



Biologisches Institut

**Lehrstuhl
für
Immunologie**

Durchflusszytometrie im Klinikum

Barbara Uzonyi

barbara.uzonyi@ttk.elte.hu

Durchflusszytometrie (DFZ) – Flow cytometry (FCM)

(FACS: fluorescence activated cell sorting)

Aufbau eines Durchflusszytometers

Messprinzip – hydrodynamische Fokussierung, Lichtstreuung, Fluoreszenzsignale, Darstellung der Daten

CD-Antigene

Klinische und mikrobiologische Anwendungen – Diagnostik, Therapieverfolgung

 Hämatologische Tumoren

 Multiplex Myelom (Minimale Resterkrankung – zur Verfolgung)

 HIV-Diagnostik

 Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

 Funktionstest von Granulozyten und Lymphozyten

 Identifizierung von Pathogenen

 Bestimmung der Antibiotikumresistenz

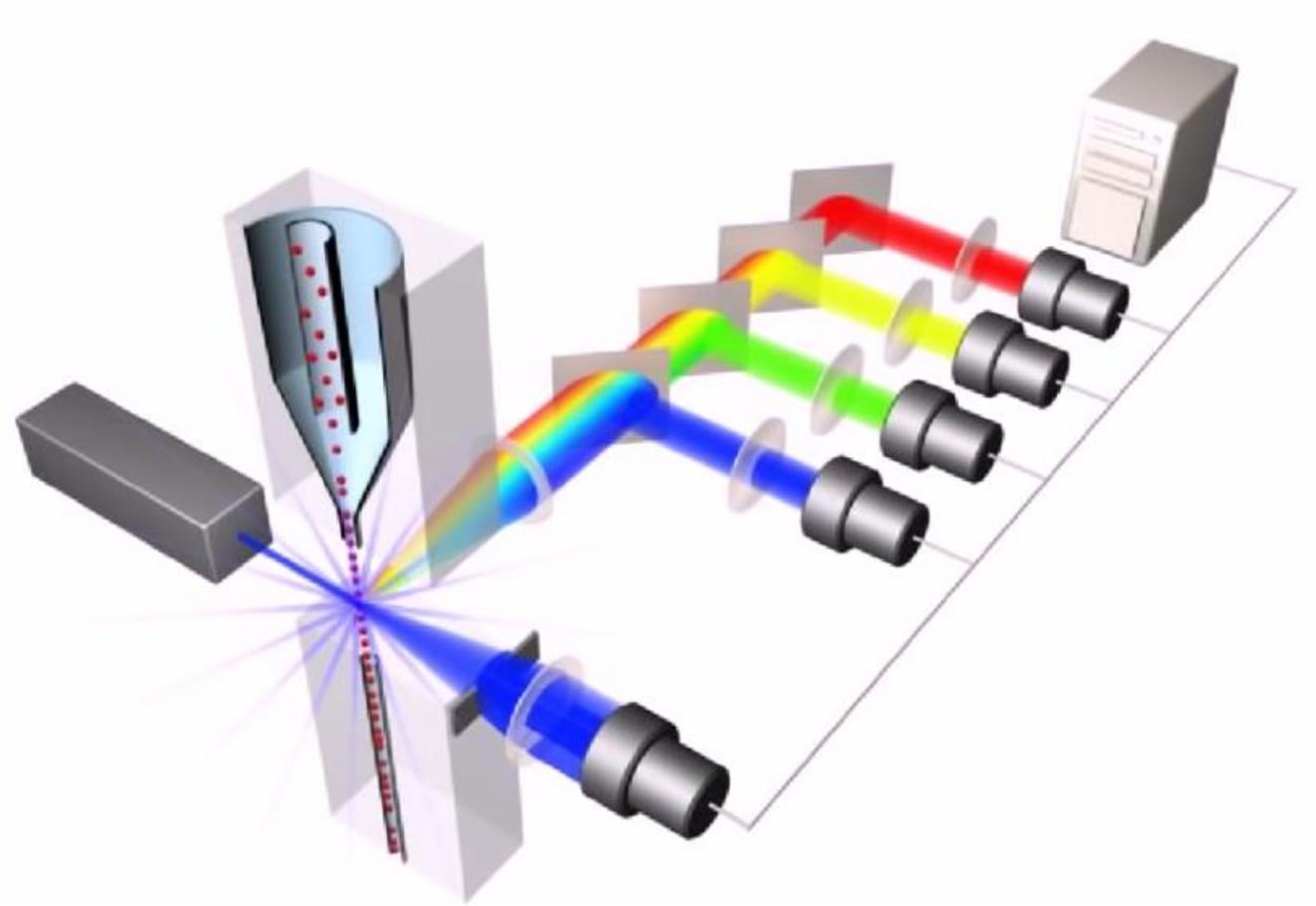
Zellsortierung

Zusammenfassung

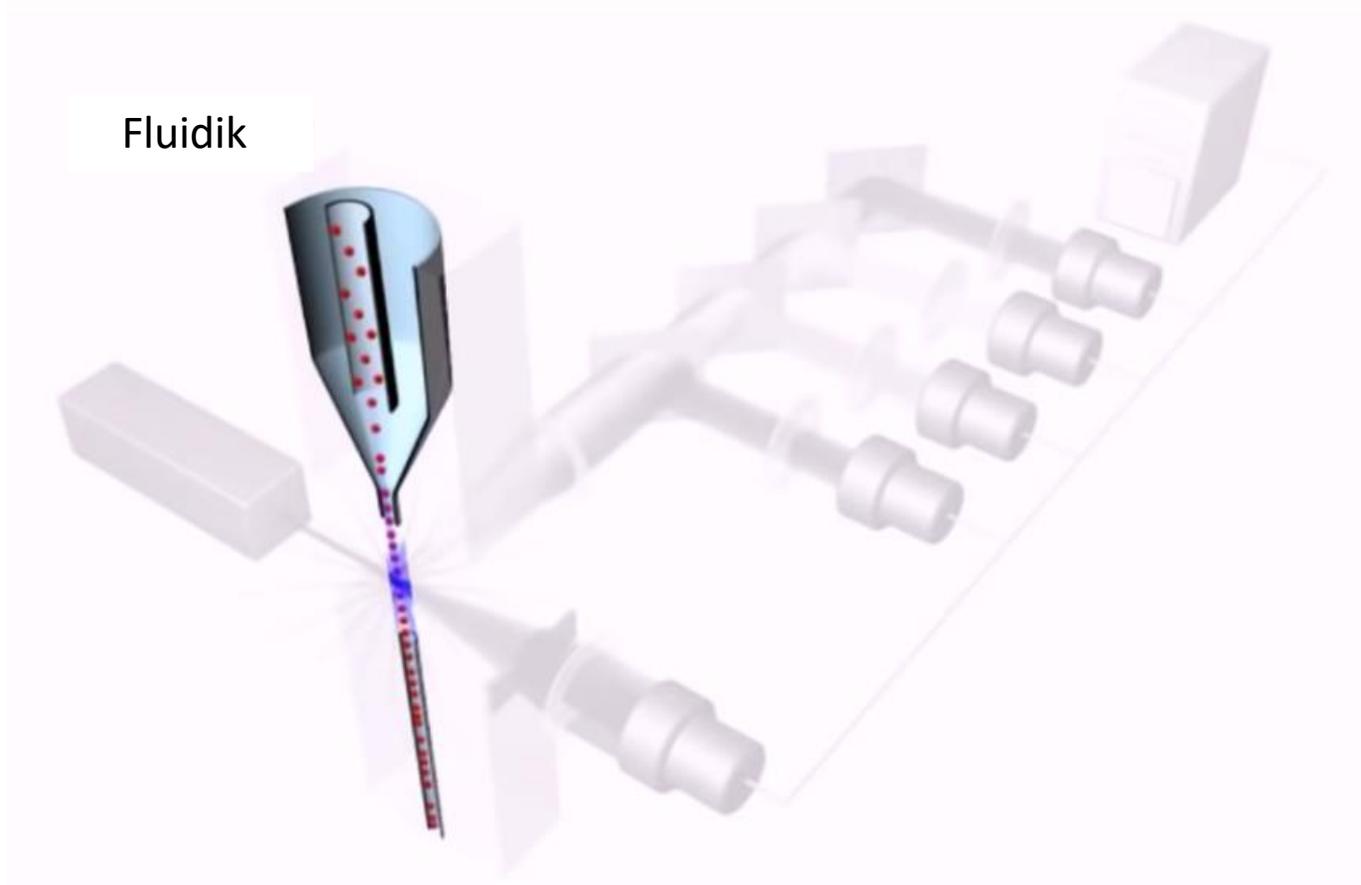
Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers



BD FACSCanto II

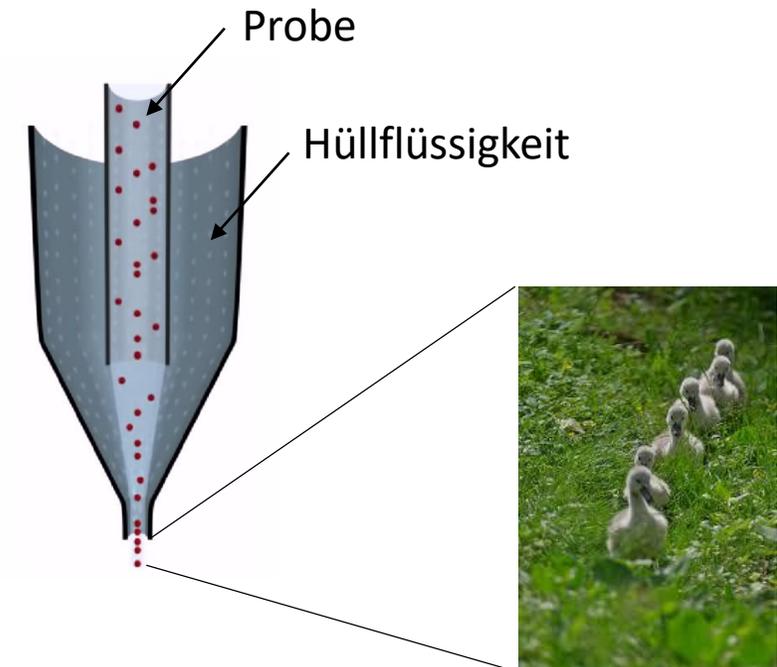


Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

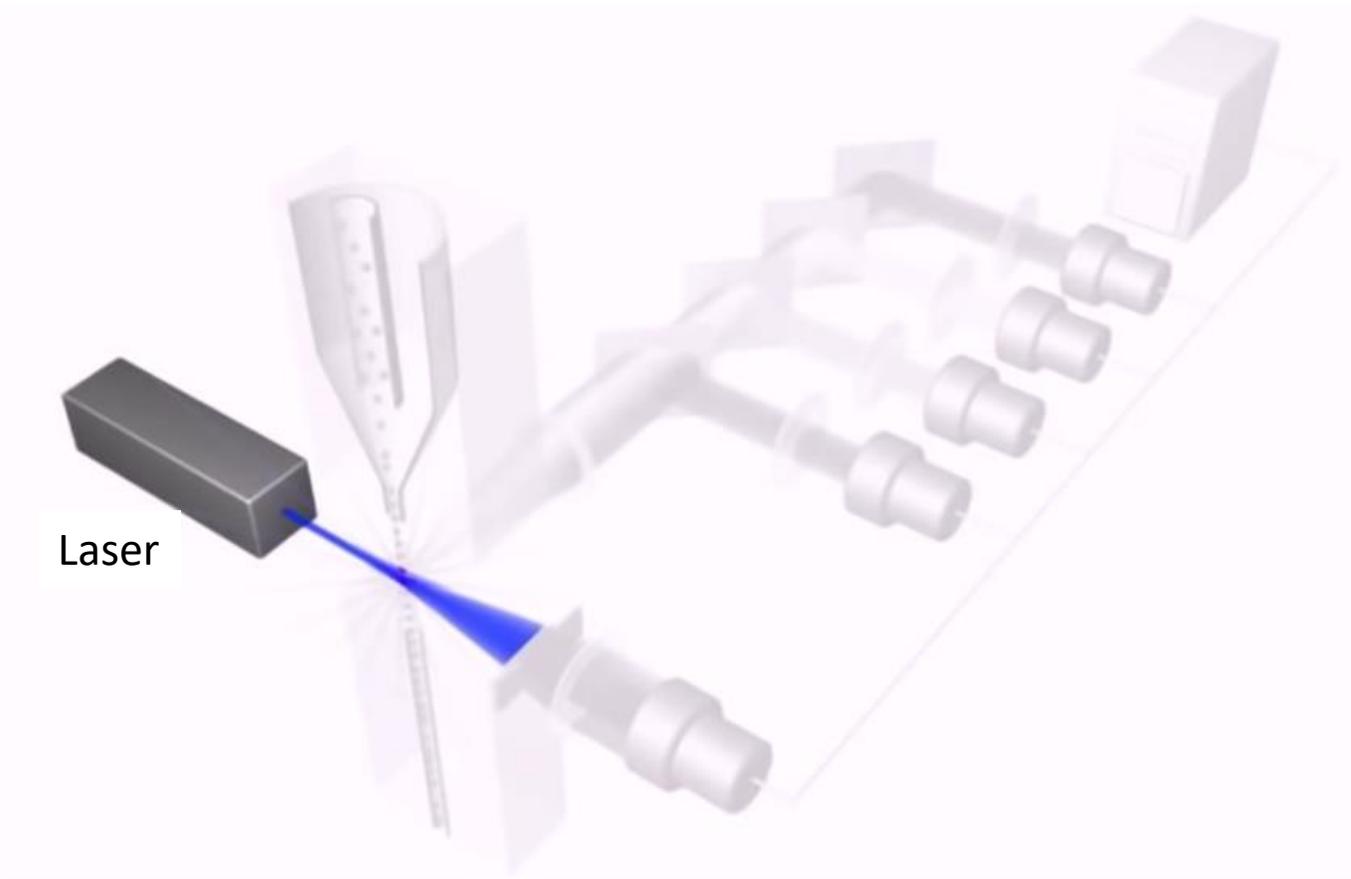


Hydrodynamische Fokussierung

- Probe: Zellsuspension im Puffer
- Hüllflüssigkeit koordiniert und schützt, vermischt sich nicht mit der Probe!
- laminare Strömung
- Zellen einzeln in einer Reihe geordnet



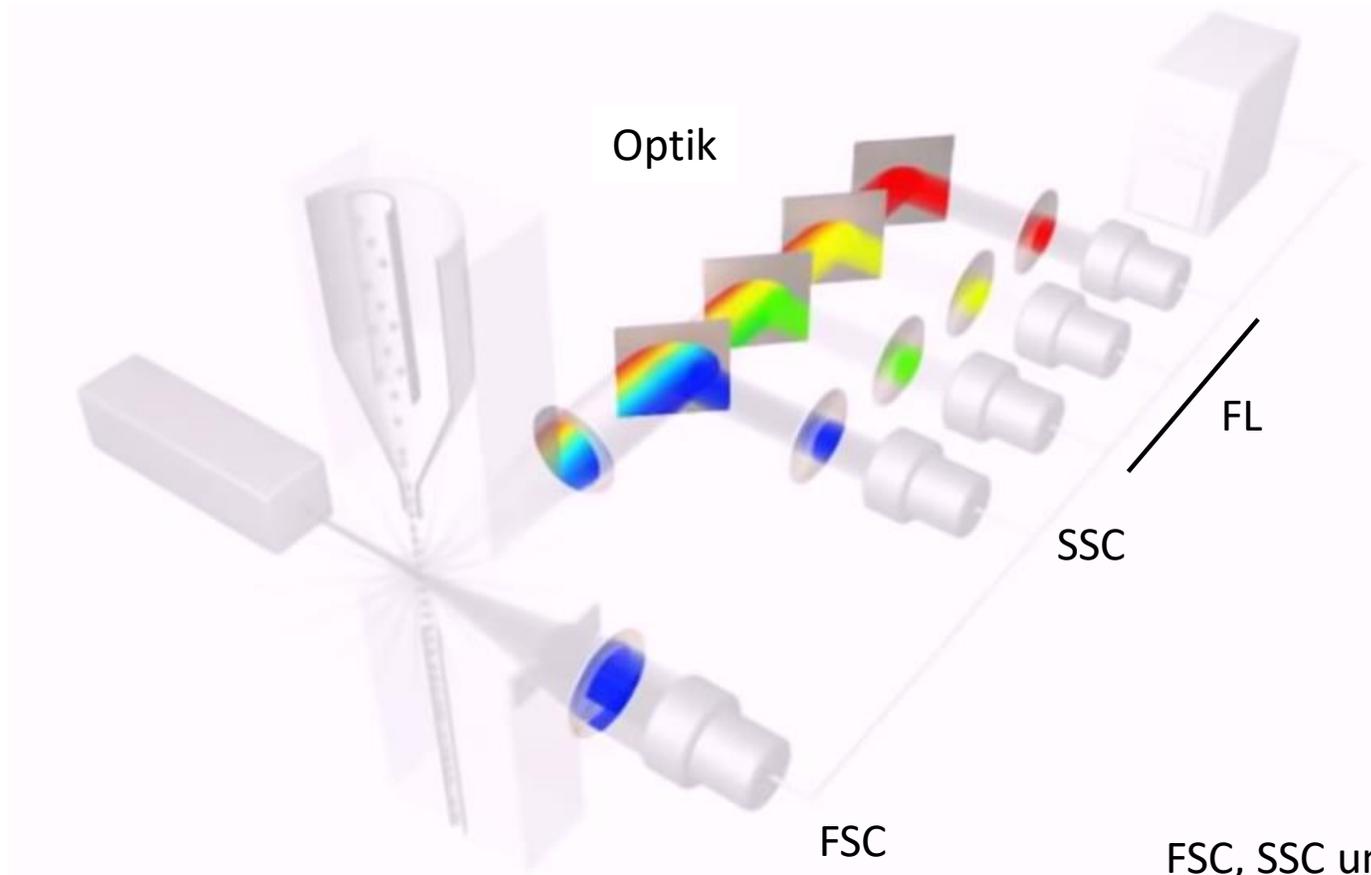
Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers



Probenbeleuchtung
Anregung zur Fluoreszenz

Wellenlänge [nm]	325/355	375	405/407	445/457	488	514-532	561	~592	633/640
Lichtqualität (Farbe)	UV	near-UV	violett	tiefblau	blau	grün	gelbgrün	orange	rot

Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

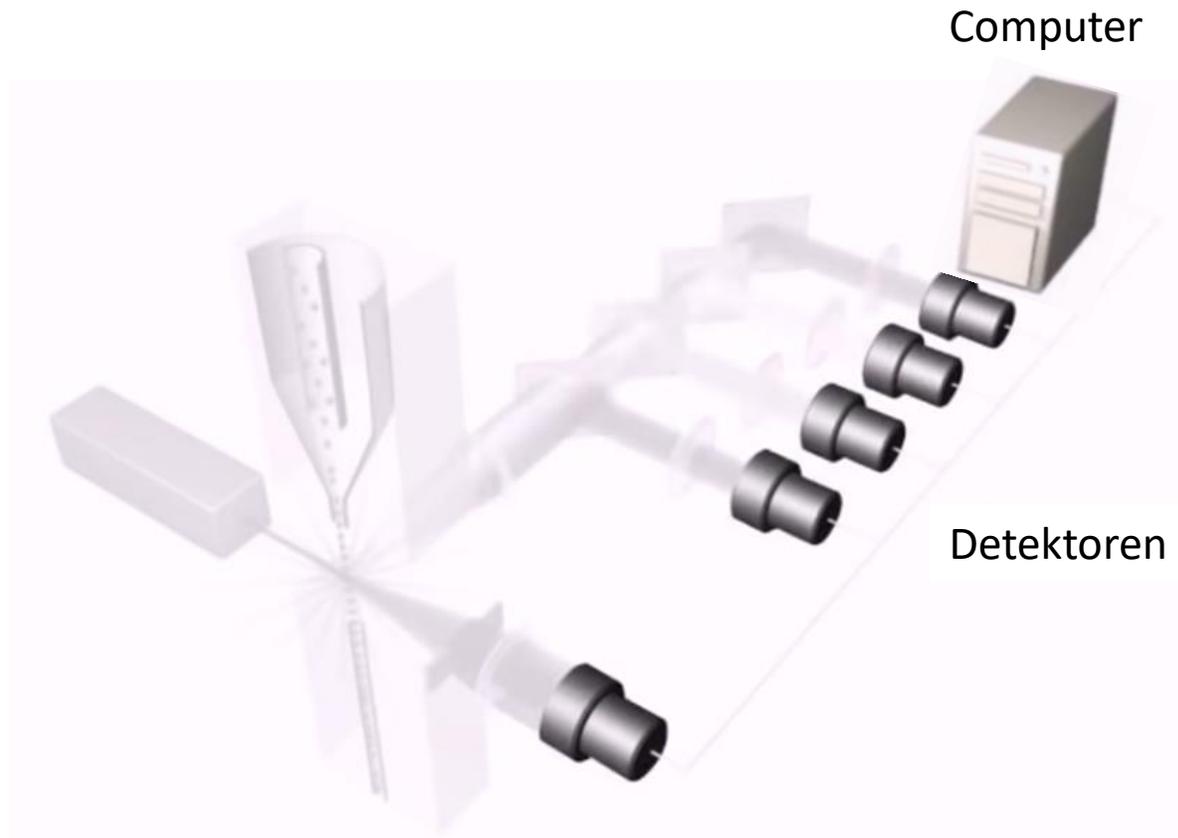


Linsen, Spiegel und Filter

- bündeln und fokussieren das Licht
- sammeln und trennen das gestreute Licht

FSC, SSC und FL sind die gemessenen Parameter

Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers



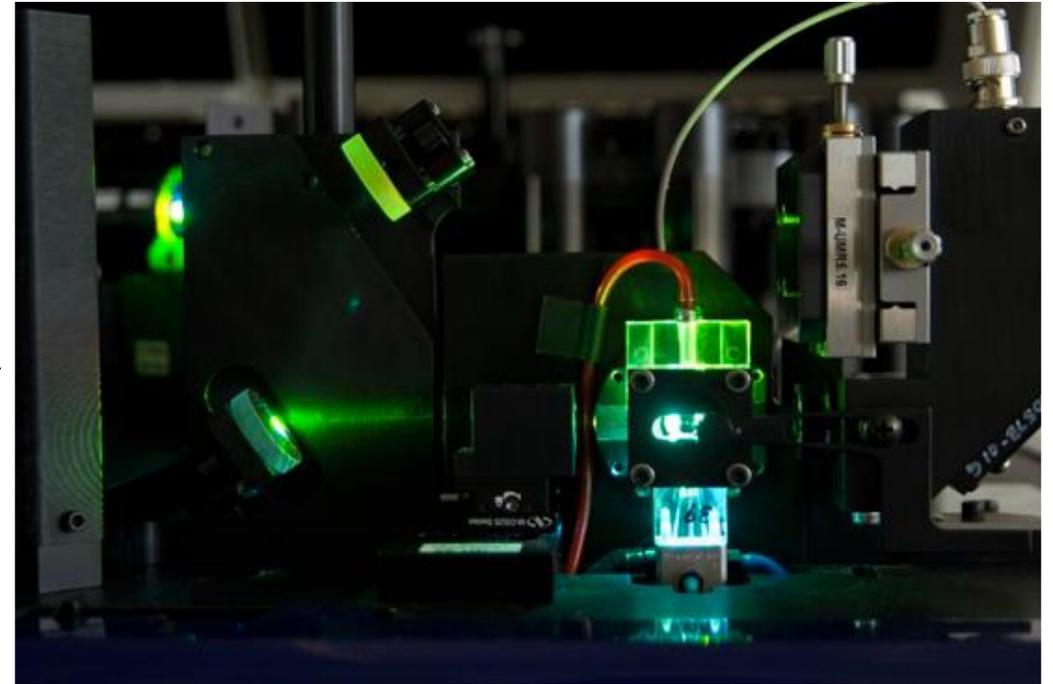
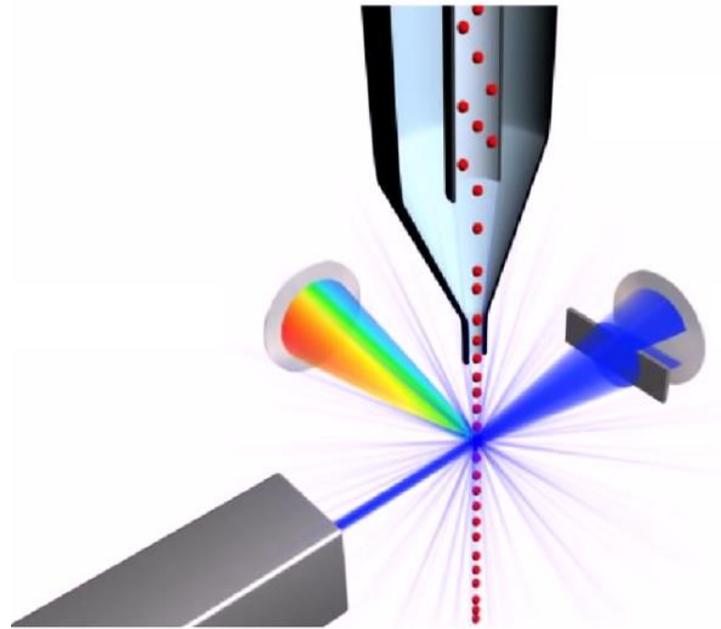
Computer

- Steuerung des Durchflusszytometers
- Datenspeicherung
- Analyse und graphische Darstellung

Detektoren

- Photodioden und Photoelektronvervielfachern
- optische Signale in digitalische Signale konvertieren
- elektronische Verstärkung

Messung



www.bdbiosciences.com

Probe: $10^5 - 10^6$ Zellen/ml

Flussrate: 30-60 $\mu\text{l}/\text{Min}$

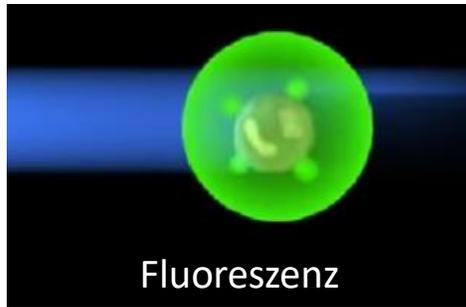
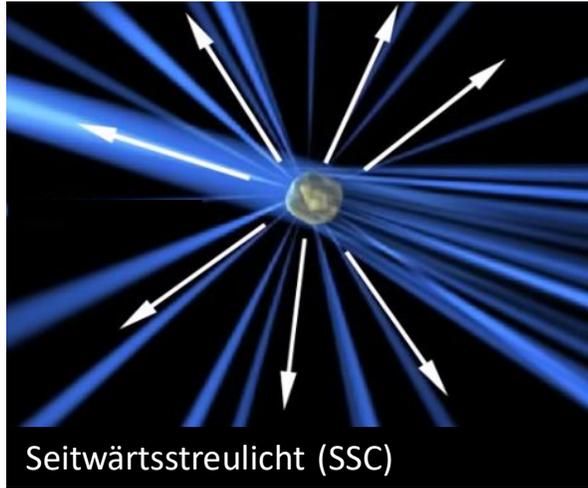
Zellen passieren einzeln den Laserstrahl

Beleuchtung und Detektion aller Parameter der Zelle

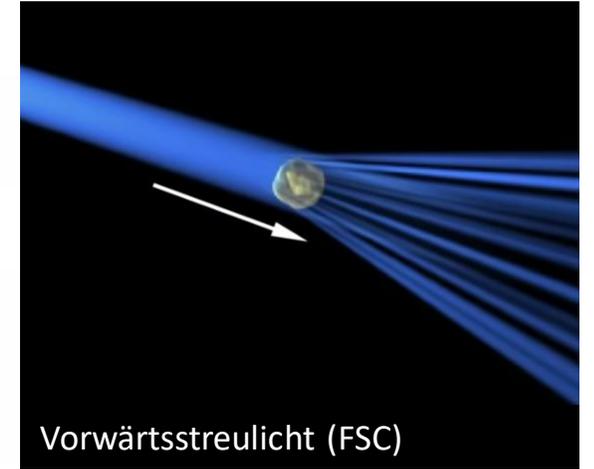
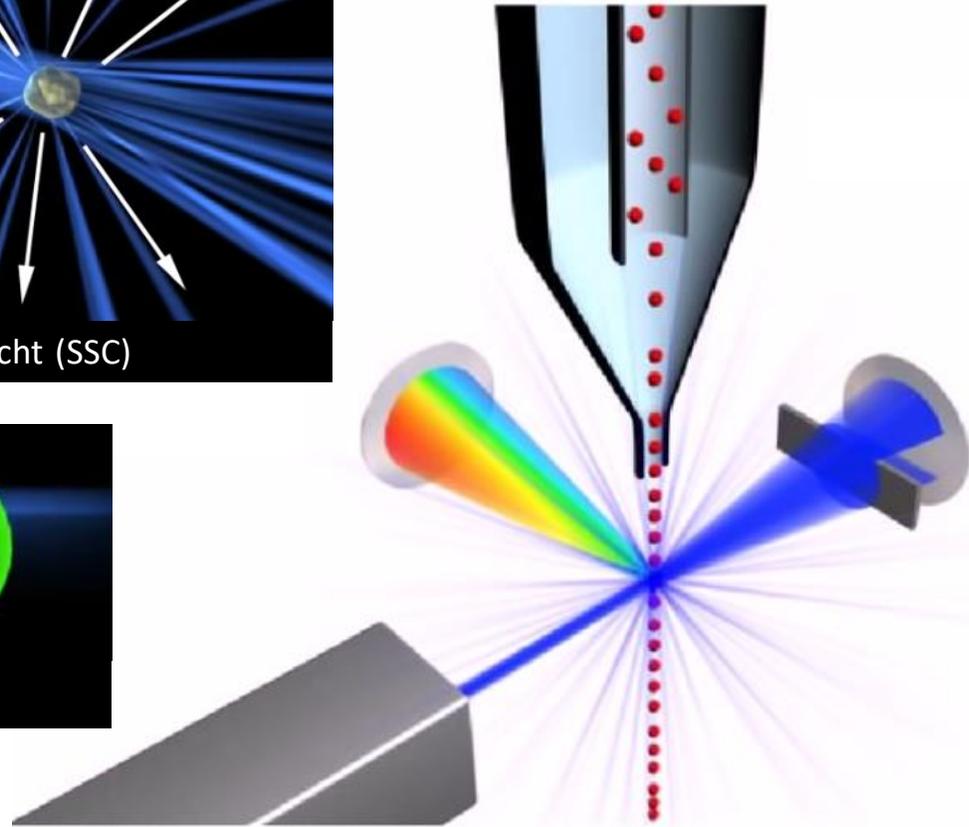
$\sim 10^3 - 10^4$ Zellen/Sekundum

20000 Zellen/Probe gemessen

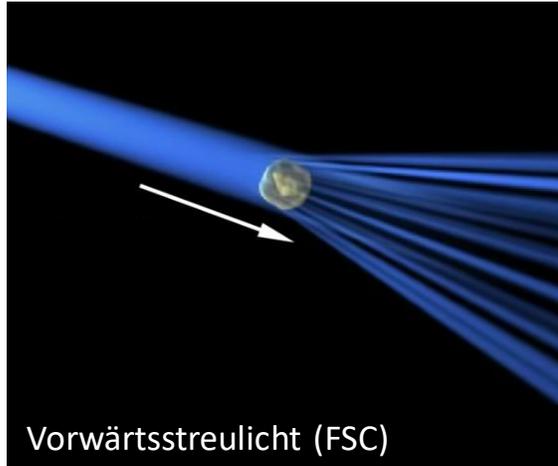
Parameter von Interesse



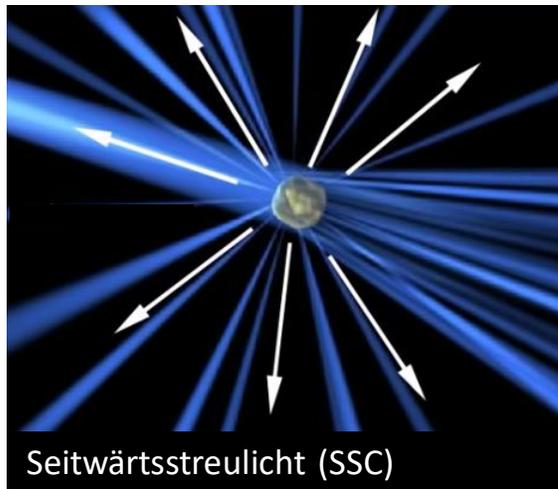
in 1-18 Kanälen



Parameter von Interesse

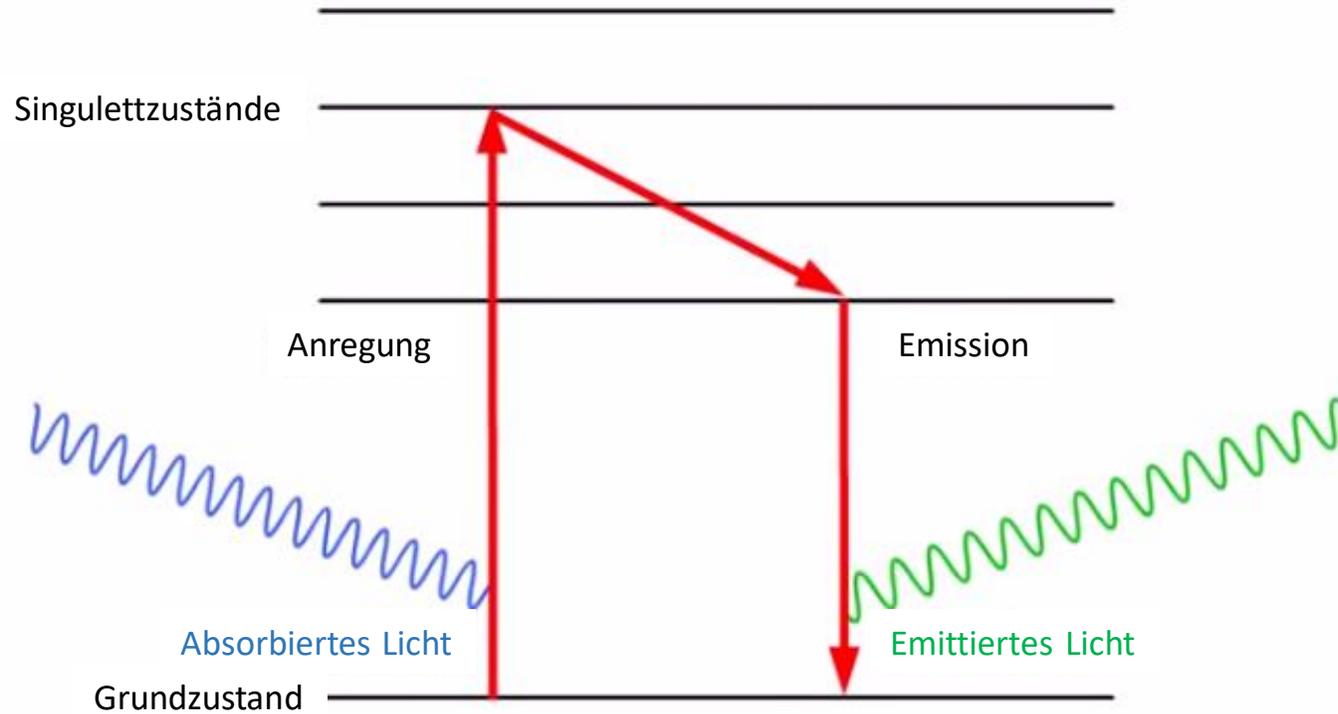
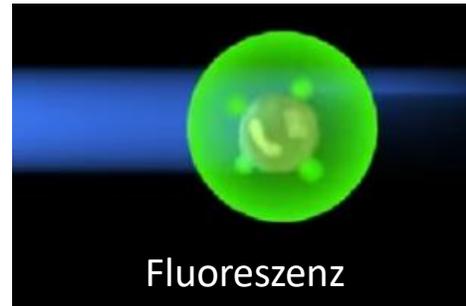


Vorwärtsstreulicht (forward scatter – FSC):
Lichtbeugung
proportional zur Grösse der Zelle
gemessen entlang der Achse des einfallenden Lichtes



Seitwärtsstreulicht (side scatter – SSC):
Lichtbrechung und Reflexion
proportional zur inneren Komplexität der Zelle, Granularität
gemessen in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht

Parameter von Interesse

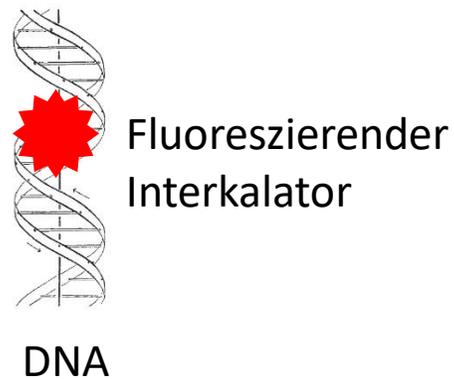
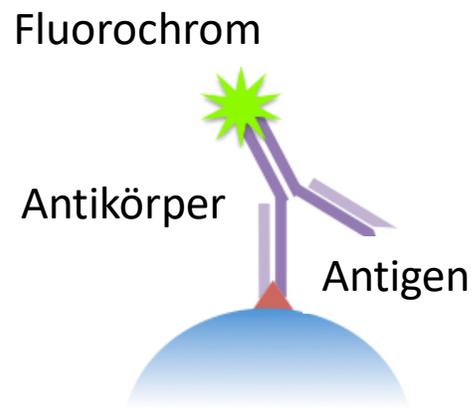


Quelle der Fluoreszenz

1. Autofluoreszenz

Aromatische Aminosäuren der Proteine in den Zellen, NADH...

2. Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, z. B. mit fluorochromgekoppelten Antikörpern



Fluoreszierende Proben zum Nachweis von

- pH
- intrazellulärer Ionen
- reaktiven Sauerstoffspezies
- Membranpotential
- Organellen
- Enzymaktivität
- ...

CD Antigene

- Cluster of Differentiation
- Oberflächenmoleküle (manche auch intrazellulär)
- Mehr als 300 CD Antigene
- Linienmarker, Differenzierungsmarker, Aktivationsmarker
- Immunphenotypisierung mit Antikörperkombinationen

www.hcdm.org

<https://www.immundefekt.de/immunologische-tabellen/cd-nomenklatur>

Antibody (CD)	Reactivity
CD1a	Thymocytes and immature T cells
CD2	T cells, Large granular lymphocytes (<u>LGL</u>), NK cells, some <u>APL</u> , neoplastic mast cells
CD3	T cells, primary effusion lymphoma
CD4	T cells (helper/inducer), monocytes, myeloblasts, NK cell lymphoma
CD5	T cells, <u>B-CLL/SLL</u> , <u>MCL</u>
CD7	T cells, some myeloblasts
CD8	T cells (suppressor/cytotoxic), large granular lymphocytes (<u>LGL</u>)
CD10	Follicle center cells, <u>FL</u> , some <u>DLBCL</u> , <u>pre-B-ALL</u> , <u>pre-T-ALL</u> , thymocytes, <u>BL</u>
CD11b	Granulocytes, monocytes
CD11c	Monocytes, <u>HCL</u> , <u>LGL</u> , activated T cells, <u>MZL</u>
CD13	Myeloid cells, rare <u>pre-B-ALL</u>
CD14	Monocytes
CD15	Granulocytes, Hodgkin's lymphoma
CD16	Granulocytes, NK cells, <u>LGL</u>
CD19	B cells, <u>pre B-ALL</u> , subset of <u>AML</u> (<u>AML1/ETO</u> with t(8;21))
CD20	B cells, rare plasma cell myelomas
CD22	B cells
CD23	<u>B-CLL/SLL</u> , plasma cells, follicular dendritic cells
CD25	<u>HCL</u> , subset of B and T cell lymphomas
CD30	Hodgkin's lymphoma, anaplastic large cell lymphoma, subset of <u>DLBCL</u> , subset of B cell lymphoma
CD33	Myeloid cells, rare <u>pre B-ALL</u> , rare blastic NK lymphoma
CD34	myeloblasts, lymphoblasts, endothelial cells
CD38	Plasma cells, activated T and B cells, subset <u>B-CLL/SLL</u> , epithelial cells
CD41	Megakaryocytes
CD43	Myeloid cells, T-cell lymphoma, <u>pre B ALL</u> , <u>pre T ALL</u> , B cell lymphoma (subset), plasma cells
CD56	NK cells, <u>LGL</u>
CD57	NK cells, <u>LGL</u>
CD61	Megakaryocytes
CD79a	B cells, plasma cells, megakaryocytes
CD103	<u>HCL</u> , rare T cell lymphomas
CD117	<u>AML</u> , mast cells, stromal tumors (<u>GIST</u>), plasma cells
bcl-2	Mature B cells, (except benign <u>GCC</u>), T cells, and <u>FL</u>
Heavy Chains (IgG, IgA, IgM, IgD)	B cells, plasma cells, <u>DLBCL</u> with ALK expression
HLA Dr	<u>AML</u> (except <u>APL</u>), B cells monocytes
Light chains (kappa or lambda)	B cells (surface), plasma cells (cytoplasmic)
TdT	<u>pre-B-ALL</u> , <u>pre-T-ALL</u> , some <u>AML</u> and hematogones

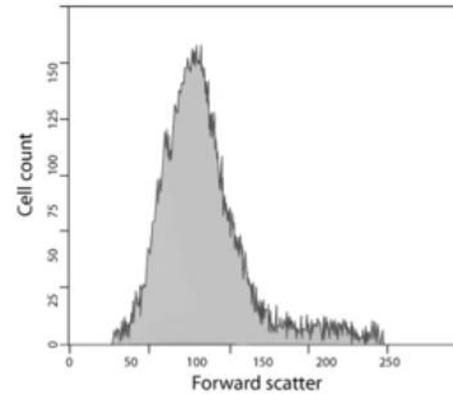
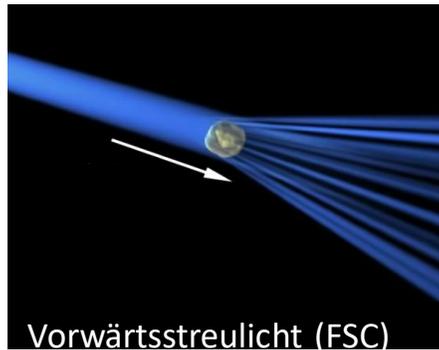
<http://wiki.clinicalflow.com/cluster-differentiation-cd-markers>

Darstellung der Daten

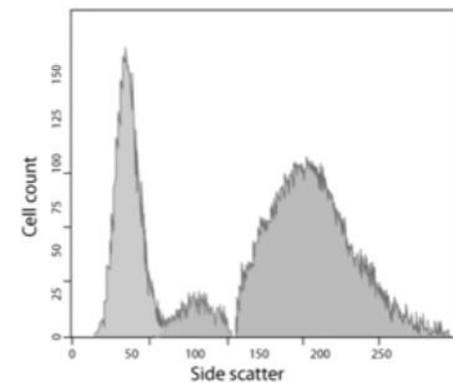
Histogramm: Häufigkeitsverteilung eines Parameters

x-Achse: Intensität der gemessenen Signale

y-Achse: Zahl der Zellen, die eine bestimmte Intensität zeigen



Verteilung der Zellgrösse

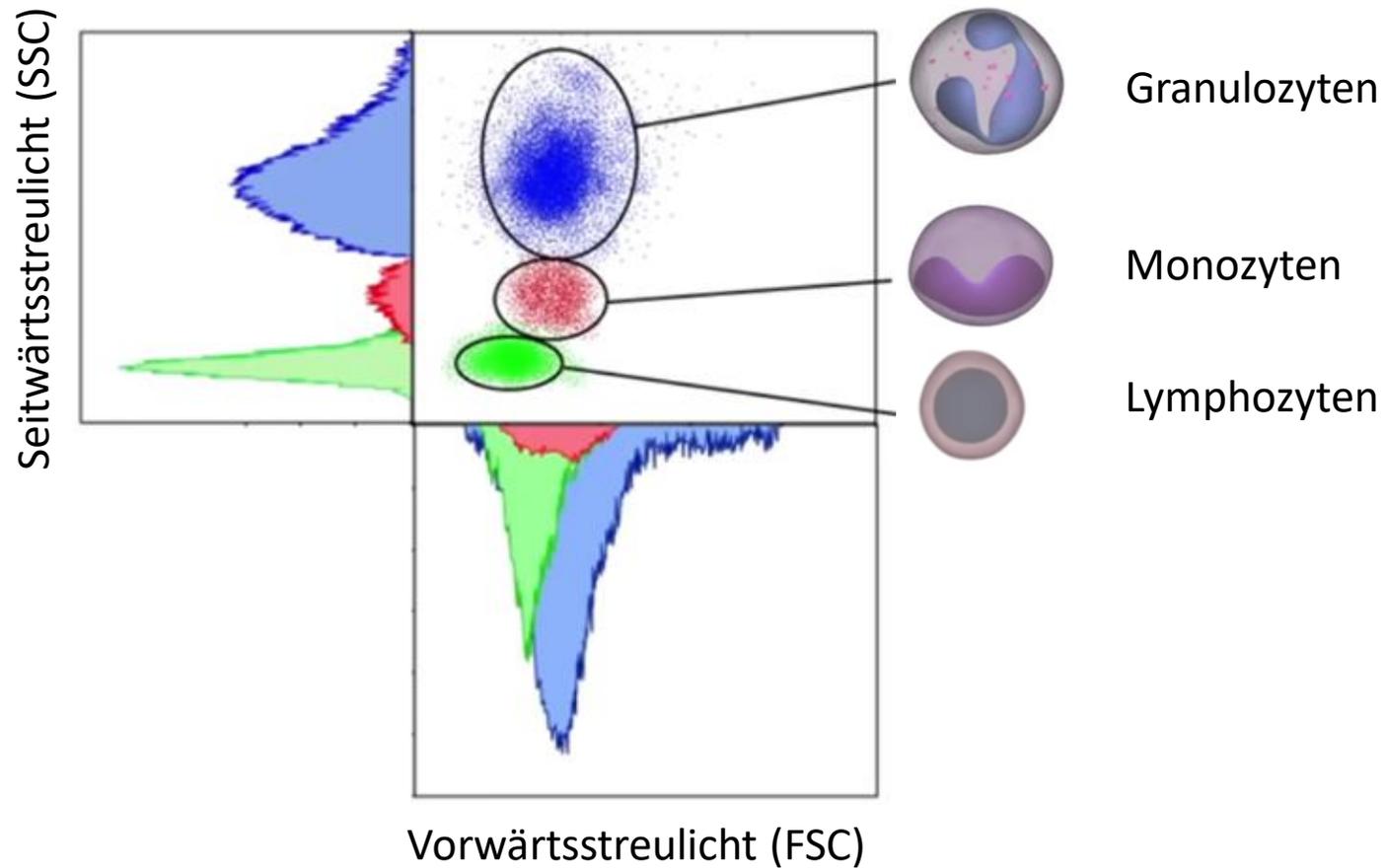


Verteilung der Granularität

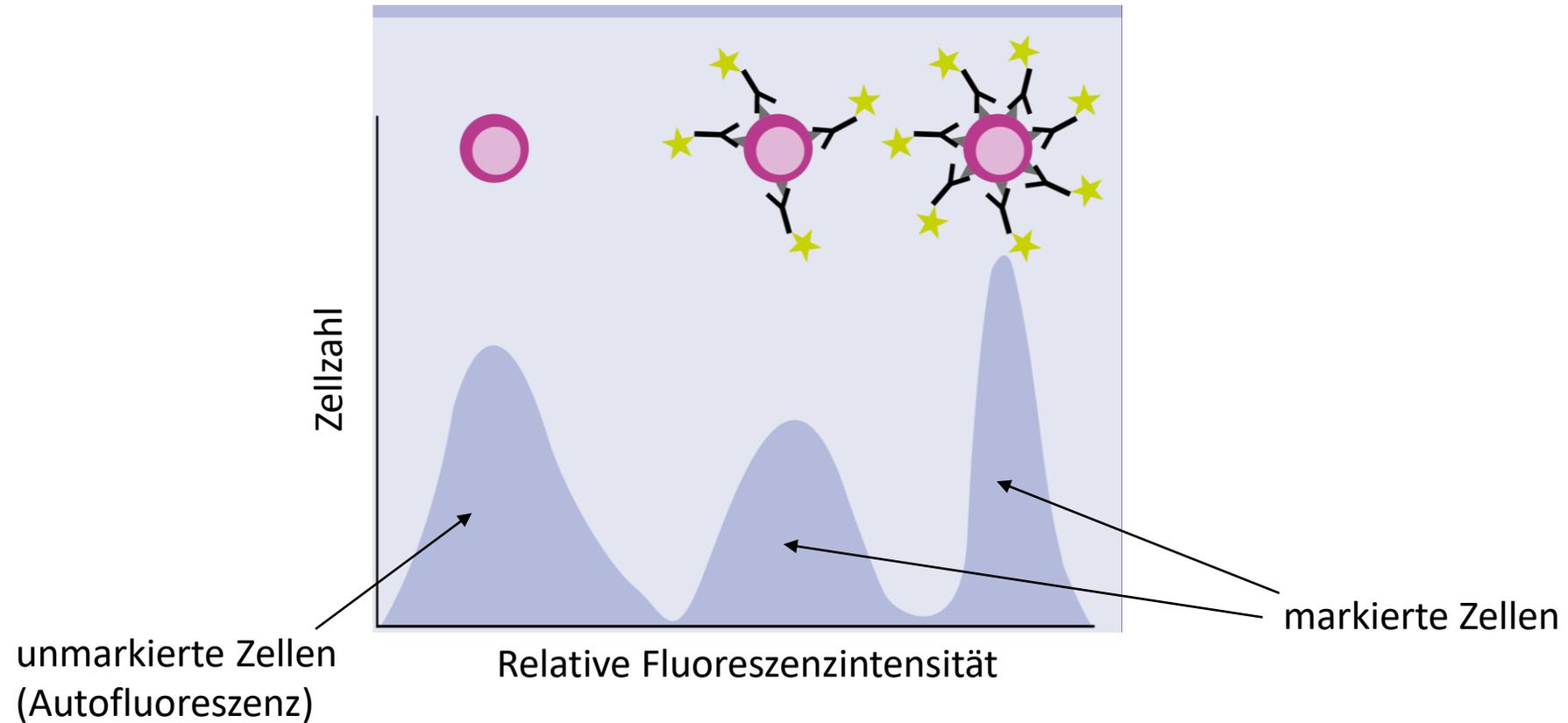
Darstellung der Daten

Punktwolkendiagramm („Dot-Plot“): Zweiparameterdarstellung
x- und y-Achse zeigen jeweils die Intensitätsverteilung von zwei Messparametern

Beispiel: Blut nach Lyse der Erythrozyten

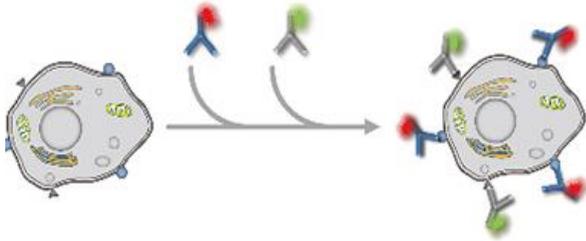


Darstellung der Daten – Fluoreszenz



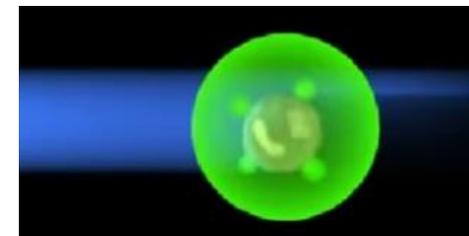
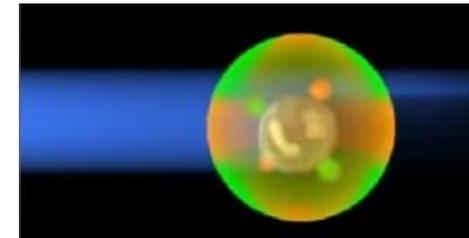
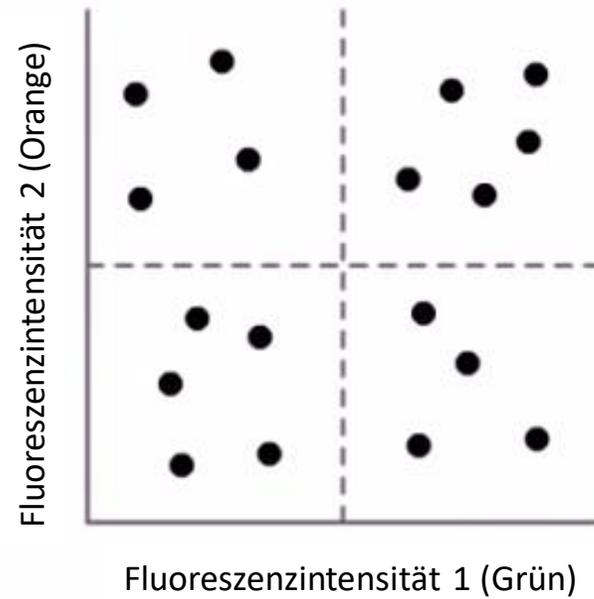
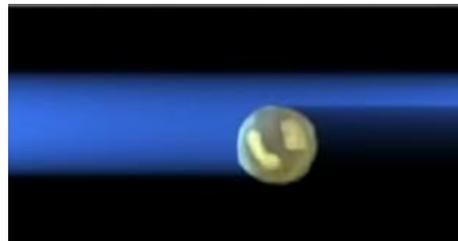
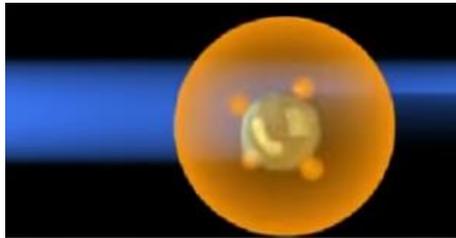
Das emittierte Licht ist proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle.

Darstellung der Daten – Fluoreszenz

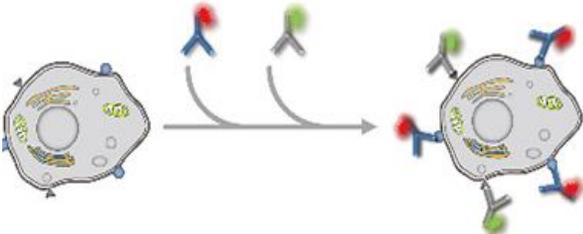


Markeirung mit mehreren Antikörpern / Farbstoffen

Punktwolkendiagramm: Zweiparameterdarstellung

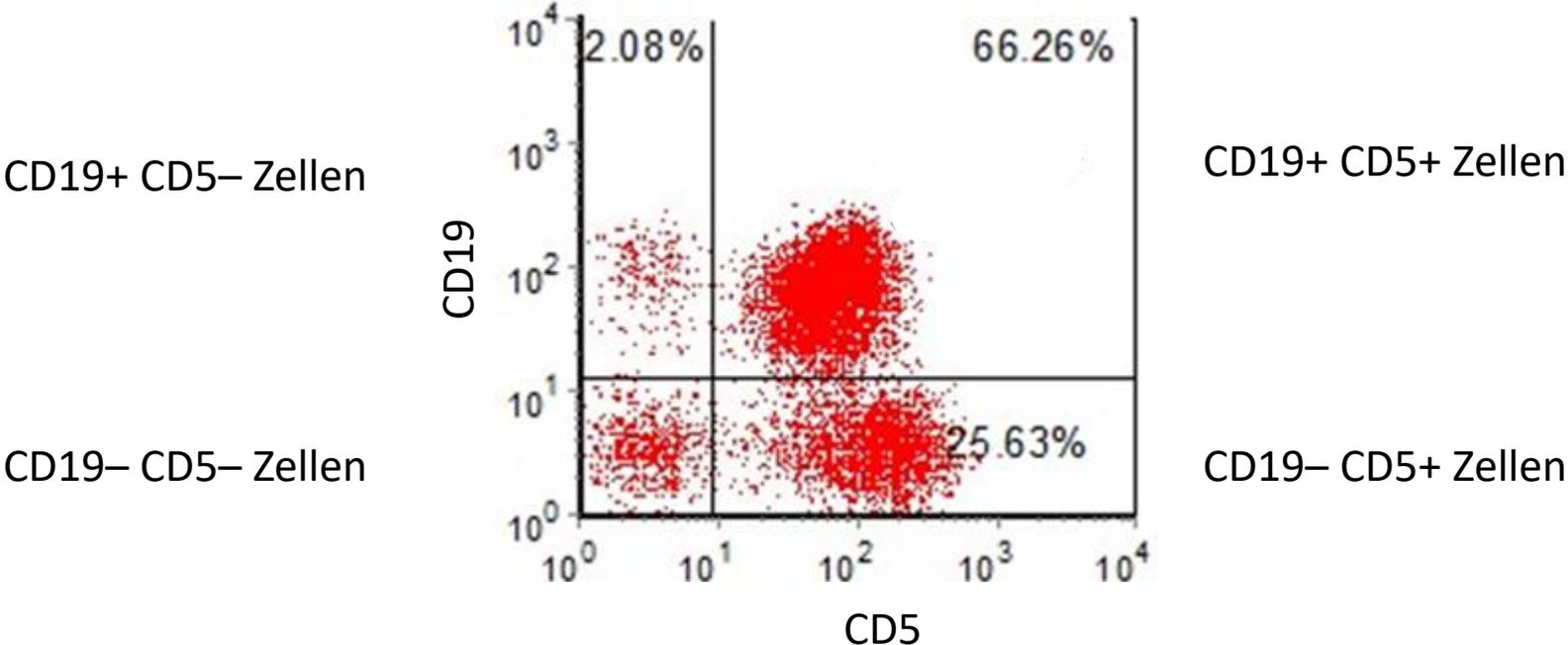


Darstellung der Daten – Fluoreszenz



Markeirung mit mehreren Antikörpern / Farbstoffen

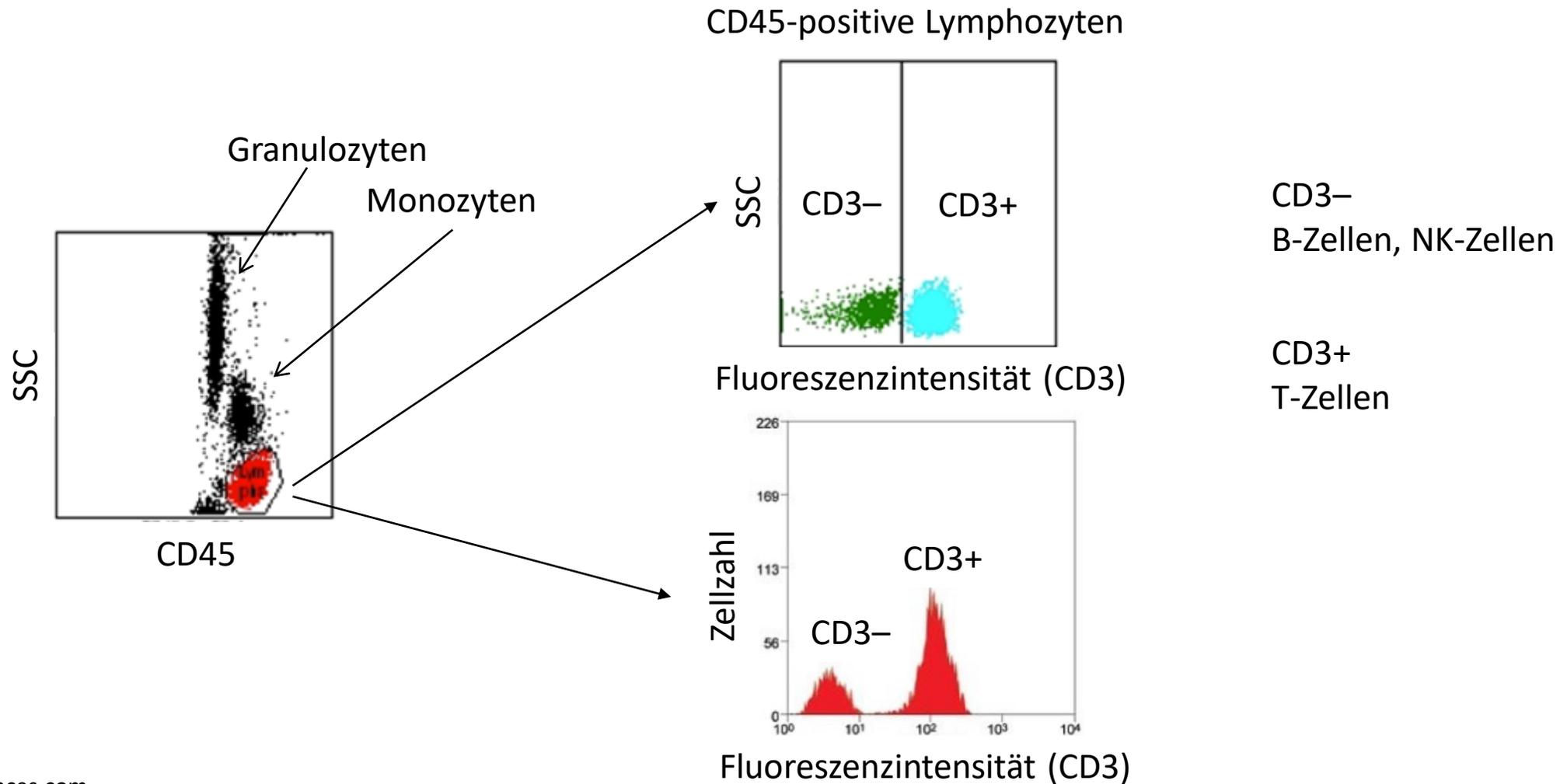
Lymphozytenverteilung in chronischer lymphatischer Leukämie (CLL)



Darstellung der Daten – Analyse von Subpopulationen

„Gating“: erlaubt eine Eingrenzung von Populationen

„Gate“ – Eine Region, die zur Auswahl von Zellen in einer erneuten Darstellung dient



Für die Messung geeignete Proben

Partikel / Zellen in Suspension (~300 nm – 100 µm)

- antikoaguliertes Blut (Heparin, EDTA)
- Punktatflüssigkeiten, z.B.:
 - Knochenmark
 - Liquor
 - Bronchoalveoläre Lavage
 - Gelenkflüssigkeit
- Nabelschnurblut
- Blutpräparat
- Gewebe nach Vereinzelnung der Zellen
- Gameten (Ejakulat)
- Beads (Latexpartikel) zur Quantifizierung
- Mikroorganismen (Bakterien, Pilzsporen, Protozoa)
- Exosomen, Mikrovesikel
- Chromosomen
- ...

Beispiel: Phänotypisierung immunologischer Tumoren

Die Immunphänotypisierung ist im Rahmen der hämatologischen Diagnostik neben der Zytologie und Histologie heute die am häufigsten angewandte Methode.

Immunphänotyp	Klinisches Beispiel
pathologische Zunahme von Subpopulationen	verschobenes Verhältnis der κ/λ -Leichtketten-expression bei reifen B-Zell-Lymphomen
fehlende Markerexpression	Verlust des T-Zellmarkers CD3 bei vielen T-Zell-Neoplasien
aberrante Markerexpression	Expression des B-Zellmarkers CD19 auf myeloischen Zellen
asynchrone Markerexpression	gleichzeitige Expression des Progenitor-markers CD34 und des Reifemarkers CD20 bei manchen ALL-Formen
quantitativ veränderte Markerexpression	überhöhte Expression von CD33 bei manchen AML-Formen
ALL = Akute Lymphatische Leukämie, AML = Akute Myeloische Leukämie, CD = „cluster of differentiation“	

Beispiel: Phänotypisierung immunologischer Tumoren

Die Immunphänotypisierung ist im Rahmen der hämatologischen Diagnostik neben der Zytologie und Histologie heute die am häufigsten angewandte Methode.

Basis Antikörperpanel für inizielle Charakterisierung hämatologischer Neoplasien

Linie	Primäre Zielmoleküle
B-Zellen	CD5, CD10, CD19, CD20, CD45, Kappa, Lambda
T-Zellen und NK-Zellen	CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD45, CD56
Myelomonozytische Zellen	CD7, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, HLA-DR
Myelomonozytische Zellen (limitiert)	CD13, CD33, CD34, CD45
Plasmazellen	CD13, CD33, CD34, CD45, CD19, CD38, CD45, CD56

Indikationen zur Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie (DFZ)

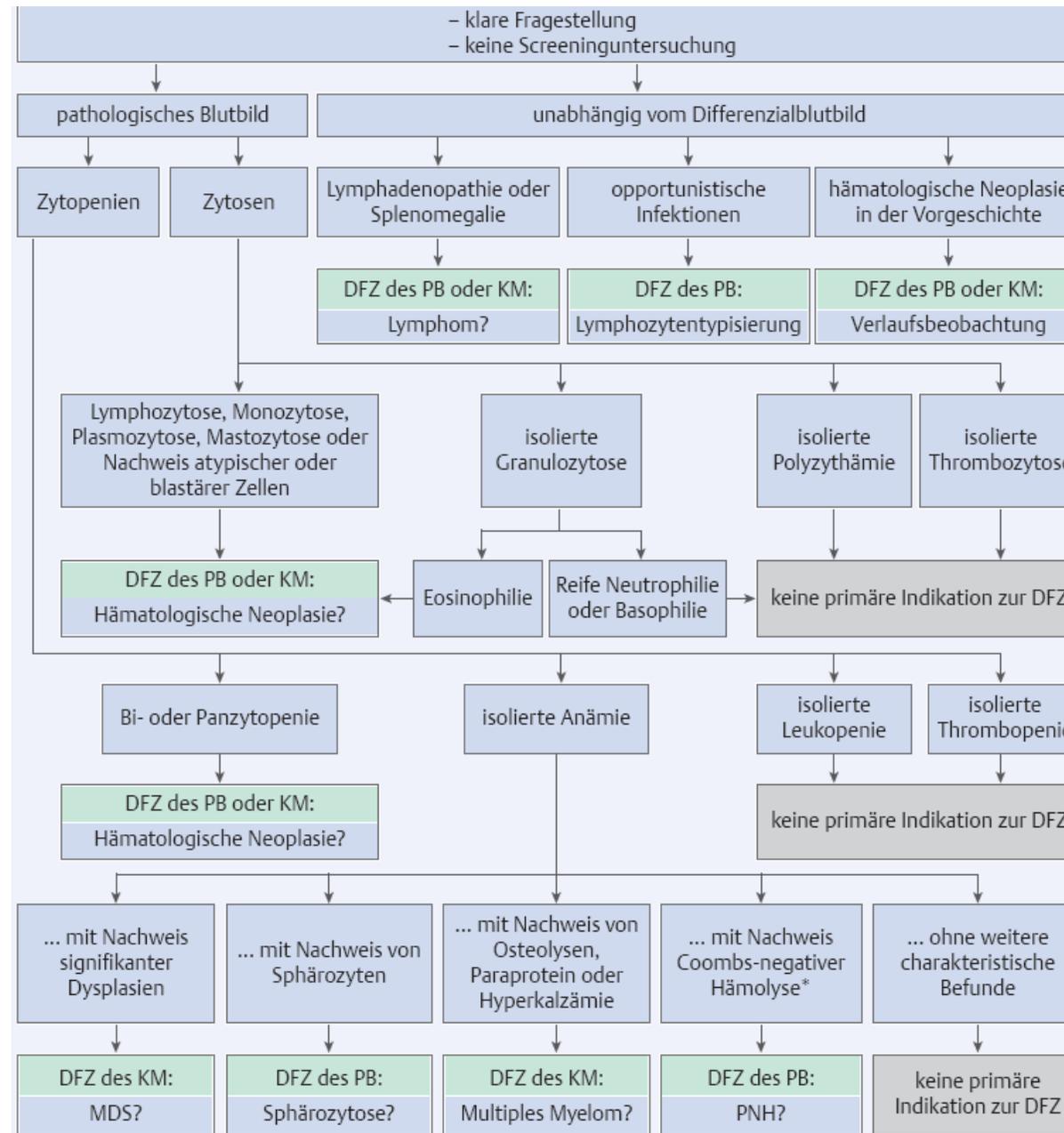


Abb. 2 Indikationsstellung zur diagnostischen Immunphänotypisierung (DFZ = Durchflusszytometrie, KM = Knochenmark, MDS = Myelodysplastisches Syndrom, PB = peripheres Blut, PNH = Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie). *Häufig liegt hier auch eine Bi- oder Panzytopenie vor.

Indikationen zur Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie (DFZ)

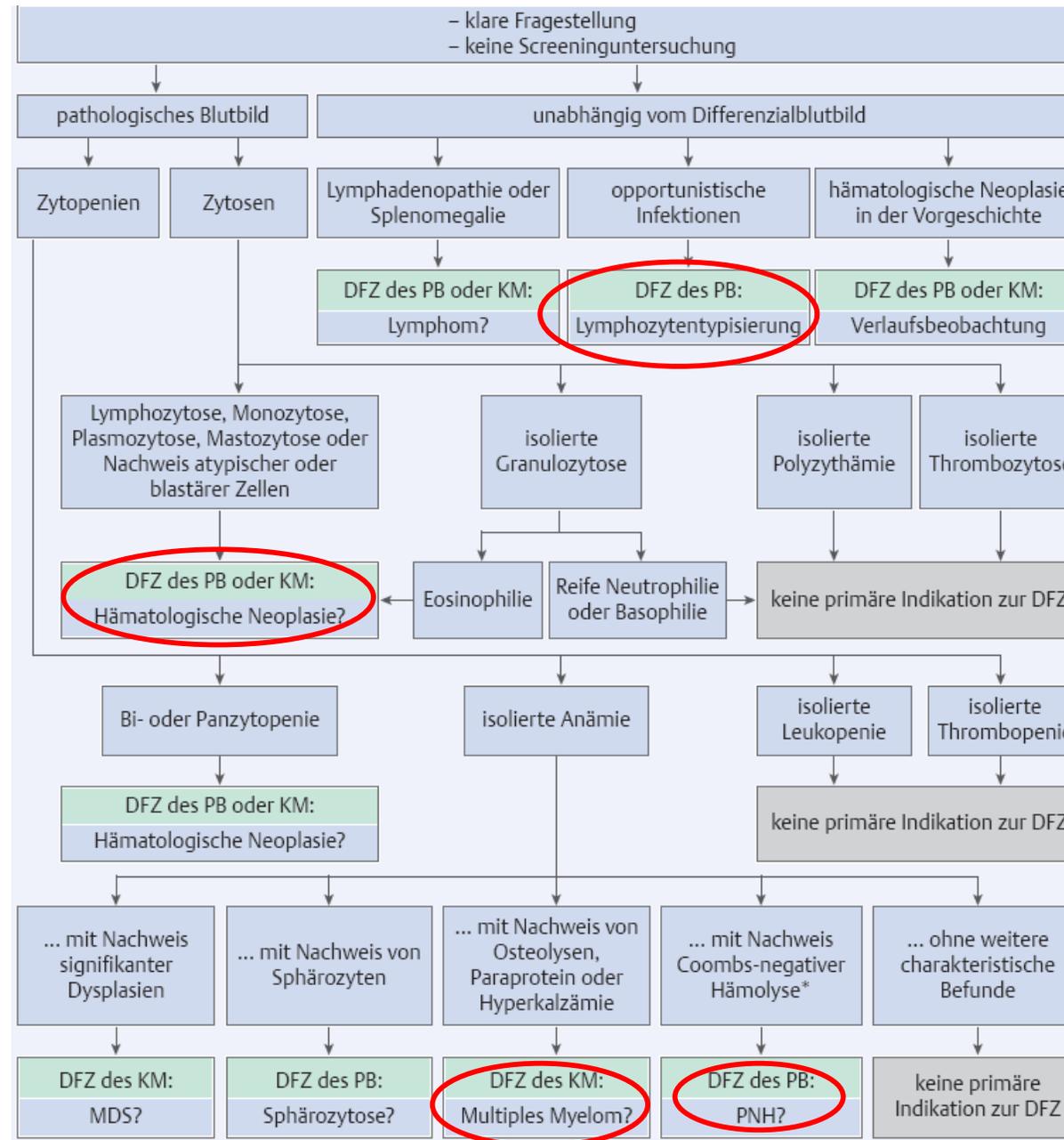
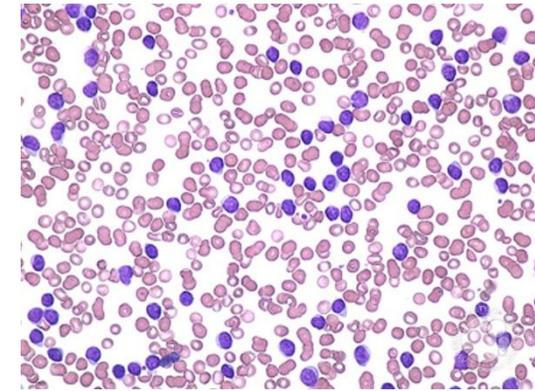


Abb. 2 Indikationsstellung zur diagnostischen Immunphänotypisierung (DFZ = Durchflusszytometrie, KM = Knochenmark, MDS = Myelodysplastisches Syndrom, PB = peripheres Blut, PNH = Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie). *Häufig liegt hier auch eine Bi- oder Panzytopenie vor.

Beispiel: chronische lymphatische Leukämie (CLL)

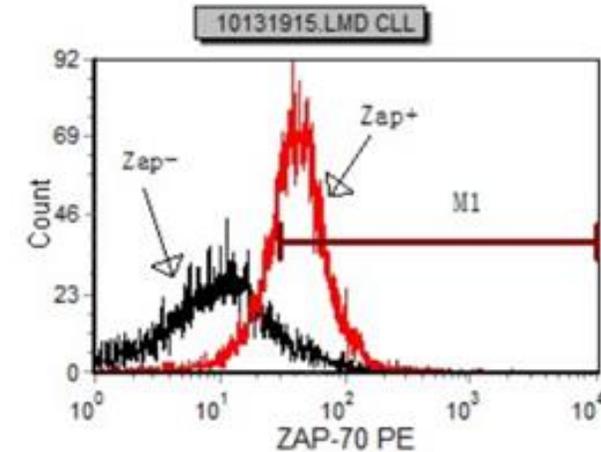
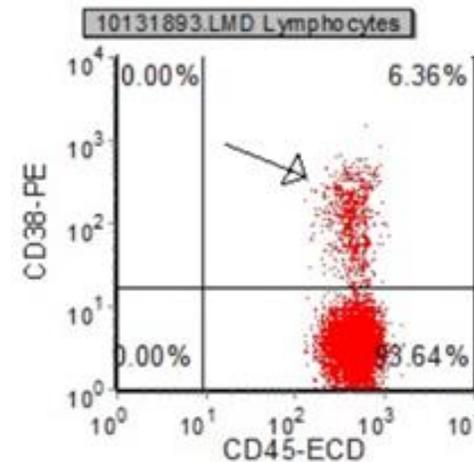
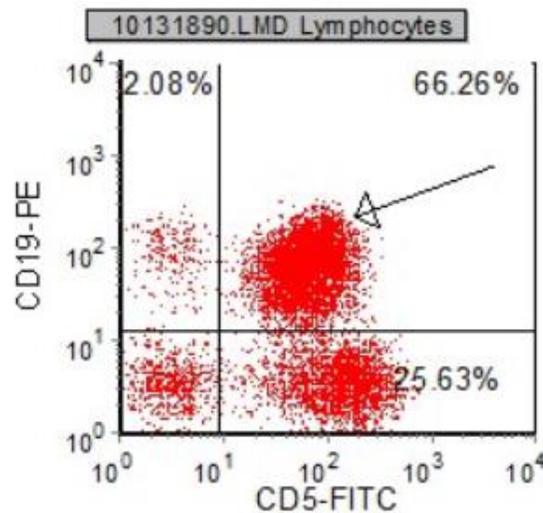
- häufigste leukämische Erkrankung in den westlichen Industrieländern
- niedrig-malignes B-Zell-Lymphom mit leukozyterer Leukozytose
- höheres Lebensalter
- Müdigkeit, Lymphknotenschwellung, Schwäche, Infektanfälligkeit
- Anämie, Thrombozytopenie, Granulozytopenie



American Society for Hematology – P. Maslak

$CD20^{low}CD19^{+}CD5^{+}CD23^{+}sIg^{low}$

Prognostische Faktoren: CD38, Zap70

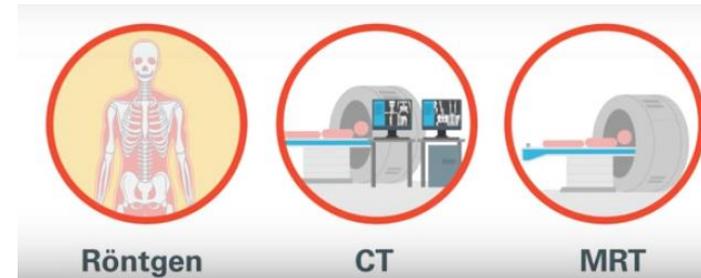
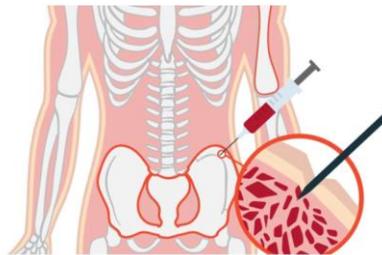
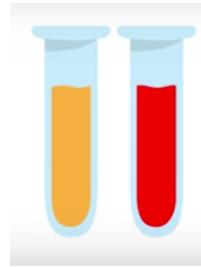


Beispiel: multiples Myelom

- malignes B-Zell-Lymphom
- monoklonale Vermehrung von Plasmazellen im Knochenmark
- vermehrte Produktion kompletter oder inkompletter monoklonaler Immunglobuline (Paraprotein / M-Protein)

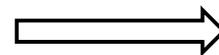
Diagnostik:

- Labor – Urin- und Blutuntersuchungen
- bildgebende Verfahren
- Knochenmarkuntersuchungen



Takeda Oncology

↓
Endorganschäden (CRAB-Kriterien)
>10% Klonale Plasmazellen im Knochenmark
Monoklonales Protein im Serum oder Urin

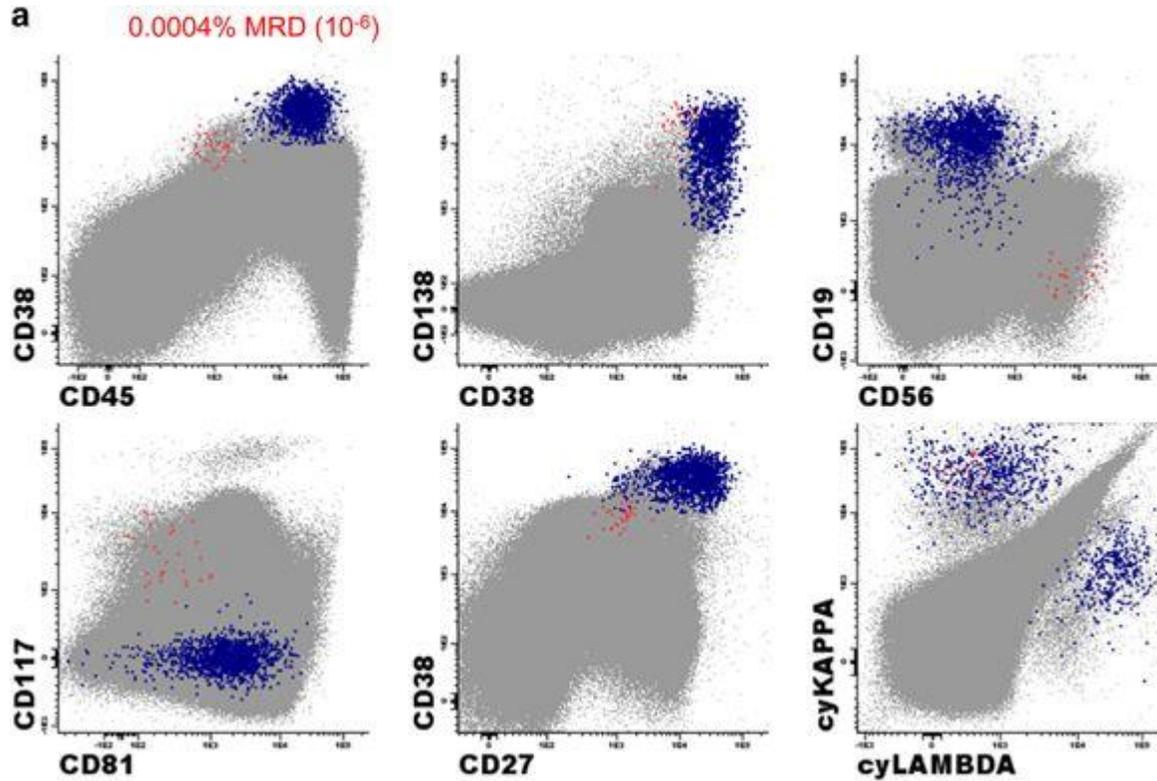


Abgrenzung verwandter Erkrankungen:
Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
Schwelendes Myelom
Multiples Myelom
Solitäres Plasmozytom
Plasmazell-Leukämie

Beispiel: multiples Myelom – Verlaufsbeobachtung



Plasmazellen im Knochenmark



Sensitivität von 10^4 – 10^6 als minimale Resterkrankung

Molekularbiologische Methoden - allelspezifische PCR und NGS

- sensitiver
- teurer
- diagnostische Probe vom Patienten muss vorhanden sein
- nicht etabliert in Routinelaboratorien

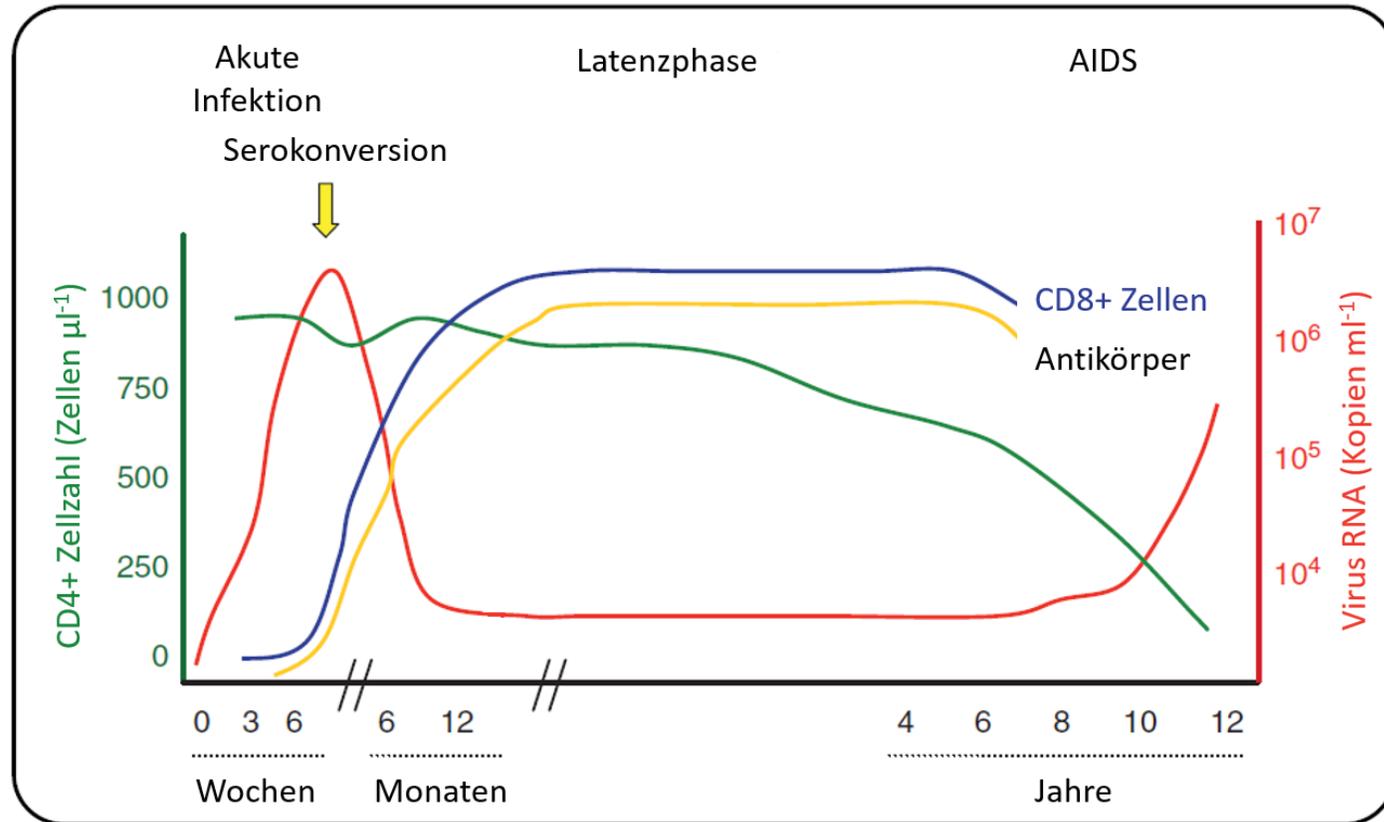
abnormale Plasmazellen → $CD45^-/CD38^{dim}/CD19^-/CD56^+/CD27^-/CD81^-/CD117^+/cyKappa^+$

normale Plasmazellen

andere Knochenmarkzellen

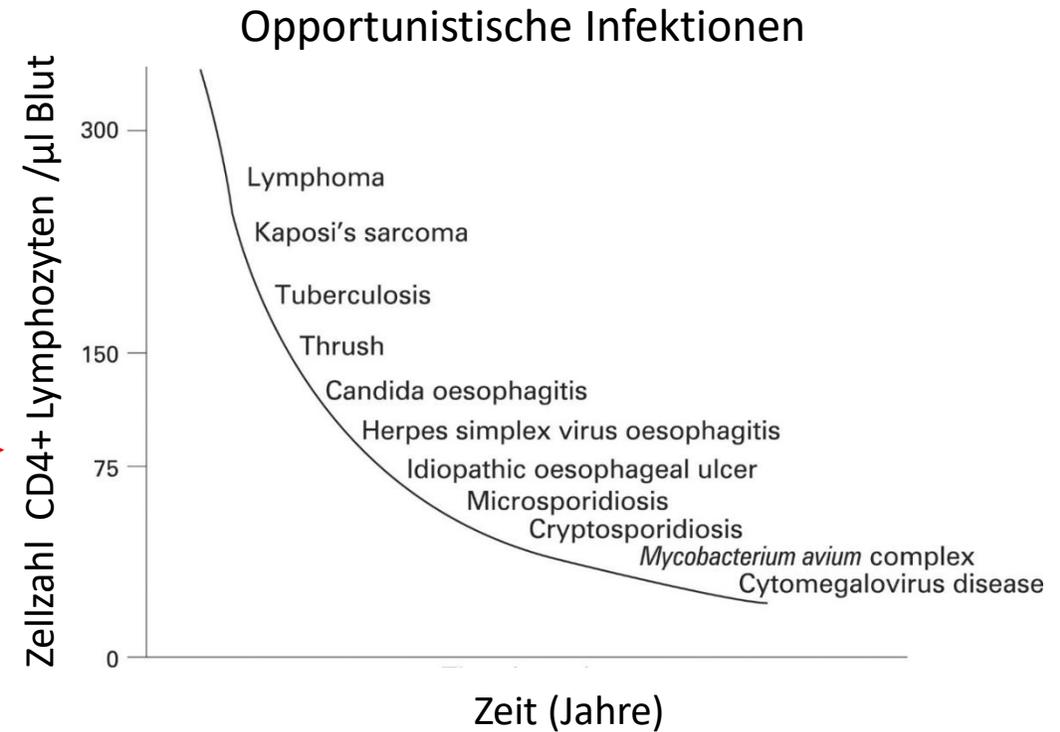
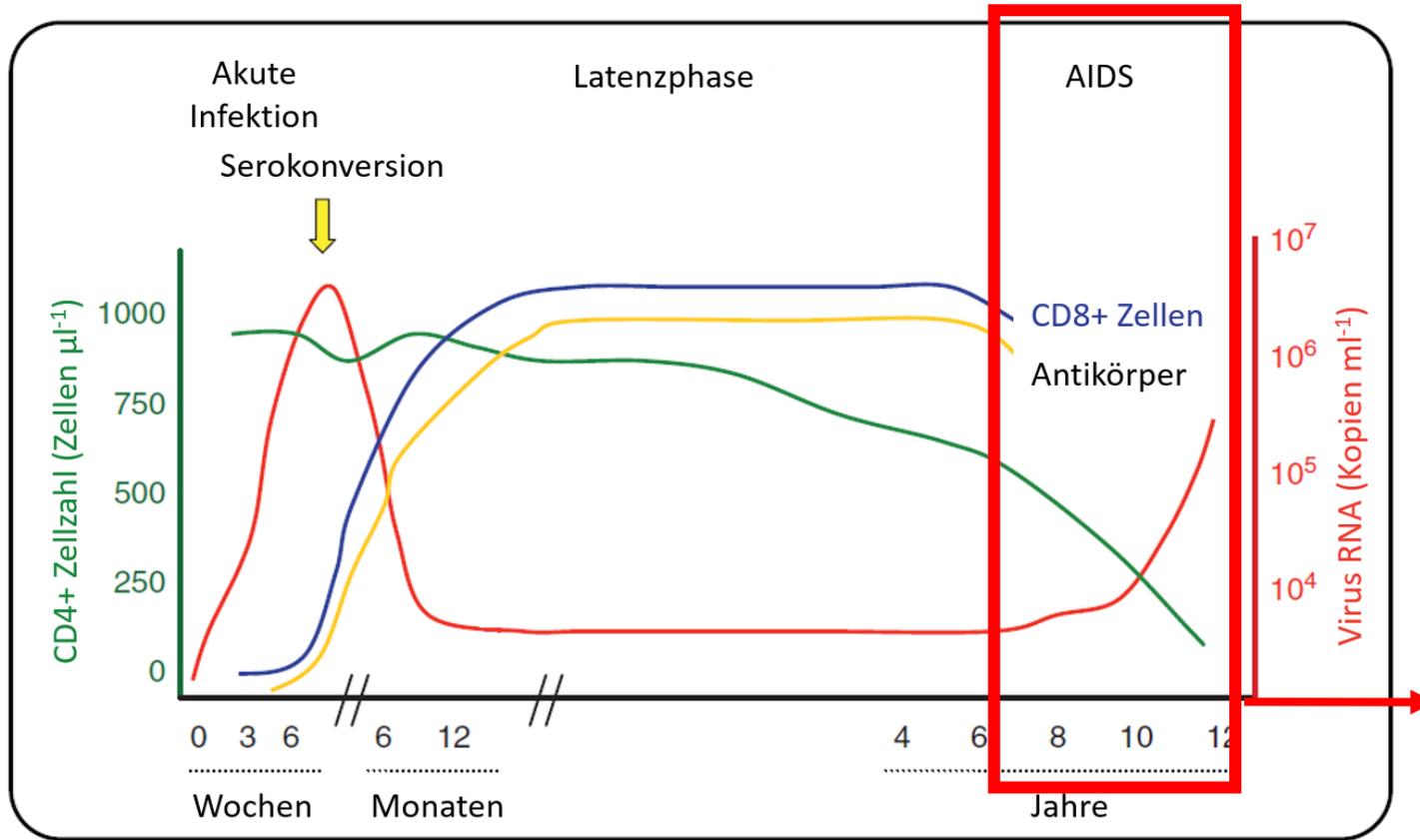


Beispiel: Verfolgung den Immunstatus von HIV-Patienten





Beispiel: Verfolgung den Immunstatus von HIV-Patienten

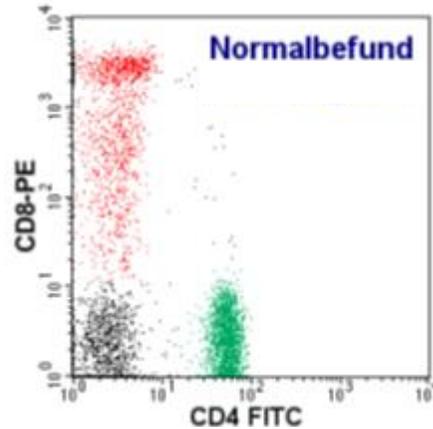




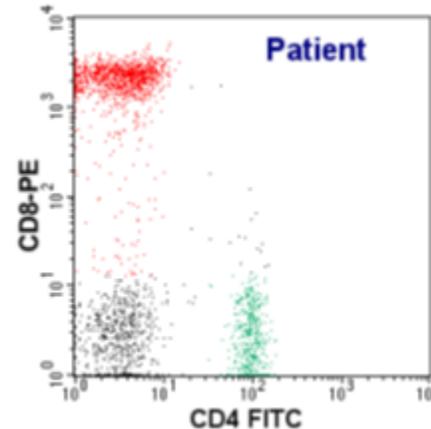
Beispiel: Verfolgung den Immunstatus von HIV-Patienten

Diagnose: anhand serologischer Ergebnisse (z.B. Nachweis von Antikörpern und Viruspartikeln im Plasma)
hämatologischer Untersuchungen

CD4+ > CD8+



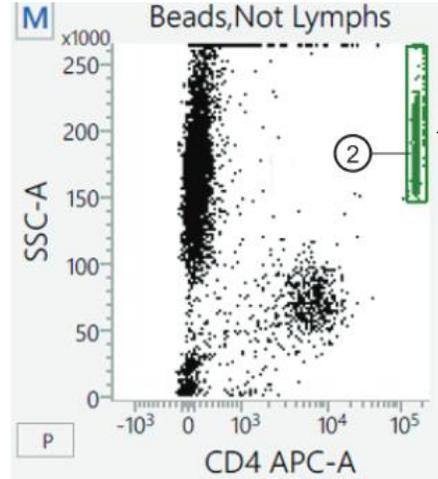
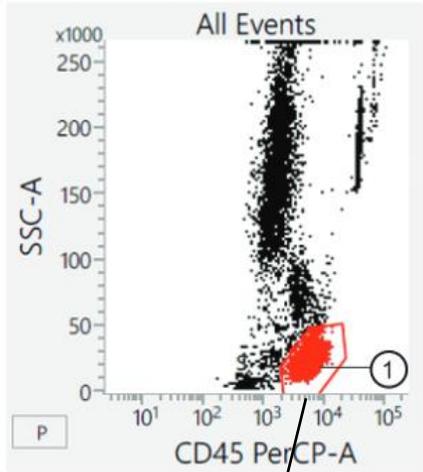
CD4+ < CD8+





Beispiel: Verfolgung den Immunstatus von HIV-Patienten

CD3/CD4/CD8/CD45

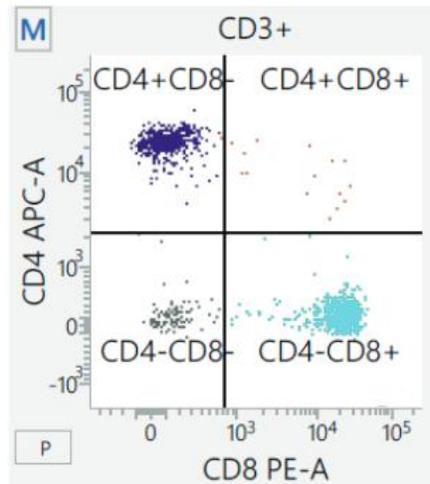
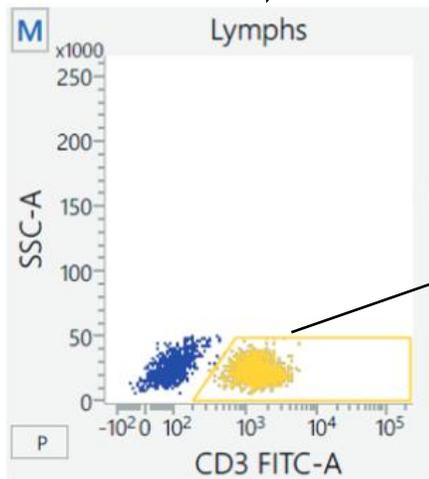


Bestimmung der absoluten CD4+ Zellzahl durch Mitführen von Kalibrationsbeads möglich

Normalbereiche:

CD4+: 31-63 %, 314-1270 Zellen/ μ l*

CD8+: 12-37 %, 147-836 Zellen/ μ l*



Absolute CD4+ Zellzahl wird benötigt:

- zur Einstufung – Prophylaxe gegen opportunistische Pathogene
- vor Anfang antiretroviraler Behandlung

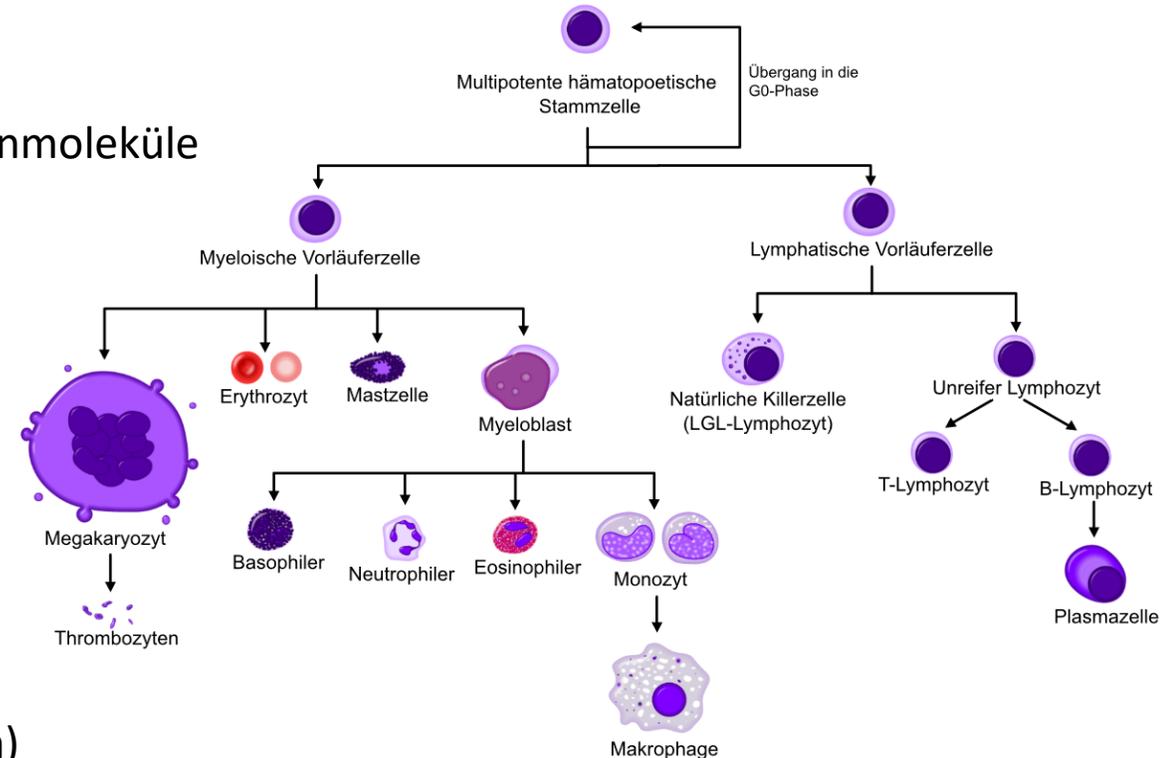
Beispiel: Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie



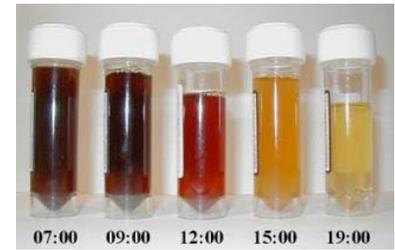
<https://step2.medbullets.com>

- seltene erworbene Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen
- häufige Symptome: intravaskuläre Hämolyse, Thrombosen
- Blutbild: Anämie, erhöhte LDH-Aktivität, negativer Coombs-Test
- Ursache: Mutation im *PIG-A* Gen
- Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) für Oberflächenmoleküle
- GPI-verankerte Moleküle z.B.:

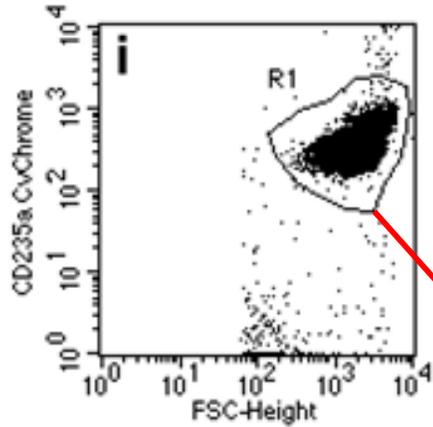
- CD14 (Monozyten)
- CD16 (Neutrophil)
- CD24 (Neutrophilen, B Zellen)
- CD55 (Alle)
- CD59 (Alle)
- CD87 (T Zellen, NK Zellen, Monozyten, Neutrophilen)



Beispiel: Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie



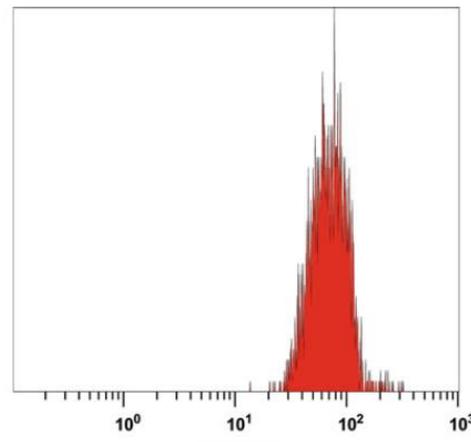
<https://step2.medbullets.com>



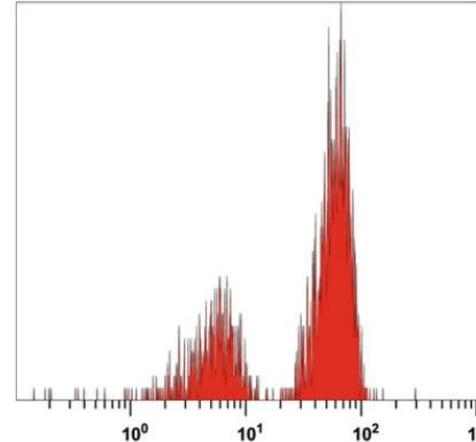
Die DFZ ist bei PNH der diagnostische Goldstandard, da sie eine PNH-Population eindeutig identifizieren und quantifizieren kann.



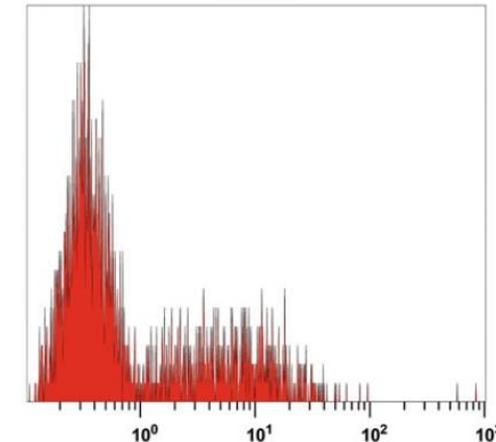
Zellzahl



CD59
Normale rote Blutzellen



CD59
Partielle Defizienz



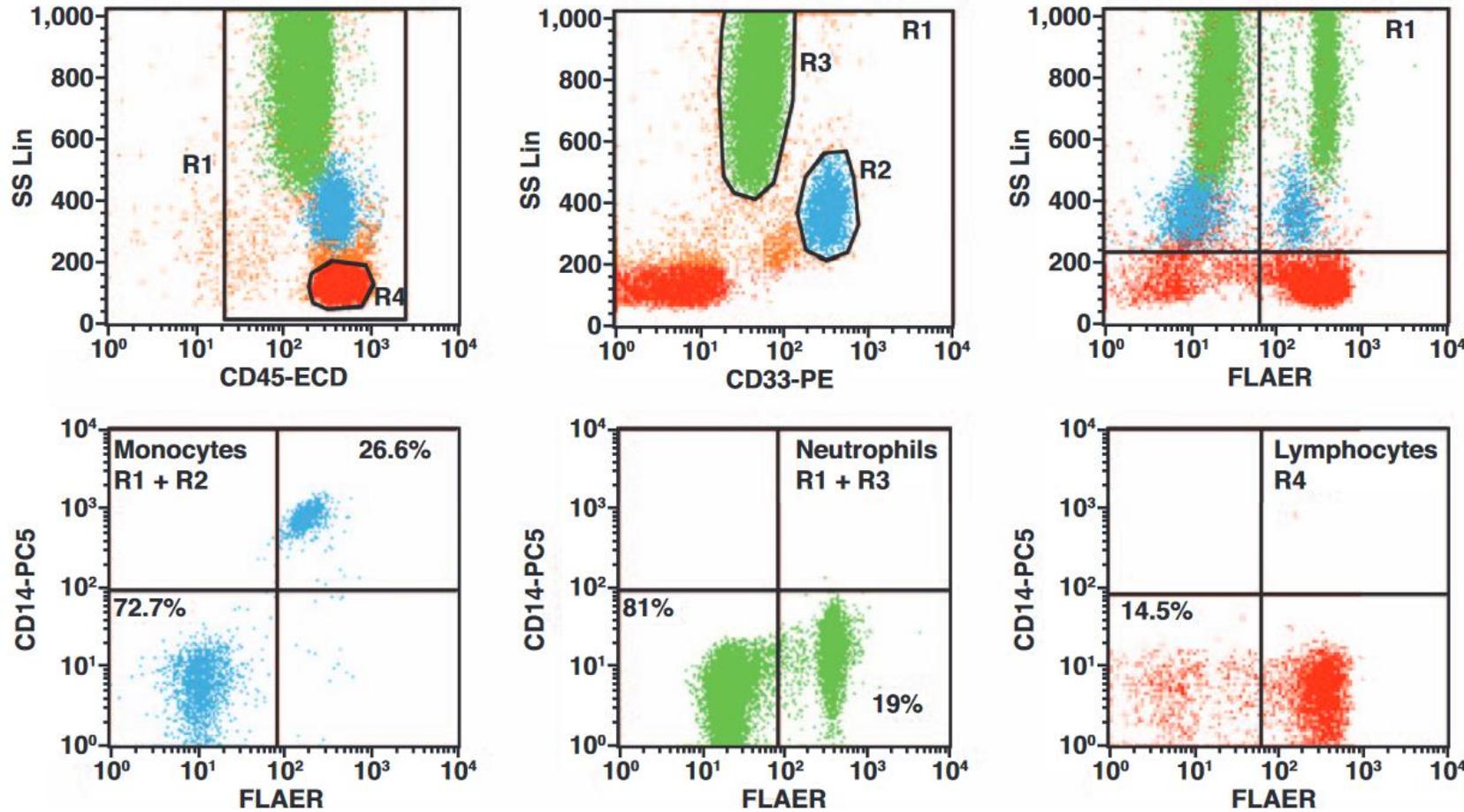
CD59
Komplette Defizienz mit Transfusion

Beispiel: Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

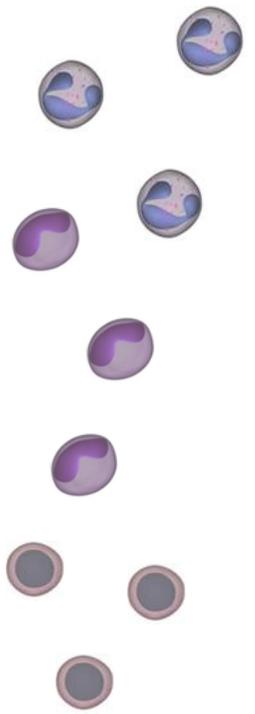
Identifizierung von PNH Leukozyten mit dem FLAER Assay



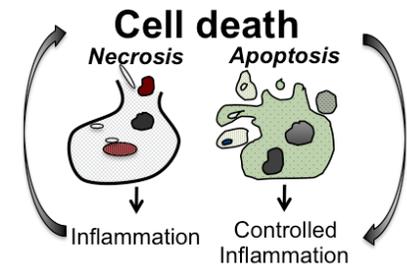
<https://step2.medbullets.com>



FLAER: fluorescent aerolysin – bindet spezifisch an den GPI-Anker



Beispiel: Zelltod messen – NK-Zell Funktionstest

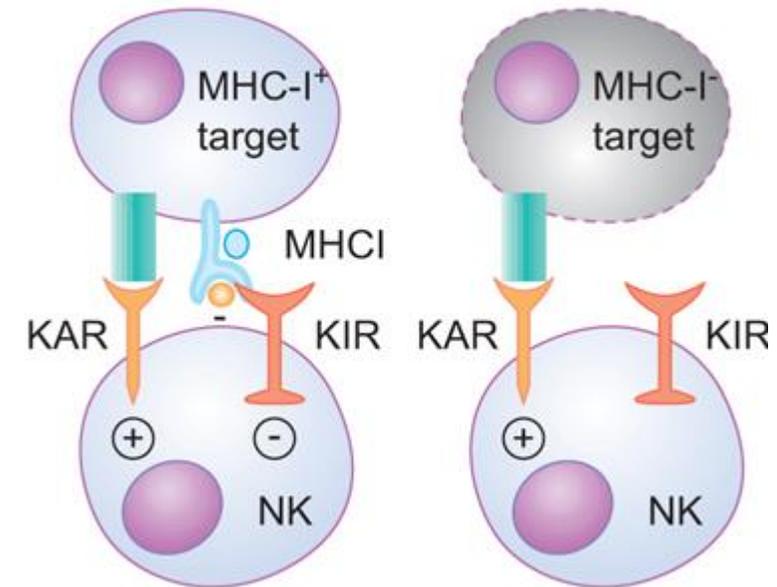


Natürliche Killerzellen:

- Zellen der angeborenen Immunität
- 5 -20% der Lymphozyten im Blut
- Abtötung virusinfizierter Zellen und Tumorzellen

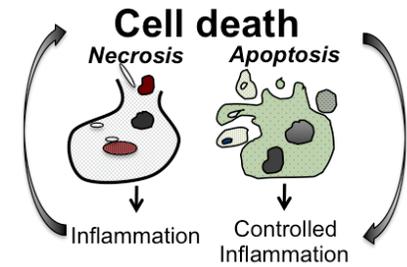
Grund: verminderte / fehlende MHC-I Expression

- während der Schwangerschaft zwei Populationen
 - periphere NK-Zellen
 - uterine NK-Zellen



KIR: killer inhibitory receptor
KAR: killer activating receptor

Beispiel: Zelltod messen – NK-Zell Funktionstest



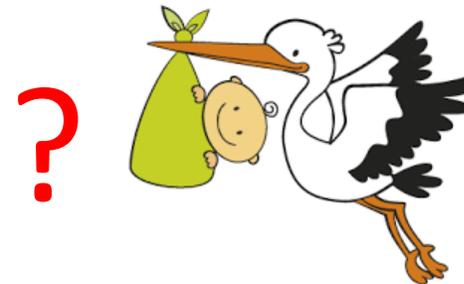
Verminderte Aktivität der NK-Zellen

- Tumorpatienten
- seltene angeborene oder erworbene Immundefizienzen
z. B. Hämophagozytische Lymphohistiozytose

Erhöhte Aktivität der NK-Zellen

- Organtransplantation
- **wiederholte Fehlgeburten mit immunologischem Hintergrund (habituellem Abort)**

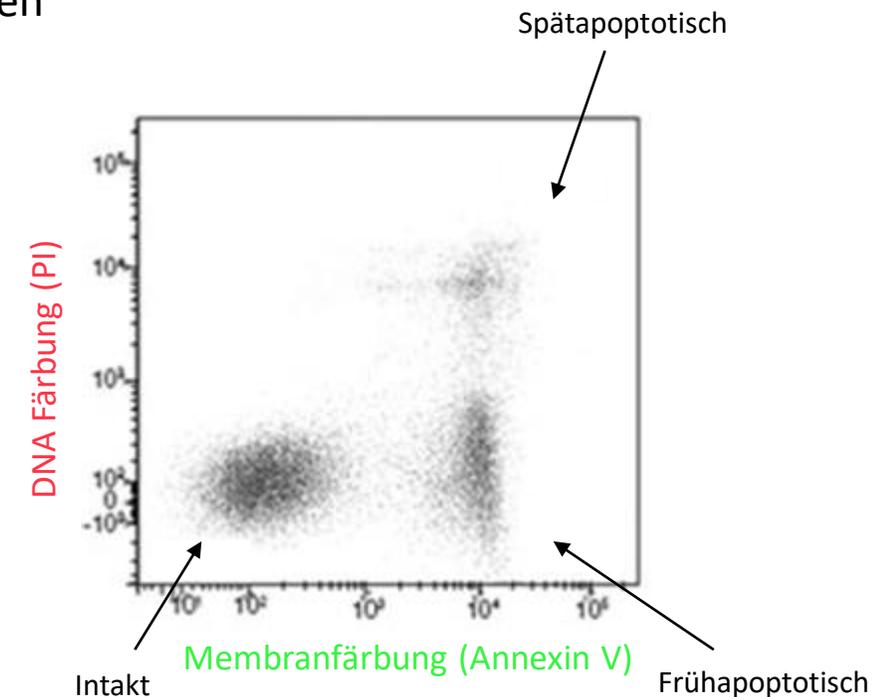
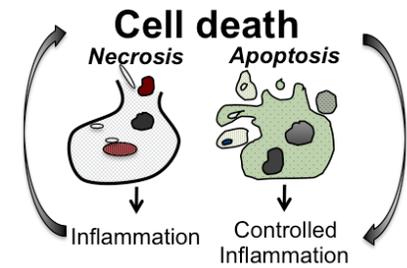
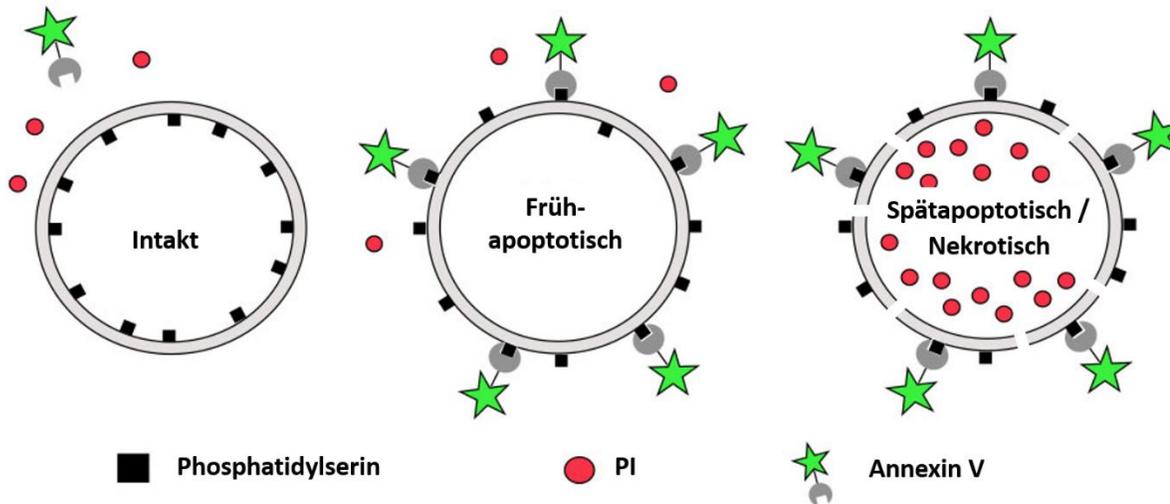
- Gynäkologische Veränderungen
- Infektionen
- Genetische Ursachen
- Gerinnungsanomalien
- Hormonstörungen
- Immunologische Ursachen
 - Autoantikörper
 - **Differenzialblutbild**
 - **NK-Zell Funktionstest**
 - Zytokinprofil



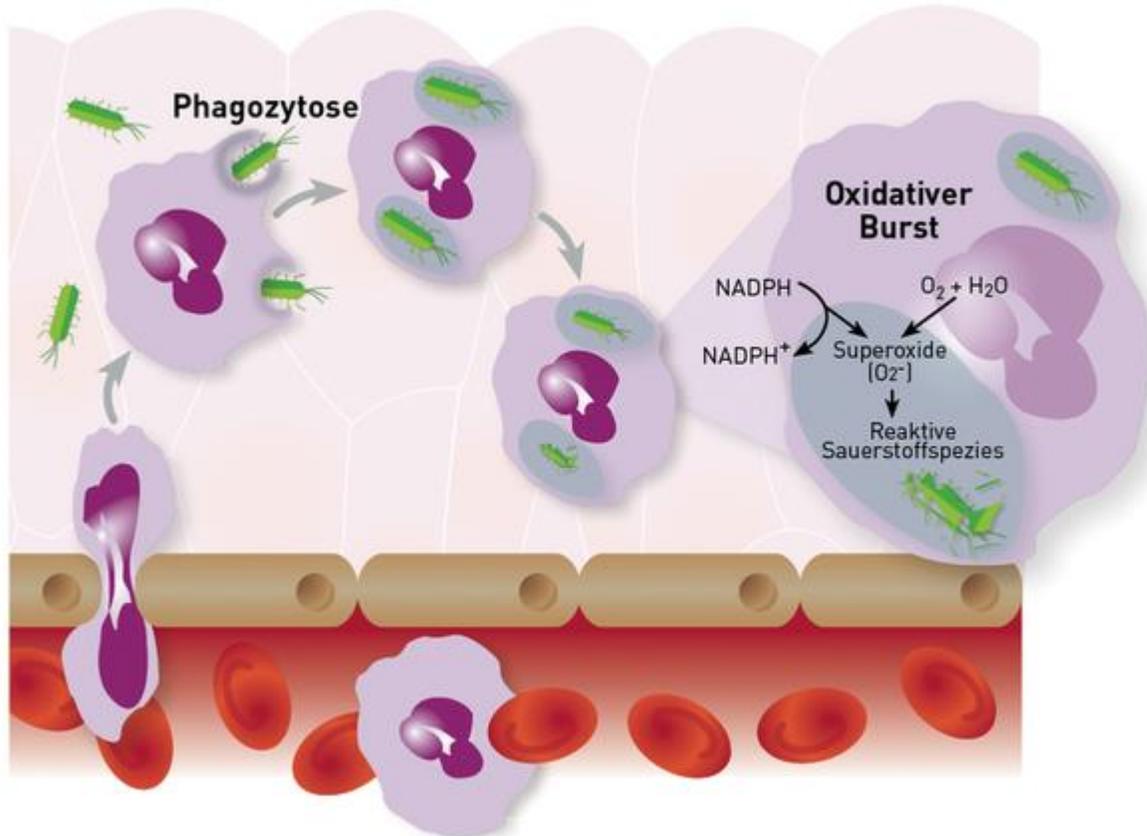
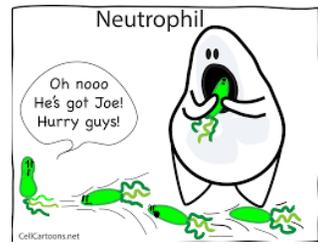
Beispiel: Zelltod messen – NK-Zell Funktionstest

Zytotoxizitätstest

- Mononukleäre Zellen aus dem Blut + K-562 Tumorzellen als Targetzellen (keine MHC-I-Expression)
- Detektion von Apoptosemarkern (Phosphatidylserin, DNA)
- NK-Zell-Aktivität korreliert mit der Apoptoserate
- Kontrollzellen von gesunden Probanden werden auch gemessen
- Befund: im Vergleich zur Kontrolle hoch oder niedrig



Beispiel: Zellaktivität messen – Granulozytenfunktionstest



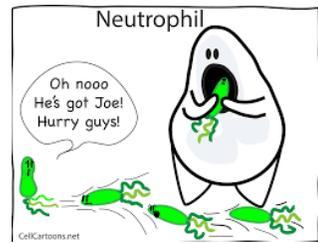
Neutrophile Granulozyten:

- Zellen der angeborenen Immunsystem
- 65-70% der Leukozyten im Blut
- Elimination von Bakterien un Pilzen
- Chemotaxis, Phagozytose, Produktion von Sauerstoffmetaboliten

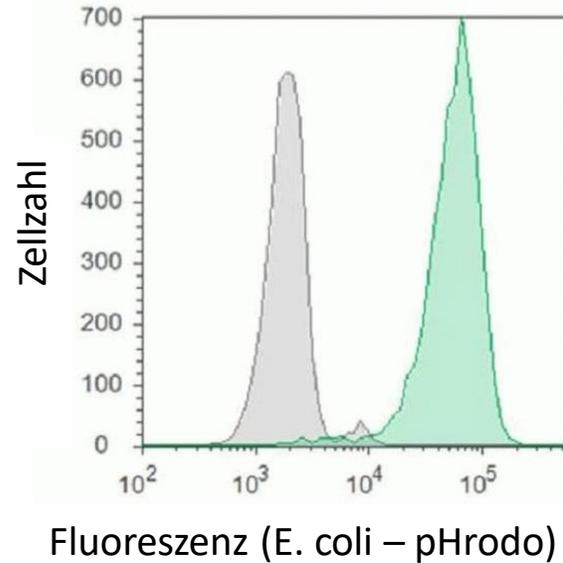
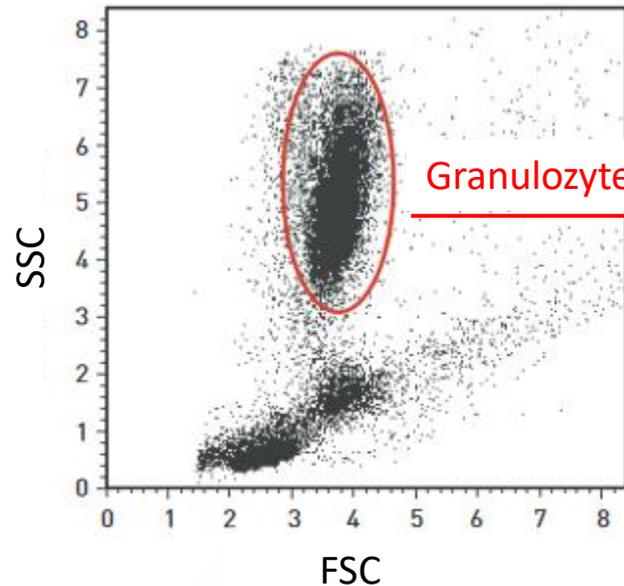
Funktionsstörung der Neutrophilen:

- angeborene Immunfunktionsstörungen
- Tumore, chronische Infektionen, AIDS, Tuberkulose
- latrogen bedingt

Beispiel: Zellaktivität messen – Granulozytenfunktionstest



Phagozytose-Test



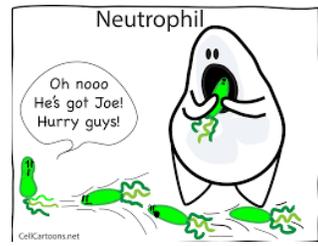
Heparinisiertes Blut
+ opsonisierte **markierte E.coli**
Inkubation bei 37°C



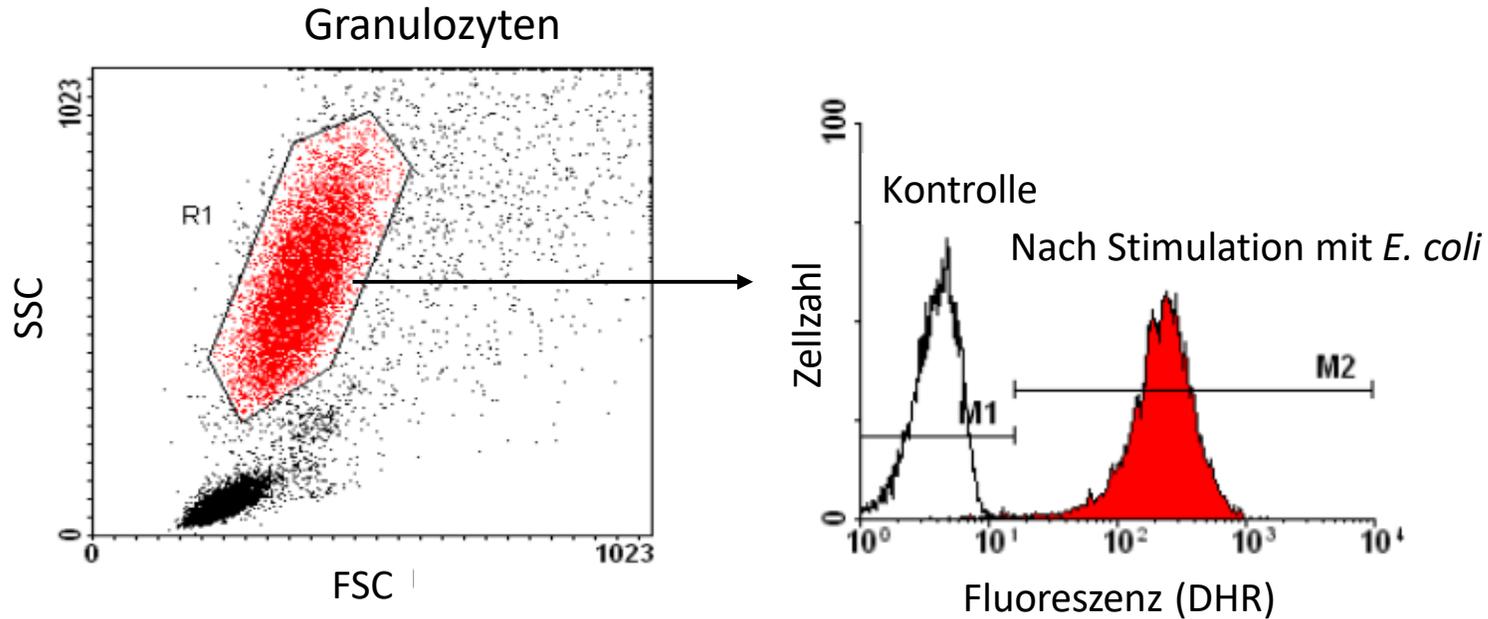
Der Farbstoff fluoresziert nur dann,
wenn der pH niedrig ist – die Bakterien
im Phagosom sind.

Abnormale Phagozytose:
Leukozyten-Integrin-Defizienz
Komplementkomponentdefekt
Aktindysfunktion

Beispiel: Zellaktivität messen – Granulozytenfunktionstest



Bursttest – diagnostischer Test bei chronischer Granulomatose



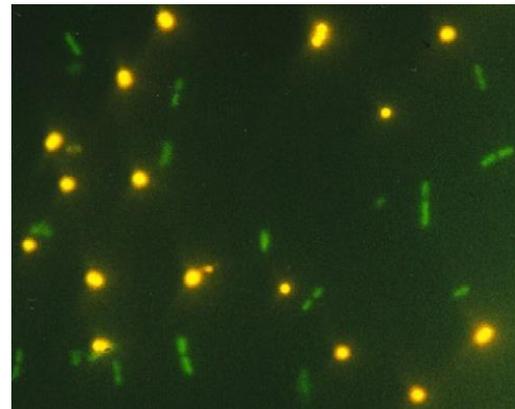
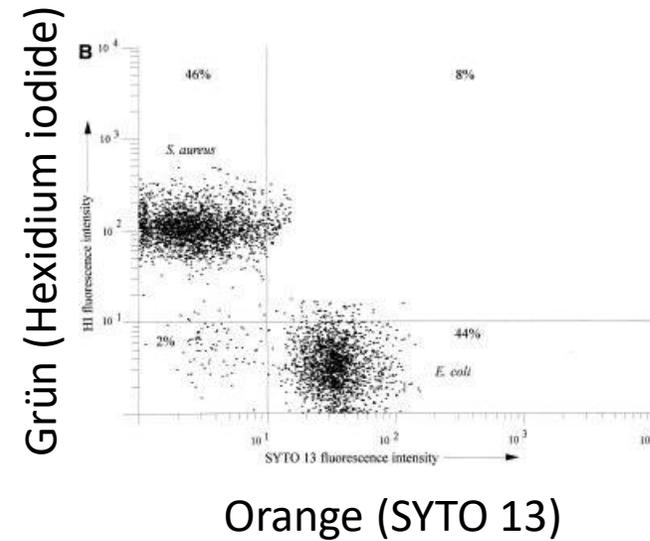
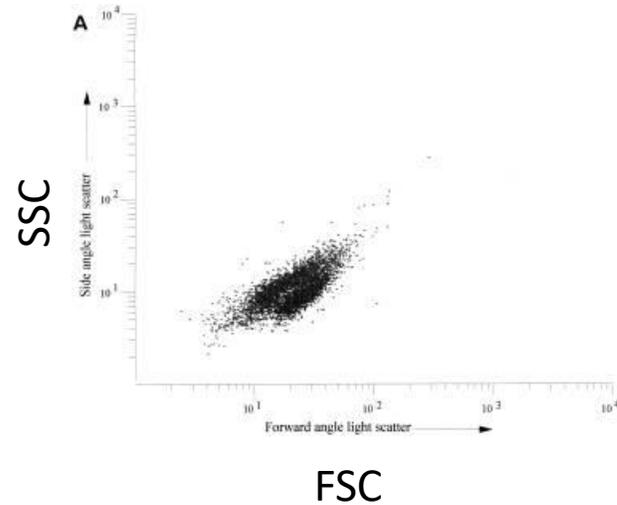
Heparinisiertes Blut
+ opsonisierte **unmarkierte** *E.coli*
Inkubation bei 37°C
+ fluorogenes Substrat
(dyhydrorhodamine 123, DHR)

Das Substrat wird fluoreszieren,
wenn Sauerstoffmetaboliten
produziert werden.

Beispiel: Identifizierung von Mikroorganismen



Fluoreszente Gram-Färbung



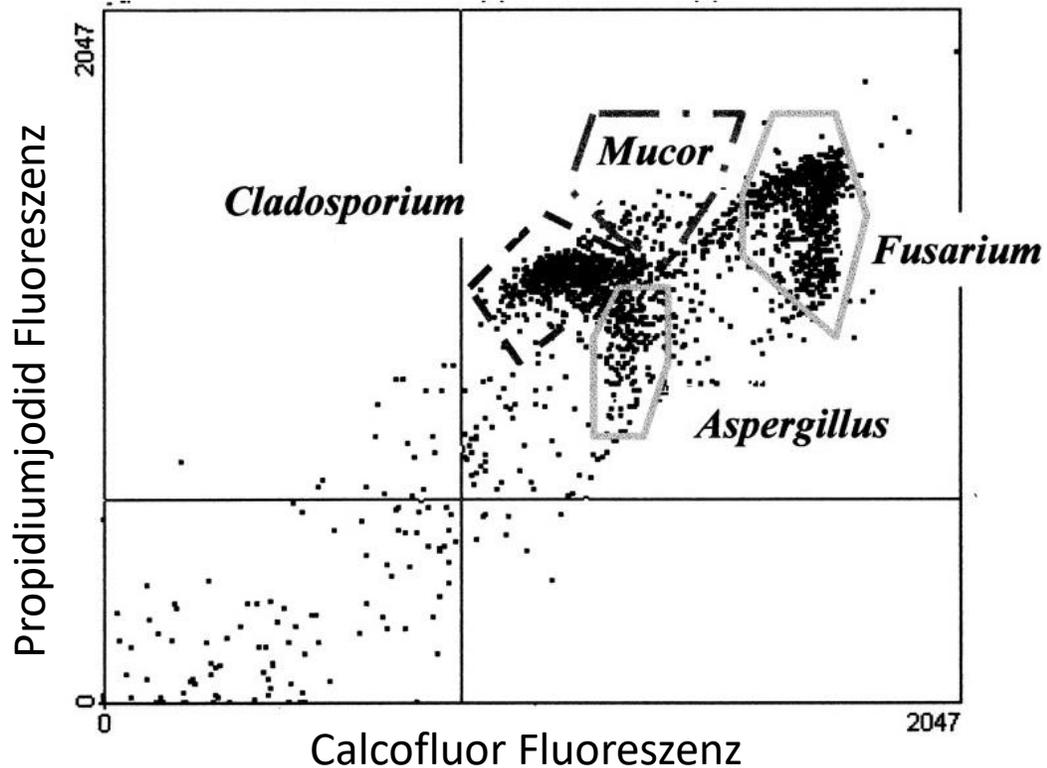
Grün: *E. coli* (Gram-negativ)

Orange: *S. aureus* (Gram-positiv)

Beispiel: Identifizierung von Mikroorganismen

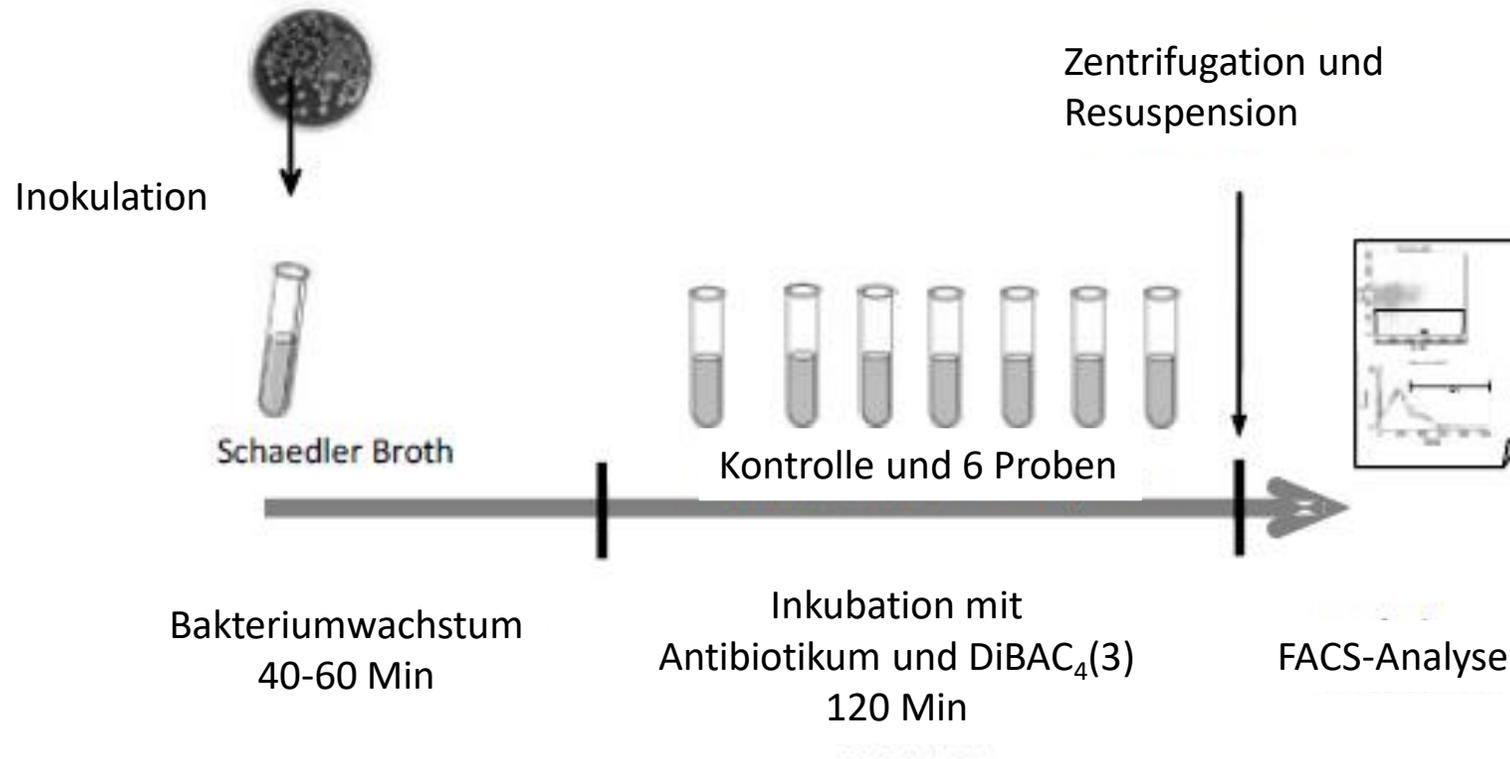


Identifizierung von Pilzsporen

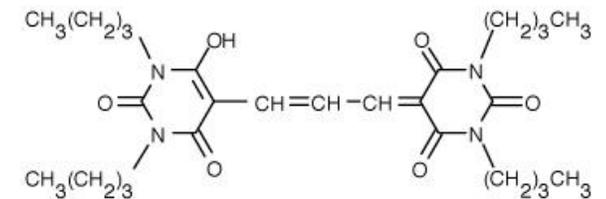


- Fixierte Sporen (70% Ethanol)
- DNA-Färbung (Propidiumjodid)
- Chitinfärbung (Calcofluor)

Beispiel: Test für Antibiotikumresistenz



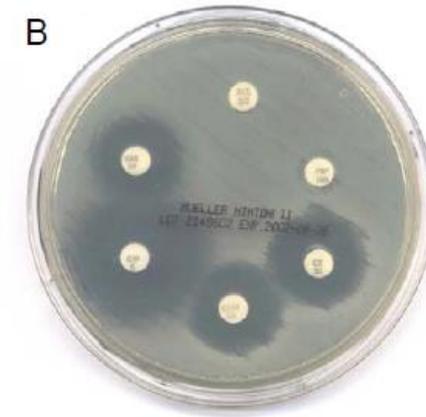
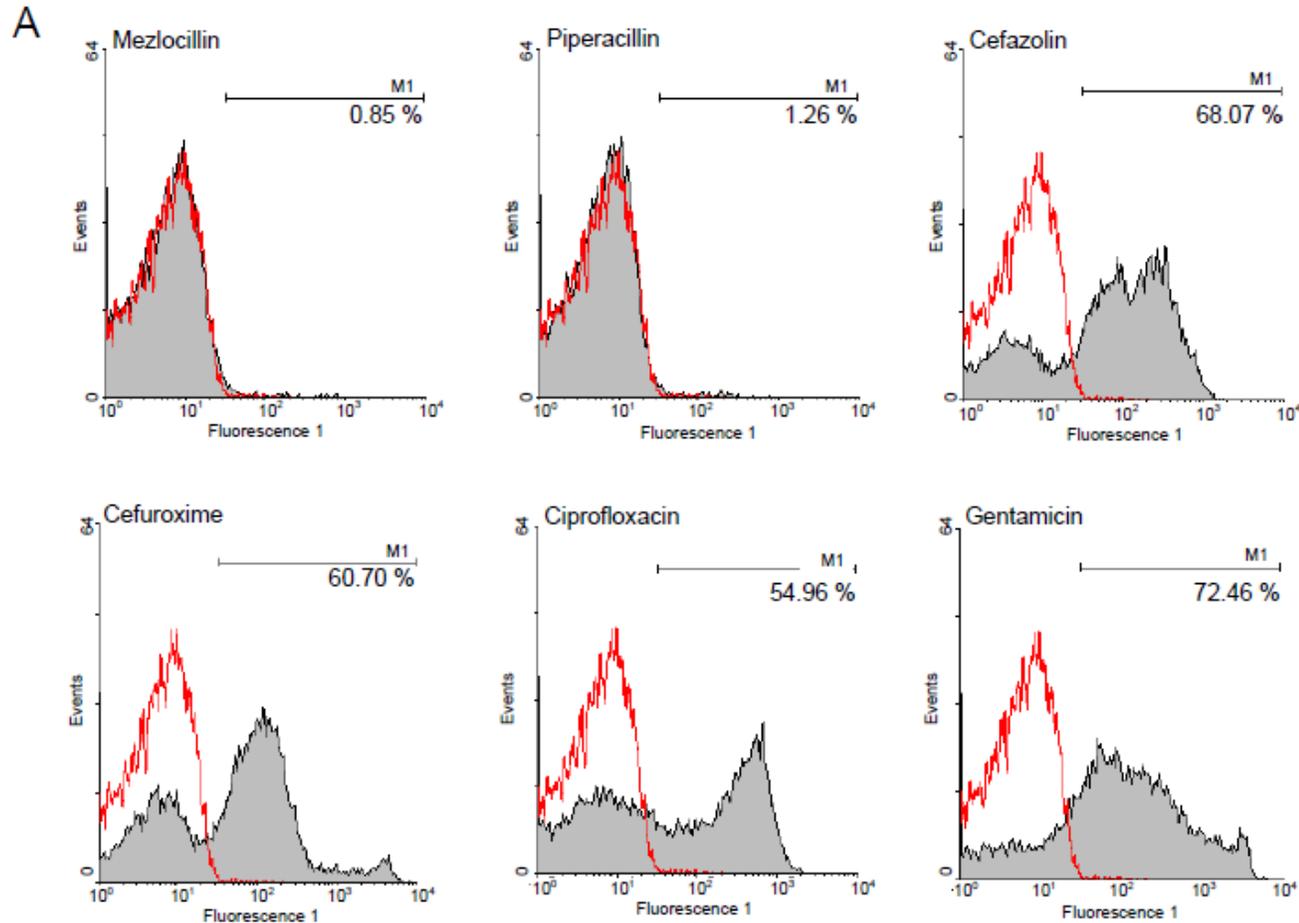
DiBAC₄(3):
Fluoreszenzfarbstoff für
Detektion der
Membranpotentialänderung



Beispiel: Test für Antibiotikumresistenz



Antibiotikumresistenz einer *E. coli* Isolat

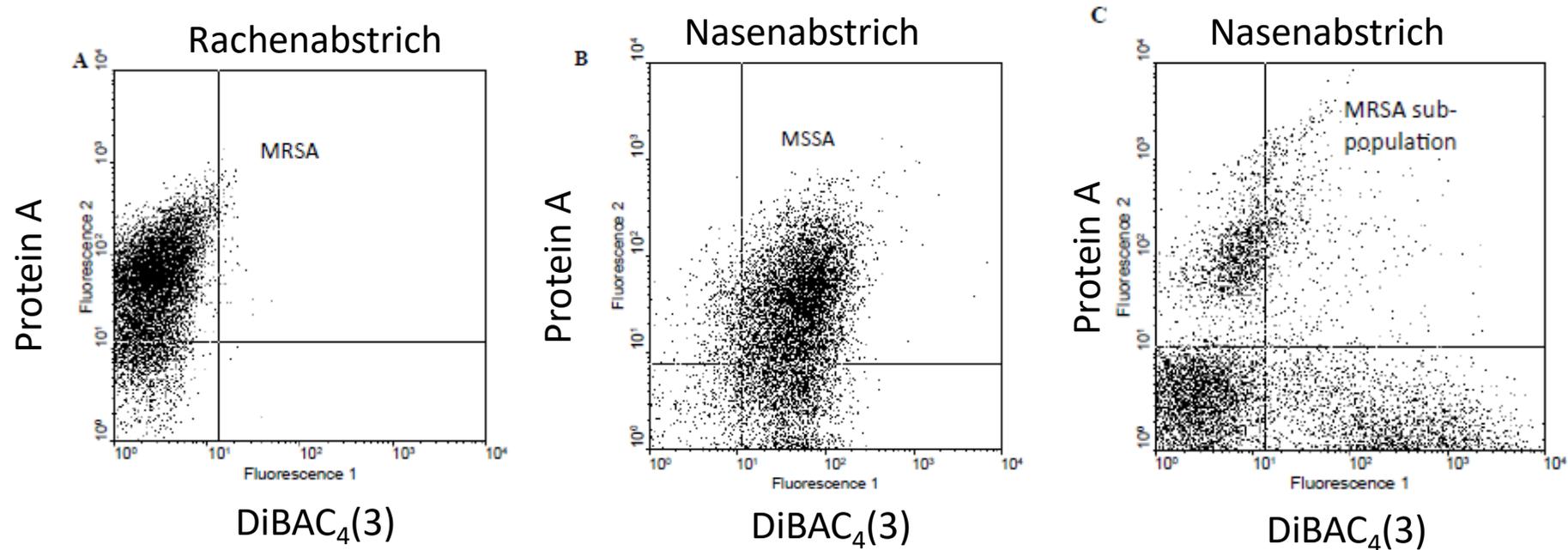


antibiotics	zone of inhibition	interpretation
mezlocillin	-	R
piperacillin	-	R
cefazolin	20 mm	S
cefuroxime	21 mm	S
ciprofloxacin	28 mm	S
gentamicin	19 mm	S

Beispiel: Identifizierung von Mikroorganismen



Charakterisierung von *S. aureus* in Abstrichen

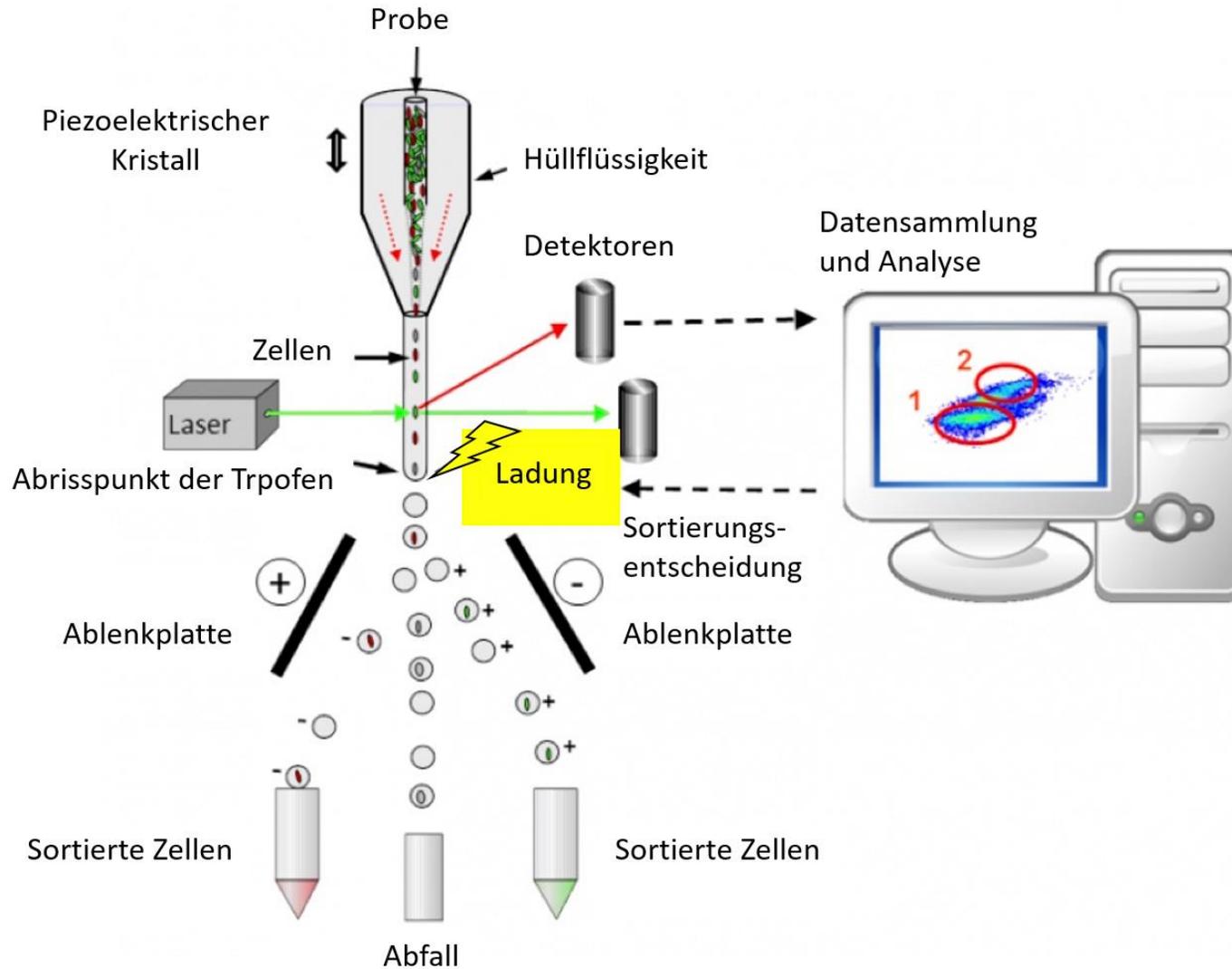


Protein A ist ein Oberflächenmolekül von *S. aureus*.

Nach Oxacillin-Behandlung DiBAC₄(3)-Färbung ist positiv, wenn das Bakterium sensitiv ist.

Ausblick: Zellsortierung

FACS: fluorescence-activated cell sorting



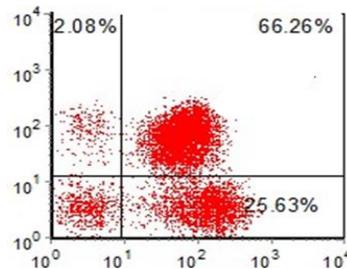
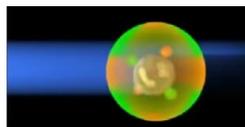
Zusammenfassung

Probe (Zellsuspension)



- Diagnostik
- Therapieverfolgung / Monitoring
- Detektion und Viabilitätstest von Mikroorganismen
- Zellfunktion / Vitalität
- ...

Lichtstreuung und
Fluoreszenz



Danke für Ihre Aufmerksamkeit!