

Etablierung eines 17 Farben Panels zur Detektion von regulatorischen T-Zellen bei Mäusen

Florian Pichler, BMA18-21A

Biomedizinische Analytik HF

DBMR Universität Bern, Durchflusszytometrie Labor

1. Zusammenfassung

Im Zytometrielabor des DBMR (Departement of Biomedical Research der Universität Bern) ist es ein Protokoll zur Definition von regulatorischen T Zellen (T reg) mittels Durchflusszytometrie zu erstellen. Um eine Identifizierung dieser Zellen zu ermöglichen wird ein «Panel» von 17 gefärbten Antikörpern (Fluorochrome) für die Identifikation dieser T reg eingesetzt.

Mit «Signal to Noise Ratio» können die besten Verdünnungen der Antikörper errechnet werden, so dass, das immer auftretende Hintergrundrauschen in den Resultaten, gut von den positiven Ereignissen abzugrenzen ist.

Mit diesem Wissen kann die «Fluorescence Minus One» (FMO) Methode durchgeführt werden. So können weitere Signalüberlappungen in die entsprechenden Sensoren überprüft werden.

Damit kann kontrolliert werden, ob die richtigen Fluorochrome ausgewählt wurden. [1]

2. Einleitung

Als Ausgangsmaterial der T reg Zellen wurden Milz und Thymii von Mäusen verwendet. Die T reg Zellen werden mittels verschiedener Antikörper identifiziert, wobei diese Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrom) markiert sind. Der „Trick“ dieses Verfahrens ist, dass die Fluorochrome so ausgewählt wurden, dass sie von einem der 5 Lasern im Durchflusszytometer angeregt werden und eine Fluoreszenz emittieren, die gut abgrenzbar von anderen Fluoreszenzen ist. Gemessen am Durchflusszytometer ergibt sich dann das komplexe Bild einer T reg Zelle.

UV	VIOLETT	BLAU	GRÜN GELB	ROT
CD45	CD127	CD45RA	FoxP3	Helios
CD44	CD25	Dead/alive	CD62L	CD19
CD4	CD197		AhR	Ly6G Ly6C
	CD357			
	CD3			
	CD8			

Tab. 1: Anregungslaser und dazugehörenden Antigene

3. Ziele und Fragestellungen

Für die 17 Fluorochrome werden die wirtschaftlichsten Verdünnungen mittels «Signal to Noise Ratio» errechnet.

Sind die Verdünnungen bekannt, soll mittels «Fluorescence Minus One» (FMO) getestet werden, ob die richtigen Fluorochrome ausgewählt wurden und die gesuchte T Zell Population so identifiziert werden können.

4. Material, Methodik, Vorgehen

Zuerst muss die Isolation der Zellen und eine Erstellung der Zellkonzentration durchgeführt werden.

Einzelfärbungen werden für die Antikörper Konzentrationsbestimmung benötigt. Zu beachten gilt, dass intrazellulären Marker erst in die Zellen eindringen können, wenn diese vorher mit einem Permeabilitätspuffer permeabel gemacht werden.

Sind die optimalen Konzentrationen der Antikörper errechnet worden, kann die FMO Methode gestartet werden.

Bei der FMO, also dem kompletten Farbepanel ausser einem Fluorochrom, müssen zuerst alle extrazellulären Bestandteile der Zelle gefärbt werden und anschliessend werden die intrazellulären Antigene angefärbt.

Ein FMO wird für jedes Fluorochrome einzeln erstellt.

Gemessen werden die Zellen auf dem Durchflusszytometer «LSR II upgrade» der Firma BD.

Die Auswertung konnte an der FlowJo Software vorgenommen werden.

5. Ergebnisse/ Resultate

Das «Signal to Noise Ratio» kann berechnet werden indem man mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) einer positiven Population gegen die Fluoreszenzintensität einer negativen Population in Verhältnis setzt. Die wirtschaftlichste Verdünnung mit einem guten Signalunterschied kann für die FMO und die komplette Färbung gewählt werden.

Bei den Messungen der FMO Signale zeigte sich jedoch ein unspezifisches Signalrauschen in allen Messkanälen, so dass die Auswertung bei der FMO leider nicht fertig gestellt werden konnte.

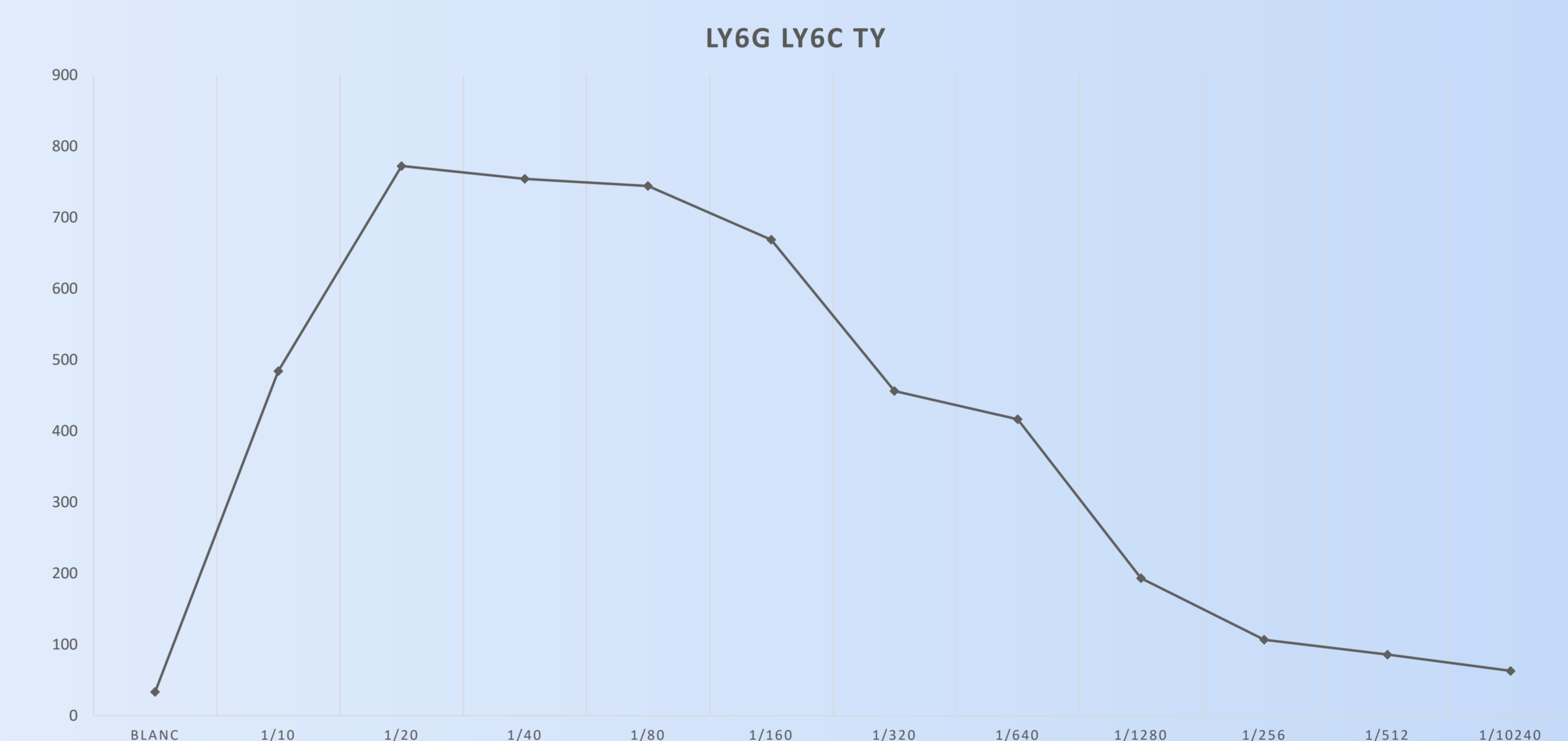


Abb. 1: Ly6G Ly6C Signal to Noise Ratio Resultat

6. Diskussion

Die «Signal to Noise Ratio» zeigte gute Resultate.

Die FMO Färbungen konnten jedoch nicht ausgewertet werden. Unspezifisches Leuchten der Zellen verunmöglichte die Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen.

Verschiedene Fehlerquellen kommen hierfür in Frage:

Methode verbessern der intrazellulären Färbungen.

Kompensationen sollten mit kommerziellen «Compensationbeads» erledigt werden.

Referenzen

[1] Roland Fuchs, P. S. (2018). Hämatologie. Nora.

Abbildungen

Abb. 1 Eigene Erstellung, F. Pichler 2021

Tabellen

Tab. 1 Eigene Erstellung, F. Pichler 2021