

.....

# Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie

*Gregor Rothe*

Laborzentrum Bremen, Deutschland

## Einleitung

Durchflusszytometer sind apparative Plattformen, die mit sehr hoher Flexibilität die quantitative Vermessung und molekulare Charakterisierung intakter Zellen erlauben. Der hydrodynamische Transport von Zellen und deren optische Vermessung nach spezifischen Färbungen stellen hierbei die Grundlagen der Analyse von Zellen nach den folgenden Grundprinzipien dar:

- Eine Suspension von Zellen wird durch einen Hüllstrom (Tab. 1) verdünnt und anschließend fokussiert in einer Sequenz von Einzelzellen (im «Gänsemarsch») im rechten Winkel an einer Lichtquelle vorbeigeführt (Abb. 1).
- Am Messpunkt, dem gemeinsamen Fokus des Probenstroms und eines Lasers als monochromatischer Lichtquelle (alternativ gibt es auch Geräte, die eine Quecksilber-Dampfampe als Lichtquelle haben), dienen die Streuung des Anregungslichts und die Anregung von fluoreszenten Markern der simultanen Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften der Zellen (Abb. 2). Die Zellgröße und Granularität können hierdurch gleichzeitig mit Fluoreszenzsignalen detektiert werden. Die Helligkeit der Fluoreszenzsignale entspricht dabei in Abhängigkeit von der Färbung z.B. der Menge gebundener Antikörper, dem nukleären DNA-Gehalt oder den biochemischen Eigenschaften der Zelle.
- Die den physikalischen und molekularen Eigenschaften der Zellen entsprechenden Lichtsignale werden quantifiziert und in einer multiparametrischen

Tab. 1. Fachbezeichnungen in der Durchflusszytometrie und deren Synonyme

Ausdruck	Synonyme	Bedeutung
Contour-Plot	Höhenlinien- darstellung	Eine zweidimensionale Darstellung von Messwerten, bei der durch Höhenlinien «Berge» von Zellen entsprechend ihre Häufigkeit umfahren werden.
Coulter-Volumen		Das durch die Veränderung des elektrischen Widerstands einer Messöffnung präzise bestimmte Volumen einer Zelle.
Dot-Plot	Punktwolken- darstellung	Eine zweidimensionale Darstellung von Messwerten, bei der jede Zelle entsprechend ihren x- und y-Signalintensitäten als einzelner Punkt eingezeichnet wird.
Emission		Das durch anregendes Licht erzeugte abstrahlende längerwellige Fluoreszenzlicht eines Farbstoffs
Exzitation		Der Farbanteil des Lichts, der bei einem Fluoreszenzfarbstoff aufgenommen (absorbiert) und in längerwelliges fluoreszentes Licht umgewandelt wird.
FL1, FL2 . . .		Die entsprechend aufsteigender Wellenlänge durchnummerierten Detektoren für fluoreszentes Licht
«Gate»		Eine Region oder eine Kombination von Regionen, die zur Auswahl von Zellen in einer erneuten Darstellung dient.
Histogramm		Eine eindimensionale Darstellung von Messwerten, in der ein Messwert gegen die Häufigkeit der Zellen aufgetragen wird.
Hüllflüssigkeit	«sheath fluid»	Flüssigkeit, die den Probenstrom in der Messküvette großvolumig umhüllt und hierbei eine Verdünnung und Zentrierung des Probenstroms bewirkt. Es werden Pufferlösungen oder Kochsalzlösungen, zum Teil mit mikrobiziden Zusätzen eingesetzt. Mit Ausnahme bei funktionellen Untersuchungen ist auch der Einsatz destillierten Wassers möglich.
Kanäle	«channel»	Historisch die Quantifizierung von Messwerten über die Durchnummerierung der einzelnen Intensitätsstufen der Digitalisierung. Heute aufgrund der hoch auflösenden Digitalisierung durch eine Darstellung der zugrunde liegenden Intensitätswerte ersetzt.
Kompensation		Korrektur der spektralen Überlappung zwischen Fluoreszenzfarbstoffen.

Tabelle 1 Fortsetzung nächste Seite

Tab. 1. (Fortsetzung)

Ausdruck	Synonyme	Bedeutung
Listenmodus-datei	«list mode data» (LMD)	Datei, die die durchflusszytometrischen Messwerte in der Form eine Liste von Einzelzellen und deren Fluoreszenzsignalen enthält.
Log-Verstärker		Bei älteren Geräten vorhandenes analoges Bauteil, über das die über einen weiten Messbereich verteilten Lichtsignale logarithmisch verdichtet werden, bevor sie digitalisiert werden. Aufgrund von Ungenauigkeit ein Problem bei quantitativen Messungen.
MESF		«Molecules of equivalent soluble fluorochrome»: Maß für die Anzahl der zu einem zellulären Messsignal führenden Fluoreszenzmoleküle
Photomultiplier	PMT	Instrumentenbauteil in Durchflusszytometern mittels dem Lichtsignale in elektrische Signale umgewandelt werden / Photodiode
Pulshöhe	z.B. FL1-Height, FL1-H	Der maximal erreichte Fluoreszenzwert während der Passage einer Zelle durch den Messpunkt. Bei Zellen wie Tumorzellen oder kultivierten Zellen, die breiter als der Laserstrahl sind, falsch niedrige Messung der Gesamtfluoreszenz. Hier kommt die Messung der Pulsfläche zum Einsatz.
Region		In einer zweidimensionalen Darstellung von Messwerten eingeführte Markierung, die eine Population von Zellen für eine weitergehende Analyse auswählt.
Seitwärtslichtstreuung	«side scatter» (SSC)	Das in einem rechten Winkel zum Laserstrahl durch die Zelle abgelenkte Licht
Trigger	«threshold», Schwellenwert	Der Trigger bezeichnet einen Messparameter, der als führender Parameter dazu eingesetzt wird, um bei der Messung «echte» Ereignisse/Zellen, die oberhalb eines Schwellenwerts liegen, vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden.
Vorwärtslichtstreuung	«forward scatter» (FSC)	Das in einem kleinen Winkel zum Laser-Strahl durch die Zelle abgelenkte Licht. Es stellt ein unscharfes Maß der Größe von Zellen dar.

Messung für jede Zelle einzeln in einen Datenspeicher geschrieben. In einem zweiten Schritt werden die gespeicherten Messdaten ausgewertet. Diese Trennung von Messung und Datenanalyse erlaubt eine korrelierte Untersuchung der Messparameter für verschiedene Populationen oder Gruppen von Zellen unter verschiedenen Fragestellungen.

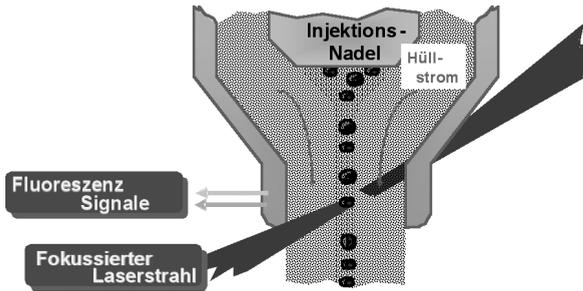


Abb. 1. Prinzip der Durchflusszelle. Zellen werden in Suspension an einem optischen Messpunkt vorbeigeführt. Ein Hüllstrom fokussiert den Probenstrahl und «streckt» ihn, so dass die Zellen einzeln den Messpunkt passieren (modifiziert von R. Murphy, Carnegie Mellon University, [www.isac-net.org](http://www.isac-net.org)).

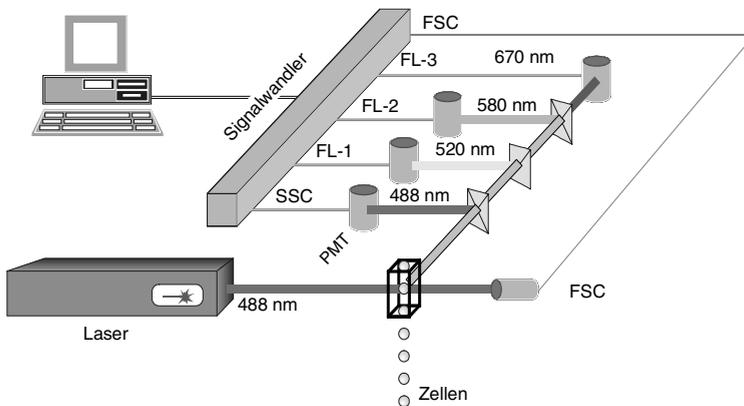


Abb. 2. Genereller Aufbau eines Durchflusszytometers. Am Kreuzungspunkt eines Laserstrahls mit dem Probenstrom wird während der Passage einzelner Zellen Licht gestreut und werden Fluoreszenzen angeregt. Das FSC wird als Maß der Zellgröße detektiert. Farbteilerspiegel und Filter trennen SSC als Maß der Granularität und Fluoreszenzen (FL1, FL2, FL3). Das von Photomultipliern (PMTs) detektierte Licht wird für jede Einzelzellen in digitaler Form gespeichert.

- Die Analyse einer Vielzahl von Zellen erlaubt statistische Auswertungen der Messergebnisse. Gleichzeitig erlaubt die Stabilität des Messaufbaus eine Eichung oder Kalibration von Fluoreszenzsignalen und damit eine quantitative Analyse der molekularen Eigenschaften der Zellen.

Typische Anwendungen der Durchflusszytometrie sind die Analyse des DNA-Gehalts z.B. von Tumorzellen (siehe «DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie», S. 604) oder die Bestimmung der Konzentration von Zellen, die über Antikörper identifiziert werden. Beispiele sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder

CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen. Weiterhin können Koexpressionsmuster von Antigenen untersucht werden, die z.B. die Aktivierung von Zellen des Immunsystems oder eine gestörte Zellreifung bei Leukämien anzeigen. Über die Phänotypisierung von Zellen hinaus kann die Messung von Fluoreszenzsignalen auch für die funktionelle Charakterisierung von Zellen eingesetzt werden. Wichtige Methoden sind hierbei die immunologische Quantifizierung der Expressionsdichte von Rezeptoren (siehe «Qualitätskontrolle und Standardisierung», S. 157), die Analyse von biochemischen Signalen wie Ionenkonzentrationen oder Enzymreaktionen als Reaktion auf eine Stimulation von Zellen (siehe «Bestimmung zellphysiologischer Parameter: pH, Kalzium, Glutathion, Membranpotential», S. 500) oder die Analyse der Interaktion von Rezeptoren und Liganden oder Rezeptorkomplexen (siehe «Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)», S. 120).

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist, in einer an die Anwendung angepassten Form, auch in Hämatologieinstrumenten zu finden. Hierzu zählen Instrumente von Abbott, Beckman Coulter, Bayer Diagnostics und Sysmex. Mit Ihrer Hilfe wird das Differenzialblutbild bestimmt.

Ausführliche Darstellungen der Geschichte der Durchflusszytometrie oder von deren klinischen Anwendungen finden sich im Kapitel 1 dieses Buches («Die Durchflusszytometrie im Wandel der Forschungskonzepte», S. 1) sowie in einer Übersicht von Janossy [1]. Das Ziel dieses Kapitels ist es, die allgemeinen Grundlagen wichtiger Methoden der Diagnostik oder klinischen Forschung sowie die hierfür genutzten technologischen Plattformen vorzustellen. Für einen intensiveren Einstieg in die Technik der Durchflusszytometrie wird auf das Handbuch von Shapiro [2] verwiesen.

## **Technische Grundlagen**

### *Prinzip des Messvorgangs*

Die durchflusszytometrische Analyse basiert auf der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenzen in dem Moment, in dem die Zellen einen rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten Laser-Strahl passieren. Zellen in Größen zwischen 0,2 und 20  $\mu\text{m}$  werden hierbei in einem Hüllstrom am Fokus des Laser-Strahls mit Geschwindigkeiten zwischen 200 und 2000 Ereignissen/s vorbeigeführt. Für die Analyse seltener Zellen oder bei hohem Probendurchsatz erlaubt die Aufnahmeelektronik auf einigen Gerätetypen auch deutlich höhere Zählraten bis hin zu 50 000 Zellen/s. Die Zuführung des Probenstroms ist langsam und liegt typischerweise zwischen 10 und 60  $\mu\text{l}/\text{min}$ , auch wenn einige Geräte Werte von 300  $\mu\text{l}/\text{min}$  und höher erlauben.

## Optik

Im Moment des Durchtritts durch den Fokus des Lasers werden als physikalische Messgrößen die Lichtstreuung der Zellen in einem engen Winkel zum Laserlicht als Vorwärtsstreulicht (forward scatter; FSC) und die Lichtstreuung im Winkel von  $90^\circ$  als Seitwärtsstreulicht (side scatter; SSC) detektiert (Abb. 3). Das je nach Gerät ab etwa  $0,5\text{--}1\ \mu\text{m}$  Größe der Zellen auflösbare FSC ist grob betrachtet ein Maß der Größe von Zellen, auch wenn es von der Form der Zellen abhängt und nicht stetig mit der Größe zunimmt. SSC hängt vor allen Dingen von der komplexen Mehrfachstreuung durch intrazelluläre Kompartimente und damit grob betrachtet von der Granularität und Binnenstruktur der Zellen ab. Die Signale der Lichtstreuung hängen sowohl von der Vorbehandlung der Zellen, z.B. der Lyse von Erythrozyten oder der Fixation, als auch von der Optik der Durchflusszelle ab. Auf die Optik verschiedener Instrumente abgestimmte Lyselösungen werden daher zur Optimierung der Trennung von Zellen des Bluts in der Lichtstreuung eingesetzt (Abb. 4). Als präziserer Weg der Zellgrößenbestimmung kann auch die Änderung des elektrischen Widerstands bei Durchtritt der Zellen durch einen Messkanal analysiert werden. Diese von Coulter eingeführte Volumenbestimmung ist bei einigen Instrumenten beispielsweise der Firma Partec verwirklicht.

Da die Lichtstreuung mit zunehmendem Winkel zum Laser-Strahl schwächer wird, werden die gleichermaßen in alle Richtungen ausgesandten Fluoreszenzsignale ebenfalls im Winkel von  $90^\circ$  detektiert. Hierbei werden Farbteilerspiegel und Bandpassfilter für die optische Trennung der Emissionsspektren der verschiedenen

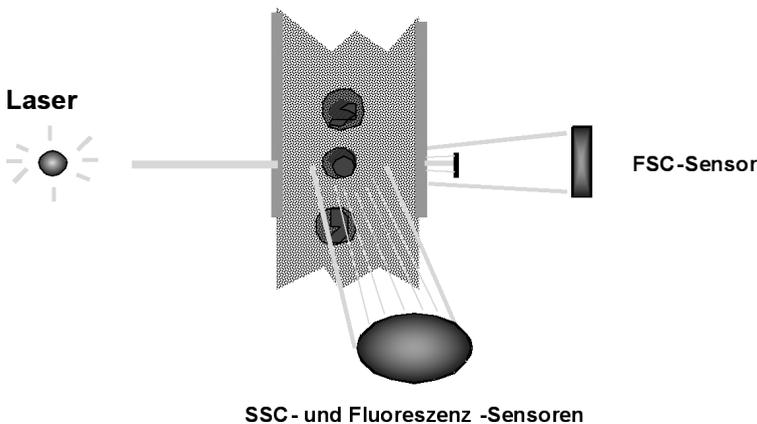


Abb. 3. Geometrie der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenzen. Das in einem engen Winkel zum Laserlicht gemessene FSC) ist ein grobes Maß der Größe der Zellen. Im rechten Winkel werden das SSC als Maß der Granularität und das längerwellige Fluoreszenzlicht aufgenommen (modifiziert von R. Murphy, Carnegie Mellon University, [www.isac-net.org](http://www.isac-net.org)).

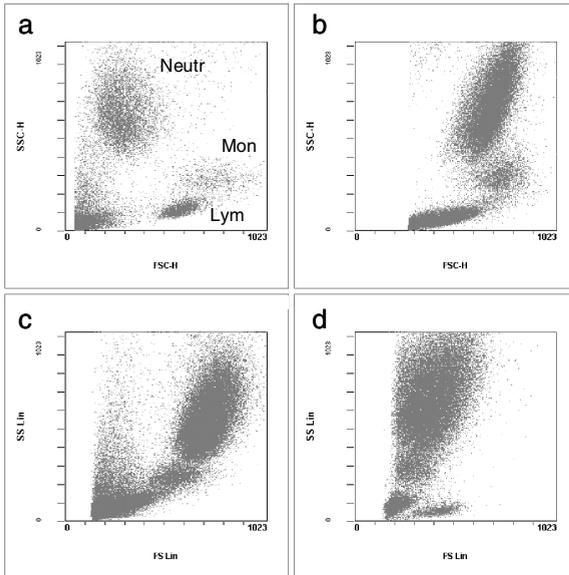


Abb. 4. Abhängigkeit der Lichtstreuung von Optik und Präanalytik. Analyse der Lichtstreuung von Leukozyten im Vollblut auf einem BD Biosciences FACSCalibur (a, b) und einem Beckman Coulter FC500 (c, d) nach Lyse mit einer für die Optik von Beckman Coulter (a, c) bzw. BD Biosciences (b, d) optimierten Lyse. Lymphozyten (Lym), Monozyten (Mon) und neutrophile Granulozyten zeigen ein steigendes SSC. Die Rangfolge des FSC hängt dagegen sowohl vom unterschiedlichen optischen Winkel der Messung als auch von der eingesetzten Lysetechnik ab.

Farbstoffe eingesetzt (Abb. 5) (siehe «Auswahl und Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen», S. 83). Deren spektral unterschiedene Lichtsignale werden dann über Photomultiplier (PMT) detektiert, die das Licht in elektrische Signale umwandeln. Einer üblichen Nomenklatur folgend werden die Detektoren mit zunehmendem spektralen Abstand vom Anregungslicht aufsteigend nummeriert (FL1, FL2, FL3... ). Bei Anregung mit dem blau-grünen Licht eines 488-nm-Argon-Lasers erkennt beispielsweise der FL1-Detektor grünes Licht, der FL2-Detektor oranges Licht und der FL3-Detektor rotes Licht. Die elektrischen Signale werden dann als digitalisierter Datensatz mit jeweils allen Messwerten einer einzelnen Zelle in eine «List mode»-Datei geschrieben.

### Datenaufnahme

Um aus dem kontinuierlichen «Hintergrundrauschen» die den einzelnen Zellen zuzuordnenden Signale herausfiltern zu können, wird während der Datenauf-

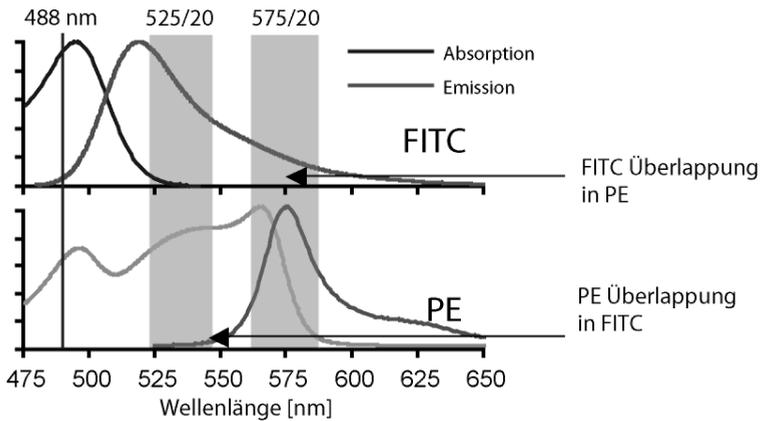


Abb. 5. Spektrale Trennung von Fluoreszenzsignalen über Bandpassfilter. Unter Anregung durch das blaue Licht eines Argon-Lasers (488 nm) kommt es zu grün-gelber Fluoreszenz von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und oranger Fluoreszenz von Phycoerythrin (PE). Bandpassfilter von 20 nm Breite um 525 nm und 575 nm erlauben die Messung von Licht im Bereich vorwiegender Emission von FITC und PE. Eine Überlappung der Farbstoffe muss nach dem Messvorgang durch Kompensation korrigiert werden (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Schiemann und D. Busch).

nahme auf einem führendem Parameter, dem Triggerparameter, ein Schwellenwert oder «threshold» definiert. Bei Überschreiten des Schwellenwerts werden die Aufnahme und das Abspeichern jeweils eines Datensatzes ausgelöst. Wird z.B. über den Parameter FSC getriggert, werden alle Zellen ab einer gewissen Größe für die Aufnahme registriert, unabhängig davon ob diese Zellen ein Färbesignal aufweisen. Bei Proben mit einem hohen Rauschanteil wie z.B. bei unlysierten Vollblutproben können alle Zellen z.B. über einen DNA-Farbstoff oder einen Antikörper, der alle Zellen identifiziert, markiert werden. Damit werden bei der Aufnahme zuverlässig alle Zellen registriert, ohne dass die Aufnahme von Rauschsignalen eine sehr große Datei erzeugt und Messdaten irrelevanter Zellen oder Ereignisse gespeichert werden.

Kritisch für die Qualität der Datenaufnahme ist weiterhin die Wahl der Pulsverarbeitung. So wird für immunologische Messungen häufig während des Vorbeifließens einer Zelle am Laser das höchste Lichtsignal, die Pulshöhe (z.B. FL1-Height oder FL1-H), abgespeichert. Dieses Signal ist jedoch nur bei Zellen, die während der Passage vollständig durch den Laser ausgeleuchtet werden, zur Fluoreszenz der Zelle proportional. Bei großen Zellen, wie Zellen nach Kultur oder Tumorzellen, ist daher die Aufnahme des Integrals des Lichtsignals, der Pulsfläche (z.B. FL1-Area oder FL1-A), erforderlich. Die auf vielen Geräten mögliche simultane Analyse der Pulsbreite (z.B. FL1-Width oder FL1-W) und der Pulsfläche er-

möglicht auch die Unterscheidung zwischen Signalen, die durch die gleichzeitige Passage zweier Zellen (koinzidente Zellen) entstanden sind, von Signalen, die einer einzelnen aber großen Zelle zuzuordnen sind.

Schließlich gibt es unterschiedliche Konzepte für die Gewinnung logarithmischer Messdaten und die Korrektur der spektralen Überlappung von Farbstoffen durch Kompensation, die einen Einfluss auf die Qualität von Messdaten haben. Eine logarithmische Darstellung der gemessenen Fluoreszenzsignale ist in der Regel erforderlich, da z.B. die Färbung mit monoklonalen Antikörpern häufig zu 100- oder 1000-fachen Unterschieden zwischen den Signalen von stark positiven und negativen Zellen führt. Ein Erkennen von schwachen Signalen ist vor diesem Hintergrund nur bei logarithmierter Darstellung der Messdaten möglich. Typischerweise wird ein Bereich von vier Dekaden hierbei in 1024 oder 4096 Kanal-klassen dargestellt. Eine einfache Form der Logarithmierung ist die elektronische Logarithmierung über einen analogen Verstärker. Diese führt bei einer Quantifizierung von Messdaten jedoch zu deutlichen Fehlern, die insbesondere im unteren Messbereich und im obersten Messbereich ausgeprägt sind. Moderne Durchflusszytometer lösen das Problem über eine hoch auflösende Digitalisierung von Messdaten, die eine rechnerisch korrekte Umwandlung der bereits digitalisierten Daten erlaubt (Tab. 1).

Lediglich im Falle von alleinigen DNA-Messungen besitzt eine Aufnahme von Fluoreszenzsignalen mit linearer Verstärkung Vorteile. Aus Tradition werden Lichtstreuungssignale wie FSC und SSC meist mit linearer Verstärkung aufgenommen. Diese Vorgehensweise besitzt keinen Vorteil gegenüber einer logarithmischen Aufnahme der Lichtstreuungssignale. Ein Nachteil ist, dass die lineare Aufnahme in der Regel keine Abgrenzung von größeren oder stärker granulierten Zellen erlaubt. Hierzu gehören z.B. Plasmazellen oder eosinophile Granulozyten im peripheren Blut oder Doubletten von Zellen und proliferierende Zellfraktionen bei adhäsiven oder stimulierten Zellmaterialien.

### *Kompensation*

Ein verwandtes Problem ist die Korrektur der Messdaten für Fluoreszenzsignale entsprechend der spektralen Überlappung von Farbstoffen durch Kompensation. Das Problem besteht darin, dass die eingesetzten Farbstoffe in ihren Emissionsspektren überlappen, so dass jeweils Mischungen mit verschiedenen Anteilen von Farbstoffen detektiert werden (Abb. 5) (siehe «Auswahl und Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen», S. 83). Eine nicht korrigierte Messung zeigt daher auch für Zellen, die jeweils nur mit einem Farbstoff markiert wurden, Mischsignale auf zwei Detektoren (Abb. 6; siehe Abb. 11 zur Erklärung der Darstellung). Auch hier gibt es die Möglichkeit der analogen Lösung des Problems durch eine prozentuale

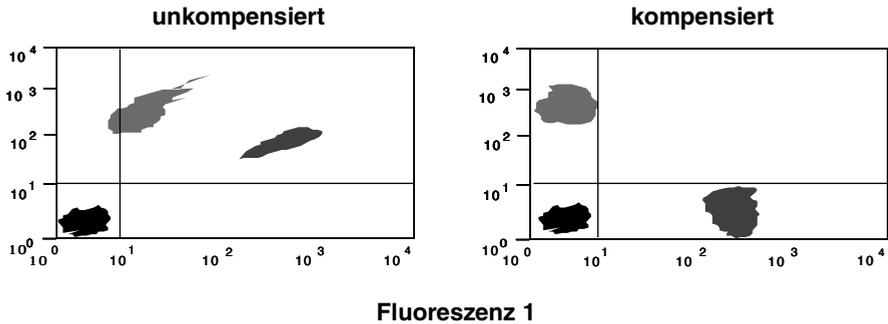


Abb. 6. Prinzip der Kompensation. Die spektrale Überlappung der Emissionsspektren (siehe Abb. 5) führt in der linken Abbildung dazu, dass jeder PMT jeweils auch Farbanteile spektral benachbarter Farbstoffe detektiert. Eine rechnerische Korrektur um den prozentualen Anteil benachbarter Farbstoffe führt in der rechten Abbildung zur «kompensierten» Darstellung der Farbsignale.

Korrektur von Messdaten vor Digitalisierung und Speicherung, die für viele immunologische Fragestellungen ausreichend ist. Ein Problem ist jedoch, dass eine fehlerhafte Kompensation zu nicht mehr korrigierbaren Fehlern der Messdaten führt. Eine moderne Lösung ist auch hier die hoch auflösende Digitalisierung der originalen Messdaten, die unkompensiert gespeichert werden. Die Kompensation erfolgt dann «offline» über Software während der Re-Analyse und kann jederzeit korrigiert werden. Die Einführung von automatisierter Softwarekompensation hat in letzter Zeit vor allen Dingen auch die routinemäßige Durchführung von komplexen Färbungen mit simultaner Detektion von fünf und mehr Immunfluoreszenzen ermöglicht.

### *Mehrfachanregung*

Das Ziel, vier, fünf oder mehr Fluoreszenzen gleichzeitig zu detektieren, hat in letzter Zeit zur Verwendung von Mehrfach-Laser-Anregungen bei Routineapplikationen geführt. Wie in Kapitel 4 («Auswahl und Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen», S. 83) ausführlich dargestellt wird, erlauben Geräte mit mehreren Lasern den Einsatz eines größeren Spektrums von Farbstoffen, da mehrere Anregungswellenlängen für die Exzitation (Anregung) von Farbstoffen eingesetzt werden können. Wichtig ist hierbei ein apparativer Unterschied in den verfügbaren Messplattformen. In einem einfacheren Aufbau treffen die Zellen mehrere Laser am gleichen Messpunkt in der Durchflusszelle (kollektive Laser-Einkopplung; Tab. 1). Dies ist mit der Einschränkung verbunden, dass sich alle eingesetzten Farbstoffe in ihrer Emission unterscheiden müssen. In einem flexibler einsetzbaren Aufbau passiert die Zelle verschiedene Laser an hintereinander angeordneten Mess-

punkten (räumliche getrennte Laser-Einkoppelung). In diesem Falle können auch Farbstoffe gleicher Emission parallel eingesetzt werden, sofern sie jeweils nur von einem der Laser intensiv angeregt werden. Einige Geräte haben eine Quecksilber-Kurzbogenlampe als Anregungsquelle. Da diese Lichtquelle in mehreren Farben leuchtet, wird die Anregungswellenlänge durch nachgeschaltete Farbfilter eingestellt. Mehrfachanregung ist hier prinzipiell kollinear oder in Kombination mit Lasern möglich.

#### *Datenformate, Flow Cytometry Standard Format (FCS)*

Ein geräteübergreifender Standard wurde bereits vor einiger Zeit für die Form der Datenspeicherung in so genannten «List mode»-Dateien gefunden. Der aktuelle FCS.3.0-Standard sieht im Header der Datei die genaue Beschreibung der gewählten technischen Messeinstellungen sowie der Probe, der Färbung oder des Experiments vor. Der Header wird beim Öffnen der Datei gelesen. Dadurch können bei der Datenauswertung alle messspezifischen Einstellungen mit ausgedruckt werden bzw. aus der Datei die Einstellungen früherer Messungen übernommen werden. Durch Öffnen einer Messdatei mit einem regulären Textverarbeitungsprogramm (z.B. Microsoft Word) können alle gespeicherten Einstellungen angesehen werden. In dem hinter dem Header liegenden Teil des Datensatzes werden die gemessenen Lichtstreuungs- oder Fluoreszenzsignale jeder Zelle in einem für alle nach dem FCS-Standard arbeitenden Softwarepakete auswertbaren Format abgespeichert. Die optionale Abspeicherung der Zeit erlaubt auch die kinetische Auswertung von Messungen, z.B. bei Stimulationsexperimenten.

#### *Apparative Aufbauten am Markt etablierter Geräte*

Die derzeit für analytische Anwendungen und insbesondere in der Diagnostik eingesetzten Durchflusszytometer zeichnen sich durch einen geschlossenen Messaufbau aus, bei dem mit einer vom Hersteller vorjustierten Laser-Einkoppelung und Optik die Analyse von Zellen in einem geschlossenen Probenstrom in einer Küvette erfolgt. Weiterhin wird in erster Linie aufgrund der historisch gewachsenen Verfügbarkeit von fluoreszenzmarkierten Antikörpern ein bei 488 nm emittierender Argon-Laser als Hauptlichtquelle eingesetzt, der um weitere Laser ergänzt werden kann. Offene Messaufbauten dienen vorwiegend der Zellsortierung und werden in Kapitel 8 («Durchflusszytometrische Zellsortierung», S. 178) beschrieben. Eine genaue Beschreibung der spektralen Eigenschaften von Lasern und der hierzu passenden Farbstoffe findet sich in Kapitel 4 («Auswahl und Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen», S. 83).

Ein Beispiel für die Aufnahme von bis zu fünf Fluoreszenzsignalen entweder bei Anregung mit einem einzelnen Argon-Laser oder ergänzt um einen kollinear eingekoppelten roten Laser ist der Cytomics FC500 der Firma Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland). Der optische Aufbau des Geräts ist durch eine räumlich dicht gepackte Anordnung von Farbteilerspiegeln und Bandpassfiltern nahe der Flusszelle gekennzeichnet (Abb. 7). Weiterhin sind wie auch bei dem älteren Epics XL von Beckman Coulter digitale Logarithmierung und Kompensation, eine integrierte automatisierte Probenzuführung und ein hohes Maß an Automatisierung des Messablaufs und der Qualitätskontrolle sowie Konnektivität zu Laborinformationssystemen Kennzeichen des Geräts.

Ein Beispiel für ein Gerät mit räumlicher getrennter Doppel-Laser-Anregung und die Aufnahme von bis zu sechs Fluoreszenzsignalen ist der FACSCanto (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Der komplexere optische Aufbau ist durch eine faseroptische Ankopplung der Laser sowie der Detektionsoptik gekennzeichnet (Abb. 8). Das Gerät verfügt ebenso über eine digitale Verarbeitung von primären Messdaten, eine automatisierte Probenhandhabung ist optional. Ein älteres, aber für viele Anwendungen ausreichendes Bauprinzip ist beim FACSCalibur (BD Biosciences) umgesetzt, der bei ebenfalls räumlich getrennter Doppel-Laser-Anregung nur über eine analoge Logarithmierung und Kompensation verfügt. Zu erwähnen ist als in der Forschung eingesetztes analytisches Gerät noch der LSR II

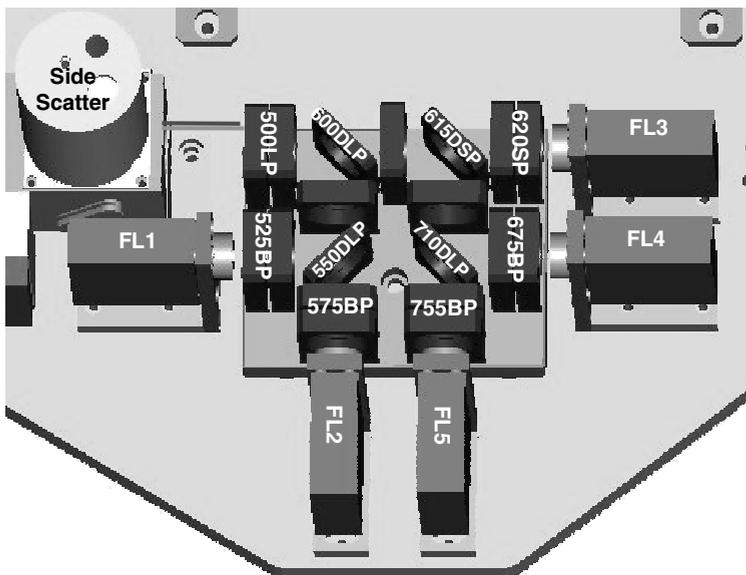


Abb. 7. Optische Bank des Beckman Coulter FC 500.

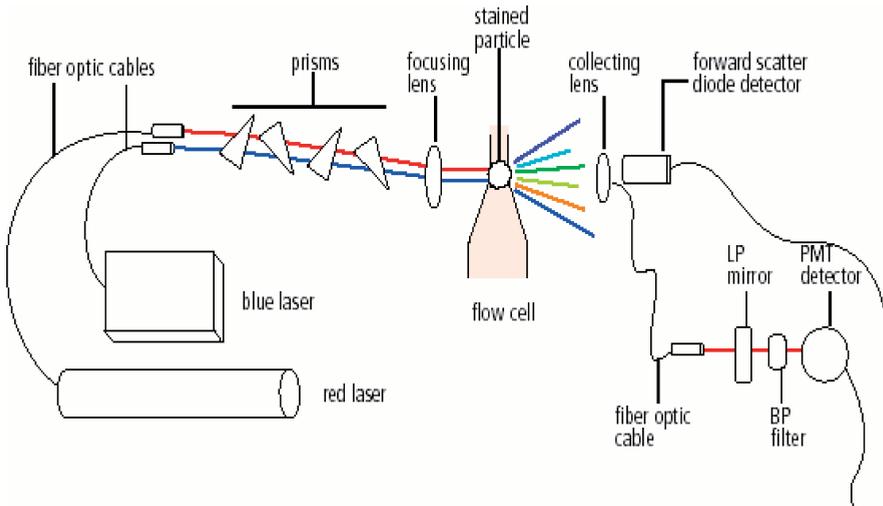


Abb. 8. Lichtfaseroptik des BD Biosciences FACSCanto.

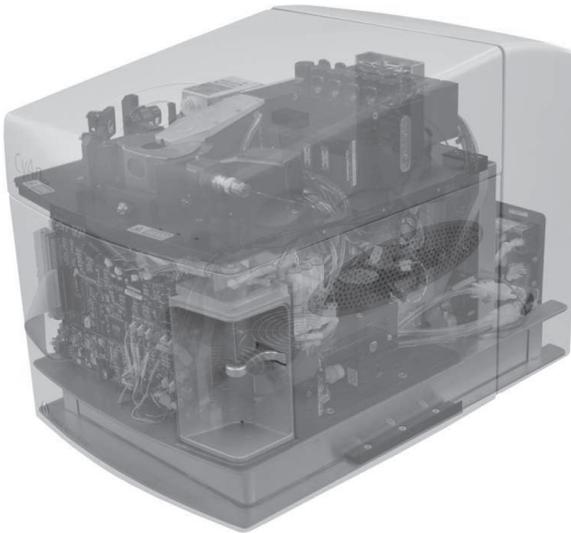


Abb. 9. Räumlicher Aufbau des Dako CyAn.

(BD Biosciences), dessen Gehäuse mit bis zu vier Lasern betrieben werden kann und die Detektion von bis zu 18 Fluoreszenzen erlaubt.

Eine sehr kompakte Lösung für eine komplexe Mehrfachanregung mit bis zu drei Lasern, räumlich getrennter Anregung und maximal 9 Fluoreszenzen stellt schließlich der CyAn (Dako, Hamburg, Deutschland) dar (Abb. 9). Mit digitaler

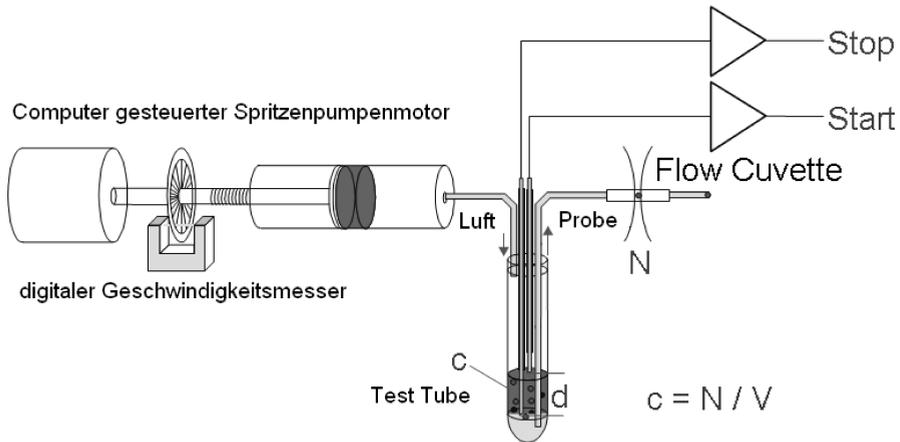


Abb. 10. Steuerung und Messung des Probenvolumenflusses bei Geräten der Firma Partec.

Parallelprozessierung der primären Messdaten wurde das Gerät für die Aufnahme von bis zu 50 000 Messdaten/s bei hohem maximalem Fluss des Probenvolumens entwickelt.

Die präzise Steuerung und Messung des Probenvolumenflusses ist ein besonderes Merkmal von Durchflusszytometern der Firma Partec (Münster, Deutschland) (Abb. 10). Diese Option erlaubt eine Absolutzählung von Zellen, ohne dass hierfür während der Präparation der Probe Mikropartikel als Volumenstandards (siehe unten) zugesetzt werden müssen. Die von der Firma Partec angebotenen Durchflusszytometer sind über eine relativ kompakte Bauweise und Flexibilität der optischen Bestückung charakterisiert.

Die Eigenschaften der beschriebenen Instrumente werden zusammenfassend in den Tabellen 2–5 dargestellt. Diese Tabellen sollen primär dem Verständnis der Charakteristika der einzelnen Geräte dienen. Es gibt kaum eine in diesem Buch beschriebene analytische Anwendung, die die Auswahl eines bestimmten Gerätetyps erforderlich macht und nicht auf eine andere als die im Buch beschriebene Plattform zu adaptieren ist. Weiterhin stellen für viele Zwecke die schwerer in einem übersichtlichen Vergleich zu fassende Qualität der Software zur Bedienung des Geräts sowie die Schnittstellen zu Systemen für die Probenpräparation und anderen EDV-Systemen wie Laborinformationssystemen wesentlichere Kriterien für eine Geräteauswahl dar.

#### *Prinzip der Datenanalyse*

Wie bereits oben beschrieben wurde, ist in der Durchflusszytometrie die komplette Speicherung der verschiedenen Messparameter für jede einzelne Zelle in ei-

Tab. 2. Technische Spezifikationen analytischer Beckmann-Coulter-Durchflusszytometer nach Herstellerangaben

Parameter	BC Cytomics FC 500	BC EPIC XL/XL-MCL
Laser	20-mW-Argon-Laser 488 nm und optional 25-mW-Red-Solid-State-Diode 635 nm	20-mW-Argon-Laser 488 nm
Anregung	entfällt im Falle der Ein-Laser-Konfiguration; kollineare Laser-Konfiguration im Falle der Zwei-Laser-Konfiguration	entfällt, da kein Laser-Alignment notwendig
Detektoren	FSC (zwei verschiedene Winkel anwählbar), SSC, 5 Fluoreszenzen	FSC, SSC, 4 Fluoreszenzen
Standardfilter	FITC 525BP, PE 575BP, ECD 620BP; PC5 675BP, PE-Cy7 755BP, dichroitische LP: 488, 550, 600, 710, dichroitische SP: 615, 645 LP: 500, SP: 620	FITC 525BP; PE 575BP, ECD 620BP; PE-Cy5 675BP, dichroitische LP: 488, 550, 600, Blocking Filter: 488
Standardfluochrome	FITC, PE, PE-TexasRed (ECD), PE-Cy5 (Ein-Laser-Konfiguration) oder APC (Zwei-Laser-Konfiguration), PE-Cy7	FITC, PE, PE-TexasRed (ECD), PE-Cy5
Sensitivität Fluoreszenz	PE < 300 MESF, FITC < 600 MESF	FITC und PE < 1000 MESF
Auflösung Streulicht	FSC 0,5 µm, SSC < 0,5 µm	FSC 0,5 µm, SSC < 0,5 µm
Signalverarbeitung	digital, 20 bit	digital, 10 bit
Kompensation	Inverted Matrix, on- und offline	Inverted Matrix, online
Maximale Ereignisrate	3300 Ereignisse/s voll kompensiert	3300 Ereignisse/s voll kompensiert
Datenauflösung	1 048 576 Kanäle	1024 Kanäle
Datenformat	FCS 3.0, abwärts kompatibel Auswertung möglich	FCS 2.0
Computer/ Betriebssystem	PC/Microsoft Windows 2000	PC/Microsoft Windows 98 und/oder Microsoft DOS 6.22
Probenzuführung	Karussellzuführung für 32 Röhren und Einzelzuführungsposition mit integriertem Vortex (MCL) oder Multi Plate Loader für Röhren und Mikrotiterplatten (MPL)	Einzelzuführung optional mit Karussellzuführung für 32 Röhren mit integriertem Vortex (MCL)

Tab. 2 Fortsetzung nächste Seite

Tab. 2. (Fortsetzung)

Parameter	BC Cytomics FC 500	BC EPIC XL/XL-MCL
Medienversorgung	integrierte Medienversorgung für «Sheath»- und Reinigungsflüssigkeit, externer Abfallbehälter.	integrierte Medienversorgung für «Sheath»- und Reinigungsflüssigkeit, externer Abfallbehälter
Flussrate	10, 30 oder 60 µl Probe/min	10, 30 oder 60 µl Probe/min
Probenverschleppung	<1,0%	<1,0%
Stromanschluss	220/240 V, 16 A	220/240 V, 16 A

APC = Allophycocyanin; FITC = Fluoreszeinisothiocyanat; MESF = «molecule equivalent soluble fluorochrome»; PE = Phycoerythrin; PE-Cy5 = Phycoerythrin-Cyanin-5; PE-Cy7 = Phycoerythrin-Cyanin-7.

nem standardisierten Datei-Format (FCS-3.0-Format) möglich. Die Messbedingungen sind im Header der Datei dokumentiert. Die Auswertung ist grundsätzlich von der Messung unabhängig. Diese kann auf anderen als den bei der Aufnahme eingesetzten Rechnern und auch mit anderer Software erfolgen. Hierbei können bei modernen Geräten, die über eine digitale Kompensation verfügen, Fehler der Kompensation während der Aufnahme der Daten nachträglich korrigiert werden. Falls während der Messung Triggerparameter falsch gesetzt wurden oder falls Zellen aufgrund falscher Verstärkungen oberhalb oder unterhalb des aufgelösten Messbereichs liegen, sind Fehler der Messung in der Analyse jedoch nicht mehr korrigierbar.

Das Hauptziel der Datenanalyse ist es, in dem aufgenommenen Datensatz Gruppen von Zellen ähnlicher Eigenschaften, so genannte Populationen, zu identifizieren und diese anschließend in Hinblick auf ihren Anteil an den gemessenen Zellen, ihre absolute Konzentration, das Muster der Expression der verschiedenen gemessenen Parameter und ihre Heterogenität zu beschreiben. Hierzu sind eine Reihe von Darstellungen möglich, die dazu dienen den durch die verschiedenen Messparameter gegebenen mehrdimensionalen Raum auf unmittelbar verständliche ein- oder zweidimensionale Ansichten zu reduzieren (Abb. 11).

### *Histogramme*

Ein Histogramm stellt mit seiner eindimensionalen Darstellung der Intensitätsverteilung für einen Parameter die einfachste Form der Darstellung dar. Hierbei wird auf der x-Achse die Intensität der gemessenen Signale, z.B. einer bestimmten

Tab. 3. Technische Spezifikationen analytischer BD-Biosciences-Durchflusszytometer nach Herstellerangaben

Parameter	BD FACScanto	BD LSR II	BD FACScalibur
Laser	20-mW-Feststoff-Laser 488 nm und 17-mW-Helium-Neon-Laser 633 nm, Ankopplung über Glasfaser	25-mW-Feststoff-Laser 355 nm, 25-mW- Dioden-Laser 405 nm, 20-mW-Feststoff-Laser 488 nm und 17-mW-Helium-Neon-Laser 633 nm	15-mW-Argon-Laser 488 nm und 10-mW-Dioden-Laser 633 nm
Anregung	räumlich getrennt, fixes «time delay» für die elektronische Verarbeitung	räumlich getrennt, fixes «time delay» für die elektronische Verarbeitung	räumlich getrennt, fixes «time delay» für die elektronische Verarbeitung
Detektoren	FSC, SSC, 6 Fluoreszenzen	FSC, SSC, bis zu 18 Fluoreszenzen	FSC, SSC, 4 Fluoreszenzen
Standardfilter	FITC; 502LP, 530/30BP; PE 556LP, 585/42BP; PerCP/PerCP-Cy5,5 655LP; 670LP; PE-Cy7 735LP, 780/60BP; APC-Cy7 735LP; 780/60BP; APC kein LP, 660/20BP Filter vom Anwender frei wechselbar	Bei BD Biosciences anfragen Filter vom Anwender frei wechselbar	FITC 530/30BP; PE 585/42BP, PerCP/PerCP-Cy55 670LP; APC 661/16BP
Standardfluorochrome	FITC, PE, PerCP/PerCP-Cy55, PE-Cy7; APC, APC-Cy7	Bei BD Biosciences anfragen	FITC, PE, PerCP/PerCP-Cy55; APC
Sensitivität Fluoreszenz	PE < 50 MESF, FITC < 100 MESF	<200 MESF	<200 MESF
Auflösung Streulicht	FSC 1 µm, SSC 0,5 µm	ermöglicht die Trennung fixierter Thrombozyten vom Messhintergrundrauschen	optimiert für die Auflösung von Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten
Signalverarbeitung	digital, 18 bit	digital, 18 bit	analog
Kompensation	Inverted Matrix, on- und offline	Inverted Matrix, on- und offline	online

Tab. 3 Fortsetzung nächste Seite

Tab. 3. (Fortsetzung)

Parameter	BD FACScanto	BD LSR II	BD FACScalibur
Maximale Ereignisrate	10 000 Ereignisse/s voll kompensiert	mehr als 20 000 Ereignisse/s	3500 Ereignisse/s
Datenauflösung	262 144 Kanäle	262 144 Kanäle	1024 Kanäle
Datenformat	FCS 2.0 und 3.0	FCS 2.0 und 3.0	FCS 2.0
Computer/Betriebssystem	PC/Microsoft Windows XP Pro	PC/Microsoft Windows XP Pro	Mac/OSX
Probenzuführung	Einzelzuführung für Röhren, optional Karussellzuführung für 40 Röhren oder HTS-Option für die Messung aus Mikrotiterplatten	Einzelzuführung für Röhren, optional HTS-Option für die Messung aus Mikrotiterplatten	Einzelzuführung für Röhren, optional Karussellzuführung für 40 Röhren oder HTS-Option für die Messung aus Mikrotiterplatten
Medienversorgung	externe Medienversorgung für «Sheath»-Flüssigkeit, Abfall und Reinigungsflüssigkeiten	externe Medienversorgung mit optional wählbaren Gefäßgrößen	integriert oder optional externe Medienversorgung für «Sheath»-Flüssigkeit und Abfall, mit fünfjährig verlängerter, unterbrechungsfreier Laufzeit
Flussrate	10, 60 oder 120 µl Probe/min	12, 35 oder 60 µl Probe/min, mit zusätzlicher Möglichkeit der Feinregulierung im Bereich 0,5–2×	12, 35 oder 60 µl Probe/min
Probenverschleppung	<0,1%	<1,0%	<1,0%
Stromanschluss	230 V, 16 A	230 V, 16 A	230 V, 16 A

APC = Allophycocyanin; APC-Cy7 = Allophycocyanin-Cyanin-7; FITC = Fluoresceinisothiocyanat; MESF = «molecule equivalent soluble fluorochrome»; PE = Phycoerythrin; PE-Cy7 = Phycoerythrin-Cyanin-7; PerCP = Peridimin-Chlorophyll-Protein-Komplex; PerCP-Cy5.5 = Peridimin-Chlorophyll-Protein-Komplex-Cyanin-5.5.

Tab. 4. Technische Spezifikationen analytischer Dako-Durchflusszytometer nach Herstellerangaben

Parameter	Dako CyAn ADP 7 color	Dako CyAn ADP 9 color
Lasert	20-mW-Feststoff-Laser 488 nm und 25-mW-Dioden-Laser 635 nm, elliptische «Beamshaping»-Optik	25-mW-Dioden-Laser 405 nm, 20-mW-Feststoff-Laser 488 nm und 25-mW-Dioden-Laser 635 nm, elliptische «Beamshaping»-Optik
Anregung	räumlich durch «pinholes» getrennt, fixes «time delay» für die elektronische Verarbeitung	räumlich durch «pinholes» getrennt, fixes «time delay» für die elektronische Verarbeitung
Detektoren	FSC, SSC, 7 Fluoreszenzen	FSC, SSC, 9 Fluoreszenzen
Standardfilter	FITC: 530/40BP – (545DLP) – PE: 575/25BP- (595DLP)- PE-TxR/PI: 613/20BP – (640DLP) – PerCP/7AAD: 680/30BP- (730DLP) – PE-Cy7: 750LP; APC: 665/20BP -(730DLP) – APC-Cy7: 750LP Standard 12-mm-Filter vom Anwender frei wechselbar	FITC: 530/40BP – (545DLP) – PE: 575/25BP- (595DLP)- PE-TxR/PI: 613/20BP – (640DLP) – PerCP/7AAD: 680/30BP- (730DLP) – PE-Cy7: 750LP; APC: 665/20BP -(730DLP) – APC-Cy7: 750LP PB: 450/50BP – (485DLP) –CY: 530/40BP Standard 12-mm-Filter vom Anwender frei wechselbar
Standardfluorochrome	FITC, PE, PE-TexasRed/PI, PerCP/7AAD, PE-Cy7; APC, APC-Cy7	FITC, PE, PE-TexasRed/PI, PerCP/PerCP-Cy5.5, PE-Cy7; APC, APC-Cy7; Pacific Blue, Cascade Yellow
Sensitivität Fluoreszenz	PE < 50 MESF, FITC < 100 MESF	PE <50 MESF, FITC < 100 MESF
Auflösung Streulicht	FSC 1 µm, SSC 0,5 µm	FSC 1 µm, SSC 0,5 µm
Signalverarbeitung	digital, volle Auflösung in allen Dekaden durch synthetische Pulstransformation 16 bit	digital, volle Auflösung in allen Dekaden durch synthetische Pulstransformation 16 bit
Kompensation	Inverted Matrix, on- und offline	Inverted Matrix, on- und offline
Maximale Ereignisrate	50 000 Ereignisse/s voll kompensiert	50 000 Ereignisse/s voll kompensiert
Datenauflösung	65 536 Kanäle	65 536 Kanäle
Datenformat	FCS 2.0, 3.1	FCS 2.0, 3.1
Computer/ Betriebssystem	PC/Microsoft Windows XP Pro	PC/Microsoft Windows XP Pro

Tabelle 4 Fortsetzung nächste Seite

Tab. 4. (Fortsetzung)

Parameter	Dako CyAn ADP 7 color	Dako CyAn ADP 9 color
Probenzuführung	Einzelzuführung für Röhren	Einzelzuführung für Röhren
Medienversorgung	externe Medienversorgung für 20 l «Sheath»-Flüssigkeit, 20 l Abfall und 5 l Reinigungsflüssigkeit	externe Medienversorgung für 20 l «Sheath»-Flüssigkeit, 20 l Abfall und 5 l Reinigungsflüssigkeit
Flussrate	0–300 µl Probe/min variabel, 3 benutzerdefinierte Presets	0–300 µl Probe/min variabel, 3 benutzerdefinierte Presets
Probenverschleppung	<1%	<1%
Stromanschluss	230 V, 16 A	230 V, 16 A

APC = Allophycocyanin; APC-Cy7 = Allophycocyanin-Cyanin-7; FITC = Fluoreszeinisothiocyanat; MESF = «molecule equivalent soluble fluorochrome»; PE = Phycoerythrin; PE-Cy7 = Phycoerythrin-Cyanin-7; PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex; PerCP-Cy5.5 = Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex-Cyanin-5.5; PI = Propidiumjodid.

Fluoreszenz, aufgetragen. Auf der y-Achse wird die Zahl von Zellen aufgetragen, die mit einer bestimmten Intensität analysiert wurden. Bei nur wenigen gemessenen Zellen sieht die Verteilungskurve häufig gezackt aus. Da in der Regel 1024 digitalisierte Intensitätsstufen oder «Kanäle» auf der y-Achse mit einzelnen Balken angezeigt werden, ist die Darstellung von vielen Tausend Zellen erforderlich, damit jeweils mehrere Zellen in den Kanälen registriert werden und eine gleichmäßiges Bild des Histogramms entsteht. Aus diesen Gründen ist häufig eine Glättungsfunktion bereits voreingestellt, die durch Zusammenfassen von Kanälen oder statistische Mittelung zu ansprechenden Darstellungen führt.

Neben der Darstellung von Verteilungsmustern dienen Histogramme auch der Vermessung von Zellparametern. So lassen sich in Histogrammen Regionen definieren, in denen der Anteil einer markierten Population unter allen dargestellten Zellen sowie statistische Mittelwerte der Intensität ermittelt werden.

Schließlich sind Überlagerungsdarstellungen möglich, bei denen in einem Histogramm die Verteilungsmuster von Zellen aus zwei verschiedenen Messungen oder Populationen, die durch «Gating» (siehe unten) definiert wurden, dargestellt werden. Die Kurven werden hierbei durch unterschiedliche Farbwahl oder Linienmuster voneinander abgesetzt. Häufig werden Überlagerungen auch eingesetzt, um im Vergleich zwischen einer gefärbten Probe und einer ungefärbten oder mit einem Kontrollantikörper gefärbten Probe den Anteil der spezifisch gefärbten Zellen zu erkennen. In diesem Fall werden Regionen gesetzt, die den Anteil der Zellen ermitteln, die sich unmittelbar oberhalb des größten Teils der Zellen im Kontrollansatz befinden.

Tab. 5. Technische Spezifikationen analytischer Partec-Durchflusszytometer nach Herstellerangaben

Parameter	Partec CyFlow® SL	Partec CyFlow® space	Partec CyFlow® ML
Laser	20-mW-Festkörper-Laser 488 nm oder 100-mW-Festkörper-Laser 532 nm	Auswahl von bis zu 3 Lasern: 20/50/200/500-mW-Festkörper-Laser 488 nm, 25-mW-Laser-Diode 638 nm, 50/100-mW-Dioden-Laser 405 nm oder 10-mW-Diodenlaser 375 nm	Auswahl von bis zu 4 Lasern: 20/50/200/500 mW 488 nm, 25 mW 638nm, 50/100 mW 405 nm, 10 mW 375 nm, 50 mW 562 nm, 100 mW 532 nm, Quecksilber-Dampflampe zur hoch auflösenden UV-Anregung
Anregung	direkt, Laser-Spot 60 × 15 µm	direkt, Strahlengänge und Anregungssspots 60 × 15 µm räumlich getrennt, festes «time delay» zur Datenverarbeitung	direkt, Strahlengänge und Anregungssspots 60 × 15 µm räumlich getrennt, einstellbares «time delay» zur Datenverarbeitung
Detektoren	FSC, SSC, 3 Fluoreszenzen	FSC, SSC, 6 Fluoreszenzen	FSCI, FSCII, SSC, 13 Fluoreszenzen
Standardfilter	frei austauschbare Standardfilter FL1: 537/35 FL2: 590/50 FL3: 630LP	Filterbestückung in Abhängigkeit von der Laser-Konfiguration, Filtereinsätze frei tauschbar	Filterbestückung in Abhängigkeit von der Laserkonfiguration, Filtereinsätze frei tauschbar
Standardfluorochrome	FITC, Alexa-488, Syto9, PE, PerCP, PE-Cy5, PI, PE-Cy7	FITC, Alexa-488/405/633, Syto9, PE, PerCP, PE-Cy5, PI, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, DAPI, Hoechst und viele mehr in Abhängigkeit von der Laserbestückung	FITC, Alexa-488/405/633, Syto9, PE, PerCP, PE-Cy5, PI, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, DAPI, Hoechst und viele mehr in Abhängigkeit von der Laserbestückung
Sensitivität Fluoreszenz	FITC < 100 MESF, PE < 50 MESF	FITC < 100 MESF, PE < 50 MESF	FITC < 100 MESF, PE < 50 MESF
Auflösung Streulicht	FSC 0,7 µm, SSC) 0,2 µm	FSC 0,7 µm, SSC 0,2 µm	FSC 0,7 µm, SSC 0,2 µm

Tabelle 5 Fortsetzung nächste Seite

Tab. 5. (Fortsetzung)

Parameter	Partec CyFlow® SL	Partec CyFlow® space	Partec CyFlow® ML
Signalverarbeitung	digital, 16 bit	digital, 16 bit	digital, 16 bit
Kompensation	on- und offline N-colour-Software-Kompensation	on- und offline N-colour-Software-Kompensation	on- und offline N-colour-Software-Kompensation
Parameter	Partec CyFlow® SL	Partec CyFlow® space	Partec CyFlow® ML
Maximale Ereignisrate	15 000 Ereignisse/s, 8 Plots, voll kompensiert	15 000 Ereignisse/s, 8 Plots, voll kompensiert	15 000 Ereignisse/s, 8 Plots, voll kompensiert
Datenauflösung	16 bit > 65 000 Kanäle	16 bit > 65 000 Kanäle	16 bit > 65 000 Kanäle
Datenformat	FCS 2.0	FCS 2.0	FCS 2.0
Computer/Betriebssystem	PC/Microsoft Windows XP Pro	PC/Microsoft Windows XP Pro	PC/Microsoft Windows XP Pro
Probenzuführung	automatisierte Einzelprobenmessung, optional Probenautomat für Karussell oder Mikrotiterplatten	automatisierte Einzelprobenmessung, optional Probenautomat für Karussell oder Mikrotiterplatten	automatisierte Einzelprobenmessung, optional Probenautomat für Karussell oder Mikrotiterplatten
Medienversorgung	Vorratscontainer, 5 l, für Hüllstromflüssigkeit und Abfall,	Vorratscontainer, 5 l, für Hüllstromflüssigkeit und Abfall	Vorratscontainer, 5 l, für Hüllstromflüssigkeit und Abfall
Flussrate	Stufenlos einstellbarer Probendurchfluss von 0–1200 µl/min	Stufenlos einstellbarer Probendurchfluss von 0–1200 µl/min	Stufenlos einstellbarer Probendurchfluss von 0–1200 µl/min
Probenverschleppung	<0,5 %	<0,5 %	<0,5 %
Stromanschluss	100/240 V AC, 60VA, 50/60 Hz oder 12 VDC/5A	100/240 V AC, 60VA, 50/60 Hz	100/240 V AC, 60VA, 50/60 Hz

APC = Allophycocyanin; APC-Cy7 = Allophycocyanin-Cyanin-7; FITC = Fluoresceinisothiocyanat; MESF = «molecule equivalent soluble fluorochrome»; PE = Phycoerythrin; PE-Cy5 = Phycoerythrin-Cyanin-5; PE-Cy7 = Phycoerythrin-Cyanin-7; PerCP = Peridimin-Chlorophyll-Protein-Komplex; PerCP-Cy5.5 = Peridimin-Chlorophyll-Protein-Komplex-Cyanin-5.5; PI = Propidiumjodid.

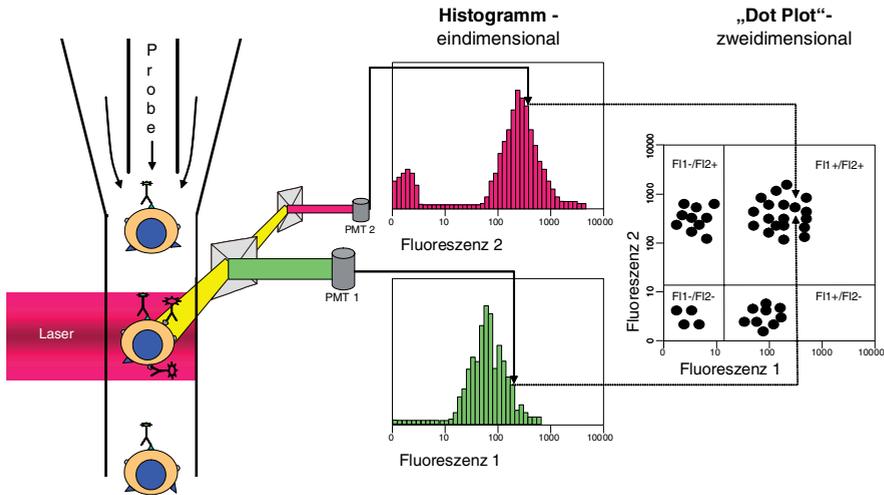


Abb. 11. Korrelierte Darstellung von Messsignalen. Für jede einzelne Zelle werden in der Durchflusszytometrie gleichzeitig mehrere Fluoreszenzsignale aufgenommen. Während Histogramme darstellen, mit welcher Häufigkeit einzelne Fluoreszenzintensitäten erreicht werden, erlauben Dot-Plots (Punktwolkendarstellungen) den Zusammenhang von Fluoreszenzsignalen darzustellen.

### Dot-Plots und Contour-Plots

Als zweidimensionale Darstellungen sind so genannte Dot-Plots (Punktwolkendarstellungen) oder Contour-Plots (Höhenliniendarstellungen) möglich. In einem Dot-Plot (Abb. 12) werden auf der x- und y-Achse jeweils die Intensitätsverteilungen von zwei Messparametern aufgetragen. Jede gemessene Zelle wird dann als Punkt («dot») an der x- und y-Position entsprechend ihrer Intensitäten aufgetragen. Auf diese Weise ist es einfach möglich zu erkennen, ob die aufgetragenen Messparameter in ihrer Expression miteinander korrelieren oder unabhängig voneinander verteilt sind. Im ersten Fall verteilen sich die Zellen in der Form einer Diagonale, im zweiten Falle gibt es verschiedene Populationen von Zellen, die entweder nur für den einen oder nur für den anderen Parameter ein Signal zeigen.

Auch bei den Dot-Plots werden häufig Voreinstellungen zur übersichtlicheren Darstellung von Ereignissen oder Zellen gewählt. So wird häufig nur eine Stichprobe von einer festen Zahl von Zellen, wie z.B. 1000, oder ein vorgewählter Anteil, z.B. 10 %, in der Form von Punkten dargestellt, damit es bei großen Populationen von Zellen nicht zu einer gleichmäßigen Schwärzung eines Bereichs kommt und eine Beurteilung von Heterogenitäten möglich bleibt. Ein Nachteil dieser Einstellung ist es, dass kleinere Populationen in der Darstellung unterdrückt sein können.

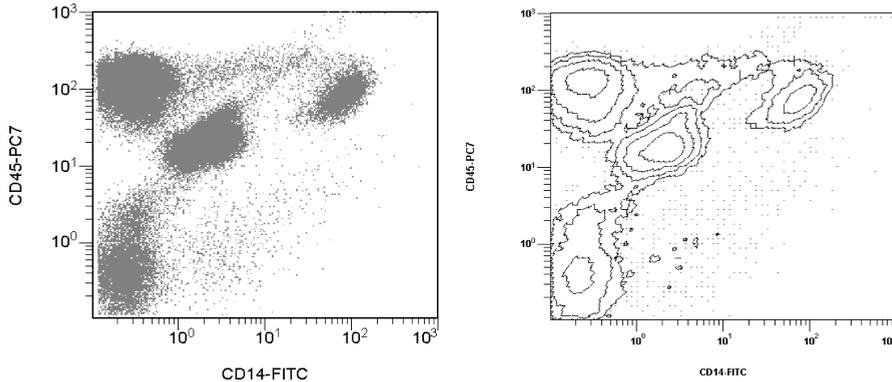


Abb. 12. Zweidimensionale Darstellung von Messwerten. Bei einem Dot-Plot (Punktwolkendarstellung) wie im linken Bild wird jede gemessene Zelle als einzelner Punkt aufgetragen. In Contour-Plots (Höhenliniendarstellungen) wie im rechten Bild werden Gruppen von Zellen entsprechend ihrer Häufigkeit umfahren.

nen. Um diese zu sehen, ist daher die Auswahl der Darstellung aller gemessenen Ereignisse als Punkte erforderlich.

Ein für das Verständnis von Dot-Plot-Darstellungen wichtiges Detail ist die Wahl eines so genannten «baseline offset». Hierbei handelt es sich um ein elektronisches Rauschen das in der Dot-Plot-Darstellung all den Ereignissen hinzugefügt wird, die in einem der dargestellten Parameter mit keinem messbaren Signal verknüpft sind. Auch wenn die künstliche Addition von Rauschen eine scheinbare Verschlechterung der rauscharmen Messdaten darstellt, wird hierdurch verhindert, dass ein Vielzahl von Zellen in einer jeweils einzigen Linie auf der x- oder y-Achse dargestellt wird und hierdurch für das Auge ein falscher Eindruck über die Anteile von Zellen mit positiven und negativen Fluoreszenzmustern entsteht. In der Philosophie einiger Gerätehersteller wird aus diesem Grunde grundsätzlich mit «baseline offset» gearbeitet, während andere Anbieter eine Definition des gewünschten Verhaltens der Software in Präferenzinstellungen vorsehen.

Eine einfache Methode der Vermessung von Zellen in Dot-Plots ist es, Regionen in der Form einer Quadrantenanalyse zu definieren. Hierbei werden unter der Annahme, dass es für jeden Parameter positive und negative Zellen gibt, in der Form eines Kreuzes auf der x- und y-Achse Schwellen oberhalb der negativen Population eingeführt. Anschließend wird der prozentuale Anteil der vier Populationen, die für die analysierten Parameter doppelt negativ, doppelt positiv oder jeweils nur für einen Parameter positiv sind, ermittelt. Eine flexiblere Art, Populationen von Zellen hinsichtlich der Zellzahl und mittlerer Intensitätswerte für die gemessenen Parameter auszuwerten, ist das Setzen einer polygonalen Region um die entsprechende Population. Die Regionen werden meistens automatisch in der Reihen-

folge der Definition aufsteigend mit Nummern wie R1, R2, R3 usw. oder Buchstaben wie A, B, C usw. bezeichnet. Eine Änderung in einen die Population sinnvoll beschreibenden Namen, z.B. «CD4+ T-Zellen», erlaubt eine einfachere Interpretation der Regionenstatistik.

Eine alternative Form der Darstellung zweidimensionaler Daten ist der Contour-Plot. Hierbei werden wiederum auf der x- und y-Achse die Intensitäten zweier Messparameter aufgetragen. Die Anzahl der Zellen mit verschiedenen Intensitätsmustern wird dann ähnlich der Anzeige von Bergen auf einer Landkarte in der Form von Höhenlinien dargestellt. Contour-Plots sind sehr gut zur Darstellung der Heterogenität von großen Populationen geeignet. Kleine Populationen gehen bei einer linearen Abstufung der Höhenlinien unter. Lösungsansätze hierfür sind eine logarithmische Abstufung der Höhenlinien sowie eine Darstellung von Ereignissen unterhalb der niedrigsten Höhenlinie in der Form von Punkten. Der Density-Plot ist eine Variante des Contour-Plots, bei der Höhenlinien so gewählt sind, dass die Flächen zwischen den Linien jeweils eine identische Anzahl von gemessenen Zellen umfassen. Schließlich kommen bei Contour-Plots ähnlich wie bei Histogrammen optional Glättungsalgorithmen zum Einsatz. Dem Vorteil einer ansprechenden Darstellung von Populationen steht hierbei die Gefahr der Unterdrückung informativer Unregelmäßigkeiten, z.B. durch Subpopulationen, gegenüber.

### *Regionen und «Gates»*

Die Darstellung von Datensätzen in Histogrammen oder Dot-Plots erlaubt es, Informationen über die Verteilung von Intensitäten für einen Parameter bzw. die Assoziation von zwei verschiedenen Messparametern zu gewinnen. Um zu erkennen, wie sich z.B. die Subpopulation von Zellen, die in FL1 und FL2 positiv ist (Abb. 11), in Bezug auf FL3 verhält, sind dagegen weitere Schritte erforderlich.

In einem ersten Schritt kann für Dot-Plots eine Fehlfarbdarstellung von Regionen gewählt werden. Diese Einstellung führt dazu, dass nach einer editierbaren Voreinstellung den Punkten einer Region in jedem Dot-Plot eine feste Farbe zugewiesen wird. Das Beispiel von Abbildung 13 zeigt die Definition von drei Regionen mit den typischen Lichtstreuungseigenschaften von Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten in einem Dot-Plot mit Auftragung FSC gegen SSC. Die diesen Regionen zugehörigen Zellen werden daraufhin in weiteren Dot-Plots mit Auftragung von Fluoreszenzen entsprechend ihrer Lichtstreuungseigenschaften in blau, rot oder grün dargestellt.

Weitergehende Analysen von Zellen, die über mehr als zwei Parameter definiert werden, sind über die Verknüpfung von Regionen in «Gates» möglich. Hierbei werden nach den Regeln der Booleschen Algebra Regionen mit den Funktionen «Und», «Oder» oder «Nicht» miteinander zu «Gates» verknüpft. Derartige

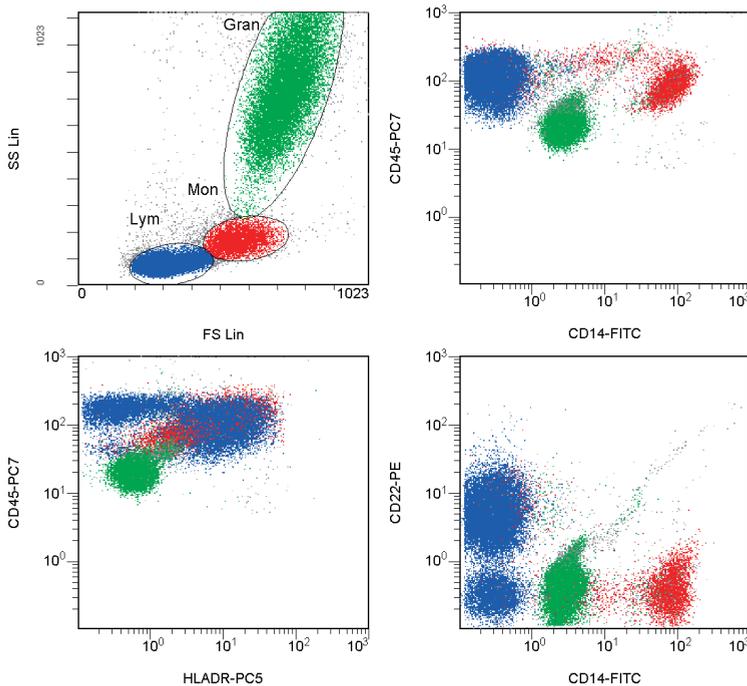


Abb. 13. Prinzip der Fehlfarbkodierung von Populationen in Dot-Plots. Im linken oberen Dot-Plot wird bei lysiertem Vollblut Zellen mit einer für Lymphozyten charakteristischen Lichtstreuung über eine Region eine blaue Fehlfarbe zugeordnet. Monozyten werden rot kodiert und neutrophile Granulozyten grün. Die über die Lichtstreuung kodierten Fehlfarben erlauben eine einfachere Interpretation der Antikörperfärbungen am Beispiel einer Vier-Farb-Immunphänotypisierung.

«Gates» können dann wiederum über ein Fehlfarbkodierung in Dot-Plots dargestellt werden. Alternativ können auch Dot-Plots oder Histogramme generiert werden, die nur Ereignisse eines «Gates» darstellen. Eine verschachtelte Verknüpfung von «Gates» erlaubt schließlich eine Eingrenzung von Populationen, die über alle gemessenen Parameter definiert werden. Ein gutes Beispiel für derartiges hierarchisches «Gaten» ist die Definition von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen [3] (siehe «Hämatopoetische Stammzellen», S. 361).

Ein für die Interpretation von Darstellungen wichtiger Unterschied besteht zwischen einigen Softwarepaketen in der Zuweisung von Farben, wenn Populationen mit einer unterschiedlichen Farbkodierung in einem Dot-Plot zur Überlagerung kommen. Hier gibt es zum einen die Philosophie, Zellen verschiedener Populationen gleichberechtigt zur Darstellung zu bringen. Dies kann dazu führen, dass kleine Populationen von großen Populationen überlagert werden. Eine alter-

native Vorgehensweise ist die Definition einer Rangliste der Farbvergabe. Hierbei werden im Konfliktfall die Zellen dargestellt, die zum ranghöheren «Gate» gehören.

In ähnlicher Weise lässt sich der Konfliktfall unterschiedlich lösen, wenn ein und dieselbe Zelle durch zwei in unterschiedlichen Dot-Plots definierte Regionen erfasst wird. Hier kann wiederum gemäß einer Hierarchie z.B. die zuletzt definierte Region die Kodierung bestimmen, oder die Darstellung von Zellen, die zwei Regionen angehören, kann über Mischfarben erfolgen. Letzteres schränkt jedoch die Zahl der definierbaren Regionen ein.

### *Automatisierung der Datenanalyse*

Mit dem Ziel, mehrere Datensätze, die für unterschiedliche Proben gemessen wurden, in vergleichbarer Weise auszuwerten, stellt die Anwendung vordefinierter Regionen und «Gates» in abgespeicherten Auswerteformaten nur einen unvollkommenen Zugang dar. Einerseits unterscheidet sich die Lichtstreuung verschiedener Messdatensätze sowohl aufgrund des unterschiedlichen Alters von Proben bei Aufarbeitung als auch aufgrund der in diesem Bereich geringeren Stabilität der Instrumente häufig stark, andererseits können unterschiedliche Zusammensetzungen von Proben, eine unterschiedliche Aktivierung oder abnorme Zellen zu Fehlern bei der Erkennung von Zellen mit vordefinierten «Gates» führen.

Verschiedene Lösungsstrategien sind möglich, um dennoch zu einer reproduzierbaren Datenanalyse zu kommen (siehe auch «Qualitätskontrolle und Standardisierung», S. 157):

#### *«Backgating»*

Beim «Backgating» wird eine für jeden Datensatz individuelle Setzung von Auswerteregionen in der Lichtstreuung dadurch objektiviert, dass eine Zellpopulation zuerst anhand der Expression von stabilen Eigenschaften, wie der Antigenexpression erkannt wird. Auf dieser Grundlage wird dann eine Lichtstreuungsregion definiert, die diese Zellen enthält. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Definition einer Lymphozytenregion, wie sie in Abbildung 13 blau dargestellt ist, anhand einer hohen Expressionsdichte, d.h. Signalintensität, für das Panleukozytenantigen CD45 und fehlender Expression des monozytären Antigens CD14. Wenn diese immunologisch erkannten Zellen in einem zweiten Schritt in der Lichtstreuung durch eine Region erfasst werden, kann über die immunologisch definierte Region gleichzeitig überprüft werden, wie vollständig Lymphozyten im Lichtstreuungsfenster enthalten sind (% der Zellen mit dem Immunphänotyp CD14–CD45++, die gleichzeitig in der Lichtstreuungsregion enthalten sind) und mit welcher Reinheit das Lichtstreuungsfenster diese Zellen enthält (% der in dem

Lichtstreuungsfenster enthaltenen Zellen, die gleichzeitig den Phänotyp CD14–CD45++ besitzen).

#### *«Autogating» und Cluster-Analyse*

Beim «Autogating» wird der oben beschriebene Schritt automatisiert. Während der Typ der Regionen und deren Verknüpfungen zu «Gates» vordefiniert werden, wird die genaue Lage von Regionen innerhalb von vorgegebenen Grenzen durch Algorithmen ermittelt, mit denen Zentren von Populationen gesucht werden und Feinanpassungen ihrer Lage erfolgen. Die Cluster-Analyse geht einen Schritt weiter. Hierbei wird, ohne dass das Auswertekonzept im Detail vorgegeben wird, durch die Software nach im mehrdimensionalen Raum zusammenhängenden Populationen gesucht, die dann für eine detaillierte Analyse markiert werden.

#### *Beschreibende Statistik*

Unabhängig davon, ob Populationen von Zellen über Regionen in Histogrammen, Regionen in Dot-Plots, Quadranten, oder komplexe «Gates» definiert werden, stehen in den meisten Softwarepaketen eine Reihe von Methoden zur statistischen Beschreibung von Populationen zur Verfügung. Diese Methoden werden sowohl zur Auswertung von Experimenten als auch zur Qualitätskontrolle (siehe «Qualitätskontrolle und Standardisierung», S. 157) eingesetzt. Hierzu gehören:

- *Mittelwert*: dieser Wert stellt das arithmetische Mittel eines Parameters über die gesamte Population hin dar. Zu beachten ist hierbei, dass in einigen Softwarepaketen Optionen vorhanden sind, den Mittelwert über die digitale Intensitätsstufe (den «Kanal», z.B. von 1 bis 1024), einen Logarithmus der Signalintensität zu ermitteln und erst dann eine Umwandlung dieses Ergebnisses in die dem mittleren Kanal zugrunde liegende lineare Signalintensität vorzunehmen. Diese Vorgehensweise ist im Falle einer angenommenen logarithmischen Normalverteilung angemessen. Sie wird teilweise allein aufgrund der resultierenden kleineren Variationskoeffizienten (CV) des Mittelwerts bevorzugt.
- *Median*: dieser Wert teilt die Population in 50 % der Zellen mit höheren Werten und 50 % der Zellen mit niedrigeren Werten des Parameters. Der Wert teilt ein Histogramm in Hälften mit einer identischen Fläche unter der Kurve.
- *Modalwert*: dies ist der Einzelwert, der bei den meisten Zellen der Population erreicht wurde und der Spitze eines Histogramms entspricht.

Schließlich erlauben die Statistikoptionen die Abfrage von Minimal- und Maximalwerten der Population sowie teilweise auch der 5%- und 95%-Ordinalwerte.

### *Generierung abgeleiteter oder korrigierter Messdaten*

Eine wichtige weitergehende Methode der Datenanalyse besteht in der unmittelbaren Bearbeitung der Messdaten. Hierzu gehört die Zuweisung einer korrigierten Kompensationsmatrix die die Generierung einer um die spektralen Überlappung bereinigten Datei erlaubt. Weiterhin können auch nach komplexen Formeln aus einem oder mehreren Parametern neue Parameter berechnet werden. Interessante Anwendungen sind z.B. die Berechnung von Quotienten von Parametern bei Methoden der Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, des pHs oder des Membranpotentials mit spektral sensitiven Farbstoffen (siehe «Bestimmung zellphysiologischer Parameter: pH, Kalzium, Glutathion, Membranpotential», S. 500, und «Oxidativer Burst, Phagozytose und Expression der Adhäsionsmoleküle», S. 519).

### **Fluoreszenzdetektion von Biomarkern**

Verschiedene Methoden der Zellfärbung werden im Detail in den verschiedenen Anwendungskapiteln beschrieben. Im Folgenden sollen einige allgemeine Aspekte zu Klassen von einsetzbaren Farbstoffen (siehe auch «Auswahl und Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen», S. 83) sowie Antikörpern dargestellt werden.

#### *Typen von Fluoreszenzfarbstoffen*

Aufgrund der Fähigkeit von Durchflusszytometern, zellassoziierte Fluoreszenz unabhängig von ihrer Lokalisation und bei entsprechenden Lichtquellen auch vom Spektrum zu quantifizieren, können verschiedenste Arten von Fluoreszenzfarbstoffen zur molekularen Beschreibung von Zellen eingesetzt werden:

- *Fluoreszente Sonden:* Biomoleküle wie monoklonale oder polyklonale Antikörper für den immunologischen Nachweis von Proteinantigenen, Oligonukleotide für In-situ-Hybridisierungsreaktionen oder Liganden von Rezeptoren können direkt oder indirekt fluoreszent derivatisiert werden, um das Ausmaß ihrer spezifischen zellulären Bindung über die Fluoreszenz auszuwerten. Die Kopplung kann direkt, wie bei der FITC-Markierung von Antikörpern oder dem Einbau von Cy5-gekoppelten Nukleotiden, erfolgen. Ein Beispiel für indirekte Methoden ist die Biotinylierung von Antikörpern gefolgt vom Nachweis der zellulären Bindung mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin.
- *Stöchiometrisch bindende Farbstoffe:* Der DNA- oder RNA-Gehalt der Zellen sowie die hydrophoben Lipidkompartimente können über stöchiometrische

trisch bindende Farbstoffe quantifiziert werden. Farbstoffe wie PI weisen an DNA gebunden gleichzeitig eine höhere Quantenausbeute auf, die eine Quantifizierung der DNA mit gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis ermöglicht (siehe «DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie», S. 604).

- *Fluoreszente Substrate*: Niedermolekulare fluoreszente Verbindungen, die ähnlich physiologischen Substraten von Zellen metabolisiert werden, können für die Analyse von Stoffwechselwegen eingesetzt werden. Ein Beispiel hierfür ist der Einbau von markiertem desoxy-UTP als Indikator der DNA-Neusynthese und Proliferation von Zellen (siehe «DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie», S. 604).
- *Fluorogene Substrate*: Niedermolekulare nichtfluoreszente Verbindungen, die intrazellulär zu fluoreszenten Produkten metabolisiert werden, können sowohl zur spezifischen quantitativen Derivatisierung von Biomolekülen als auch zur Messung von Enzymaktivität eingesetzt werden. Beispiele sind der Nachweis von Glutathion über die Ausbildung einer Ringstruktur mit Ortho-Phthaldialdehyd oder der Nachweis der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindung über die intrazelluläre Oxidation von Dihydrorhodamin 123 zur Rhodamin 123 (siehe «Bestimmung zellphysiologischer Parameter: pH, Kalzium, Glutathion, Membranpotential», S. 500, und «Oxidativer Burst, Phagozytose und Expression der Adhäsionsmoleküle», S. 519).
- *Potentialfarbstoffe*: Fluoreszente anionische und kationische Farbstoffe können für den Nachweis des Membranpotentials der Plasmamembran oder der Membran von Mitochondrien eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind die spektrale Veränderung der Fluoreszenz von JC-1 bei Akkumulation in Gegenwart von hohem Membranpotenzial oder die selektive und ladungsabhängige Akkumulation von Rhodamin 123 an mitochondriale Membranen (siehe «Bestimmung zellphysiologischer Parameter: pH, Kalzium, Glutathion, Membranpotential», S. 500).
- *Umgebungssensitive Fluorophore*: Farbstoffe, die in Abhängigkeit der Ionenkonzentration, der Fluidität ihrer Umgebung oder der Interaktion mit weiteren Farbstoffen ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern, können zur Charakterisierung von Kompartimenten eingesetzt werden. Beispiele für derartige Mechanismen sind die spektrale Veränderung der Emission des pH-Indikators Carboxy-SNARF-1, die Ausbildung von längerwellig emittierenden Excimeren für den Membranfarbstoff Pyrendekansäure oder die Detektion von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer bei der räumlichen Annäherung von mit entsprechenden Farbstoffen gekoppelten Sonden (siehe «Bestimmung zellphysiologischer Parameter: pH, Kalzium, Glutathion, Membranpotential», S. 500 und «Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)», S. 120).

Eine Reihe von Übersichten [2, <http://probes.invitrogen.com/handbook/>] stellt umfassend die Vielfalt grundlegender Möglichkeiten der fluoreszenten Charakterisierung von Zellen dar. Bei der Prüfung der Anwendung von bestimmten Färbemethoden auf spezifische Fragestellungen ist zu beachten, dass sich die Spezifität von Farbstoffen oder fluoreszenten Sonden durch Interaktion mit Zellen ändern kann und sich verschiedene Färbemethoden auch bei nicht überlappenden Spektren der Farbstoffe nicht frei kombinieren lassen. Vielmehr ist eine sorgfältige Anpassung der Methoden an die Zelltypen erforderlich, insbesondere dann, wenn Färbungen mit einer unveränderten Antwort von Zellen auf In-vitro-Stimulation vereinbar sein sollen [4].

### *CD-Antigene*

In ähnlicher Weise stehen im Bereich von monoklonalen Antikörpern gegen Antigene von Leukozyten eine sehr große Zahl von Werkzeugen zur Verfügung, die grundsätzlich in verschiedenen Kombinationen zur Immunphänotypisierung eingesetzt werden können. Antikörper gleicher Reaktivität werden hierbei in einem «cluster of differentiation» mit identischer CD-Bezeichnung zusammengefasst. Es gibt eine Reihe von umfangreichen Verzeichnissen der aktuell klassifizierten CD-Antigene (z.B. [www.hcdm.org](http://www.hcdm.org), [mpr.nci.nih.gov/prow](http://mpr.nci.nih.gov/prow), [www.immunodefekt.de/cd.shtml](http://www.immunodefekt.de/cd.shtml)). Einige in der klinischen Diagnostik relevanten Antigene werden in Tabelle 6 beschrieben. Detaillierte Angaben sind in den entsprechenden Kapiteln der Abschnitte «Zellcharakterisierung und Phänotypisierung» und «Indikationen» des Buches zu finden.

### *Auswahl und Kombination von Antikörpern*

Zur Immunphänotypisierung von Zellen ist vor allen Dingen die eindeutige Beschreibung der Zellen im entsprechenden Probenmaterial wichtig. Zu beachten ist, dass viele Antigene auf mehreren Populationen von Zellen des Bluts exprimiert werden, so dass lediglich eine sinnvolle Kombination von Antikörpern zu einer eindeutigen Beschreibung der Zellen führt (Tab. 7). Weiterhin ist eine sinnvolle Auswahl von Fluorochromkonjugaten sinnvoll. Hierbei ist die unterschiedliche Sensitivität von Fluorochromkonjugaten zu beachten («Auswahl und Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen», S. 83). Daneben ist eine vorsichtige Belegung von spektral breit emittierenden Fluorochromen zur Vermeidung von Kompensationsartefakten in benachbarten Kanälen wichtig [5].

Tab. 6. Auswahl diagnostisch relevanter Antigene

Antikörper	Expressionsmuster	Funktion
CD1a	kortikale Thymozyten, Dendritische Zellen, Langerhans-Zellen	MHC-Klasse-I-ähnliches Molekül, Funktion in der Präsentation von nichtpeptidischen bzw. Lipidantigenen
CD2	T-Zellen, NK-Zellen	Zellaktivierung
CD3	T-Zellen	T-Zell-Rezeptor assoziiert, Signaltransduktion
CD4	T-Zellen, Monozyten, myeloische Vorläuferzellen	Korezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle, human immunodeficiency virus receptor
CD5	T-Zellen, B-Zell-Subpopulation	zelluläre Aktivierung
CD7	hämatopoetische Stammzellen, frühe myeloische Zellen, T-/NK-Zell-Subpopulationen	zelluläre Aktivierung
CD8	T-Zell-Subset, NK-Zellen	Korezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle
CD10	B-/T-Zell-Vorläufer	CALLA, Endopeptidase
CD11a	Pan-Leukozyten-Antigen	LFA-1a, ICAM-1/2/3-Rezeptor zusammen mit CD18
CD11b	myeloische Zellen, NK-Zellen, T-/B-Zell-Subsets	Mac-1, Untereinheit des Complement-Rezeptors 3 (CR3)
CD11c	Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen, T-/B-Zell-Subsets	Untereinheit des Complement-Rezeptors 4 (CR4)
CD13	myelomonozytäre Zellen	Amino-peptidase N
CD14	Monozyten, Granulozyten schwach	Lipopolysaccharid-Rezeptor, Glykosylphosphatidylinositol-Anker-Protein
CD15	Granulozyten, Monozyten	Lewis-x-Antigen
CD16a	NK-Zellen, Makrophagen	Fcγ-Rezeptor IIIa
CD16b	Granulozyten	Fcγ-Rezeptor IIIa, Glykosylphosphatidylinositol-Anker-Protein
CD18	Pan-Leukozyten-Antigen	β2-Integrin
CD19	Pan-B-Zellantigen	B-Zell-Aktivierung und Differenzierung
CD20	B-Zellen	B-Zell-Aktivierung/-reifung
CD22	B-Zellen, Basophile	B-Zell-Aktivierung

Tabelle 6 Fortsetzung nächste Seite

Tab. 6. (Fortsetzung)

Antikörper	Expressionsmuster	Funktion
CD23	aktivierte B-Zellen, Makrophagen, Eosinophile	niedrig affiner IgE Rezeptor FcεRII
CD25	aktivierte T-/B-Zellen, aktivierte Monozyten	IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette
CD33	myeloische Zellen	Lektinaktivität
CD34	hämatopoetische Stammzellen	Zelladhäsion, Steuerung der Differenzierung?
CD36	Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen	Glykoprotein IV, Collagen/Thrombospondinrezeptor, Scavenger-Rezeptor für oxidierte Lipoproteine
CD38	hämatopoetische Vorläuferzellen, aktivierte T-Zellen, Plasmazellen	Leukozytenaktivierung, -proliferation
CD41	Thrombozyten, Megakaryozyten	Fibrinogenrezeptor zusammen mit CD61
CD42a–d	Thrombozyten, Megakaryozyten	Von-Willebrand-Rezeptor-Komplex CD42a GpIX CD42b GpIb $\alpha$ CD42c GpIb $\beta$ CD42d GpV
CD45	Pan-Leukozyten-Antigen	Tyrosinphosphatase, differentielle Expression der Splicing-Varianten CD45RA und CD45RO auf T-Zell-Subsets
CD52	Lymphozyten, Monozyten	CAMPATH-1
CD55	Leukozyten, Thrombozyten, Erythrozyten	Decay-Accelerating Factor, Glykosylphosphatidylinositol-Anker-Protein
CD56	NK-Zellen, T-Zell-Subset	NCAM
CD57	Nk-Zellen, Subpopulationen von T-Zellen, Monozyten	HNK-1
CD61	Thrombozyten, Megakaryozyten	Fibrinogenrezeptor zusammen mit CD41 Vitronectinrezeptor zusammen mit CD51
CD64	Monozyten/Makrophagen, aktivierte Granulozyten	Fc $\gamma$ -Rezeptor I

*Tabelle 6 Fortsetzung nächste Seite*

Tab. 6. (Fortsetzung)

Antikörper	Expressionsmuster	Funktion
CD66b	Granulozyten	Glykosylphosphatidylinositol-Anker-Protein
CD69	Aktivierte T-/B-Zellen, NK-Zellen, Granulozyten, Eosinophile, Thrombozyten	zelluläres Aktivierungsantigen
CD71	proliferierende Zellen	Transferrinrezeptor
CD79a	B-Zellen	zytoplasmatische Komponente des B-Zell-Antigenrezeptors
CD103	intestinale epitheliale Lymphozyten	HML-1, gewebespezifische Lymphozytenretention
CD117	myeloische Blasten, Mastzellen	c-kit, Stammzellfaktorrezeptor
CD138	Plasmazellen, Prä-B-Zellen	Syndecan-1
CD235a	Erythrozyten und erythroide Vorläuferzellen	Glycophorin A
Myelo-peroxidase	myeloische Zellen	lysosomales Enzym
TdT	Lymphoblasten, Myeloblasten-Subset	nukleär exprimierte terminale Desoxynucleotidyltransferase
HLA-DR	Vorläuferzellen, B-Zellen, Monozyten, aktivierte T-Zellen	HLA-Klasse-II-Rezeptor

## Grundlegende Methoden der Zellaufbereitung

### *Vereinzelung und Isolation von Zellen*

Für durchflusszytometrische Analysen sind grundsätzlich alle Arten von Zellen geeignet, die in einer Einzelzellsuspension vorliegen, z.B. Blut, Knochenmark, Liquor oder weitere Körperflüssigkeiten. Zellen, die adhärent oder in Gewebeverbänden vorliegen, müssen im Rahmen der Aufarbeitung in eine Einzelzellsuspension überführt werden. Hierbei sind mechanische Formen der Zellvereinzelung vorteilhaft, da sie im Gegensatz zu enzymatischen wie der Trypsinierung von Geweben die Zerstörung von Epitopen oder Veränderungen der Funktion von Zellen reduzieren. Die zytometrische Analyse von adhären Zellen in der Zellkultur oder von Zellen im Gewebeverband lässt sich ohne Zellvereinzelung mit Hilfe der Objektträger-basierter Zytometrie (siehe «Technische und methodische Grundlagen der Objektträger-basierten Zytometrie», S. 71) durchführen. Allerdings ist

Tab. 7. Antigene Koexpression von Leukozyten des Blutes und Normoblasten

Marker	T-Zellen	B-Zellen	NK-Zellen	Monozyten	Frühe Neutrophile	Neutrophile	Eosinophile	Basophile	Normoblasten
FS	+	+	+	++	+++	+++	+	+	+
SS	+	+	+	++	+++	+++	++++	+	+
CD1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD2	++	-	(+)	-	-	-	-	-	-
CD3	++	-	-	-	-	-	-	-	-
CD4	(++)	-	-	+	+	-	+	-	-
CD5	++	(+)	-	-	-	-	-	-	-
CD7	(++)	-	(++)	-	-	-	-	-	-
CD8	++	-	(+)	-	-	-	-	-	-
CD10	-	-	-	-	+	+	-	-	-
CD13	-	-	-	++	+	++	+	+	-
CD14	-	(+)	-	++	-	(+)	-	-	-
CD15	-	-	-	+	+	++	-	-	-
CD16	(+)	-	(+)	(+)	-	++	-	-	-
CD19	-	++	-	(+)	-	-	-	-	-
CD20	-	++	-	-	-	-	-	-	-
CD22	-	++	-	-	-	-	-	+	-
CD25	(+)	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-
CD33	-	-	-	++	+	+	+	+	-
CD45	+++	+++	+++	++	+	+	++	+	-
CD56	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-
CD57	(+)	-	++	-	-	-	-	-	-
CDw65	-	-	-	+	+	++	+++	-	-
CD79a	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CD103	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD117	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HLA-DR	(+)	+	(+)	++	-	-	-	-	-
TdT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPO	-	-	-	+	+	+	-	-	-
GpA	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+, ++, +++ = Relative Expressionsdichten; (+) oder (++): Expression nur auf Subpopulationen oder unter pathologischen Bedingungen.

diese Messtechnologie noch relativ neu, und es liegen nur begrenzte Erfahrungen vor.

Zum Methodenrepertoire der mechanischen oder physikalischen Trennmethode gehören insbesondere das Zerschneiden von Zellverbänden, die Vereinzelnung durch wiederholte Aspiration durch englumige Kanülen, die Anwendung von Kälte zur Dissoziation von adhären Zellen und die Zentrifugation durch Dichte-

gradienten. Vor einer durchflusszytometrischen Analyse dissoziierter Gewebe ist, sofern verbleibende Zellaggregate nicht ausgeschlossen werden können, eine Filtration, z.B. durch Nylongewebe mit einer Maschenweite von 50 µm sinnvoll, um eine Verstopfung des Durchflusszytometers zu vermeiden.

### *Anreicherung von Zellen*

In vielen Fällen ist auch eine Anreicherung von Zellen vorteilhaft. So können Leukozyten im Blut bei der Wahl von gut diskriminierenden Triggerparametern wie dem Panleukozytenantigen CD45 oder einer DNA-Färbung grundsätzlich in Gegenwart von Erythrozyten analysiert werden. Der hohe Überschuss an Erythrozyten führt jedoch zu langen Messzeiten, bis eine größere Zahl von Leukozyten analysiert wurde.

Alternativ können im Blut Leukozyten durch die Depletion von Erythrozyten angereichert werden. Das klassische Verfahren hierfür war eine Isolation von mononukleären Zellen, d.h. von Lymphozyten und Monozyten, durch Zentrifugation in einem Dichtegradienten ( $d = 1,077$ ). Da diese Technik jedoch zu schwer kontrollierbaren Zellverlusten führt und weiterhin einschließlich der erforderlichen Waschvorgänge zeitaufwendig ist, wird sie bei rein analytischen Fragestellungen kaum noch eingesetzt. Ausnahmen sind die Vorbereitung von Zellsuspensionen für die Zellkultur, die Kryokonservierung oder die immunmagnetische Anreicherung.

Die Methode der Wahl zur Depletion von Erythrozyten im Blut ist heute die Vollblutlyse. Hierbei wird die geringere osmotische Widerstandsfähigkeit von Erythrozyten zu deren selektiver Lyse eingesetzt. Unter den verschiedenen Verfahren sind solche, die mit einer Fixation der Zellen einhergehen, von fixationsfreien wie der Ammoniumchlorid-Lyse zu unterscheiden. Die fixierenden Lysen haben den Vorteil einer größeren Stabilität der Probe ohne weitere Behandlung bis zur durchflusszytometrischen Analyse. Ein entscheidender Nachteil ist aber der selektive Verlust von Zellen, der beim Waschen der Zellen durch Zentrifugation der in dieser Weise lysierten Proben auftritt. Lösungsansätze für eine Absolutzählung von Zellen sind waschfreie Techniken, bei denen die lysierten Proben unmittelbar zur Messung kommen, oder der Einsatz von fixationsfreien Lysen. Das enge Zeitfenster für die Stabilität der Lichtstreuungseigenschaften von Zellen des Bluts von bis zu 2 h kann durch eine Formaldehyd-Fixation nach Abschluss der Waschvorgänge auf mehrere Tage ausgedehnt werden.

Für die Analyse seltener Zellen können immunmagnetische Voranreicherungsschritte eingesetzt werden (siehe « Phänotypisierung von Tumorzellen», S. 437).

### *Präanalytik und Probenstabilisierung*

Die Wahl von Antikoagulantien im Falle einer Analyse von Blut ist methodenspezifisch. So wird EDTA in den Fällen bevorzugt, in denen gleichzeitig eine Analyse der Probe mit einem Hämatologieanalysator erfolgt oder Absolutzellzählungen durchgeführt werden oder ein Ausstrich der Probe gefärbt wird. Heparin hat den Vorteil einer besseren Probenstabilität. Citrat reduziert Beeinträchtigungen der Thrombozytenfunktion.

Die maximale Lagerungszeit der Proben und die optimale Lagerungstemperatur sind methodenspezifisch und werden in den einzelnen Kapiteln des Buches abgehandelt. Zu beachten ist, dass eine Kühlung von Proben nicht allgemein empfohlen werden kann, da Temperaturveränderungen zu zellulärer Aktivierung führen können [6] (siehe «Bestimmung zellphysiologischer Parameter: pH, Kalzium, Glutathion, Membranpotential», S. 500).

Aufgrund des für einige Materialien sehr engen Zeitfensters bis zu einer Veränderung der Proben stellen Methoden der Probenstabilisierung einen wesentlichen Fortschritt dar. Eine Reihe von kommerziellen Präparationen, z.B. auf Basis von Formaldehyd-Donoren, Polyethylenglykol und EDTA, erlauben die Durchführung einer Immunphänotypisierung nach bis zu 7 Tagen. Bei der Einführung derartiger Methoden sind mögliche Veränderungen der Erkennung von Epitopen durch monoklonale Antikörper sorgfältig zu analysieren.

Da Zelltod mit selektiven Zellverlusten und auch mit unspezifischer Antikörperbindung assoziiert ist, ist insbesondere bei unbekanntem präanalytischen Bedingungen eine Kontrolle der Vitalität der Zellen sinnvoll. Hierfür können in der Durchflusszytometrie nicht membranpermeable DNA-Farbstoffe wie PI eingesetzt werden, die selektiv tote Zellen anfärben (siehe «Bestimmung zellphysiologischer Parameter: pH, Kalzium, Glutathion, Membranpotential», S. 500).

### *Antikörperfärbungen*

Eine Antikörperfärbung von Zellen in unseparierten Vollblut geht im Vergleich zur Färbung gewaschener Zellen aufgrund der im Plasma vorhandenen autologen Immunglobuline mit einer geringeren unspezifischen Bindung durch Fc-Rezeptor-Interaktion einher. Die unmittelbare Anfärbung des nativen Materials wird in vielen Fällen auch wegen der Vermeidung von Artefakten durch Vorbehandlung der Probe bevorzugt. Ein Nachteil ist der höhere Antikörpereinsatz im Vergleich zu Techniken mit einer Voranreicherung von Leukozyten durch Lyse oder Gradientenzentrifugation. Für reproduzierbare Markierungen muss eine sättigende Konzentration des Antikörpers ermittelt werden. Hierbei ist auf eine Titration gegen eine Probe mit einer hohen Expression des Zielantigens, z.B. mit einem hohen Anteil

der das Antigen exprimierenden Zellfraktion oder Hochregulation nach Aktivierung, zu achten.

Der Einsatz direkt markierter Antikörper führt im Vergleich zu indirekten Methoden zu geringeren unspezifischen Signalen. Einfache indirekte Methoden, bei denen ein Sekundärantikörper eingesetzt wird, bieten auch unter dem Gesichtspunkt der Signalverstärkung im Gegensatz z.B. zu Biotin/Streptavidin-Systemen kaum Vorteile.

Das Waschen der mit Antikörper gefärbten Probe durch Zentrifugation reduziert Hintergrundsignale durch Entfernen der nicht gebundenen Antikörper. Gleichzeitig führt es aber zu Zellverlusten, die selektiv sein können. Im Falle von Zellzählungen mit der Durchflusszytometrie und der Erkennung von Zellen über dicht exprimierte Antigene werden daher meistens manipulationsarme Methoden eingesetzt, bei denen nach einer Färbung im Vollblut die Erythrozytenlyse und eine Verdünnung der Probe durch Zugabe von Lysepuffer erfolgt und dann ohne Zentrifugation gemessen wird («Lyse-no-wash»-Methoden). Der Nachteil ist eine geringe Konzentration der Zellen in der Probe, so dass die Analysezeiten lang sind. Im Falle der Analyse von schwach exprimierten Antigenen, z.B. bei der Analyse aberranter Antigene in der Charakterisierung von Leukämien, ist dagegen eine Reduktion des Hintergrundsignals durch Zentrifugation erforderlich (siehe «Akute Leukämien», S. 946, und «Durchflusszytometrie in der Non-Hodgkin-Lymphom-Diagnostik», S. 1001).

Der Einsatz von Puffern muss an das Probenmaterial und das Färbeformat angepasst werden. Bei Färbungen von im Vorlauf gewaschenen Zellen reduzieren proteinhaltige Puffer die unspezifische Bindung von Antikörpern. Während der Zentrifugation reduzieren sie Zellverluste in proteinarmen, d.h. bereits gewaschenen Proben und insbesondere bei bereits fixierten Zellen.

Eine stringente, d.h. hochtourige oder lange Zentrifugation reduziert Zellverluste beim Waschen. Mit zunehmender Zentrifugationsintensität kommt es aber zur funktionellen Schädigung von Zellen bis hin zum Zelltod, die für das spezifische Probenmaterial validiert werden sollte.

Zwei-Schritt-Methoden, bei denen nach einer quervernetzenden Fixation eine Inkubation mit Antikörpern in Gegenwart eines Detergens erfolgt, erlauben intrazelluläre Antikörperfärbungen. Die verschiedenen Methoden sind unterschiedlich gut zum Aufschluss verschiedener intrazellulärer Kompartimente geeignet. Weiterhin kann es zur Destruktion von Epitopen für einzelne Antikörper kommen, so dass hier eine sorgfältige Anpassung von Methoden und Antikörpern erforderlich ist [7].

Bei allen Antikörperfärbung ist die Analyse der Spezifität, d.h. des Signalanteils, der nicht durch eine Interaktion von Antigen und Antikörper sondern z.B. durch Bindung an Fc-Rezeptoren oder Interaktion des Fluorochroms erfolgt, erforderlich. Der in indirekten Methoden der Antikörperfärbung gewählte klassische

Ansatz hierfür ist der Einsatz von Isotypkontrollen, d.h. eines in seiner Spezifität irrelevanten Antikörpers des gleichen Isotyps (z.B. IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>) und damit der gleichen Affinität zu Fc-Rezeptoren, in identischer Konzentration. Im Falle des Einsatzes von direkt markierten Antikörpern sind neben der Konzentration und dem Isotyp des Antikörpers auch das Fluorochrom-zu-Protein-Verhältnis (F/P-Ratio) und die herstellereigene Aufreinigung des Antikörpers Determinanten für den unspezifischen Signalanteil. Weiterhin ist der unspezifische Signalanteil aufgrund der Aufreinigung der Antikörper niedrig. Der Einsatz von Isotypkontrollen ist unter diesen Umständen nur begrenzt notwendig oder sinnvoll und in der Regel wenig praktikabel. Sofern mehrere Färbungen mit der gleichen Probe durchgeführt werden, liefern auch die Färbesignale der für den jeweiligen Antikörper negativen Fraktion wertvolle Informationen über das Hintergrundsignal. Akkreditierungseinrichtungen, die sich der Problematik bewusst sind, verlangen aus diesen Gründen den Nachweis objektiver Methoden zur Abgrenzung von positiven und negativen Fraktionen, ohne dass Isotypkontrollen als Methode der Wahl definiert werden.

### **Methodische Entwicklungen in der Zytometrie**

Auf dem Weg der Durchflusszytometrie von einer offenen Forschungsmethode hin zu einer diagnostisch eingesetzten Methodik ist es erforderlich, die Präzision der Analytik zu erhöhen und zu methodenunabhängigen und kontrollierbaren Ergebnissen zu kommen. In diesem Zusammenhang sind die Verbesserung der Absolutzählung, die Antigenquantifizierung und der Versuch der Entwicklung von Standards und Kontrollmaterialien zu nennen. Neben der hierdurch erzielten Objektivierung ist es notwendig, die durchflusszytometrische Analytik ähnlich anderen Laboruntersuchungen in den klinischen Informationsfluss zu integrieren, um Messergebnisse verfügbar und interpretatorische Befundanteile transparent zu machen.

#### *Absolutzählung*

Auch wenn die Durchflusszytometrie mit Zusatz von Färbelösungen und Waschprozeduren eine Technik ohne Volumenbezug der Messung ist, sind Methoden der volumenbezogenen Zählung oder Absolutzählung – aufgrund der klinischen Notwendigkeit, bei der HIV-Erkrankung die Konzentration von CD4+ T-Lymphozyten im Blut zu ermitteln – zu den am häufigsten verwendeten durchflusszytometrischen Anwendungen geworden. Neben der Zählung von CD4+

T-Lymphozyten ist hier vor allen Dingen die Quantifizierung von CD34 exprimierenden hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen bei der Stammzelltransplantation zu nennen.

Die klassische Methode zur Ermittlung der Konzentration von CD4+ T-Zellen bestand darin, mit kombiniertem Einsatz eines Durchflusszytometers und eines Hämatologieanalysators («Dual platform»-Methode) einmal durchflusszytometrisch den relativen Anteil von CD4+ T-Zellen unter den Lymphozyten zu ermitteln und zum anderen die Konzentration der Gesamtpopulation von Lymphozyten im Blut über den Hämatologieanalysator zu bestimmen [8]. Als alternative Bezugsgröße wurde hierbei auch die Population der Gesamt-Leukozyten eingesetzt. Diese Methoden sind mit groben Fehlern behaftet, da es vor allen Dingen bei lymphopenischen Proben zu unterschiedlichen Zählweisen der durchflusszytometrischen und hämatologischen Zelldifferenzierung kommt. So führen die Anteile von Normoblasten und basophilen Granulozyten methodenabhängig zu Störungen beider Plattformen. Bei Störungen der Zelldifferenzierung kommt es mit dem Hämatologieanalysator zu einer breiten Streuung der Ergebnisse. Weiterhin sind die klassischen Methoden der Aufarbeitung von Zellen mit Zentrifugationsschritten mit unkalkulierbaren und selektiven Zellverlusten verknüpft.

Trotz dieser Nachteile werden «Dual platform»-Methoden in Deutschland weiterhin häufig eingesetzt, da die beiden nationalen Anbieter für externe Ringversuche das Erreichen von methodenspezifischen Mittelwerten der teilnehmenden Labore zertifizieren. Eine derartige Konsensusfindung begünstigt häufig eingesetzte Methoden unabhängig davon, ob sie zu richtigen Ergebnissen führen. Ebenso orientiert sich das Vergütungssystem an der Anzahl der analysierten Populationen bzw. der eingesetzten Antikörper, die bei «Dual platform»-Methoden aufgrund der Notwendigkeit des Bezugs zu allen Lymphozyten hoch ist, da sie CD4+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen, Gesamt-T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen umfasst. Ein höherer methodischer Aufwand zur direkten und präziseren Analytik von CD4+ T-Zellen wird hingegen nicht berücksichtigt.

Bei Methoden der direkten Absolutzählung auf dem Durchflusszytometer («Single platform»-Methode) wird der Volumenbezug in der Probe dadurch erhalten, dass durch den Einsatz der «Lyse-no-wash»-Techniken auf eine Zentrifugation und die damit verbundenen schlecht reproduzierbaren Volumenveränderungen verzichtet werden kann. Der Volumenbezug wird dann entweder über Zählpartikel, die als Zählstandard zusammen mit der Blutprobe eingesetzt werden, oder über ein volumenkalibriertes Durchflusszytometer hergestellt. Abbildung 14 zeigt den Einsatz von Zählpartikeln in der Beschreibung der aktuellen Richtlinien der US-Centers for Disease Control and Prevention für die CD4+ T-Zellzählung [9]. In analoger Weise wird auch die Absolutzählung seltener Zellen, wie z.B. von CD34 exprimierenden Zellen oder antigenspezifischen T-Zellen heutzutage mit «Single platform»-Methoden durchgeführt. Zu beachten ist hierbei, dass die Zählpartikel

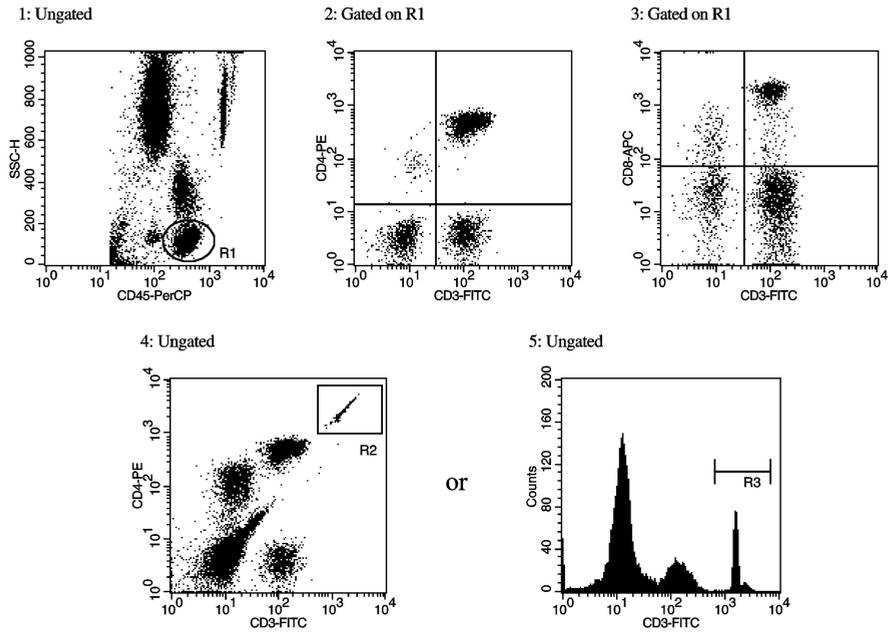


Abb. 14. Prinzip des «Gatings» am Beispiel der «Single platform»-Zählung. Entsprechend einem Beispielsprotokoll der CDC [9] wird lysiertes Vollblut unter Zusatz von Zählpartikeln gemessen. Im Dot-Plot 1 sind die Zählpartikel mit hoher Fluoreszenz und mittlerem SSC in der gestrichelten Region erkennbar. Mit Region 1 werden die CD45 dicht exprimierenden Lymphozyten identifiziert. In Dot-Plot 2 und 3 werden ausschließlich die Lymphozyten der Region 1 dargestellt. In einer Quadrantenstatistik werden die CD3 und CD 4 exprimierenden T-Helferzellen und die CD3 und CD8 exprimierenden zytotoxischen T-Zellen identifiziert. Dot-Plot 4 und das Histogramm 5 zeigen in der nicht auf Region 1 eingegrenzten Darstellung die hochfluoreszenten Zählpartikel über die als Volumenstandard die absolute Zellkonzentration ermittelt wird.

für den Einsatz in Vollblut entwickelt wurden und in proteinarmen Probenmaterialien wie z.B. Aphereseprodukten verklumpen und ausfallen können. Damit es nicht zu falsch-hohen Ergebnissen kommt, ist beim Einsatz von Partikeln in derartigen Probenmaterialien daher der Zusatz von proteinhaltigen Pufferlösungen erforderlich.

### Antigenquantifizierung

Die Intensität der Expression von Antigenen besitzt in vielen Fällen unmittelbare diagnostische Bedeutung. Beispiele hierfür sind CD38 auf CD8+ T-Zellen bei der HIV-Infektion, die Expression von HLA-DR auf Monozyten bei Sepsis

oder die Expression von Aktivierungsantigenen auf Thrombozyten bei prothrombotischen Erkrankungen. Darüber hinaus dienen unterschiedliche Expressionsdichten von Antigenen der Unterscheidung von Zelltypen, insbesondere der Erkennung pathologischer Zellen wie z.B. von CD10 überexprimierenden B-Zellen bei Formen der akuten lymphatischen Leukämie oder CD34 überexprimierenden Zellen bei akuten myeloischen Leukämien. Schließlich ist auch bereits die Bestimmung des Anteils von Zellen, die für ein Antigen positiv sind, wie z.B. bei der Analyse von CD38 oder ZAP-70 bei der chronisch lymphatischen B-Zell-Leukämie ein Problem der Antigenquantifizierung, da die Nachweisgrenze von Antigenen von den eingesetzten Fluorochromen und Antikörperpräparationen sowie vom Gerät und dessen Einstellung abhängt.

Für die Bestimmung von Antigendichten wurden eine Reihe von Ansätzen untersucht [10] (siehe auch «Qualitätskontrolle und Standardisierung», S. 157):

- Ein Ansatz besteht in der Kalibrierung des Durchflusszytometers, mit Eichpartikeln, die in mehreren Populationen mit unterschiedlichen Dichten das zur Färbung eingesetzte Fluorochrom tragen.
- Partikel mit einer definierten Zahl von Bindungsstellen für Maus-Immunglobuline können in Kombination mit den auch zur Zellzählung eingesetzten Antikörpern für die Kalibrierung eingesetzt werden.
- Schließlich können Zellen mit einer bekannten stabilen Expression eines Antigens als Bezugsgröße eingesetzt werden. Hierzu können stabilisierte Materialien oder auch in der Probe enthaltene Populationen mit einer stabilen Expression, wie sie z.B. für das CD4-Antigen auf T-Helferzellen bekannt ist, eingesetzt werden.

Methoden der Antigenquantifizierung sind jedoch unverändert problematisch, da die Kombination verschiedener Methoden der Antigenquantifizierung mit unterschiedlichen Antikörpern trotz gleicher Spezifität auch bei dicht und homogen exprimierten Antigenen zu breit streuenden Ergebnissen führt [11] und auch die Chargenstabilität einiger Kalibrierungsreagenzien unzureichend ist. Ein wesentliches Problem ist die fehlende Sättigung von Bindungsstellen durch viele kommerziell verfügbare Antikörper, insbesondere im Falle von Konjugaten mit hell fluoreszierenden Fluorochromen wie PE oder APC. Weiterhin wirken sich das Fluorochrom-zu-Protein-Verhältnis, die Zugänglichkeit von Epitopen für bestimmte Klone oder Unterschiede in deren Immunreaktivität, bivalente oder monovalente Bindung von Antikörpern sowie die Linearität und Stabilität des Durchflusszytometers in Abhängigkeit der Methoden unterschiedlich auf das Ergebnis aus. Speziell die Kompensation von spektraler Überlappung bei Mehrfarbansätzen ist ein komplexes Problem.

### *Standardprotokolle und Kontrollmaterialien*

Ein entscheidendes Hindernis für den routinemäßigen Einsatz von durchflusszytometrischen Methoden stellt in vielen Bereichen die mangelnde Standardisierung von applikationsspezifischen Methoden und damit die fehlende multizentrische Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen dar. Bei Anwendungen mit klar definierten Messparametern wie der Zählung von CD4 exprimierenden T-Zellen, von CD34 exprimierenden hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen oder von residualen Zellen in Blutprodukten sind inzwischen eine Reihe von validierten Testsystemen und zum Teil entsprechende Kontrollmaterialien verfügbar. Weiterhin wurden von einigen Herstellern Qualitätskontrollmodule in die Datenaufnahmesoftware integriert.

Unverändert problematisch sind hingegen komplexe Methoden wie z.B. die Immunphänotypisierung von Leukämien oder Lymphomen oder die Analytik von Thrombozyten. Derartige Methoden befinden sich aktuell in der Phase der literatur- und erfahrungsbasierten Konsensusfindung während eine Kreuzvalidierung alternativer methodischer Ansätze aussteht.

### *Integration in die klinische Befunderzeugung und -interpretation*

Der klinische Einsatz der Durchflusszytometrie ist schließlich auch ein Problem der Informationslogistik. So erfordert eine effiziente Bearbeitung von Proben eine automatisierte und damit sichere Übernahme der Probenidentifikation, z.B. über Barcodes, sowie von Auftragsinformation einschließlich Patientenstammdaten. Während die Übernahme und Integration von numerischen Analyseergebnissen in Laborinformationssysteme und Krankenhausinformationssysteme in der Regel ohne Probleme gelingt, fehlen bisher Standards für die Aufarbeitung und Dokumentation der graphischen Befundinformation, wie z.B. von Dot-Plots, bei komplexen Analysen wie bei Leukämien und Lymphomen. Eine Integration auch derartiger Befundinformationen in Befundberichte ist ein wichtiger Ansatz, um auch interpretatorische Befundanteile nachvollziehbar zu machen und die klinische Bewertung derartiger Ergebnisse zu vereinfachen.

## **Zusammenfassung**

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik zur gleichzeitigen Messung der Größe und Granularität sowie von mehreren Fluoreszenzeigenschaften jeden Zelltyps. Über spezifische Färbungen mit fluoreszenten Antikörpern oder andere fluoreszente Färbeverfahren können hierbei in flexibler Weise immunologische,

biochemische oder funktionelle Eigenschaften einzelner Zellen in heterogenen Zellgemischen vermessen werden. Komplexe Methoden der Datenanalyse erlauben die Zuordnung der Messsignale zu Populationen von Zellen ähnlicher Eigenschaften. Die Analyse der Fluoreszenz stellt im Grundsatz eine nur relative Vermessung von Zellen ohne feste Bezugsgrößen dar. Neue methodische Ansätze erlauben über Referenzpartikel jedoch auch eine Quantifizierung von Antigenen oder eine Bestimmung der Absolutkonzentration von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

## Literatur

- 1 Janossy G: Clinical flow cytometry, a hypothesis-driven discipline of modern cytomics. *Cytometry A* 2004;58:87–97.
- 2 Shapiro HM: *Practical Flow Cytometry*, 4th ed. New York, Wiley-Liss, 2003.
- 3 Gratama JW, Orfao A, Barnett D, Brando B, Huber A, Janossy G, Johnsen HE, Keeney M, Marti GE, Preijers F, Rothe G, Serke S, Sutherland DR, Van der Schoot CE, Schmitz G, Papa S: Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Cytometry* 1998;34:128–142.
- 4 Rothe G, Klouche M: Phagocyte function. *Methods Cell Biol* 2004;75:679–708.
- 5 Maecker HT, Frey T, Nomura LE, Trotter J: Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry A* 2004;62:169–173.
- 6 Elghetany MT, Davis BH: Impact of preanalytical variables on granulocytic surface antigen expression: a review. *Cytometry B Clin Cytom* 2005;65:1–5.
- 7 Kappelmayer J, Gratama JW, Karaszi E, Menendez P, Ciudad J, Rivas R, Orfao A: Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a. Interaction between monoclonal antibody clones, fluorochromes and sample preparation protocols. *J Immunol Methods* 2000;242:53–65.
- 8 Brando B, Barnett D, Janossy G, Mandy F, Autran B, Rothe G, Scarpati B, D'Avanzo G, D'Hautcourt JL, Lenkei R, Schmitz G, Kunkl A, Chianese R, Papa S, Gratama JW: Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 2000;42:327–346.
- 9 Mandy FF, Nicholson JK, McDougal JS: Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 2003;52:1–13.
- 10 Gratama JW, D'Hautcourt JL, Mandy F, Rothe G, Barnett D, Janossy G, Papa S, Schmitz G, Lenkei R: Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 1998;33:166–178.
- 11 Lenkei R, Gratama JW, Rothe G, Schmitz G, D'Hautcourt JL, Arekrans A, Mandy F, Marti G: Performance of calibration standards for antigen quantitation with flow cytometry. *Cytometry* 1998;33:188–196.