



# Optimering av lymfocytfraktionering med AutoMACS Pro för biobankning av hematologiska maligniteter

Jennifer Arnqvist

Vårterminen 2015  
Examensarbete, 15 hp  
Biomedicinsk analytikerprogrammet, 180 hp



Institutionen för Klinisk mikrobiologi  
Biomedicinsk laboratorievetenskap  
Biomedicinska analytikerprogrammet  
Examensarbete, 15 hp  
Kursansvarige lärare: Ylva Hedberg Fransson [ylva.hedberg.fransson@umu.se](mailto:ylva.hedberg.fransson@umu.se)

## **Optimization of Lymphocyte Fractionation with AutoMACS Pro for Biobanking of Hematological Malignancies**

**Handledare: Magnus Hultdin. Klinisk patologi, laboratoriemedicin, Norrlands universitetssjukhus och Institutet för medicinsk biovetenskap, Patologi.**

**Läroproponent: Maria Brohlin**

**Examinator: Mari Norgren**

**Datum för godkännande: 2015 - 06 - 11**

## Abstrakt

För att förbättra biobankning av provmaterial från individer med hematologiska maligniteter för ett projekt, Uppsala-Umeå Comprehensive Cancer Consortium (U-CAN), behövde proverna delas upp i fraktioner av maligna och icke maligna celler. Detta kunde göras med Auto Magnetic Activated Cell Sorting Pro (AutoMACS Pro) som separerade celler automatiskt med magnetism. Separationen gjordes med antikroppar som hade konjugerade magnetiska kulor (MicroBeads) vilka märkte in målceller på specifika antigen. En mängd olika separationsprogram, vars olikheter var beroende av målcellsandel i prov och epitopmängd på målcell, kunde väljas. Syftet med studien var att optimera den magnetiska separationen av lymfocyter och kontrollera renheten med flödescytometrisk immunfenotypning. De prover som användes var blod, benmärg, lymfkörtlar och ascites. Blod och lymfkörtlar separerades bäst efter en filtrering medan benmärg borde förberedas med lysering och filtrering inför separation. Separationen fungerade lika bra oavsett vilket separationsprogram som användes så länge tillverkarnas rekommendationer följdes och adekvata MicroBeads användes. Konklusionen var att programmet Posselwb, som var designat för blod och benmärg, borde användas. Allt provmaterial borde filtreras inför separation, dessutom krävde benmärg ytterligare bearbetning. Provet borde vara så färskt som möjligt inför fraktionering för att erhålla högt antal viabla celler.

## Nyckelord

Hematologiska maligniteter, AutoMACS Pro, flödescytometri, cellsortering, lymfocyter, antigen.

# Introduktion

Hematologiska maligniteter är sjukdomar vilka drabbar benmärg och/eller lymfsystemet. Alla individer oavsett ålder kan drabbas och dessa hematologiska sjukdomar orsakar många dödsfall. Vid misstanke om hematologisk sjukdom tas prov som blod, benmärg eller lymfkörtel för att undersöka vilken hematologisk sjukdom det rör sig om och maligniteten manifesterar sig olika beroende på vilken celltyp som orsakar maligniteten (1).

Lymfom, vilket är ett malignt tillstånd som drabbar lymfocyter, är den femte vanligaste cancerdiagnosen hos män och sjunde vanligaste cancerdiagnosen hos kvinnor och risken för att drabbas ökas med åldern. Det finns två typer av lymfom, Hodgkins och Non-Hodgkins lymfom. Non-Hodgkins lymfom har över 30 subtyper enligt Världshälsoorganisationens (WHO) klassifikation 2008 och kan grovt delas in i B-cellslymfom och T-cellslymfom. Hodgkins lymfom är en ovanligare cancerform, dock är den en av de vanligaste cancerdiagnoserna bland ungdomar och unga vuxna. Hodgkins lymfom brukar oftast diagnostiseras genom igenkänning av Hodgkin-Reed-Sternberg cellen eller genom ändrat uttryck av ytantigenet CD20 på B-celler. Det har visats att vissa infektioner, som infektion av Epstein-Barr virus eller *Helicobacter pylori*, är en del i etiologin för utvecklandet av vissa lymfom. Andra etiologiska faktorer av betydelse är genmutationer och kroniska immunsuppression behandlingar. Orsaken till utvecklandet av lymfom är ännu oklart och behöver utredas ytterligare (2). Det är önskvärt att öka kunskapen om hematologiska sjukdomar och minska mortaliteten av dem. För att göra det krävs vidare forskning och undersökningar på maligna celler för att ytterligare kartlägga de hematologiska maligniteternas karaktär.

Uppsala-Umeå Comprehensive Cancer Consortium (U-CAN) är ett forskningsprojekt med målet att biobanka tumörprover, blodprover, biomolekyler och information från patienter med hematologiska maligniteter, då även lymfom, före, under och efter behandling för framtida forskningsprojekt. Dessa prover finns i nuläget nedfrysta utan en cellsortering vilket gör maligna celler utblandat med icke maligna celler (3).

Vid separation för att skilja maligna celler från icke maligna celler används cellernas specifika antigen. B-celler, som är av intresse vid B-cellslymfom, har antigenet CD19 vilket finns i B-cellens alla utvecklingsstadier förutom vid utveckling till plasmaceller (4, 5). B-celler har även antigenet CD20 som specificerar B-celler från andra lymfocyter (6). T-celler, är av intresse som en normal fraktion vid B-cellslymfom, har antigenet CD3 (4, 7). B-celler är även av intresse vid T-cellslymfom, då som en normal fraktion medan T-cellerna blir en malign fraktion. En vanlig leukocytmarkör, CD45, visar viabla celler bland annat natural killer-celler (NK-celler) och lymfocyter. De viabla cellerna kan man sedan skilja i subpopulationerna CD19 och CD3 för att särskilja B- och T-celler (8).

Separation av maligna och icke-maligna celler är önskvärd för vidare forskning där DNA-analyser och RNA-expression är i fokus. Efter separation så att rena fraktioner erhålls, bestående maligna och icke maligna celler kan man sedan undersöka om det finns genetiska skillnader mellan fraktionerna och

hur de uttrycks i cellerna. Även genexpression kan utvärderas och användas vidare för ökad förståelse av maligniteten (9, 10).

Automated Magnetic Activated Cell Sorting Pro (AutoMACS Pro) är en automatisk cellseparator som separerar celler med hjälp av antikroppar vilka är konjugerade till magnetiska kulor (MicroBeads). Det är en helautomatisk metod som märker in provet med riktade MicroBeads vilka fäster till önskat antigen, inkuberar, och separerar provet till två fraktioner, en negativ och en positiv (11).

Separationen sker genom att efter inkubering med MicroBeads tas provet upp och passerar en, eller två, järnkolonner som vid separation blir magnetiska. De celler som har blivit inmärkt med MicroBeads fastnar i kolonnen medan de omärkta cellerna passerar igenom som en negativ fraktion. Efter det avmagnetiseras kolonnerna och de inmärkta cellerna elueras ut till en positiv fraktion. Denna separator har flera olika förinställda separationsprogram som lämpar sig till olika typer av prov. Cellerna kan separeras på olika vis dels genom positiv selektion, där cellerna som man önskar ha märks in med MicroBeads, och dels depletion, där de celler som inte önskas märks in med MicroBeads och de celler som önskas förblir oinmärkt. I denna studie ska endast positiv selektion användas och det finns flera separationsprogram lämpade för det. För prover med en andel målcell mer än 5% lämpar sig separation genom en kolonn med separationsprogrammet Possel eller Possel\_s. Possel är avsett för separation av målceller som uttrycker normal mängd målantigen medan Possel\_s lämpar sig för prover där målcellen uttrycker låg mängd målantigen eller där renhet är högsta prioritet. För prover med en andel målceller längre än 5% lämpar sig separation genom två kolonner där tre program finns. Posseld och Posseld2 separerar prov där målcellerna uttrycker normal mängd målantigen, Posseld2 ger endast en mindre volym på den positiva fraktionen. Posselds är ett program med högre sensitivitet vilket lämpar sig vid separation av målceller som finns mindre än 5% i provet och uttrycker låg mängd målantigen. Posselwb (whole blood) är ett separationsprogram där separationen sker med positiv selektion och genom två kolonner, men programmet är anpassat för material som blod och benmärg. Det finns MicroBeads anpassade för positiv selektion, depletion och whole blood separation (11-13). De MicroBeads som fäster sig till cellers antigen påverkar inte cellernas vidare inmärkning med exempelvis fluorokroma antikroppar och cellernas viabilitet bibehålls för vidare undersökningar, vilket är önskvärt inom U-CAN (12).

De fraktioner som erhålls efter separation bör undersökas med avseende på renhet eftersom AutoMACS Pro kan visa det (14), vilket görs med flödescytometri. Flödescytometri är en viktig analysmetod inom hematologi där celler undersöks individuellt. Om provmaterialet inför analys inkuberas med monoklonala antikroppar med fluorokrom konjugerat tills sig kan cellerna ytterligare identifieras. Antikropparna sätter sig på cellernas specifika antigen som uttrycks på cellytan och fluorokromen avger en färg då det strålas med laser (1, 4).

Syftet med detta arbete var att optimera cellsortering av lymfocyter med AutoMACS Pro för biobankning av prover med hematologiska maligniteter inom U-CAN och undersöka resultatet med flödescytometri.

# Material och metoder

## **Provmaterial**

I denna studie användes avkodade patientprover som bestod av 27 blodprover (Klinisk kemi, Norrlands universitetssjukhus, Umeå (NUS)), 24 benmärgsprover, sju lymfkörtlar och ett ascitesprov (Hematopatologi, NUS).

## **Förberedning av prover**

### ***Blod***

Blod lämnades orört eller förbereddes på två sätt, det filtrerades eller lyserades. Vid filtrering användes Pre-Separation Filter, 30 µm (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Tyskland) där 500 µl fosfat-buffrad salin (PBS) (Tekniskbiokemiskfunktion, Klinisk mikrobiologi, laboratoriemedicin, NUS) tillsattes först för att blöta filtret innan provet applicerades. Vid lysering togs provmaterial i förhållandet 1:51 med lyseringslösning (Tekniskbiokemiskfunktion, NUS) för att lyseras på vagga i tio min. Det centrifugerades vid 400 g i fem min därefter hällades supernatanten av. Pelleten resuspenderades med 10 ml PBS. Det centrifugerades vid 400 g i fem min, supernatanten hällades av och pelleten resuspenderades med PBS till en slutvolym på 2 ml.

### ***Benmärg***

Benmärg förbereddes genom lysering eller tvätt med RPMI-odlingsmedium (Tekniskbiokemiskfunktion, NUS) eller PBS. Vid lysering togs provmaterial i förhållandet 1:51 med lyseringslösning för att lyseras på vagga i tio min. Det centrifugerades vid 400 g i fem min därefter hällades supernatanten av. Pelleten resuspenderades med 10 ml PBS. Det centrifugerades vid 400 g i fem min, supernatanten hällades av och pelleten resuspenderades med PBS till en slutvolym på 2 ml. Vid tvätt togs RPMI eller PBS i förhållandet 4:1 mot provmaterialet i ett rör, blandades och centrifugerades vid 218 g i sju min eller vid 400 g i fem min. Supernatanten sögs av och pelleten resuspenderades med RPMI eller PBS till en slutvolym på 2 ml. All benmärg filtrerades med MACS SmartStrainer, 70 µm (Miltenyi Biotec) eller genom 70 µm filter (Sintab Produkt AB, Malmö, Sverige) innan applicering på AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec).

### ***Lymfkörtlar/ascites***

Lymfkörteln hackades upp och späddes ut med PBS. Denna suspension filtrerades genom 70 µm filter (Sintab Produkt AB). Ascites centrifugerades vid 400 g i fem min och supernatanten sögs av. Pelleten resuspenderades och filtrerades genom 70 µm filter. Inför cellseparation kunde lymfkörtelsuspensionen filtreras ytterligare en gång med MACS SmartStrainer, 70 µm eller 70 µm filter (Sintab Produkt AB). En lymfkörtel och ascitessuspensionen späddes i seriespädning med PBS och koncentrationen kontrollerades med WBC HemoCue med adekvat hantering inför cellseparation.

## **Flödescytometri**

En del av provet, 40 µl, blandades med olika kombinationer av 3 µl anti-human CD45-V500 (HI30) (BD Horizon, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 3 µl anti-CD19-PEcy7 (IM3628) (Beckman Coulter Company, Marseille, France), 3 µl anti-human CD19-PerCP/Cy5,5 (HIB19) (Bio Legend, San Diego,

CA, USA), 3 µl CD3-APC-Alexa (A94680) (Beckman Coulter Company), 5 µl monoklonal mus anti-human CD13/FITC (WM-47) (Dako, Glostrup, Danmark), 3 µl APC mus anti-human CD15 (H198) (BD Pharmingen, BD Biosciences), 5 µl mus anti-human Myeloid cell CD33/RPE (WM-54) (DakoCytomation), 5 µl CD15-FITC (MMA), 3 µl CD13-PeCy7 (L138), 3µl CD33-APC (P67,6), 5 µl CD19-PE (4G7) och 7 µl CD20-PerCP (L27) (BD Biosciences) i ett 5 ml rör (Falcon). Provet vortexades och inkuberades i 15 min i mörker. Provmaterialet lyserades med 4 ml lyseringslösning i 5 min, centrifugerades vid 400 g i fem min, supernatanten hälldes av, pelleten skakades upp och resuspenderades med tre droppar PBS. Provet vortexades strax innan analys med BD FACS Canto II flödescytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) som visade lymfocytinnehåll. De prover med lågt B-cellsantal kasserades innan vidare laborerande, vilket gav tio blodprover, 13 benmärgsprover, sex lymfkörtlar och ett ascitesprov.

### **Cellseparation**

Hanteringen av AutoMACS Pro gjordes enligt tillverkarens rekommendationer samt med adekvata buffrar (Miltenyi Biotec). Adekvata, humana MicroBeads skannades in, Whole Blood CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec), Whole Blood CD3 MicroBeads (Miltenyi Biotec), CD3 MicroBeads (Miltenyi Biotec) eller CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec), och placerades utan lock på avsett rack. På AutoMACS Pro ställdes separationsprogram in enligt tillverkarens rekommendationer. Under denna studie användes endast program med separation genom två kolonner och för positiv selektion därför användes Posseld, Posseld2, Posselds och Posselwb. Posselwb användes i större utsträckning. För varje separation krävdes tre rör, ett originalrör där provet i vald provvolym pipetterades i, ett negativfraktionsrör och ett positivfraktionsrör. Efter separation centrifugerades de negativa och positiva fraktionerna vid 400 g i fem min, supernatanten hälldes av och pelleten förbereddes inför analys med flödescytometri som ovan beskrivet.

### **Etiska överväganden**

U-CAN-projektet hade ett etiskt godkännande, EPN dnr 2014/233 vilket utfärdades i Uppsala 2014-12-22. Under denna studie användes prover som inkom till laboratorierna, vilket medförde inget ytterligare obehag för de individer som deltagit i projektet.

# Resultat

## Separation av blod

Vid jämförelse och utvärdering av separationsprogram som separerade genom två kolonner, Posseld, Posseld2, Posselds och Posselwb, sågs ingen antydning till skillnad på den positiva fraktionens renhet vilket varierade mellan 98,0-99,5 % (data ej visad). En knappt märkbar förbättring kunde ses vid filtrering av blod inför separation, 99,1 mot 98,4 dock gav lysning av blod sämre resultat (Fig.1). Separationen var oberoende på val av MicroBeads. CD19 Microbeads fick en renhet på 96,5 % med posselwb-programmet och Whole Blood CD19 MicroBeads fick en renhet på 97,6% med posselwb-programmet (data ej visad). Vid flödescytometri sågs en nedgång i signalstyrkan av anti-CD19 efter separation med CD19 MicroBeads eller Whole Blood CD19 MicroBeads, men inmärkning av anti-CD20 gav ingen skillnad i signalstyrkan innan som efter separering (Fig.2).

## Separation av benmärg

Separationsprogrammet Posselwb gav en hög renhet på blod. Det är ett program anpassat för blod och benmärg och användes därför genom benmärgsoptimeringen vid separation av CD19. Val av filter, Sintab Produkt AB eller MACS SmartStrainer 70µm, inför separation var irrelevant, 99,2 respektive 99,2 %, men mer prov erhöles vid filtrering med MACS SmartStrainer. Förberedning av prov med tvätt eller lysning skiljde sig åt. Resultaten var ej konsekventa, men en antydning att tvätt med PBS eller lysning var något bättre än tvätt med RPMI, den positiva fraktionens renhet var för lysning 90,8%, PBS-tvätt 91,2% och RPMI-tvätt 87,6 %. Det kunde även ses en antydning att försiktig hantering av prov, dvs. mjukare centrifugering, gav renare positiva fraktioner, centrifugering vid 400 g gav en renhet på 95,3% medan centrifugering vid 218 g gav 96,1 % (data ej visad). Prover med högre B-cellsinnehåll gav renare positiva fraktioner efter separation (Fig. 3).

## Separation av lymfkörtel/ ascites

Val av separationsprogram på AutoMACS Pro var irrelevant, när tillverkarnas instruktioner följdes, och renheten varierade mellan 95,6%-98,8%. Val av filter, Sintab Produkt AB eller MACS SmartStrainer 70µm, inför separation var irrelevant, men mer prov erhöles vid filtrering med MACS SmartStrainer. En tendens till förbättring av den positiva fraktionens renhet kunde ses efter ytterligare en filtrering efter cellsuspensionsframställningen (data ej visad). Vid ytterligare separation av den negativa fraktionen sågs en sämre separation av målcell, och den positiva fraktionens renhet var ej tillfredsställande (Fig. 4). Lymfkörtel separerades med CD3 och CD19 MicroBeads samt CD3 och CD19 Whole Blood MicroBeads och renheten varierade med provets fördelning av cellpopulationer inför separation (data ej visad). En högre cellkoncentration gav renare separering vilket sågs vid separering av både en lymfkörtelsuspension och ascites där låg koncentration gav hög side scatter (SSC) med sämre bevarade celler medan hög koncentration gav låg SSC med högt antal viabla celler (Fig. 5). Dåligt bevarade celler i originalprovet separerades sämre, den positiva fraktionen var ren men många målceller separerades ej och hamnade i den negativa fraktionen (data ej visad).



## Diskussion

Denna studie hade som syfte att optimera separering av lymfocyter för forskningsprojektet U-CAN för att skapa en bättre biobank av prover med hematologiska maligniteter och att optimera renheten i de positiva fraktionerna. Vidare var det önskvärt att öka antal målceller i den positiva fraktionen. Oavsett vilken typ av prov som separerades fungerade alla separationsprogram, under förutsättning att adekvata MicroBeads användes och att tillverkarnas rekommendationer följdes (12). Dock upptäcktes att ett separationsprogram, Posselwb, hade en ekonomisk fördel där adekvata MicroBeads, Whole Blood MicroBeads, kräver mindre volym per volym prov, jämfört med de andra MicroBeads, direkta MicroBeads, som användes under denna studie. Direkta MicroBeads bör användas till cellsuspensioner med högre koncentration än vad som använts till stor del i detta försök, för att det ska bli ekonomiskt gynnsamt. Programmet Posselwb är även ett program som är mer anpassat för blandad och obehandlat provmaterial jämfört med andra separationsprogram (13). Vid de försök som gjorts har dock ingen större skillnad setts mellan de olika separationsprogrammen förutom mängden MicroBeads som används. Det har noterats att provets ålder har en inverkan på separationen, men även detta var oberoende på separationsprogram. Detta tros beror på att cellernas viabilitet minskat och då gett en ökad ospecifik bindning av först MicroBeads vid separation och sedan fluorokroma antikroppar vid flödescytometri.

Whole Blood MicroBeads är framtagna för att optimalt separera blod och benmärg med programmet Posselwb. Det medför att Whole Blood MicroBeadsen är optimerad för vanlig leukocytkoncentration på blod och benmärg (13). Försök gjordes att överbelasta Whole Blood MicroBeads med koncentrationer en och två tiopotenser högre än optimal koncentration, men försöken visade en lika bra separation som vid optimala cellkoncentrationer. Direkta MicroBeads har utvärderats på liknande sätt, där cellkoncentrationer som var optimalt samt maximalt för dessa MicroBeads separerades. Även där sågs en bättre separering ju högre cellkoncentrationen var. Teoretiskt bör högre koncentrationer av provet ge sämre inmärkning av målceller vid separation då det inte bör finnas tillräckligt med MicroBeads per målcell och det ger mer målceller i den negativa fraktionen. Detta har inte setts utan i prover med för höga cellkoncentrationer, dvs. cellkoncentration vid maxkapaciteten för AutoMACS Pro, inför separation erhöles hög renhet i den positiva fraktionen samt en låg andel av målceller i den negativa fraktionen vid separation. En högre andel målceller noterats i den negativa fraktionen vid separation av prover med låga cellkoncentrationer men med hög renhet i den positiva fraktionen (14). Detta fenomen kan bero på att för många MicroBeads per målcell kan överbelasta cellerna och medföra lägre viabilitet. Hög SSC vid flödescytometri visar celler med låg viabilitet, men denna teori kan ej säkert fastställas för denna studie. Acitesprovet, som hade dåligt bevarade/ icke viabla B-celler inför separation sågs vid separation på CD19 släppa igenom en hög andel målceller till den negativa fraktionen, men det hade även en hög renhet på den positiva fraktionen. Detta kan förklaras med att de MicroBeads som användes vid separering inte kunde binda in till cellerna på adekvat sätt då de med minskad viabilitet tappar de epitop som MicroBeadsen binder till. En manuell bokföring av MicroBeads måste göras för att undvika att mängden MicroBeads inte räcker till, AutoMACS Pro bokför ej åtgången.

Vad som kunde utrönas med denna studie var att olika provmaterial bör förberedas på olika sätt. Blod bör inte lyseras utan endast filtreras för att få bästa resultat. Benmärg bör förberedas och då lyseras med lyserlösning eller tvättas med PBS. Resultaten har dock varierat under försöken och måste undersökas vidare. Lysering av benmärg, vilket ska användas i framtiden, är ett kliniskt applicerbart arbetssätt vid hematopatologiska laboratoriet vid NUS där framtida forskningsprover ska hanteras. Benmärgen filtrerades alltid för att eventuella benmärgskorn eller fett inte skulle störa separation med AutoMACS Pro. Fettet skulle kunna, som benmärgskornen, skada AutoMACS Pro genom att fastna i de slangar som leder provet till separationskolonnerna. Lymfkörtlar däremot behövde ingen förberedning förutom eventuellt en extra filtrering efter cellsuspensionsframställning. Lymfkörtlarna måste bearbetas till en cellsuspension inför separation, vilket är ett kliniskt applicerbart arbetssätt vid hematopatologiska laboratoriet, då lymfkörtelsuspensioner analyseras i flödescytometri.

Utvärdering av två olika filter, 70 µm, visade att de gav lika renhet i fraktionerna efter separering. En fördel med MACS SmartStrainer är att den är utformad som en kon som fästs vid provrörsmynningen, vilket ger mindre spill av provet och en större volym erhöles efter filtreringen jämfört med filtret från Sintab Produkt AB.

Försök gjordes att göra efterföljande separering på lymfkörtel som redan separerats, detta för att få en ren fraktion av CD19- respektive CD3-positiva celler samt en fraktion av övriga lymfkörtelspecifika celler. Detta gjordes med en separering på CD3 och den negativa fraktionen som erhöles separerades igen på CD19. Den ytterligare separeringen med CD19 gav inte ren positiv fraktion och den negativa fraktionen innehöll hög andel målcell, vilket ej var önskat. Orsaken till att den positiva fraktionen inte var ren kan bero på inmärkta CD3-celler från första separationen separerades i den andra separationen istället och gav hög andel CD3-positiva celler. Det var även dålig uppsamling av målcell vid den efterföljande separationen, vilket kan bero på att provet inte klarar av att gå igenom separationen två gånger. Det finns separationskit där man ska kunna separera på flera epitop vilket skulle vara intressant att använda, men dessa har inte prövats under denna studie.

Under denna undersökning utvecklades användningen av olika antikroppar i flödescytometrin. I slutet av undersökningen användes fler fluorokroma antikroppar och de antikroppar som användes i början av undersökningen utvärderades. Efter separation användes till en början anti-CD19 antikroppar då proverna separerades med avseende på det epitopet med CD19 MicroBeads. Dock sågs signalstyrkan från anti-CD19 i flödescytometri sjunka efter separationen p.g.a. inbindning av CD19 MicroBeads, vilket inte borde ske (11). Detta undersöktes genom jämförelse mellan anti-CD19 och anti-CD20 efter separation och där sågs en klart starkare signal från anti-CD20. Vi observerade att CD20-andelen inte var lika hög som mängden CD19 positiva celler i den negativa fraktionen. Det kan bero på att gaten som märker in CD19 är satt för lågt och även innesluter NK-celler, men samtidigt måste gaten placeras där eftersom CD19-signalen sjunker efter separation. Detta innebär att NK-celler felaktigt markeras som CD19 positiva och ger förhöjd procentandel av CD19, ett mer korrekt värde att utgå ifrån är då inmärkningen av CD20. Studien som gjorts indikerar att MicroBeads-antikropparna konkurrerar med andra antikroppar om inbindning till epitop vilket kan ge vilseledande resultat vid analys av denna epitop efter separation.

Konklusionen var att Posselwb är det program som borde användas med adekvata MicroBeads för att få rena fraktioner på ett kostnadseffektivt sätt. Benmärg var det provmaterial som borde förberedas med lysering och allt provmaterial som undersökts fick en bättre separation med en filtrering innan separation. Provmaterialets cellkoncentration gav varierad renhet efter separation där en högre koncentration av målcell inför separation gav bättre resultat. De MicroBeads som används kan påverka vidare analyser om samma epitop används, vilket bör tas i beaktning vid planerad separation. Provet borde vara så färskt som möjligt för att få en bra separation, detta för att antal celler som är viabla är högre och det ger renare fraktion.

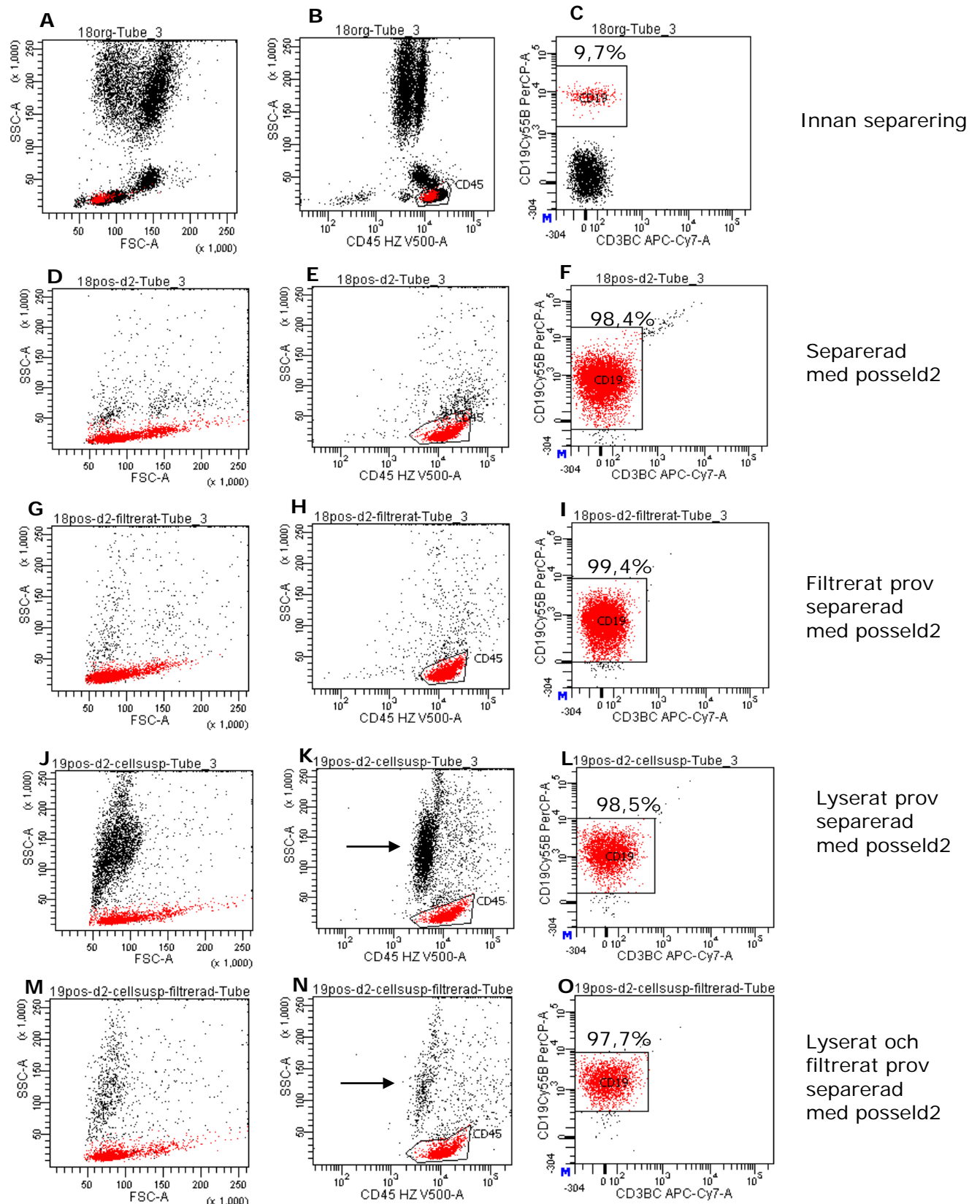
## Tack tillägnas

Jag vill tacka min Handledare Magnus Hultdin för bra handledning och jag vill tacka alla vid Hematopatologiska laboratoriet NUS för teknisk assistans med de laborativa momenten. Jag vill tacka Malin Ragnarsson för hennes hjälp vid användandet av flödescytometri och Astrid Lundberg som hjälpt mig kombinera fluorokroma antikroppar till flödescytometriska analyser i denna studie. Jag vill även tacka Jonas Sörlin som bidragit stort till de laborativa momenten i min användning av AutoMACS Pro.

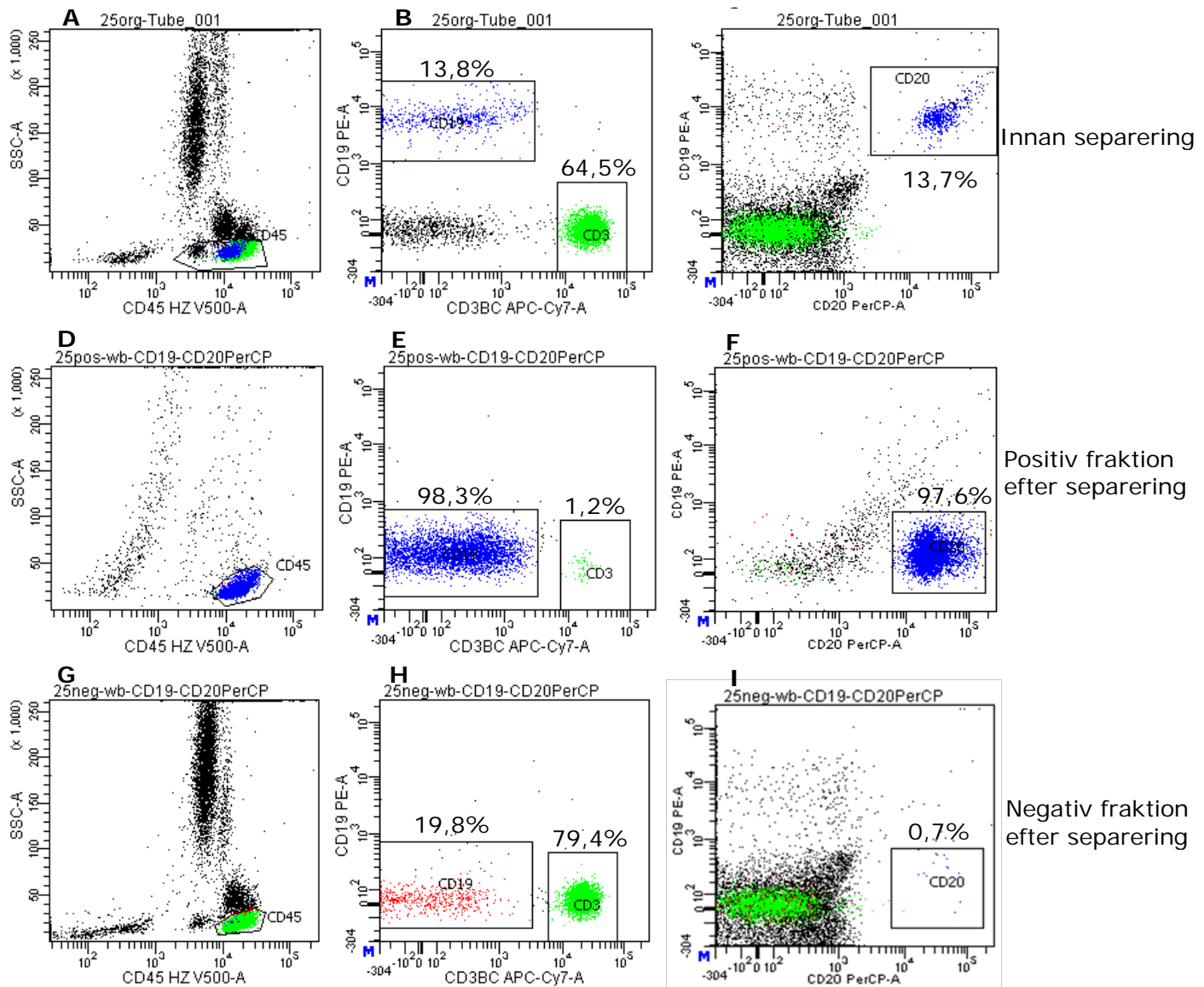
# Referenser

1. Garthon G, Juliusson G. (2012). Blodets sjukdomar: lärobok i hematologi. Studentlitteratur AB. 59-65.
2. Sammut R, Arumainathan A. Lymphoma. *InnovAiT*. 2013;6(4):206-213.
3. Uppsala Universitet, <http://www.u-can.uu.se/aktuell-forskning/?tarContentId=369840>, 2015-04-24
4. La Motte-Mohs R N, Herer E, Zúñiga-Pflücker J C. Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 *in vitro*. *Blood*. 2005;105(4): 1431 - 1439.
5. Ma Y, Xiang D, Sun J, Ding C, Liu M, Hu X, Li G, Kloecker G, Zhang H, Yan J. Targeting of antigens to B lymphocytes via CD19 as a means for tumor vaccine development. *J. Immunol*. 2013;190(11):5588-5599.
6. Horikawa M, Minard-Colin V, Matsushita T, Tedder T F. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Clin Invest*. 2011; 121(11): 4268–4280.
7. Awong G, Herer E, La Motte-Mohs R N, Zúñiga-Pflücker J C. Human CD8 T cells generated *in vitro* from hematopoietic stem cells are functionally mature. *BMC Immunol*. 2011;12(1):22-30.
8. Zikherman J, Doan K, Parameswaran R, Raschke W, Weiss A. Quantitative differences in CD45 expression unmask functions for CD45 in B-cell development, tolerance, and survival. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2011;109(1):E3–E12.
9. Mansson R, Zandi S, Anderson K, Martensson I-L, Jacobsen S E W, Bryder D, Sigvardsson M. B-lineage commitment prior to surface expression of B220 and CD19 on hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2008;112(4): 1048-1055.
10. Taskesen E, Havermans M, van Lom K, Sanders M A., van Norden Y, Bindels E, Hoogenboezem R, Reinders M J T, Figueroa M E, Valk P J M, Löwenberg B, Melnick A, Delwel R. Two splice-factor mutant leukemia subgroups uncovered at the boundaries of MDS and AML using combined gene expression and DNA-methylation profiling. *Blood*. 2014;123(21): 3327-3335.
11. Nelson N, Szekeres K, Cooper D, Ghansah T. Preparation of myeloid derived suppressor cells (MDSC) from naive and pancreatic tumor-bearing mice using flow cytometry and automated magnetic activated cell sorting (AutoMACS). *J Vis Exp*. 2012:(64):3875.
12. Smith C. Cell Separation. *Life Science Articles*, [www.biocompare.com/Editorial-Articles/41662-Cell-Separation/](http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/41662-Cell-Separation/), 2015-04-27.
13. Miltenyi Biotec (2014). AutoMACS Pro Separator User manual version 5. Miltenyi Biotec. 107-124.

14. Willasch A, Eing S, Weber G, KuçiS, Schneider G, Soerensen J, Jarisch A, Rettinger E, Koehl U, Klingebiel T, Kreyenberg H, Bader P. Enrichment of cell subpopulations applying automated MACS technique: purity, recovery and applicability for PCR-based chimerism analysis. Bone Marrow Transplant. 2010;(45):181-189.

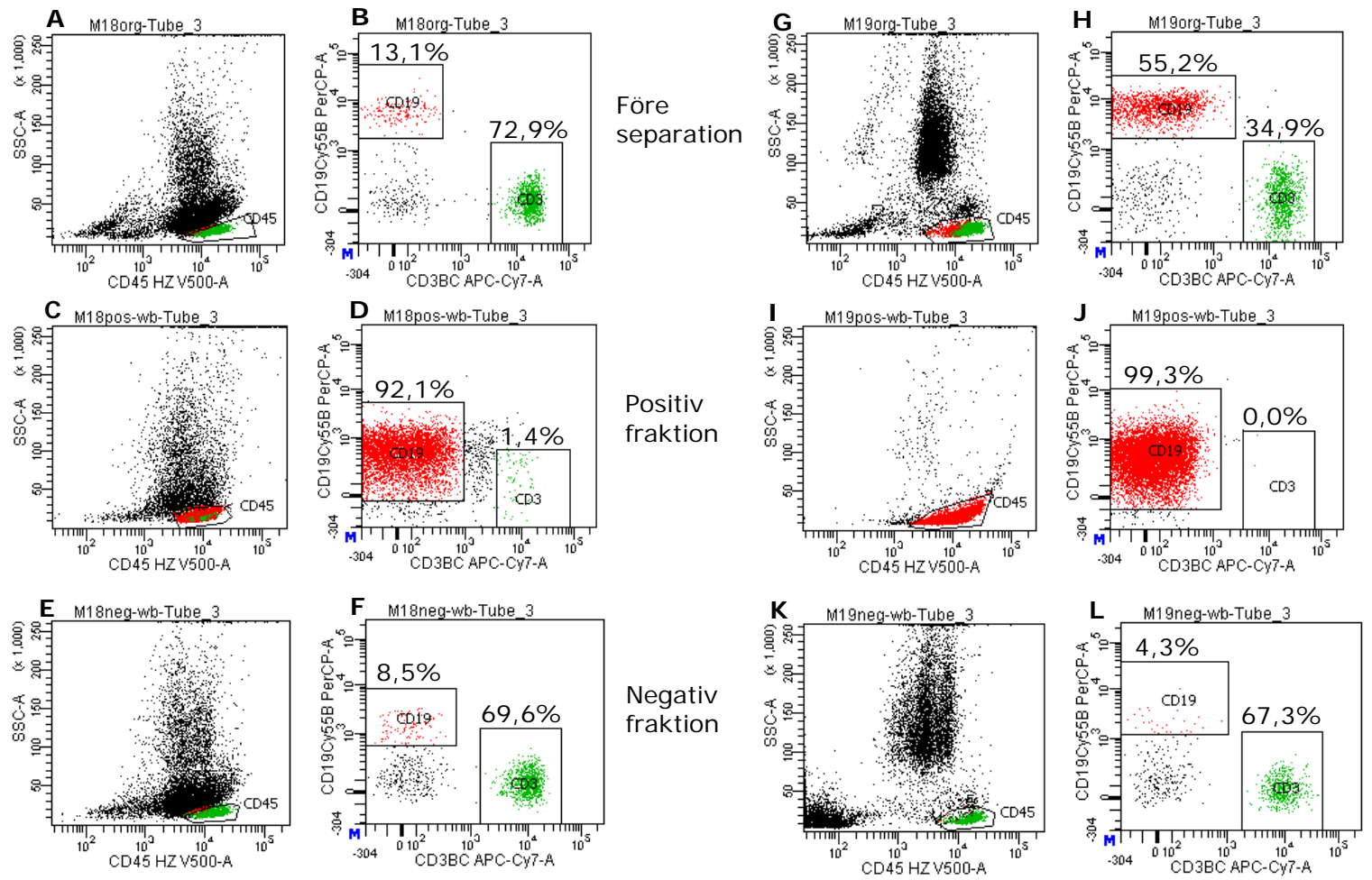


Figur 1. A-C visar fördelningen av celler i blodprov 18, vilket representerar liknande försök, innan separering. I B visas en gate som ringar in lymfocyter, CD45, och från den gaten ses fördelningen av lymfocyter i C där en gate ringar in B-celler, CD19. Samma kan ses för samma prov i D-F där provet separerades med programmet Posseld2, vilket även G-I illustrerar med samma separationsprogram, dock är provet filtrerat inför separation. I J-L ses ett annat prov som inför separation lyserats och sedan separerats med samma program, Posseld2. Figur M-O visar samma prov som J-L men det har filtrerats efter lysering innan separation. Pilarna visar celler som inte är lika viabla som de ingatade CD45.

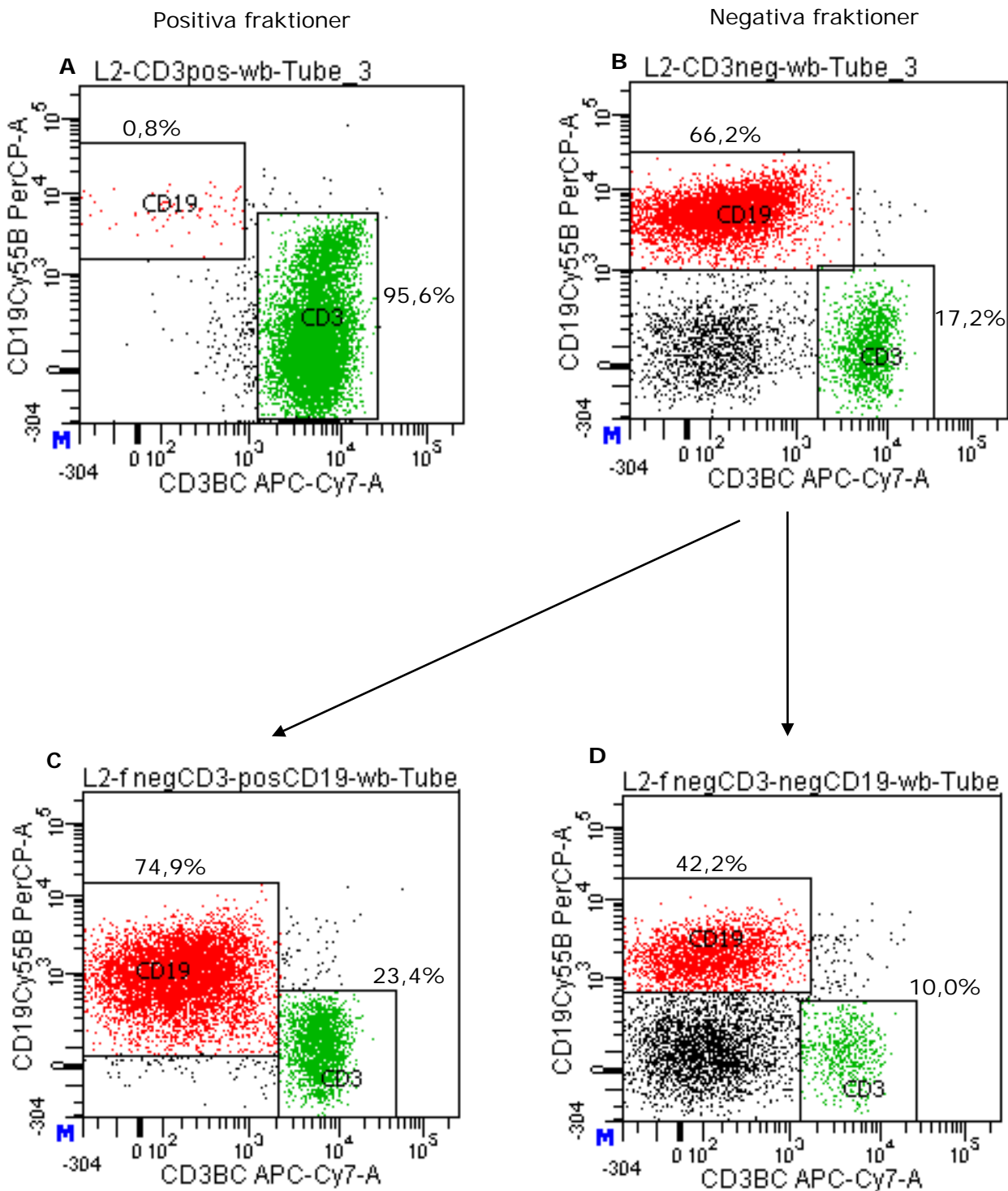


Figur 2. A-I visar samma prov, blodprov 25, A-C är provet innan separation med olika gater, B visar CD19 och CD3 gate från CD45-gaten i A medan C visar CD20. På liknande sätt illustreras den positiva fraktionen, D-F, och den negativa fraktionen, G-I. Gaten CD19 i H visar CD19-positiva celler samt NK-celler, vilket kan särskiljas med CD20 markören i I. Blodprovet separerades med programmet Posselwb och Whole Blood CD19 MicroBeads.

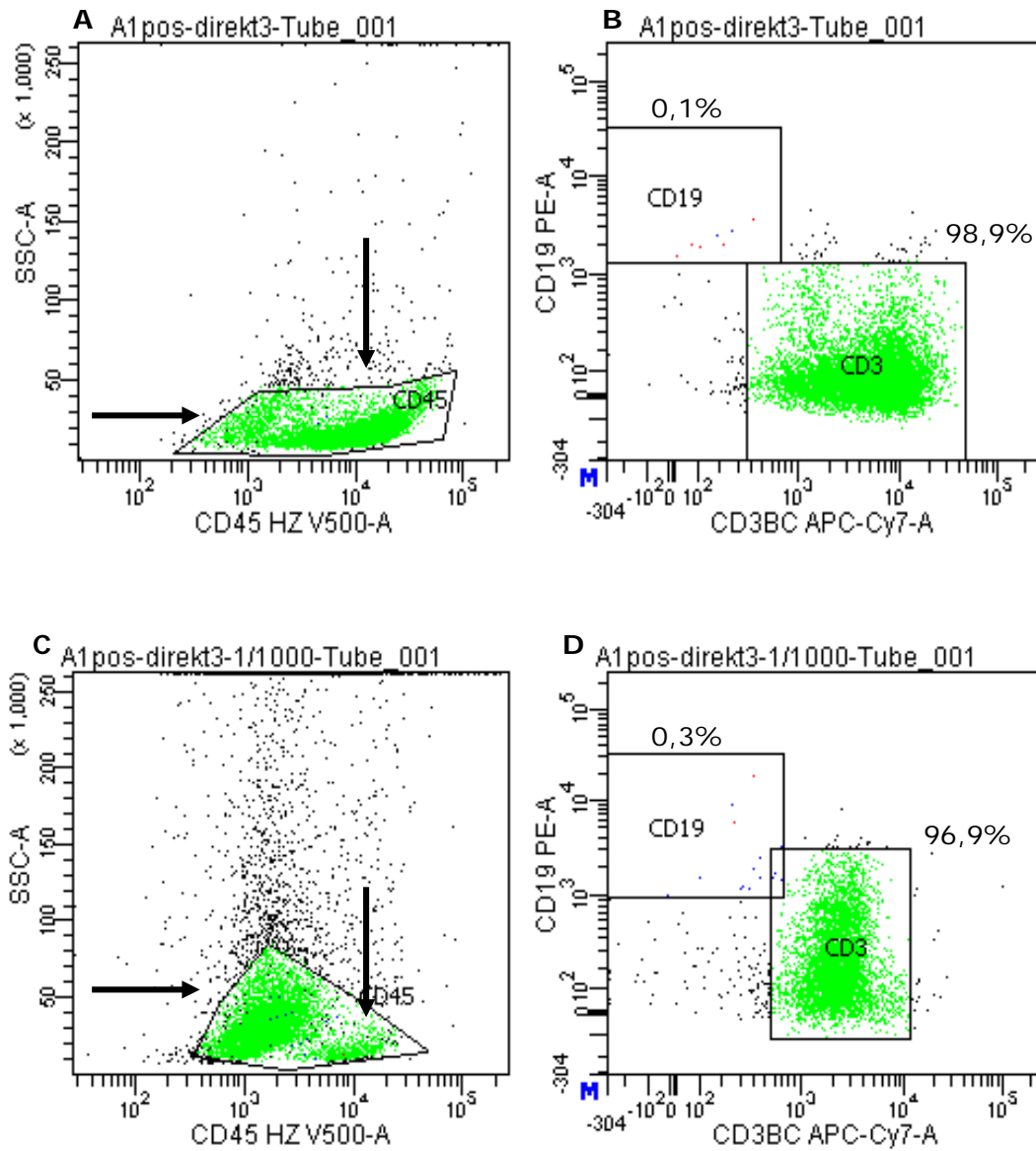




Figur 3. A-F visar märgprov 18, vilket representerar prover med lågt B-cellsinnehåll, och G-L visar märgprov 19, vilket representerar med högt B-cellsinnehåll. Proverna separerades lyserades, filterade och med programmet Posselwb.



Figur 4. A-B visar fraktionerna som erhålls efter en separation av lymfkörtelprov 2 med CD3 MicroBeads. Från fraktionen som visas i B gjordes ytterligare en separation med Whole Blood CD19 MicroBeads där fraktionerna ses i C, positiv fraktion, och D, negativ fraktion. Alla dessa separerades med programmet Posselwb.



Figur 5. Figur A-D visar den positiva fraktionens utfall efter separering av ascites med programmet Posseld2 och CD3 MicroBeads. De lodräta pilarna visar den viabla populationen medan den vågräta pilen visar en population med minskad viabilitet i och med den ökade SSC. Figur A-B är ascites med hög cellkoncentration medan figur C-D visar samma ascitesprov dock utspätt 1/1000. A och C visar fraktionens celler och cellernas viabilitet, gaten i dessa figurer markerar CD45. Från den gaten fås B och D och gaterna i dessa figurer visar CD19- och CD3-innehåll.