

Durchflusszytometrie

Allgemeine Beschreibung

Die **Durchflusszytometrie** ermöglicht die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse wird auch als FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting bezeichnet (bei diesem Begriff handelt es sich allerdings um den geschützten Handelsnamen von Beckton Dickinson). Sie eignet sich zur quantitativen Differenzierung von Zellen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmerkmale oder intrazellulären Proteine („Marker“) auf Einzelzellebene. Grundlage ist die Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern/Reagenzien gegen definierte Antigene/Moleküle. So lassen sich aus einer Probe viele unterschiedliche Zell-Populationen, (z.B. T-, B-, NK-Zellen, Monozyten) und Subpopulationen (z.B. T-Helfer, zytotoxische T-Zellen, naive und memory T-Zell Populationen) unterscheiden.

Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen der Zelle beim Passieren eines Laserstrahles. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Detektor (Photomultiplier) registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle: je höher die detektierte Fluoreszenzintensität, desto mehr Antikörper sind gebunden (und desto höher ist die Expression des betreffenden Markers). Die gleichzeitige Detektion verschiedener Moleküle, die mit unterschiedlich konjugierten Antikörpern markiert wurden, ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Granularität des Zytoplasmas gewonnen. So streuen Granulozyten, die eine raue Oberfläche und in ihrem Inneren viele Vesikel haben, deutlich mehr Licht als die glatten Lymphozyten. Durch Streulichtanalysen können lebende von toten Zellen, Lymphozyten von Erythrozyten, Monozyten und Granulozyten und außerdem ruhende von aktivierten Lymphozyten unterschieden werden.

Außer der Untersuchung der T-Zell Funktionen basieren alle Methoden des Immunologielabors auf durchflusszytometrischen Analysen.

Analytische Leistungsdaten

Die Zuverlässigkeit der durchflusszytometrischen Untersuchung ist abhängig von der Anzahl der gemessenen Zellen. Insgesamt sollten wenn möglich mindestens 10 000 Zellen gemessen werden. Um eine Zell- Population mit einem Anteil von >2 % reproduzierbar beurteilen zu können, müssen mindestens 25 Zellen dieser Population untersucht werden. Das bedeutet, dass wir bei lymphopenen Patienten für bestimmte Untersuchungen mehr Material benötigen als normalerweise. Bei diesen Patienten wird die Analyse ggf. nicht aus heparinisiertem Vollblut, sondern nach Anreicherung der Lymphozyten durchgeführt. Für Untersuchungen, bei denen eine definierte Zellzahl zugrunde liegt, werden Lymphozyten grundsätzlich angereichert, so dass für diese Analysen immer mehr Material benötigt wird, als für diejenigen, welche aus Vollblut gemacht werden können.