

# Etablierung eines Immuno-Flow-FISH-Protokolls auf dem Amnis® ImageStream®X MK II

Walther, Viorel Philip, BMA 20-23

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Flow Cytometry and Cell Sorting Facility, Department for Biomedical Research

## 1. Zusammenfassung

Der Amnis® ImageStream®X MK II (ISX) der Flow Cytometry and Cell Sorting Facility des Department of Biomedical Research wird nur wenig benutzt. Um die Auslastung des ISX zu erhöhen, wurde versucht ein Immuno-Flow-FISH-Protokoll auf dem ISX zu etablieren. Als Vorlage für dieses Protokoll diente ein Protokoll, das 2021 publiziert wurde [1]. Es wurden Jurkat-Zellen und periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) verwendet. Die Zellen wurden immunphänotypisiert und anschliessend mit einer CEP 17-Sonde hybridisiert. Danach wurde ein Spot-Count mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Der Fluoreszenz-korrigierte Spot-Count konnte die Kriterien erfüllen, auf die Immunphänotypisierung wird auf diesem Poster nicht eingegangen.

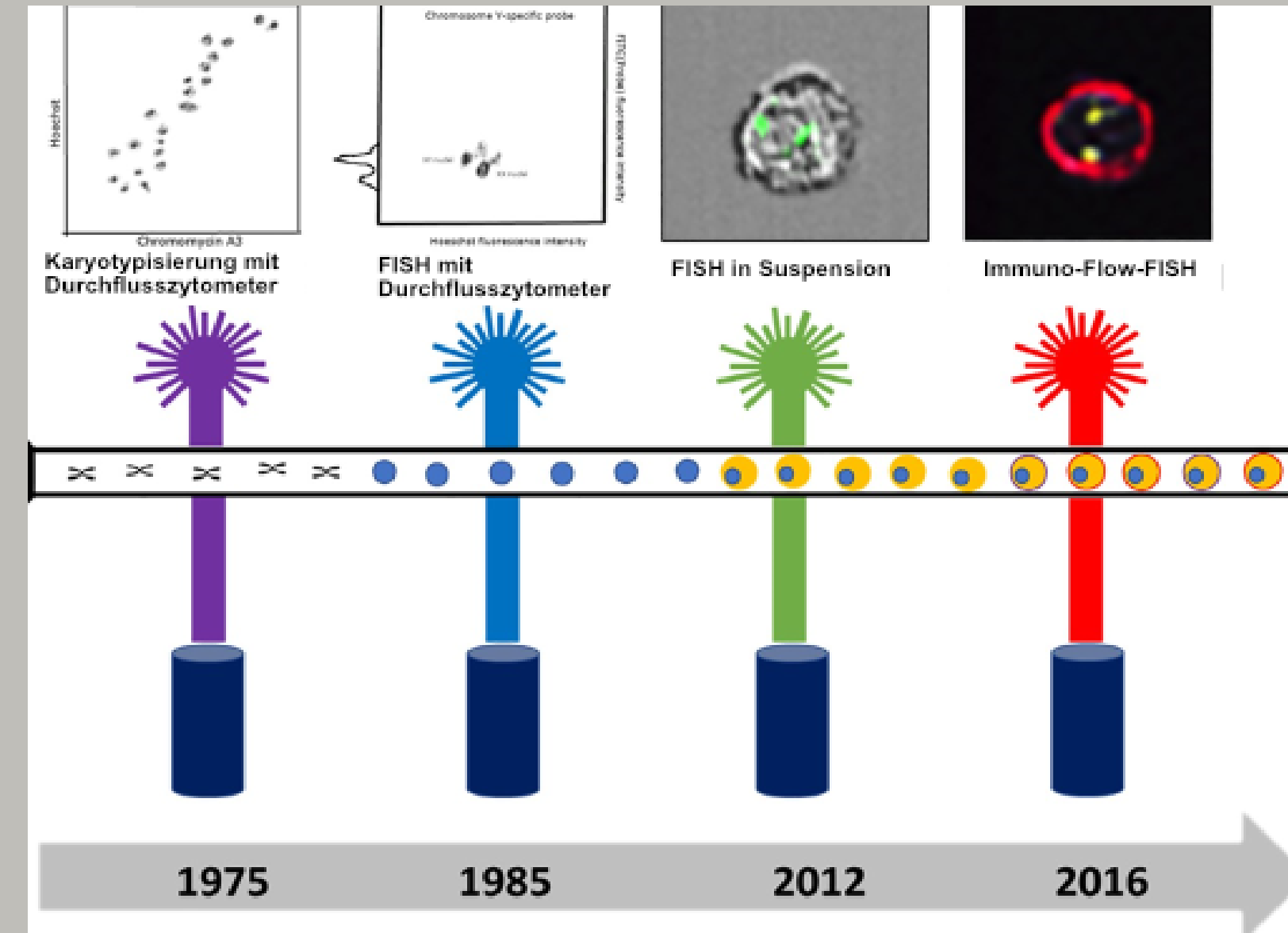


Abb. 1: Entwicklung von FISH in Kombination mit Durchflusszytometrie (Stanley et al., 2021, S. 542)

## 2. Einleitung

Immuno-Flow-FISH ist eine Methode, die Immunphänotypisierung mit FISH in Suspension kombiniert. Im Gegensatz zur konventionellen FISH-Analyse auf Objektträgern ermöglicht Immuno-Flow-FISH die Analyse von mehreren Tausend Zellen in einem einzigen Schritt. Aktuell werden in der CLL-Diagnostik Immunphänotypisierungen und FISH-Analysen in einzelnen Schritten durchgeführt. Diese Technik bietet die Möglichkeit diese Schritte zu kombinieren und dadurch Zeit einzusparen. [2]

Für die FISH-Analyse wurde eine zentromerspezifische repetitive DNA-Sonde(CEP) für das Chromosom 17 verwendet. CEP-Sonden dienen der Detektion von numerischen chromosomalen Aberrationen. [3]

## 3. Ziele und Fragestellungen

Können Jurkat-Zellen erfolgreich mit CEP17 hybridisiert werden?

- Mindestens 90 % der fokussierten, nichtteilenden Einzelzellen sind hybridisiert (weisen mindestens einen Spot auf).
- Mindestens 90 % der hybridisierten Zellen weisen 2 Spots auf.

Können periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) erfolgreich mit CEP17 hybridisiert werden?

- Mindestens 90 % der fokussierten, nichtteilenden Einzelzellen sind hybridisiert (weisen mindestens einen Spot auf).
- Mindestens 90 % der hybridisierten Zellen weisen 2 Spots auf.

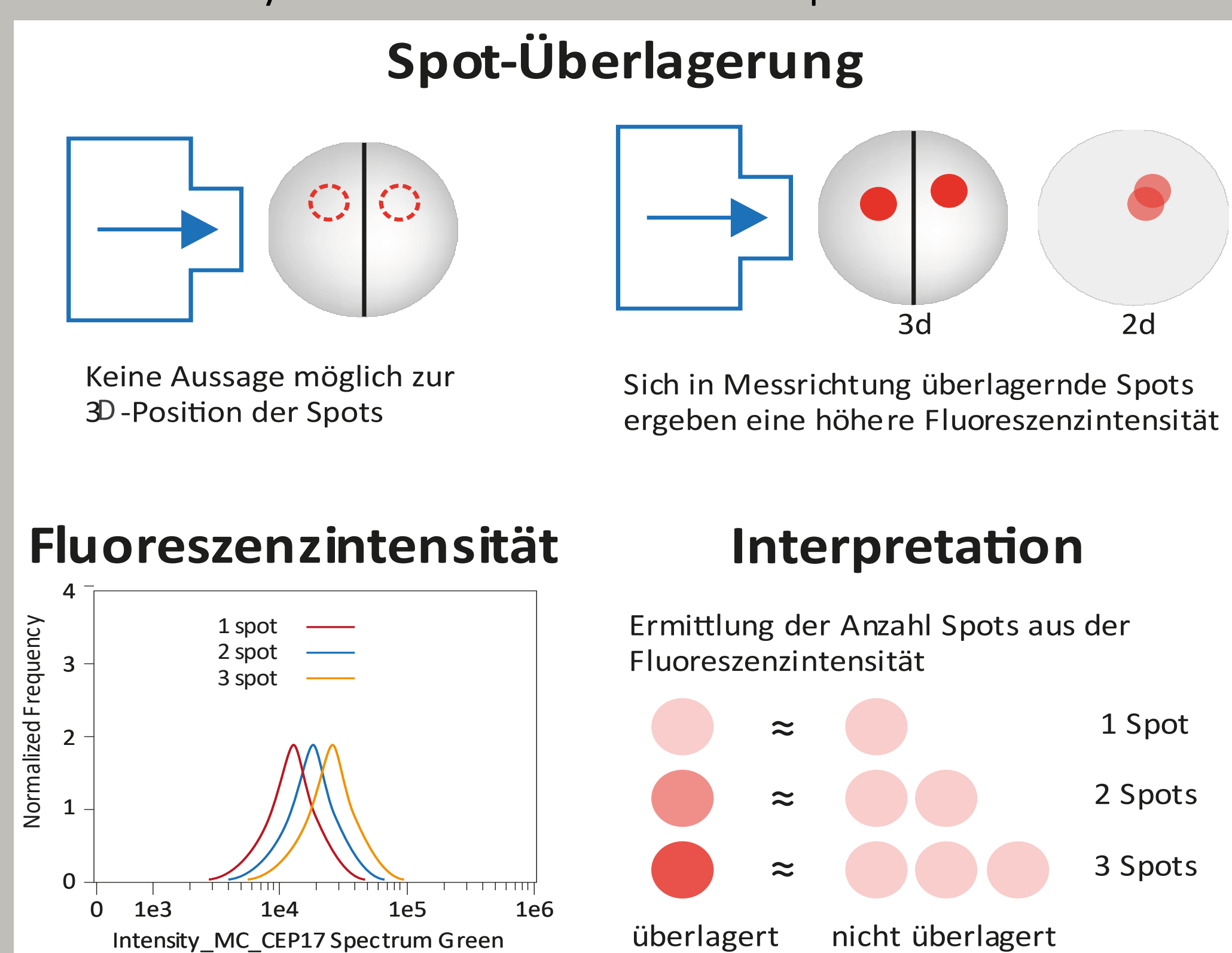


Abb. 2: Prinzip des fluoreszenz-korrigierten Spot-Counts (Schenker, 2023)

## 4. Material, Methodik, Vorgehen

Der ISX ist ein bildgebendes Durchflusszytometer, das die Kombination von Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie erlaubt.

Als Probematerial wurden Jurkat-Zellen und aus Buffy Coat isolierte PBMC verwendet. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 42°C hybridisiert. Anschliessend erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Sytox AAdvanced™ vor der Analyse auf dem ISX. Die Zellen wurden mit dem 60x-Objektiv und mit Extended-Depth-of-Field-Technik aufgenommen.

Nachdem fokussierte, nicht teilende, hybridisierte Einzelzellen durch konsequente Gates selektioniert worden waren, erfolgte ein erster Spot-Count mit dem Spot Wizard der IDEAS®-Software. Anschliessend wurde ein zweiter, Fluoreszenz-korrigierter Spot-Count durchgeführt.

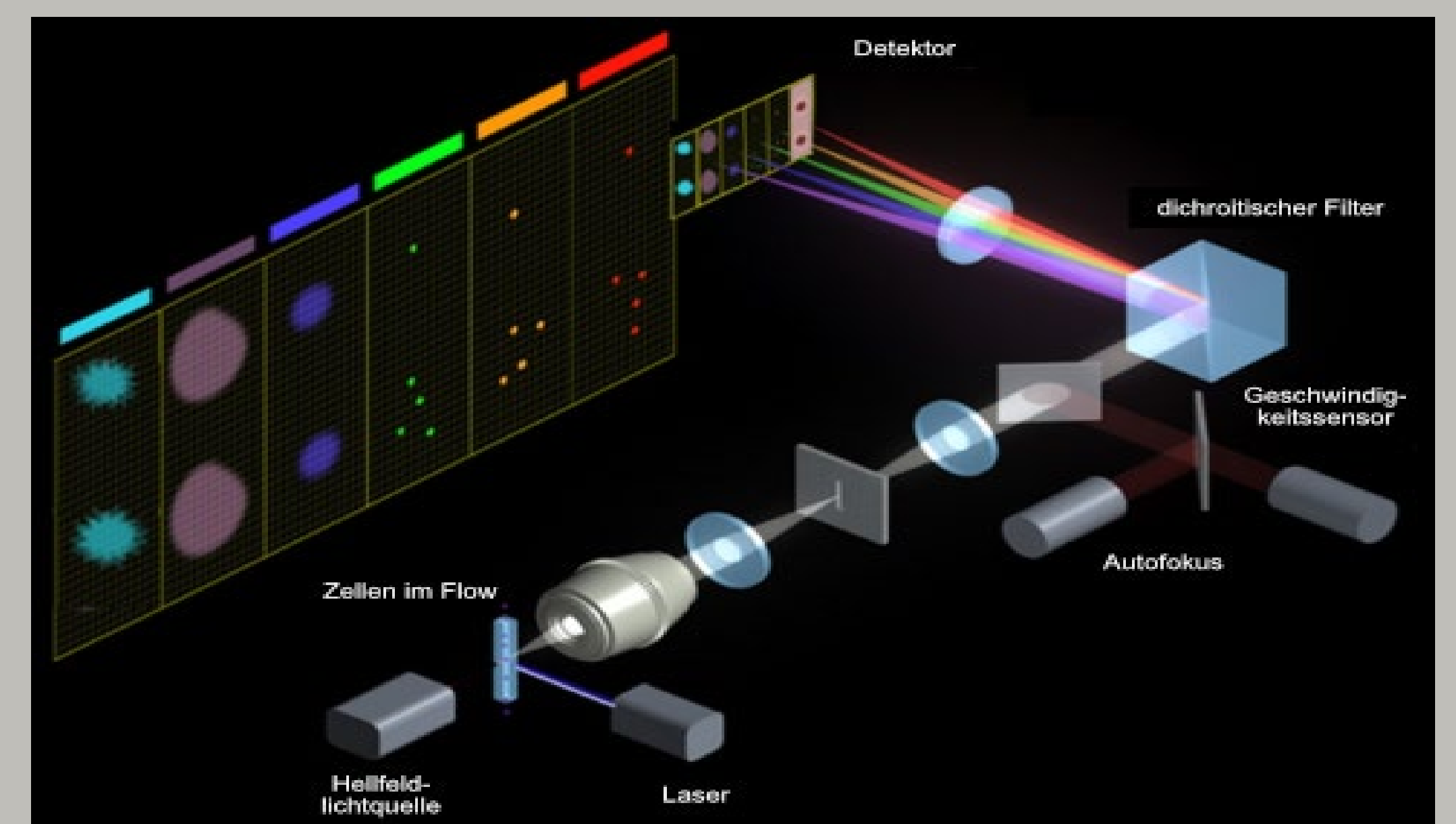


Abb. 3: Schematische Darstellung der ImageStream-Optik (Amnis, 2020, S.10) - adaptiert

## 5. Ergebnisse/ Resultate

**Jurkat-Zellen:**

82.46 % der Zellen wurden erfolgreich hybridisiert und wiesen mindestens 1 Spot auf (siehe Tab.1).

Nach dem IDEAS® Spot-Count wiesen im Schnitt 33.69 % der Zellen 2 Spots auf. Nach dem Fluoreszenz-korrigierten Spot Count wiesen 98.48 % der Zellen 2 Spots auf (siehe Abb.4).

**PBMC:**

97.84 % der Zellen wurden erfolgreich hybridisiert und wiesen mindestens 1 Spot auf (siehe Tab.1).

Nach dem IDEAS® Spot-Count wiesen im Schnitt 71.49 % der Zellen 2 Spots auf. Nach dem Fluoreszenz-korrigierten Spot-Count wiesen 99.66 % der Zellen 2 Spots auf (siehe Abb.5).

|               | Einzelzellen, fokussiert nichtteilend | Einzelzellen, fokussiert nichtteilend hybridisiert | Prozentualer Anteil hybridisierter Zellen |
|---------------|---------------------------------------|--|---|
| Jurkat-Zellen | 17'477                                | 14'412   | 82.46 %                                   |
| PBMC          | 29'265                                | 28'634   | 97.84 %                                   |

Tab. 1: Auswertung der Hybridisierung der Zellen.(Walther, 2023)

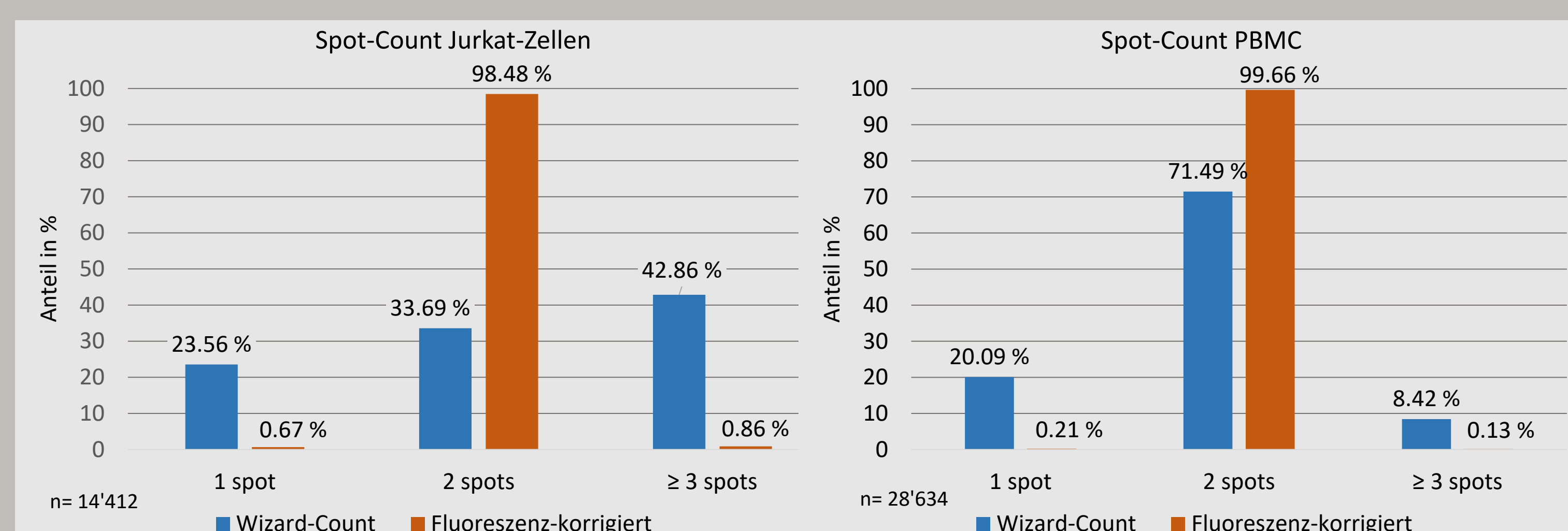


Abb. 4: Vergleich Wizard und Fluoreszenz-korrigierter Spot-Count bei Jurkat-Zellen (Walther, 2023)

Abb. 5: Vergleich Wizard und Fluoreszenz-korrigierter Spot-Count bei PBMC (Walther, 2023)

## 6. Diskussion

Das Ziel mindestens 90% der Zellen erfolgreich zu hybridisieren, wurde nur bei den PBMC erreicht. Bei den Jurkat-Zellen konnte das Ziel nicht erreicht werden. Der Zielwert von einem 2 Spot-Anteil von mind. 90% wurde bei beiden Probematerialen erst nach dem Anwenden des Fluoreszenz-korrigierten Spot-Counts erreicht.

Eine Verbesserung des Spot-Counts der Jurkat-Zellen könnte durch die Wahl eines kleineren Objektivs erreicht werden. Da die Jurkat-Zellen grösser als PBMC sind, sind sie mit dem 60x-Objektiv zu weit weg von der Fokusebene. Weitere Möglichkeiten sind die Anpassung der Gating-Strategie oder des Spot Wizards.

**Fazit:**

Das Protokoll konnte für die PBMC erfolgreich etabliert werden. Es ist gelungen einen weiteren Verwendungszweck des ISX zu demonstrieren. Diese Methode kann somit zu einer höheren Auslastung des ISX beitragen.

## Referenzen

- [1] Hui, H., Stanley, J., Clarke, K., Erber, W. N., & Fuller, K. A. (2021). Multi-probe FISH Analysis of Immunophenotyped Chronic Lymphocytic Leukemia by Imaging Flow Cytometry. *Current Protocols*, 1(10). <https://doi.org/10.1002/cpz1.260>
- [2] Fuller, K. A., Bennett, S., Hui, H., Chakera, A., & Erber, W. N. (2016). Development of a robust immuno-S-FISH protocol using imaging flow cytometry. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 89(8), <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22852>
- [3] Jauch, A. (2014). 14.2 Molekulare Zytogenetik: FISH. In *Medizinische Genetik für die Praxis*. S.346-347 Thieme Verlag.

## Abbildungen

Abb. 1 Stanley, J., Hui, H., Erber, W., Clynick, B., & Fuller, K. (2021). Analysis of human chromosomes by imaging flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 100(5), 541.

Abb. 2 Amnis (2023, Mai 6). Inspire ImageStreamX mkII Manual. <https://www.luminexcorp.com/imagestreamx-mk-ii/#documentation>

Abb. 3 Schenker, M (2023). Prinzip des Fluoreszenz-korrigierten Spot-Counts, selbsterstellte Grafik.

Abb. 4 Walther, V.P. (2023). Vergleich Wizard- und Fluoreszenz-korrigierter Spot Count bei Jurkat-Zellen, DBMR Bern

Abb. 5 Walther, V.P. (2023). Vergleich Wizard- und Fluoreszenz-korrigierter Spot Count bei PBMC, DBMR Bern

## Tabellen

Tab. 1 Walther, V.P. (2023). Auswertung der Hybridisierung der Zellen, DBMR Bern