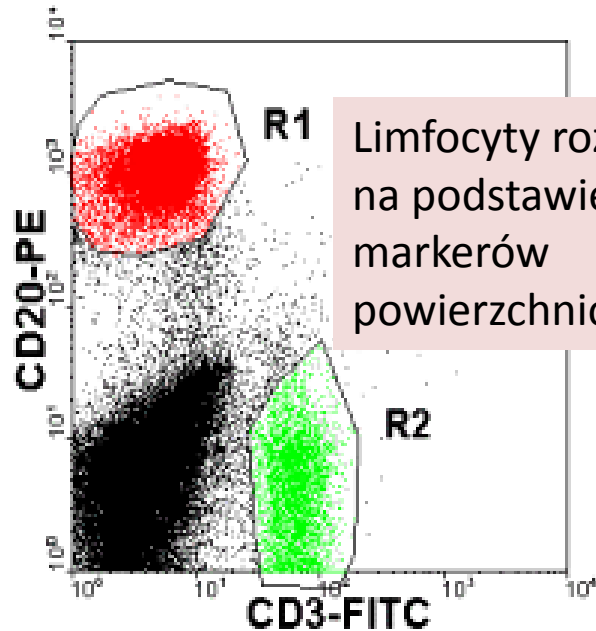
Analiza cyklu komórkowego



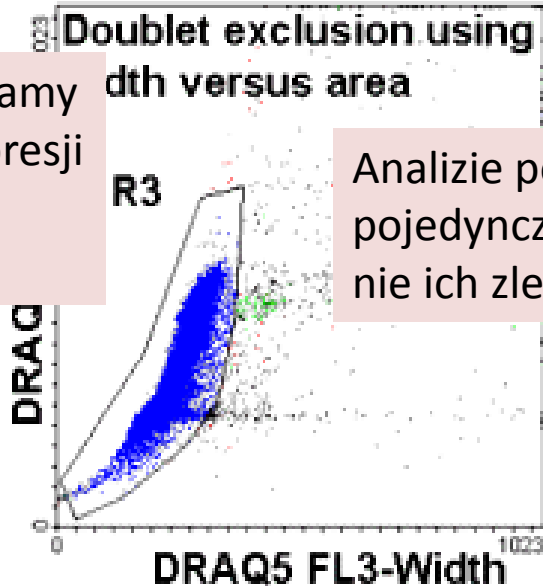
Analiza cyklu komórkowego



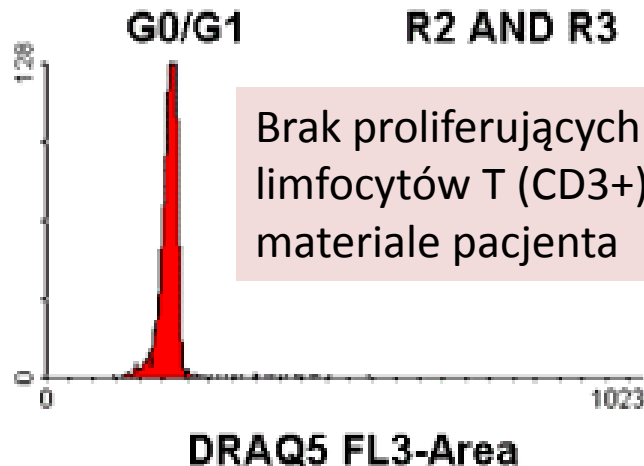
Analiza cyklu komórkowego



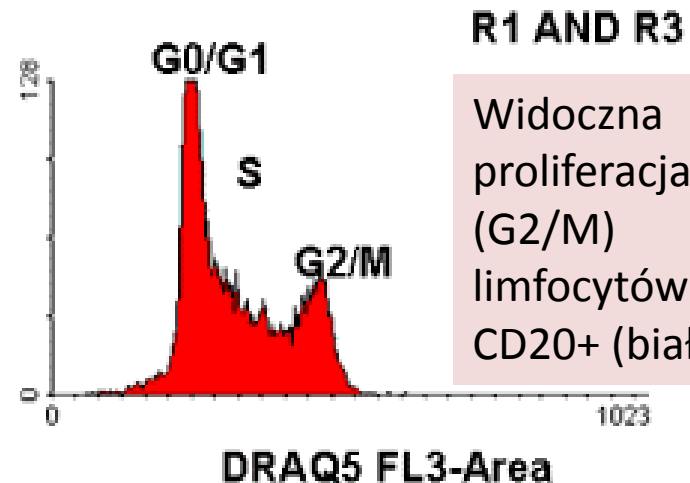
Limfocyty rozróżniamy na podstawie ekspresji markerów powierzchniowych



Analizie poddajemy pojedyncze komórki a nie ich zlepy (dublety)

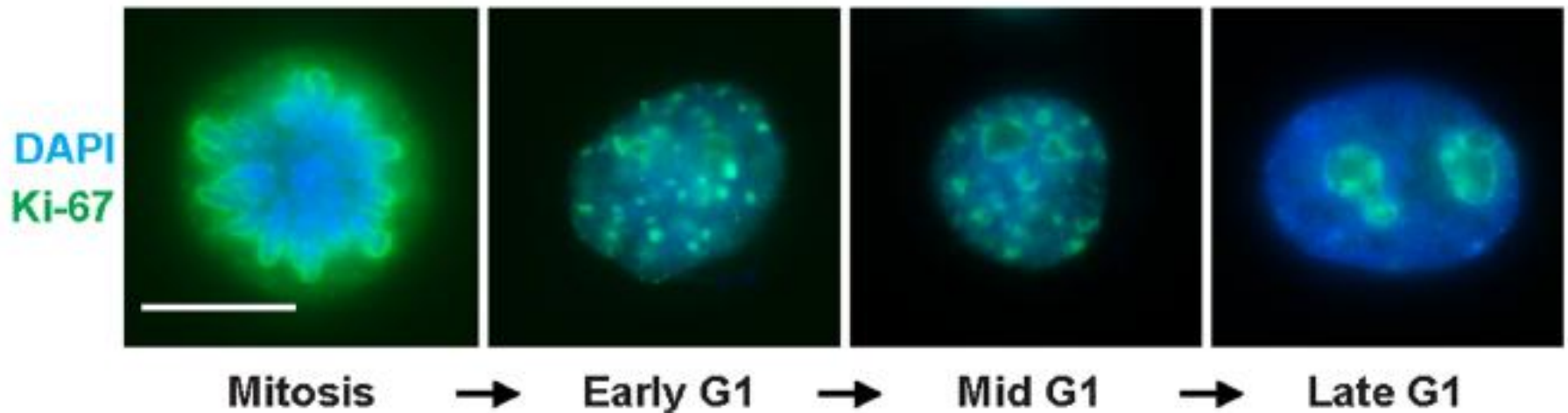


Brak proliferujących limfocytów T (CD3+) w materiale pacjenta



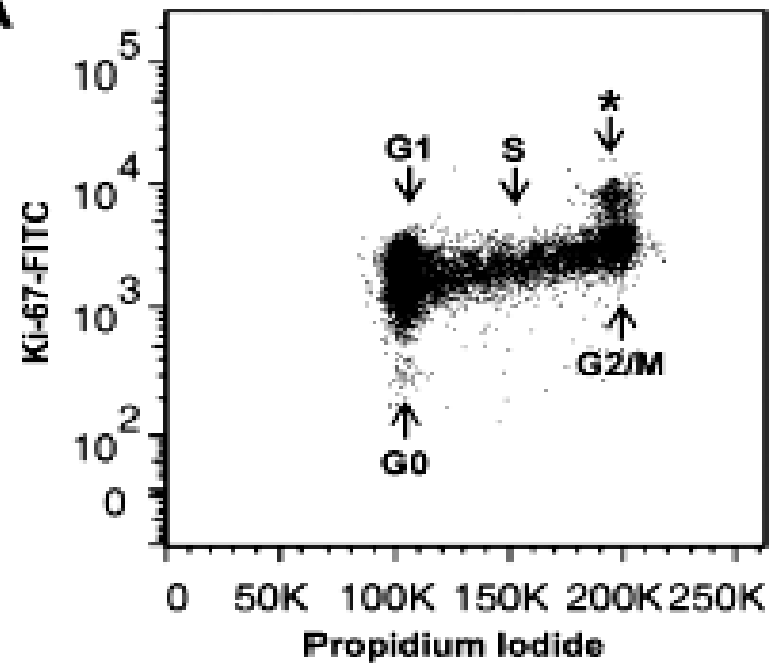
Widoczna proliferacja (G2/M) limfocytów B CD20+ (białaczka)

Ki-67 marker proliferacji



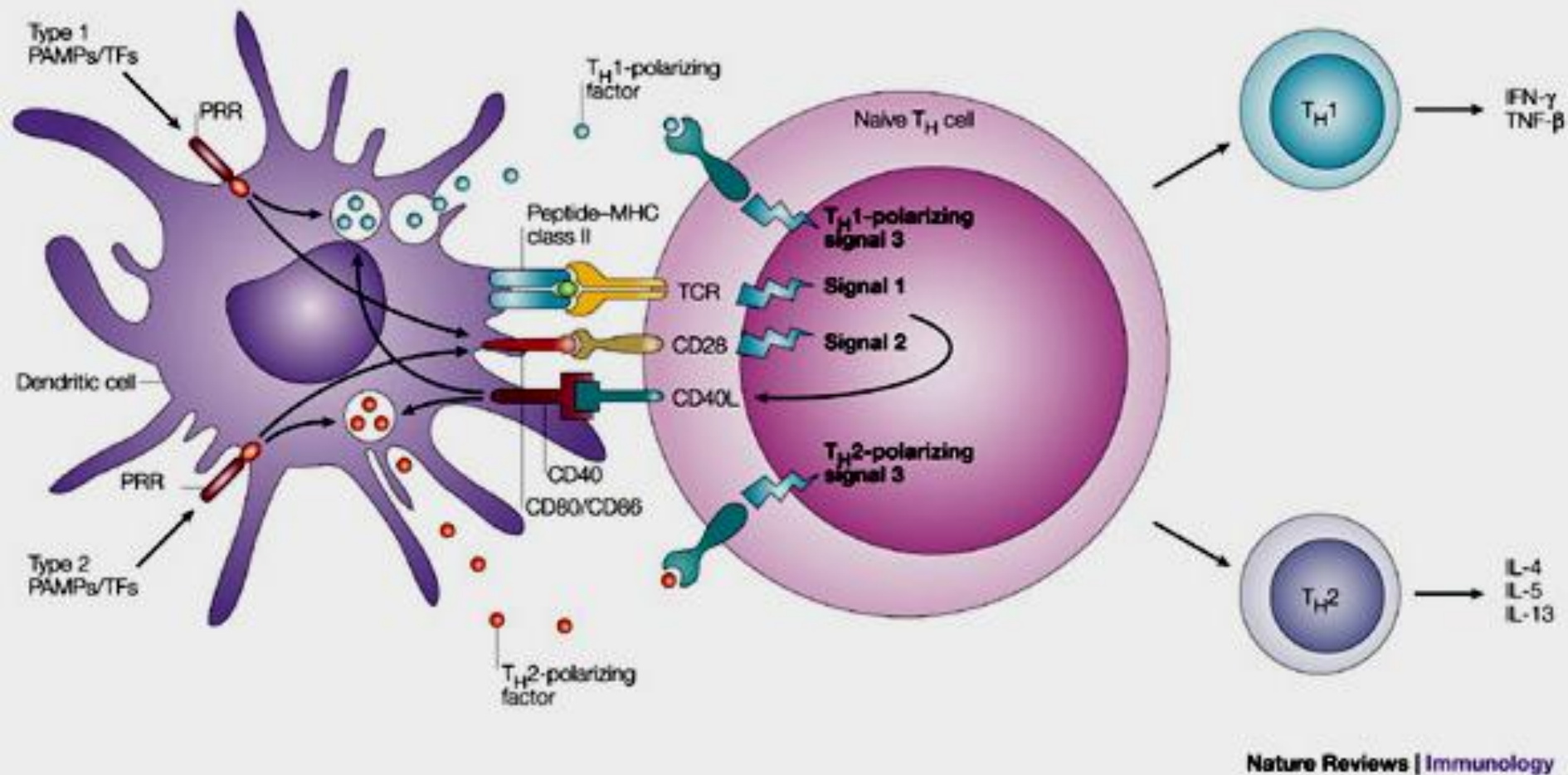
Białko Ki-67 (antygen jądrowy) niewykrywalne jedynie w fazie G0 cyklu komórkowego, a największa ekspresja występuje w komórkach w fazie G2/M

A



Różnicowanie efektorowych limfocytów T

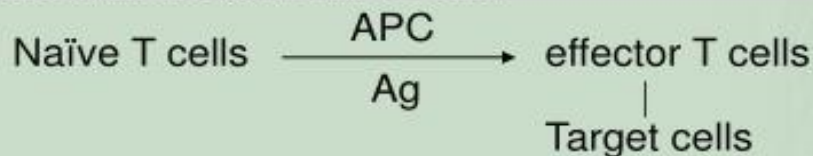
Polaryzacja immunologiczna: różnicowanie aktywowanych naiwnych limfocytów w populację limfocytów efektorowych pełniących różne funkcje odpornościowe



Różnicowanie aktywowanych naiwnych limfocytów T w limfocyty T efektorowe

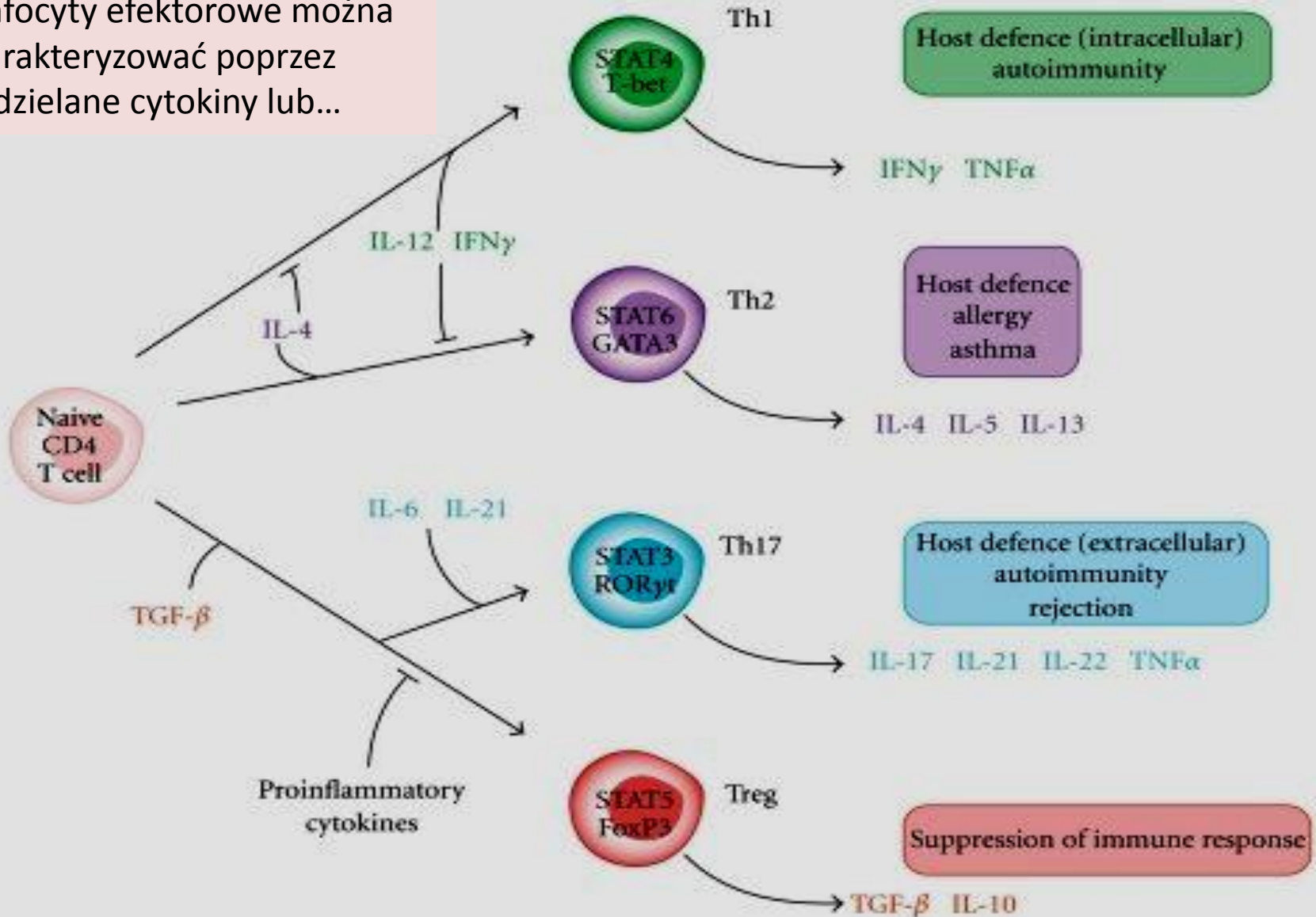
effector T cells					
	CD8 cytotoxic T cells	CD4 T _H 1 cells	CD4 T _H 2 cells	CD4 T _H 17 cells	CD4 regulatory T cells (various types)
Types of effector T cell					
Main functions in adaptive immune response	Kill virus-infected cells	Activate infected macrophages Provide help to B cells for antibody production	Provide help to B cells for antibody production, especially switching to IgE	Enhance neutrophil response	Suppress T-cell responses
Pathogens targeted	Viruses (e.g. influenza, rabies, vaccinia) Some intracellular bacteria	Microbes that persist in macrophage vesicles (e.g. mycobacteria, <i>Listeria</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Pneumocystis carinii</i>) Extracellular bacteria	Helminth parasites	Extracellular bacteria (e.g. <i>Salmonella enterica</i>)	

Figure 8-1 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

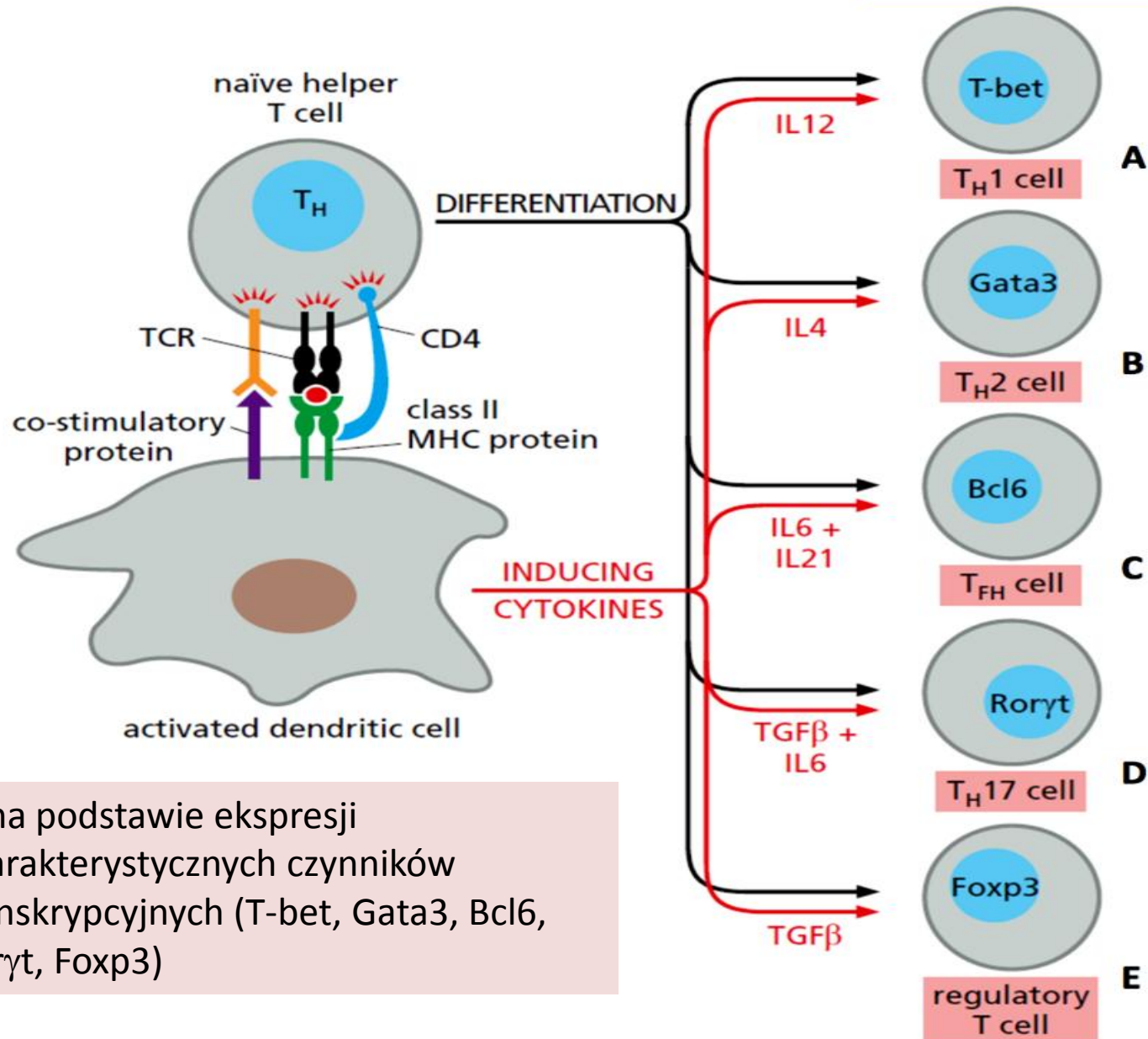


Cechy limfocytów T efektorowych

Limfocyty efektorowe można charakteryzować poprzez wydzielane cytokiny lub...

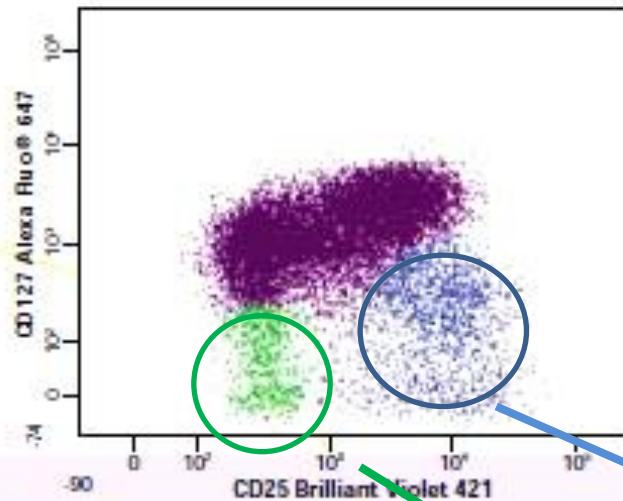


Cechy limfocytów T efektorowych



....na podstawie ekspresji charakterystycznych czynników transkrypcyjnych (T-bet, Gata3, Bcl6, Ror γ t, Foxp3)

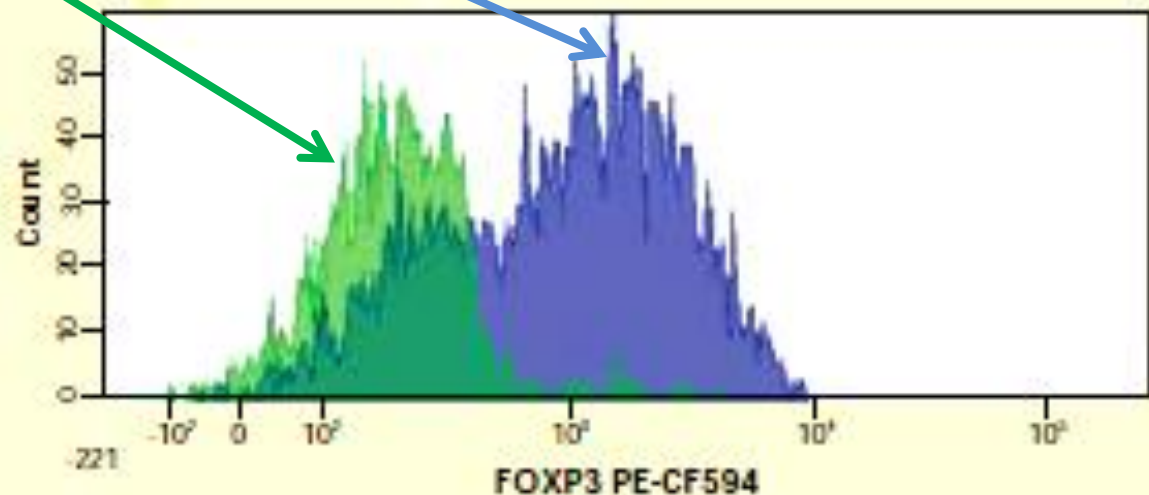
Wykrywanie czynników transkrypcyjnych



Charakterystyczny czynnik transkrypcyjny jest głównym markerem identyfikującym efektorowe populacje limfocytów T przy braku specyficznych markerów powierzchniowych: przykład identyfikacji limfocytów T regulatorowych na podstawie ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3. Wykrywanie czynnika transkrypcyjnego wymaga permeabilizacji błony, co umożliwia następnie wnikięcie specyficznego przeciwciała monoklonalnego sprzężonego z fluorochromem. Znakowanie komórek przeciwciałami przeciwko markerom błonowym umożliwia charakterystykę fenotypową limfocytów Treg.

CD25^{low}CD127⁻Foxp3⁻

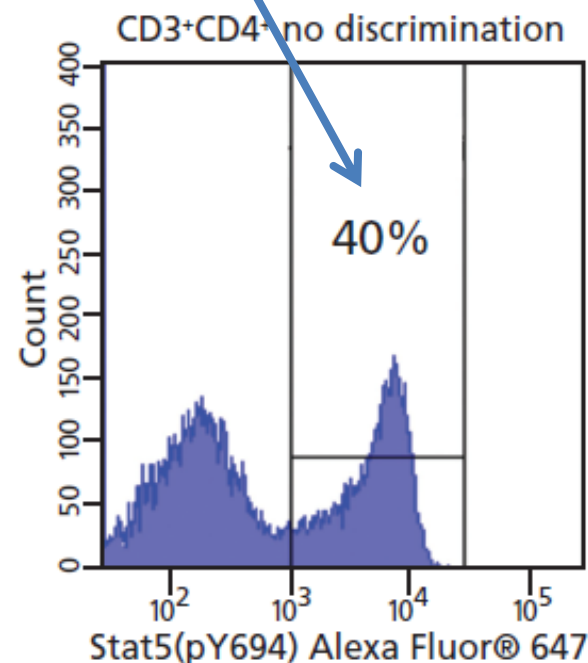
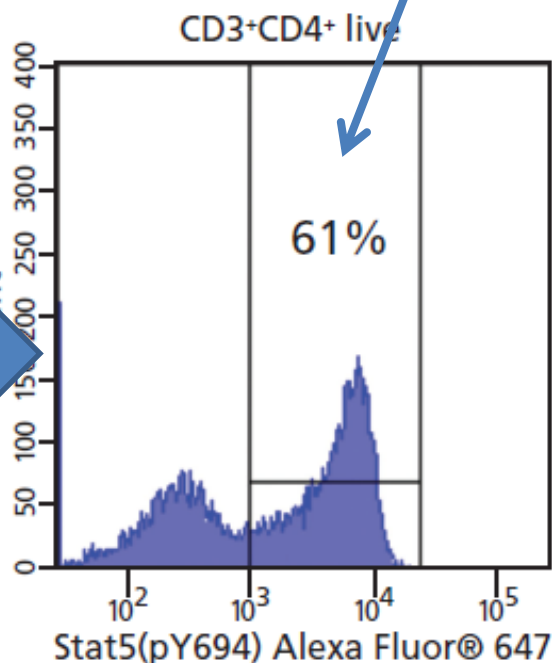
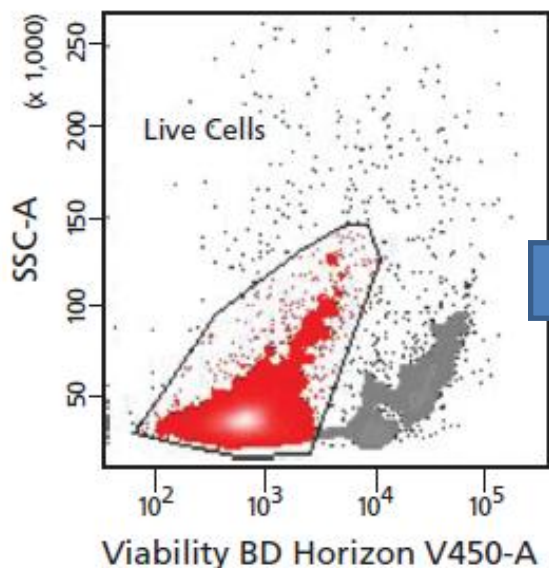
CD25^{high}CD127^{low}Foxp3⁺ (Treg)



Wykrywanie czynników transkrypcyjnych w żywych komórkach

Odsetek komórek STAT5+ w odniesieniu do żywych komórek i wszystkich komórek w próbce

Martwe – intensywność świecenia 10-20x większa od żywych



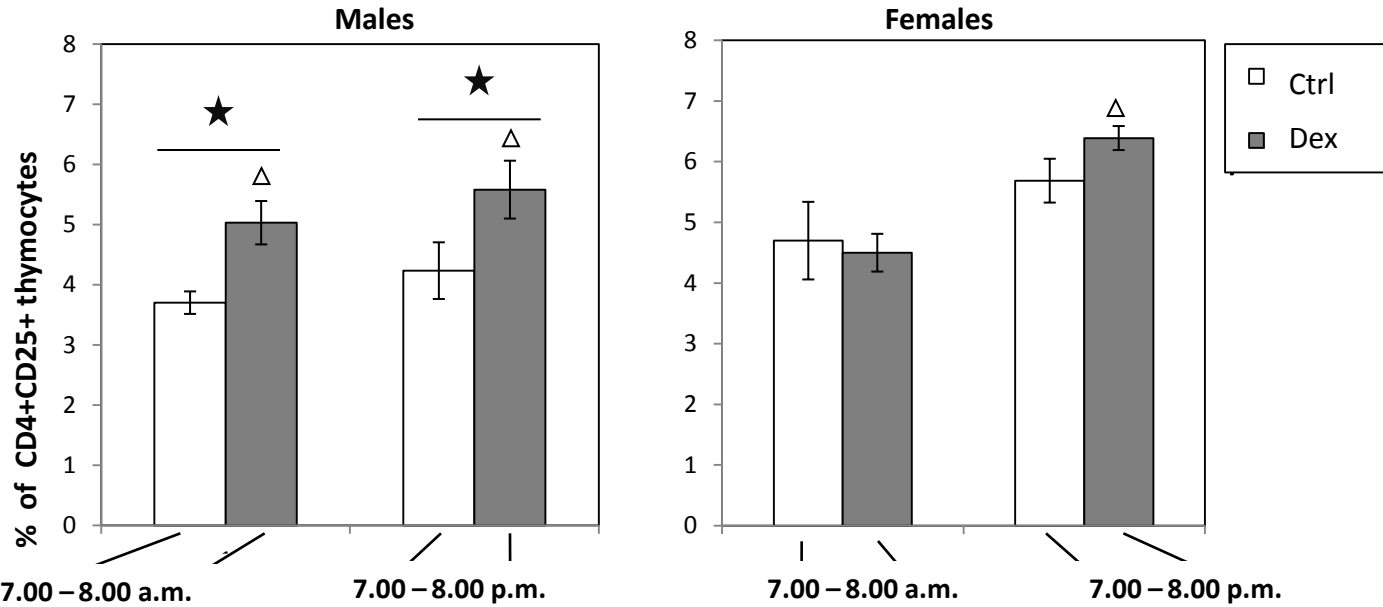
FVS450, FVS510 – laser fioletowy
FVS520 - laser niebieski
FVS570 – laser żółtozielony i niebieski
FVS660, FVS700 – laser czerwony

Barwniki polimerowe wnikają do wszystkich komórek. Emitowana przez nie fluorescencja wykazuje różną intensywność w komórkach martwych (duża intensywność fluorescencji) i żywych (mała intensywność fluorescencji). Permeabilizację komórek i znakowanie przeciwciałem specyficznym dla białka STAT5 wykonuje się w kolejnym etapie.

Wykrywanie Foxp3 w rozwoju tTreg w grasicy

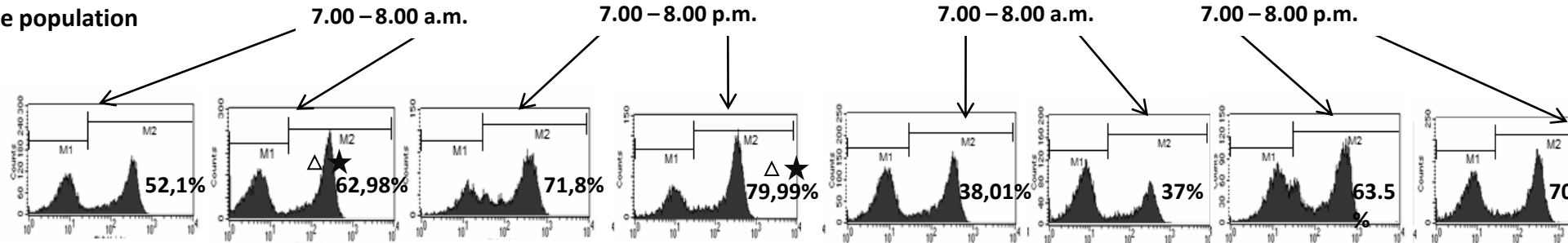
A

CD4+CD25+ cells in SP
CD4+CD8- thymocyte
subset



B

cells in CD4+CD25+
e population



Foxp3+ thymocytes

- Δ Statistically significant differences after Dex treatment
- ★ Sex-dependent statistically significant differences

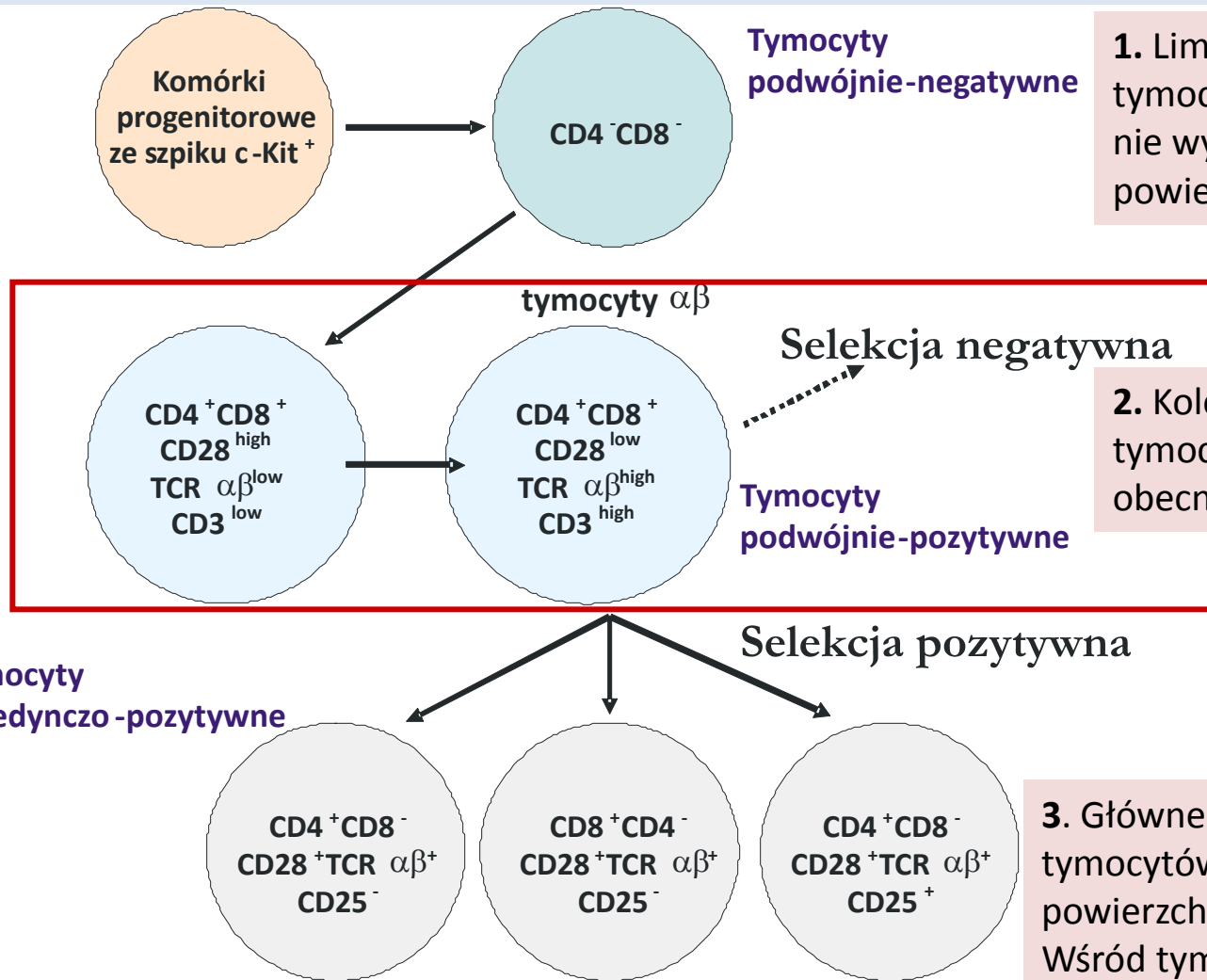
Deksametazon (Dex), syntetyczny glukokortykoid, indukuje syntezę Foxp3.
Działanie Dex jest zależne od pory dnia i płci.

Rozwój limfocytów T w grasicy

W grasicy powstają limfocyty T, które gdy przejdą wszystkie etapy rozwoju i osiągną dojrzałość migrują do obwodowych narządów limfoidalnych gdzie stanowią populację naiwnych limfocytów T o różnorodnej specyficzności receptorów dla antygeny. To właśnie naiwne limfocyty T ulegają aktywacji przez antygeny prezentowane w kompleksach MHC/peptyd przez komórki dendrytyczne. Skutkiem aktywacji jest, jak przedstawiono na poprzednich slajdach, ekspansja klonalna antygenowo-swoistych limfocytów T i ich różnicowanie w limfocyty T efektorowe.

Rozwój limfocytów T w grasicy można śledzić na podstawie ekspresji markerów powierzchniowych takich jak CD4, CD8, TCR, CD3 czy CD28 co przedstawiono na kolejnych slajdach.

Schemat rozwoju limfocytów T w grasicy



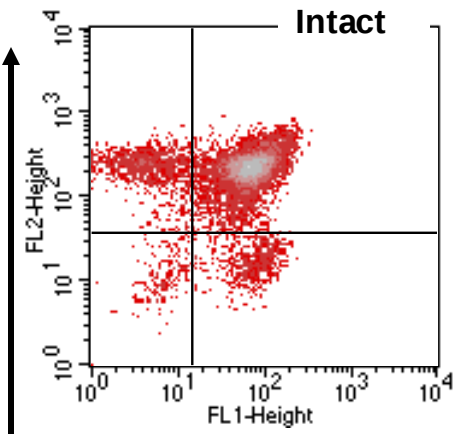
1. Limfocyty T w grasicy nazywamy tymocytami. Niedojrzałe tymocyty nie wykazują obecności białek powierzchniowych CD4 i CD8

2. Kolejne stadium rozwoju tymocytów charakteryzuje się obecnością zarówno CD4 jak i CD8.

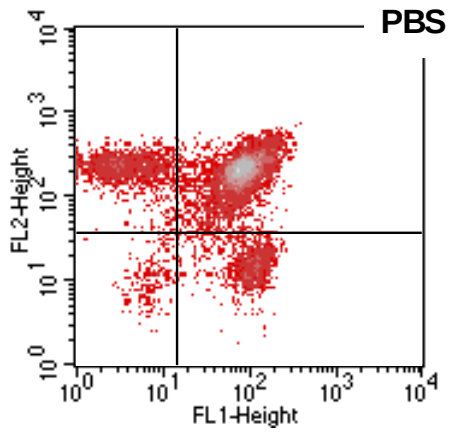
3. Główne dojrzałe populacje tymocytów wykazują ekspresję białek powierzchniowych CD4 lub CD8. Wśród tymocytów CD4+ wyróżnia się tymocyty CD4+CD25⁻ (limfocyty T helperowe) i CD4+CD25⁺ (limfocyty T regulatorowe oraz ich prekursorzy)

4. Na schemacie zaznaczono także inne markery, których poziom ekspresji zmienia się podczas rozwoju tymocytów, co pokazują następne slajdy (64, 65, 66).

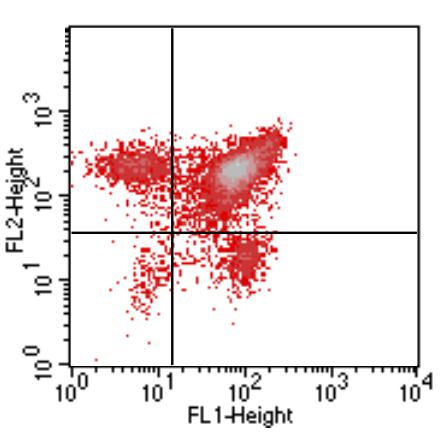
CD4



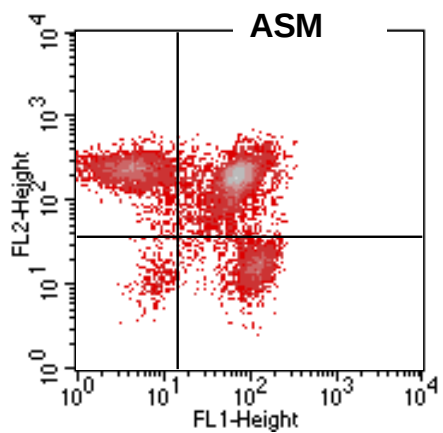
UL = 14.29%
UR = 78.02%
LL = 1.89%
LR = 5.80%



UL = 16.74%
UR = 70.10%
LL = 1.86%
LR = 11.30%



UL = 13.68%
UR = 76.24%
LL = 1.85%
LR = 8.23%

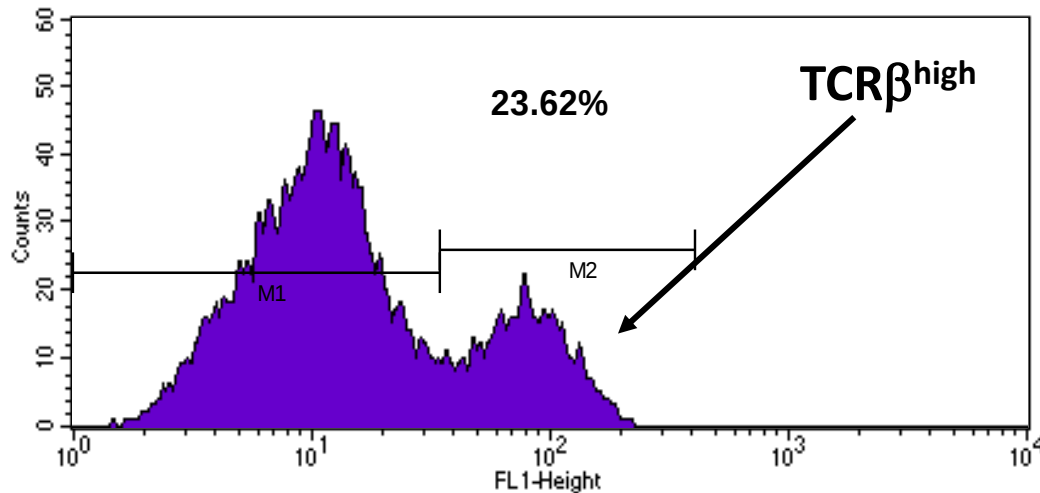


UL = 28.53%
UR = 53.90%
LL = 2.35%
LR = 15.22%

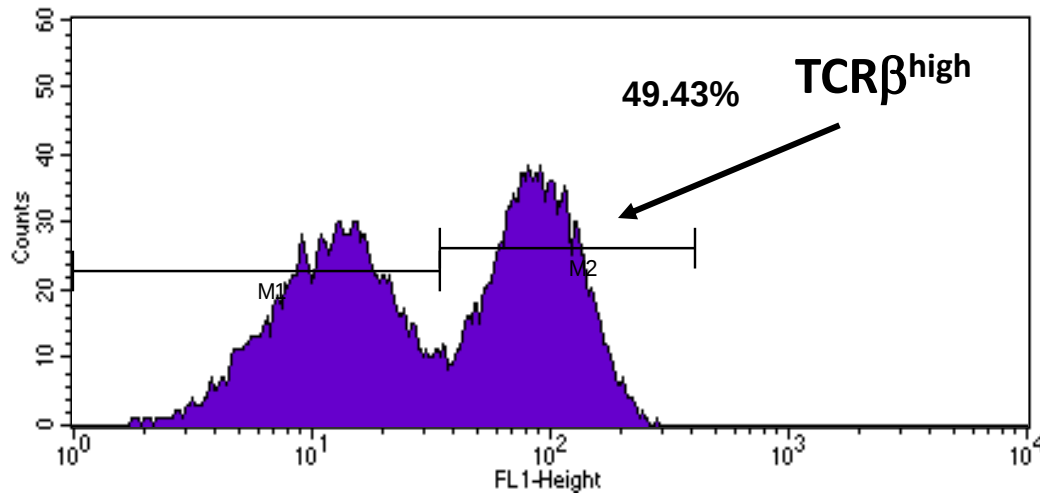
Przykładowa analiza przedstawiająca zmiany w rozwoju tymocytów na podstawie ekspresji markerów różnicowania CD4 i CD8.

CD8

TCR β ^{low} i TCR β ^{high}



W populacji wszystkich tymocytów w grasicy, w miarę ich dojrzewania, zwiększa się odsetek tymocytów z dużą ekspresją TCR $\alpha\beta$



TCR β

CD4⁺CD8⁺CD3^{low}

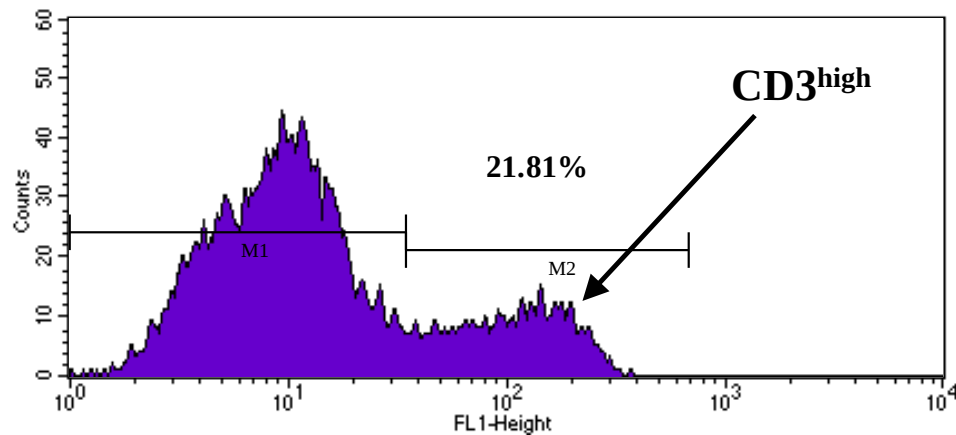
TCR β ^{low}CD28^{high}



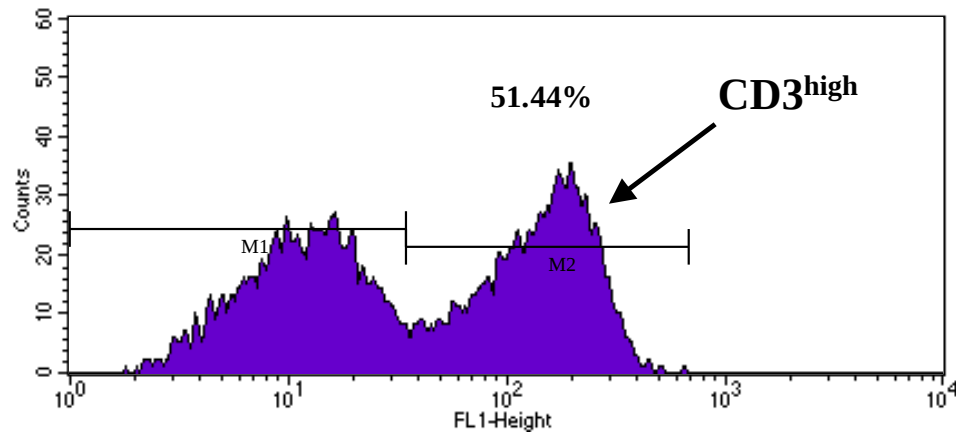
CD4⁺CD8⁺CD3^{high}

TCR β ^{high}CD28^{low}

CD3^{low} i CD3^{high}



Ctrl



ASM

CD3

W populacji wszystkich tymocytów w grasicy, w miarę ich dojrzewania, zwiększa się odsetek tymocytów z dużą ekspresją CD3 (składnik kompleksu TCR).

CD4⁺CD8⁺CD3^{low}

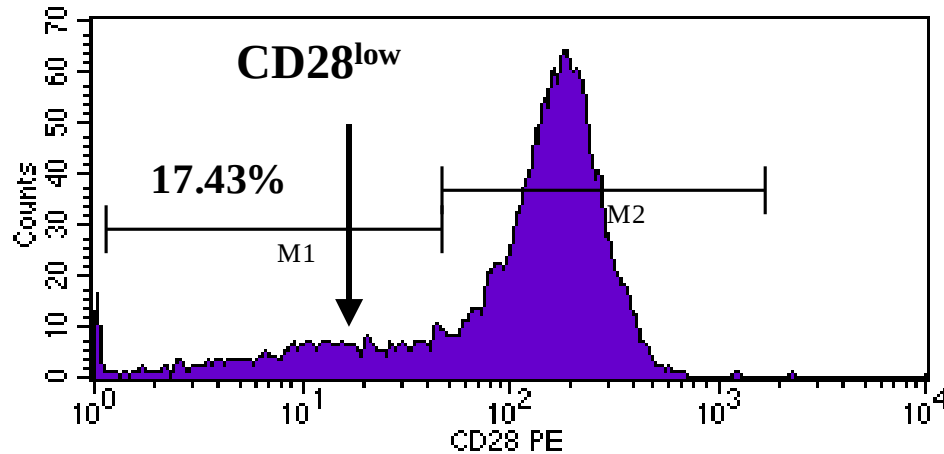
TCRβ^{low}CD28^{high}



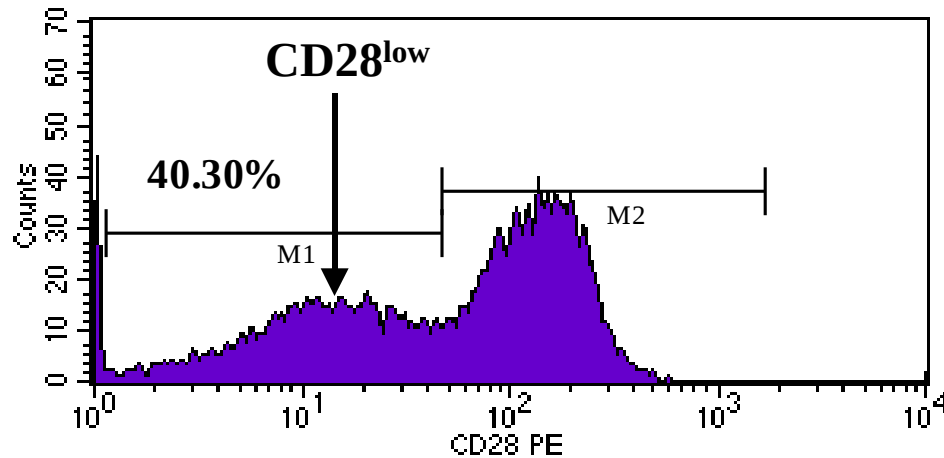
CD4⁺CD8⁺CD3^{high}

TCRβ^{high}CD28^{low}

CD28^{low} i CD28^{high}



Ctrl



ASM

CD28

W populacji wszystkich tymocytów w grasicy, w miarę ich dojrzewania, zmniejsza się ekspresja CD28, a odsetek tymocytów CD28^{high} zmniejsza się.

CD4⁺CD8⁺CD3^{low}

TCRβ^{low}CD28^{high}



CD4⁺CD8⁺CD3^{high}

TCRβ^{high}CD28^{low}

Aktywność cytotoksyczna

Testy do badania żywotności komórek

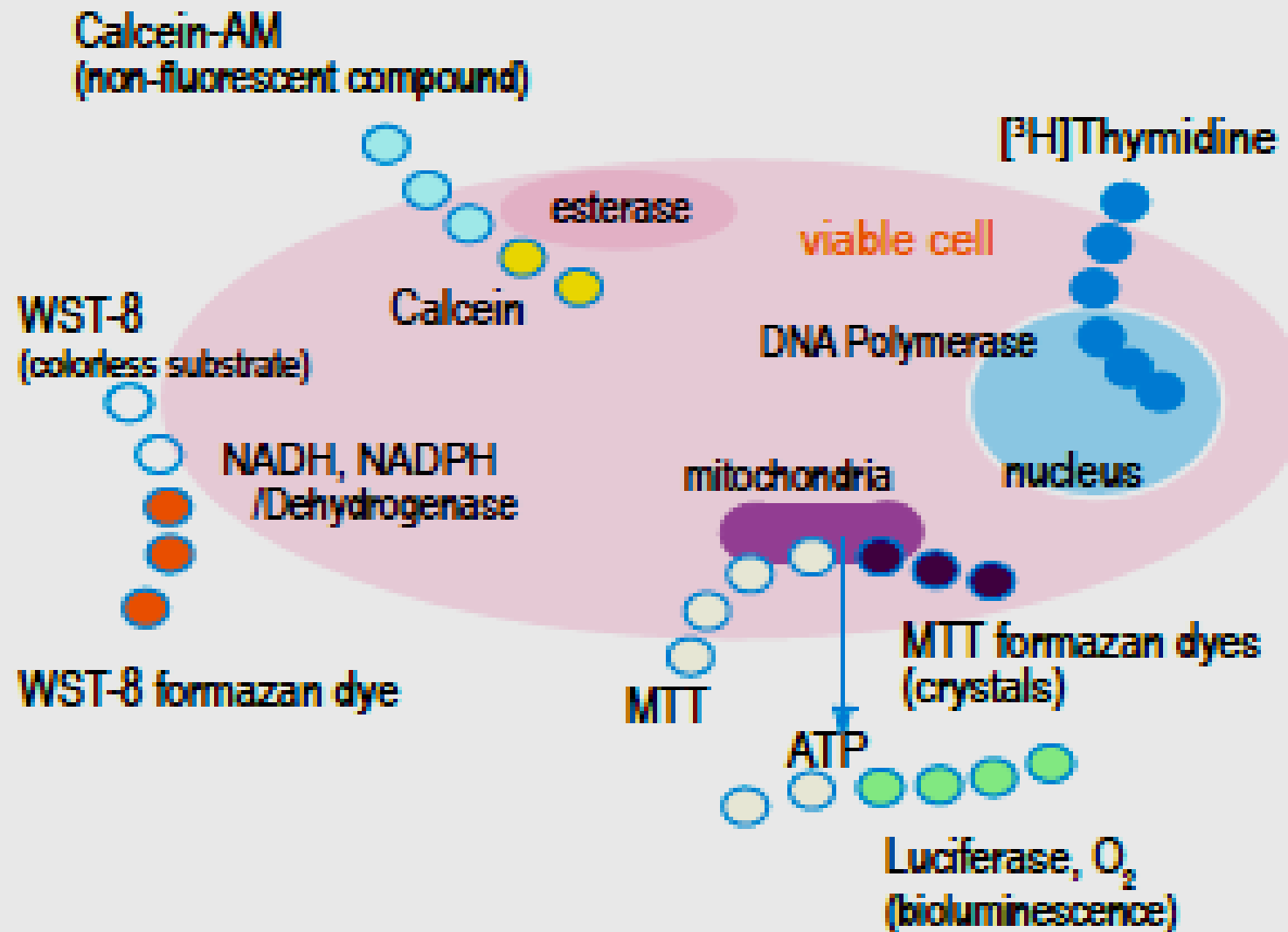


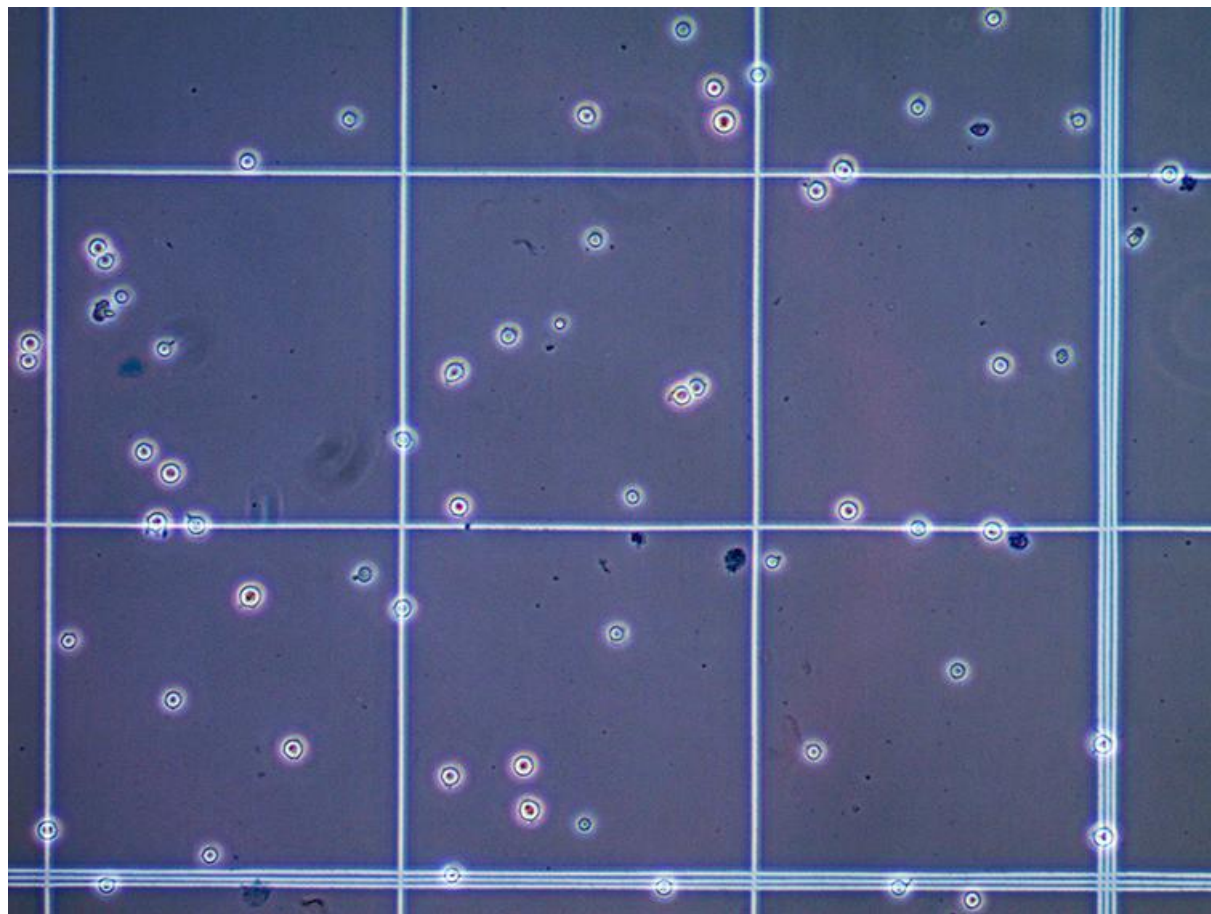
Fig. 1 Reagents for cell viability detection

Dye exclusion assays

Błękit trypanu (wnika do martwych komórek)

Czerwień obojętna (wnika do żywych komórek, barwi lizosomy)

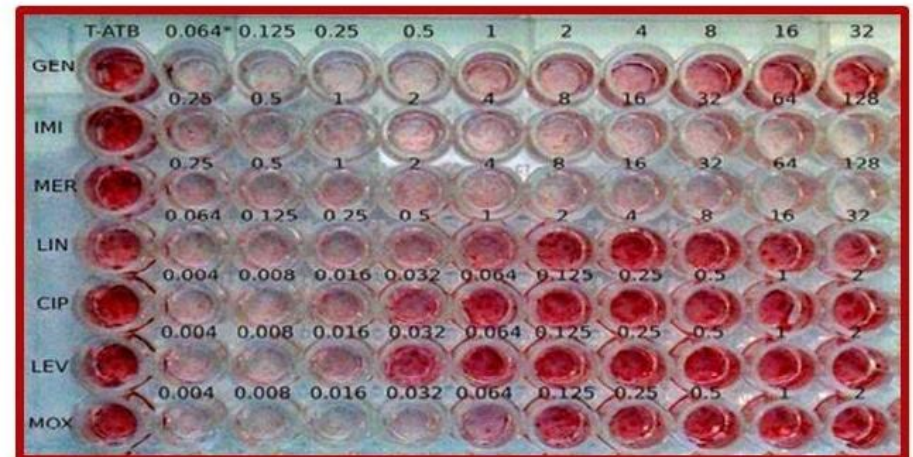
Stosowane do komórek w zawiesinach. Można stosować także do oznaczania żywotności innych komórek niż limfocyty.



Widoczne są limfocyty zabarwione błękitem trypanu na kolor niebieski (martwe) oraz zabarwione czerwienią obojętną na kolor czerwony (żywe).

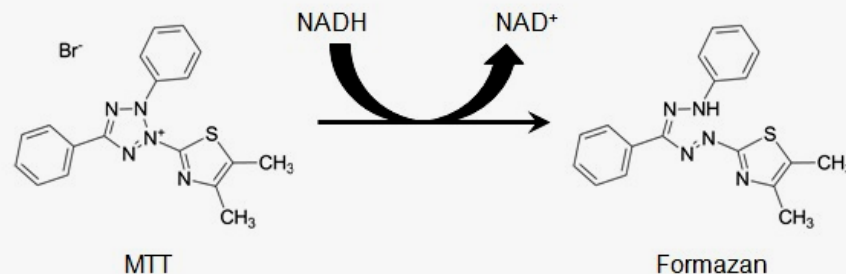
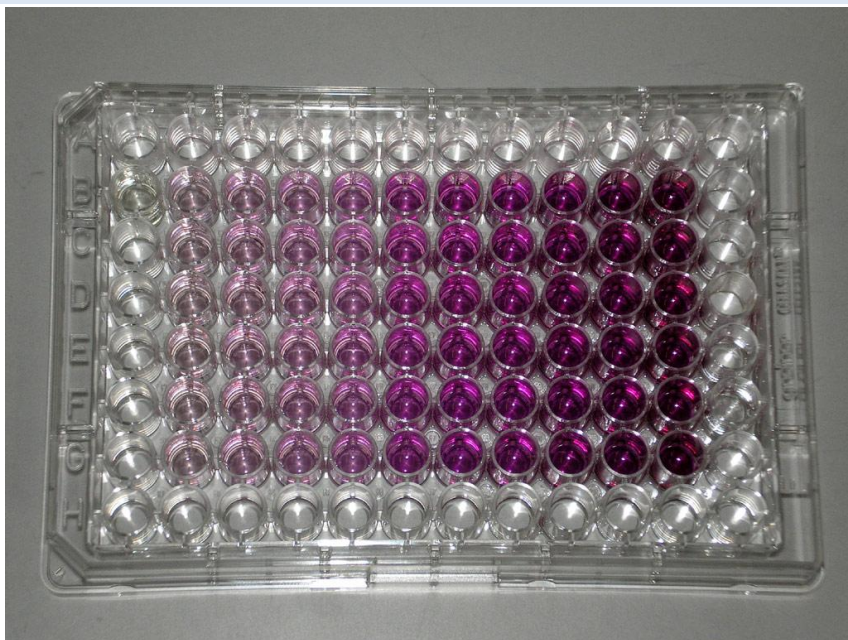
Neutral red uptake NRU

- Barwnik kationowy, przenika do komórek w drodze dyfuzji i lokalizuje się w lizosomach.
- Poddawany ekstrakcji z lizosomów za pomocą mieszaniny etanolu z kwasem, pomiar absorbancji za pomocą spektrofotometru (540 nm).
- Pobieranie barwnika zależy od gradientu pH. pH lizosomów jest mniejsze niż cytoplazmy. Gdy komórka umiera gradient pH ulega redukcji i barwnik jest usuwany.



MTT assay (redukcja MTT)_a

Metoda kolorymetryczna



3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

redukcja MTT do purpurowego formazanu (kryształy) przez oksydoreduktazę zależną od NADH

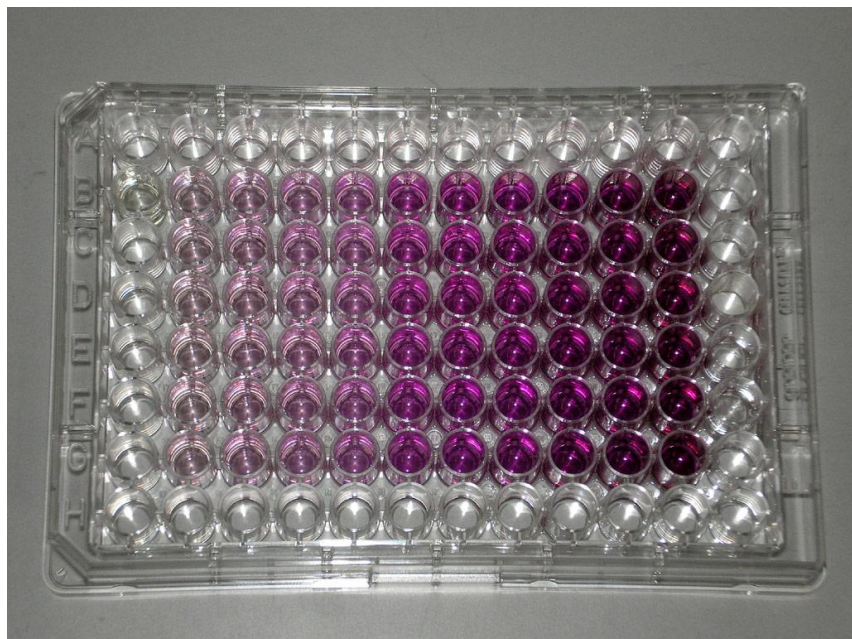
Pomiar absorbancji przy określonej długości fali (570 nm).

Przed pomiarem kryształ formazanu należy rozpuścić używając DMSO lub izopropanol.

2-(2-methoxy4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium, monosodium salt (WST-8)

Powstający w wyniku redukcji formazan jest rozpuszczalny w wodzie

Redukcja MTT_b

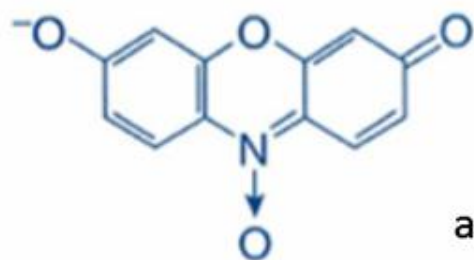
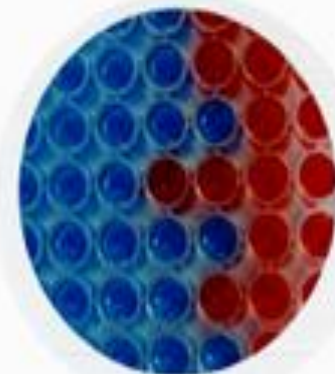


**Zwiększenie intensywności barwy świadczy o zwiększeniu liczby komórek (ocena proliferacji),
A zmniejszenie intensywności barwy świadczy o zmniejszeniu liczby komórek (skutek aktywności cytotoksycznej wobec zabarwionych komórek docelowych).
Im więcej komórek tym większa gęstość optyczna.**

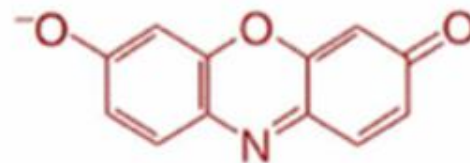
Test fluorymetryczny: alamarBlue

resazurin reduction assay: w żywych komórkach następuje konwersja niebieskiej, niefluorescencyjnej resazuryny do różowej fluorescencyjnej resorufiny przez enzymy mitochondrialne

System opiera się na wskaźniku REDOX, który jednocześnie zmienia barwę i nabiera właściwości fluorescencyjnych w odpowiedzi na redukcję metabolizmu komórkowego. Ilość wytwarzanej fluorescencji jest proporcjonalna do liczby żywych komórek.



Redukcja przez
→
aktywne metabolicznie komórki



Resazuryna
Niebieska i słabo fluorescencyjna

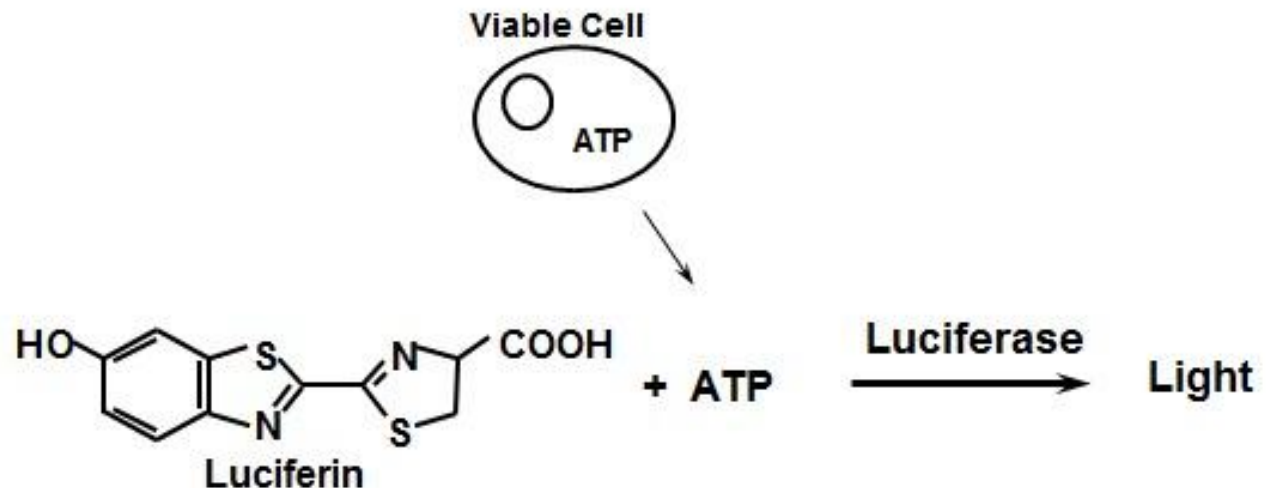
Resorufina
Czerwona i silnie fluorescencyjna

Test luminometryczny: test ATP

W martwych komórkach poziom ATP ulega nagłemu zmniejszeniu. Test polega na pośrednim pomiarze ATP w komórkach (detergent do lizy komórek, inhibitor ATPaz do stabilizacji ATP uwolnionego z komórek).

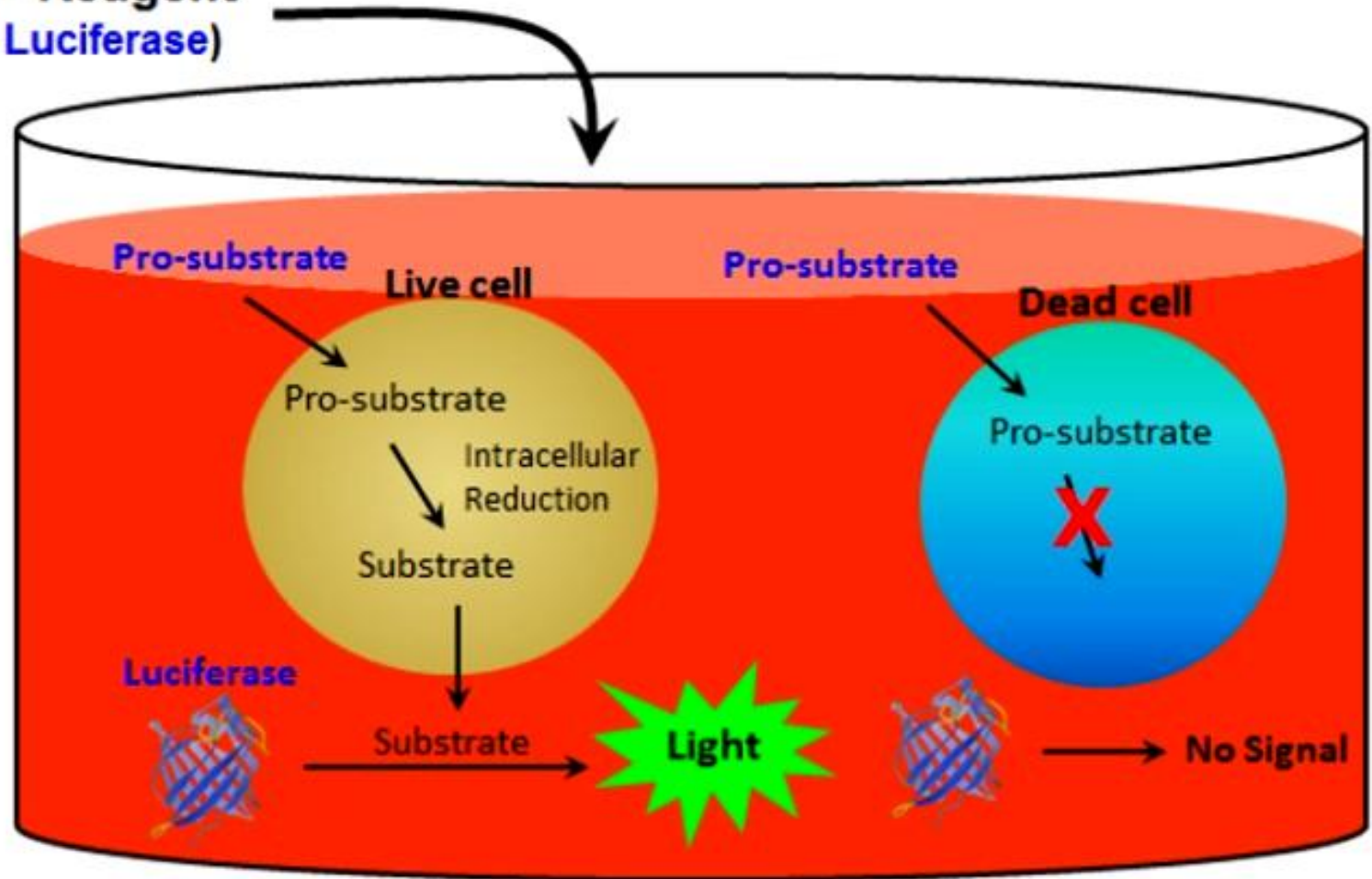
Test polega na reakcji lucyferyny do oksylucyferyny w obecności lucyferazy, jonów magnezu i ATP i emisji luminescencji. Sygnał luminescencji zależy od stężenia ATP.

Lucyferyna emituje światło na skutek reakcji utleniania katalizowanej przez lucyferazę.



Test luminometryczny: modyfikacja

RealTime-Glo® Reagent
(Prosubstrate & Luciferase)



Pro-substrat dodawany do komórek i stabilna forma lucyferazy (pochodząca z krewetek). W żywych komórkach pro-substrat redukowany jest do substratu dla lucyferazy. Substrat emituje światło na skutek reakcji utlenienia przez lucyferazę. W martwych komórkach nie jest generowany substrat dla lucyferazy.

Badanie aktywności cytotoksycznej: przykładowy eksperyment

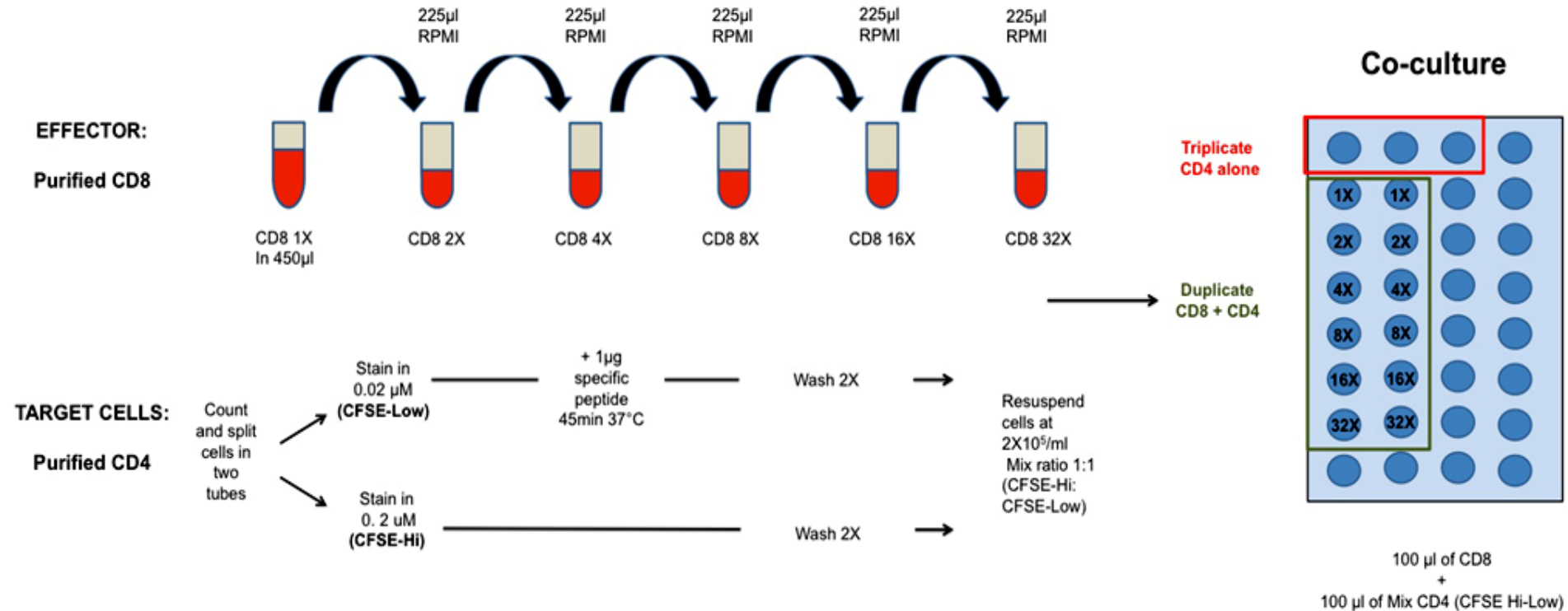
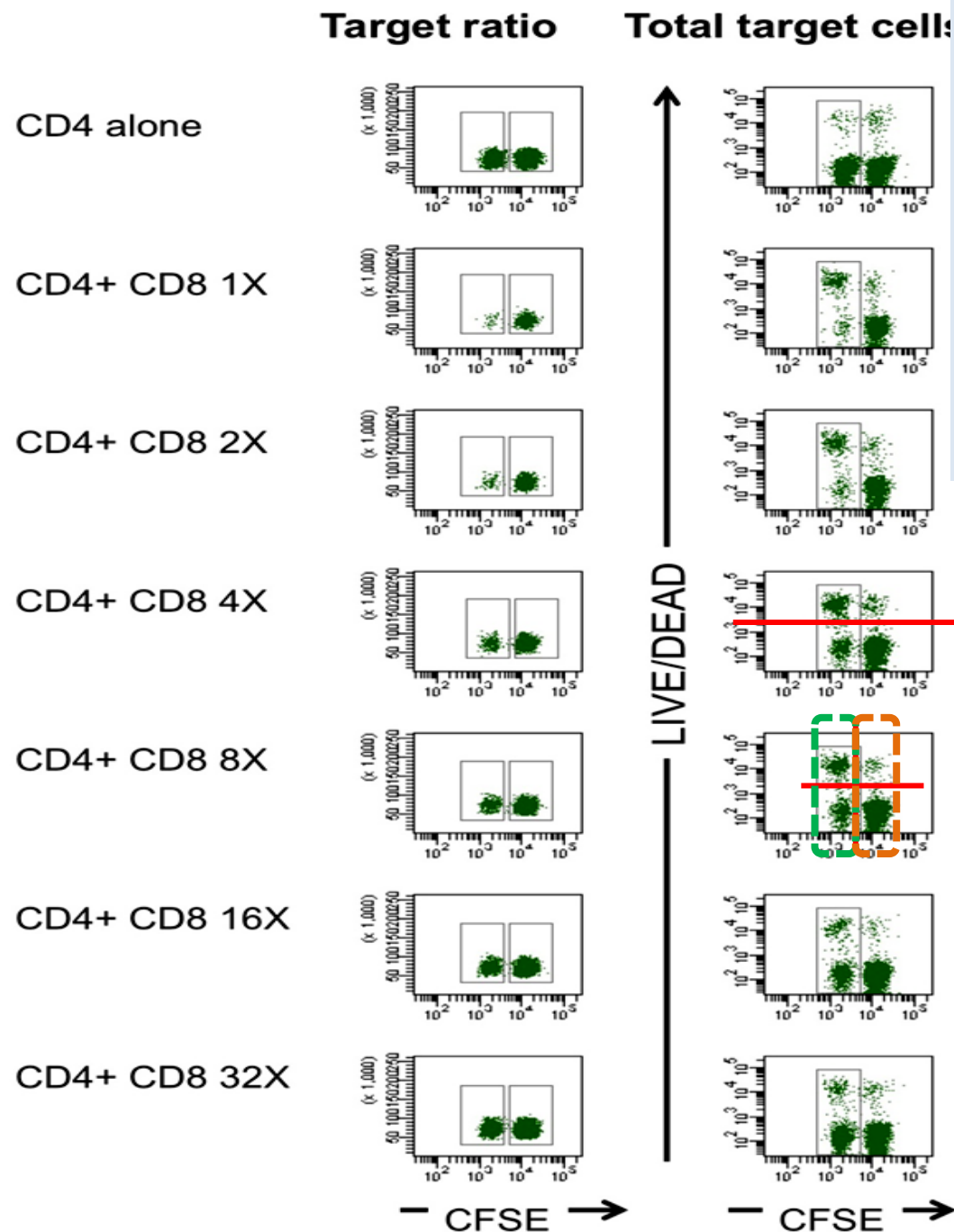


Figure 1. Schematic representation of the cytotoxic assay coculture. Purified CD8+ T cells were resuspended in 450 µl of complete RPMI and 5 serial dilutions were performed. Purified CD4+ T cells were counted, split into two tubes and stained with two concentrations of CFSE (0.02 µM CFSE-low and 0.2 µM CFSE-high). Only CFSE low CD4+ T cells were pulsed with 5 µg of specific peptide. After 45 min, both CFSE low and high CD4+ T cells were washed 2x, resuspended at 2×10^5 /ml and mixed at a ratio of 1:1. 100 µl of mixed CD4+ were seeded in a 96-well plate in the presence or absence of 100 µl of each CD8+ T cell dilution for 6 hr.

Komentarz do slajdu nr 76:

Limfocyty użyte w eksperymencie mogą pochodzić z krwi lub obwodowych narządów limfoidalnych. Z materiału do badania wyizolowano limfocyty T CD4+ i limfocyty T CD8+. Zawiesinę limfocytów T CD8+ rozcieńczono (szereg rozcieńczeń jak na schemacie). Limfocyty T CD4+ rozdzielono na dwie porcje i obie wyznakowano CFSE: do znakowania użyto dwóch stężeń CFSE, tak aby uzyskać różne „świejące” populacje limfocytów T CD4+ (CFSE low CD4+ i CFSE high CD4+). Limfocyty efektorowe, CD8+ (cytotoksyczne) wcześniej aktywowano specyficznym antygenem i wyizolowano tylko te, których TCR wykazywały specyficzne powinowactwo do antygeny. Komórkami docelowymi dla cytotoksycznych limfocytów T były autologiczne limfocyty CD4+ CFSE low prezentujące kompleksy MHC I/peptyd specyficzny przygotowanym uprzednio limfocytom CD8+. Zatem, limfocyty CD4+ CFSE low stanowiły cel ataku limfocytów cytotoksycznych CD8+. Limfocyty naniesiono na płytkę 96-dołkową jak to pokazano na slajdzie nr 76. Wynik testu odczytano po 6 godzinach inkubacji.

Analiza aktywności cytotoksycznej limfocytów T CD8+ względem docelowych limfocytów T CD4+ (CFSE low)



Limfocyty martwe

Limfocyty żywe

Zielony prostokąt: limfocyty T CD4+
CFSE low (docelowe dla limfocytów T
cytotoksycznych)

Pomarańczowy prostokąt: limfocyty T
CD4+ CFSE high

Komentarz do slajdu nr 78:

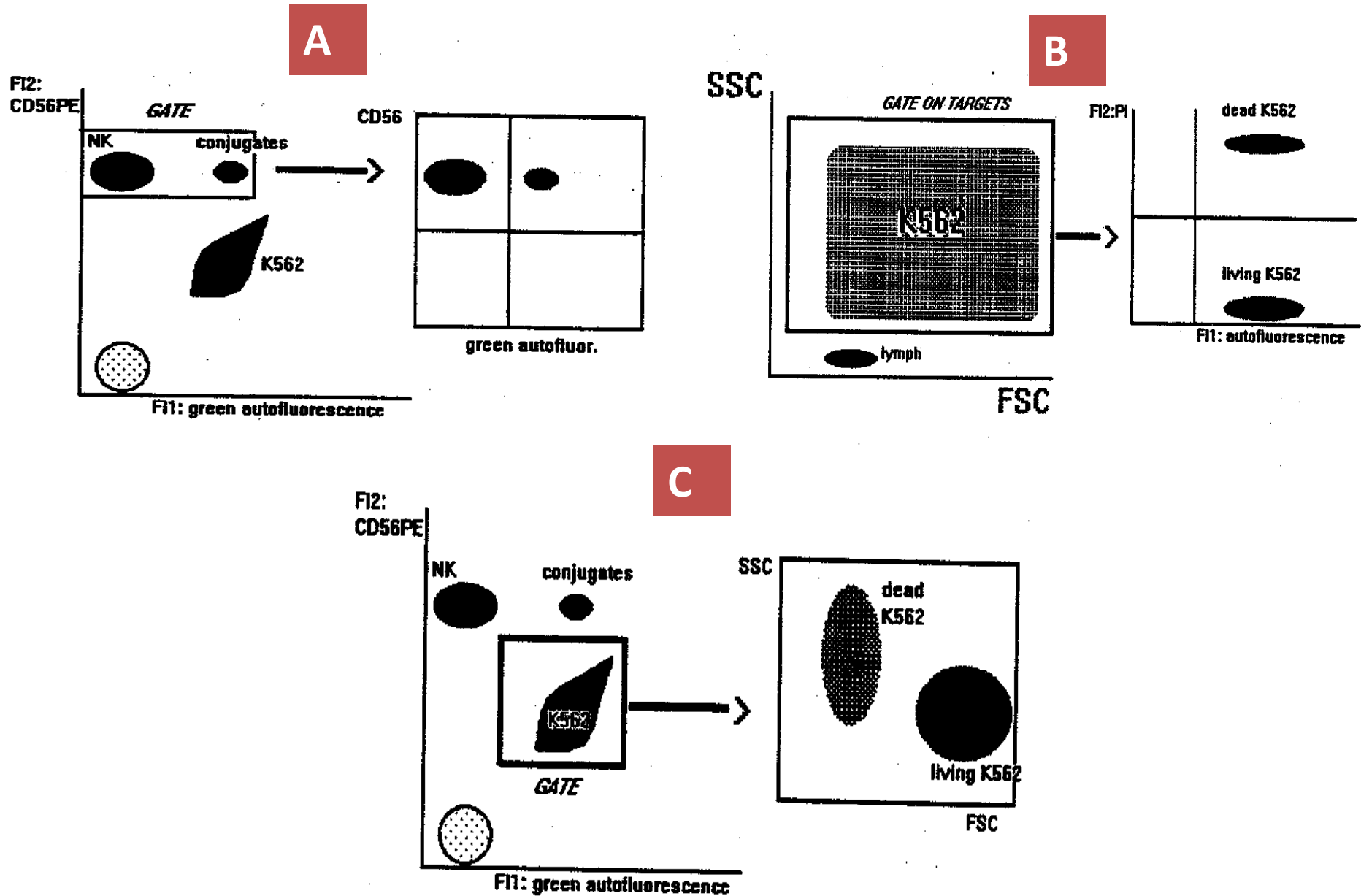
Widzimy dwie kolumny wykresów:

-Lewa kolumna przedstawia rozkład limfocytów T CD4+ wg intensywności fluorescencji pochodzącej od CFSE (widać dwie populacje limfocytów T CD4+, CFSE low i CFSE high). Pokazano populacje żywych komórek. W hodowli zawierającej tylko limfocyty T CD4+ jest tyle samo limfocytów CD4+ CFSE low i CFSE high. W hodowlach zawierających limfocyty T CD8+ widać, że populacja żywych limfocytów T CD4+ CFSE low maleje zależnie od proporcji CD4:CD8 w hodowli.

- prawa kolumna przedstawia żywe i martwe limfocyty T CD4+. W hodowli samych limfocytów T CD4+ widzimy martwe komórki zarówno CFSE low jak i CFSE high. W hodowlach zawierających limfocyty T CD8+ widać zwiększającą się populację martwych limfocytów T CD4+ CFSE low. Wielkość populacji jest zależna od proporcji CD4:CD8. Populacja martwych limfocytów T CD4+ CFSE high nie zmienia się, pozostaje taka sama jak w hodowli kontrolnej niezawierającej limfocytów cytotoksycznych. Widać zatem, że celem ataku limfocytów T cytotoksycznych są limfocyty T CD4+ CFSE low prezentujące specyficzne peptydy.

- odsetek limfocytów T żywych i martwych wylicza program do analizy danych.

Cytotoksyczność komórek NK



Komentarz do slajdu nr 80:

Przykład badania aktywności cytotoksycznej komórek NK.

Komórki NK charakteryzują się obecnością białka (markera) powierzchniowego CD56. Można zatem identyfikować komórki NK poprzez znakowanie białka CD56 przeciwciałem monoklonalnym anty-CD56 sprzężonym z fluorochromem (na schemacie PE, fikoerytryna). W standardowym teście *in vitro* stosuje się komórki białaczki K562 jako cel dla komórek NK. Analizę przeprowadza się techniką cytometrii przepływowej. Komórki NK można łatwo odróżnić od komórek K562 na podstawie parametrów fizycznych, wielkości i ziarnistości oraz emisji autofluorescencji.

A/ W przypadku badania funkcji cytotoksycznej komórek NK człowieka źródłem komórek NK jest krew żylna. Z próbki krwi usuwa się erytrocyty (można zastosować lizę erytrocytów za pomocą buforu hipotonicznego). W próbie po lizie erytrocytów występują wszystkie leukocyty, wśród których komórki NK stanowi populacja komórek CD56+ (na wykresie widoczne na osi FL2, oznaczone NK). Można też uzyskać poprzez wirowanie na gradiencie sacharozy populację leukocytów mononuklearnych (w większości limfocyty) zawierającą komórki NK. Komórki K562 ze względu na emisję autofluorescencji zajmują pozycję w środku wykresu. Komórki NK działają cytotoksycznie wskutek ich aktywacji poprzez interakcje receptorów i ligandów w bezpośrednim kontakcie z komórką docelową. Zatem na wykresie widoczne są konjugaty komórek NK i K562. Odsetek konjugatów daje informację o potencjalnej aktywności komórek NK.

B/ Komórki K562 od limfocytów można odróżnić na podstawie wielkości (oś FSC) i ziarnistości (oś SSC). Analizowane są komórki K562 wyznakowane jodkiem propidyny (oś FL2/PI). Komórki K562 PI+ są martwe, a K562 PI- są żywe.

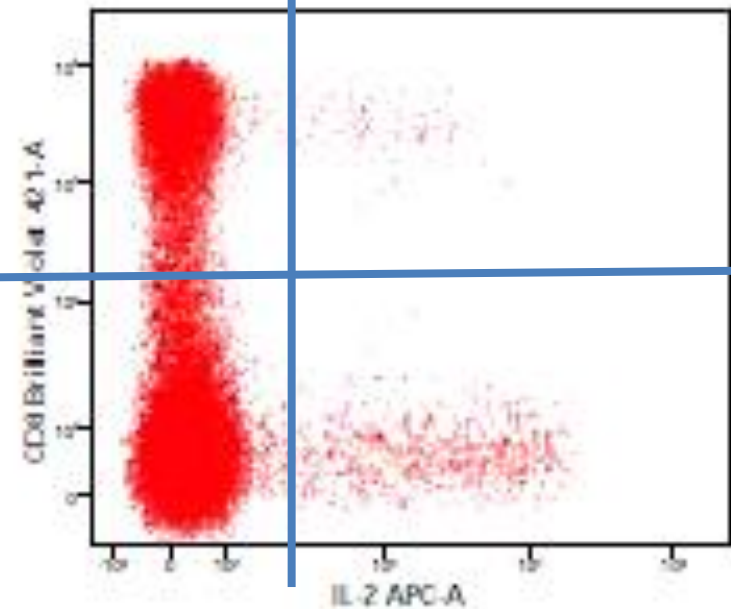
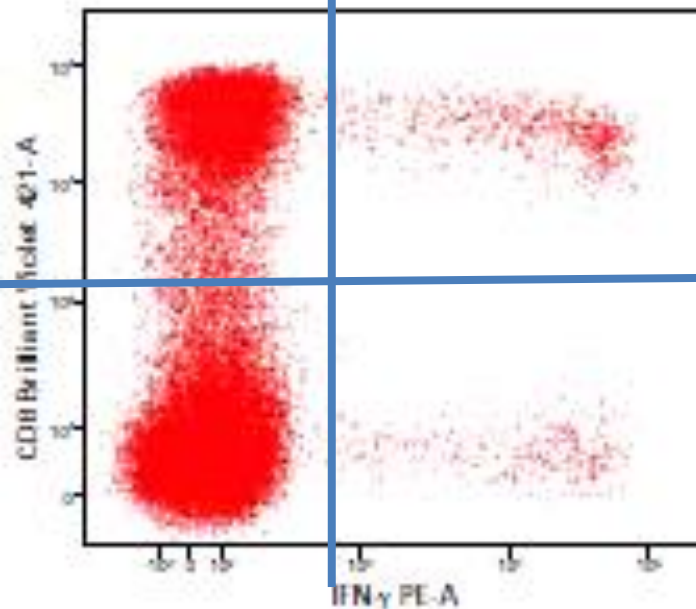
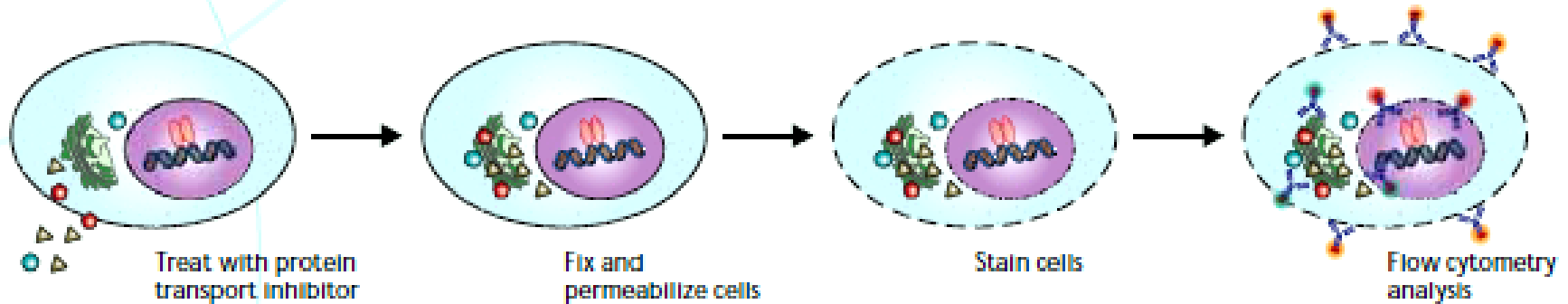
C/ Analizie poddajemy komórki K562, które nie tworzą konjugatów z NK. Znajdują się wśród nich K562 żywe i martwe, które rozróżniamy na podstawie wielkości i ziarnistości, czyli parametrów fizycznych. Mniejsze i bardziej ziarniste w populacji K562 są martwe, a większe i mniej ziarniste – żywe.

Synteza cytokin

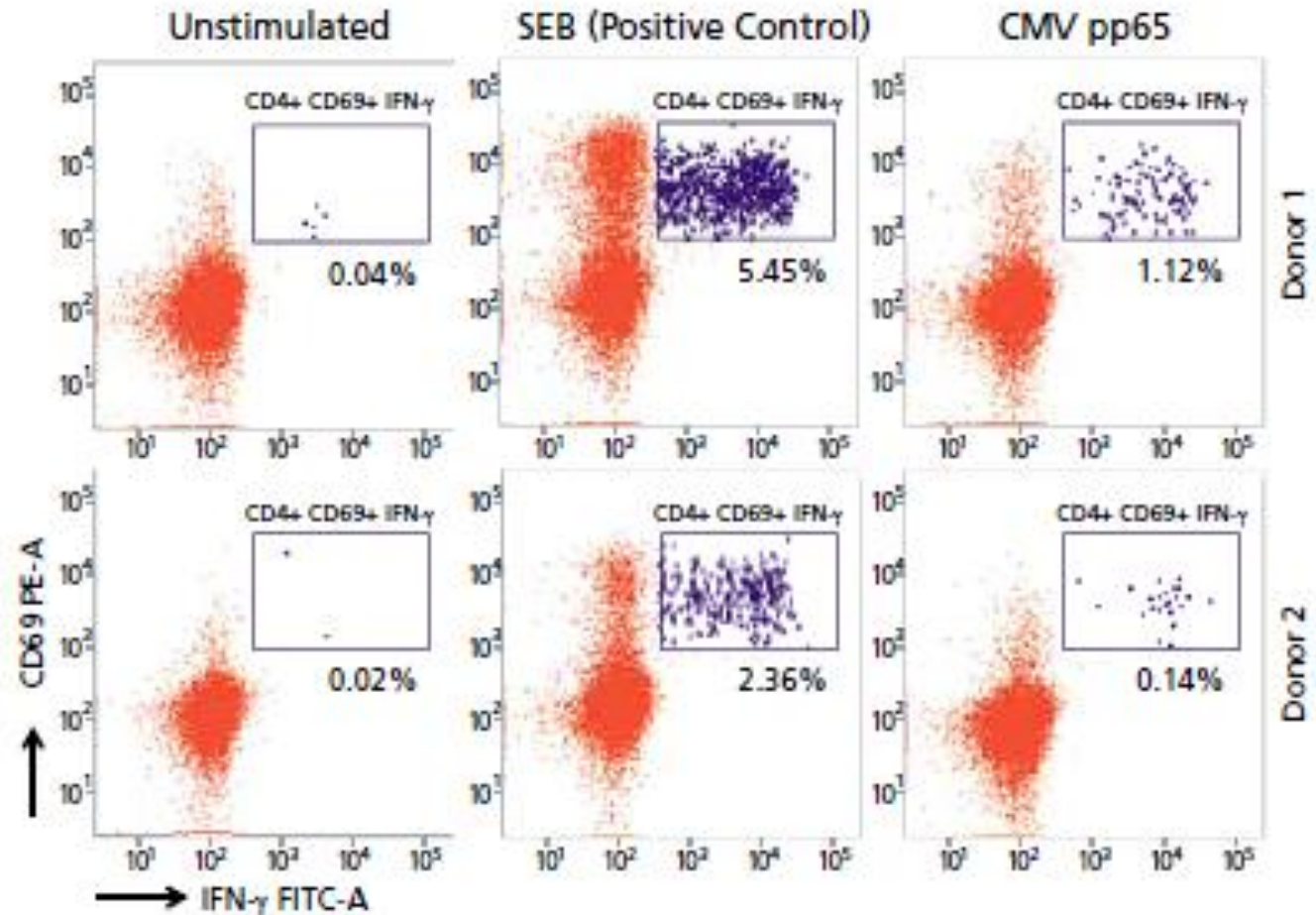
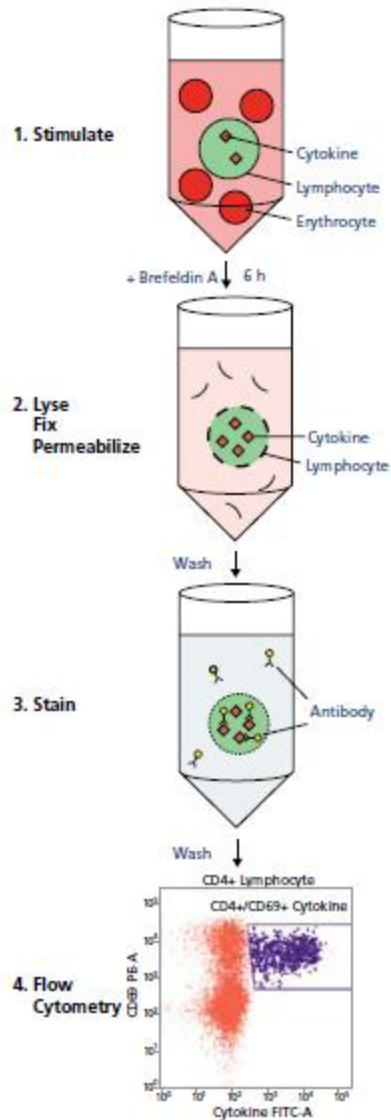
Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin

Basic principles of intracellular staining.

Cells are fixed and permeabilized (symbolized by dashed line membrane), stained, and then analyzed by flow cytometry. For studies of secreted proteins, cells are first treated with a protein transport inhibitor to allow accumulation of the target protein inside the cell.



Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin



Cytokiny wytwarzane są przez aktywowane limfocyty. Na wykresach widać, że limfocyty, które wykazują obecność IFN gamma są jednocześnie CD69+ (wykazują ekspresję markera charakterystycznego dla aktywowanych limfocytów). Limfocyty nieaktywowane nie produkują IFN- γ .

Figure 1. Overview of the BD FastImmune Intracellular Cytokine assay.

Przykłady antygenów używanych do aktywacji limfocytów *in vitro*

Activation Agent	Source	Stock Solution	Use In Assay
SEB positive control	Sigma Catalog No. S4881 (1 mg)	Add 2 mL of sterile PBS directly to a 1-mg vial of SEB. Cap the vial and shake to dissolve all the powder. Remove the solution and dilute up to 20 mL with PBS to make a stock solution of 50 µg/mL. Store this stock solution at 4°C.	Use 20 µL of stock solution for stimulation of 1 mL blood at a final concentration of 1 µg/mL.
CMV Lysate	Advanced Biotechnologies (ABI) Catalog No. 10-144-000 (1 mg) Catalog No. 10-144-100 (0.1 mg)	The material is diluted to a final concentration of 1 mg/20 mL (50 µg/mL) in sterile PBS, calculating from the protein concentration given in the product insert. Aliquots of 20 µL each are frozen at -80°C. NOTE: Different lots of this product might need to be titrated for optimal concentrations.	Use 20 µL of stock solution for stimulation of 1 mL blood at a final concentration of 1 µg/mL.
CMV pp65 protein	Austral Biotechnologies Catalog No. CMA-1420-4 (50 µg)	Fifty micrograms (50 µg) is diluted to a total of 2 mL in sterile PBS (final concentration 25 µg/mL). Aliquots of 20 µL each are frozen at -80°C.	Use 20 µL of stock solution for stimulation of 1 mL blood at a final concentration of 0.5 µg/mL.
Peptides		Most peptides can be dissolved in DMSO at a concentration of 2 mg/mL. Aliquots of 5 µL each are frozen at -80°C.	Use 5 µL of stock solution for stimulation of 1 mL blood at a final concentration of 10 µg/mL.

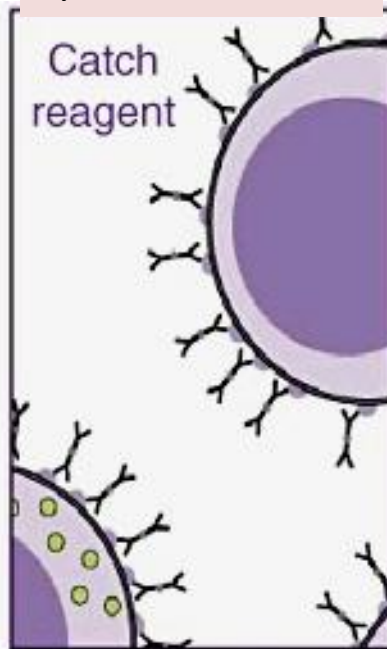
Wykrywanie limfocytów wydzielających cytokiny

Aktywacja
limfocytów



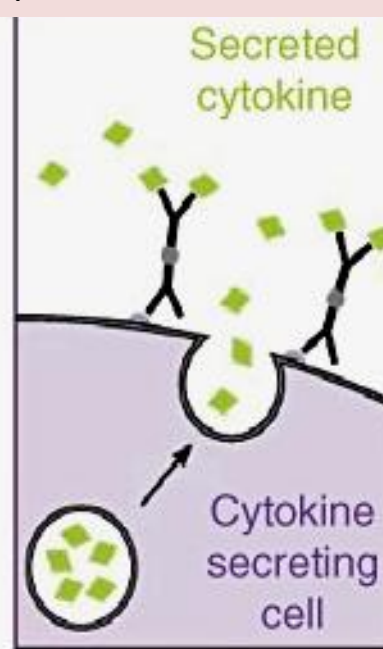
Antigen-specific
restimulation

Znakowanie
limfocytów MoAb
anty-CD45 i anti-
cytokina



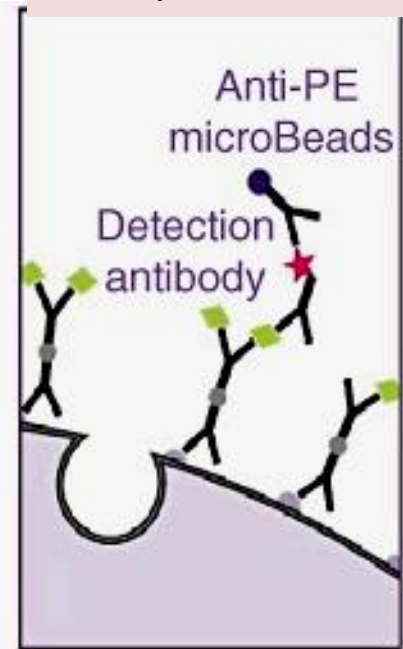
Labelling with
catch reagent

MoAb-anty cytokina
wiąże cytokinę
wydzielaną do
podłoża



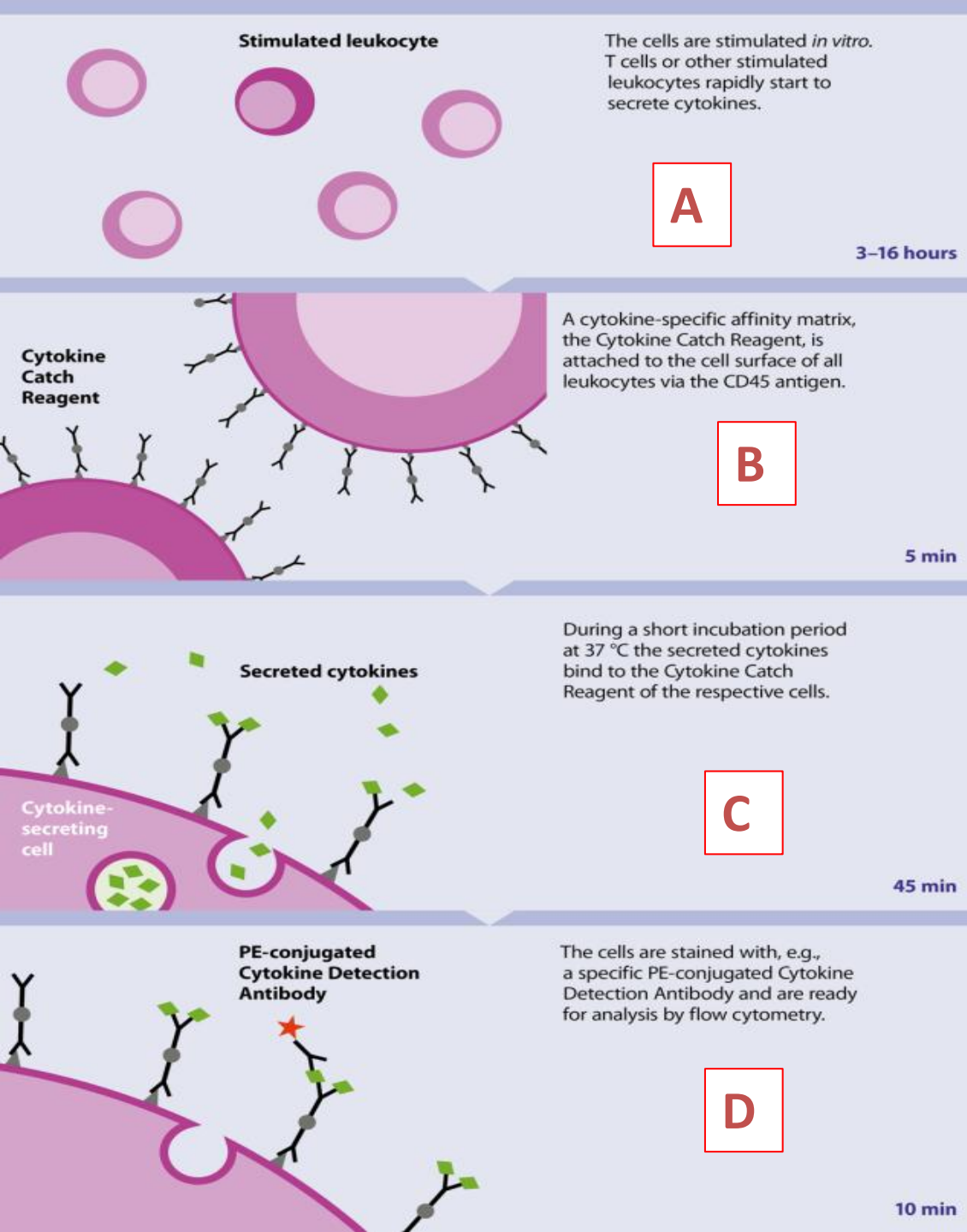
Secretion
period

Wysycenie
mikrokulkami
umożliwia sortowanie
limfocytów



Fluorescent and
magnetic labelling

Wykrywanie limfocytów wydzielających cytokiny



Zastosowanie techniki cytometrii przepływowej.

A/ próba leukocytów jest aktywowana (antygenem, aktywatorem poliklonalnym)

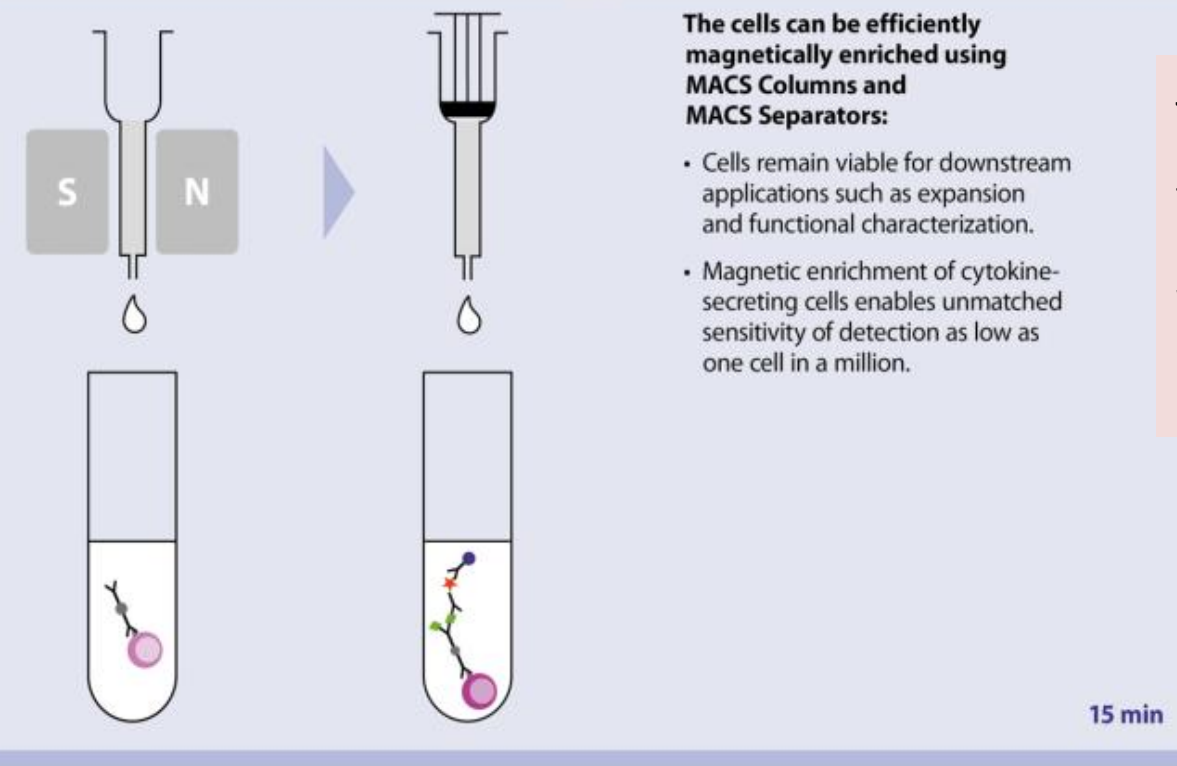
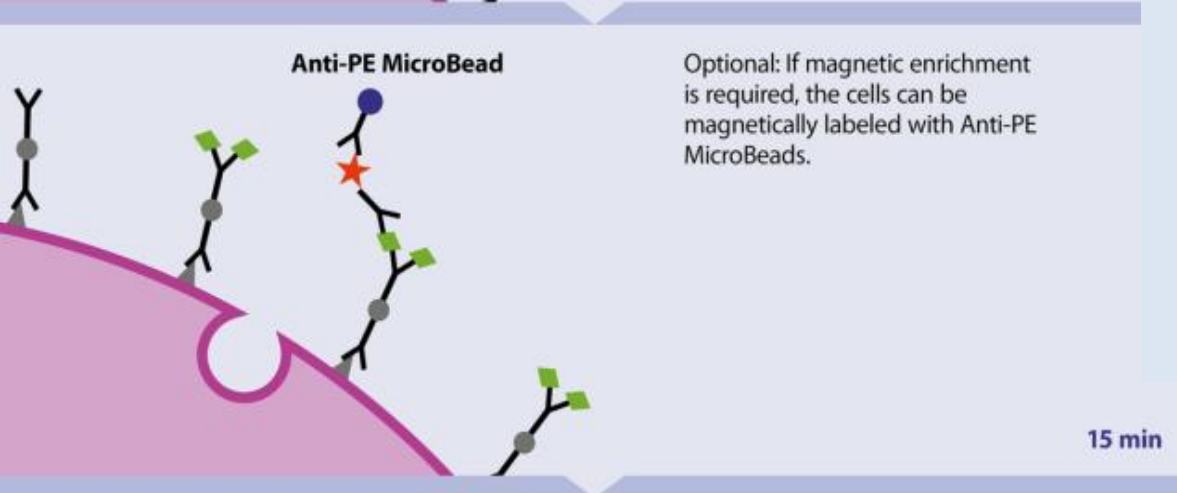
B/ leukocyty po aktywacji znakuje się sprzężonymi przeciwciałami podwójnej specyficzności: anti-CD45 wiąże białko CD45 obecne na wszystkich leukocytach. Część anti-cytokina x będzie wiązać wydzielaną przez leukocyty cytokinę x

C/ Wiązanie wydzielanej cytokiny przez przeciwciała anti-cytokina

C/ wykrywanie związanej cytokiny przez przeciwciała anti-cytokina sprzężone z fluorochromem.

<https://www.miltenyibiotec.com/ES-en/resources/macshandbook/human-cells-and-organs/human-cell-types/pan-t-cells-human.html>

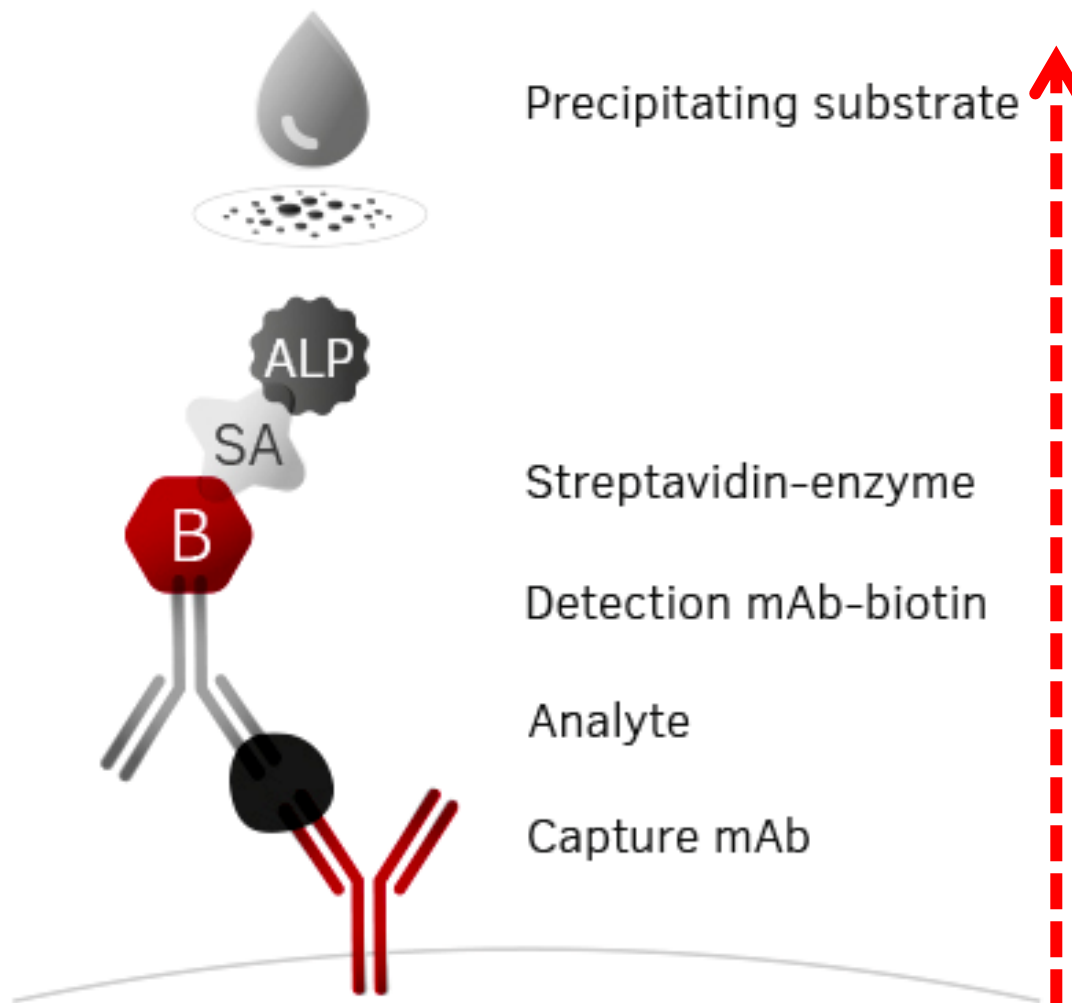
Izolowanie limfocytów wydzielających cytokiny



- Cells remain viable for downstream applications such as expansion and functional characterization.
- Magnetic enrichment of cytokine-secreting cells enables unmatched sensitivity of detection as low as one cell in a million.

Jeżeli zastosujemy dodatkowo przeciwciała anti-PE (przeciwko fikoerytrynie) opłaszczane na mikrokulkach, to uzyskamy możliwość wyizolowania komórek wydzielających cytokiny za pomocą sortera magnetycznego.

ELISpot (enzyme-linked immune absorbent spot)



Test umożliwia wykrywanie komórek wydzielających cytokinę.

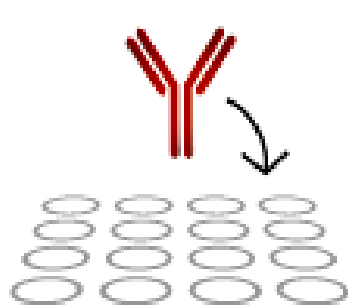
5/ dodanie substratu dla enzymu, produkt reakcji enzymatycznej jest nierozpuszczalny i tworzy depozyt w miejscu, w którym komórka wydelała cytokinę. „Spoty” liczone są za pomocą automatycznego czytnika
4/ dodanie enzymu sprzężonego z streptawidyną
3/ dodanie przeciwciał anty-cytokina sprzężonych z biotyną
2/ dodanie aktywowanych limfocytów, które wydzielają cytokinę. Cytokina jest „wyłapywana” przez przeciwciała zaadherowane na płytce. Limfocyty są usuwane.
1/ opłaszczanie płytki MoAB anty-cytokina

Zastosowanie biotyny i awidyny

1. Biotyna, wit. H, wit. B7
2. Awidyna, białko obecne w jajach, wykazuje powinowactwo do biotyny, 1 cz. awidyny wiąże 4 cz. biotyny
3. Streptoawidyna, białko bakteryjne (*Streptomyces avidinii*), wiąże niekowalencyjnie biotyne

Reakcja biotyna-awidyna; biotyna-streptoawidyna – specyficzna, nieodwracalna

Przewodnik po teście ELISpot



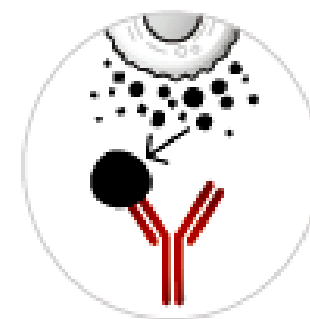
Coating

Monoclonal capture antibodies are added to an ethanol-treated PVDF membrane plate.



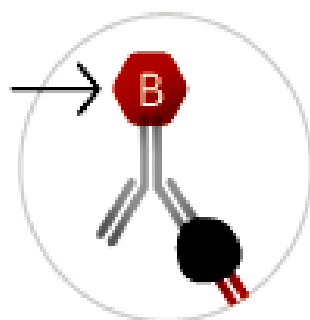
Cell incubation

Cells are added in the presence or absence of stimuli and the plate is incubated to allow cytokine secretion.



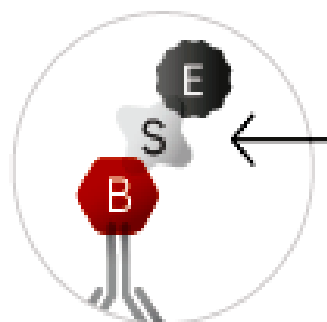
Cytokine capture

Secreted cytokines bind to capture antibodies surrounding the activated cells.



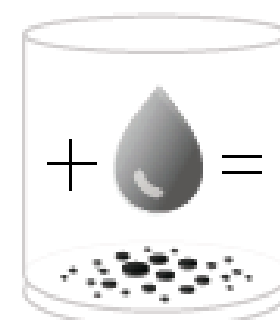
Detection antibodies

Cells are removed and the plate is washed before biotinylated detection antibodies are added.



Streptavidin-enzyme conjugate

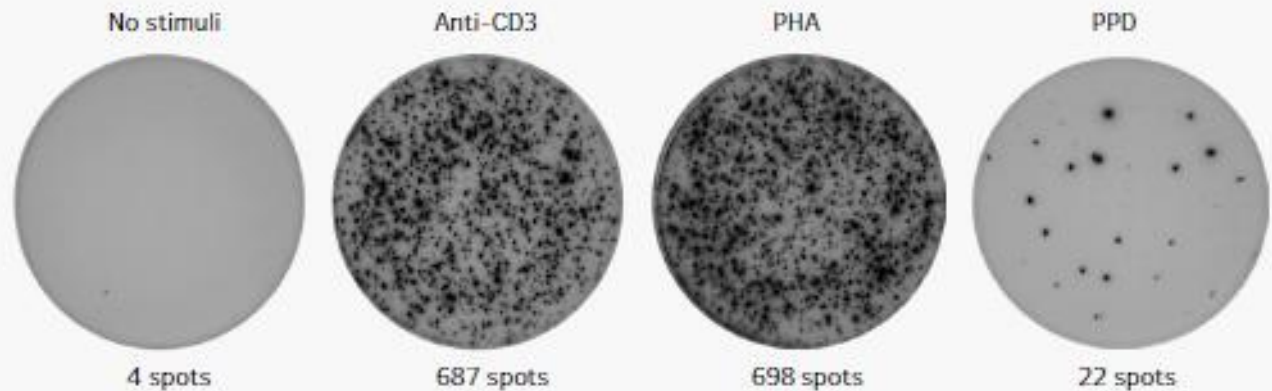
Addition of a streptavidin-conjugate enables the formation of spots on the membrane.



Addition of substrate

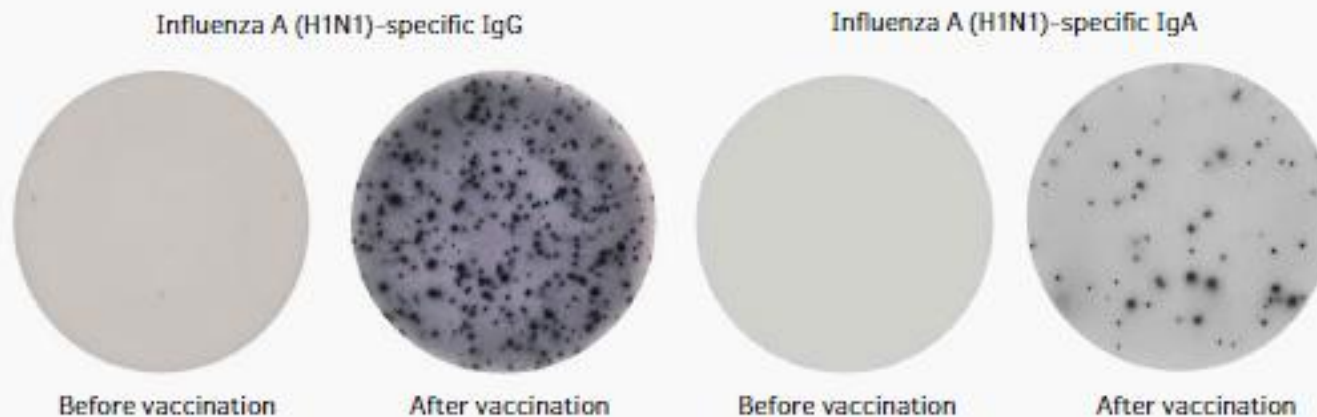
A colorimetric substrate forms an insoluble precipitate when catalyzed by the enzyme.

Przykłady oznaczania limfocytów wydzielających IFN- γ . Liczba „spotów” zależy od użytego aktywatora



Human IFN- γ ELISpot

IFN- γ secretion by PBMCs incubated overnight without stimuli or with anti-CD3, phytohaemagglutinin (PHA) or purified protein derivative (PPD).

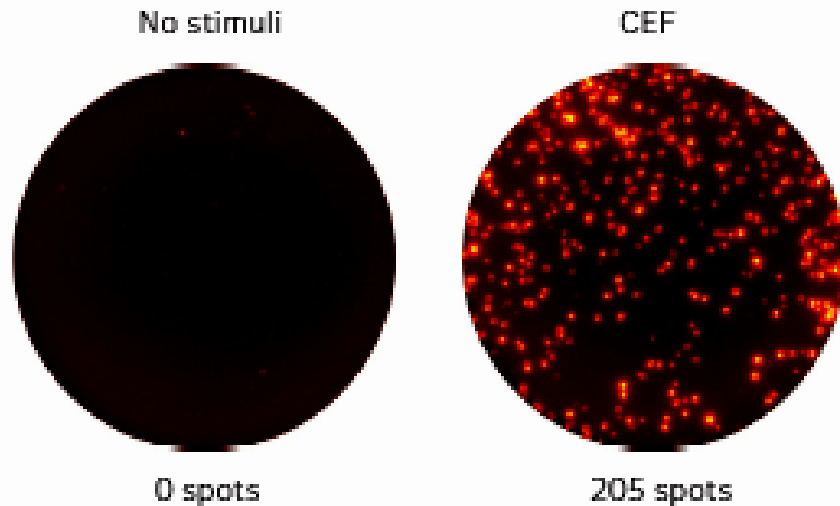


Human IgG and IgA ELISpot

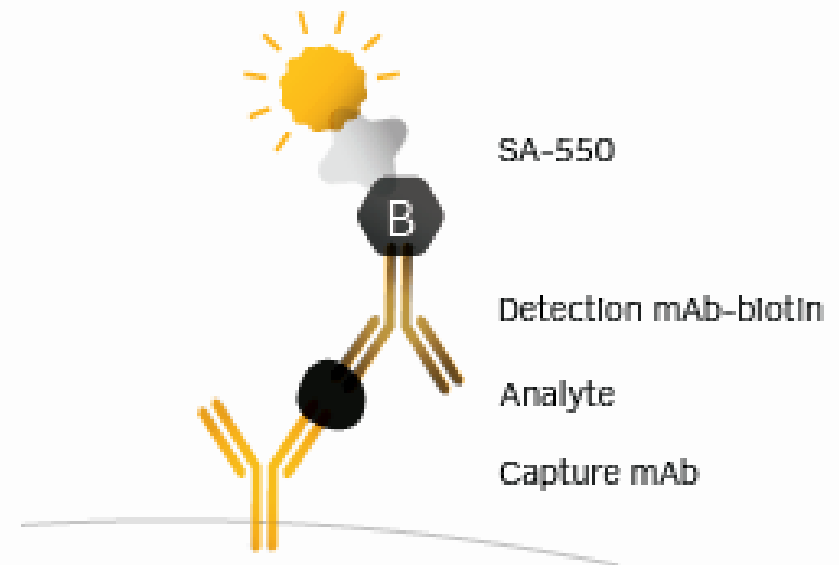
PBMCs were collected before and after vaccination with Pandemrix® and secretion of influenza A (H1N1)-specific IgG (left) and IgA (right) was analyzed by ELISpot.

Przykłady oznaczania limfocytów wydzielających przeciwciała IgG i IgA pochodzących od pacjentów nieszczepionych i szczepionych szczepionką przeciwko grypie.

Single FluoroSpot: odmiana ELISpot z zastosowaniem fluoroforów zamiast enzymów

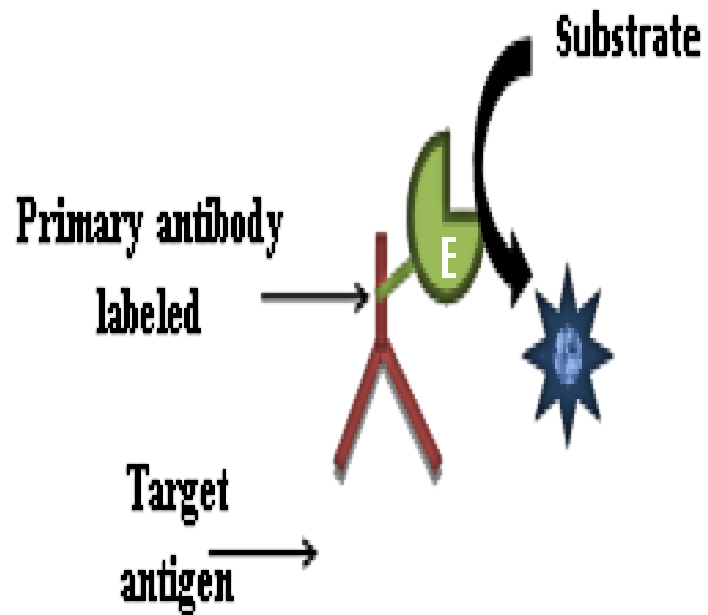


PBMCs were incubated overnight with or without CEF peptide pool, and IFN- γ -secreting cells were analyzed by **single FluoroSpot**.

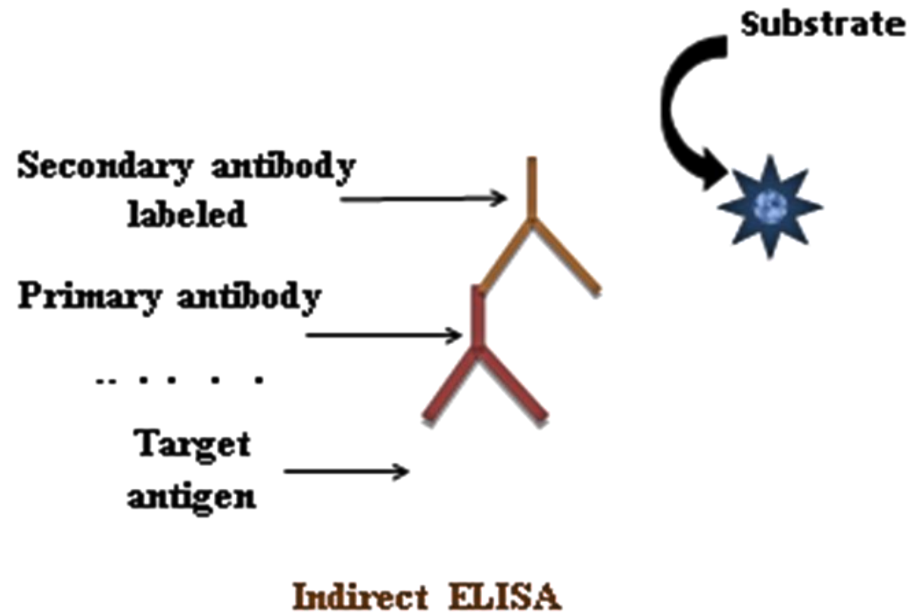


Single FluoroSpot assay principle

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay



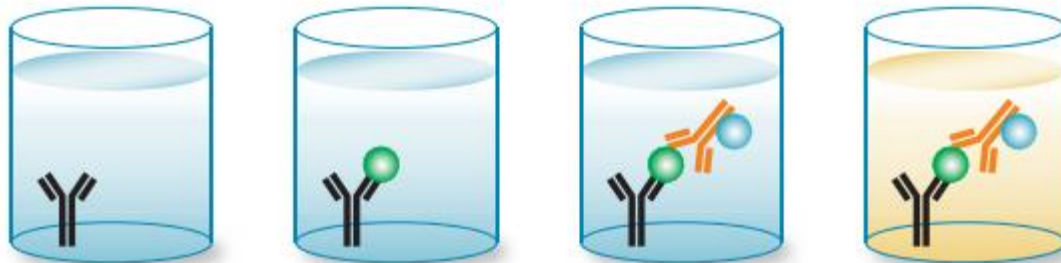
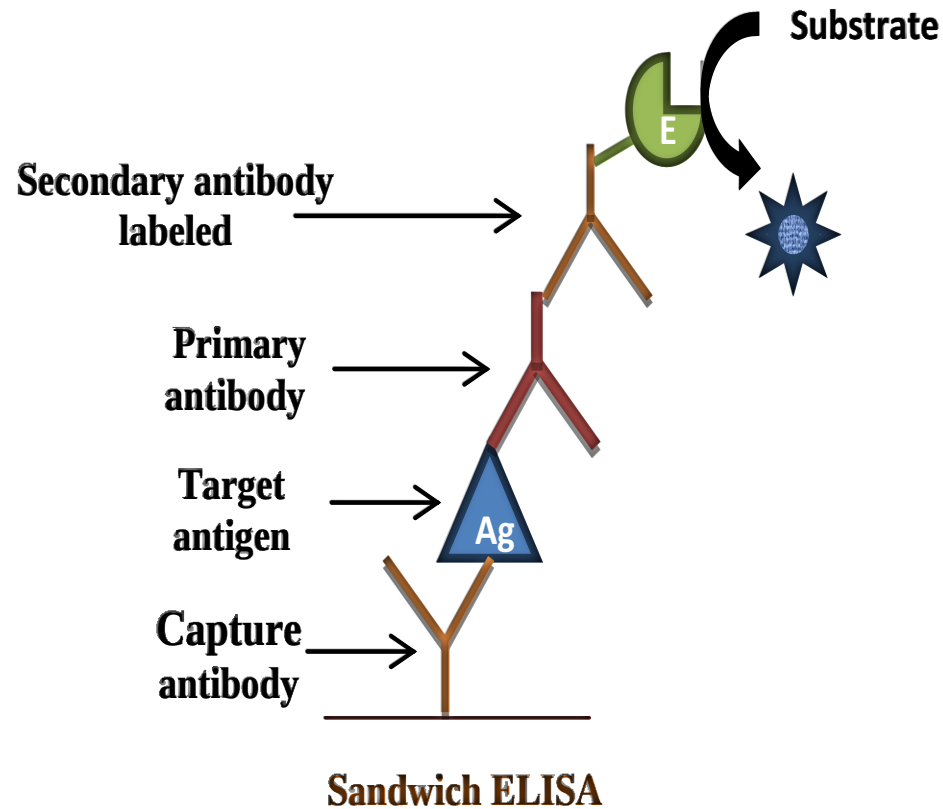
Direct ELISA



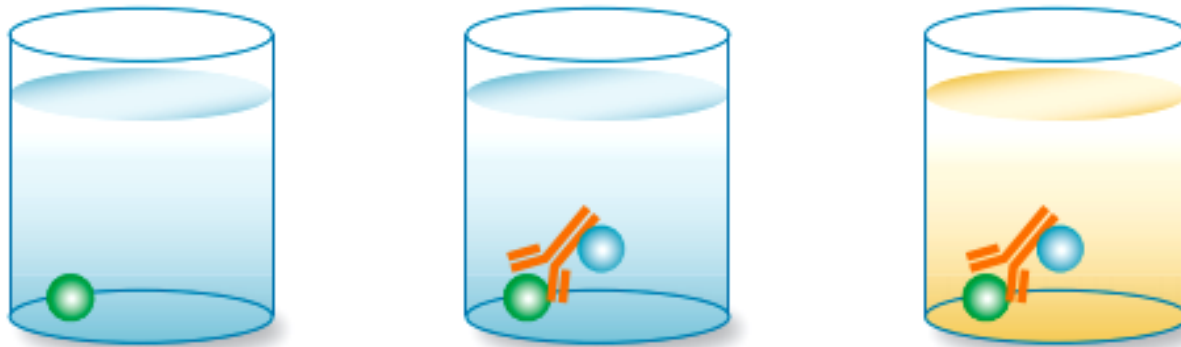
Indirect ELISA



ELISA

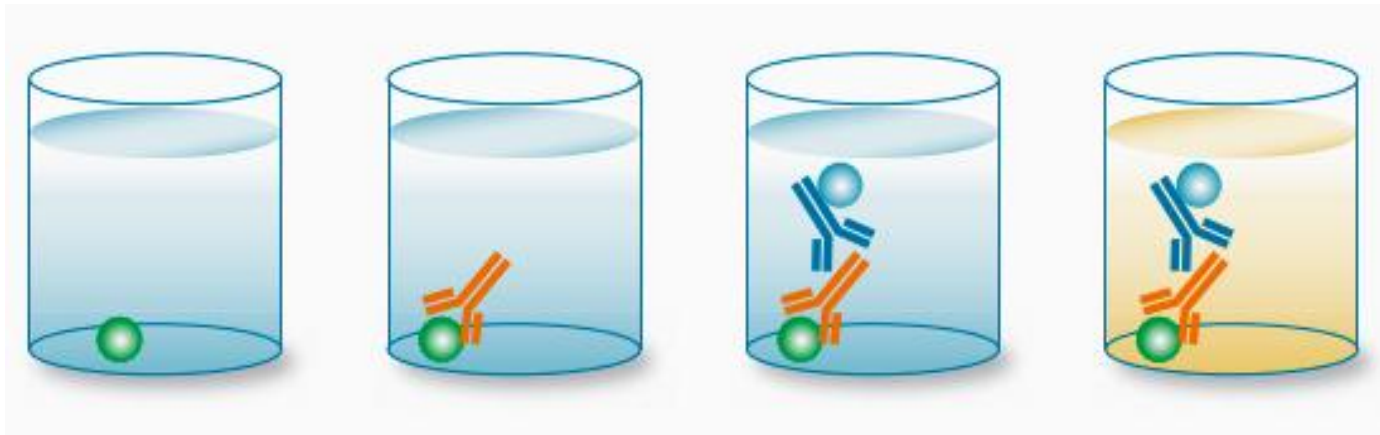


ELISA: test bezpośredni



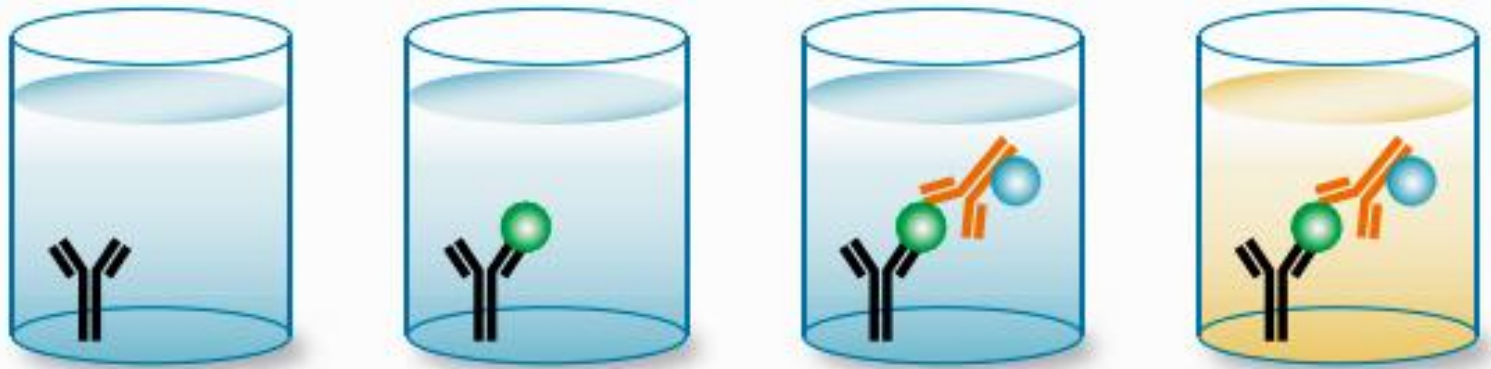
Advantages	Disadvantages
Faster than other ELISA – the technique has fewer steps	Antigen immobilization is not specific - may cause higher background noise than indirect ELISA. Mainly because all proteins in the sample, including the target protein, will bind to the plate Less flexible - each target protein needs a specific conjugated primary antibody No signal amplification - reduces assay sensitivity
Less prone to error – as less reagents and fewer steps are required	
Best for: when analyzing the immune response to an antigen.	

ELISA: test pośredni



Advantages	Disadvantages
High sensitivity - more than one labeled secondary antibody can bind the primary antibody	Possibility of background noise - secondary antibody may be cross-reactive Longer procedure than direct ELISA technique - additional incubation step for secondary antibody needed
Economical - fewer labeled antibodies are needed	
Greater flexibility - different primary antibodies can be used with a single labeled secondary antibody	
Best for: determining total antibody concentration in samples.	

ELISA: sandwich



Advantages

High sensitivity - 2-5 times more sensitive than direct or indirect ELISA

High specificity - two antibodies are involved in capture and detection

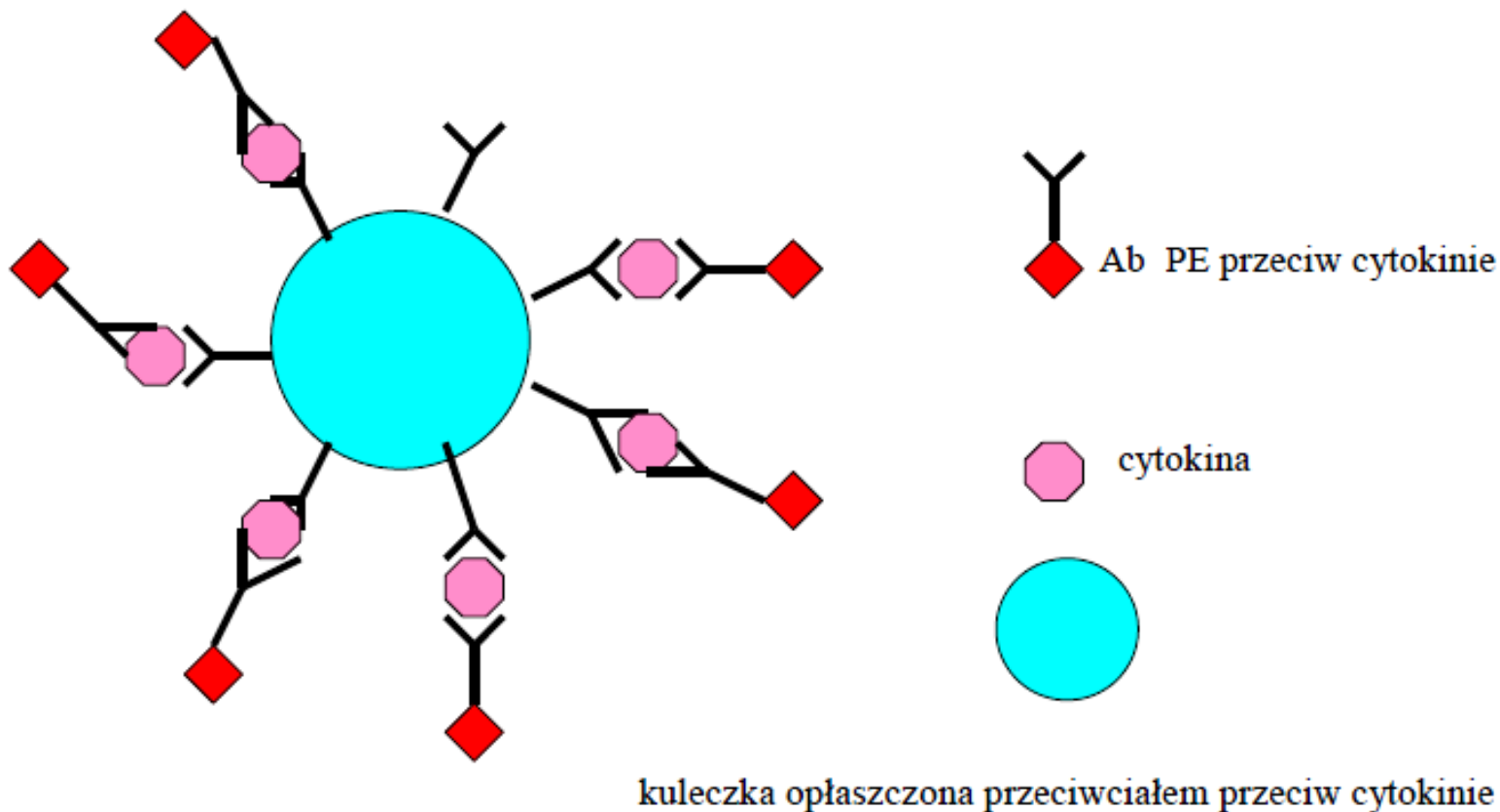
Flexibility - both direct and indirect detection can be used

Disadvantages

Antibody optimization can be difficult - cross-reactivity may occur between the capture and detection antibodies. Needs a standardized ELISA kit or tested antibody pair.

Best for: analysis of complex samples, since the antigen does not need to be purified prior to measurement.

CBA: oznaczanie stężenia cytokin za pomocą cytometru przepływowego



Komentarz do slajdu nr 99:

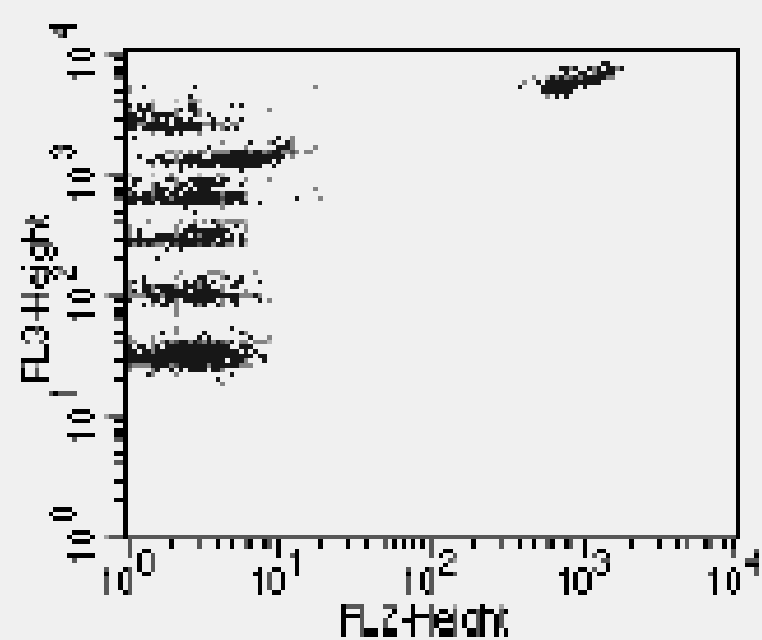
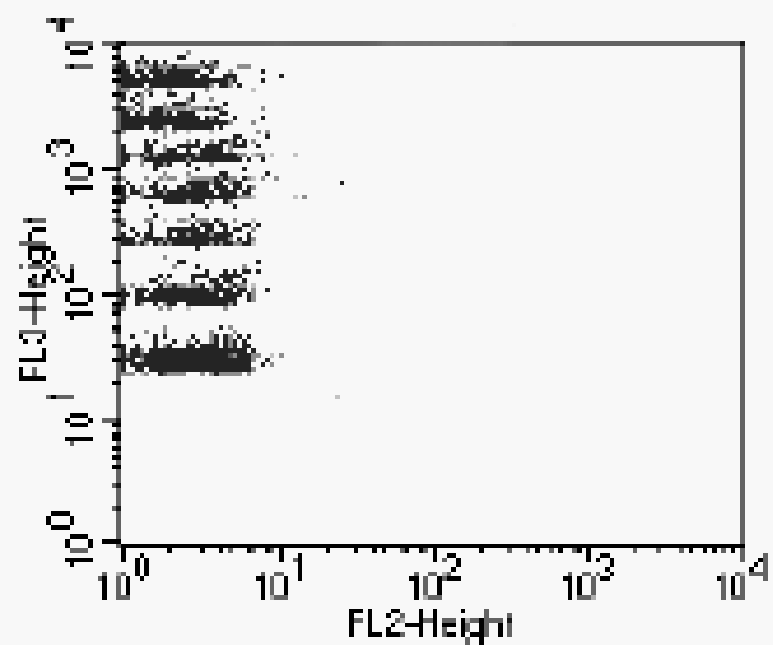
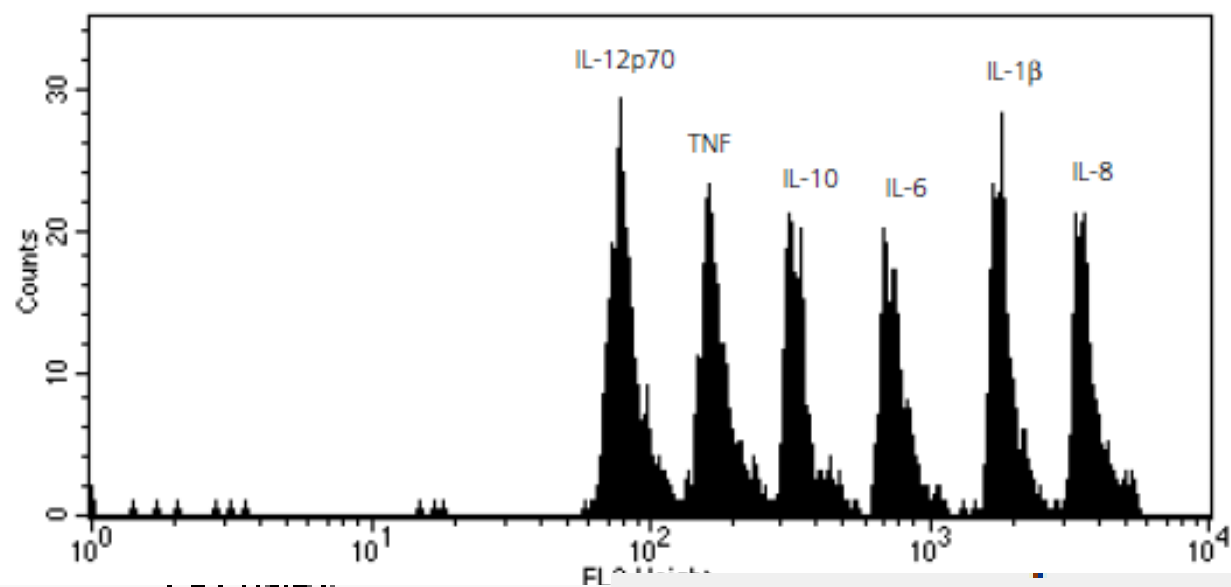
Zastosowano kuleczki o różnej intensywności fluorescencji. Kuleczki są takiej samej wielkości, tworzą sześć populacji różniących się intensywnością świecenia. Kuleczki należące do jednej populacji opłaszczane są przeciwciałami (nieznakowanymi) wiążącymi określoną cytokinę. W zestawie znajduje się 6 populacji kuleczek opłaszczonych odpowiednio przeciwciałami. Intensywność fluorescencji oceniana jest w kanale FL3.

Zatem w zestawie znajduje się 6 fiolek zawierających kuleczki opłaszczane przeciwciałami przeciw cytokinom (przeciw jednej cytokinie w każdej fiole).

Przed przystąpieniem do testu zawiesiny kuleczek mieszane są w równych objętościach. Do badanej próby (np. supernatant pochodowlany, surowica, płyny tkankowe) dodawane są kuleczki opłaszczane przeciwciałami przeciw cytokinom. Cytokiny wykrywane są pomocą przeciwciał przeciw cytokinom sprzężonym z PE (pomiar w kanale FL2).

Analiza wykonywana jest techniką cytometrii przepływowej. O obecności cytokin w badanej próbce świadczy przesunięcie populacji kuleczek w prawą stronę osi FL2.

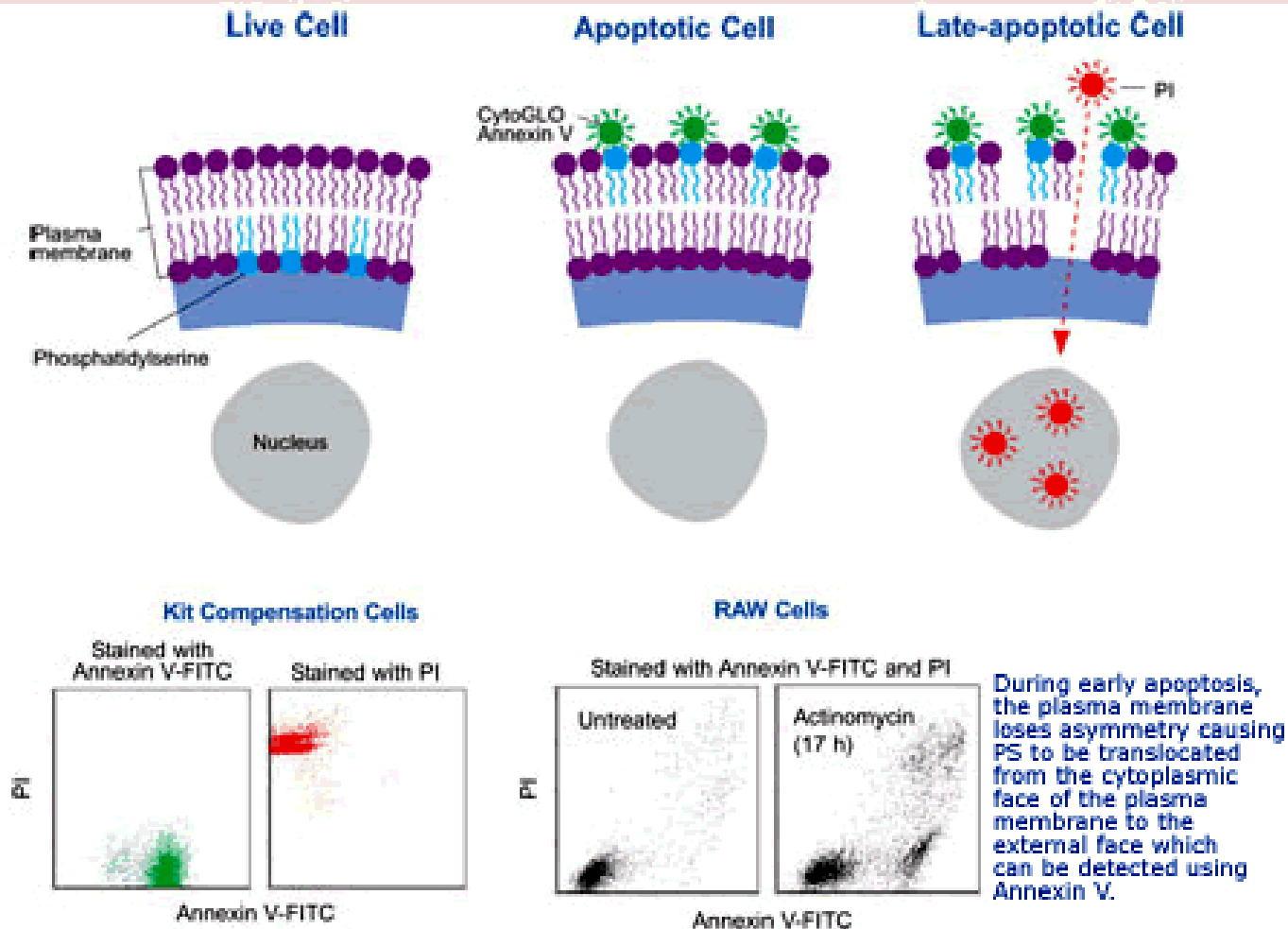
Program do analizy oblicza stężenie poszczególnych cytokin w badanej próbce w odniesieniu do krzywych wzorcowych.



Indukcja apoptozy

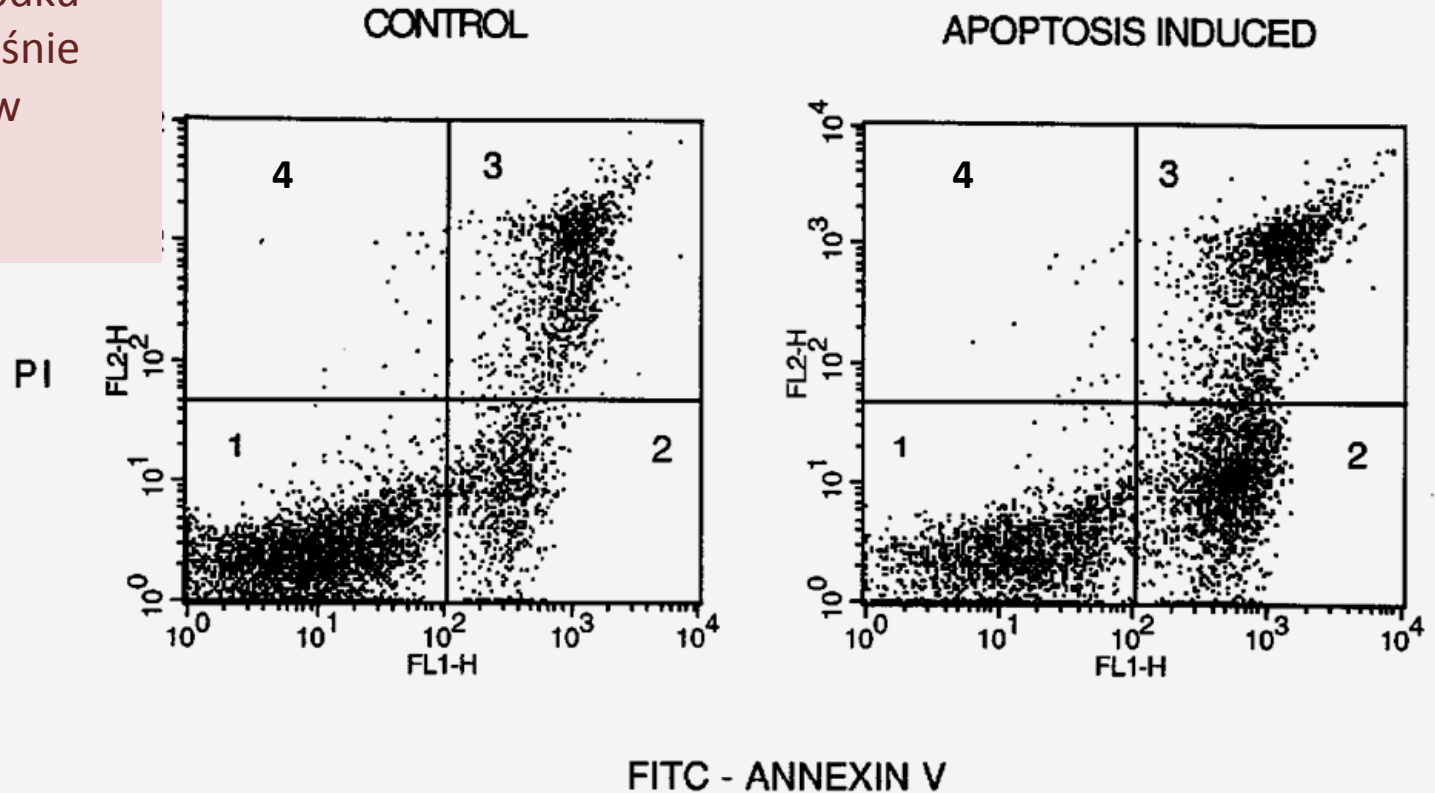
Aneksyna V

Białko komórkowe o słabo poznanej funkcji. Wykazuje powinowactwo do fosfatydyloseryny, która w żywych komórkach zlokalizowana jest w wewnętrznej warstwie błony cytoplazmatycznej, a w komórkach apoptotycznych przemieszcza się na stronę zewnętrzną i jest łatwo wykrywalna przez wiązanie Aneksyny V sprzężonej z fluorochromem.



Oznaczanie komórek apoptotycznych i nekrotycznych

Komórki nekrotyczne mają błonę powierzchniową przepuszczalną dla jodku propidyny i jednocześnie nie wykazują zmian w lokalizacji fosfatydyloseryny.



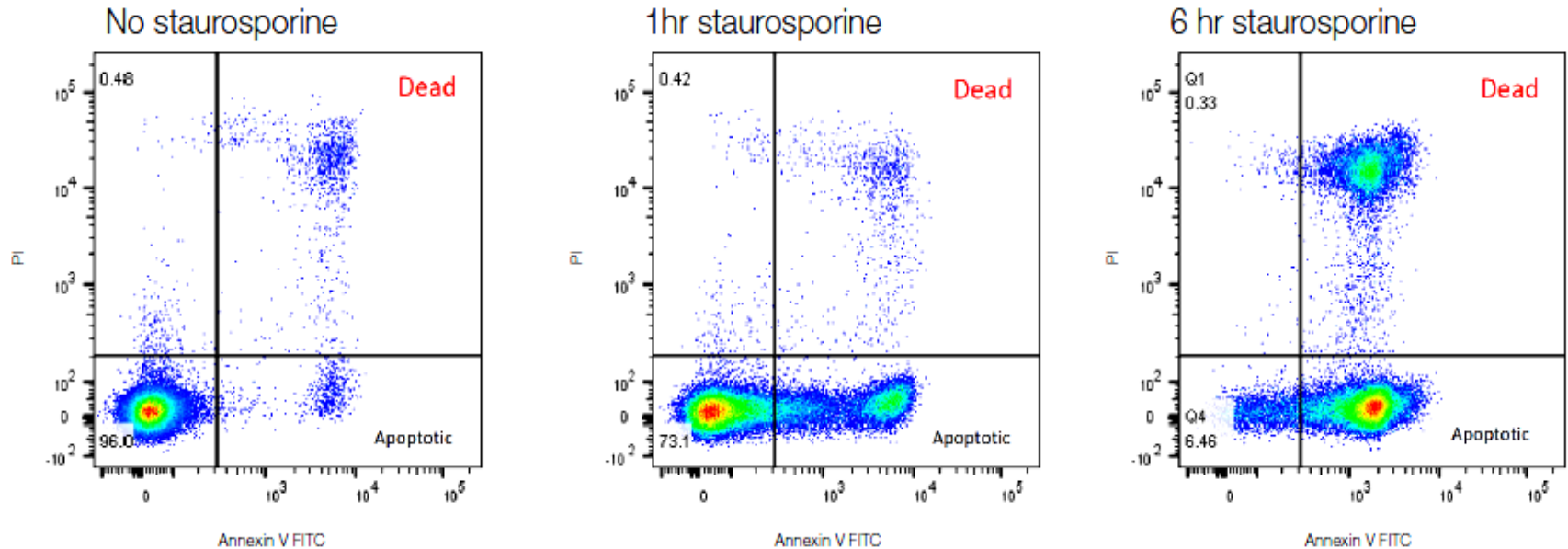
1. Komórki żywe
2. Wczesna faza apoptozy komórek
3. Późna faza apoptozy
4. Komórki nekrotyczne

Oznaczanie komórek apoptotycznych: inne podejście

Komórki po inkubacji z czynnikiem indukującym apoptozę wyznakowano PI i AnV/FITC.

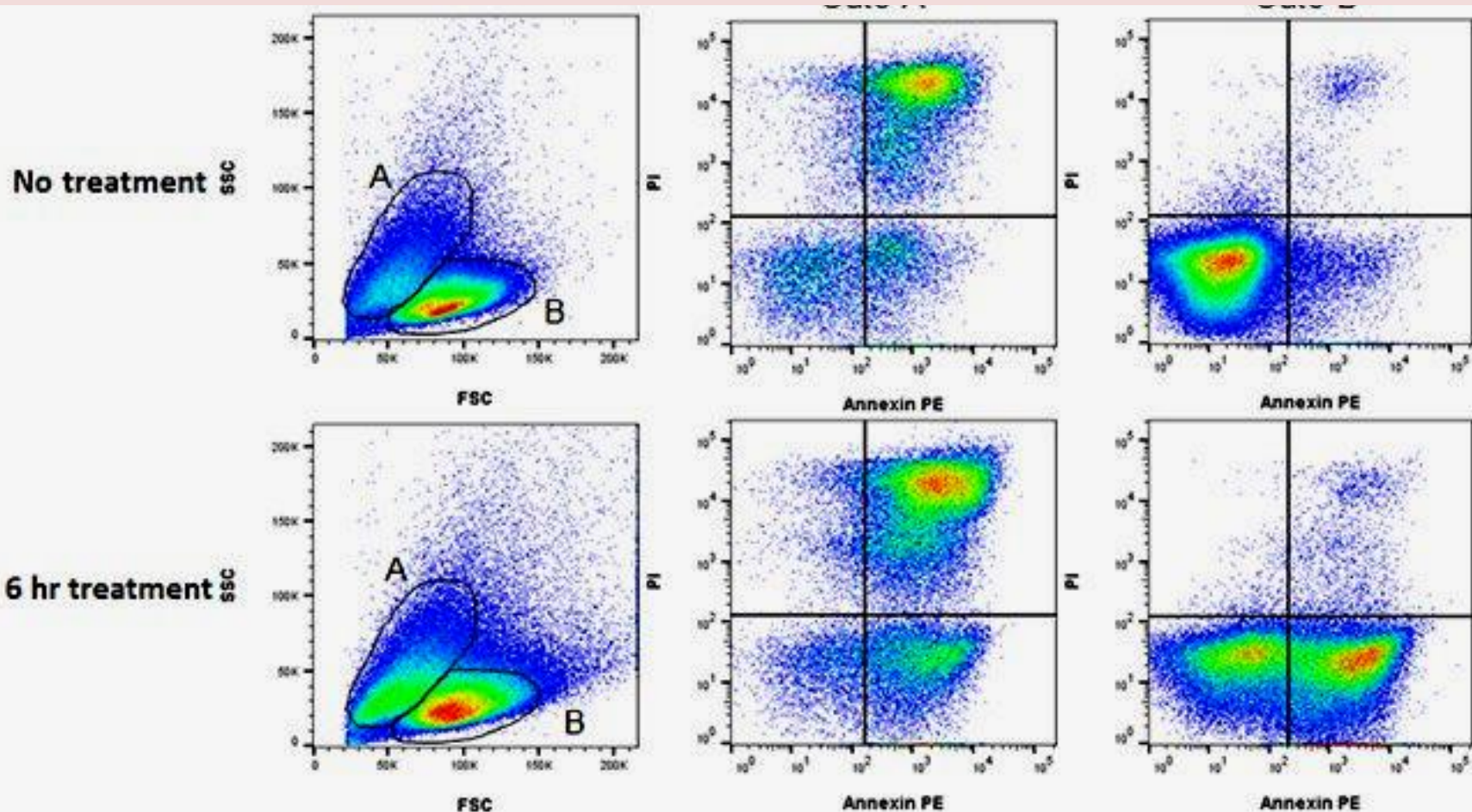
Komórki apoptotyczne – AnV+

Komórki martwe bez rozgraniczenia sposobu śmierci : AnV+PI+



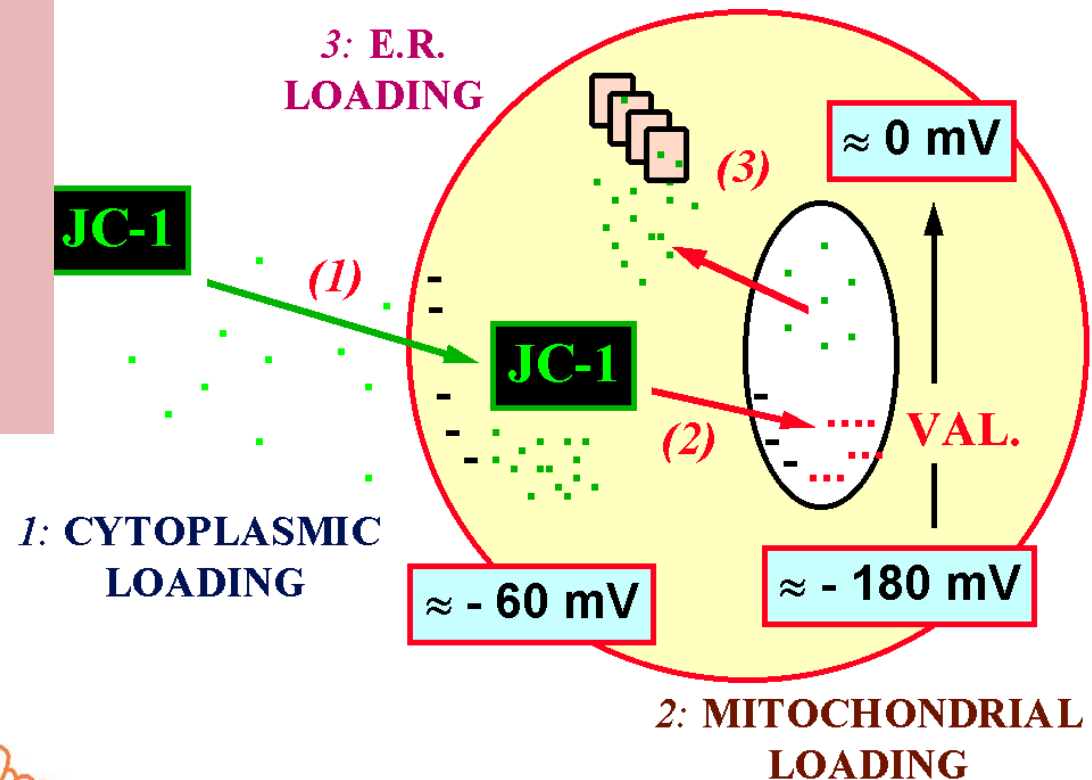
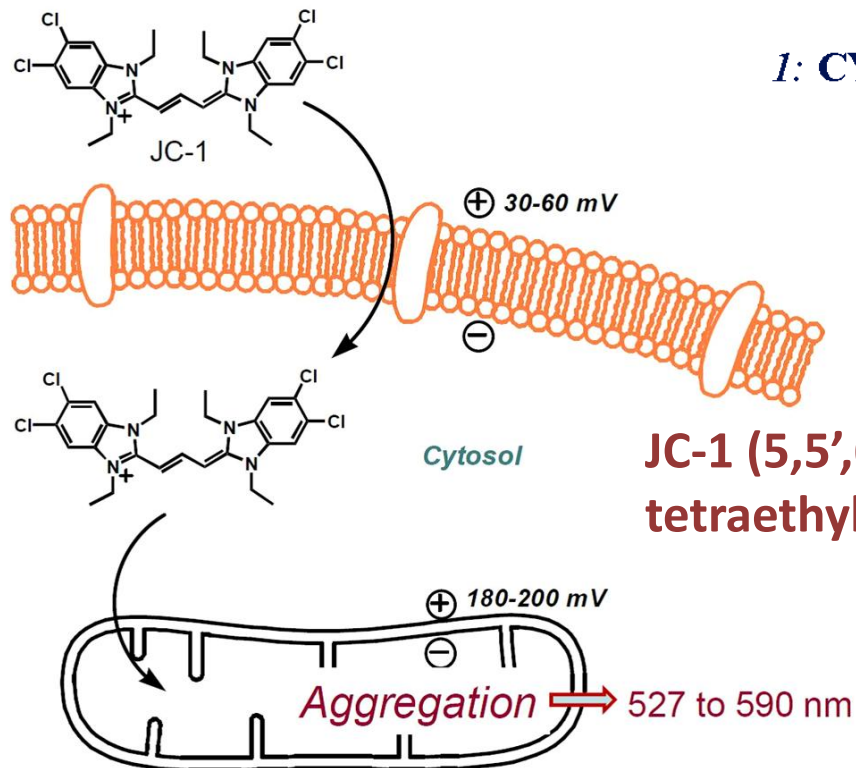
Oznaczanie komórek apoptotycznych: ważne wskazówki

Widać, że komórki znajdujące się w obszarze A zawierają głównie komórki martwe. Zatem, badając działanie czynników potencjalnie indukujących apoptozę analizujemy ich działanie wobec populacji w obszarze B. Widzimy więc, że komórki martwe i żywe można odróżnić na podstawie parametrów fizycznych jak wielkość (FSC) i ziarnistość (SSC).



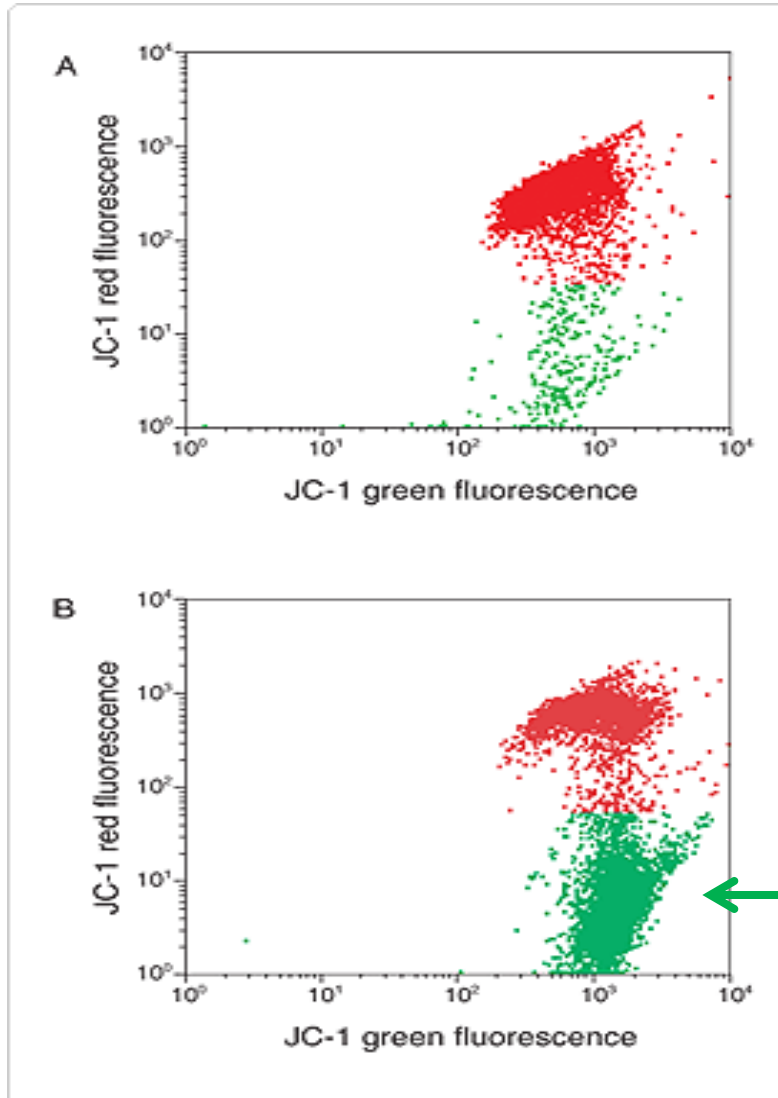
Analiza potencjału błonowego mitochondriów

- Utrata potencjału błonowego mitochondriów jest oznaką apoptozy
- JC-1 monomery w cytozolu-"zielona" fluorescencja
- JC-1 dimery w mitochondriach-"czerwona" fluorescencja.
- Zmniejszenie potencjału błonowego mitochondriów skutkuje przesunięciem komórek w kierunku FL1.



JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)

Analiza potencjału błonowego mitochondriów



CONTROL



Kierunek zmiany
emisji fluorescencji
świadczy o indukcji
apoptozy

CAMPTOTHECIN TREATED

więcej monomerów
JC-1 w komórkach
jest wyznacznikiem
apoptozy

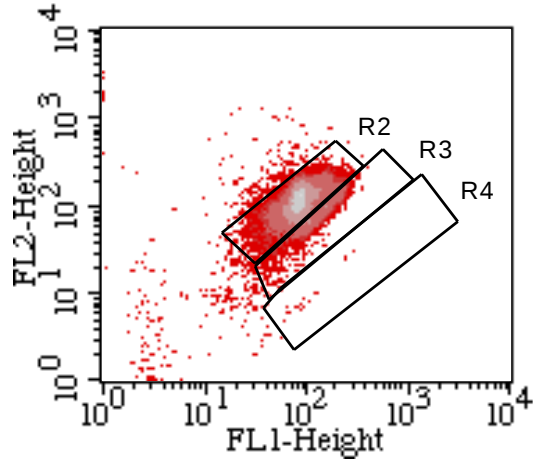
Analiza potencjału błonowego mitochondriów

Ctrl

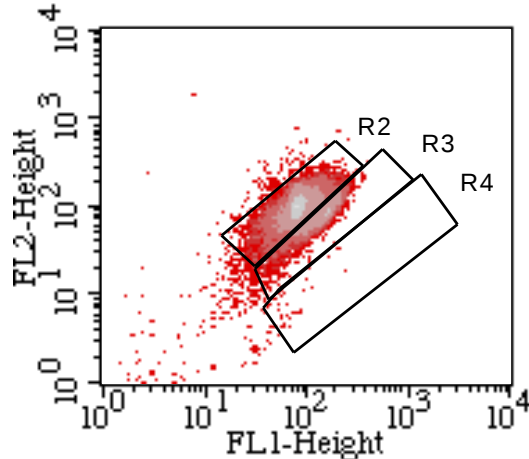
ASM

A

-Hc



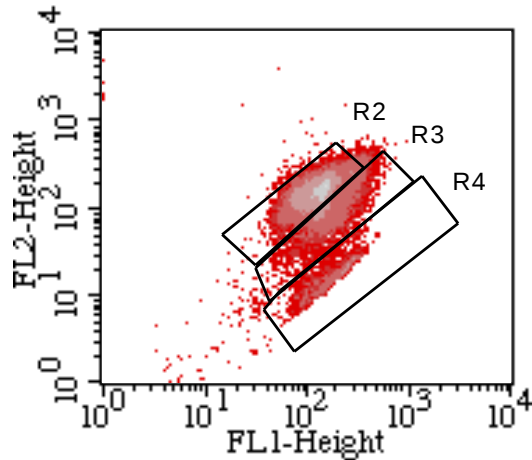
R2 - 88.30%
R3 - 7.51%
R4 - 0.06%



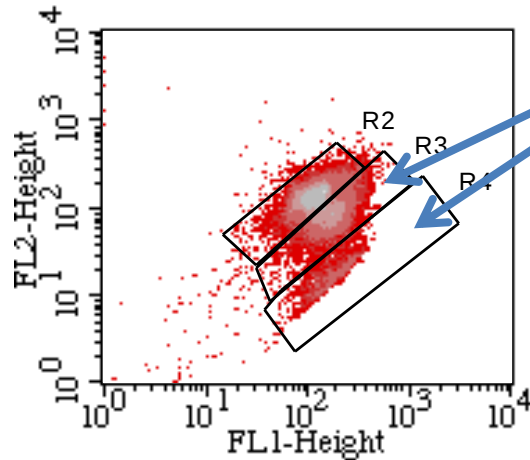
R2 - 77.65% *
R3 - 17.60% *
R4 - 0.07%

B

+Hc



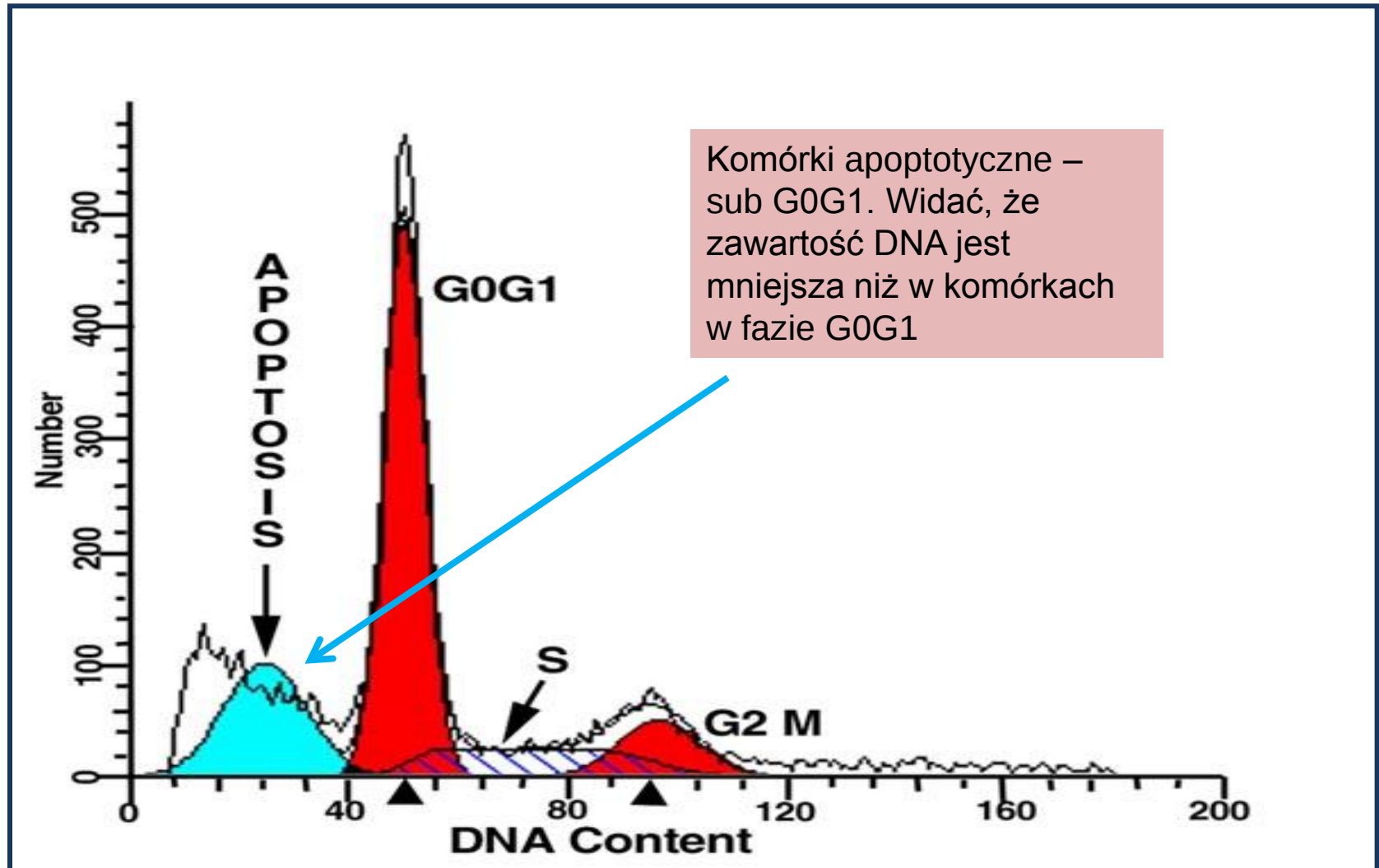
R2 - 76.16% #
R3 - 13.81% #
R4 - 6.21% #



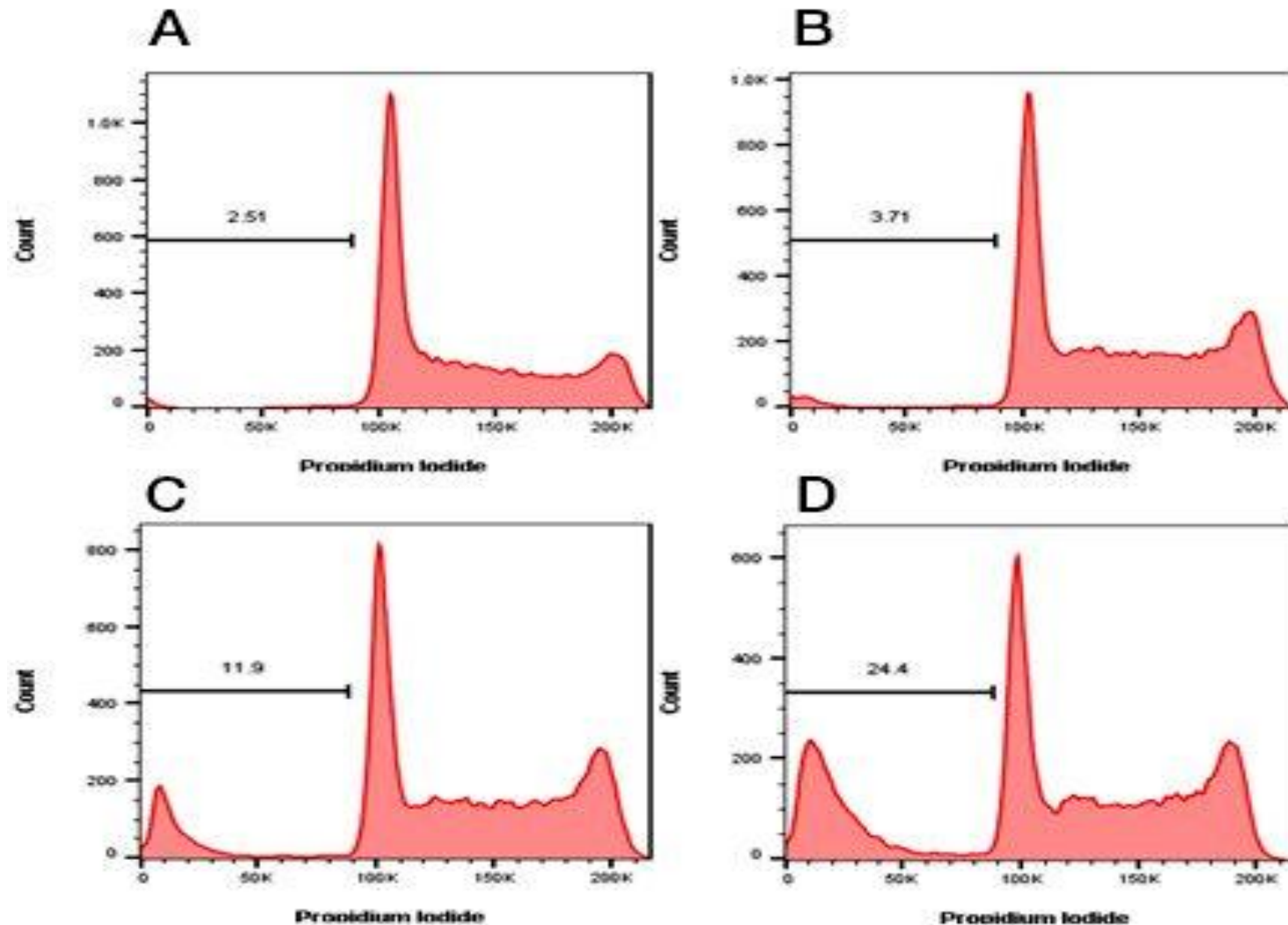
R2 - 60.27% * # ^
R3 - 29.18% * # ^
R4 - 7.19% # ^

Ustawienie cytometru (ustawienie kompensacji) umożliwia płynne śledzenie zmiany emisji fluorescencji i badanie kinetyki apoptozy.

Analiza cyklu komórkowego, apoptoza



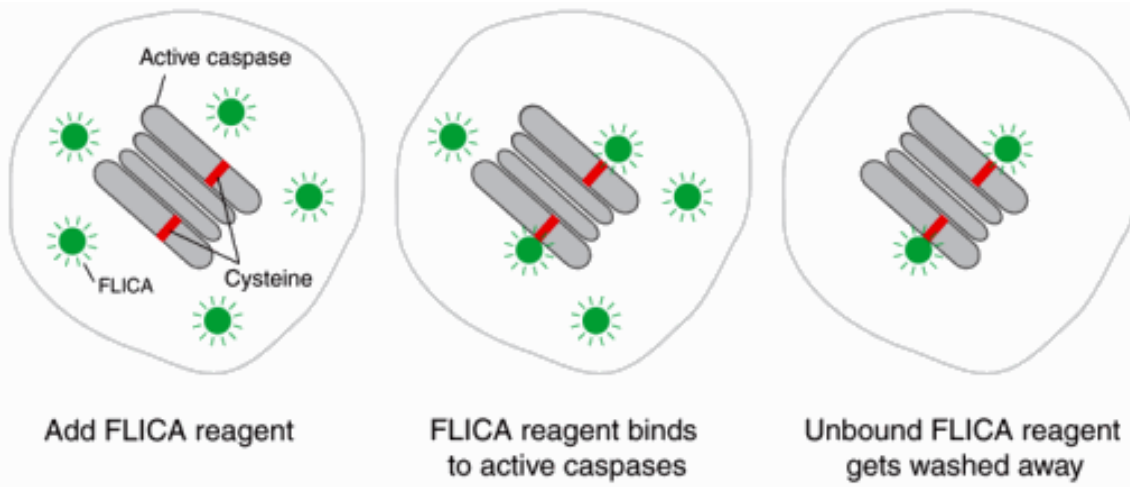
Analiza cyklu komórkowego: Sub G1 (Nicoletti assay), przykład analizy



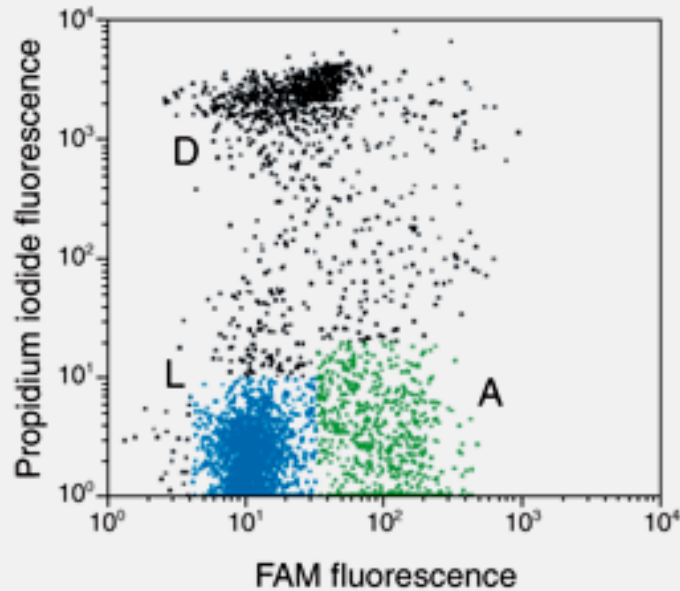
Analiza kaspaz

Caspases are a family of conserved cysteine proteases that play an essential role in apoptosis.

Mammalian caspases can be subdivided into three functional groups: initiator caspases (caspase 2, 8, 9 and 10), executioner caspases (caspase 3, 6 and 7), and inflammatory caspases (caspase 1, 4, 5, 11 and 12). Initiator caspases initiate the apoptosis signal while the executioner caspases carry out the mass proteolysis that leads to apoptosis. Inflammatory caspases do not function in apoptosis but are rather involved in inflammatory cytokine signaling and other types of cell death such as pyroptosis.



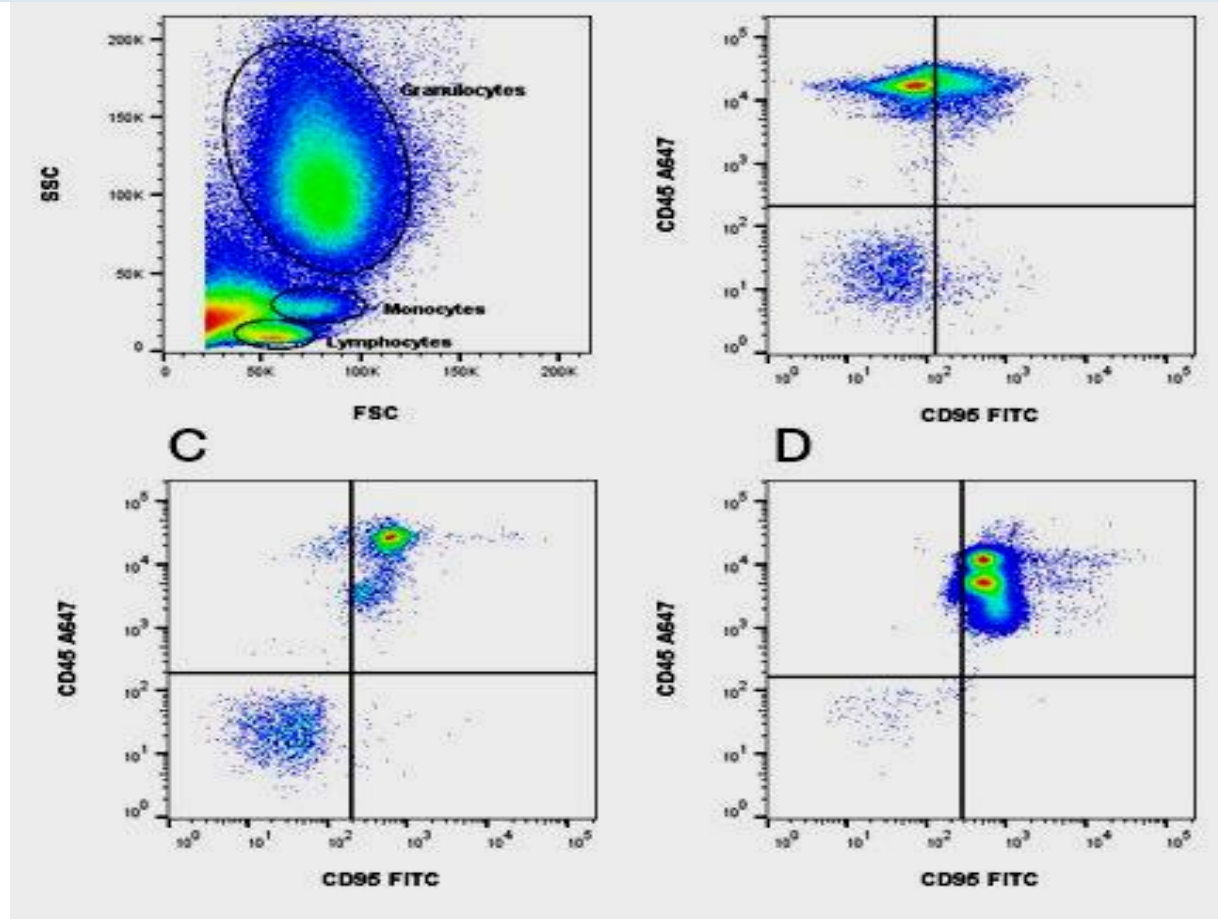
Detecting active caspases in apoptotic cells using the Vybrant FAM Caspase Assay Kits. Unbound FLICA (**FL**uorescent **I**nhibitor of **C**aspases) reagent diffuses out of the cell and is washed away. The green-fluorescent signal is a direct measure of the amount of active caspase that was present at the time the inhibitor was added.



Measure fluorescence

Detection of active caspases in living cells by flow cytometry. Jurkat cells were either treated with $10 \mu\text{M}$ camptothecin for 4 hours at 37°C and $5\% \text{CO}_2$ and stained with the FLICA reagent for caspase-3 and -7 and propidium iodide, both from the Vybrant FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit. Samples were analyzed on a flow cytometer with 488 nm excitation using 530 nm bandpass and 670 nm longpass emission filters.

Detekcja FAS (CD95): zwiększenie ekspresji tego białka w błonie powierzchniowej komórek zwiększa ich wrażliwość na indukcję apoptozy w wyniku interakcji Fas/FasL wskutek kontaktu z komórką cytotoksyczną.



CD95 expression in peripheral blood populations. A, lymphocytes, monocytes and granulocytes in the live cell fraction were identified by FSC and SSC. The level of CD95 /FAS receptor was determined in B, lymphocytes, C, monocytes and D, granulocytes. To help with identification, cells were counterstained with CD45

Analiza żywotności limfocytów w hodowli

Rozróżnianie komórek żywych i martwych

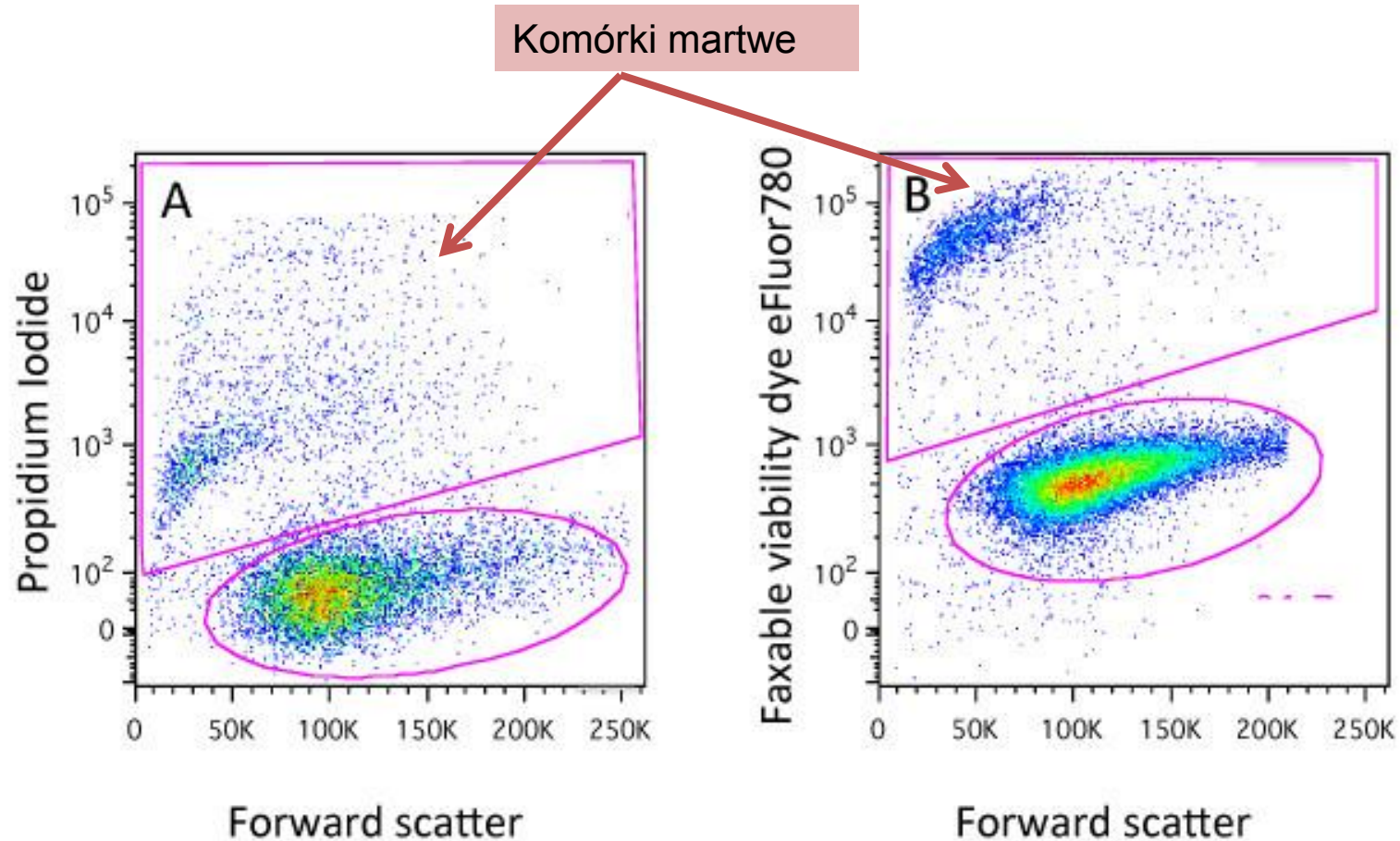
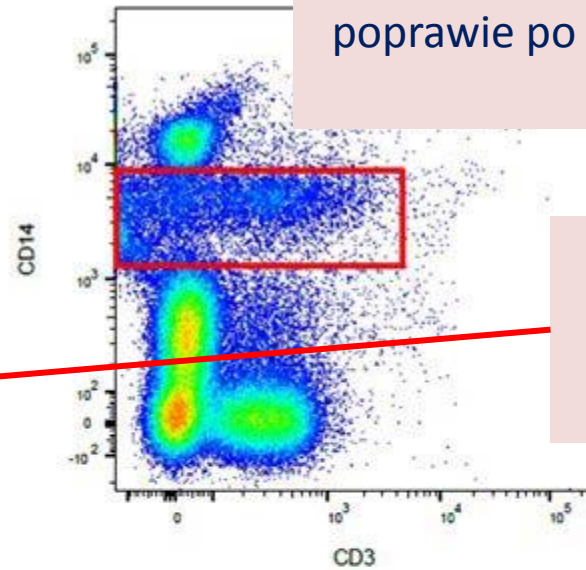
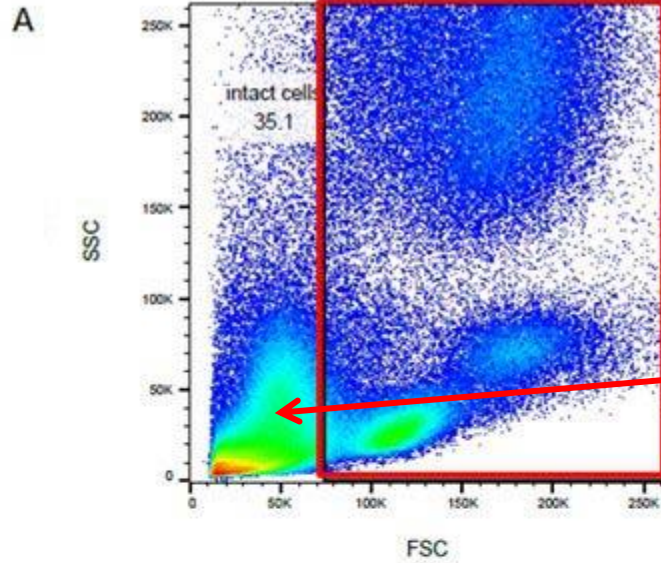
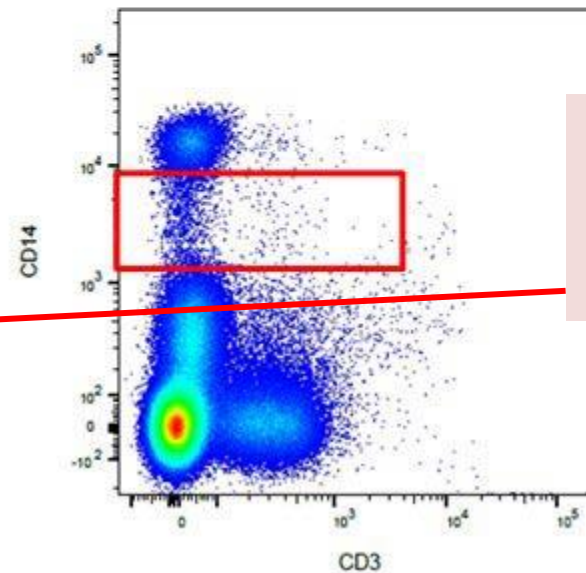
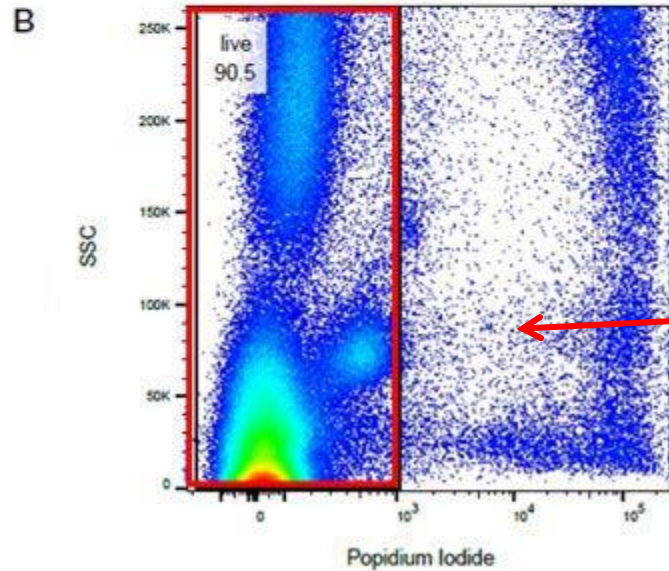


Figure 1. Panel A shows the use of a DNA binding dye, propidium iodide. Dead cells are positive for the dye (upper region). Panel B shows a fixable amine-binding dye (eFluor780). Again dead cells are identified by positive fluorescence in the upper region.

Jakość analizy fenotypowej komórek ulega poprawie po usunięciu z analizy martwych komórek.



Eliminacja z analizy komórek martwych na podstawie parametrów fizycznych



Eliminacja z analizy komórek martwych na podstawie barwienia jodkiem propidyny

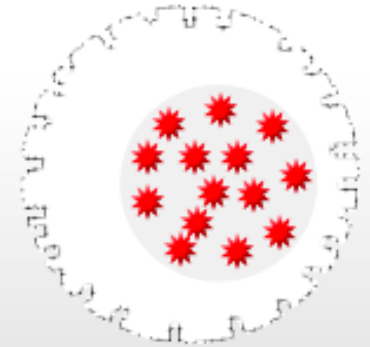
Using a live/dead stain can improve your staining. A. Use of forward and side scatter gating (red rectangle) may not remove all dead cells and some non-specific binding may still be present. B. Exclusion of dead cells using propidium iodide staining (red rectangle) means less non-specific binding and easier identification of positively stained populations. Images shown here are human peripheral blood stained with CD14 and CD3.

Barwniki stosowane do odróżnienia komórek martwych i żywych

LIVE

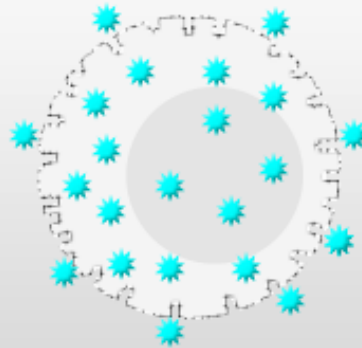
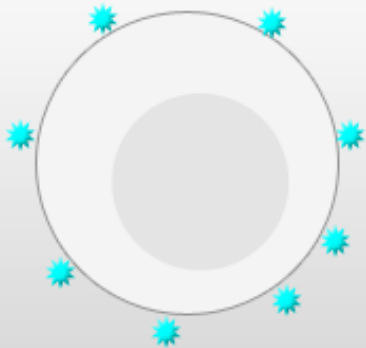


DEAD



LIVE

DEAD



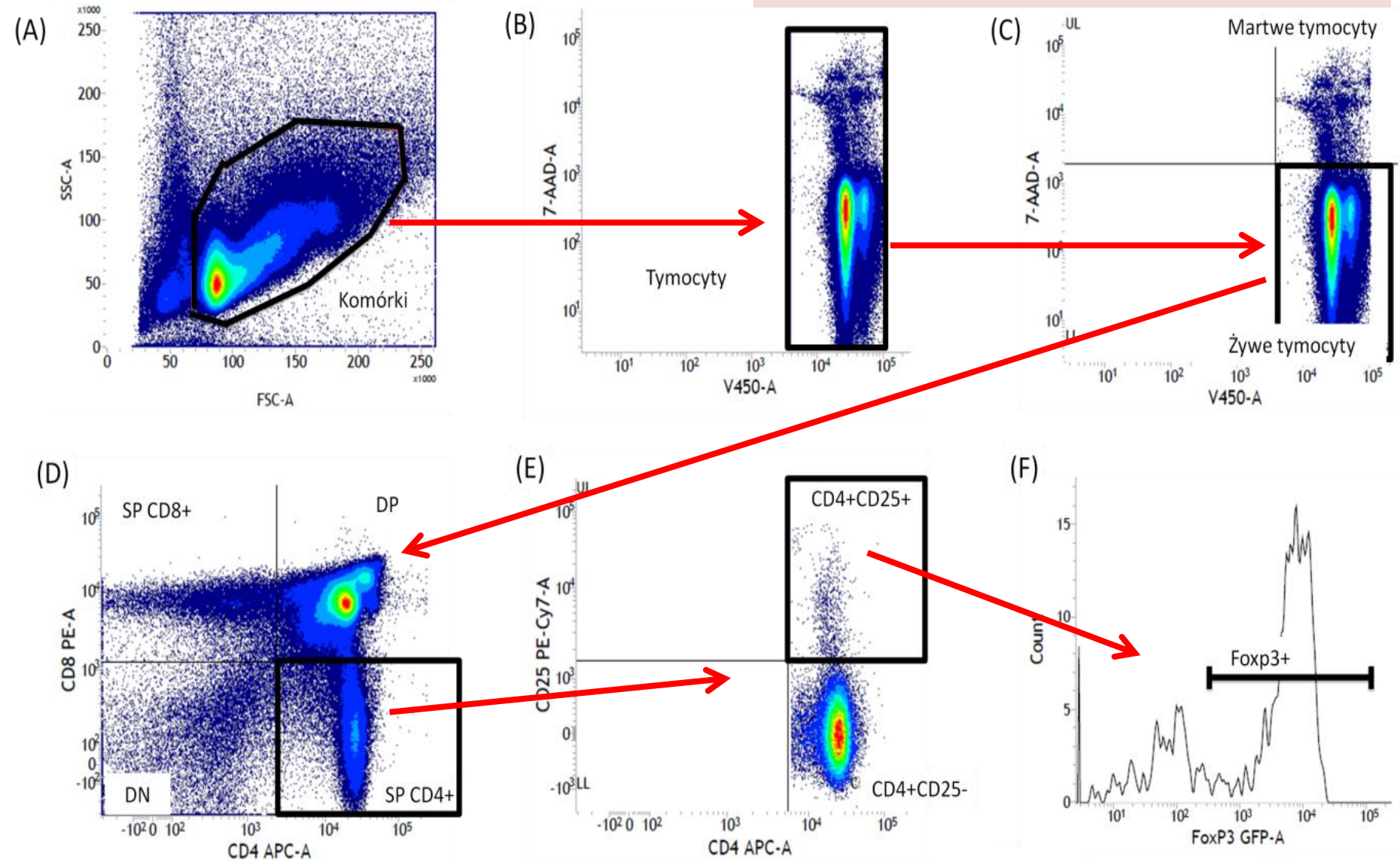
Zombie Dyes are fixable dyes that react with primary amine groups on proteins. Live cells exclude the dyes, so that only cell surface proteins will be labeled, while dead cells allow the entry of the dyes into the cytoplasm increasing the amount of total protein labeling. Thus, dead cells will be significantly brighter for Zombie fluorescence than live cells.

DRAQ7™, Propidium Iodide (PI) and 7-AAD (7-amino-actinomycin D) are high affinity DNA-binding dyes that are effectively excluded from live cells. Dead cells with compromised plasma membranes allow the passage of these dyes into the nucleus, where they will bind DNA. These dyes produce a bright fluorescent signal when excited by the appropriate lasers.

Przykłady analizy cytometrycznej

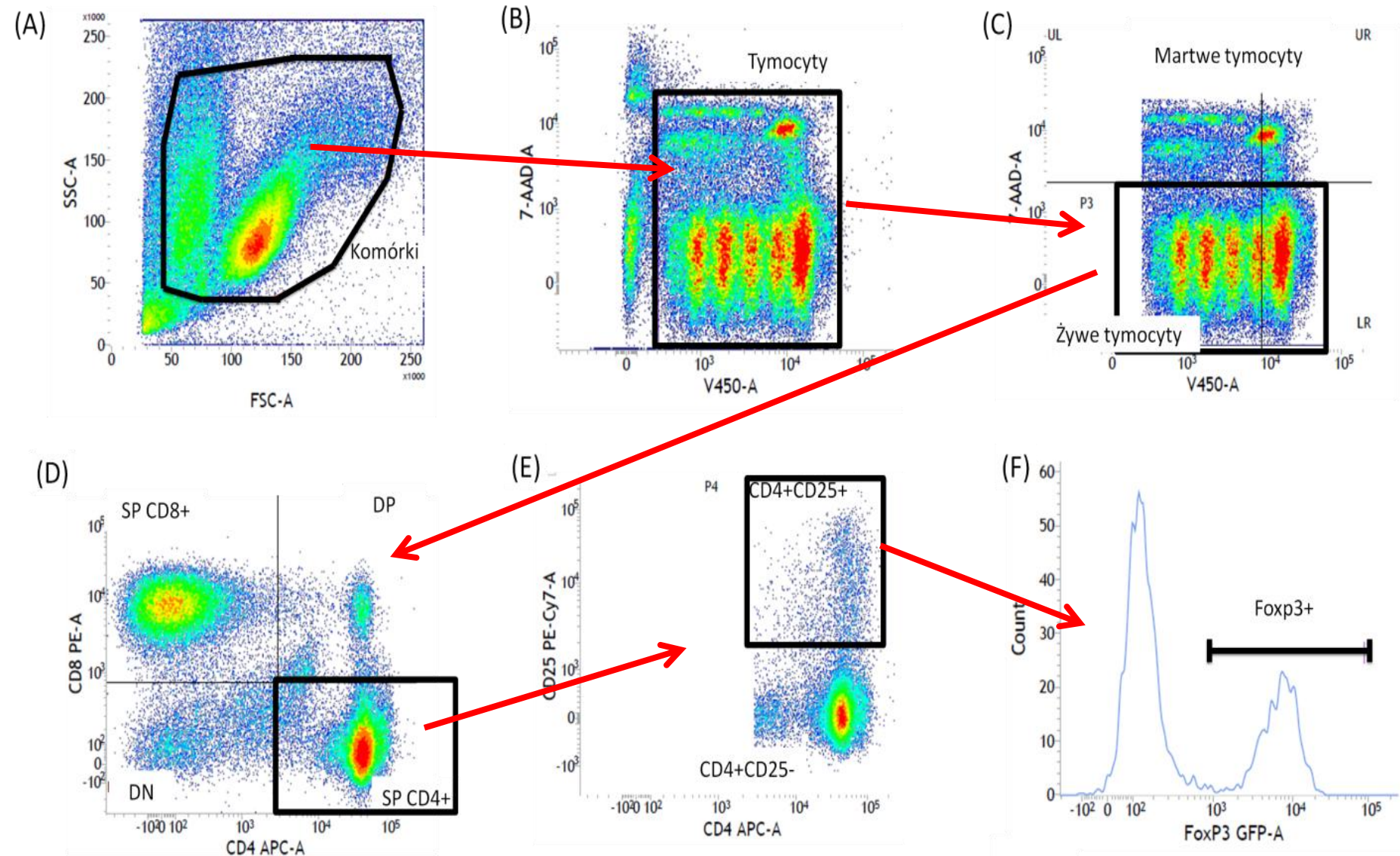
V450- barwnik wnikaący do komórek żywych i martwych, umożliwia badanie proliferacji

a) Strategia bramkowania tymocytów świeżo po izolacji z grasicy



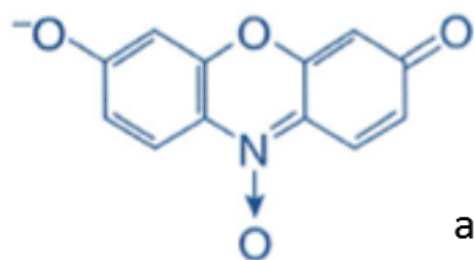
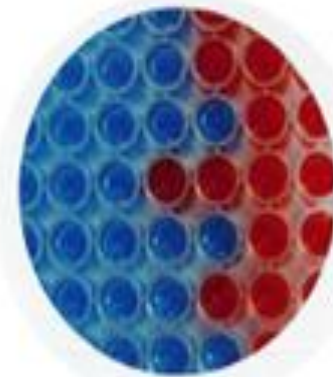
Przykłady analizy cytometrycznej

b) Strategia bramkowania tymocytów po 72h hodowli

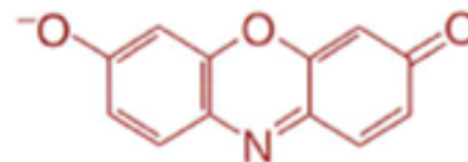


ALAMARBLUE

System opiera się na wskaźniku REDOX, który jednocześnie zmienia barwę i nabiera właściwości fluorescencyjnych w odpowiedzi na redukcję metabolizmu komórkowego. Ilość wytwarzanej fluorescencji jest proporcjonalna do liczby żywych komórek.



Redukcja przez
→
aktywne metabolicznie komórki



Resazuryna
Niebieska i słabo fluorescencyjna

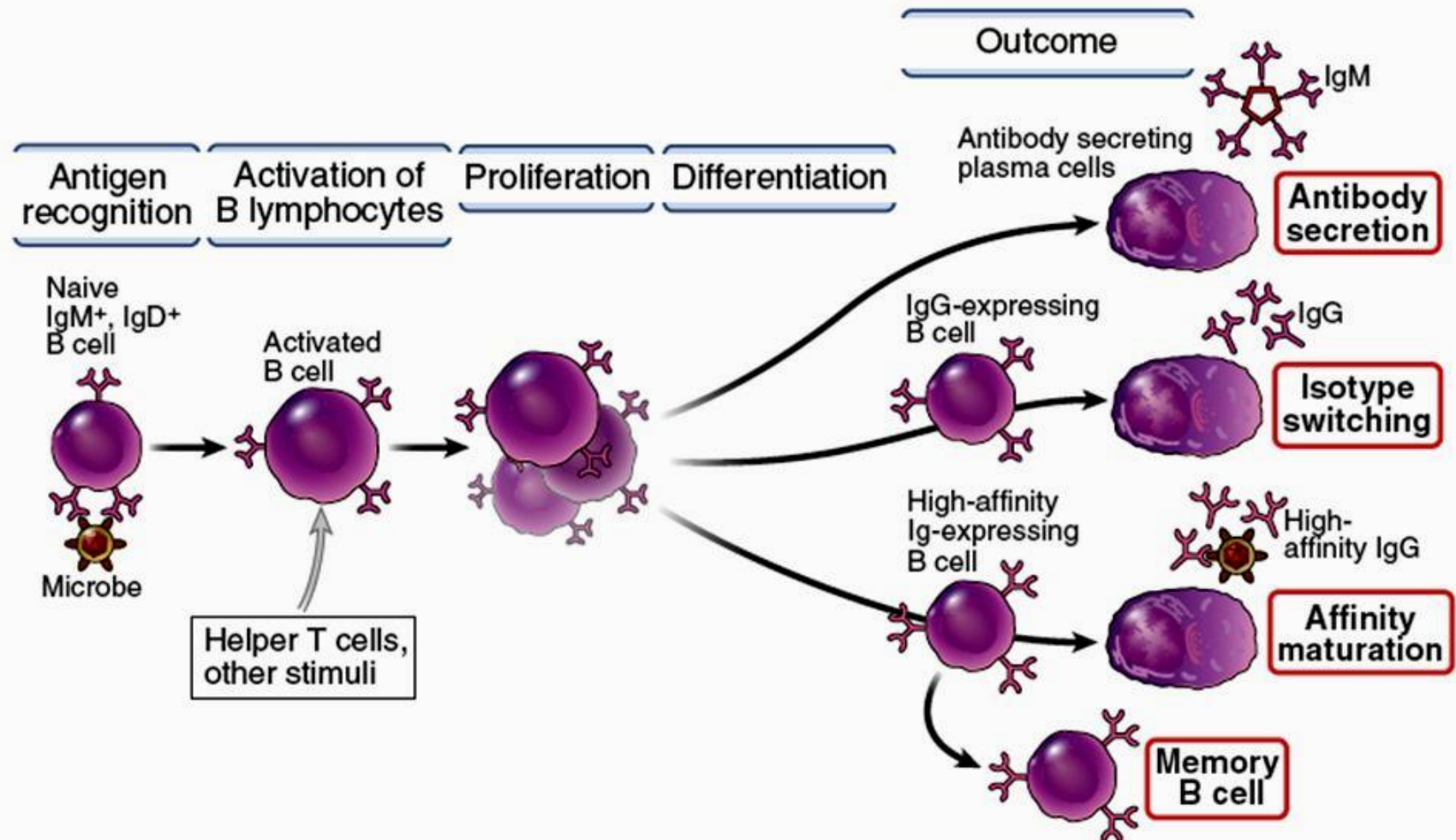
Resorufina
Czerwona i silnie fluorescencyjna

Sposoby badania aktywacji i funkcji efektorowych limfocytów B

Etapy aktywacji limfocytów B

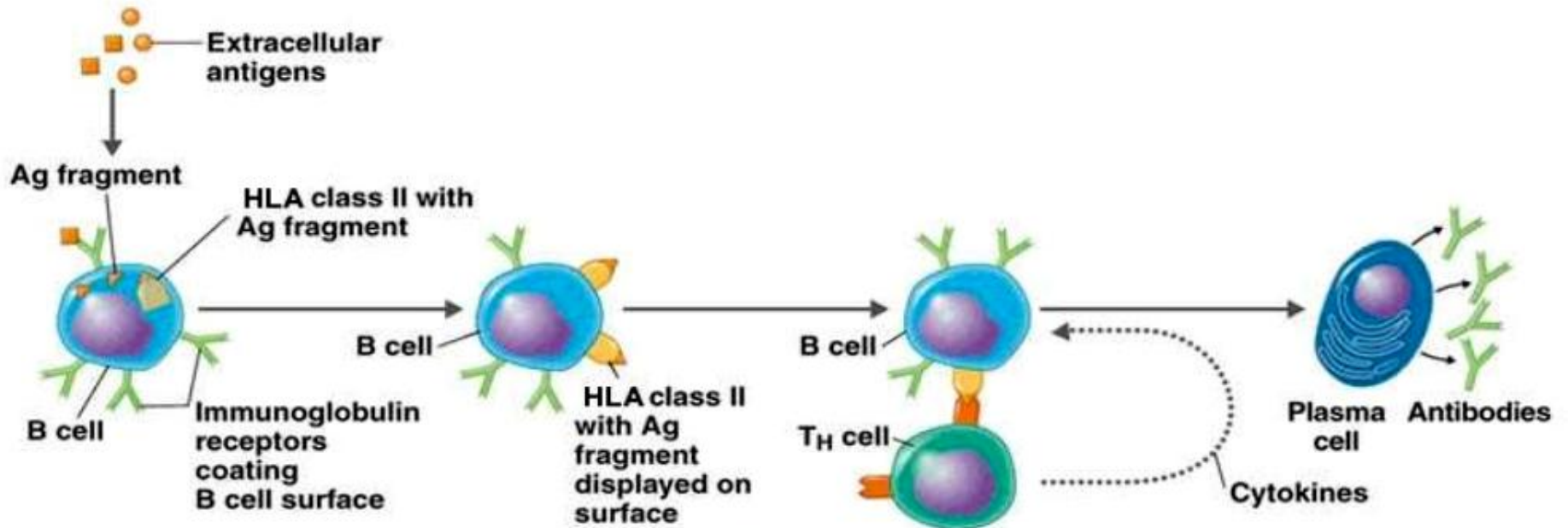
7

B cell activation and antibody production



Aktywacja limfocytów B

B CELL ACTIVATION

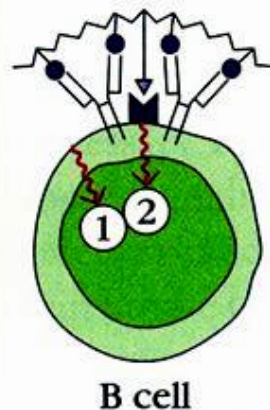


- 1** Immunoglobulin receptors on B cell surface recognize and attach to antigen, which is then internalized and processed. Within the B cell a fragment of the antigen combines with HLA class II.
- 2** HLA class II–antigen–fragment complex is displayed on B cell surface.
- 3** Receptor on the T helper cell (T_H) recognizes complex of HLA class II and antigen fragment and is activated—producing cytokines, which activate the B cell.
- 4** B cell is activated by cytokines and begins clonal expansion. Some of the progeny become antibody-producing plasma cells.

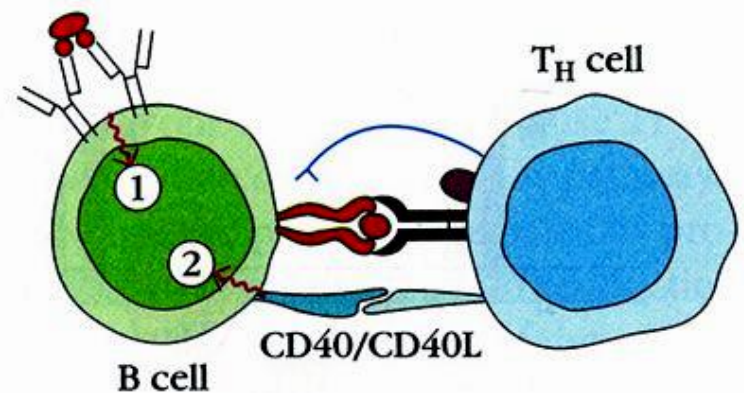
Two Signals Are Required for B Cell Activation

- TI Antigen
 - Binding of antigen provides both signal 1 and signal 2
- TD Antigen
 - Binding of antigen provides signal 1
 - Binding of Th2 cell via CD40:CD40L provides signal 2 (analogous to B7 for T cells)

(a) TI-1 antigen



(b) TD antigen

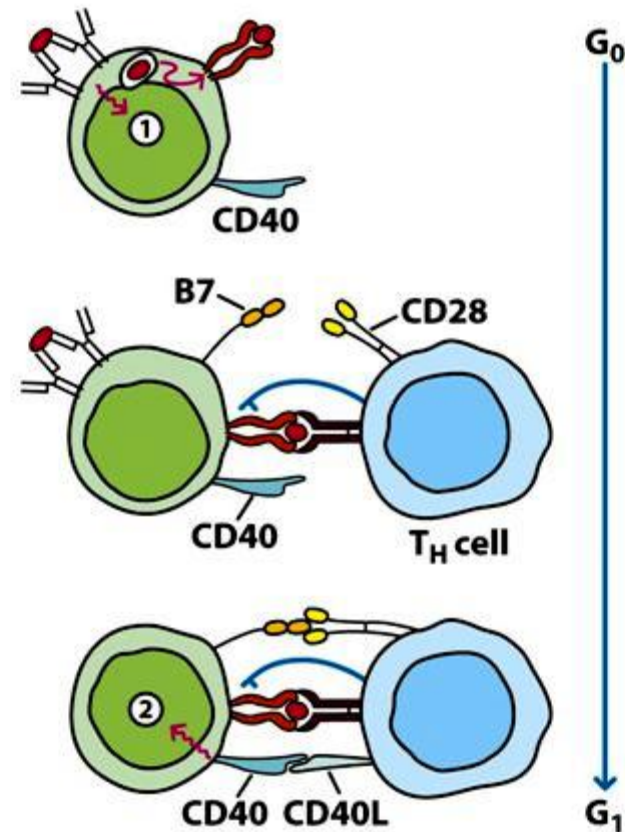


Sequence of Events in B-Cell Activation by a Thymus-Dependent Ag

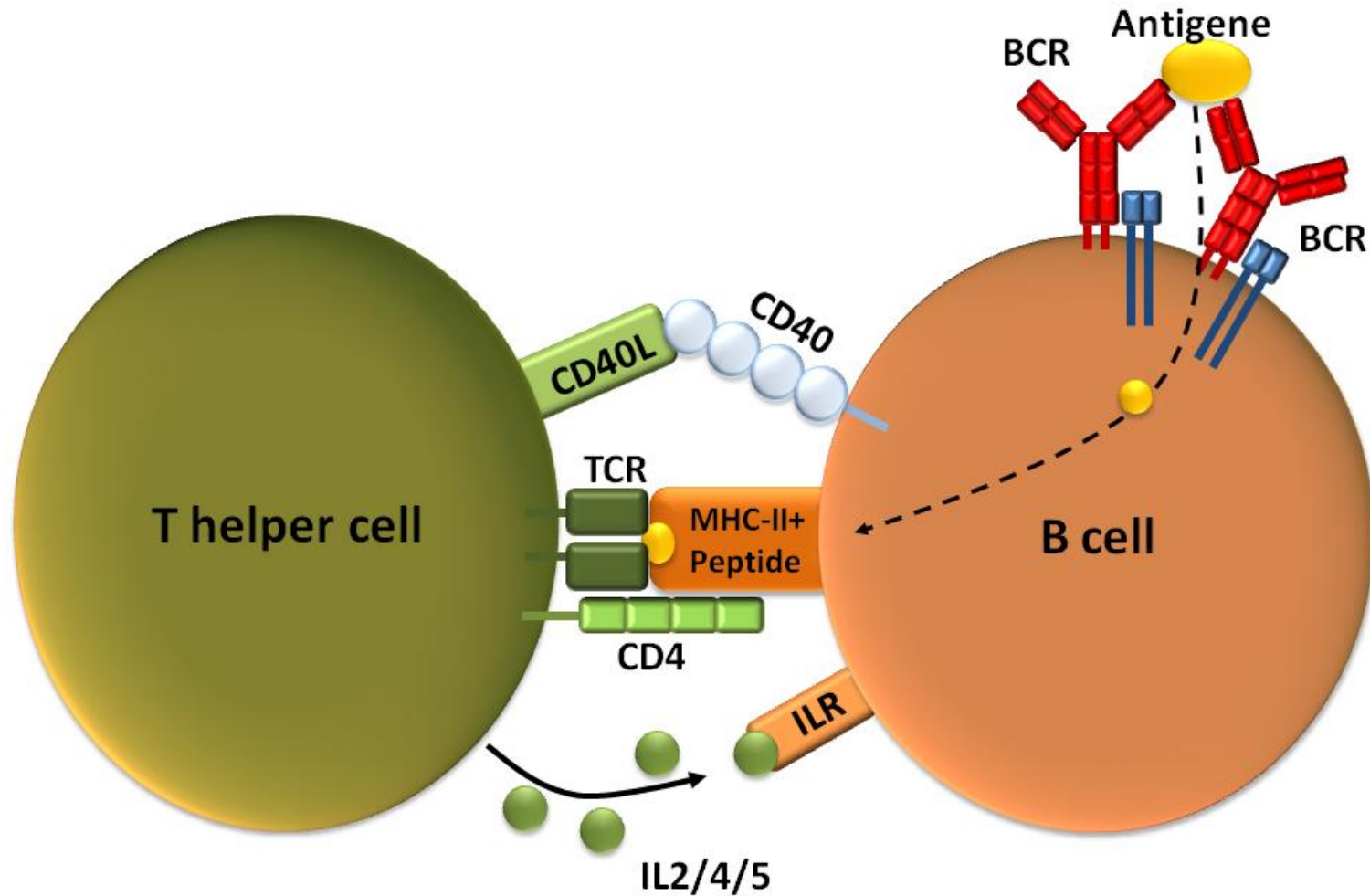
Antigen cross-links mIg, generating signal ①, which leads to increased expression of class II MHC and co-stimulatory B7. Antigen-antibody complexes are internalized by receptor-mediated endocytosis and degraded to peptides, some of which are bound by class II MHC and presented on the membrane as peptide-MHC complexes.

T_H cell recognizes antigen-class II MHC on B-cell membrane. This plus costimulatory signal activates T_H cell.

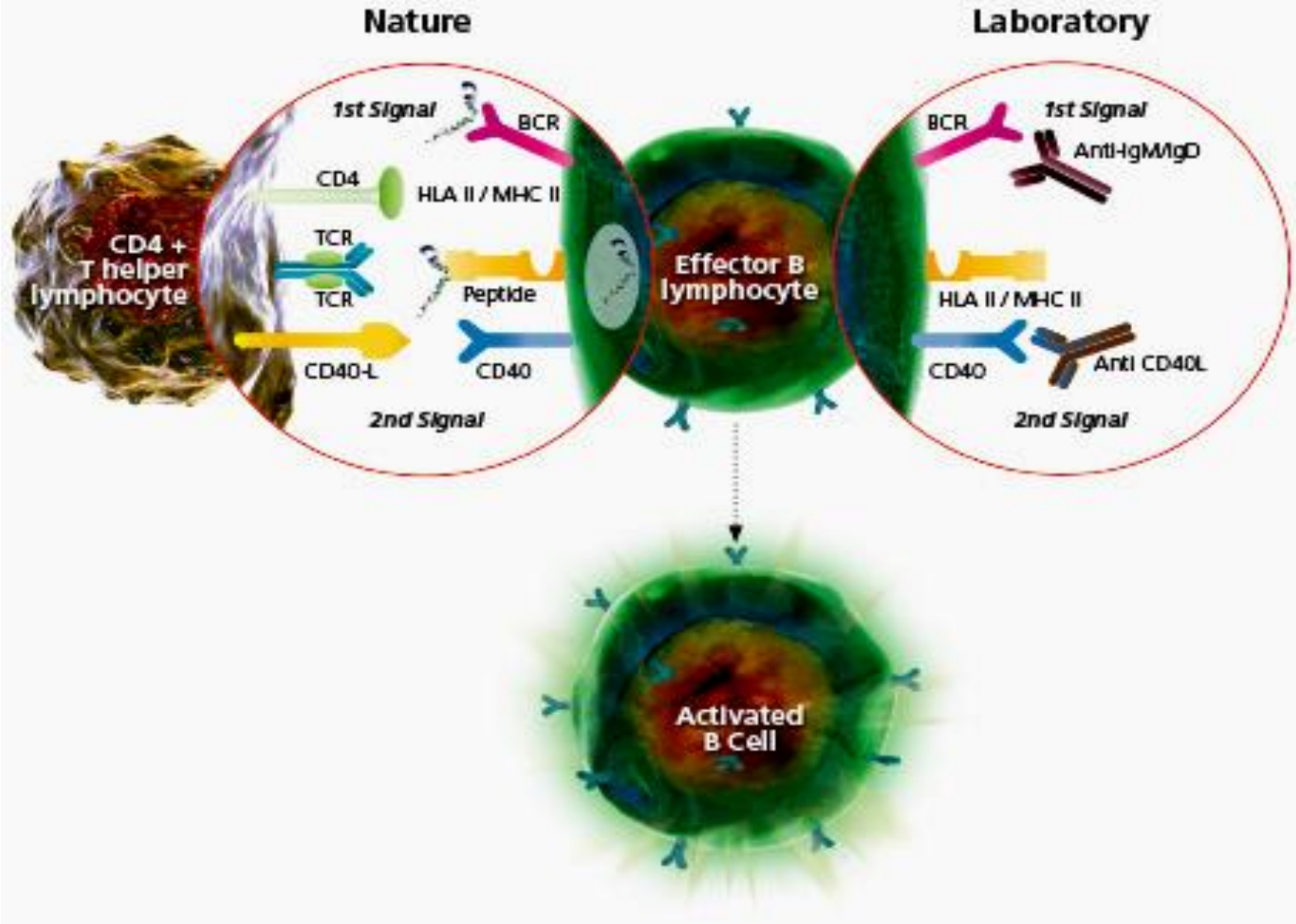
1. T_H cell begins to express CD40L.
2. Interaction of CD40 and CD40L provides signal ②.
3. B7-CD28 interactions provide costimulation to the T_H cell.



Niezbędne sygnały aktywacji limfocytów B przez Ag białkowe



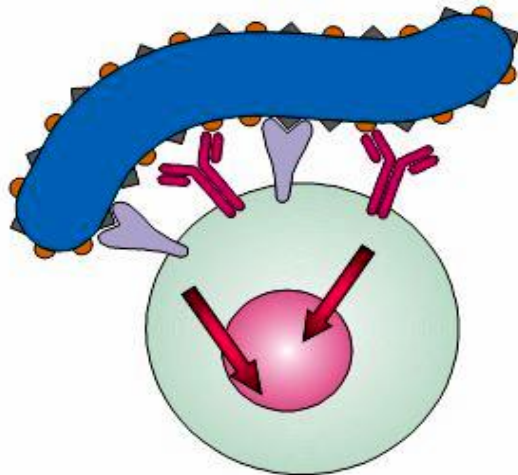
Symulacja warunków fizjologicznych



B cell activation without the help of T cells

T-INDEPENDENT ANTIGEN

TI-1

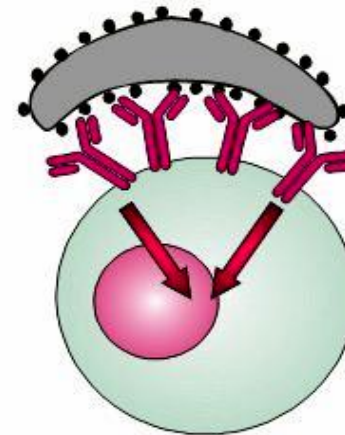


B cell

Complete absence of T-cell help. No interactions no cytokines. At high concentration B-cell mitogens. Simultaneous activation of BCR and other receptors on B cells (i.e. LPS binding protein /CD14/TLR4) induces the B cells to proliferate and differentiate

T-INDEPENDENT ANTIGEN

TI-2



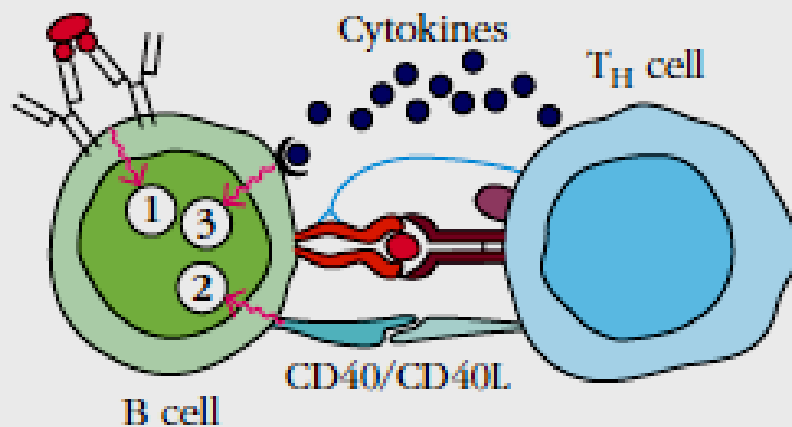
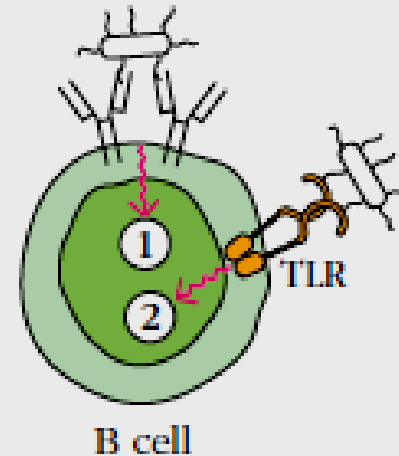
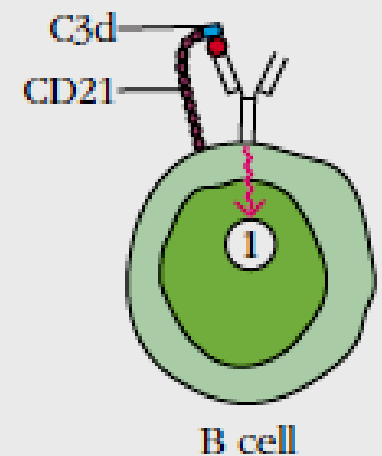
Strong crosslinking of BCR by repetitive polysaccharide or protein epitopes. Cytokine help provided by T, NK cells etc. TI-2 usually do not act as polyclonal B cell activators.



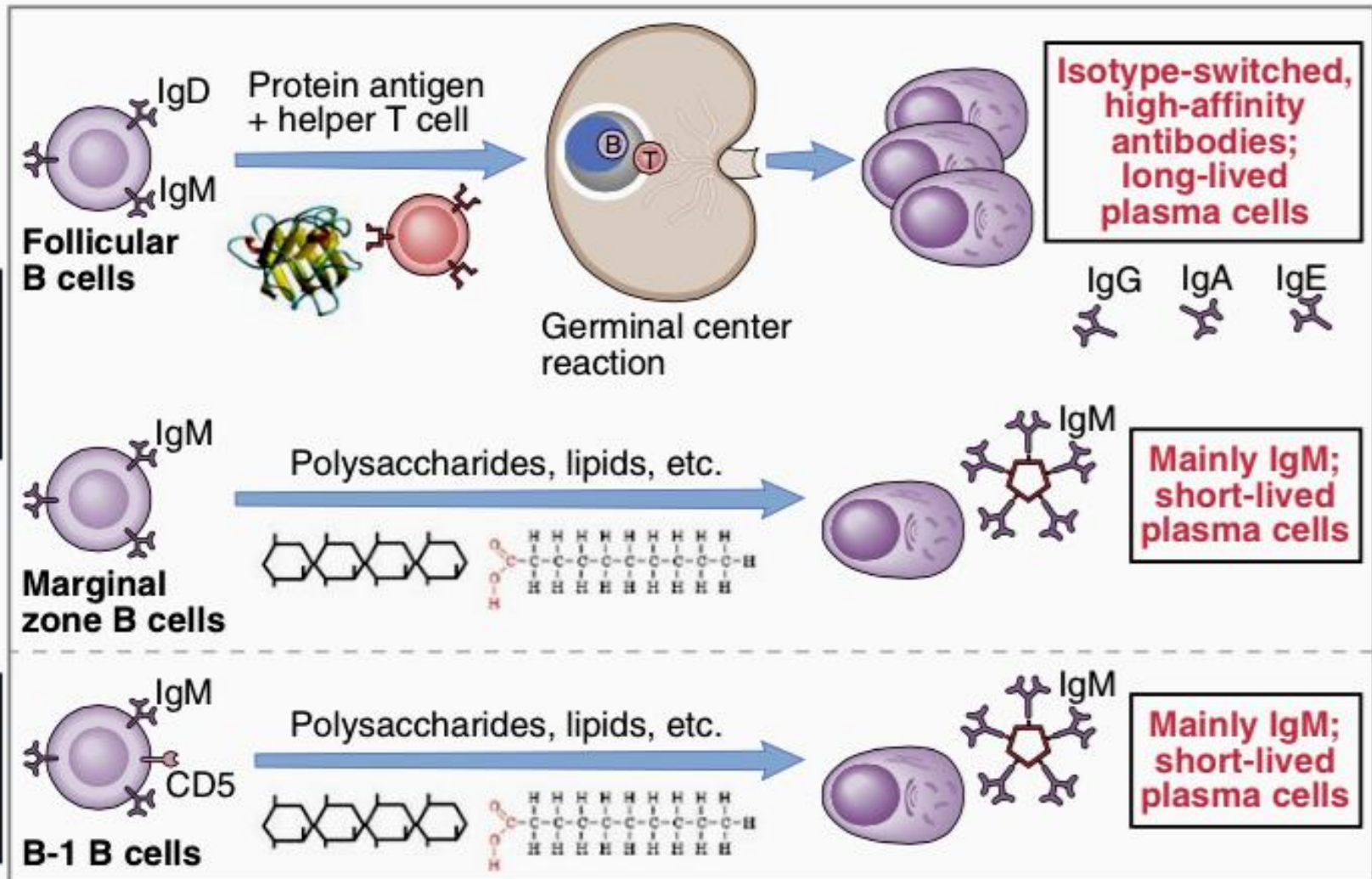
B CELL ACTIVATION

TABLE 12-3**Properties of thymus-dependent and thymus-independent antigens**

Property	TD antigens	TI antigens	
		Type 1	Type 2
Chemical nature	Soluble protein	Bacterial cell-wall components (e.g., LPS)	Polymeric protein antigens; capsular polysaccharides
Humoral response			
Isotype switching	Yes	No	Limited
Affinity maturation	Yes	No	No
Immunologic memory	Yes	No	No
Polyclonal activation	No	Yes (high doses)	No

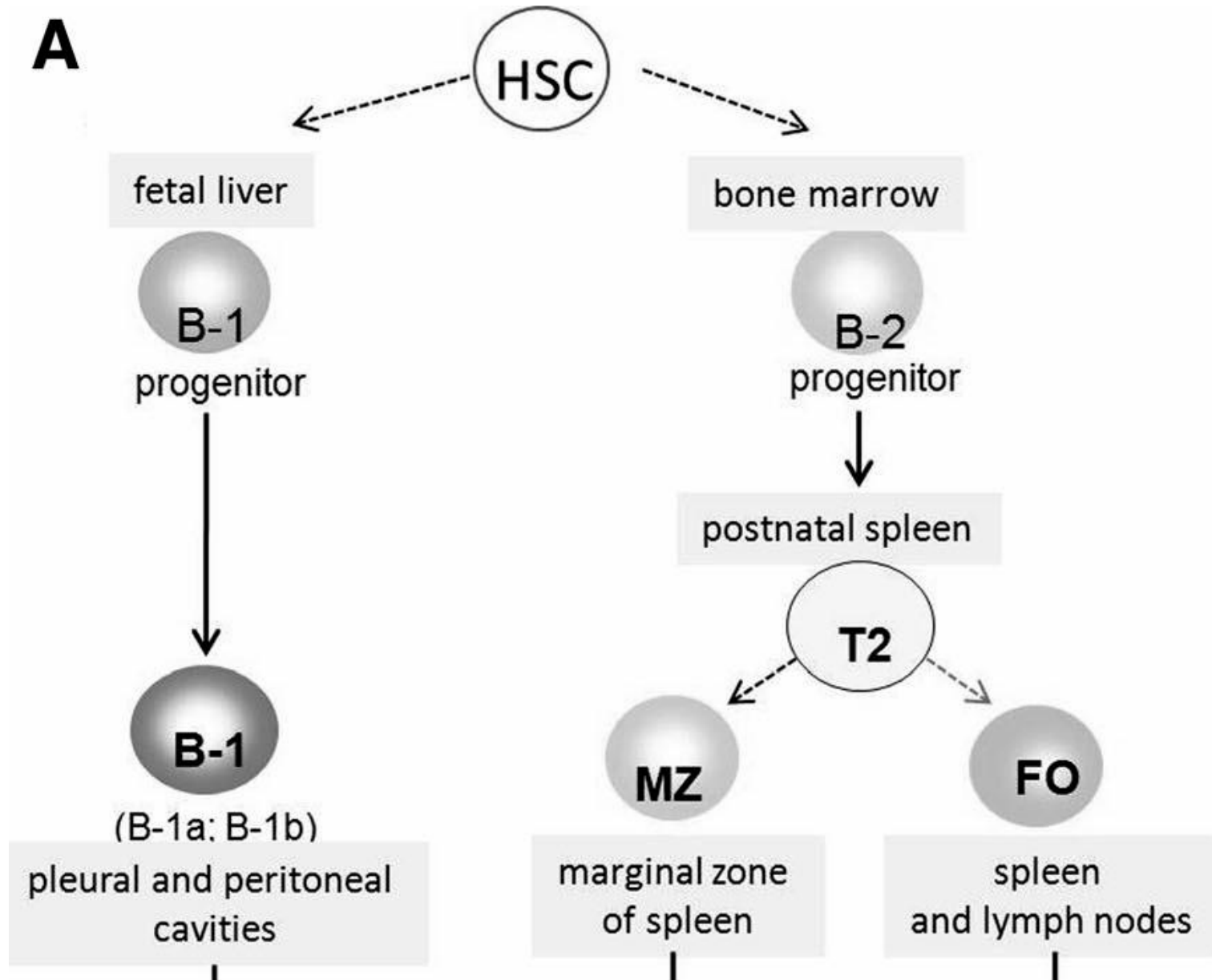
(a) TD antigen**(b) TI-1 antigen****(c) TI-2 antigen**

Limfocyty B-1 i B-2



Limfocyty B-1 i B-2

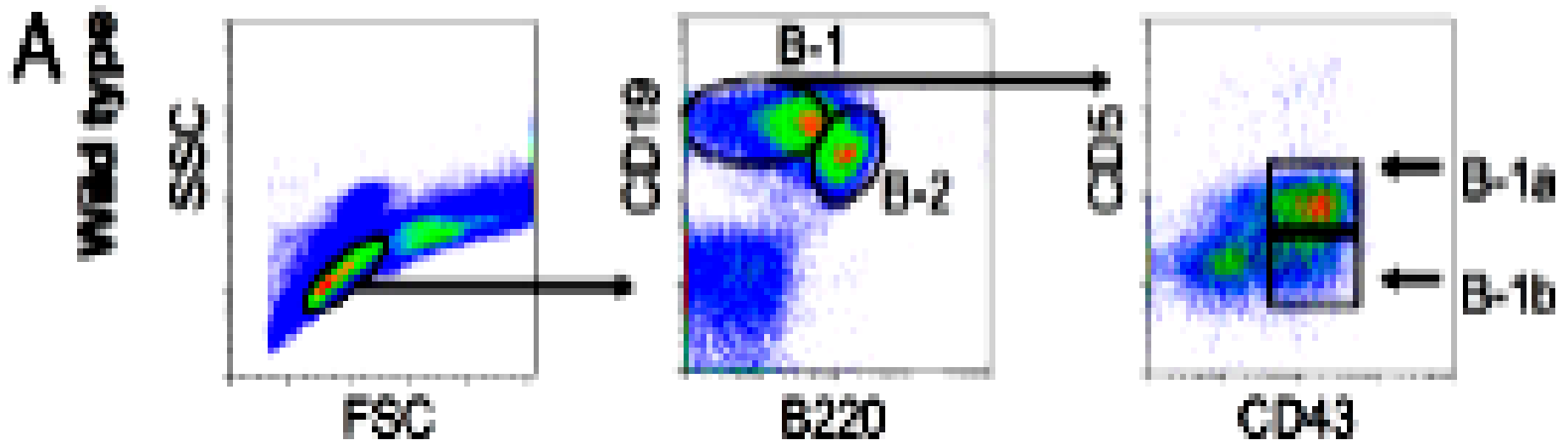
A



Charakterystyka fenotypowa limfocytów B

Cell surface phenotype	CD5 ⁺ CD19 ^{hi} CD1d ^{mid} CD23 ⁻ CD43 ⁺ IgM ^{hi} IgD ^{low}	CD5 ⁻ CD19 ^{hi} CD1d ^{mid} CD23 ⁻ CD43 ⁺ IgM ^{hi} IgD ^{low}	CD5 ⁻ CD19 ^{mid} CD1d ^{hi} CD21 ^{hi} CD23 ⁻ CD43 ⁻ IgM ^{hi} IgD ^{low}	CD5 ⁻ CD19 ^{mid} CD1d ^{mid} CD23 ⁺ CD43 ⁻ IgM ^{low} IgD ^{hi}	CD5 ⁺ CD19 ^{hi} CD1d ^{hi} CD21 ^{hi/mid} CD23 ^{+/+} CD43 ⁻ IgM ^{hi} IgD ^{low/mid}
Frequency in total splenic B cell population	2%	<1%	15%	>70%	1%
	B-1a B-1b  B-1 cells	Marginal zone Follicular  B-2 cells	Regulatory B cell  Relationship to B-1 and B-2 cells unclear		

Jak odróżnić B-1 od B-2?



Często limfocyty nie posiadają typowo specyficznych markerów. Mają te same, ale ich poziom ekspresji się różni.

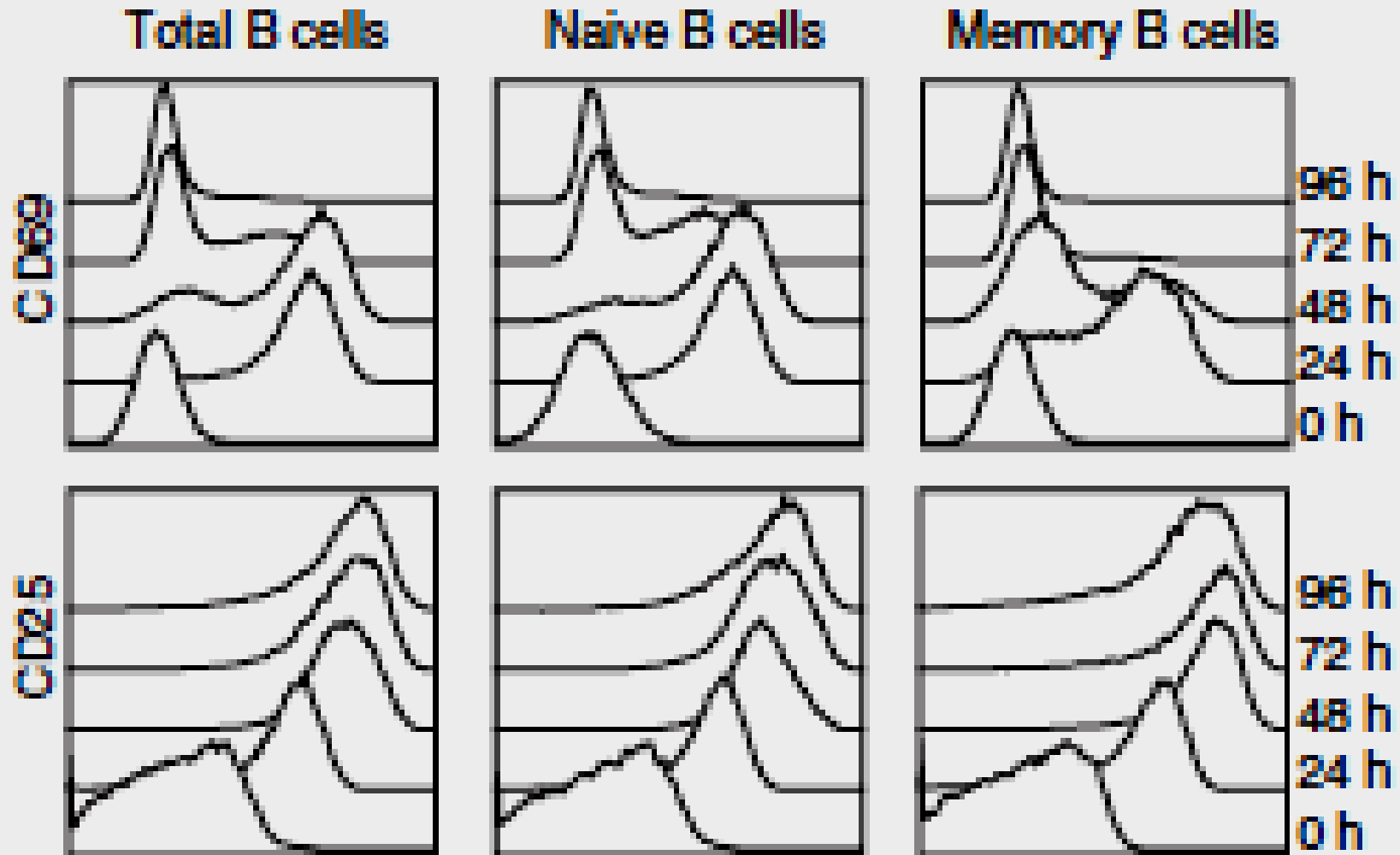
Limfocyty B-1: CD19^{high} B220^{low}.

W tej populacji można zidentyfikować B-1a i B-1b na podstawie ekspresji innych markerów jak CD5 i CD43.

Limfocyty B-2: CD19^{low} B220^{high}

Markery aktywacji limfocytów B

Ekspresja markerów aktywacji CD69 i CD25 zwiększa się podczas aktywacji limfocytów B

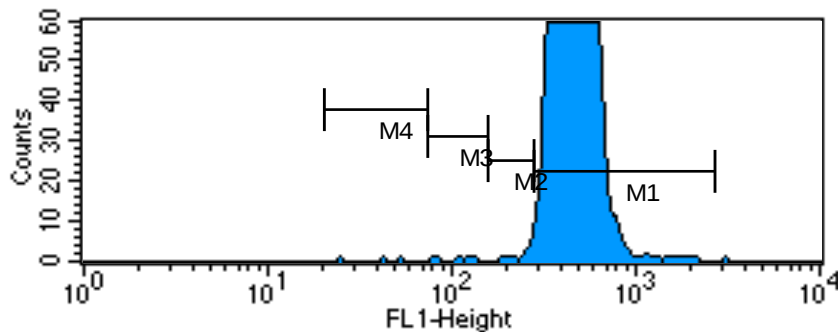


Badanie aktywności supresorowej limfocytów Treg.

Przykład badania aktywności supresorowej

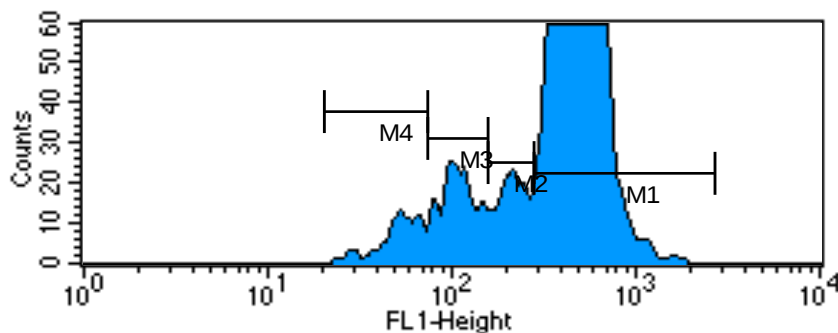
limfocytów Treg: zastosowano test proliferacji. Limfocyty docelowe

wyznakowano CFSE. Widać, że liczba rund podziałowych nie uległa zmianie w hodowli z limfocytami Treg, ale zmniejszył się odsetek proliferujących limfocytów T

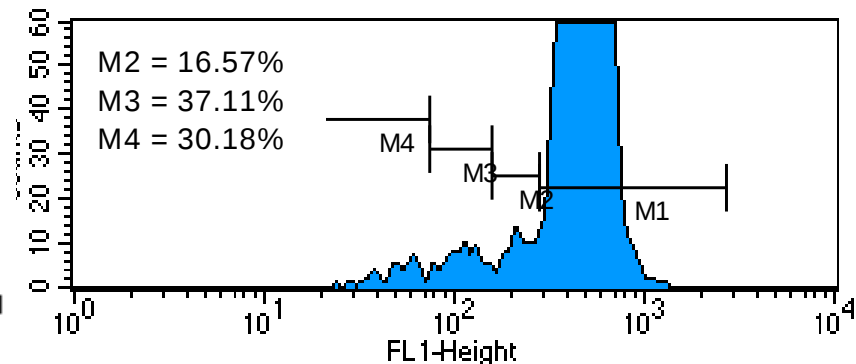


Ctrl

Aktywność supresorową wykazują także limfocyty Breg. Podobnie jak limfocyty Treg mogą hamować proliferację aktywowanych limfocytów T. Zatem ich zdolność do hamowania proliferacji limfocytów docelowych można badać z wykorzystaniem tej samej metody.



a-CD3+a-CD28 – activated T cells



a-CD3+a-CD28 – activated T cells + Treg

CFSE

Dziękuję za uwagę