2. Treffen der Arbeitsgruppe «Durchflußzytometrie» der DGTI-Sektion «Monoklonale Antikörper, Gentechnik» am 23.8.1995 in Frankfurt/Main

Infusionsther Transfusionsmed 1996;23:109-110

Monoklonale Antikörper und Immunmarkierung

H.-D.		Kleine
M.		Freund

Abteilung Hämatologie und Onkologie, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Universität Rostock

Dr. med. Hans-Dieter, Kleine Abteilung Hämatologie und Onkologie, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Universität Rostock, Ernst-Heydemann-Straße 6, D-18055 Rostock (Deutschland)

Die Verbreitung der Durchflußzytometrie in der medizinischen Diagnostik hat nicht zuletzt durch die relativ problemlose Bedienbarkeit und gute Stabilität der kommerziell erhältlichen Geräte in den letzten zehn Jahren sprunghaft zugenommen. Trotz dieser erhöhten Bedienerfreundlichkeit ist für eine qualitativ anspruchsvolle Durchflußzytometrie ein Grundwissen über die physikalisch-technischen und biochemischen Grundlagen notwendig. Für die durchflußzytometrische Immunmarkierung von Zellen werden direkt fluorochromkonjugierte monoklonale Antikörper aus verschiedenen Gründen, vor allem aber wegen der vereinfachten Handhabung und der Reduktion von Laborfehlern, der indirekten Immunmarkierung vorgezogen. Die gängigsten Fluorochrome zeichnen sich insbesondere durch ihre Anregbarkeit bei 488 nm aus, die in der Verwendung von Argonlasern in den meisten Durchflußzytometern begründet liegt. Häufig verwendete Fluorochrome sind das Fluorescein, Phycocerythrin und Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) sowie Tandemkonjugate, wie PE-Texas-Red und PE-Cy5, die mittels Energietransfer in der Lage sind, langwelliges Licht zu emittieren. Ein Problem, das bei der gleichzeitigen Nutzung mehrerer Fluorochrome auftritt, ist die relative Breitbandigkeit des emittierten Lichtes. Das heißt, daß ein grüner Farbstoff einen gewissen Rotanteil besitzt und ein roter Farbstoff einen Grünanteil. Die genaue Erfassung dieser Überschneidung eines Farbstoffs mit einem anderen Meßkanal ist der Grund für eine elektronische Korrektur – die Kompensation. Häufig werden Kompensationskontrollen mit Antikörperkombinationen, die einander ausschließende Epitope markieren (z. B. CD3/CD19), durchgeführt. Dies ist bei der zweiparametrischen Messung problemlos möglich. Werden aber drei Parameter markiert, wird die Kompensation eventuell sehr schwierig. Ein einfacher Weg zur sicheren Kompensation besteht in der Kombination einer oder mehrerer Negativkontrollen mit nur einem spezifischen Marker. Die Anzahl der Kompensationskontrollen ist identisch mit der Anzahl der Parameter. Auf diese Art kann der Einfluß eines spezifischen Markers auf alle anderen Parameter beurteilt und kompensiert werden.

Die Stärke der Kompensation ist hauptsächlich von den physikalischen Eigenschaften des Farbstoffs, der verwendeten Filter und der Verstärkung der Meßsignale abhängig. Die notwendige Verstärkung der Meßsignale wird vor allem durch die Justierung des Durchflußzytometers und die Art und Menge des durch unspezifische Antikörperbindung vorhandenen Farbstoffes der Negativkontrollen bestimmt. Zwei Faktoren können die Menge des vorhandenen Fluorochroms beeinflussen. Der erste Faktor ist die sogenannte Fluorochrom/Protein-Ratio (F/P-Ratio). Diese Ratio beschreibt die Menge des gebundenen

Fluorochroms pro Mengeneinheit Protein. Es ist unabdingbare Voraussetzung, daß die Negativkontrollen und spezifischen Antikörper, die an der Durchflußzytometrie verwandt werden, vergleichbare F/P-Ratios besitzen, weil nur dann exakte Messungen möglich sind. Die F/P-Ratio sollte natürlich möglichst groß sein, was aber in der Praxis nicht immer möglich ist, da zuviel gebundenes Fluorochrom häufig die spezifischen Bindungsmöglichkeiten des Antikörpers einschränkt. Der zweite Faktor, der die Menge des vorhandenen Farbstoffs bestimmt, liegt in der Titration des Antikörpers.

Die verwendete Antikörperkonzentration sollte für jeden Antikörper optimal titriert sein. Ein einfacher Weg, diese Konzentration zu bestimmen, kann wie folgt aussehen. Etwa 1×10^6 Zellen je Probe, die für den zu titrierenden Antikörper anteilig positiv und negativ sind, werden in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert. Die Verstärkung des Durchflußzytometers wird so eingestellt, daß die Zellen mit der geringsten Fluoreszenz aus der Probe der geringsten Konzentration links im Histogramm sichtbar sind. Danach werden sämtliche Proben gemessen. Zuerst wird mit ansteigender Konzentration des Antikörpers ein Signalanstieg der für den Antikörper positiven Zellen sichtbar. Ab einer gewissen Konzentration steigt dann die Menge des unspezifisch gebundenen Antikörpers und damit die Fluoreszenz der negativen Zellpopulation. Die beiden Verteilungen nähern sich wieder an. Der Antikörper hat sein Sättigungsplateau erreicht. Die Konzentration, die den größten Unterschied in den mittleren Kanalzahlen (mathematisch und nicht geometrisch) zwischen den Verteilungen der

negativen und positiven Zellen aufweist, ist optimal. Wird die Anzahl der zu färbenden Zellen bei konstantem Volumen erhöht, kann die Konzentration des Antikörpers während der Inkubation so stark abfallen, daß keine optimale Markierung erreicht wird. In diesem Falle sollte das Färbervolumen erhöht werden und nicht die Konzentration des Antikörpers. Die Amplifikation eines Meßsignals ist bei der mehrparametrischen Fluoreszenzmarkierung nur eingeschränkt möglich. Bei der einparametrischen Messung ist die Markierung mit einem Second-step-Antikörper möglich. Die erhoffte Signalverstärkung wird in diesem Fall aber häufig mit einer deutlichen Erhöhung der Hintergrundfluoreszenz «erkauft». Die Signalamplifikation mit einem Biotin-Streptavidin-System stellt die beste Möglichkeit der Amplifikation dar, da Streptavidin hier hochaffine Bindungsstellen für Biotin besitzt. Da viele Zellen auf ihrer Oberfläche Fc-Rezeptoren exprimieren, werden monoklonale Antikörper häufig als Fab-Fragmente

eingesetzt. Soll eine Immunmarkierung mit einem kompletten Antikörper durchgeführt werden, ist die Blockade der Fc-Rezeptoren durch eine Vorinkubation mit Immunglobulin ratsam. Inkubationen sollten bei der Markierung lebensfähiger Zellen immer bei 4°C und so kurz wie möglich (10-15 min) durchgeführt werden. Auch die Anzahl der Waschschrte sollte bei direkt konjugierten Antikörpern auf zwei begrenzt werden. Sollte die Hintergrundfluoreszenz nach weiteren Waschschrten deutlich abnehmen, muß die Titration des Antikörpers überprüft werden.

Ein hohes Qualitätsniveau in der durchflußzytometrischen Diagnostik ist durch die Beachtung einiger chemischer und physikalischer Grundsätze möglich. Die daraus folgende standardisierte Vorgehensweise bei der Probenvorbereitung und Messung ist der Schlüssel zur Qualitätssicherung dieser Technik.