

Multiplextest zum Nachweis verschiedener Tumorantigene an einer Karzinomzelllinie durch zeitaufgelöste Einzelphotonenzählung

Achim Lenenbach^a, Gero Brockhoff^b, Stefan Seeger^a

^aPhysikalisch-Chemisches Institut, Universität Zürich, Schweiz

^bInstitut für Pathologie, Universität Regensburg, Deutschland

lea@pci.unizh.ch

Registriernummer der Online-Anmeldung: 170

Poster

Tumorzellen tragen für sie charakteristische Antigene, sogenannte Tumorantigene, die sie von anderen Zellen unterscheiden und daher ein Merkmal für die Diagnostik darstellen.

Für die Therapie spielen diese Tumorantigene zunehmend eine wichtige Rolle, weil sie eine spezifische Angriffsstelle für Antikörper bieten, die diese Zellen über eine Antikörper-Antigenkopplung markieren und somit für das Immunsystem erkennbar machen.

Je detaillierter die Charakterisierung eines Tumors (Tumorheterogenität, Expressionsdichte der Tumorantigene) in Bezug auf solche Antigene z. B. membranständige Rezeptoren erfolgt, desto spezifischer könnten zukünftige Therapien auf den Patienten individuell abgestimmt werden.

Für einen möglichst effizienten und exakten quantitativen Nachweis verschiedener Antigene an einem Tumorgewebeschnitt bietet die Methode der zeitaufgelösten Einzelphotonenzählung TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) in Kombination mit verschiedenen Farbstofflabels eine interessante Alternative zu herkömmlichen Verfahren.

Diese Art des fluoreszenten Nachweises kombiniert die Vorteile des konfokalen Laserscanning-Mikroskops mit denen eines Multilabeltests.

Für den Fluoreszenznachweis eines Antigens wird der dazu komplementäre Antikörper mit einem Farbstoff gekoppelt. Möchte man verschiedene Antigene an einem biologischen System gleichzeitig detektieren, so muss jeder spezifisch bindende Antikörper mit einem anderen Farbstoff konjugiert werden. Dieser kann sich in seiner Emissionswellenlänge von den anderen unterscheiden, der Fluoreszenznachweis erfolgt dann über geeignete optische Filtersysteme.

Bei der TCSPC-Messung ist die charakteristische Messgröße die Fluoreszenzlebensdauer des am Antikörper gekoppelten Farbstoffs. Alle Farbstoffe werden mit derselben monochromatischen Lichtquelle zur Fluoreszenz angeregt und emittieren in dasselbe Wellenlängenfenster.

In unserem Messsystem wird eine rote Laserdiode mit 40 MHz gepulst und sendet dabei 70 ps kurze Lichtpulse aus. Das parallele Laserlicht trifft über ein Mikroskopobjektiv auf die zu untersuchenden Zellen. Die von den Zellen ausgesandten Fluoreszenzphotonen werden mit dem Mikroskopobjektiv gesammelt und über eine Lochblende konfokal auf einen Photomultiplier abgebildet. Detektiert der Photomultiplier ein Fluoreszenzphoton, so wird die Zeit bis zum Aussenden des nächsten Laserpulses gemessen und in einen Vielkanalanalysator mit 1024 Kanälen einsortiert. Nimmt man ausreichend viele Fluoreszenzereignisse mit dem Photomultiplier auf und sortiert die so erhaltenen Zeiten in die zugehörigen Zeitkanäle ein, so erhält man als Messkurve eine exponentielle Abklingkurve, deren zeitlicher Verlauf durch die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt ist.

Ein solcher, konfokaler Mikroskopaufbau mit einer monochromatischen Laserlichtquelle im Anregungsstrahlengang kann beim Einsatz eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur prinzipiell Empfindlichkeiten erreichen, die den Nachweis einzelner Farbstoffmoleküle ermöglicht.

Er liefert daher ein sensitives Messverfahren zur Bestimmung von Rezeptordichten membranständiger Tumorantigene an Karzinomzellen.

Als Fluoreszenzfarbstoffe werden von uns im Roten anregbare Rhodamin- und Cyaninfarbstoffe eingesetzt. Sie haben zum Einen den Vorteil, dass sie im langwelligen Bereich des sichtbaren Lichts angeregt werden können, in dem die Autofluoreszenz des Gewebes nur einen geringen Untergrund hervorruft. Zum Anderen gibt es in diesem Wellenlängenbereich eine große Anzahl von Farbstoffen mit verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern im ns-Bereich [1], die in kurzen Messzeiten ausreichend viele Fluoreszenzereignisse für die TCSPC-Messung liefern.

Befinden sich nun zwei Farbstoffe mit unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern im Fokus, so erhält man als Messkurve eine Überlagerung aus den beiden monoexponentiellen Fluoreszenzereignissen mit den dazugehörigen Lebensdauern.

Durch einen geeigneten Fit (Maximum Likelihood) kann man die monoexponentiellen Komponenten der zwei Farbstoffe mit den Lebensdauern τ_1 und τ_2 ermitteln.

Markiert man nun zwei verschiedene Antikörper mit je einem Farbstoff der Lebensdauer τ_1 bzw. τ_2 , so lassen sich diese bei Kopplung an eine Zelle über das oben beschriebene Verfahren durch TCSPC-Messungen nachweisen. Zusätzlich zu den Fluoreszenzlebensdauern können die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Farbstoffe ermittelt werden.

Beim Einsatz mehrerer Farbstoffe, die sich alle in ihrer Fluoreszenzlebensdauer ausreichend unterscheiden ist diese Messmethode auf mehr als zwei Komponenten erweiterbar.

Als biologisches Testsystem für zeitaufgelöste Messungen zum Nachweis zweier verschiedener Antikörper verwenden wir eine Mammakarzinomzelllinie, an die wir zwei unterschiedliche Antikörperspezies koppeln.

Zum Einen markieren wir den tumorspezifischen c-erbB2 Rezeptor, zum Anderen Zytoskelettmoleküle, das Cytokeratin18. Die beiden monoklonalen Antikörper sind mit Farbstoffen der Lebensdauer $\tau_1 = 1\text{ns}$ bzw. $\tau_2 = 4\text{ ns}$ markiert.

Die adhärent wachsende Zelllinie SK-BR-3 wird zur Färbung zunächst trypsiniert und in Alkohol fixiert. Anschließend führt man die beiden Antikörperkopplungen nacheinander durch, nachdem die Zellen zuvor nochmals zentrifugiert und in PBS resuspendiert wurden. Nach jeweils einstündiger Inkubationszeit markiert man die beiden gebundenen Antikörperspezies mit zwei verschiedenen Sekundäantikörpern, die mit je einem Farbstoff ($\tau_1 = 1\text{ns}$ bzw. $\tau_2 = 4\text{ ns}$) konjugiert sind.

Mit einer Zytospinzentrifuge bringt man die Zellen auf ein Deckgläschen, um anschließend die Fluoreszenz mit dem TCSPC-System abzuscannen.

Durch die ermittelten Fluoreszenzdaten können die beiden Antikörper über einen biexponentiellen Fit anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauer nachgewiesen und ihre jeweilige Anzahl auf der Zelle über die Intensität bestimmt werden.

Literatur

- [1] M. Sauer, K.-T. Han, R. Müller, S. Nord, A. Schulz, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N.J. Marx, C. Zander, and K.H. Drexhage: *Journal of Fluorescence* **5** (1995), 1995