

SELEKCE PLAZMATICKÝCH BUNĚK

ISOLATION OF PLASMA CELLS

ČUMOVÁ J.^{1,2}, BUREŠOVÁ I.^{1,2}, KOVÁŘOVÁ L.², KYJOVSKÁ D.^{1,2}, VIDLÁKOVÁ P.^{1,2}, SUSKÁ R.², PERUTKA T.¹, MORAVCOVÁ J.¹, RYCOVÁ M.¹, PENKA M.², HÁJEK R.^{1,2,3}

¹ UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM-ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

² LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

³ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

Souhrn

V našich laboratořích jsou plazmatické buňky (PB) ze vzorků aspiračních biopsií kostních dření pacientů nemocných mnohočetným myelomem (MM) separovány magneticky aktivovanou separací buněk (MACS) a/nebo fluorescenčně aktivovanou separací buněk (FACS). Pro selekce se používají protilátky CD138 MACS MicroBeads nebo fluorescenčně značené, které jsou namířeny proti povrchovému antigenu CD138 plazmatických buněk, známému jako syndecan-1. Izolované PB jsou využity pro molekulárně biologické studie k PCR analýze, ke komparativní genomické hybridizaci (CGH), fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH), k proteinovým analýzám nebo k analýzám povrchových buněčných markerů či intracelulárních antigenů.

Klíčová slova: Mnohočetný myelom, Separace, MACS, FACS, CD138

Summary

We have used magnetic-activated cell sorting (MACS) and/or fluorescence-activated cell sorting (FACS) for the separation of plasma cells (PC) from bone marrow aspirates from patients with multiple myeloma (MM) using human antibodies CD138 MACS MicroBeads or CD138-PE antibodies that recognize the plasma cell surface antigen CD138 (syndecan-1). Isolated PC can be used for molecular biology studies of MM such as PCR analysis, comparative genomic hybridization (CGH), fluorescence in situ hybridization (FISH), protein analysis, analysis of cell surface markers, and/or intracellular antigens.

Keywords: Multiple myeloma, Separation, MACS, FACS, CD138

Úvod

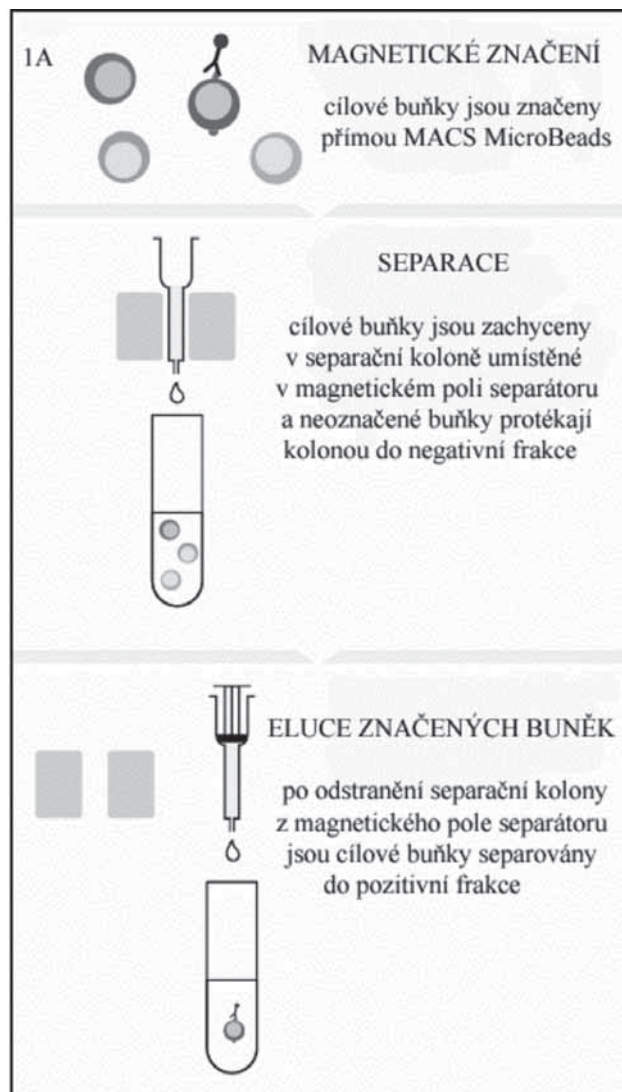
Ve světě bylo v posledních několika desetiletích vyvinuto mnoho principů separačních metod, kterými je možné získat vysoce čisté populace plazmatických buněk (PB) separovaných ze vzorků kostní dřeně (KD) a periferní krve (PK) pacientů nemocných mnohočetným myelomem (MM). Nejčastěji se využívá mikrofluidních separačních technik (9), které umožňují selekci buněk na principu imunologické reakce povrchového markeru cílové (přístup pozitivní selekce) nebo nežádoucí (depleční přístup, negativní selekce) buňky s monoklonální protilátkou, která může být fluorescenčně značená nebo konjugovaná s magnetickou mikro/nano částicí. Separace plazmatických buněk je prováděna 1) v magnetickém poli v separační koloně (technologie MACS®, <http://www.miltenyibiotec.com/>, Dynal®, <http://www.invitrogen.com/>, StemSep®, <http://www.stemcell.com/>) nebo ve zkumavce (technologie EasySep®, <http://www.stemcell.com/>) 2) imunodenzitní centrifugací (např. technologie RosetteSep®, <http://www.stemcell.com/>). Na našich pracovištích URC-CMG a OKH-LEHABI využíváme pro separaci plazmatických buněk metody MACS (magnetic-activated cell sorting, magneticky aktivovaná separace buněk) a/nebo FACS (fluorescence-activated cell sorting, fluorescenčně akti-

vovaná separace buněk), jejichž principy jsou detailně popsány níže.

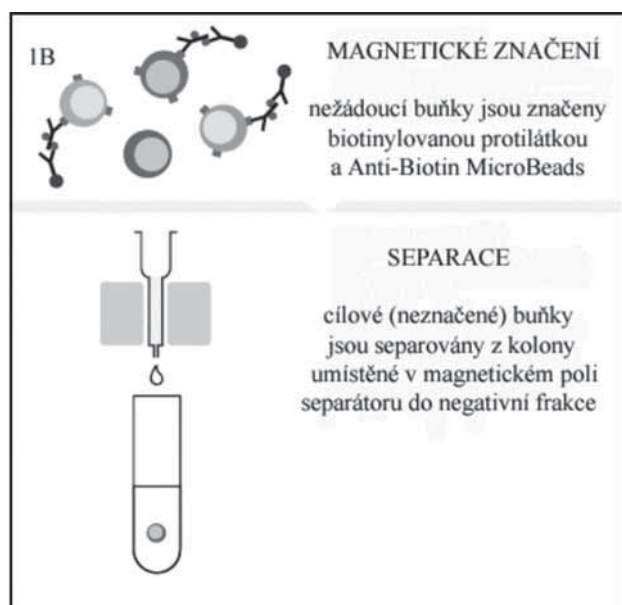
Principy separačních metod

MACS (magnetic-activated cell sorting, magneticky aktivovaná separace buněk)

Metoda MACS (firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) (10) je založena na imunomagnetickém značení cílových buněk podle jejich povrchových antigenů monoklonální protilátkou, která je konjugována se superparamagnetickou partikulí (MACS MicroBeads). Firma Miltenyi do současné doby vyvinula několik separátorů MACS (např. MiniMACS, VarioMACS, SuperMACS, autoMACS™), které mohou být využity pro 2 základní typy separačních strategií. Pokud pro separaci cílové buňky existuje přímá monoklonální protilátka konjugovaná se superparamagnetickou partikulí (MicroBeads), volíme separační přístup **pozitivní selekce**. Cílové buňky, které jsou magneticky značeny přímou MACS MicroBeads, jsou zachyceny v separační koloně, která je umístěna v magnetickém poli separátoru. Neoznačené buňky protékají separační kolonou do negativní frakce a po odstranění separační kolony z magnetického pole jsou cílové buňky pak separovány do pozitivní frakce (Obrázek č.1A).



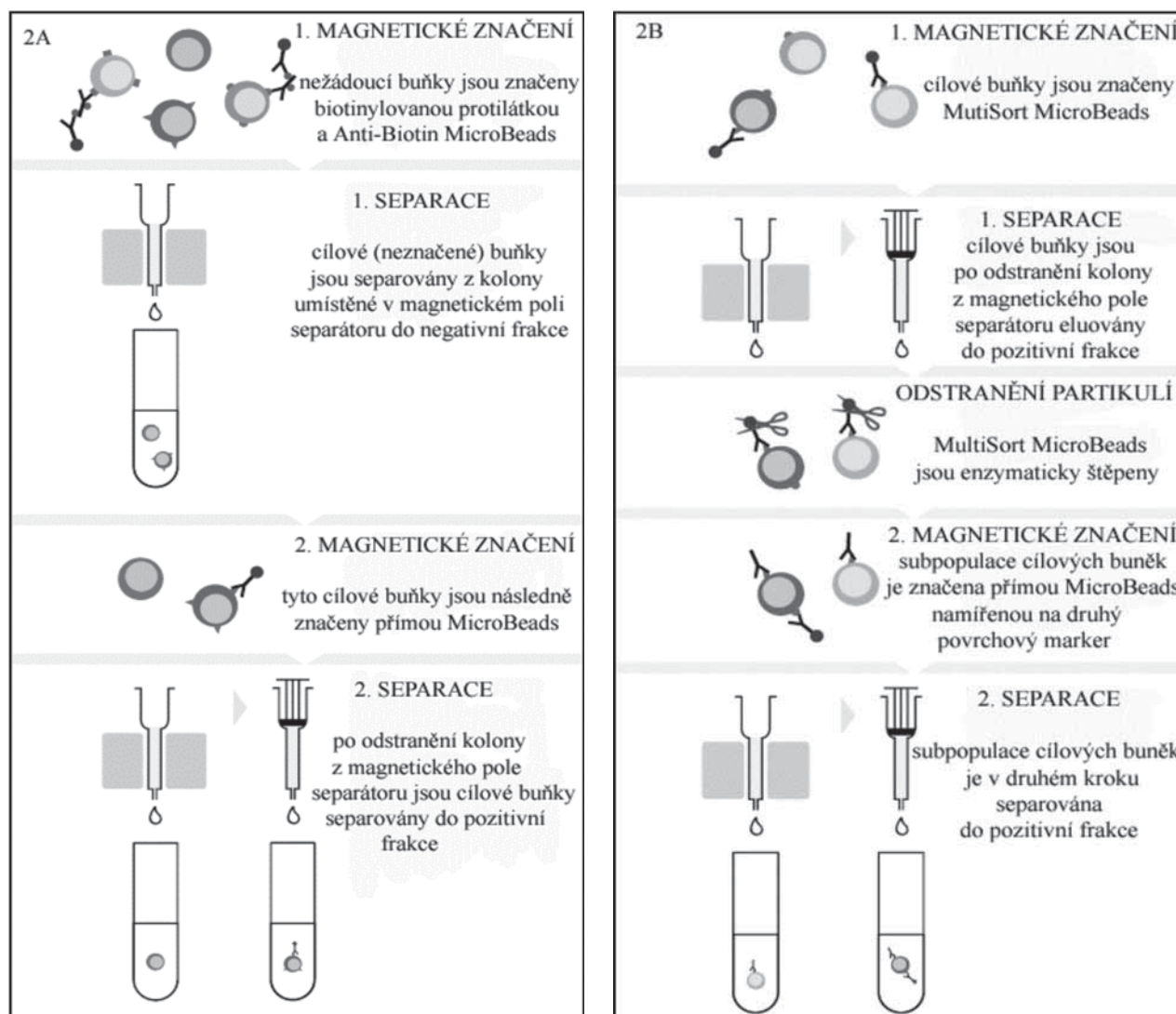
Obrázek č. 1: Separační přístup (A) pozitivní selekce (B) deplece nežádoucích buněk. Převzato a upraveno od výrobce technologie MACS®.



Pokud nejsou dostupné přímé MicroBeads pro cílové buňky, volíme **depleční přístup**, kdy jsou nežádoucí buňky magneticky označeny primární protilátkou (biotinylovanou, fluorescenčně-značenou aj.). Ve druhém kroku jsou nežádoucí buňky magneticky značeny sekundární polyklonální protilátkou namířenu proti primární protilátce (např. Anti-Immunoglobulin, Anti-Biotin, Streptavidin nebo Anti-Fluorochrom MicroBeads). Označené (nežádoucí buňky) jsou zachyceny v koloně a jsou odděleny od neoznačených (cílových buněk), které procházejí kolonou do negativní frakce. Po odstranění kolony z magnetického pole separátoru jsou značené buňky separovány do pozitivní frakce (Obrázek č. 1B). Je také možné využít kombinace těchto dvou separačních přístupů pro získání vysoce čisté populace vzácně zastoupených buněk, kdy jsou v prvním kroku odstraněny z buněčné suspenze nežádoucí buňky a následnou pozitivní selekcí je získána populace vysoce čistých cílových buněk (Obrázek č. 2A). Firma také vyvinula separační strategii, kterou nazvala **MultiSort strategií**. Tento přístup je vhodný pro separaci cílových buněk, které mají na svém povrchu několik CD antigenů a vůči kterým je možné využít dostupné přímé MicroBeads. Tímto přístupem je možné získat různé subpopulace cílových buněk. V prvním separačním kroku jsou cílové buňky, které nás zajímají, magneticky značeny MultiSort MicroBeads a po odstranění magnetického pole jsou separovány do pozitivní frakce. Inkubací s MultiSort Release Reagen-cii jsou z buněk enzymaticky odstraněny mikropartikelule a v druhém separačním kroku je subpopulace cílových buněk magneticky značena přímou MicroBeads namířenu proti jinému povrchovému markeru na cílové buňce (Obrázek č. 2B).

FACS (fluorescence-activated cell sorting, fluorescenčně aktivovaná separace buněk)

Buněčné sortery jsou zařízení, ve kterých na část odpovídající průtokovému cytometru navazuje část umožňující třídění buněk. Stejně jako každý průtokový cytometr pracují pouze s buněčnými suspenzemi a k identifikaci buněk využívají značení monoklonálními protilátkami konjugovanými s různými fluorochromy, tedy látkami, které po ozáření laserovým světlem emitují světlo určité vlnové délky (6). Zahrnují vždy systém vedení kapalin, který buněčnou suspenzi soustřeďuje do úzkého proudu obaleného proudem nosné kapaliny (tzv. hydrodynamická fokuzace) – v této formě jsou buňky „jedna po druhé“ vystavovány světelnému paprsku z laseru (v tzv. interrogation point), který excituje fluorochromy na navázaných protilátkách. Světlo emitované fluorochromem pak slouží jako signál k aktivaci sortovacího mechanismu. Základním principem elektrostatického sorteru je rozechvění (pomocí piezoelektrického krystalu) proudu nosné kapaliny s proudem vzorku, které vede k rozdělení proudu na malé kapičky. Těm může být v okamžiku oddělení od souvislého proudu udělen elektrický náboj a nabitě kapičky pak mohou být v elektrickém poli, tvořeném dvěma bočními elektrodami, vychýleny z původní dráhy směrem k těmto elektrodám. Tyto přístroje pracují s časovým intervalem (tzv. time delay - v řádu mikrose-

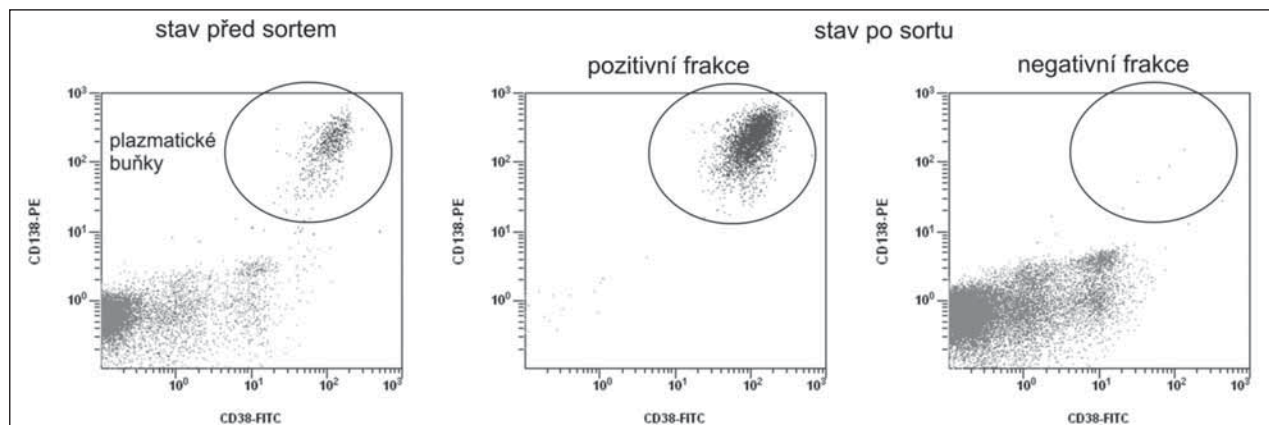


Obrázek č. 2: Separační přístup (A) kombinace deplece a následné pozitivní selekce (B) MultiSort strategie. Převzato a upraveno od výrobce technologie MACS®.

kund), který uplyne, než se buňka dostane z místa ozáření laserem (z interrogation point) na konec souvislého proudu nosné kapaliny. Pokud byla detekována jako cílová buňka, dojde těsně před oddělením kapičky s touto buňkou k nabití proudu nosné kapaliny, nabitá kapička je vychýlena k příslušné elektrodě a nasměrována do připravené sběrné nádoby. V okamžiku oddělení kapičky se souvislý proud kapaliny vybije a celý systém je připraven k novému cyklu nabití a vybití.

Na našem pracovišti máme možnost pracovat s vysokorychlostním průtokovým sorterem buněk FACS Aria firmy BD Biosciences. Jde o sorter využívající elektrostatický princip sortování; proti jiným podobným zařízením má několik zajímavých inovací. Vzorek prochází speciálně navrženou průtokovou komorou, která minimalizuje světelné ztráty při průchodu světelným rozhraním a zajišťuje tak velkou citlivost měření i při použití laserů s nižším výkonem a vyšší životností nevyžadujících přídatná chladicí zařízení. K detektorům je světlo přiváděno optickými kabely, takže jsou minimalizovány jeho

ztráty, ke kterým může docházet při průchodu klasickou optickou lavicí. Speciální design cesty vzorku zajišťuje, že vzorek prochází průtokovou komorou relativně pomalu, což zajišťuje dostatečně dlouhý osvit laserem; pak se dostává do úzké trysky, tzv. nozzle, kde dojde k urychlení proudu nosné tekutiny a zároveň jeho rozechvení a následně roztrhání na jednotlivé kapičky. Sorter je také vybaven systémem vedení kapalin zajišťujícím velmi stabilní rychlost průtoku, která je naprosto zásadní pro stálý time delay (viz výše) a dále velmi přesným a vysoce lineárním systémem sběru a zpracování dat na digitální bázi. Umožňuje třídění jedné až čtyř různých populací, a to do zkumavek různých velikostí, do mikrotitračních destiček nebo přímo na sklíčka. Po speciální přípravě lze provádět třídění za aseptických podmínek – pokud je zájem vytržité buňky dále kultivovat. FACS Aria je v současnosti osazena dvěma lasery a umožňuje analyzovat najednou až devět parametrů (2 optické a 7 fluorescenčních). Tuto konfiguraci lze do budoucna rozšířit na 3 lasery a 11 parametrů.



Obrázek č. 3: Obrázek KD v průtokovém cytometru před a po třídění buněk s vyznačenou populací plazmatických buněk (CD138+ CD38+).

Specifická nastavení u MM

Separace PB z mononukleárních buněk kostní dřeně či periferní krve pacientů je nejčastěji prováděna pomocí komerčně dostupné monoklonální protilátky CD138 (11), která je namířena proti povrchovému antigenu CD138 (syndecanu-1). Jde o membránový glykoprotein bohatý na heparan sulfát – proteoglykany. Syndecany se obecně účastní interakcí s proteiny extracelulární matrix, s rozpustnými proteiny typu cytokinů a s povrchově vázanými molekulami. Expresí syndecanu-1 byla popsána na normálních i nádorových plazmatických buňkách KD a PK pacientů s mnohočetným myelomem, ale také na neuronových a endoteliálních buňkách (1,2). Plazmatické buňky, které vstupují do apoptózy, pak antigen CD138 ztrácejí (8). Diferenciace B buněk na plazmatické buňky je také provázána ztrátou exprese CD45 antigenu. Této ztráty exprese lze využít při separacích plazmatických buněk v dvoukrokové proceduře v kombinaci deplece CD45+ buněk s pozitivní selekcí CD138+ buněk frakce CD45- (4). Nejčastěji se však využívá jednokrokové procedury pozitivní selekce plazmatických buněk označených přímou protilátkou CD138-PE či CD138 MACS MicroBeads. Před vlastní separací PB je nutné provést izolaci mononukleárních buněk. Kostní dřeň (20-60 ml) pacienta je odebrána do heparinu a ihned smíchána s transportním médiem v poměru 1:1 obsahujícím IMDM médium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma No: I-2510) s DNázou o koncentraci 0,1 mg/ml (Roche, No.1 284 932). Mononukleární buňky kostní dřeně jsou získány denzitní gradientovou centrifugací na Histopaque – 1077 (Sigma, No:H-8809), centrifugace 400g, 35 min, 4 °C. Po dvojím promytí mononukleárních

buněk v PBS pufru obsahujícím 2mM EDTA (centrifugace 300g, 10 min, 4°C) je provedeno vlastní značení PB podle standardních protokolů separace buněk pomocí MACS nebo FACS metody. Na Obrázku č.3 je příklad obrázku KD v průtokovém cytometru před a po třídění s vyznačenou populací plazmatických buněk CD138+ CD38+.

Specifické problémy u MM

Pro veškeré výzkumné analýzy v oblasti MM, které na našem pracovišti provádíme, je nutné získat separacími dostatečný počet PB o velmi vysoké čistotě. Čistota buněk je při separaci metodou MACS vždy závislá na vstupní infiltraci patologických buněk v odebraném vzorku KD. Proto je nutné pro každou MACS separaci zvolit vhodný separační program. Přístroj autoMACS™ má přednastavených 9 separačních programů v závislosti na separační strategii, frekvenci cílových buněk a expresi cílového antigenu. Pro selekci málo zastoupených buněk z velkého množství buněk je doporučován program posseld₂, který umožňuje pozitivní separaci a přečištění cílových buněk ve 2 separačních kolonách. Tento program jsme zvolili pro separaci plazmatických buněk z kostní dřeně pacientů, u kterých bylo stanovené procento PB ve frakci mononukleárních buněk kostní dřeně ≤ 10% (analýza průtokovou cytometrií, populace plazmatických buněk CD38+ CD138+). Pro ostatní vzorky aspiračních biopsií kostních dření se procentem PB > 10% jsme zvolili program possels. Tento program umožňuje zvýšení výtěžku separovaných buněk za cenu mírného snížení čistoty buněk. Separace těchto buněk probíhá přes 1 kolonu.

Tabulka č.1: Srovnání metod purifikace plazmatických buněk metodami MACS a FACS

MACS metoda	FACS metoda
separace buněk podle jednoho znaku v jednom kroku	separace buněk podle několika znaků v jednom kroku
separace dvou subpopulací	separace až 4 různých subpopulací
čistota je závislá na vstupní infiltraci	čistota nezávislá na vstupní infiltraci
časově nenáročná	časově náročná
nižší náklady	vyšší náklady

Význam metod u MM stávající a očekávaný

Purifikace PB od pacientů nemocných mnohočetným myelomem je nezbytná pro uplatnění řady studií, u kterých musíme pracovat s vysoce čistou populací nádorových buněk (3, 5, 7). Možností, jak docílit tohoto obohacení plazmatických buněk ze vzorků aspiračních biopsií kostních dření s nízkou infiltrací patologických buněk, je použití vysoce specifických a senzitivních separačních metod MACS a/ nebo FACS (Tabulka č. 1). Vitalita separovaných buněk těmito procedurami není významně ovlivněna, čehož můžeme využít v experimentech vyžadujících kultivaci těchto buněk (cytogenetické studie, produkce imunoglobulinů, produkce cytokinů aj.). Výhodou selekce buněk na principu FACS je možnost využít více znaků, a sortovat tak i různé typy plazmatických buněk podle fenotypu (např. CD19+ CD56- x CD19- CD56+), podle klonality stanovené intracelulárním barvením lehkých řetězců imunoglobulinů aj. V budoucnu plánujeme zahájit selekce PB u mono-

klonálních gamapatií s nízkou vstupní infiltrací. K těmto separacím bude využit buněčný sorter FACSaria.

Závěr

MACS a FACS separační systémy umožňují rychlou, účinnou a levnou separaci vysoce čisté populace plazmatických buněk ze vzorků kostní dřeni a periferní krve pacienta s mnohočetným myelomem. Kvalita čistoty a výtěžku separovaných buněk v případě použití technologie MACS je vždy závislá na vstupní infiltraci plazmatických buněk ve frakci mononukleárních buněk. Proto je nutné vždy zvážit volbu vhodného separačního programu MACS pro různé vstupní infiltrace plazmatických buněk ve frakci mononukleárních buněk.

Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434 a IGF č. 3/05.

Literatura:

1. Couchman JR, Woods A. Syndecans, Signaling and Cell Adhesion. *J Cell Biochem.* 1996; 61 (4): 578-584.
2. Dhodapkar MV, Sanderson RD. Syndecan-1 (CD 138) in myeloma cells and lymphoid malignancies: a multifunctional regulator of cell behavior within the tumor microenvironment. *Leuk Lymphoma.* 1999; 34 (1-2): 35-43.
3. Draube A, Pfister R, Vockerodt M, et al. Immunomagnetic enrichment of CD138+ positive cells from weakly infiltrated myeloma patients samples enables the determination of the tumor clone specific IgH rearrangement. *Ann Hematol.* 2001; 80 (2): 83-89.
4. Fišerová A, Hájek R, Doubek M, et al. Imunomagnetická separace myelomových buněk. *Klin Onkologie.* 2001; 14 (2): 46-50.
5. Fišerová A, Hájek R, Holubová V, et al. Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells. *Neoplasma.* 2002; 49 (5): 300-306.
6. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem.* 2002; 48 (10): 1819-1827.
7. Horst A, Hunzelmann N, Arce S, Herber M, Manz RA, Radbruch A, Nischt R, Schmitz J, Assenmacher M. Detection and characterization of plasma cells in peripheral blood: correlation of IgE+ plasma cell frequency with IgE serum titre. *Clin Exp Immunol.* 2002; 130 (3): 370-378.
8. Jourdan M, Ferlin M, Legouffe E, et al. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol.* 1998; 100 (4): 637-646.
9. Kang JH, Park J-K. Technical paper on microfluidic devices- cell separation technology. *APBN.* 2005; 9 (21): 1135-1146.
10. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High Gradient Magnetic Cell Separation With MACS. *Cytometry.* 1990; 11 (2): 231-238.
11. Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, et al. A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996; 94 (2): 318-323.