

**Aus dem Institut für Anatomie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann**

---

**Der Einsatz speziegleicher Antikörper für Fluoreszenz-  
Mehrfachmarkierungen – Eine methodische Untersuchung  
zur Fab-Fragment-Technik in der Immunhistochemie**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von  
Carsten Haas, geb. Neubauer  
aus Schwerin

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Gebert
  2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Fehrenbach
- Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2011
- Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.02.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 <b>Fluoreszenz .....</b>	<b>2</b>
1.2 <b>Markierungstechniken .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 <b>Direkte Markierung .....</b>	<b>5</b>
1.2.2 <b>Indirekte Markierung.....</b>	<b>6</b>
1.3 <b>Die Fab-Fragment-Technik.....</b>	<b>10</b>
1.4 <b>Zielsetzung .....</b>	<b>11</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>12</b>
2.1 <b>Materialien .....</b>	<b>12</b>
2.1.1 <b>Gewebeproben und Verarbeitung .....</b>	<b>12</b>
2.1.2 <b>Antikörper, Reagenzien und Geräte .....</b>	<b>13</b>
2.2 <b>Arbeitsprotokolle.....</b>	<b>14</b>
2.2.1 <b>Direkte Markierung .....</b>	<b>14</b>
2.2.2 <b>Indirekte Markierung.....</b>	<b>15</b>
2.2.3 <b>Markierungen mit der Fab-Fragment-Technik .....</b>	<b>15</b>
2.3 <b>Fluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>18</b>
2.3.1 <b>Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>18</b>
2.3.2 <b>Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....</b>	<b>19</b>
2.4 <b>Messmethode .....</b>	<b>25</b>
2.5 <b>Statistik .....</b>	<b>28</b>
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>29</b>
3.1 <b>Eigenschaften der Fab-Fragmente.....</b>	<b>29</b>
3.1.1 <b>Massenverhältnis.....</b>	<b>29</b>
3.1.2 <b>Einfluss der Inkubationszeit auf die Markierungsintensität.....</b>	<b>31</b>
3.1.3 <b>Stabilität der Antikörperkomplexe .....</b>	<b>35</b>

---

<b>3.2</b>	<b>Mehrfachmarkierungen</b> .....	<b>41</b>
3.2.1	Doppelmarkierungen .....	41
3.2.2	Drei- und Vierfachmarkierungen .....	46
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Eigenschaften der Fab-Fragmente</b> .....	<b>51</b>
4.1.1	Das optimale Massenverhältnis .....	51
4.1.2	Verhalten der Antikörperkomplexe in Lösung .....	53
4.1.3	Einfluss der Markierungsdauer auf die Markierungsintensität .....	54
4.1.4	Mehrfachmarkierungen mit speziegleichen Antikörpern.....	55
<b>4.2</b>	<b>Messmethode</b> .....	<b>58</b>
<b>4.3</b>	<b>Ökonomische Gesichtspunkte</b> .....	<b>60</b>
<b>4.4</b>	<b>Grenzen der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie</b> .....	<b>62</b>
<b>4.5</b>	<b>Abschließende Betrachtung</b> .....	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b> .....	<b>80</b>
9.1	Poster .....	81

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Prinzip der Fluoreszenzentstehung .....	3
Abbildung 1.2: Direkte Markierung.....	5
Abbildung 1.3: Indirekte Markierung .....	6
Abbildung 1.4: Biotin-Avidin Markierung.....	7
Abbildung 1.5: Fab-Fragment Markierung.....	10
Abbildung 2.1: Herstellung eines Antikörperkomplexes mithilfe von Fab-Fragmenten	16
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops .....	18
Abbildung 2.3: Konfokales Prinzip.....	20
Abbildung 2.4: Anordnung der Filter und Strahlenteiler für eine Mehrfachmarkierung	22
Abbildung 2.5: Emissionsspektren von Alexa 555 (blau) und Alexa 594 (rot) .....	23
Abbildung 2.6: Cross-talk zwischen Fluorochromen Alexa 555 und Alexa 594 .....	24
Abbildung 2.7: Prinzip der Threshold-Messung am Beispiel einer CD3/Zenon Alexa 555 Markierung .....	27
Abbildung 3.1: Intensitätsunterschiede bei verschiedenen Massenverhältnissen von Sekundärantikörper zu Primärantikörper .....	31
Abbildung 3.2: Intensitätsentwicklung bei verschiedenen Inkubationszeiten des Antikörperkomplexes CD3 und Zenon Alexa 555 auf dem Schnitt.....	33
Abbildung 3.3: Vimentin-Markierungen (clone V9 und Zenon Alexa 555) bei verschiedenen Inkubationszeiten auf dem Schnitt analog zu Diagramm 3.3 .....	34
Abbildung 3.4: Markierungsintensität (CD3 und Zenon Alexa 488) nach 8 Stunden Lagerung in verschiedenen Medien.....	38
Abbildung 3.5: Doppelmarkierung von CD3- und CD4-positiven Zellen .....	43
Abbildung 3.6: Verschiedene Auftragungsmethoden bei einer Doppelmarkierung mit CD8/Zenon Alexa 488 und CD38/Zenon Alexa 555 .....	45
Abbildung 3.7 Vierfachmarkierung mit 4 monoklonalen Antikörpern und der Fab-Fragment-Technik .....	48
Abbildung 3.8: Fab-Fragment-Dreifachmarkierung mithilfe biotinylierter Fab- Fragmente.....	50

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Exzitations- und Emissionsmaxima der benutzten Alexa-Fluorochrome .....	5
Tabelle 2.1: Monoklonale Primärantikörper .....	13
Tabelle 2.2: Monoklonale Sekundärantikörper .....	13
Tabelle 2.3: Arbeitsprotokoll einer direkten Markierung .....	14
Tabelle 2.4: Arbeitsprotokoll einer indirekten Markierung .....	15
Tabelle 2.5: Arbeitsprotokoll einer Fab-Fragment-Markierung .....	17
Tabelle 3.1: Getestete Antikörperkombinationen für Doppelmarkierungen .....	42
Tabelle 4.1: Preise ausgewählter Antikörper (Stand 05/2010) .....	61
Tabelle 4.2: Kosten pro Markierung .....	61

## Abkürzungsverzeichnis

AKK	Antikörperkomplexe
Alexa	Name einer Familie von Fluoreszenzfarbstoffen, benannt nach dem Sohn (Alex) des Entwicklers Richard Haugland
AOTF	Acousto-optical tunable filters
BP	Bandpassfilter
BSA	Bovine serum albumin
CCD	Charge-coupled Device
CD	Cluster of differentiation
CLSM	Confocal laser scanning microscope
Cy	Cyanin
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
FITC	Fluorescein-Isothiozyanat
GAM	Goat anti mouse
HFT	Hauptfarbteiler
Ig	Immunglobulin
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MV	Massenverhältnis
NFT	Nebenfarbteiler
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMT	Photomultiplier tube
ROI	Region of interest
SA <sub>v</sub>	Streptavidin
SNR	Signal-to-noise ratio
UV	ultraviolett
Zenon	Patentierter Name der Fab-Fragment-Technik der Marke Molecular Probes®, benannt nach dem Lieblings-Cafe des Entwicklers (Zenon Cafe, Eugene, Oregon)

# 1 Einleitung

Vor über 60 Jahren entwickelte Albert Coons ein Verfahren zur Visualisierung von Antigen-Antikörperkomplexen (Coons et al., 1942) und bediente sich dabei als Erster der Fluoreszenzmarkierung. Er infizierte Mäuse mit Pneumokokken und markierte die später entnommenen histologischen Schnitte mit Pneumokokkenantikörpern. An die Antikörper koppelte er vorher einen fluoreszierenden Farbstoff ( $\beta$ -Anthryl-Isozyanat), um so die Antigen-Antikörperkomplexe mithilfe eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar zu machen. Diese Art der Fluoreszenztechnik wird auch noch heute in abgewandelter Form genutzt, um Antigene und spezifisch bindende Antikörper im Laboralltag und der Routinediagnostik für das menschliche Auge sichtbar zu machen. Allerdings waren die ersten durchgeführten Immunmarkierungen instabil und nicht sehr spezifisch. Sie blühten schnell aus und die Leistungsfähigkeit der damals verfügbaren Fluoreszenzmikroskope war ebenfalls nicht zufrieden stellend (Coons, 1971). So wurde nach neuen Methoden geforscht und enzymgekoppelte Antikörper entwickelt. Anstelle des Fluoreszenzfarbstoffes wurden Enzyme, z. B. Peroxidase, an den Antikörper gekoppelt (Avrameas und Uriel, 1966; Nakane und Pierce, 1966; Leduc et al., 1968; Nakane, 1968), welche in einem nachfolgenden Inkubationsschritt mithilfe der Diaminobenzidin-Reaktion sichtbar gemacht wurden. Eine weitere Methode der Immunhistochemie ist die Avidin-Biotin-Technik (Miller und Tausig, 1964; Lichstein und Birnbaum, 1965). Hierbei können sekundäre Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder mit einem Enzym (siehe 1.2.2) gekoppelt sein. Mit der Entwicklung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) Mitte der 80er Jahre (Übersicht: Amos und White, 2003) ergaben sich neue Möglichkeiten in der Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen. Die CLSM schuf Voraussetzungen zur Erforschung räumlicher Strukturen und Beziehungen im Mikrometerbereich und ermöglichte durch fortschreitende technologische Entwicklung die gleichzeitige Darstellung verschiedenster Fluorochrome unterschiedlicher Spektralbereiche.

Fluoreszenzmarkierungen gehören nach wie vor zu den am häufigsten angewandten immunhistochemischen Methoden. Dieses hängt nicht nur mit der relativ einfachen

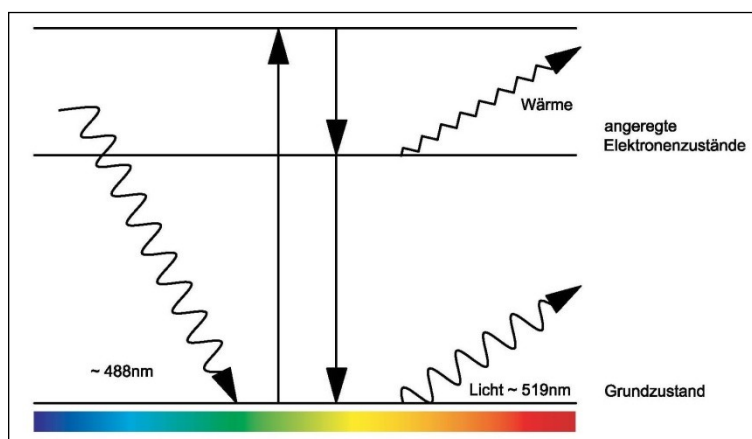
Handhabung zusammen, sondern auch mit der rasanten Entwicklung neuer technischer Geräte, Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe. Mittlerweile sind zahlreiche Farbstoffe, Antikörper und deren Fragmente einzeln oder in Kombination kommerziell verfügbar, um den Bedürfnissen und Fragestellungen angepasste Markierungen durchzuführen. Dennoch gelangt man trotz der angebotenen Vielfalt, bedingt durch den stetigen Wissensfortschritt und die neu entstehenden technischen Möglichkeiten, häufig an Grenzen. So ist die gleichzeitige Markierung mehrerer Oberflächenepitope in einem Präparat nicht oder nur mit hohem Arbeitsaufwand möglich (Staines et al., 1988; Hermiston et al., 1992) und wird weiter erschwert, wenn nur Primärantikörper derselben Spezies zur Verfügung stehen (Lewis Carl et al., 1993; Shindler und Roth, 1996). Doch gerade die simultane Darstellung verschiedenster Antigene ermöglicht häufig erst neue wissenschaftliche Erkenntnisse, beispielsweise beim Verständnis physiologischer Prozesse (De Rosa et al., 2003; Ishaque et al., 2008), der Erforschung mesenchymaler Stammzellen (Schieker et al., 2004) oder in der Tumorforschung (Stauffer et al., 2006; Morrish und Greider, 2009).

In dieser Arbeit wird eine immunhistochemische Methode untersucht, welche es ermöglicht, durch die Verknüpfung eines neuen Markierungsverfahrens und aktueller apparativer Technik, einwandfreie Mehrfachmarkierungen durchzuführen und darzustellen. Die Methode wurde systematisch erprobt und optimiert unter der Prämisse, Markierungen mit bis zu 4 monoklonalen Antikörpern derselben Spezies und Immunglobulinklasse in nur *einem* Inkubationsschritt effizient durchzuführen. Der Einsatz der CLSM ermöglicht hierbei die exakte spektrale Trennung der benutzten Fluoreszenzfarbstoffe und bildet damit die Grundlage einer korrekten Auswertung und Analyse der Daten.

## **1.1 Fluoreszenz**

In zahlreichen naturwissenschaftlichen Bereichen ist man auf die Visualisierung von Molekülen, Zellen und Antigenen in Geweben angewiesen. Hierfür wird häufig die Fluoreszenz genutzt. Fluoreszierende Farbstoffe werden an Antikörper gekoppelt, um die gesuchten Gewebsstrukturen zu markieren und sichtbar zu machen. Fluoreszenz ist

eine Art der Lumineszenz, welche nach dem fluoreszierenden Mineral Fluorit benannt wurde. Sie entsteht durch die Absorption von kurzwelligem, hochenergetischem Licht (Anregungslicht). Dadurch gelangen Elektronen des fluoreszierenden Moleküls auf ein höheres Energieniveau, jedoch können sie diesen energetisch höheren Zustand nicht lange beibehalten und fallen innerhalb von ca.  $10^{-8}$  Sekunden wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück (Wessendorf und Brelje, 1993). Die zuvor aufgenommene Energie wird dabei zu einem Teil in Form von Licht abgegeben, dem so genannten Fluoreszenzlicht. Dieses emittierte Licht ist energieärmer, von größerer Wellenlänge und strahlt damit auch in einer anderen Lichtfarbe als das Anregungslicht (Abbildung 1.1). Die Tatsache, dass kurzwelliges Licht absorbiert und im Vergleich dazu längerwelliges Fluoreszenzlicht emittiert wird, nennt man Stokes-Regel, nach seinem Entdecker George Gabriel Stokes. Das emittierte Licht besitzt im Normalfall eine ca. 20-50 nm größere Wellenlänge als das Anregungslicht.



**Abbildung 1.1: Prinzip der Fluoreszenzentstehung**

In der Immunhistochemie werden Fluoreszenzfarbstoffe an Antikörper gekoppelt, um Epitope sichtbar zu machen. Dafür sollten die Fluorochrome über besondere Eigenschaften verfügen, wie beispielsweise Reaktionsstabilität, geringe Bleichfähigkeit, hohe Leuchtkraft und pH-Unabhängigkeit. Diese speziellen Anforderungen erschwerten von Anfang an den Einsatz von Farbstoffen in der Immunfluoreszenz. Coons benutzte z. B. bei seinen ersten Markierungen einen blaufluoreszierenden Farbstoff (Anthrazen-Isozyanat), welcher sich nicht genügend vom Hintergrund abhob (Coons, 1971). In weiteren Experimenten synthetisierte er das Fluorescein-Isozyanat, welches gelbgrün

leuchtete und einen guten Kontrast zum Hintergrund bot, jedoch seine maximale Intensität im alkalischen und damit unphysiologischen pH-Bereich von ungefähr 9 entfaltete (Coons, 1958). Mit der Einführung des Fluorescein-Isothiozyanats (FITC) (Riggs et al., 1958) und der Entwicklung von Rhodamin-Derivaten als Alternative und Ergänzung zum FITC wurde die Immunfluoreszenz immer populärer. Zumal durch das Rhodamin nun auch ein Farbstoff zur Verfügung stand, welcher eine gute Lichtstabilität aufwies, einen guten Kontrast zur Autofluoreszenz des Gewebes bot und pH-unabhängig eingesetzt werden konnte (Nairn et al., 1969; Brandtzaeg, 1975; McKay et al., 1981; Entwistle und Noble, 1992). An Protein gekoppeltes Rhodamin verlor aufgrund von Interaktionen zwischen den Farbstoffmolekülen jedoch an Helligkeit (Ravdin und Axelrod, 1977; Valdes-Aguillera und Neckers, 1989) und auch das FITC, bedingt durch seine pH-Abhängigkeit und geringe Lichtstabilität (Benchaib et al., 1996), war noch kein optimaler Fluoreszenzfarbstoff. Die Entwicklung von Cyanin-Farbstoffen (Southwick et al., 1990; Mujumdar et al., 1993) brachte einen deutlichen Fortschritt. Aufgrund ihrer chemischen Struktur waren sie stabiler und heller als bisherige Fluoreszenzfarbstoffe (Wessendorf und Brelje, 1992). Dennoch verloren auch konjugierte Cy-Farbstoffe an Helligkeit. Außerdem wiesen sie zwischen unterschiedlichen Spektralbereichen (z. B. Cy3 und Cy5) erhebliche Intensitätsunterschiede auf (Gruber et al., 2000). Durch weitere chemische Modifizierung bei der Sulfonierung, welche ursächlich für die Fotostabilität der Cyanin-Farbstoffe ist (Mujumdar et al., 1993), entwickelte die Firma Invitrogen ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) vor einigen Jahren eine neue Generation von Fluoreszenzfarbstoffen. Diese neuen Alexa-Farbstoffe fluoreszieren gleich stark oder um ein Vielfaches stärker als Cy-Farbstoffe (Anderson und Nerurkar, 2002; Berlier et al., 2003), können bei pH-Werten zwischen 4 und 10 problemlos eingesetzt werden und sind wesentlich lichtstabiler als bisherige Fluoreszenzfarbstoffe (Panchuk-Voloshina et al., 1999). Alexa-Farbstoffe sind für Spektralbereiche vom Ultravioletten bis hin zum Infraroten erhältlich (Tabelle 1.1) und nach ihren ungefähren Anregungsmaxima benannt z. B. Alexa 350 oder Alexa 488. In dieser Arbeit werden die Farbstoffe Alexa 350, 488, 555, 594 und 647 verwendet.

Fluorochrom	Exzitationsmaximum	Emissionsmaximum	Emissionsfarbe
Alexa Fluor <sup>®</sup> 350	346 nm	442 nm	blau
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	495 nm	519 nm	grün
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555	555 nm	565 nm	orange
Alexa Fluor <sup>®</sup> 594	590 nm	617 nm	rot
Alexa Fluor <sup>®</sup> 647	650 nm	668 nm	rot - infrarot

Tabelle 1.1: Exzitations- und Emissionsmaxima der benutzten Alexa-Fluorochrome

## 1.2 Markierungstechniken

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit benutzten Markierungstechniken kurz beschrieben und erläutert. Hierzu gehören die direkte und indirekte Markierung sowie als erweitertes Beispiel der indirekten Markierungstechnik die Avidin-Biotin-Methode. Außerdem wird ausführlich auf die neu erprobte Fab-Fragment-Technik eingegangen.

### 1.2.1 Direkte Markierung

Die älteste Methode der Immunfluoreszenzmarkierung ist die direkte Markierung, welche erstmals von Coons (1942) beschrieben wurde. Hierbei ist ein primärer Anti-

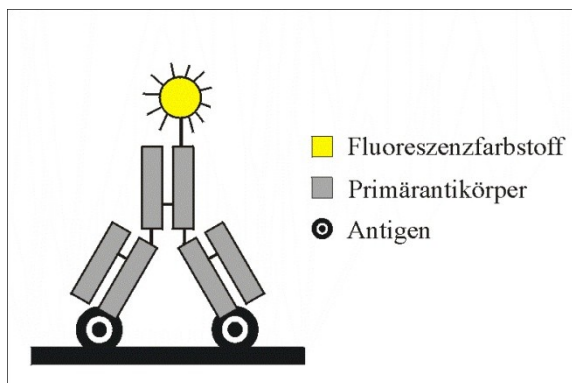


Abbildung 1.2: Direkte Markierung

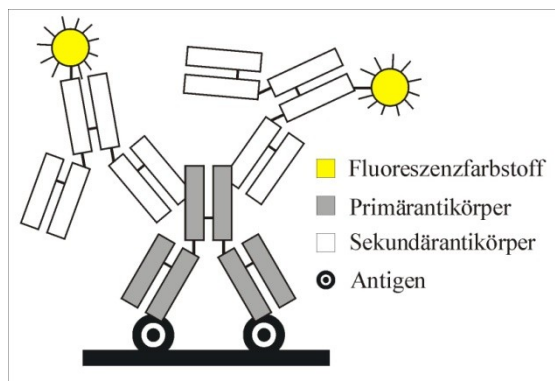
körper kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Dieser kann dann unmittelbar und in nur einem Arbeitsschritt auf das entsprechende Gewebe aufgetragen werden und markiert das gewünschte Antigen (Abbildung 1.2). Die Methode ist schnell und ungewünschte Kreuzreaktionen treten selten auf, da keine sekundären Antikörper benutzt werden. Es bindet jedoch nur *ein* direkt

konjugierter Primärantikörper am Epitop, dadurch kommt es zu keiner Signalverstärkung. Somit ist die Markierung im Vergleich zur indirekten Methode (siehe 1.2.2) etwas schwächer (Mao, 1999). Mit der direkten Markierungstechnik lassen sich durch die fehlende Signalverstärkung nur stark exprimierte Antigene sicher nachweisen. Häufig sind auch die benötigten direkt konjugierten Antikörper im Handel nicht erhält-

lich. Dieses grenzt die Einsatzmöglichkeiten der direkten Methode ebenfalls erheblich ein.

### 1.2.2 Indirekte Markierung

Für diese Art der Markierung wird ein unkonjugierter Primärantikörper benötigt, welcher an das Antigen bindet. Nachdem der Primärantikörper an das Antigen ge-

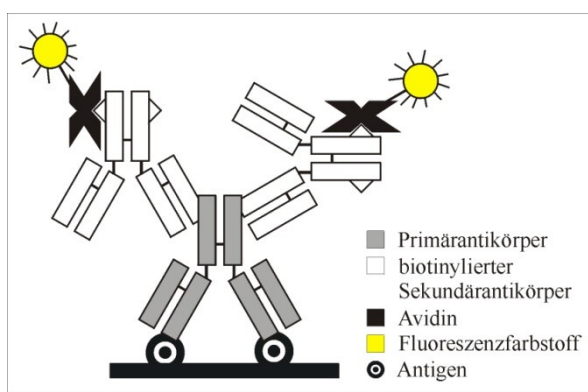


**Abbildung 1.3: Indirekte Markierung**

bunden hat, werden fluoreszenzkonjugierte Sekundärantikörper hinzugegeben, die gegen den Primärantikörper gerichtet sind (Abbildung 1.3). Durch die Möglichkeit der Kombination verschiedener Primär- und Sekundärantikörper ist diese Methode, im Vergleich zur direkten Markierung, wesentlich variabler einsetzbar. Sie ist außerdem sensitiver, da mehrere Sekundärantikörper am primären Antikörper binden und es somit, bedingt durch die Signalverstärkung, zu einer besseren Visualisierung kommt (Brelje, 2002). Jedoch können auch unerwünschte Reaktionen auftreten, wenn der sekundäre Antikörper mit Epitopen von Zellen des zu untersuchenden Gewebes oder eines anderen Primärantikörpers, z. B. bei Doppelmarkierungen, reagiert. Diese Kreuzreaktionen können durch Verwendung präabsorbierender Antiseren oder bei monoklonalen Antikörpern, durch Benutzung geeigneter Klone, minimiert oder ganz unterbunden werden. Ebenso kann es zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung durch hydrophobe Wechselwirkungen kommen. Um diese zu verhindern, können der Inkubationslösung Proteine hinzugefügt und so hydrophobe Bindungsstellen blockiert werden. Häufig benutzt man dazu Rinderserumalbumin (BSA) (McKinney et al., 1964, 1966; Hebert et al., 1967, 1971), alternativ besteht aber auch die Möglichkeit 1-5% Normalserum aus der Tierspezies des untersuchten Tieres zu verwenden.

### Avidin-Biotin-Methode

Es gibt zahlreiche Weiterentwicklungen der indirekten Markierungstechnik, welche alle auf dem beschriebenen indirekten Prinzip basieren. Stellvertretend soll an dieser Stelle die Avidin-Biotin-Methode (Guesdon et al., 1979) erläutert werden. Hierbei wird im ersten Schritt ein Primärantikörper auf das Gewebe gegeben und anschließend ein gegen den Primärantikörper gerichteter und mit Biotinmolekülen konjugierter Antikörper (biotinylierter Sekundärantikörper) aufgetragen. Im dritten Schritt wird dann fluorochromkonjugiertes Avidin hinzugegeben, welches eine hohe Affinität für Biotin aufweist (Abbildung 1.4). Es besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin. Diese werden aufgrund



**Abbildung 1.4: Biotin-Avidin Markierung**

grund der molekularen Ausrichtung aber nicht vollständig besetzt (Chaiet und Wolf, 1964). Die freien Bindungsstellen sowie die Tatsache, dass in vielen Geweben endogenes Biotin vorhanden ist (Wood und Warnke, 1981), sorgen häufig für eine unspezifische Hintergrundfärbung. Um diese zu minimieren, ist es möglich, das endogene Biotin durch vorherige Inkubation in einer Avidinlösung und anschließend in einer Biotinlösung zu blockieren (Wood und Warnke, 1981).

Bei der oben beschriebenen Methode wird anstelle des Avidins oft Streptavidin genutzt, welches erstmals von Tausig und Wolf (1964) in der Literatur beschrieben wurde. Aufgrund seiner chemischen Struktur weist Streptavidin weniger unspezifische Reaktionen mit Gewebebestandteilen auf als Avidin und wirkt sich somit günstiger auf die Markierung aus (Happerfield et al., 1993). Die Avidin-Biotin-Methode erlaubt den flexiblen Einsatz von Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen, da diese schnell ausgetauscht und auf einfache Art und Weise miteinander kombiniert werden können. Im Vergleich zur einfachen indirekten Markierung wird jedoch mindestens ein zusätzlicher Inkubationsschritt benötigt und somit die Markierungsdauer verlängert. Außerdem kommt es häufig zu falsch positiven Markierungen, da endogenes Biotin nicht immer zuverlässig blockiert werden kann (Wang und Pevsner, 1999). Für Mehrfachmarkierungen ist diese

---

Methode dennoch eine gute Ergänzung (van der Loos et al., 1987, 1989; Vervoordeldonk et al., 1996).

### **Probleme bei Mehrfachmarkierungen**

Zur Durchführung von Einfachmarkierungen sind die oben beschriebenen Markierungsverfahren ausreichend sensitiv und praktikabel einsetzbar, doch schon bei der Realisierung von Doppelmarkierungen limitieren sich die Einsatzmöglichkeiten dieser Methoden. Die einfachste Möglichkeit zur Durchführung einer Doppelmarkierung ist die Nutzung von zwei Primärantikörpern, welche jeweils direkt mit einem Fluorochrom konjugiert sind (Pryzwansky, 1982). Häufig sind die benötigten Direktkonjugate aber nicht im Handel erhältlich oder zeichnen sich durch eine geringere Sensitivität (Mao, 1999) im Vergleich zur indirekten Markierung aus. Deshalb werden indirekte Markierungstechniken bevorzugt. Sie bieten die Möglichkeit, Primärantikörper unterschiedlicher Spezies, z. B. Maus und Kaninchen, zu verwenden und diese dann variabel mit einem spezifischen fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper zu kombinieren (Pryzwansky, 1982; Ferri et al., 1997). Durch die Benutzung von Primärantikörpern differenter Spezies werden Kreuzreaktionen verhindert, da die benutzten Sekundärantikörper speziesspezifisch binden. Alternativ zu diesen Primärantikörpern können auch Primärantikörper unterschiedlicher Immunglobulinklassen, wie beispielsweise IgM und IgG, oder verschiedener Isotypen derselben Spezies, z. B. IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub>, verwendet werden (Tidman et al., 1981). Häufig ist die Nutzung unterschiedlicher Primärantikörper jedoch nicht möglich, da diese nicht erhältlich sind. Dann ist man gezwungen, Markierungen mithilfe von Primärantikörpern der gleichen Spezies durchzuführen. Hierfür wurden verschiedenste Techniken entwickelt (Überblick: Larsson, 1988). Um die Kreuzreaktionen aufgrund freier Antigenbindungsstellen des Sekundärantikörpers bei speziessgleichen Markierungen zu verhindern, bedarf es effektiver Blockierungsmethoden. Wang und Larsson (1985) beschrieben eine effektive Blockierungstechnik mittels Formaldehyddampf. Dieser Dampf inaktiviert die freien Anti-IgG-Bindungsstellen der Sekundärantikörper, jedoch maskiert er auch formaldehydsensitive Antigene und macht sie unauffindbar. Viele weitere Blockierungsmethoden wurden entwickelt. Tornehave et al. (2000) zeigten beispielsweise, dass die vorsichtige Nutzung von Mikrowellen die Kreuzreaktionen der Antikörper minimieren kann. Kroeber et al.

(1998) entwickelten eine Methode für Doppelmarkierungen, bei der die freien Bindungsstellen des ersten gebundenen Sekundärantikörpers mit Normalserum geblockt wurden und der zweite Sekundärantikörper an den entsprechenden Primärantikörper gekoppelt wurde, bevor dieser Antikörperkomplex auf das Gewebe gegeben wurde. Insgesamt muss man jedoch sagen, dass diese Blockierungsmethoden nicht immer sehr verlässlich funktionieren und häufig mit einem vergleichsweise großen Aufwand verbunden sind.

Eine hervorragende und einfache Methode zur Verhinderung von Kreuzreaktionen bei speziegleichen Markierungen stellt die Nutzung monovalenter Antikörper, so genannter Fab-Fragmente, als Sekundärantikörper dar (Negoescu et al., 1994; van der Loos und Gobel, 2000; Brouns et al., 2002; Ino, 2004). Die Fab-Fragmente besitzen nur *eine* freie Antigenbindungsstelle, welche, ist sie einmal gebunden, keine weiteren Reaktionen mehr eingehen kann (siehe 1.3). Somit können Kreuzreaktionen sicher vermieden werden. In leicht abgewandelter Form bietet die von Negoescu et al. (1994) beschriebene Fab-Fragment-Methode auch die Möglichkeit, Mehrfachmarkierungen mit vielen speziegleichen Primärantikörpern ohne aufwendige Blockierungstechniken und in nur *einem* Markierungsschritt zeitsparend durchzuführen. Alle bisher genannten Methoden, außer die direkte Markierungstechnik, benötigen mehrere Markierungsschritte und sind dadurch zeitintensiv. Zudem eignen sie sich häufig nicht für Markierungen mit mehr als zwei Primärantikörpern.

### 1.3 Die Fab-Fragment-Technik

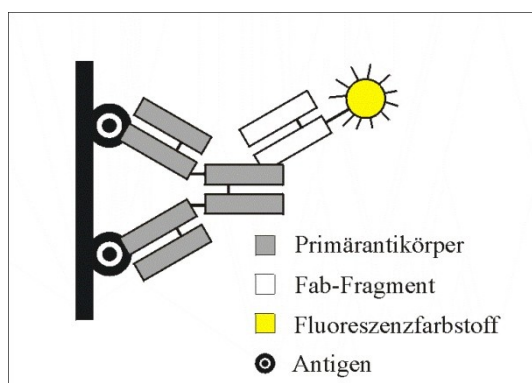


Abbildung 1.5: Fab-Fragment Markierung

Bei dieser Methode handelt es sich um eine modifizierte Art der indirekten Markierung. Jedoch ähnelt sie aufgrund ihres Baukastenprinzips auch stark der direkten Markierungstechnik, da Primär- und fluoreszenzkonjugierte Sekundärantikörper schon vor der Inkubation miteinander reagieren und erst dann als Antikörperkomplex auf das Gewebe aufgebracht werden (Abbildung 1.5, Abbildung 2.1).

Für diese Art der Markierung wird ein herkömmlicher Primärantikörper benötigt, welcher später an das gewünschte Epitop bindet. Das Besondere dieser Methode ist der Aufbau des Sekundärantikörpers. Dieser besteht lediglich aus *einem* variablen Anteil eines Antikörpers, dem Fab-Fragment (**fragment antigen binding**), welcher gegen den Primärantikörper gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Fab-Fragmente entstehen bei der proteolytischen Spaltung eines Immunglobulinmoleküls mittels Papain. Dabei wird es in drei Stücke geteilt: zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Ein vollständiger Antikörper besitzt zwei variable Regionen, die jeweils aus einer leichten und einer schweren Kette bestehen. Sie bestimmen die Antigen-spezifität des Antikörpers (Janeway et al., 2002). Häufig bindet der Antikörper jedoch nur mit *einer* variablen Region an das Antigen. Der zweite variable Anteil bleibt ungebunden und kann somit zu Kreuzreaktionen führen, welche die Ergebnisse verfälschen und die Auswertung von Experimenten erschweren können. Die Verwendung von Fab-Fragmenten hat den Vorteil, dass sie jeweils nur *eine* freie Bindungsstelle aufweisen, mit welcher sie nicht kovalent an den Primärantikörper binden. Unspezifische Reaktionen können somit auf ein Minimum reduziert werden (Negoescu et al., 1994). Mit Blick auf die Durchführung von Mehrfachmarkierungen weist diese Methode noch einen weiteren enormen Vorteil auf. Sie bietet die Möglichkeit, mehrere Primärantikörper derselben Spezies gleichzeitig zu nutzen (Wessel und McClay, 1986; Negoescu et al., 1994; Brown et al., 2004), welche zudem auch der gleichen Immunglobulinklasse

angehören können (siehe 2.2.3). Eine einfache Handhabung und Logistik ist somit gewährleistet.

## **1.4 Zielsetzung**

Diese Arbeit hat zum Ziel, eine Methode zu erproben und zu optimieren, welche es ermöglichen soll, im Laboralltag schnell und effektiv mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen und monoklonalen Fab-Fragmenten derselben Immunglobulinklasse, mehrere Oberflächenepitope gleichzeitig zu markieren.

Hierfür sollen verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Wie sehen die Eigenschaften der verwendeten Antikörper und Farbstoffe in Bezug auf Handhabung, Stabilität und Kreuzreaktivität aus?
2. Sind Mehrfachmarkierungen mit speziegleichen Antikörpern problemlos durchführbar oder kommt es dabei zu Kreuzreaktionen?
3. Welche technischen Möglichkeiten und Grenzen bietet die Fluoreszenzmikroskopie unter Berücksichtigung der Zielsetzung?
4. Wie können bestehende Markierungsprotokolle hinsichtlich ökonomischer Aspekte und unter Beibehaltung vergleichbarer oder besserer Resultate modifiziert werden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Gewebeproben und Verarbeitung

Für die Arbeit wurden menschliche Tonsillae palatinae verwendet, welche bei routinemäßigen Tonsillektomien (n=32) an der Ludwig-Maximilians-Universität München entnommen wurden. Die klinischen Indikationen für die Entnahme waren Hyperplasien und chronische Entzündungen, wobei die Operationen im entzündungsfreien Intervall vorgenommen wurden. Gewebe, welche akute Entzündungszeichen oder pathologische Veränderungen aufwiesen, wurden von den Experimenten ausgeschlossen. Die Benutzung der Tonsillen wurde durch die Ethikkommission und durch das schriftliche Einverständnis aller Patienten genehmigt. Teile der Tonsillen wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Mithilfe eines Kryostaten (Modell Leitz 1720, Wetzlar, Deutschland) wurden aus den gefrorenen Gewebelöcken  $7\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgetragen und bei Raumtemperatur mithilfe eines Ventilators 2 Stunden getrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Direkt vor der Markierung erfolgte eine Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger in einem Gemisch aus Methanol und Aceton (Verhältnis 1:1) für 10 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurden die Schnitte weitere 5 Minuten in PBS gespült und dann sofort markiert.

## 2.1.2 Antikörper, Reagenzien und Geräte

### Antikörper

<b>Primärantikörper</b>	<b>Clone</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Vimentin (Mouse) IgG <sub>1</sub>	V9	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-Vimentin (Mouse) IgG <sub>1</sub> Cy3	V9	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CD3 Anti-Human-IgG <sub>1</sub> (Mouse)	T3-4B5	DAKO, Glostrup, Dänemark
CD4 Anti-Human-IgG <sub>1</sub> (Mouse)	MT 310	DAKO, Glostrup, Dänemark
CD8 Anti-Human-IgG <sub>1</sub> (Mouse)	DK 25	DAKO, Glostrup, Dänemark
CD11c Anti-Human-IgG <sub>1</sub> (Mouse)	KB 90	DAKO, Glostrup, Dänemark
CD19 Anti-Human-IgG <sub>1</sub> (Mouse)	HD 37	DAKO, Glostrup, Dänemark
CD20 Anti-Human-IgG <sub>1</sub> (Mouse)	B-Ly1	DAKO, Glostrup, Dänemark
CD38 Anti-Human-IgG <sub>1</sub> (Mouse)	AT 13/5	DAKO, Glostrup, Dänemark
CD56 Anti-Human-IgG <sub>1</sub> (Mouse)	T 199	DAKO, Glostrup, Dänemark
CD68 Anti-Human-IgG <sub>1</sub> (Mouse)	EBM 11	DAKO, Glostrup, Dänemark

**Tabelle 2.1: Monoklonale Primärantikörper**

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>
GAM Alexa 350 IgG <sub>1</sub>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
GAM Alexa 488 IgG <sub>1</sub>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
GAM Alexa 555 IgG <sub>1</sub>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
GAM Alexa 647 IgG <sub>1</sub>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
GAM Cy3 IgG <sub>1</sub>	Dianova, Hamburg, Deutschland
GAM Cy5 IgG <sub>1</sub>	Dianova, Hamburg, Deutschland
Streptavidin Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin Alexa Fluor 555	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin Alexa Fluor 633	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Zenon Mouse IgG <sub>1</sub> Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Zenon Mouse IgG <sub>1</sub> Alexa Fluor 555	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Zenon Mouse IgG <sub>1</sub> Alexa Fluor 594	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Zenon Mouse IgG <sub>1</sub> Alexa Fluor 647	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Zenon Mouse IgG <sub>1</sub> Alexa Fluor Biotin XX	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 2.2: Monoklonale Sekundärantikörper**

### Reagenzien

Hoechstfarbstoff 33258	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Humanserum 5%	Transfusionsmedizin, Lübeck, Deutschland
Mowiol	Hoechst, Frankfurt a.M., Deutschland
Phosphate-buffered saline (PBS)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Geräte

LSM 510 META Zeiss, Jena, Deutschland

Software

Adobe Photoshop 6.0 Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA

Excel Office XP Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland

LSM 5 Image Examiner Zeiss, Jena, Deutschland

LSM 510 META 3.2 Zeiss, Jena, Deutschland

SigmaPlot 7.0 Systat Software, Erkrath, Deutschland

SPSS 14.0 SPSS GmbH, München, Deutschland

**2.2 Arbeitsprotokolle****2.2.1 Direkte Markierung**

Auf den Schnitt wurden 100 µl eines fluorochrommarkierten Primärantikörpers in optimaler Konzentration gegeben und für eine Stunde inkubiert. Die darauf folgende einstündige Lagerung der Objektträger in einer Lösung mit Hoechstfarbstoff diente der Markierung der Zellkerne. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Mowiol benetzt und

	<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Dauer</b>
1.	Methanol/Aceton (1:1) (-20°C)	10 min
2.	Spülen in PBS-Puffer	5 min
3.	Primärantikörper hinzugeben	60 min
4.	Spülen in PBS-Puffer	3 x 5 min
5.	Hoechstfarbstoff	60 min
6.	Spülen in PBS-Puffer	3 x 5 min
7.	Eindecken in Mowiol	

**Tabelle 2.3: Arbeitsprotokoll einer direkten Markierung**

unter einem Deckglas eingeschlossen. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die Schnitte jeweils dreimal für 5 Minuten in PBS gespült (siehe Tabelle 2.3). Um ein Ausbleichen der Markierungen zu verhindern, erfolgte eine lichtgeschützte Aufbewahrung der Objektträger.

### 2.2.2 Indirekte Markierung

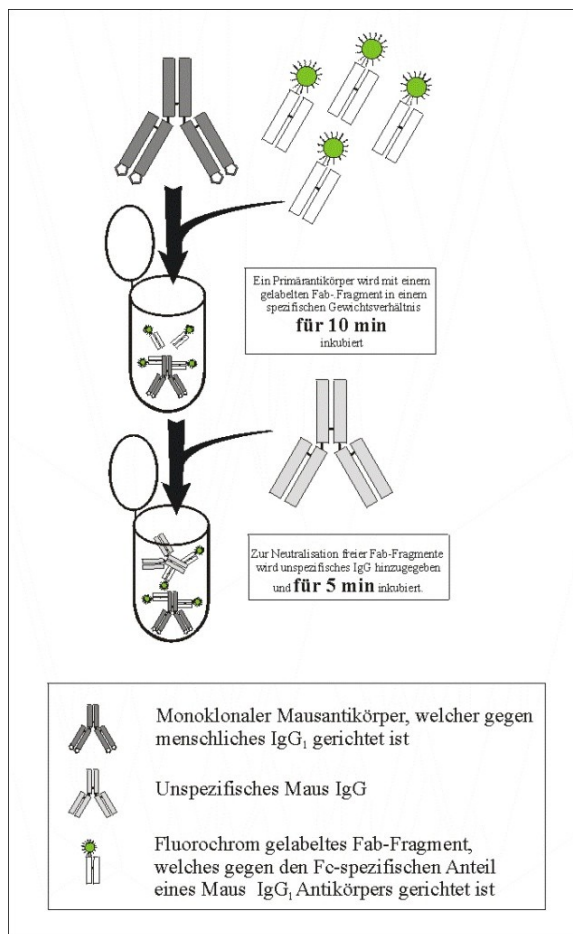
Bei der indirekten Markierung wurde, analog zur direkten Markierung, der Primärantikörper in optimaler Konzentration auf den Schnitt gegeben. Nach einstündiger Inkubation und Spülung erfolgte die Auftragung eines fluorochromkonjugierten Sekundärantikörpers im erprobten optimierten Verdünnungsverhältnis, welcher ebenfalls für eine weitere Stunde in einem lichtgeschützten Behälter inkubiert wurde. Als Verdünnungsmedium wurde 5-prozentiges Humanserum benutzt, um unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren. Nach erneuter Spülung in PBS erfolgte die Inkubation mit Hoechstfarbstoff für 1 Stunde und anschließender Eindeckung in Mowiol (siehe Tabelle 2.4). Um ein Ausbleichen der Markierungen zu verhindern, wurden die Objektträger lichtgeschützt gelagert.

	<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Dauer</b>
<b>1.</b>	Methanol/Aceton (1:1) (-20°C)	10 min
<b>2.</b>	Spülen in PBS-Puffer	3 x 5 min
<b>3.</b>	Primärantikörper	60 min
<b>4.</b>	Spülen in PBS-Puffer	3 x 5 min
<b>5.</b>	Sekundärantikörper	60 min
<b>6.</b>	Spülen in PBS-Puffer	3 x 5 min
<b>7.</b>	Hoechstfarbstoff (Verdünnung: 1:10000)	60 min
<b>8.</b>	Spülen in PBS-Puffer	3 x 5 min
<b>9.</b>	Eindecken in Mowiol	

**Tabelle 2.4: Arbeitsprotokoll einer indirekten Markierung**

### 2.2.3 Markierungen mit der Fab-Fragment-Technik

Eine Besonderheit dieser Technik, im Vergleich zur herkömmlichen indirekten Markierung, ist die Tatsache, dass die Reaktion des Primärantikörpers mit dem Sekundärantikörper schon im Reaktionsgefäß stattfindet und nicht erst auf dem Objektträger (siehe Abbildung 2.1). Der fertige Antikörperkomplex wird dann auf den Objektträger aufgetragen. Das Vorgehen erfolgt prinzipiell nach dem Protokoll des Herstellers (Haugland, 2002).



**Abbildung 2.1: Herstellung eines Antikörperkomplexes mithilfe von Fab-Fragmenten**

1. Mischung des primären Mausentkörpers mit einem Fc-spezifischen fluoreszenzmarkierten Fab-Fragment, welches gegen Maus-Immunglobulin gerichtet ist, in einem Massenverhältnis von 1:1 für 10 Minuten.

2. Hinzugabe von unspezifischem Maus-Immunglobulin und Inkubation für 5 Minuten, um die ungebundenen Fab-Fragmente zu blockieren.

3. Herstellung der gewünschten Verdünnung und Verarbeitung innerhalb von 30 Minuten.

Der weitere Arbeitsablauf (Tabelle 2.5) gleicht dem der direkten Markierung (siehe 2.2.1).

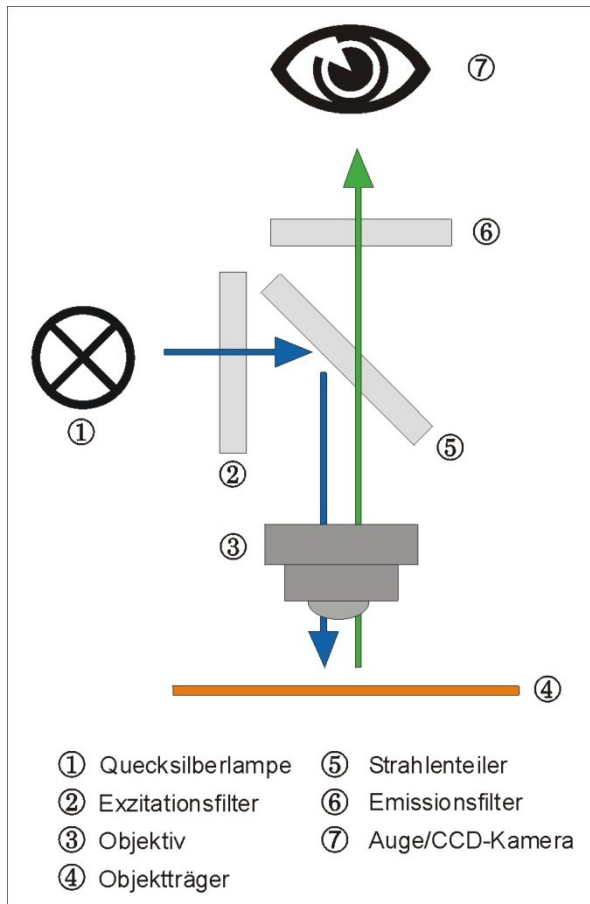
	<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Dauer</b>
<b>1.</b>	Methanol/Aceton (1:1) (-20°C)	10 min
<b>2.</b>	Spülen in PBS-Puffer	5 min
	<i>Herstellung des Antikörperkomplexes erfolgt vor oder parallel zu Schritt 1 und 2 (siehe Abbildung 2.1).</i>	15 min
<b>3.</b>	Antikörperkomplex	60 min
<b>4.</b>	Spülen in PBS-Puffer	3 x 5 min
<b>5.</b>	Hoechstfarbstoff (Verdünnung: 1:10000)	60 min
<b>6.</b>	Spülen in PBS-Puffer	3 x 5 min
<b>7.</b>	Eindecken in Mowiol	

**Tabelle 2.5: Arbeitsprotokoll einer Fab-Fragment-Markierung**

## 2.3 Fluoreszenzmikroskopie

### 2.3.1 Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie

Für die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie werden Mikroskope genutzt, welche sich von herkömmlichen Lichtmikroskopen durch eine besondere Lichtquelle und



spezielle Filter unterscheiden. Die Lichtquelle für die Fluoreszenzmikroskopie muss eine extrem hohe Leuchtdichte besitzen, damit eine intensive Fluoreszenzstrahlung entstehen kann. Hierfür haben sich Quecksilberhochdrucklampen bewährt. Sie sind hell und die ausgestrahlten Wellenlängen liegen im Bereich der Absorptionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe. Um auch exakt nur den für die Anregung des Farbstoffes notwendigen Wellenlängenbereich zu nutzen, verwendet man Exzitationsfilter. Diese lassen nur das Licht mit der entsprechenden Anregungswellenlänge (Bandpassfilter) passieren. Bevor das Licht auf das zu

**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops**

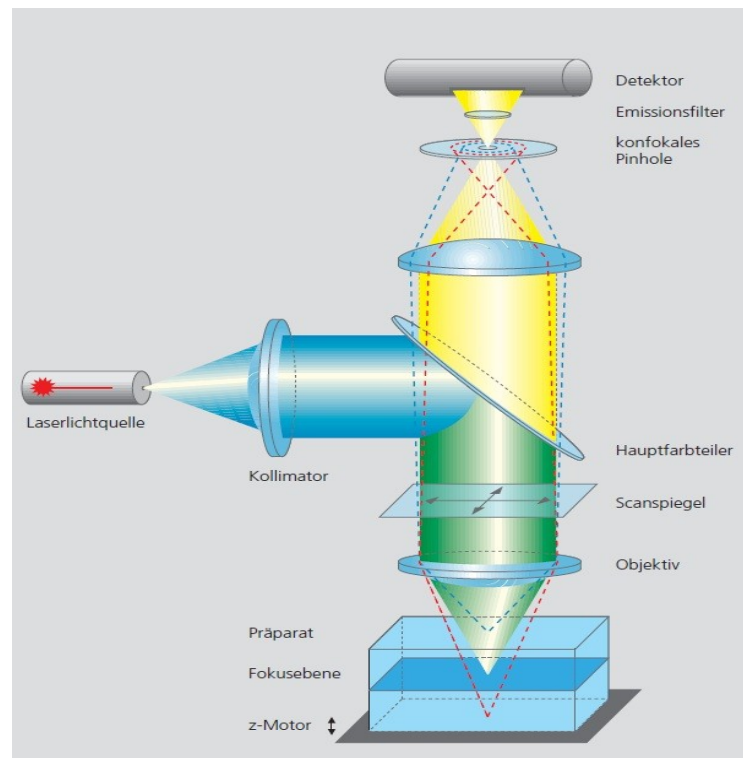
untersuchende Objekt strahlt, wird es durch einen dichroitischen Spiegel (Strahlenteiler) im Winkel von  $90^\circ$  reflektiert und so auf das Objekt gelenkt. Dieser Spiegel reflektiert kurzwelliges Licht, welches zur Anregung der Fluoreszenz verwendet wird. Für das entstehende längerwellige Fluoreszenzlicht ist der Spiegel durchlässig, so kann die auf dem Objekt entstehende Fluoreszenzstrahlung auf dem gleichen Weg zurückstrahlen und den Strahlenteiler ungehindert passieren (Abbildung 2.2). Bevor die Abbildung des Bildes auf der Retina oder einer CCD-Kamera erfolgt, wird das Licht noch einmal mithilfe eines Emissionsfilters aufgetrennt, welcher die Aufgabe hat, nur das gewünschte Spektrum des emittierten Lichtes durchzulassen. Grundsätzlich

sollten die Filter so gewählt werden, dass ein ausreichend starkes Bildsignal mit möglichst wenig unspezifischem Hintergrundrauschen (SNR=Signal-to-Noise-Ratio) entsteht.

### **2.3.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

Das erste Mikroskop mit konfokalen Eigenschaften wurde 1955 von Minsky entwickelt und patentiert (Minsky, 1988). Damals fehlten ausreichend helle Lichtquellen und Möglichkeiten der technischen Verarbeitung, sodass eine überzeugende experimentelle Demonstration eines Konfokalmikroskops erst durch Brakenhoff et al. (1979) an der Universität Amsterdam gelang. 1985 beschrieben van der Voort et al. das erste System, welches einen Laser als Lichtquelle nutzte und über eine ausgereifte Scantechnologie verfügte. Heute ermöglichen konfokale Laser-Scanning-Mikroskope (CLSM) in Kombination mit leistungsfähigen Computern und ausgereifter Software die räumliche Erforschung biologischer Strukturen und die simultane Darstellung sowie spektrale Trennung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe (Schubert, 1991; Brelje et al., 2002). Für diese Arbeit war besonders der letzte Punkt von großer Bedeutung, da teilweise bis zu 5 Fluoreszenzspektren getrennt werden mussten.

In der konfokalen Mikroskopie scannt ein Laserstrahl das Objekt Punkt für Punkt in einer Ebene ab (siehe Abbildung 2.3). Aus den einzelnen Punkten wird ein Bild berechnet und auf einem Monitor abgebildet. Das Scannen ist nicht nur auf die xy-Ebene beschränkt, sondern kann auch in der xz-Ebene stattfinden (Robenek, 1995). So werden optische Schnitte des Objekts erzeugt, welche zu dreidimensionalen Bildern zusammengefügt werden können. Durch die Beleuchtung einzelner Punkte in einer Ebene werden Strukturen außerhalb der Fokusebene nicht mit abgebildet. Dadurch minimiert sich das Streulicht und die Bildqualität verbessert sich (Wright und Wright, 2002). Um das Streulicht, welches aus der Umgebung der Fokusebene einstrahlt, noch effektiver zu minimieren, kommen Lochblenden (Pinholes) zur Anwendung. Die Pinholes befinden sich im abbildenden Strahlengang und können vergrößert oder verkleinert werden, um die Helligkeit und Tiefenschärfe zu regulieren (Wessendorf und Brelje, 1993).

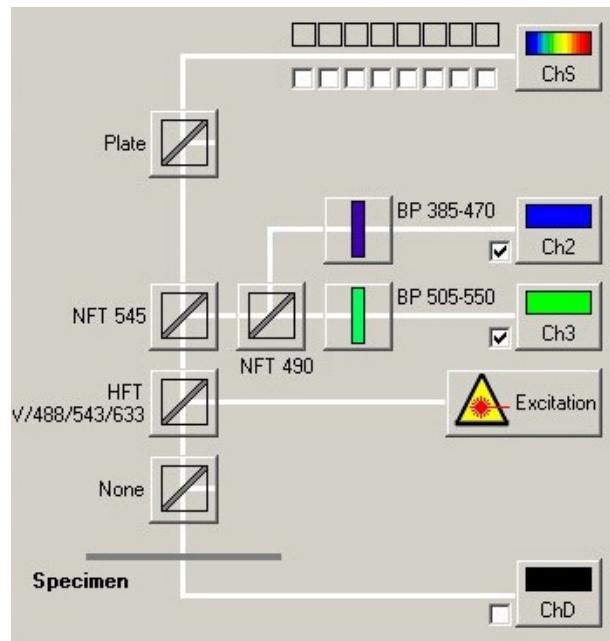


**Abbildung 2.3: Konfokales Prinzip**

Über Fiberoptiken und Kollimatoren wird das Laserlicht in die Scaneinheit geleitet. Die Kollimatoren gewährleisten das exakte Zusammentreffen der Laserstrahlen in der Fokusebene. Der Laserstrahl wird am Hauptfarbteiler reflektiert und über einen Scanner auf das Präparat gelenkt. Das dort entstehende Fluoreszenzlicht strahlt zurück und passiert den Hauptstrahlenteiler. Mithilfe einer Lochblende wird das im emittierten Licht enthaltene Streulicht reduziert. Durch einen Photomultiplier wird das Fluoreszenzsignal detektiert und anschließend auf einem Monitor dargestellt. Die Abbildung stammt von der Firma Carl Zeiss.

Für die simultane Darstellung mehrerer fluorochrommarkierter Antigen-Antikörper-Komplexe wurde in dieser Arbeit das Zeiss LSM 510 META als inverses Mikroskop genutzt. Zur optimalen Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe standen 4 Laser unterschiedlicher Gasgemische, bestehend aus Argon, Helium und Neon, zur Verfügung. Damit wurden vom UV- bis zum Infrarot-Bereich alle Wellenlängen abgedeckt (1. Ar-Laser (351, 364 nm), 2. Ar-Laser (458, 477, 488, 514 nm), 3. HeNe-Laser (543 nm), 4. HeNe-Laser (633 nm)). Die Nutzung von Lasern unterschiedlicher Wellenlängen ist gerade für die Visualisierung von Mehrfachmarkierungen sinnvoll. Hier können Fluorochrome, deren Anregungswellenlänge im Bereich der ausgestrahlten Wellenlänge eines Lasers liegt, mit diesem kombiniert werden. Das erhöht nicht nur die Intensität der

Abbildung (Mossberg et al., 1990), sondern vermindert auch die Anregung von Farbstoffen anderer Wellenlängenbereiche, dem so genannten „cross-talk“ (Wright und Wright, 2002). Um die Intensität der Abbildung weiter zu erhöhen, werden auch akustooptisch einstellbare Filter (AOTF) genutzt (Hoyt, 1996). Diese können exakt für die Anregungsmaxima der Farbstoffe justiert werden und ersetzen damit die z. B. in der konventionellen Mikroskopie eingesetzten Anregungsfilter. Die Fluoreszenzsignale werden durch Photomultiplier (PMT, engl.: photomultiplier tube) elektronisch detektiert und als digitales Bild abgespeichert. Das für diese Untersuchung genutzte Zeiss LSM 510 META besitzt 3 PMTs, diese ermöglichen bei Mehrfachmarkierungen die simultane Darstellung mehrerer Fluorochrome (Wright und Wright, 2002). Um die gleichzeitige Darstellung der Fluorochrome zu ermöglichen, ist neben der optimalen Auswahl von Fluorochromen und Lasern auch eine sinnvolle Kombination entsprechender Strahlenteiler und Emissionsfilter nötig (siehe Abbildung 2.4).



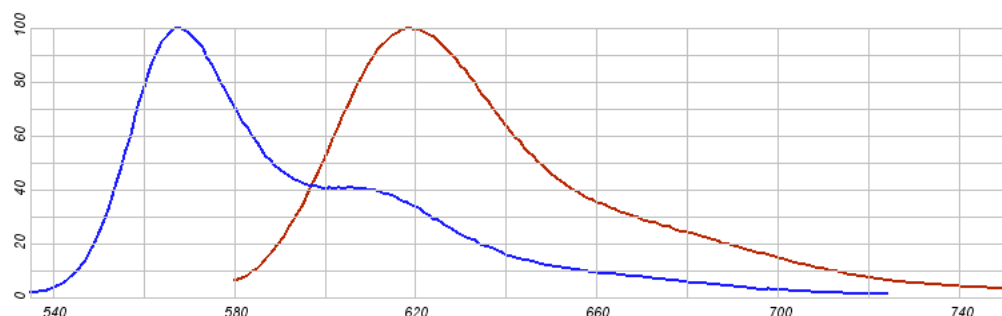
**Abbildung 2.4: Anordnung der Filter und Strahlenteiler für eine Mehrfachmarkierung**

Durch die Benutzung von Strahlenteilern und Filtern werden die emittierten Wellenlängen spektral getrennt und können separat detektiert werden. Am Hauptfarbteiler (HFT) wird der Laserstrahl reflektiert und auf die Probe gelenkt. Das dort entstehende Fluoreszenzlicht strahlt zurück durch den HFT und wird mithilfe von Nebenfarbteilern (NFT) weiter aufgetrennt. Der NFT 545 ist durchlässig für Wellenlängen von über 545 nm und ermöglicht somit die Aufzeichnung weiterer Fluoreszenzen auf dem „META“-Kanal (ChS). Wellenlängen von unter 545 nm werden reflektiert und am NFT 490 erneut getrennt. Bandpassfilter (BP) ermöglichen eine weitere Einengung der Fluoreszenzsignale. Wellenlängen zwischen 385 und 470 nm (z. B. Hoechstfarbstoff) können auf dem zweiten PMT (Ch2) detektiert werden. Der dritte PMT (Ch3) ermöglicht die Detektion von Fluoreszenzen im Bereich von 505 bis 550 nm (z. B. Alexa 488).

Für die Aufzeichnung der Mehrfachmarkierungen wurde in dieser Arbeit der Multi-Track-Modus genutzt. Multi-Track-Modus bedeutet, dass die Fluorochrome nacheinander visualisiert werden. Im ersten Scandurchlauf wird beispielsweise nur das Fluorochrom Alexa 488 mit dem Laser der optimalen Anregungswellenlänge (Ar-Laser, 488 nm) angeregt und abgebildet. Im nachfolgenden Durchlauf erfolgt dann die Darstellung von Alexa 555 unter Nutzung des HeNe-Lasers (543 nm). Diese Methode ist deutlich spezifischer (Montag et al., 1991; Wessendorf und Brelje, 1993; Carlsson und Liljeborg, 1997) im Vergleich zum Single-Track-Modus, wo ein Laser derselben Wellenlänge zur

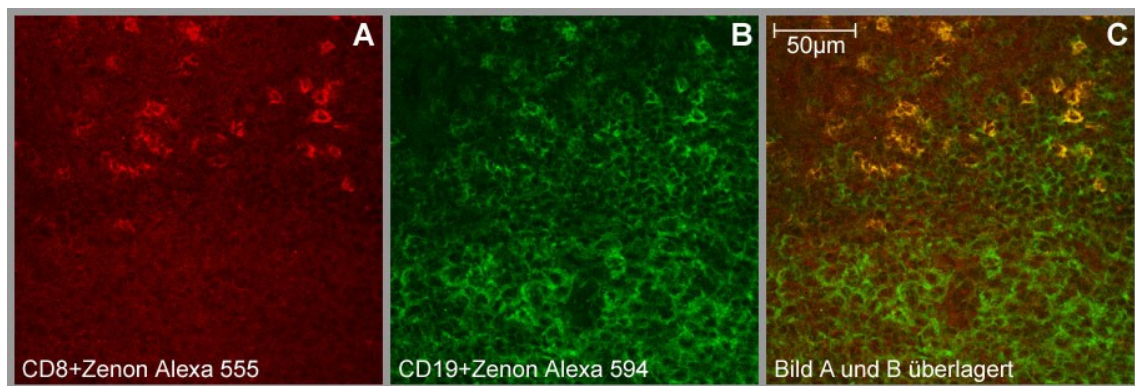
gleichzeitigen Anregung mehrerer Fluorochrome (z.B. Alexa 488 und Alexa 555) genutzt wird. Außerdem kommt es im Single-Track-Modus häufig zu falsch positiven Signalen (Carlsson und Mossberg, 1992; Brelje et al., 1993), da die Farbstoffe teilweise nicht mit der optimalen Wellenlänge angeregt werden und durch die benutzten Filtersätze häufig eine ausreichende spektrale Trennung technisch nur schwer möglich ist.

Aber auch im Multi-Track-Modus kann es durch die Nutzung von Fluorochromen mit dicht beieinander liegenden Spektralbereichen zu verfälschten Ergebnissen bei Mehrfachmarkierungen kommen. Ursächlich hierfür sind die unterschiedlichen Eigenschaften der fluorochromkonjugierten Antikörperkomplexe in Bezug auf die Antigenaffinität sowie die Antigenexprimierung und die dadurch mitbeeinflusste Leuchtintensität. Markiert man beispielsweise ein stark exprimiertes Antigen (z. B. CD3) mit dem Fluorochrom Alexa 555, so hat diese Markierung eine hohe Leuchtintensität. Zeichnet man nun in einem weiteren Track das Signal eines schwächer exprimierten Antigens auf, für dessen Markierung Alexa 594 benutzt wurde, so kann die Leuchtintensität dieser Markierung geringer ausfallen. Durch die sehr eng beieinander liegenden und überlappenden Emissionsspektren von Alexa 555 und 594 können die Spektralbereiche nur schwer voneinander getrennt werden. Dadurch kann es bei der Aufzeichnung des Signals für die fluorochromkonjugierte Alexa 594-Markierung zur Mitabbildung (Cross-talk) der kräftig leuchtenden und mit Alexa 555 konjugierten Markierung kommen (siehe Abbildung 2.6) (Kumar et al., 1999). Verständlicher wird das Problem bei der Betrachtung der Emissionsspektren der beiden Fluorochrome in der Abbildung 2.5.



**Abbildung 2.5: Emissionsspektren von Alexa 555 (blau) und Alexa 594 (rot)**

Man erkennt deutlich die überlappenden Emissionsspektren (x-Achse in nm) der beiden Fluorochrome. Beim Emissionsmaximum von Alexa 594 (617 nm) beträgt die Emissionsstärke von Alexa 555 noch ca. 40%.



**Abbildung 2.6: Cross-talk zwischen Fluorochromen Alexa 555 und Alexa 594**

Die im Bild A CD8-positiv markierten Areale erscheinen auch im Bild B positiv. Gut erkennt man dieses auch an den gelben Markierungen in Bild C. Eine Kolo-kalisation von CD8-Antigenen (Zytotoxische T-Zellen) und CD19-Antigenen (B-Zellen) ist in der Literatur nicht beschrieben. Ursächlich für diese falsch positiven Markierungen in Bild B sind die überlagerten Fluoreszenzspektren von Alexa 555 und 594. Beide Bilder (A und B) wurden in verschiedenen Tracks aufgezeichnet, jedoch mit dem gleichen monochromatischen Laserlicht (HeNe-Laser, 543 nm) angeregt. Die Bandpassfilter waren mithilfe des META-Kanals im Bereich der Emissionsmaxima beider Fluorochrome eng eingestellt. Da jedoch das Fluoreszenzspektrum von Alexa 555 deutlich in das von Alexa 594 hineinreicht, kam es zu einer Mitabbildung der CD8-positiven Zellen im Fluoreszenzspektrum von Alexa 594.

### Emission Fingerprinting

Mit dem Zeiss LSM 510 META-Konfokalmikroskop besteht durch das „Emission Fingerprinting“ eine weitere Möglichkeit der simultanen Aufzeichnung von Mehrfachmarkierungen. Hierbei müssen die Fluoreszenzspektren der benutzten Fluorochrome bekannt und in einer Datenbank hinterlegt sein. Das gesamte Fluoreszenzspektrum der Mehrfachmarkierung wird in einem Scan ermittelt, mithilfe der hinterlegten Fluoreszenzspektren mathematisch analysiert und aus diesen Daten die Bilder berechnet (Dickinson et al., 2001). In Vorversuchen für diese Arbeit gelang die Trennung der 5 Fluoreszenzspektren mit dieser Methode ausreichend, jedoch war das Signal-Rausch-Verhältnis schlechter als beim Single-Track-Modus. Aus diesen Gründen wurde für alle Experimente mit Mehrfachmarkierungen der Multi-Track-Modus benutzt.

## 2.4 Messmethode

Um die untersuchten Kriterien objektiv beurteilen und miteinander vergleichen zu können, wurde die Helligkeit der Fluoreszenzmarkierungen als Richtmaß genommen, wobei auf konstante experimentelle Voraussetzungen geachtet wurde. Alle Bilder wurden mit dem Objektiv C-Apo 40/1,2W Korr und einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln im 12-Bit-Modus (4096 Graustufen) aufgenommen. Innerhalb eines Experimentes galten die gleichen Einstellungen für Pinholes, Detektoren und Laser. Zwischen verschiedenen Experimenten können diese Einstellungen variieren.

Zur grafischen Darstellung von Intensitäten können Histogramme genutzt werden. Hier werden Pixel in Abhängigkeit von ihren Helligkeitswerten und Häufigkeiten abgebildet und als Kurve mit einem entsprechenden Maximum dargestellt. Das Maximum muss nicht dem Intensitätsmaximum der spezifisch markierten Areale entsprechen, sondern kann auch das Maximum der unspezifischen Hintergrundmarkierung abbilden. Dieses tritt auf, wenn der Hintergrund (Background) einen größeren Anteil im Bild einnimmt, als das spezifisch markierte Objekt (Abbildung 2.7, Bild A). In solchen Fällen können die Intensitätsmaxima nicht zur Auswertung und dem Vergleich von Fluoreszenzmarkierungen dienen. Eine Alternative bietet die Nutzung von Schwellenwerten. Mithilfe eines manuell eingestellten unteren Schwellenwertes (Threshold) besteht die Möglichkeit den Background auszublenden und so von der spezifischen Markierung zu trennen (Abbildung 2.7, Bild B). Durch die zusätzliche Einstellung eines oberen Grenzwertes (Abbildung 2.7, Bild C) können unspezifische Farbstoffakkumulationen subjektiv und im Vergleich mit dem mikroskopischen Bild eliminiert werden. Bei der Einstellung der Laserintensität ist darauf zu achten, dass es zu keiner Übersteuerung des Bildes kommt, da sonst die Werte der absoluten maximalen Intensität bzw. des oberen Thresholds nicht verwertbar sind. Aus beiden Schwellenwerten kann die Intensitätsbreite berechnet werden.

Zur Bestimmung der Intensitätsbreite, welche in dieser Arbeit als Kriterium für die Helligkeit einer Markierung genutzt wird, wird die Differenz von oberem und unterem

Threshold ermittelt. Die angegebenen Intensitäten in dieser Arbeit sind Mediane. Hierfür wurden mehrere Regionen (n=5) eines Schnittes untersucht und ausgewertet.

Die Nutzung von Schwellenwerten zur Intensitätsmessung wurde von mir weiter entwickelt und genutzt, da andere Ansätze zur Bestimmung der mittleren Intensität einer Markierung für diese Arbeit nicht brauchbar waren. So kam es, wie oben schon beschrieben, bei schwach markierten Geweben oder wenig positiv markierten Zellen, aufgrund des quantitativ überlegenden Backgrounds, in den Histogrammen nicht zur Darstellung von Intensitätsmaxima spezifisch markierter Zellen. Auch die separate Messung von einzelnen positiv markierten Zellen, der so genannten Region of interest (ROI), war nicht geeignet, da zum einen bei schwach markierten Geweben diese Regionen nicht sicher bestimmt werden konnten und zum anderen die Ergebnisse durch die subjektive Auswahl der Regionen stark variierten. Die Methode der Threshold-Messung ist zwar ebenfalls von den subjektiven Wahrnehmungen des Untersuchers abhängig, bietet aber dennoch in Blindversuchen eine gute Reproduzierbarkeit (Mossberg et al., 1990).

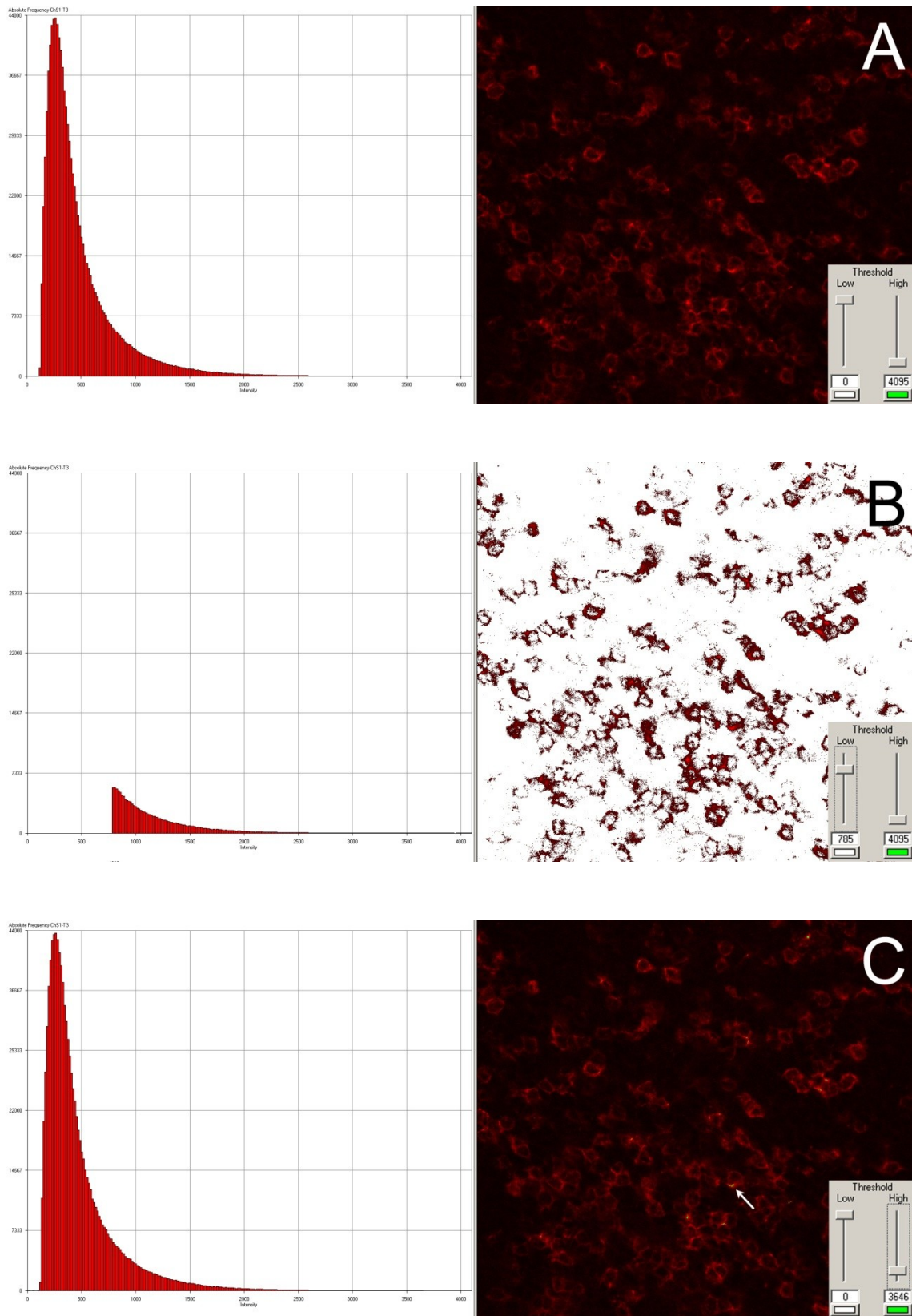


Abbildung 2.7: Prinzip der Threshold-Messung am Beispiel einer CD3/Zenon Alexa 555 Markierung

Beschriftung zur Abbildung 2.7

Die Benutzung von Thresholds ermöglicht die manuelle Abgrenzung zwischen spezifischer und unspezifischer Markierung. Zur Ermittlung der Intensitätsbreite wird sowohl ein unterer als auch ein oberer Threshold festgelegt. Die Einstellung des unteren Threshold (Bild B) erfolgt mittels eines Reglers, welcher zur besseren Abgrenzung von der eigentlichen Markierung mit einer Kontrastfarbe (weiß) belegt ist. Der Regler wird auf einen Wert eingestellt, ab dem nur noch die spezifisch markierten Zellen sichtbar sind. Der untere Threshold kann nun im Display oder im Histogramm abgelesen werden. In diesem Beispiel liegt er bei 785. Im Histogramm ist auch deutlich der Anteil des fehlenden Hintergrundes im Vergleich zum Originalbild (Bild A) erkennbar. Zur Bestimmung des oberen Thresholds (Bild C) wird der Regler reduziert, bis die ersten Pixel (grün, Pfeil) sichtbar werden. Zur Berechnung der Intensitätsbreite wird der untere vom oberen Threshold subtrahiert, in diesem Beispiel beträgt die Intensitätsbreite demzufolge 2861.

## 2.5 Statistik

Die Angabe der Intensitätsbreiten erfolgte in absoluten Werten in Form von Graustufen. Sie wurden in Tabellen und grafischen Darstellungen als Mediane  $\pm$  mittlere Abweichung angegeben. Die Mediane berechnen sich aus den Differenzen der jeweiligen Wertepaare für den oberen und unteren Threshold der entsprechenden Messreihen. Zur Analyse zwei jeweils verbundener Stichproben wurde der Rangsummentest nach Wilcoxon genutzt. Für die Auswertung unverbundener Stichproben wurde der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test gebraucht. Die statistische Auswertung und Darstellung erfolgte mit Office Excel und SPSS 14.0 für Windows.

## 3 Ergebnisse

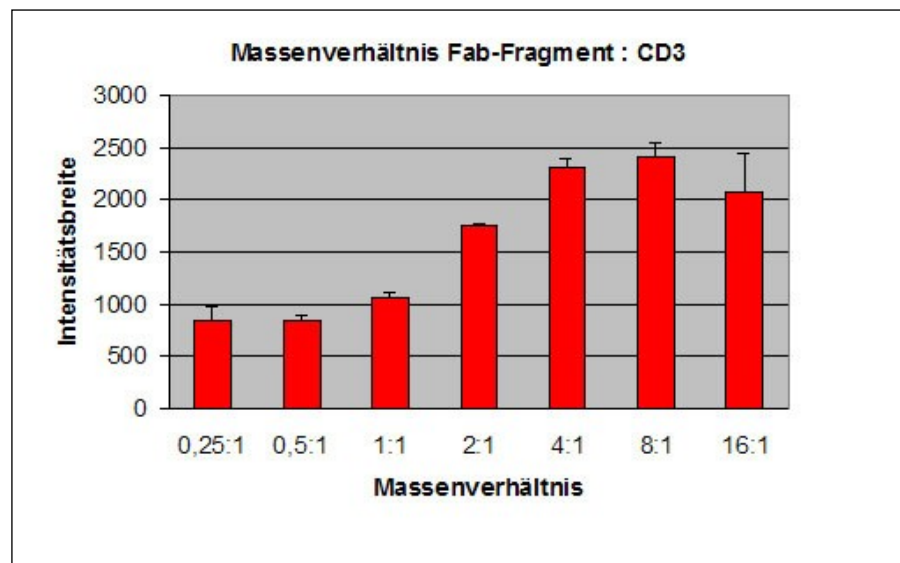
### 3.1 Eigenschaften der Fab-Fragmente

#### 3.1.1 Massenverhältnis

Anders als bei der herkömmlichen indirekten Markierung wird bei der Fab-Fragment-Methode bereits *vor* der Inkubation auf dem Schnitt der Sekundärantikörper an den Primärantikörper gekoppelt. Hierbei kommt es auf ein optimales Massenverhältnis zwischen Sekundär- und Primärantikörper an. Das Massenverhältnis kann die Intensität und Spezifität einer Markierung beeinflussen, da der Primärantikörper nur über eine begrenzte Zahl an freien Bindungsstellen für den Sekundärantikörper verfügt. Ungebundene Sekundärantikörper können, trotz guter Blockierungstechniken, unspezifisch binden und zu einer vermehrten Hintergrundmarkierung oder zu falsch positiven Markierungen führen. Aber auch aus ökonomischer Sicht, um den bestmöglichen Nutzen bei möglichst geringen Kosten zu erhalten, ist die Ermittlung eines optimalen Massenverhältnisses sinnvoll, da Fab-Fragmente im Vergleich zu herkömmlichen Sekundärantikörpern momentan noch wesentlich kostenintensiver sind.

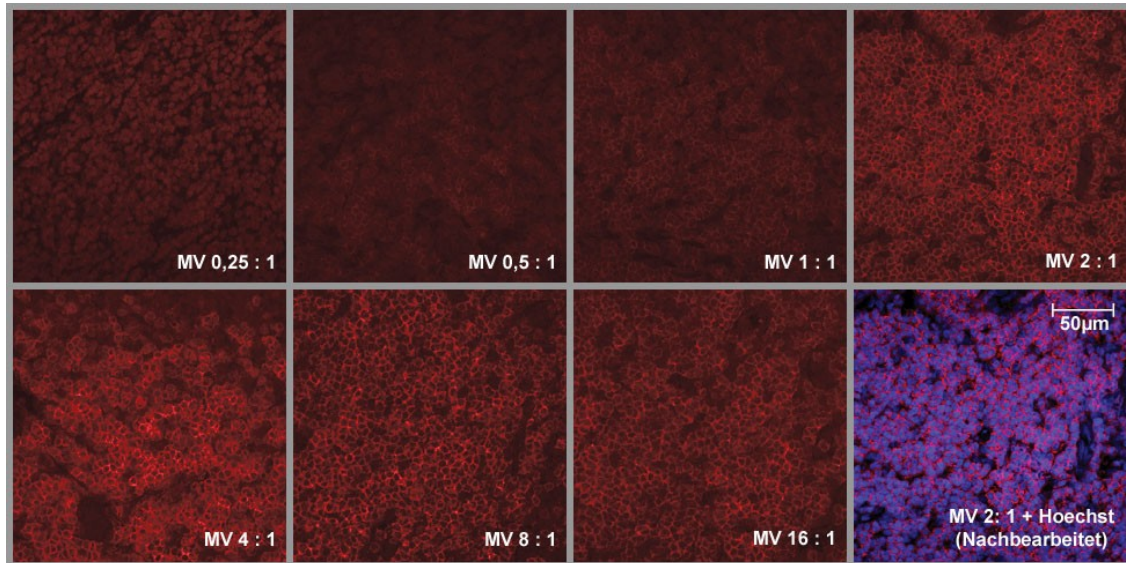
Zur Bestimmung des Optimums wurden Massenverhältnisse (Fab-Fragment zu Primärantikörper) von 0,25:1 bis 16:1 für die genutzten Primärantikörper separat getestet und die jeweiligen Messreihen unter identischen Laser- und Mikroskopeinstellungen am CLSM ausgewertet. Eine Messreihe beinhaltete für jedes erprobte Massenverhältnis (MV) jeweils 5 Einzelmessungen, welche dann entsprechend der in Abschnitt 2.4 beschriebenen Methode ausgewertet wurden. Als optimales Markierungskriterium galt ein guter Kontrast zwischen markierter Struktur und unspezifischer Hintergrundmarkierung bei möglichst niedrigem Massenverhältnis. Zur Auswertung und zum Vergleich der Markierungen wurde die Intensitätsbreite benutzt, welche der Differenz von unterem und oberem Threshold entspricht. Generell zeigte sich bei den Experimenten, dass sich bei einem  $MV \leq 0,5:1$  keine Strukturen markierten, diese fanden sich erst ab einem  $MV \geq 1:1$ . Einen guten Kontrast zum Hintergrund oder zu anderen benutzten Fluoreszenzfarbstoffen boten erst Markierungen ab einem  $MV \geq 2:1$ . Exemplarisch zeigte sich bei der Austestung des Massenverhältnisses von Fab-Fragment (Zenon

Alexa 555) zum Primärantikörper (CD3) bei einem MV von 2:1 eine um 63 Prozent ( $p=0,008$ ) höhere Intensitätsbreite als bei einem MV von 1:1. Die Intensitätsbreite konnte zwar durch Erhöhung des Fab-Fragment-Anteils weiter gesteigert werden, doch kam es dabei zu einem Anstieg der Hintergrundmarkierung. Außerdem stellte sich mit zunehmender Erhöhung des Fab-Fragment-Anteils ein Sättigungsverhalten bezüglich der Intensitätsbreite ein (Diagramm 3.1). Somit ist eine Erhöhung des Massenverhältnisses auf mehr als 4:1 nicht sinnvoll, da es zu keiner signifikanten Intensitätserhöhung gegenüber einem MV von 8:1 führt ( $p=0,548$ ). Für Standardmarkierungen empfiehlt sich daher unter Berücksichtigung der oben genannten Kriterien ein MV von 2:1. Dabei zeigen sich kaum Unterschiede bezüglich der genutzten Primärantikörper. Je nach Fragestellung, z. B. bei Einfachmarkierungen zum Nachweis bestimmter Epitope, kann auch ein MV von 1:1 ausreichend sein.



**Diagramm 3.1: Intensitätsbreiten in Abhängigkeit unterschiedlicher Massenverhältnisse des Sekundärantikörpers (Zenon Alexa 555) zum Primärantikörper (CD3) zur Ermittlung des optimalen Massenverhältnisses**

Die Balken stellen die Mediane  $\pm$  mittlere Abweichung der Intensitätsbreiten dar.



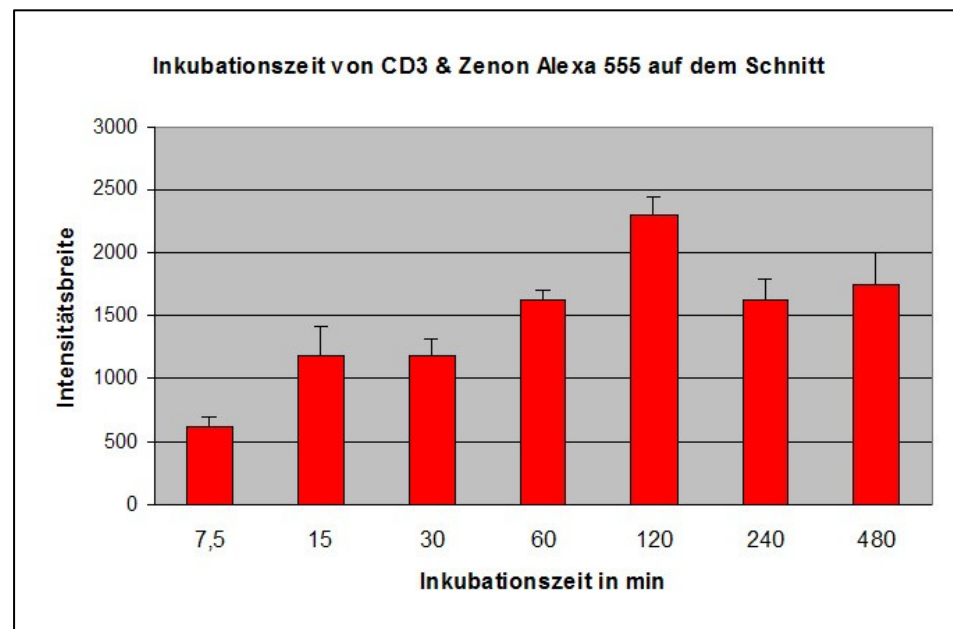
**Abbildung 3.1: Intensitätsunterschiede bei verschiedenen Massenverhältnissen von Sekundärantikörper zu Primärantikörper**

Analog zu dem Diagramm 3.1 sind die Bilder der Markierungen dargestellt. Die Bilder wurden auf gleiche Weise im Kontrast angehoben, um einen visuellen Vergleich zu ermöglichen. Als Sekundärantikörper wurde Zenon Alexa 555 genutzt, welcher in unterschiedlichen Massenverhältnissen mit dem Primärantikörper CD 3 gekoppelt ist.

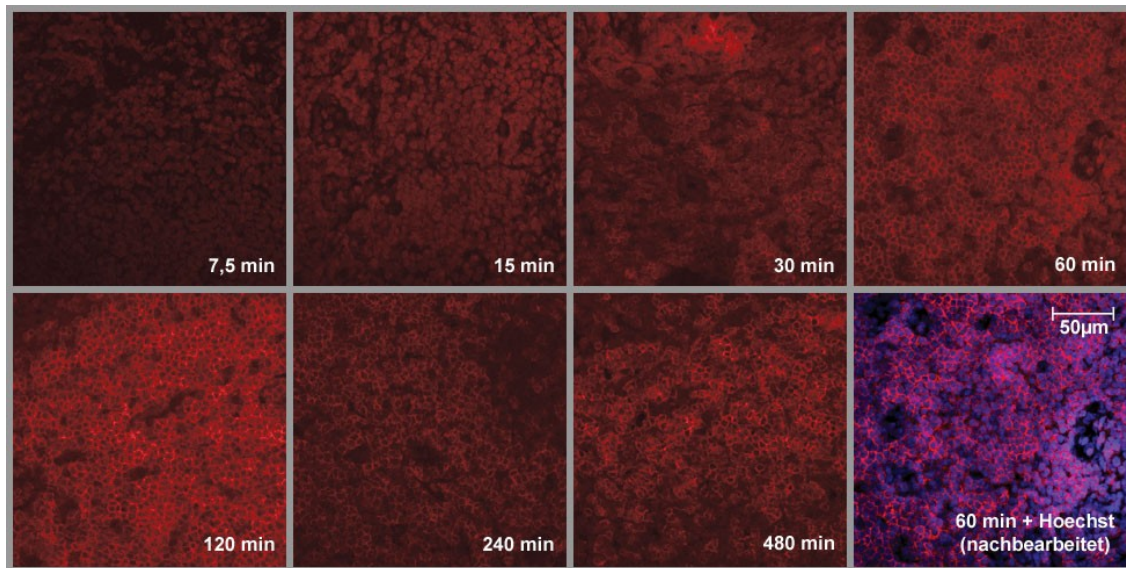
### 3.1.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die Markierungsintensität

Eine zentrales Kriterium für die Effizienz einer Markierung ist die Markierungsintensität. Diese ist bei der Fab-Fragment-Technik von vielen Faktoren, wie beispielsweise dem Massenverhältnis und der Markierungsdauer, abhängig. Aus chemischen, physikalischen sowie ökonomischen Gesichtspunkten sind möglichst kurze Markierungszeiten bei hoher Bildqualität wünschenswert. In dieser Arbeit wurden Inkubationszeiten von 7,5 Minuten bis 8 Stunden miteinander verglichen, um die optimale Markierungsdauer herauszufinden (Diagramm 3.2). Die Markierungsdauer beinhaltet das Auftragen des Antikörperkomplexes auf das Gewebe bis zur ersten Spülung des Schnittes. Bei allen Experimenten dieser Reihen wurde ein Massenverhältnis von 2:1 zwischen Fab-Fragment zu Primärantikörper eingesetzt. Bis auf die unterschiedlichen Inkubationszeiten, galten für alle Messreihen die gleichen experimentellen Bedingungen. Es wurden Experimente mit verschiedensten CD-Antikörpern (siehe Tabelle 2.1) und Alexa Farbstoffen (siehe Tabelle 2.2) durchgeführt, die zu grundsätzlich vergleichbaren Ergebnissen führten. Exemplarisch werden im Folgenden die Ergebnisse an einer Markierung von CD3 und Zenon Alexa 555 dargestellt.

Bereits nach einer Inkubationszeit von 7,5 Minuten waren wenige gering markierte Strukturen sichtbar. Eindeutig markierte Strukturen zeigten sich ab einer Inkubationszeit von 30 Minuten (Abbildung 3.2), auch wenn zwischen den Messdaten von 15 und 30 Minuten objektiv kein signifikanter Unterschied bestand ( $p=0,841$ ). Die Intensitätsbreite konnte durch Verlängerung der Inkubationszeit noch wesentlich gesteigert werden. Nach einstündiger Inkubation fand sich eine um 38 Prozent höhere Intensitätsbreite ( $p=0,008$ ) als nach 30 Minuten. Nach Verlängerung der Inkubationszeit auf 2 Stunden verdoppelte sich die Intensität fast, im Vergleich zur 30-minütigen Inkubation ( $p=0,008$ ). Eine Verlängerung der Inkubationszeit über 2 Stunden führte zu keiner weiteren Intensitätserhöhung, sondern zum Abfall der Intensitätsbreite auf das Niveau einstündiger Inkubationszeiten. Für die Praxis bedeutet dieses, dass qualitativ gute Markierungen bereits ab 30 Minuten zu erreichen sind. Je nach Fragestellung oder Ziel der Markierung kann die Zeit jedoch auch verlängert oder verkürzt werden. Allerdings erbringen Inkubationszeiten über 2 Stunden bei allen ausgetesteten CD-Antikörpern keine Verbesserung der Markierungsintensität.



**Diagramm 3.2: Ermittlung der optimalen Inkubationszeit des Antikörperkomplexes auf dem Schnitt** Die abgebildeten Balken entsprechen der Intensitätsbreite (Median  $\pm$  mittlere Abweichung) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Mit zunehmender Inkubationsdauer nimmt die Markierungsintensität zu. Eine Verlängerung auf über 2 Stunden bringt keine Intensitätsbreitensteigerung.

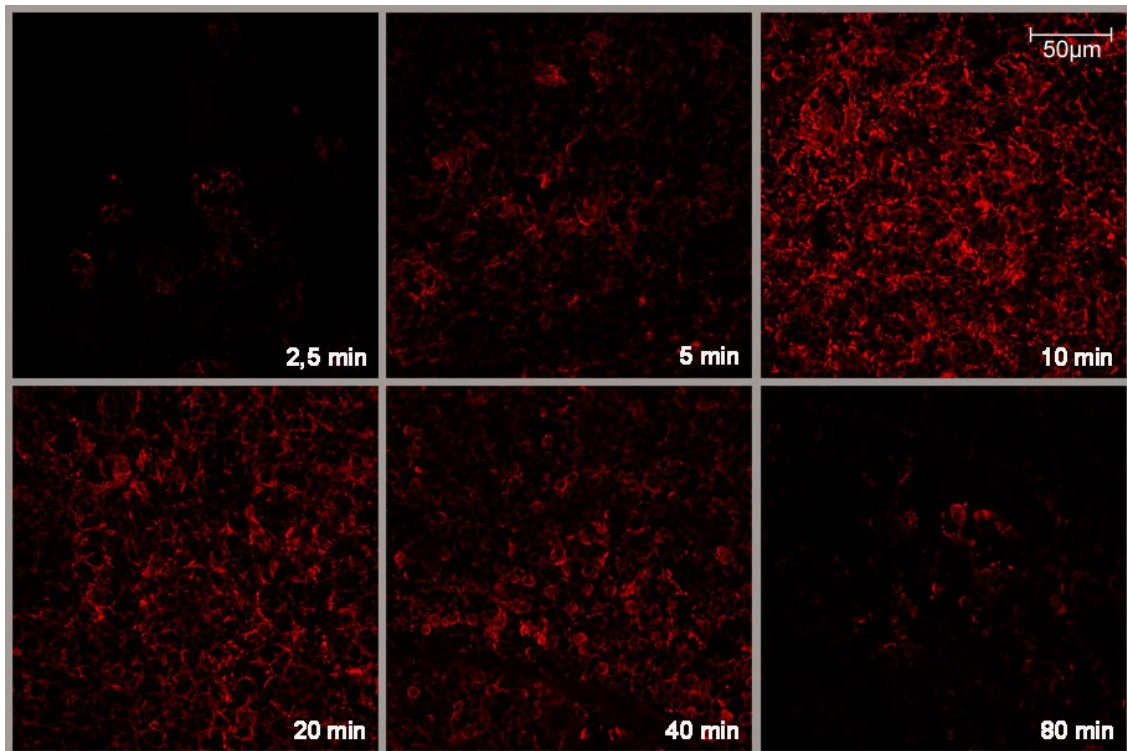


**Abbildung 3.2: Intensitätsentwicklung bei verschiedenen Inkubationszeiten des Antikörperkomplexes CD3 und Zenon Alexa 555 auf dem Schnitt**

Analog zum Diagramm 3.2 sind die mikroskopischen Bilder einer Tonsille nach Inkubationszeiten von 7,5 min bis 480 min dargestellt. Die roten Areale entsprechen den CD3 positiv markierten Lymphozyten. Rechts unten findet sich eine im Kontrast nachbearbeitete Markierung mit Kerndarstellung (blau) nach 60 minütiger Inkubationszeit.

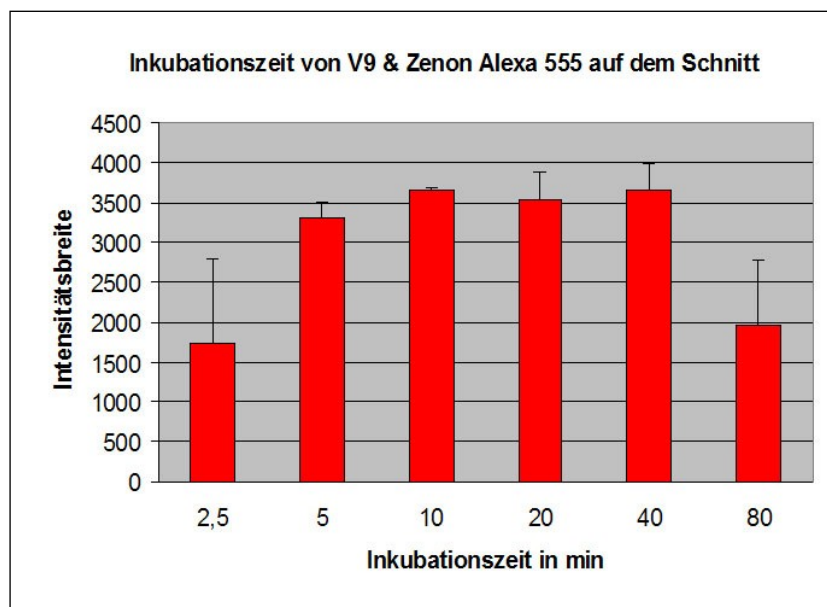
Für bestimmte Anwendungsgebiete wie beispielsweise der Laser-Mikrodissektion und anschließender Analyse von Genexpressionen mittels Polymerase-Chain-Reaktion (PCR) sind auch Inkubationszeiten von 30 min zu lang. Zur Gewinnung der entsprechenden Zellen und Zellstrukturen für die PCR müssen diese zuvor markiert werden, um dann mittels Laser-Mikrodissektion aus dem Gewebe extrahiert werden zu können. Durch lange Markierungszeiten kommt es zu einem Verlust von mRNA, dieses sollte vermieden werden, dennoch müssen die markierten Strukturen gut erkennbar sein. Hierfür eignet sich die Fab-Fragment-Technik gut. Durch Erhöhung des Massenverhältnisses (siehe 3.1.1) und eine Verringerung der Antikörperkomplexverdünnung kann die Markierungsintensität gesteigert und die Inkubationszeit auf 5 Minuten minimiert werden (von Smolinski et al., 2006). Ebenso können die Inkubationszeiten variiert werden, wenn höher exprimierte Antigene nachgewiesen werden sollen. Bei der Markierung von Vimentin, einem Strukturprotein, welches in Zellen mesenchymalen Ursprungs vorkommt, ließen sich nach einer Inkubationszeit von 2,5 Minuten markierte Strukturen erkennen (Diagramm 3.3, Abbildung 3.3). Eine Verlängerung der Zeit auf 10 Minuten zeigte keine signifikante Erhöhung der Intensitätsbreite ( $p=0,421$ ) im Vergleich zur 2,5-minütigen Inkubation, jedoch nahm die Menge der markierten Epitope zu, wodurch es zu einem helleren Bild kam (Abbildung 3.3). Allerdings war auch hier

nach 80 Minuten, im Vergleich zur 10-minütigen Inkubationszeit, ein nicht signifikanter Abfall der Intensitätsbreite zu beobachten ( $p=0,056$ ).



**Abbildung 3.3: Vimentin-Markierungen (clone V9 und Zenon Alexa 555) bei verschiedenen Inkubationszeiten auf dem Schnitt analog zu Diagramm 3.3**

Ab einer Inkubationszeit von 2,5 min ist das charakteristische Muster des Vimentins (rot) erkennbar. Erhöht man die Zeit auf 10 min, so sind deutlich mehr Gewebsteile markiert. Die Quantität und Intensität der mit V9 markierten Strukturen lässt sich durch Verlängerung der Einwirkzeit über 10 min nicht wesentlich steigern. Es kommt nach 80 min sogar zu einer Minderung der Markierungsintensität auf das 2,5-Minuten-Niveau.



**Diagramm 3.3: Intensitätsbreite in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Vimentin Antikörper (clone V9)**

Nach einer 2,5-minütigen Inkubationszeit ist das charakteristische Muster des Vimentins zu erkennen. Eine optimale Markierung findet sich nach 10 min, längere Inkubationszeiten bringen keine Verbesserung der Markierung (Median ± mittlere Abweichung).

### 3.1.3 Stabilität der Antikörperkomplexe

Bei der Durchführung von Mehrfachmarkierungen mit indirekten Markierungstechniken kommt es auf eine möglichst hohe Spezifität der Primärantikörper, verlässlich funktionierende Blockierungstechniken sowie auf eine stabile Bindung der Sekundärantikörper am jeweiligen Primärantikörper an. Die Bindungsstabilität ist von noch größerer Bedeutung, wenn man zwei oder mehr Antikörper gleichzeitig zur Markierung auf das Gewebe aufträgt. Bei diesen Mehrfachmarkierungen kann der bereits gebundene Sekundärantikörper sich vom Primärantikörper ablösen und zu unspezifischen Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Antikörperkomplexen oder zur Erhöhung der unspezifischen Hintergrundmarkierung führen.

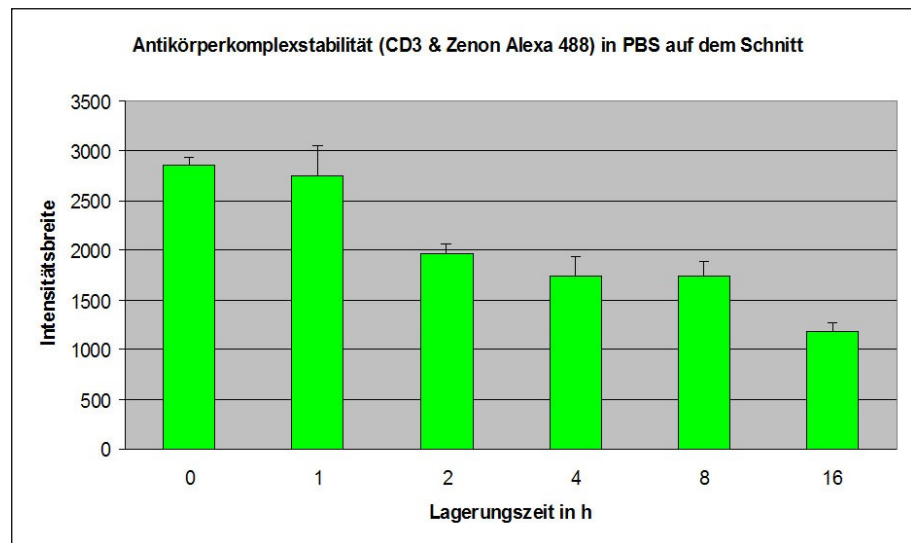
#### **Zeitliche Stabilität der Antikörperkomplexe auf dem Gewebeschnitt**

Um die Stabilität der in dieser Arbeit genutzten Antikörperkomplexe in Form von CD-Antikörpern als Primärantikörper und Fab-Fragmenten als Sekundärantikörper zu überprüfen, wurden Einfachmarkierungen analog des Arbeitsprotokolls (Tabelle 2.5) bis

---

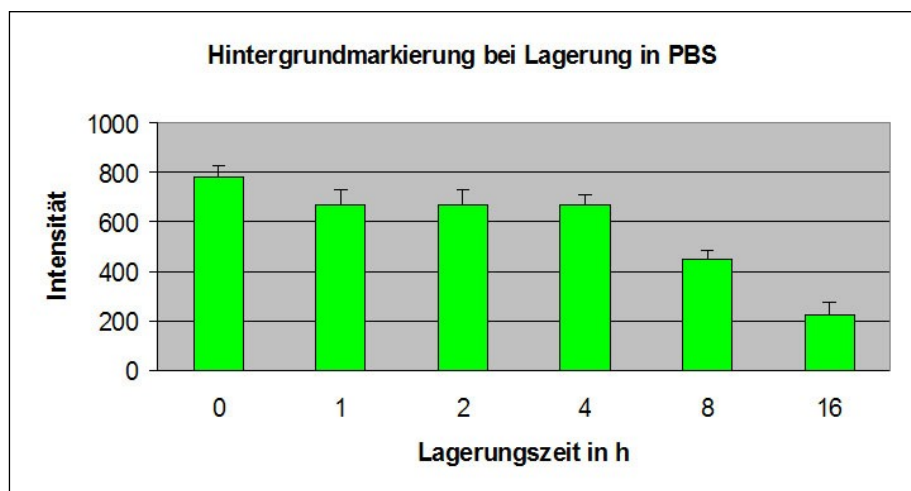
zum 5. Schritt durchgeführt. Nach der Spülung wurden die jeweiligen Schnitte nicht mit einem Eindeckmittel und Deckglas eingeschlossen, sondern erneut in 100 µl PBS-Lösung gebettet und darin jeweils 1, 2, 4, 8 oder 16 Stunden belassen. Um ein Ausbleichen der Markierung zu verhindern, wurden die Objektträger während der gesamten Zeit lichtgeschützt aufbewahrt. Unmittelbar nach dem Markierungsende fand die Intensitätsmessung mithilfe des CLSM statt. Als Referenzwert diente die gemessene Intensitätsbreite nach einstündiger Inkubation des Antikörperkomplexes auf dem Schnitt ohne erneute Lagerung in PBS. Bei stabilen Komplexen sollte die Intensitätsbreite der Markierungen – unabhängig von der Zeit – konstant sein. Ansonsten müsste es zu einer Intensitätsabnahme und gegebenenfalls zu einer Zunahme der unspezifischen Hintergrundmarkierung kommen.

Der Referenzwert nach einstündiger Markierung betrug 2861 Graustufen (Diagramm 3.4). Nach zweistündiger Lagerung kam es zu einem Intensitätsverlust um 31 Prozent ( $p=0,008$ ) auf 1964 Graustufen. Die Messungen nach 4 Stunden zeigten keinen weiteren signifikanten Intensitätsverlust ( $p=0,222$ ). Allerdings fand sich nach 8-stündiger Lagerung in PBS eine minimale Intensitätsabnahme um 12 Prozent ( $p=0,008$ ) im Vergleich zur Messung nach 2 Stunden. Insgesamt hatte die Intensitätsbreite nach 16 Stunden Lagerung in PBS um 59 Prozent abgenommen ( $p=0,008$ ). Gleichzeitig kam es auch zu einer Abnahme der unspezifischen Hintergrundmarkierung (Diagramm 3.5) um 72 Prozent.



**Diagramm 3.4: Intensitätsmessungen nach einstündiger Markierungszeit und anschließender Lagerung in PBS als indirekte Bestimmung der Antikörperkomplexstabilität**

Als Vergleichswert der Intensitätsveränderungen (Median  $\pm$  mittlere Abweichung) gilt der 0-Stunden-Wert. Dieser entspricht der Intensität nach einstündiger Markierung und anschließender Spülung ohne weitere Lagerung in PBS.

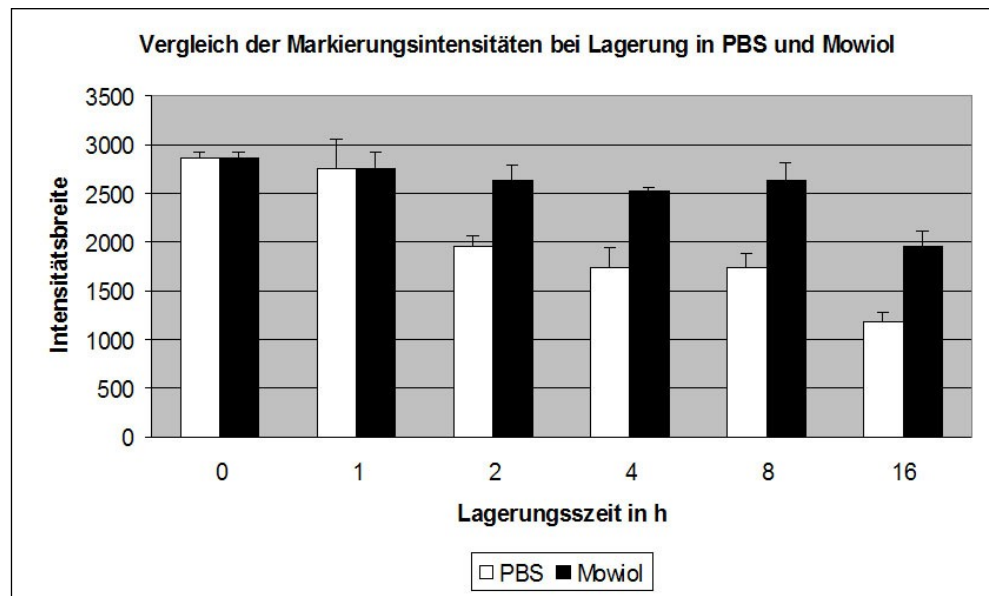


**Diagramm 3.5: Unspezifische Hintergrundmarkierung nach unterschiedlichen Lagerungszeiten in PBS**

Es wurden CD3-positive Zellen mit Zenon Alexa 488 markiert. Nach einstündiger Inkubation des Antikörperkomplexes wurden nicht gebundene Komplexe abgewaschen und die Schnitte erneut in PBS unterschiedlich lang gelagert. Die Balken stellen die Median  $\pm$  mittlere Abweichung dar.

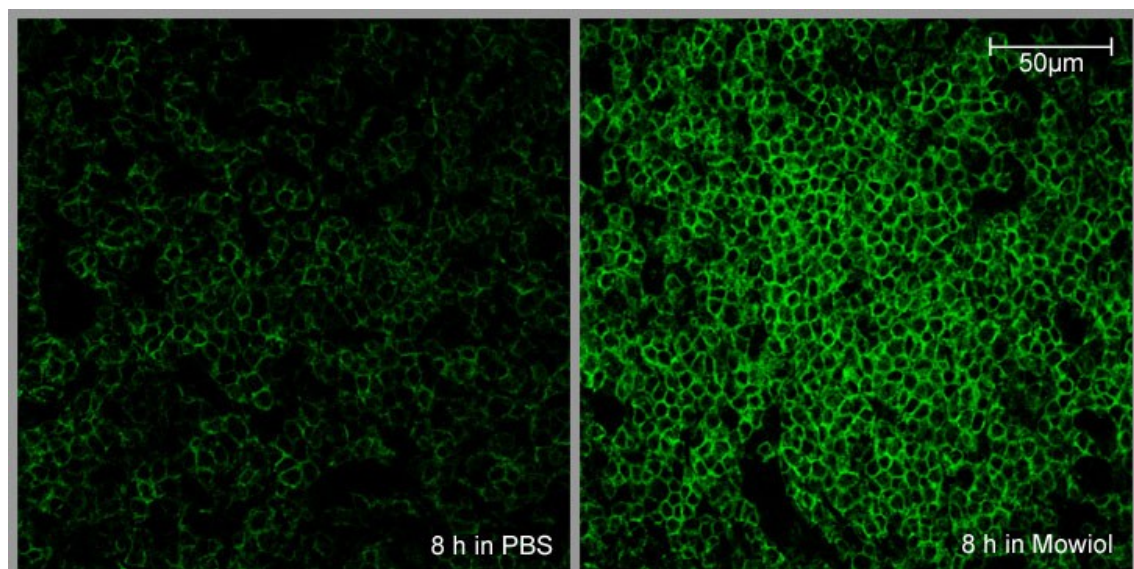
Das Experiment wurde unter gleichen Voraussetzungen mit dem erhärtenden Eindeckmittel Mowiol als Lagerungsmedium anstelle von PBS wiederholt (siehe Abbildung 3.4). Nach 2 Stunden fand sich ebenfalls eine Intensitätsabnahme; diese lag mit 7,8 Pro-

zent ( $p=0,032$ ) Intensitätsverlust deutlich unter dem 2-Stunden-Wert bei Lagerung in PBS (Diagramm 3.6). Insgesamt verminderte sich die Intensitätsbreite nach 16 Stunden Lagerung in Mowiol um 31,4 Prozent ( $p=0,008$ ). Damit ist der Intensitätsverlust um 40 Prozent geringer als der 16-Stunden-Wert (58,8 Prozent) bei Lagerung in PBS.



**Diagramm 3.6: Vergleich der Markierungsintensitäten in Abhängigkeit vom Lagerungsmedium**

Mit Zunahme der Lagerungszeit des gebundenen Antikörperkomplexes auf dem Schnitt nimmt in beiden Lagerungsmedien kontinuierlich die Intensitätsbreite (Median  $\pm$  mittlere Abweichung) ab. Der Intensitätsverlust bei den mit Mowiol bedeckten Gewebeschnitten ist aber deutlich geringer.



**Abbildung 3.4: Markierungsintensität (CD3 und Zenon Alexa 488) nach 8 Stunden Lagerung in verschiedenen Medien**

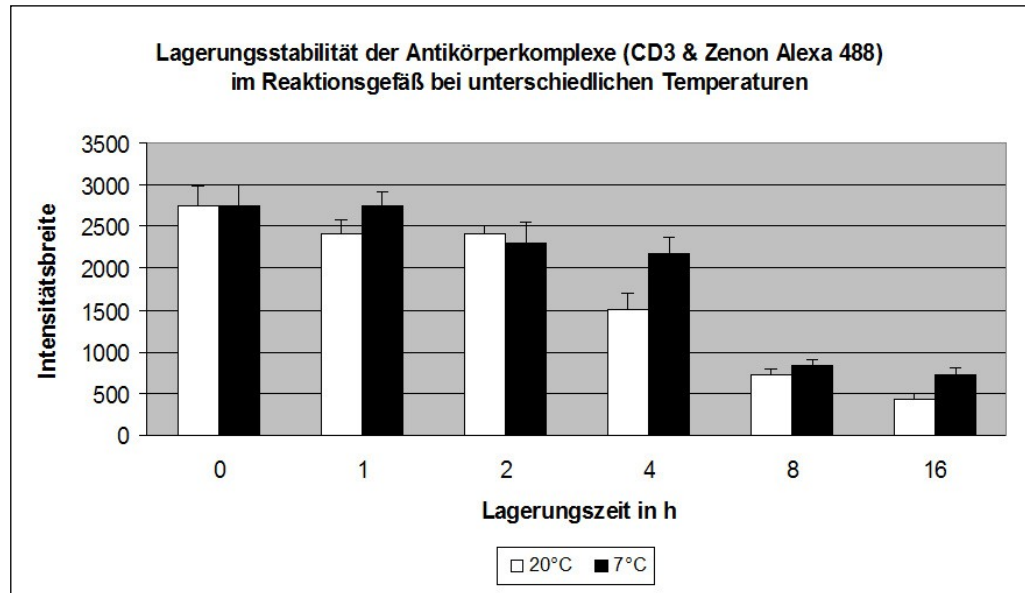
Man erkennt deutlich die Helligkeitsunterschiede. Das in Mowiol gelagerte Gewebe zeigt wesentlich intensivere CD3-Markierungen.

### **Zeitliche Stabilität der Antikörperkomplexe im Reaktionsgefäß**

Häufig ist es aus ökonomischen Gründen und zur Gewährleistung eines reibungslosen experimentellen Ablaufs notwendig, Antikörper in der gewünschten Arbeitsverdünnung vorzubereiten. Bei der Benutzung von Fab-Fragmenten ist die Vorbereitung von besonderer Bedeutung, da die entsprechenden Antikörper vor der Markierung nach einem Baukastenprinzip (siehe 2.2.3) zusammengeführt werden müssen und dieses mindestens 15 Minuten beansprucht. Sollen die Antikörperkomplexe Minuten, Stunden oder vielleicht auch Tage vor dem eigentlichen Gebrauch hergestellt werden, so muss vorher geklärt werden, ob die Qualität der Markierung dadurch beeinflusst wird.

Die Antikörperkomplexe für dieses Experiment wurden analog zum Protokoll (siehe 2.2.3) für die Durchführung einer Einfachmarkierung mittels Fab-Fragmenten hergestellt. Die fertige Antikörperlösung verblieb bis zur Nutzung unterschiedlich lange (0, 1, 2, 4, 8 oder 16 Stunden) im Reaktionsgefäß und wurde anschließend einheitlich für *eine* Stunde mit dem Schnitt inkubiert. Der weitere Ablauf folgte dem Arbeitsprotokoll. Die unmittelbar nach Ende der Markierung durchgeführten Intensitätsmessungen zeigten mit fortschreitender Lagerungszeit eine kontinuierliche Abnahme der Intensitätsbreite. Nach *einer* Stunde im Reaktionsgefäß und anschließender Markierung fand sich kein signifikanter Intensitätsverlust ( $p=0,056$ ). Eine signifikante Reduktion der Intensitätsbreite konnte nach zweistündiger Lagerung gemessen werden (siehe Diagramm 3.7), dabei sank diese um 12 Prozent ( $p=0,008$ ) im Vergleich zum 0-Stunden-Wert. Nach 4 Stunden hatte sich die Intensitätsbreite fast halbiert und war nach 16 Stunden auf insgesamt 16 Prozent ihres Ausgangswertes von 2748 Graustufen gefallen. Um den Temperatureinfluss auf das Stabilitätsverhalten der Antikörperkomplexe zu bestimmen, erfolgte das Experiment erneut unter gleichen Voraussetzungen, jedoch wurde der Antikörperkomplex nicht bei Raumtemperatur sondern bei 7° Celsius im Kühlschrank aufbewahrt. Hierbei fanden sich ebenfalls Intensitätsverluste, jedoch in geringerer Stärke. Nach 2-stündiger Lagerungszeit zeigte sich noch kein signifikanter Unterschied ( $p=1,000$ ) zwischen den Proben verschiedener Lagerungstemperaturen. Doch nach vierstündiger Lagerung bei Raumtemperatur wies die entsprechende Markierung eine 31 Prozent niedrigere Intensitätsbreite ( $p=0,016$ ) als bei Kühlschranktemperatur auf. Im Verlauf zeigte sich auch nach 16 Stunden eine um 40

Prozent ( $p=0,008$ ) geringere Intensitätsbreite der ungekühlten Probe. Bei der Auswertung der Intensität nach 8 Stunden fand sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,095$ ).



**Diagramm 3.7: Vergleich der Intensitätsbreiten bei unterschiedlichen Lagerungszeiten des Antikörperkomplexes bei 20°C und 7°C**

Der 0-Stunden-Wert (Median  $\pm$  mittlere Abweichung) beinhaltet die unmittelbare Verarbeitung des Antikörperkomplexes nach Herstellung. Nutzt man den Antikörperkomplex erst mehrere Stunden nach der Herstellung, so muss man mit einer Abnahme der Markierungsintensität rechnen.

Aufgrund der Datenlage ist es nicht sinnvoll, die Antikörperkomplexe länger als 2 Stunden vor Benutzung herzustellen, da es nach dieser Zeit zu einem deutlichen Verlust der Markierungsintensität kommt. Eine Aufbewahrung des fertigen Antikörperkomplexes über mehrere Stunden oder Tage führt zur Unbrauchbarkeit der Lösung. Auch die Lagerung bei 7° Celsius kann eine Intensitätsabnahme nicht verhindern, sondern sie in den ersten Stunden lediglich etwas verlangsamen. Nach dieser Zeit bringt auch die Minderung der Umgebungstemperatur keinen Zusatznutzen (siehe Diagramm 3.7).

## 3.2 Mehrfachmarkierungen

### 3.2.1 Doppelmarkierungen

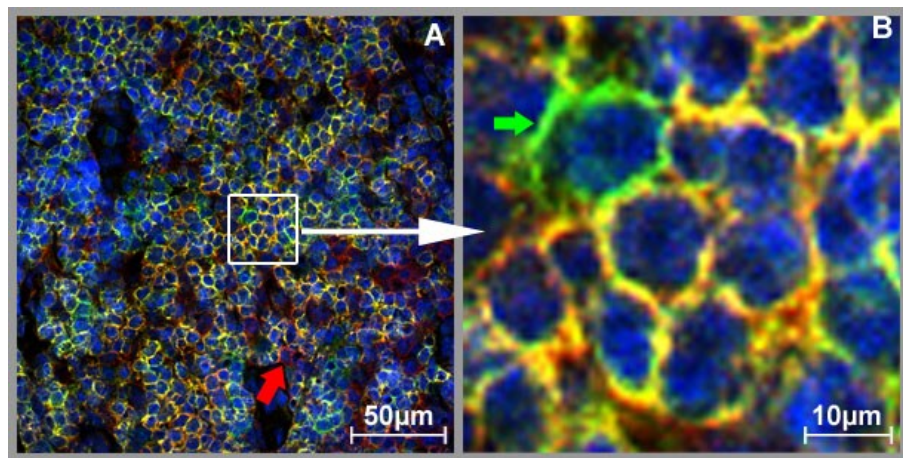
Doppelmarkierungen sind die einfachste Art der Mehrfachmarkierung. Häufig wird dabei zur Darstellung der beiden relevanten Antigene die indirekte Markierungsmethode benutzt. Die verwendeten Antikörper werden hierbei einzeln und nacheinander auf den Schnitt gegeben. Zur Verhinderung von Kreuzreaktionen muss zwischen den Arbeitsschritten ausgiebig gespült und es müssen sicher funktionierende Blockierungssysteme verwandt werden. Bei Doppelmarkierungen mithilfe von Fab-Fragmenten entfallen diese aufwendigen Prozeduren. Die mit Fab-Fragmenten gekoppelten Primärantikörper ähneln direkt konjugierten Antikörpern und gestatten somit auch einen ähnlich einfachen Arbeitsablauf, wie er bei der direkten Markierung möglich ist (siehe 1.3). Anhand von Doppelmarkierungen wurde die Leistungsfähigkeit der Fab-Fragment-Technik in Bezug auf Mehrfachmarkierungen überprüft. Insbesondere wurde dabei auf die Kreuzreaktivität und die Markierungsqualität geachtet. Einfachmarkierungen der jeweiligen Antikörperkomplexe galten als Referenz. Für die Doppelmarkierungen wurden unterschiedliche Auftragungsarten gewählt. Die Antikörperkomplexe wurden gleichzeitig sowie nacheinander auf das Gewebe aufgetragen. Bei der gleichzeitigen Auftragung wurde jeder Antikörperkomplex entsprechend dem Arbeitsprotokoll (siehe 2.2.3) separat hergestellt und anschließend mit dem anderen Antikörperkomplex zusammengegeben. Aus diesem Gemisch, in welchem sich beide Komplexe mit monoklonalen CD-Antikörpern aus der Maus befanden, z. B. 1. CD3/Zenon Alexa 488, 2. CD4/Zenon Alexa 555, wurde die Arbeitslösung in entsprechender Konzentration hergestellt und aufgetragen. Bei Markierungen mit nacheinander folgender Auftragung der einzelnen Antikörperkomplexe wurden die jeweiligen Antikörperkomplexe wie bei einer Einzelmarkierung hergestellt und der erste Komplex aufgetragen, für 1 Stunde auf dem Schnitt inkubiert und gespült. Anschließend wurde der zweite Antikörperkomplex nach gleichem Schema aufgetragen. Nach Beendigung der Markierung fand die Auswertung am CLSM statt. Die Doppelmarkierungen wurden mit verschiedensten CD-Antikörpern durchgeführt (Tabelle 3.1), an welche Fab-Fragmente mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa 488 und 555 gekoppelt wurden.

1. Antikörperkomplex	2. Antikörperkomplex
CD3/Zenon Alexa 488	CD4/Zenon Alexa 555
CD3/Zenon Alexa 488	CD8/Zenon Alexa 555
CD3/Zenon Alexa 488	CD19/Zenon Alexa 555
CD3/Zenon Alexa 488	CD38/Zenon Alexa 555
CD3/Zenon Alexa 488	CD68/Zenon Alexa 555
CD4/Zenon Alexa 488	CD8/Zenon Alexa 555
CD4/Zenon Alexa 488	CD19/Zenon Alexa 555
CD4/Zenon Alexa 488	CD38/Zenon Alexa 555
CD4/Zenon Alexa 488	CD68/Zenon Alexa 555
CD8/Zenon Alexa 488	CD19/Zenon Alexa 555
CD8/Zenon Alexa 488	CD38/Zenon Alexa 555
CD8/Zenon Alexa 488	CD68/Zenon Alexa 555
CD11c/Zenon Alexa 488	CD19/Zenon Alexa 555
CD19/Zenon Alexa 488	CD68/Zenon Alexa 555
CD38/Zenon Alexa 488	CD68/Zenon Alexa 555

**Tabelle 3.1: Getestete Antikörperkombinationen für Doppelmarkierungen**

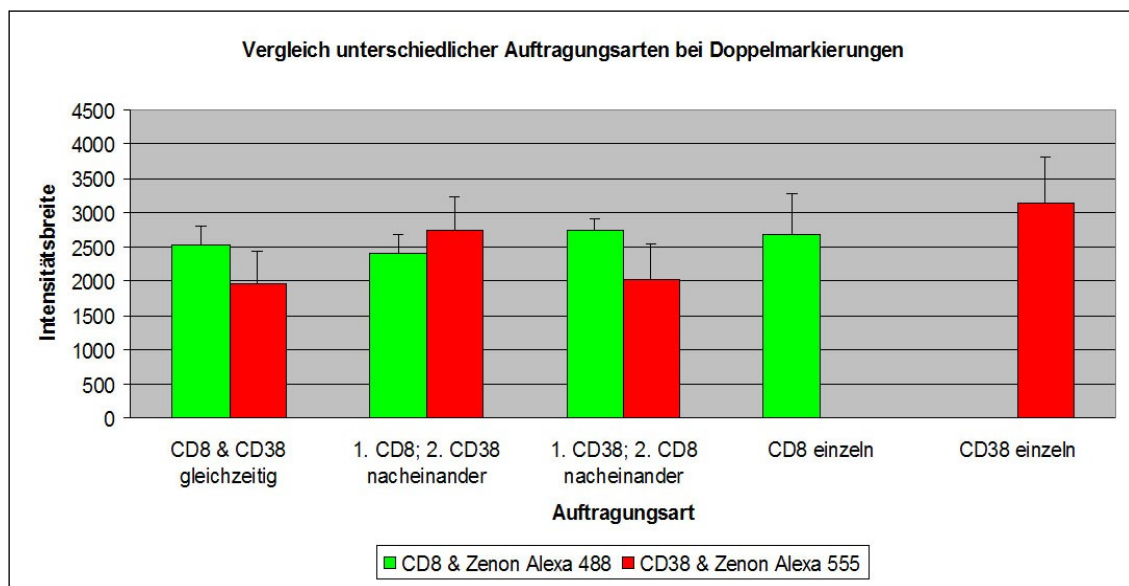
Die Doppelmarkierungen konnten unproblematisch durchgeführt werden und zeigten valide Ergebnisse, unabhängig von den benutzten Antikörpern. Bei den verschiedenen Auftragsarten der Antikörperkomplexe – gleichzeitig und nacheinander – konnten, im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmarkierungen, keine signifikanten Unterschiede bei der Intensitätsbreite gemessen werden (siehe Diagramm 3.8). Subjektiv präsentierten die Doppelmarkierungen beim Betrachten unter dem Mikroskop teilweise sogar ein etwas helleres Bild als die Einzelmarkierungen. Kreuzreaktionen konnten nicht beobachtet werden. Auch Intensitätsverluste durch verlängerte Markierungszeiten bei nacheinander aufgetragenen Antikörperkomplexen wurden nicht beobachtet. Die spektrale Trennung der Fluoreszenzfarbstoffe mithilfe des CLSM und optimal gewählter Filtereinstellungen gelang sowohl im Single- als auch im Multi-Track-Modus problemlos und auch Kreuzreaktionen zwischen den Antikörperkomplexen waren nicht feststellbar (siehe Abbildung 3.6). Für die Visualisierung und zur Unterscheidung der beiden Fluorochrome bzw. der Antigen-Antikörperkomplexe wurden die Primärfarben

Grün und Rot gewählt. Bei additiver Mischung von Rot und Grün ergibt sich die Farbe Gelb. Analog dazu hätten sich bei Kreuzreaktion oder kolokalisierten Antigenen die entsprechenden Areale gelb darstellen müssen. Bei Kolokalisationen, wie zum Beispiel einer Doppelmarkierung mit den Primärantikörpern CD3 und CD4, waren diese gelb markierten Areale gut sichtbar, da CD4-positive Zellen einem Teil der Grundgesamtheit CD3-positiver Zellen entsprechen (siehe Abbildung 3.5). Die kolokalisierten Antigene konnten morphologisch gut von anderen Zellgruppen getrennt werden.



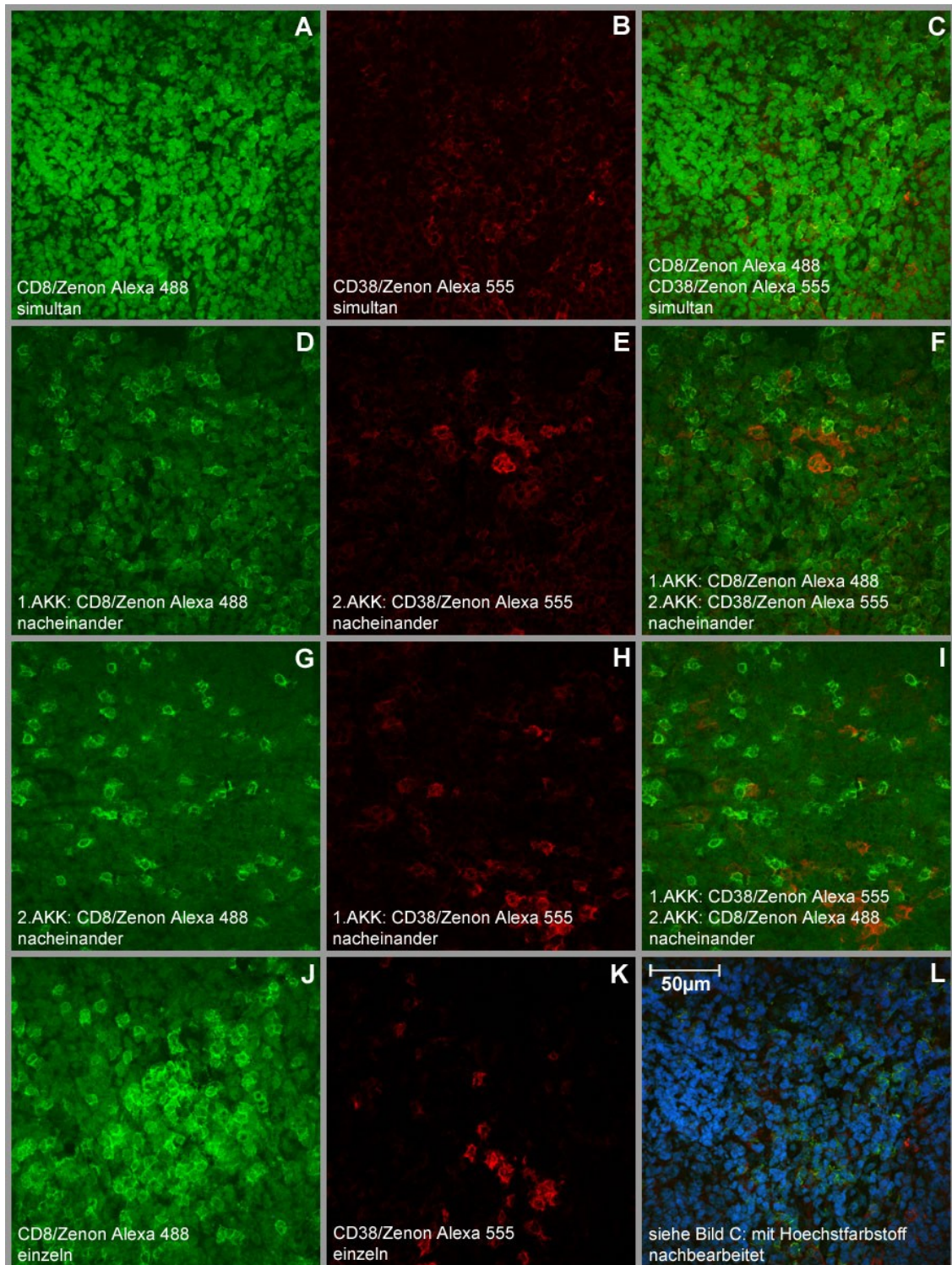
**Abbildung 3.5: Doppelmarkierung von CD3- und CD4-positiven Zellen**

Bild A (40fache Vergrößerung): Die CD3-positiven Zellen sind mit Zenon Alexa 488 (grün) markiert. Zenon Alexa 555 markiert die CD4-positiven Zellen (rot). Da die Gesamtheit der T-Helferzellen ( $CD4^+$ ) auch CD3-positiv sind, erscheinen sie nicht rot sondern als Mischfarbe in gelb, deutlich erkennbar im vergrößerten Ausschnitt (Bild B). Die separat grün gefärbten Zellen (grüner Pfeil) entsprechen zytotoxischen T-Zellen ( $CD8^+$ ). Die einzelnen rot markierten Zellen (roter Pfeil) sind nur CD4-positiv und entsprechen Makrophagen und Monozyten.



**Diagramm 3.8: Unterschiedliche Auftragsarten einer Doppelmarkierung im Vergleich zur Einfachmarkierung bezüglich der Markierungsintensität**

Die Antikörperkomplexe wurden simultan oder in unterschiedlicher Reihenfolge auf den Schnitt gebracht. Als Referenzwert für die Intensitätsbreite (Median  $\pm$  mittlere Abweichung) der Markierungen gelten die Einfachmarkierungen (CD8 einzeln und CD38 einzeln).



**Abbildung 3.6: Verschiedene Aufbaumethoden bei einer Doppelmarkierung mit CD8/Zenon Alexa 488 und CD38/Zenon Alexa 555**

Bild A-C: Die Antikörperkomplexe (AKK) wurden gleichzeitig auf den Schnitt aufgetragen. Bild A und B zeigen jeweils nur einen Kanal. In Bild C sind beide Kanäle gleichzeitig abgebildet. Bild D-F und G-I: Die AKK wurden in verschiedenen Reihenfolgen aufgebracht und jeweils eine Stunde auf dem Schnitt inkubiert, bevor der 2. AKK aufgetragen wurde. Die Bilder F und I zeigen die gemeinsam dargestellten Einzelbilder. Die zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>; grün) können sicher von den Plasmazellen (CD38<sup>+</sup>; rot) abgegrenzt werden. Bild J und K: Als Referenz zu den Mehrfachmarkierungen gelten die jeweils durchgeführten Einfachmarkierungen. Bild L: Doppelmarkierung mit CD8 & Zenon Alexa 488 und CD38 & Zenon Alexa 555 bei gleichzeitiger Auftragung der AKK und Darstellung der Zellkerne mit dem Hoechstfarbstoff.

### 3.2.2 Drei- und Vierfachmarkierungen

Bei Mehrfachmarkierungen mit drei und mehr Fluorochromen gibt es zwei Hauptprobleme: 1. Vermeidung von Kreuzreaktionen der beteiligten Antikörper, 2. Korrekte spektrale Trennung der fluoreszierenden Farbstoffe. Dass Zweifachmarkierungen mittels Fab-Fragmenten und Primärantikörpern derselben Immunglobulinklasse problemlos in nur einem Arbeitsschritt durchführbar sind, wurde im vorherigen Abschnitt gezeigt. Theoretisch sollte die Markierungsmethode mit beliebig vielen Antikörperkomplexen möglich sein, doch bestehen bei der spektralen Trennung der unterschiedlichen Emissionen technisch-physikalische Grenzen. Mithilfe eines CLSM ist es durch den Einsatz von monochromatischem Laserlicht, einer gut überlegten Anordnung von Strahlteilern und Filtern sowie der Nutzung des Multi-Track-Modus möglich, mindestens 4 Fluorochrome spektral zu separieren (siehe 2.3.2).

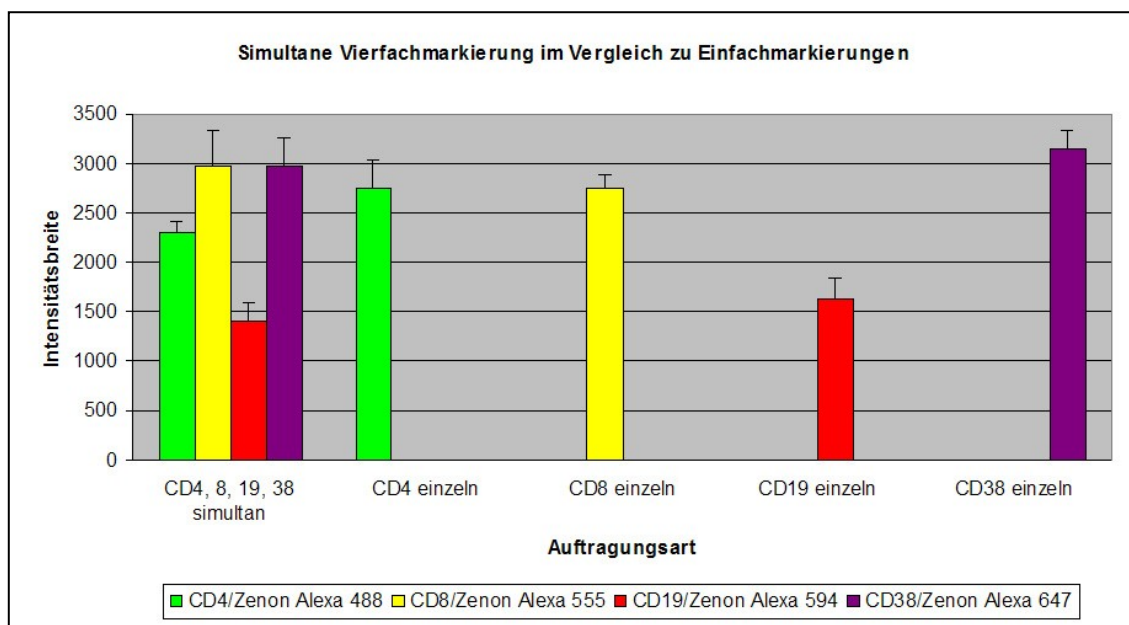
Die Drei- und Vierfachmarkierungen wurden analog zum Arbeitsprotokoll für Fab-Fragment-Markierungen (siehe Tabelle 2.5) durchgeführt. Die einzige Abweichung vom Protokoll bestand darin, dass die drei bzw. vier hergestellten Antikörperkomplexe in einer gemeinsamen Lösung auf den Schnitt gegeben wurden. Zum Vergleich der Markierungsqualität wurden Einzelmarkierungen der entsprechenden Antikörperkomplexe in äquivalenten Massen- und Verdünnungsverhältnissen genutzt. In einigen Markierungen wurde als dritter bzw. vierter Sekundärantikörper ein biotinyliertes Fab-Fragment benutzt und dieses dann in einem zusätzlichen Arbeitsschritt mit einem an Streptavidin gebundenen Fluorochrom konjugiert (siehe 1.2.1).

#### **Vierfachmarkierungen mit fluorochromkonjugierten Fab-Fragmenten**

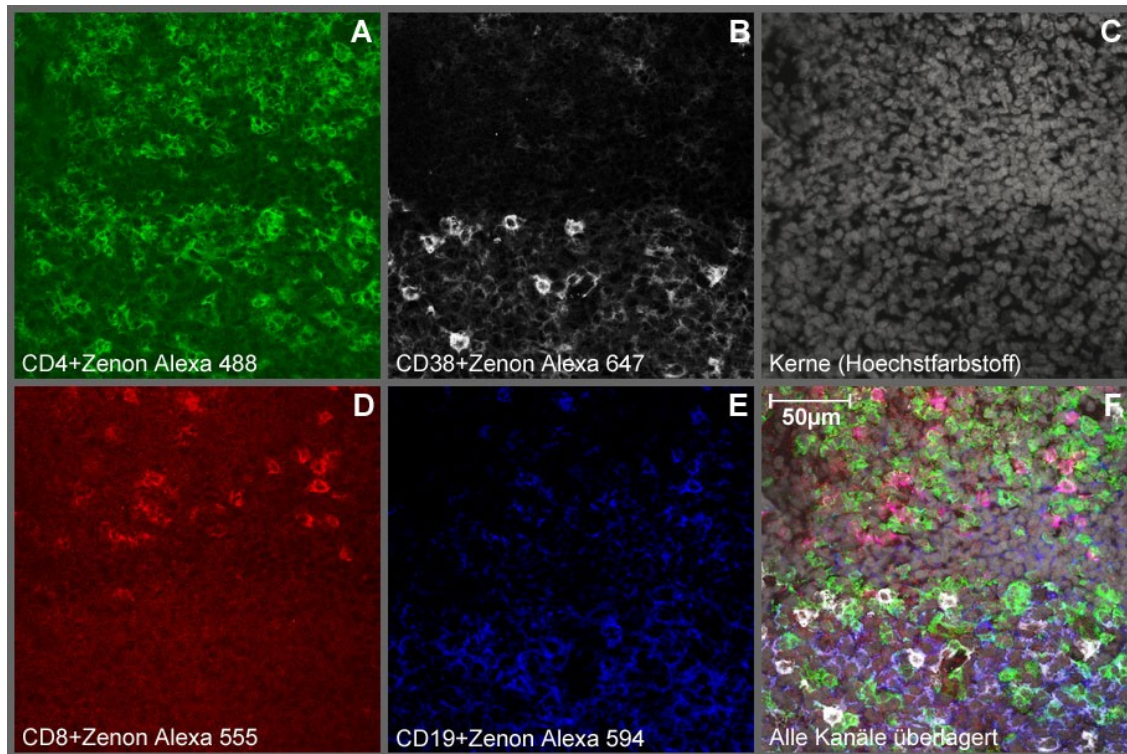
Die 4 Antikörperkomplexe (AKK) wurden separat hergestellt und anschließend in einer gemeinsamen Lösung und für den jeweiligen Antikörperkomplex entsprechenden Arbeitskonzentration aufgetragen. Bei der Berechnung der Arbeitskonzentration ist besonders darauf zu achten, dass jeder Antikörperkomplex durch Hinzugabe zur gemeinsamen Lösung somit auch zur Verdünnung der Arbeitslösung beiträgt. Zur Vermeidung von experimentellen Fehlern, bedingt durch die Herstellung der AKK, wurden die jeweils benötigten AKK für die Mehrfachmarkierungen und die als Kontrolle durchgeführten Einfachmarkierungen in einem gemeinsamen Arbeitsgang hergestellt. Bei der

Auswahl der Primärantikörper (siehe Tabelle 2.1) wurde auf eine gute morphologische Differenzierung der jeweils markierten Antigene geachtet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt exemplarisch an einer Vierfachmarkierung mit CD4/Zenon Alexa 488, CD8/Zenon Alexa 555, CD19/Zenon Alexa 594 und CD38/Zenon Alexa 647.

Bei den Vierfachmarkierungen mit simultaner Auftragung der obigen Antikörperkomplexe und einstündiger Inkubation auf dem Schnitt ließen sich die markierten Antigene klar voneinander abgrenzen. Die Mehrfachmarkierungen zeigten hinsichtlich der Intensitätsbreite im Vergleich zu den Einzelmarkierungen keine signifikanten Unterschiede (siehe Diagramm 3.9). Bei weiteren Vierfachmarkierungen mit gleichen und unterschiedlichen Antikörperkombinationen kam es gelegentlich zu einer Minderung der Intensitätsbreite bei den Einfachmarkierungen. Die Mehrfachmarkierungen wiesen stets eine hohe Qualität auf, frei von Kreuzreaktionen. Somit ist es möglich, 4 Antigene mit Primärantikörpern aus ein und derselben Spezies und Immunglobulinklasse innerhalb einer Stunde zu markieren (Abbildung 3.7). Durch Hinzugabe von Hoechstfarbstoff zur Antikörperlösung besteht eine zusätzliche Möglichkeit der Zeitersparnis ohne Qualitätsverlust.



**Diagramm 3.9: Simultane Vierfachmarkierung im Vergleich zu Einfachmarkierungen**



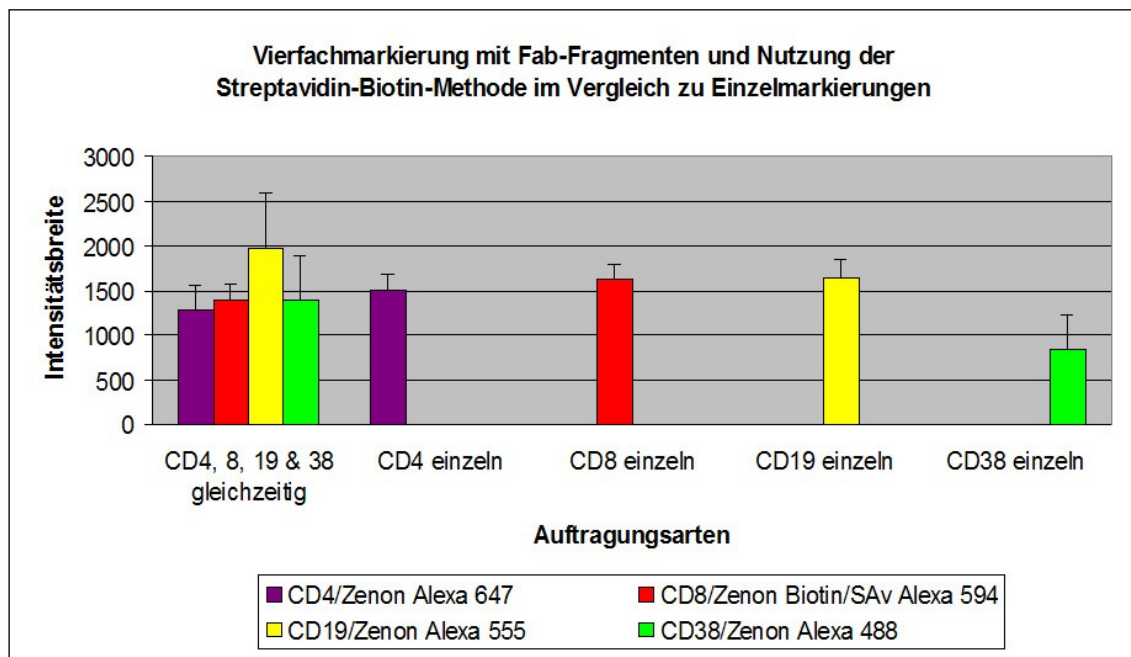
**Abbildung 3.7 Vierfachmarkierung mit 4 monoklonalen Antikörpern und der Fab-Fragment-Technik**

Auf allen Bildern ist der gleiche Ausschnitt eines Sekundärfollikels mit Keimzentrum (untere Bildhälfte) zu sehen. Die Bilder A, B, D und E zeigen die im Multi-Track aufgezeichneten Kanäle der jeweiligen CD-Antikörper und fluorochromkonjugierten Fab-Fragmente. Im Keimzentrum sind die Plasmazellen ( $CD38^+$ , Bild B) sowie die B-Zellen ( $CD19^+$ , Bild E) gut zu erkennen. Im Vergleich von Bild D (Zytotoxische T-Zellen,  $CD8^+$ ) und Bild E fallen im oberen Bildanteil morphologisch gleich markierte Areale auf. Dieses deutet nicht auf eine Kolo-kalisation hin, sondern wurde durch Cross-talk verursacht, bedingt durch die dicht beieinanderliegenden Emissionsspektren von Alexa 555 und 594. Die  $CD8$ -positiven Zellen stellen sich deshalb im Bild F in Magenta dar.

### Vierfachmarkierungen mithilfe von biotinylierten Fab-Fragmenten

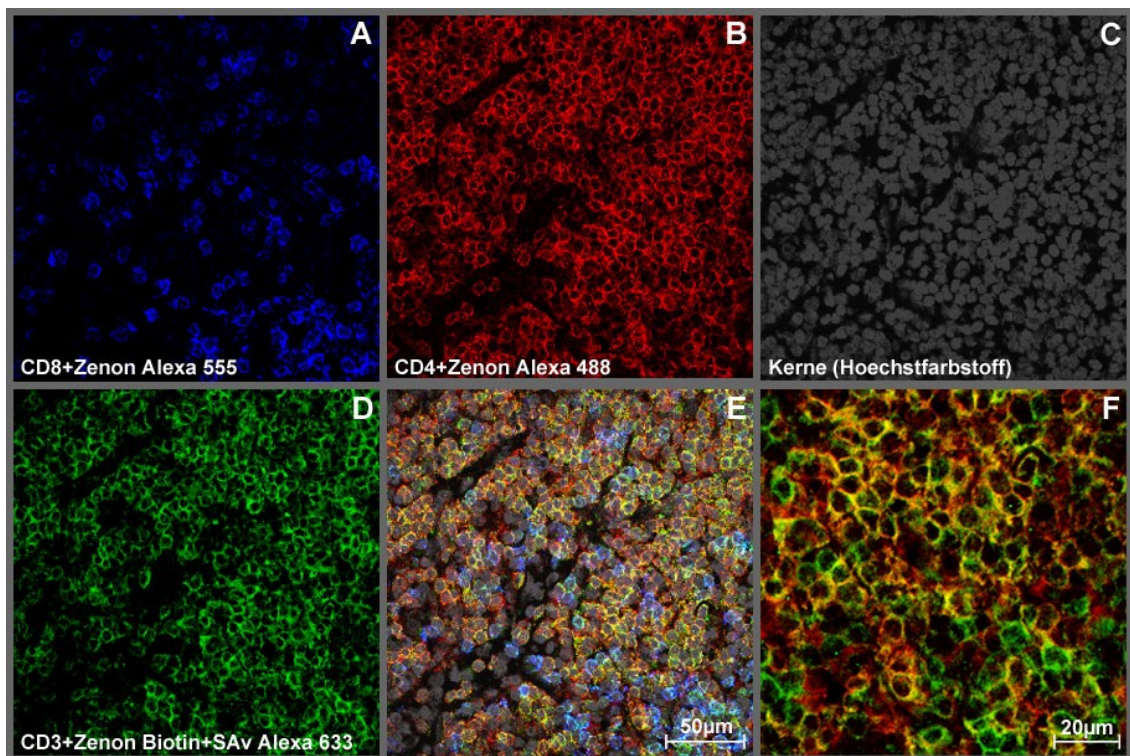
Biotinylierte Antikörper ermöglichen eine erweiterte Nutzung der Fab-Fragment-Technik. Für die korrekte spektrale Trennung der Fluorochrome ist ein ausreichender Abstand zwischen den Exzitations- und vor allem den Emissionsmaxima der genutzten Fluorochrome notwendig, die dafür benötigten fluorochromkonjugierten Fab-Fragmente sind aber nicht immer im benötigten Wellenlängenbereich vorhanden oder stehen aus ökonomischen Gründen nicht zur Verfügung. Eine Alternative bietet die etablierte Avidin-Biotin-Methode, für diese existieren zahlreiche fluorochromkonjugierte Streptavidinkonjugate (SAv). Allein vom Hersteller Invitrogen werden über 20 Streptavidine mit Fluorochromen unterschiedlichster Spektralbereiche angeboten. Durch diese Auswahl ist eine gute spektrale Trennung der einzelnen Wellenlängen,

durch sinnvolle Kombination von Fluorochromen mit ausreichendem Emissionsmaximaabstand, bei den meisten Vierfachmarkierungen möglich. Zusätzlich können die fluorochromkonjugierten Streptavidine auch für herkömmliche indirekte Markierungen mit biotinylierten Sekundärantikörpern genutzt werden und bieten somit einen ökonomischen Vorteil.



**Diagramm 3.10: Vierfachmarkierung mit Fab-Fragmenten und Nutzung der Streptavidin-Biotin-Methode**

Die Vierfach- und Dreifachmarkierungen mit Nutzung eines biotinylierten Antikörpers wiesen bei simultaner Auftragung der Antikörperkomplexe eine gute Differenzierung der jeweils markierten Zellen auf (siehe Abbildung 3.8). Kreuzreaktionen waren nicht zu beobachten und das fluorochromkonjugierte Streptavidin führte zu keiner Erhöhung der unspezifischen Hintergrundmarkierung. Die verlängerte Markierungszeit und dadurch ebenfalls verlängerte Lagerungszeit der fluorochromkonjugierten Fab-Fragmente in Lösung hatte im Vergleich zur Einfachmarkierung keinen Einfluss auf die Intensitätsbreite (siehe Diagramm 3.10). Kontrollmarkierungen unter äquivalenten experimentellen Voraussetzungen zeigten vereinzelt eine Varianz zwischen Einzel- und Mehrfachmarkierung auf, wobei die Mehrfachmarkierungen durchweg ein gut reproduzierbares Ergebnis aufwiesen.



**Abbildung 3.8: Fab-Fragment-Dreifachmarkierung mithilfe biotinylierter Fab-Fragmente**

Die Bilder A-D zeigen die einzelnen Kanäle der Dreifachmarkierung inklusive Kerndarstellung. Im Bild E sind die Einzelkanäle als Gesamtbild überlagert. In Gelb (Mischfarbe aus Rot und Grün) bilden sich die CD4-positiven Zellen ab, da sie Teil der CD3-positiven Zellen (grün) sind. Die CD8-positiven Zellen (blau), ebenfalls ein Teil der CD3-positiven Zellen, stellen sich durch die Mischung mit Grün (CD3) in Hellblau dar. Die CD4- und CD8-positiven Zellen ergeben zusammen die Gesamtheit aller CD3-positiv markierten Zellen. Dieses erkennt man sehr gut im Bild F, welches einen vergrößerten Ausschnitt darstellt. Dort sind nur der grüne und rote Kanal simultan dargestellt. Somit entsprechen die nur in Grün dargestellten Zellen den CD8-positiven Zellen und die gelb markierten Zellen den CD4-positiven. Vereinzelt sind Zellen rot markiert und stellen nur CD4-positive Zellen dar, wie beispielsweise Makrophagen.

## 4 Diskussion

Immunmehrfachmarkierungen an Zellen oder Gewebsschnitten sind heute in vielen Bereichen der Medizin und Biologie eine Standardmethode zur Darstellung von zellulären Strukturen. Durch die häufig notwendige Vielzahl an Markierungsschritten, abhängig von den genutzten Antikörpern und Fluorochromen, können sie arbeits- und zeitintensiv werden. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, Methoden zu erproben und zu etablieren, welche es einfach, sicher und schnell ermöglichen, Mehrfachmarkierungen mit bis zu 4 Antikörpern aus derselben Spezies durchzuführen. Für die Markierungen wurden monoklonale IgG<sub>1</sub>-Primärantikörper aus der Maus und fluorochromkonjugierte Fab-Fragmente als Sekundärantikörper benutzt.

### 4.1 Eigenschaften der Fab-Fragmente

Ein Antikörpermolekül besteht aus einem Fc- und zwei Fab-Anteilen; dabei sind die Fab-Anteile verantwortlich für die antigenspezifische Bindung. Für viele immunhistochemische Markierungen werden vollständige Antikörpermoleküle genutzt, doch gerade für Mehrfachmarkierungen mit Antikörpern derselben Spezies sind diese aufgrund umfangreicher Markierungsprotokolle und möglicher Kreuzreaktionen nur bedingt einsetzbar (van der Loos et al., 1993; Eichmüller et al., 1996; Kroeber et al., 1998; Tornehave et al., 2000). Antikörpermoleküle können durch Proteasen gespalten werden (Yamaguchi et al., 1995), die dadurch entstehenden Fab-Fragmente bieten durch nur *eine* vorhandene Antigenbindungsstelle besondere Vorteile (siehe 1.3). So ermöglichen Fab-Fragmente auf einfache Weise die Durchführung von Mehrfachmarkierungen mit speziesgleichen Primärantikörpern, wie van der Loos und Göbel (2000) anhand von Zweifachmarkierungen zeigten, und verhindern zudem effektiv Kreuzreaktionen (Brown et al., 2004).

#### 4.1.1 Das optimale Massenverhältnis

Indirekte Markierungen haben eine stärkere Leuchtkraft als direkte Markierungsmethoden, dieses ist bedingt durch die vermehrte Anzahl der gebunden

fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper am Primärantikörper und der daraus resultierenden Fluoreszenzsignalverstärkung (Brelje et al., 2002). Als Sekundärantikörper werden bei der Fab-Fragment-Technik fluorochromkonjugierte Fab-Fragmente benutzt. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls beobachtet werden, dass das Verhältnis von Fab-Fragment zu Primärantikörper einen unmittelbaren Einfluss auf die Markierungsintensität hat. Ebenso beeinflusst dieses Verhältnis auch die Intensität der unspezifischen Hintergrundmarkierung. Für Fluoreszenzmarkierungen ist daher ein optimales Verhältnis von Primärantikörpern und Fab-Fragmenten von grundlegender Bedeutung. In den durchgeführten Experimenten fanden sich gute Markierungsergebnisse bei einem Massenverhältnis von 2:1 (Fab-Fragment:Primärantikörper). Dieses Verhältnis führte bei allen getesteten Antikörpern zu ausreichend hellen Markierungen und wurde daher als Standard für alle durchgeführten Fab-Fragment-Markierungen definiert. Das vom Hersteller Invitrogen als Basis angegebene Massenverhältnis zwischen Fab-Fragment und Primärantikörper von 1:1 zeigte nur mäßige Markierungsergebnisse. Lediglich bei Markierungen des Vimentins, einem stark exprimierten Strukturprotein, waren damit gute Fluoreszenzintensitäten sichtbar. Auch Brown et al. (2004) titrierten für ihre Fab-Fragment-Markierungen ein Massenverhältnis von 2:1 als Optimum aus, ein Ergebnis, welches mit unseren Untersuchungen konform geht. Ursächlich für die schwachen Markierungsergebnisse bei einem MV von 1:1 sind wahrscheinlich noch freie Bindungsstellen am Fc-Anteil des Primärantikörpers und die somit fehlende Fluoreszenzsignalverstärkung, denn durch eine Erhöhung des Massenverhältnisses bis zu einem Maximum von 4:1 konnten kräftigere Fluoreszenzsignale detektiert werden (siehe Diagramm 3.1). Eine weitere Erhöhung der Fab-Fragment-Menge, auch bei schwach exprimierten Antigenen, brachte keinen Zusatznutzen. Bei besonderen Fragestellungen, wie beispielsweise der Detektion von mRNA, kann jedoch eine Erhöhung des Massenverhältnisses sinnvoll sein. So erhöhten von Smolinski et al. (2006) bei Fab-Fragment-Markierungen das Massenverhältnis deutlich über das in der vorliegenden Arbeit empfohlene Optimum, um möglichst kurze Inkubationszeiten zum Schutz der empfindlichen mRNA zu erreichen. So konnte eine hohe Anzahl gebundener Fab-Fragmente am Primärantikörper erreicht werden, wodurch ein starkes Fluoreszenzsignal auch bei kurzen Markierungszeiten detektierbar war.

#### 4.1.2 Verhalten der Antikörperkomplexe in Lösung

Die Fab-Fragment-Technik ist eine Mischform aus direkter und indirekter Markierungsmethode. So werden Antikörperkomplexe gebildet wie bei der indirekten Methode, dieses erfolgt bei der Fab-Fragment-Technik jedoch nicht erst auf dem Gewebsschnitt, sondern bereits im Reaktionsgefäß. Für reibungslose Markierungsabläufe, vor allem bei Mehrfachmarkierungen, oder einfach aus praktischen Gründen kann eine vorherige Vorbereitung und Lagerung der fertigen Antikörperkomplexe (Fab-Fragment und Primärantikörper) hilfreich sein. Um eine Beeinflussung der Markierungen durch variable Lagerungszeiten auszuschließen, wurden Antikörperkomplexe hergestellt, als fertige Lösung im Reaktionsgefäß bis zu 16 Stunden bei Raumtemperatur gelagert und anschließend für die Markierungen benutzt. Bereits nach Aufbewahrungszeiten von 2 Stunden kam es zu signifikanten Intensitätsverlusten. Um eine Beeinflussung durch die Umgebungstemperatur auszuschließen, erfolgten weitere Experimente bei 7° Celsius, doch auch dabei konnten Intensitätsverluste beobachtet werden.

Zur Beurteilung von Kreuzreaktionen und unspezifischer Hintergrundmarkierung wurden zudem Experimente durchgeführt mit unterschiedlicher Lagerungsdauer der Antikörperkomplexe direkt auf dem Gewebe. Kreuzreaktionen konnten dabei nicht beobachtet werden, doch auch bei diesen Experimenten zeigte sich eine Abnahme der Markierungsintensität mit zunehmender Markierungsdauer. Verschiedene Lagerungsmedien (PBS, Mowiol-Eindeckmittel) konnten die Intensitätsverluste nur verlangsamen aber nicht verhindern (Diagramm 3.6). Als Erklärung für die gemessenen Intensitätsverluste muss ein Ausbleichen der Fluorochrome in Betracht gezogen werden. Da die Aufbewahrung der Antikörperkomplexe sowie die Markierungen unter lichtgeschützten Bedingungen stattfanden, ist dieses jedoch unwahrscheinlich. Zudem zeichnen sich die benutzten Alexa-Farbstoffe durch eine hohe Leuchtkraft und geringe Bleichempfindlichkeit aus (Panchuck-Voloshina et al., 1999; Berlier et al., 2003). Die denkbarste Ursache für die Intensitätsverluste wäre eine Dissoziation zwischen Antigen und Primärantikörper oder Primärantikörper und Fab-Fragment, wobei Letzteres am wahrscheinlichsten ist. Würde die Bindung zwischen dem Primärantikörper und dem Antigen verantwortlich für die Intensitätsabnahme sein, so dürften sich bei vorheriger Lagerung

des Antikörperkomplexes im Reaktionsgefäß, unabhängig von der Dauer, keine Intensitätsverluste zeigen, dieses ist jedoch der Fall (Diagramm 3.7). Auch bei der unspezifischen Hintergrundmarkierung wurden Intensitätsverluste beobachtet, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die möglicherweise frei gewordenen Fab-Fragmente sich nicht unspezifisch ablagern. Gegebenenfalls werden die Fab-Fragmente durch noch vorhandene unspezifische Immunglobulin-Moleküle, welche bei der Herstellung der Antikörperkomplexe zur Bindung überschüssiger Fab-Fragmente hinzugefügt wurden, gebunden oder liegen frei in der Lösung vor. Möglicherweise liegt die Ursache für die Intensitätsverluste auch primär an der molekularen Struktur der Fab-Fragmente. Röthlisberger et al. (2005) konnten nachweisen, dass die Stabilität der Fab-Fragmente abhängig von einzelnen Domänen und den vorhandenen Disulfidbrücken ist. Der molekulare Aufbau der benutzten Fab-Fragmente ist jedoch nicht bekannt. Wo auch immer die Ursache liegen mag, durch die bereits nach 2 Stunden beginnenden Intensitätsverluste ist die Nutzung der Fab-Fragment-Technik für bestimmte Markierungsmethoden oder Fragestellungen limitiert. Eine vorzeitige Herstellung oder längerfristige Aufbewahrung der Antikörperkomplexe ist nicht empfehlenswert. Generell muss bei allen Markierungen welche länger als 2 Stunden andauern, wie beispielsweise Dick-schnittmarkierungen (z. B. Schnittdicke  $> 30 \mu\text{m}$  zur dreidimensionalen Analyse, eigene nicht veröffentlichte Beobachtungen) oder Mehrfachmarkierungen mit mehreren zeitintensiven Arbeitsschritten, mit Intensitätsverlusten und dadurch mit möglicherweise verfälschten Ergebnissen gerechnet werden.

#### **4.1.3 Einfluss der Markierungsdauer auf die Markierungsintensität**

Viele Faktoren, wie beispielsweise die Art der Markierungstechnik, Massenverhältnisse oder die Wahl der Fluorochrome, beeinflussen die Markierungsintensität. Bei jeder immunhistochemischen Markierung müssen jedoch Antigene und Antikörper miteinander in Kontakt kommen. Je länger die Markierungsdauer ist, desto mehr Antikörper können an noch freie Antigene binden. Daher ist die Dauer der Inkubation ein wesentlicher Faktor für die Markierungsintensität. Doch möglichst lange Inkubationszeiten können auch die unspezifische Hintergrundmarkierung erhöhen und Markierungsintensitäten negativ beeinflussen, wie sich in den Experimenten zeigte.

Für die Ermittlung der optimalen Markierungsdauer für die Fab-Fragment-Technik wurden verschiedenste Primärantikörper mit Inkubationszeiten (Dauer der Antikörperlösung auf dem Gewebe) von 2,5 Minuten bis zu 480 Minuten getestet. Gute Markierungsergebnisse bei den CD-Antikörpern konnten bereits ab einer Inkubationszeit von 30 Minuten erreicht werden. Verlängerte Inkubationszeiten über 120 Minuten zeigten äquivalent zu den Ergebnissen der Aufbewahrungsdauer fallende Intensitätsbreiten, welches nochmals den Verdacht auf eine instabile Bindung zwischen Primärantikörper und Fab-Fragment bestätigt. Die optimale Inkubationszeit ist jedoch auch abhängig von der Expression der Antigene. Bei hochexprimierten Antigenen wie z. B. dem Strukturprotein Vimentin konnten gute Markierungsergebnisse auch mit Inkubationszeiten von nur 5-10 Minuten erreicht werden. Somit bietet sich die Fab-Fragment-Technik auch für schnelle Immunmarkierungen an. Von Smolinski et al. (2006) nutzten diese Eigenschaft zur Detektion von mRNA für die Laser-Mikrodissektion und verhinderten so einen signifikanten Verlust der empfindlichen mRNA durch lange Markierungszeiten. Insgesamt können mit der Fab-Fragment-Technik gute Markierungen innerhalb von nur *einer* Stunde durchgeführt werden. Inkubationszeiten über 2 Stunden schwächen die Intensität der Markierung und sollten deshalb vermieden werden.

#### **4.1.4 Mehrfachmarkierungen mit speziegleichen Antikörpern**

Die einfachste immunhistochemische Methode zur Darstellung mehrerer Antigene ist die Technik der direkten Fluoreszenzmarkierung (siehe 1.2.1). Sie ermöglicht Markierungen mit bis zu 7 Antikörpern (Tsurui et al., 2000) und auch die Nutzung speziegleicher Antikörper ist problemlos möglich (Lanier und Loken, 1984; Stengl und Hildebrand; 1990). Doch durch die fehlende Signalverstärkung sind die Intensitäten direkter Markierungen im Vergleich zu indirekten Systemen geringer (Brelje et al., 2002; Boenisch, 2003). Dadurch kann die Analyse von Fluoreszenzmarkierungen, vor allem bei Mehrfachmarkierungen, erschwert werden. Indirekte Markierungsmethoden führen zu guten Fluoreszenzsignalen, doch ist die Anwendung dieser Methode für Mehrfachmarkierungen durch zahlreiche Arbeitsschritte zeitaufwendiger. Zudem sind indirekte Mehrfachmarkierungen häufig nur durch den Einsatz von Primärantikörpern

verschiedener Spezies möglich. So beschrieben Ferri et al. (1997) eine indirekte Vierfachmarkierung unter der Nutzung von Antikörpern aus Schafen, Meerschweinchen, Affen, Kaninchen und Mäusen. Stehen für indirekte Mehrfachmarkierungen nur Primärantikörper aus derselben Spezies zur Verfügung, sind Mehrfachmarkierungen nicht oder nur durch komplexe Markierungsprotokolle möglich. Kroeber et al. (1998) und Tornehave et al. (2000) beschrieben Zweifachmarkierungen mit speziesgleichen Antikörpern. Eine Möglichkeit der Dreifachmarkierung unter Nutzung von Fab-Fragmenten zur Blockierung freier Antigenbindungsstellen wurde von Brouns et al. (2002) beschrieben. Doch je mehr speziesgleiche Antikörper genutzt werden, desto schwieriger wird die Umsetzung der Markierungsprotokolle. Durch die Nutzung von kommerziell erhältlichen Fab-Fragmenten können Mehrfachmarkierungen mit Antikörpern derselben Spezies erheblich vereinfacht werden. Brown et al. beschrieben 2004 erstmalig eine Dreifachmarkierung mit Rattenantikörpern welche mit fluorochromkonjugierten Fab-Fragmenten markiert wurden. In der vorliegenden Arbeit gelangen Markierungen mit 4 Mausantikörpern. Systematisch wurden Mehrfachmarkierungen mit der simultanen Nutzung von 2, 3 und 4 monoklonalen CD-Mausantikörpern derselben Immunglobulinklasse (IgG<sub>1</sub>) erprobt. Mit verschiedensten Antikörperkombinationen und unterschiedlichen Auftragsarten (simultan und nacheinander) wurde die Fab-Fragment-Technik hinsichtlich der Markierungsintensität und möglicher Kreuzreaktionen untersucht. Sowohl bei den Zwei-, Drei- als auch den Vierfachmarkierungen, unabhängig von der Auftragsart, konnten keine Kreuzreaktionen beobachtet werden. Brown et al. (2004) beobachteten allerdings geringe Kreuzreaktionen bei den Dreifachmarkierungen. Bei allen durchgeführten Mehrfachmarkierungen waren keine signifikanten Intensitätsunterschiede im Vergleich zu den Einfachmarkierungen, welche als Referenz dienten, messbar. Auch bei Mehrfachmarkierungen mit verlängerter Markierungsdauer von bis zu 3 Stunden, durch nacheinander aufgetragene Antikörperkomplexe, fanden sich keine Intensitätsunterschiede. Diese Ergebnisse sprechen für spezifisch bindende und stabile Antikörperkomplexe. Jedoch muss angemerkt werden, dass es bei weiterer Verlängerung der Inkubationszeit zu Intensitätsunterschieden zwischen der Einfach- und der Mehrfachmarkierung kommen könnte, bedingt durch die mögliche Dissoziation von Primärantikörper und Fab-Fragment (siehe 3.1.3). Dieses wurde aber innerhalb der maximalen Markierungsdauer von 3 Stunden nicht beobachtet.

Generell sollte jedoch bei der Nutzung von Fab-Fragmenten auf kurze Gesamtmarkierungszeiten geachtet werden. Daher wurde zur Verkürzung der Markierungsdauer teilweise Hoechstfarbstoff als simultane Kernfärbung zum Gemisch der Antikörperkomplexe gegeben. Kreuzreaktionen oder eine Beeinflussung der Markierungsintensität waren darunter nicht zu beobachten und die Markierungsdauer konnte durch Kombination zweier Arbeitsschritte um *eine* Stunde verkürzt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass es problemlos möglich ist, mit 4 monoklonalen Antikörpern aus derselben Spezies und Immunglobulinklasse, Mehrfachmarkierungen innerhalb von nur *einer* Stunde durchzuführen. Dieses stellt einen enormen Fortschritt in der immunhistologischen Methodik dar.

### **Nutzung von biotinylierten Fab-Fragmenten**

Die Streptavidin-Biotin-Methode ist eine häufig benutzte Technik für immunhistochemische Markierungen (Coleman, 2000). Sie bietet bei Mehrfachmarkierungen vielfältige Kombinationsmöglichkeiten durch zahlreiche fluorochromkonjugierte Streptavidine, gleichzeitig ist sie einfach anzuwenden und produziert gute Markierungsergebnisse, wie beispielsweise Würden und Homberg (1992) anhand von Zweifachmarkierungen zeigten. Daher sind die kommerziell erhältlichen biotinylierten Fab-Fragmente eine gute Ergänzung zu den fluorochromkonjugierten Fab-Fragmenten. Die Anwendung der Streptavidin-Biotin-Methode ist jedoch stets mit einem zusätzlichen Arbeitsschritt verbunden (Bindung des Streptavidins an das Biotin), zudem hat das Streptavidin eine hohe Affinität zu endogenem Biotin, wodurch verstärkte Hintergrundmarkierung auftreten kann (Grumbach und Veh, 1995; Wang und Pevsner, 1999). Bei der Benutzung und Austestung der biotinylierten Fab-Fragmente verlängerte sich die Markierungsdauer um *eine* Stunde durch den zusätzlichen Arbeitsschritt. Dieses führte jedoch zu keiner signifikanten Beeinflussung der Markierungsintensitäten (Diagramm 3.10). In der Kombination von biotinylierten Fab-Fragmenten mit mehreren fluorochromkonjugierten Fab-Fragmenten für Drei- und Vierfachmarkierung konnten keine Kreuzreaktionen und keine vermehrte Hintergrundmarkierung beobachtet werden (siehe Abbildung 3.8). Somit zeigt sich, dass durch die Nutzung der Streptavidin-Biotin-Methode in Verbindung mit der Fab-Fragment-Technik gute Markierungsergebnisse möglich sind. Zudem erweitern die biotinylierten Fab-Fragmente die

Flexibilität und Einsatzmöglichkeiten der Fab-Fragment-Technik. Der Vorteil der Zeitersparnis wird jedoch durch den Einsatz von biotinylierten Antikörpern geschmälert. Für Drei- oder Vierfachmarkierungen ist der Einsatz von biotinylierten Fab-Fragmenten dennoch eine hervorragende Alternative, da herkömmliche Markierungsprozeduren teilweise Tage dauern (Ferri et al., 1997). Zudem sind biotinylierte Fab-Fragmente auch in Kombination mit herkömmlichen indirekten Markierungsmethoden einsetzbar (van der Loos und Göbel, 2000) und bilden aufgrund der großen Auswahl fluorchromkonjugierter Streptavidine, welche auch für andere indirekte Markierungsmethoden genutzt werden können, eine gute Ergänzung.

## 4.2 Messmethode

Zur Bestimmung der Markierungsstärke wurde für die Arbeit eine neue Messmethode entwickelt, basierend auf der Analyse von Pixelintensitätsverteilungen. Die Histogramme dieser Auswertungsmethode stellen Pixel eines Bildes in Bezug zu ihrem Helligkeitswert dar und können zur Beurteilung der Markierungsstärke benutzt werden. Üblicherweise entstehen dabei Gipfel, welche die maximale Intensität einer Markierung abbilden. Sabri et al. (1997) beschrieben Histogramme mit 2 Intensitätsgipfeln, einen für den Background und einen für die spezifische Markierung. In den ermittelten Histogrammen dieser Arbeit konnte nur *ein* Gipfel identifiziert werden (siehe Abbildung 2.7), welcher dem Maximum des Backgrounds entsprach. Maxima für die spezifischen Markierungen konnten somit nicht ermittelt werden. Ursächlich hierfür war ein hoher Anteil an unspezifischer Hintergrundmarkierung, wodurch es zu einer Abflachung bzw. Verdeckung des Gipfels im Bereich der spezifisch markierten Areale in den Histogrammen kam. Daher wurden neue Messmethoden erprobt, wie beispielsweise die Aufzeichnung und Auswertung kleinerer spezifisch markierter Areale (Region of interest, ROI). Demandolx und Davoust (1997) nutzten diese Methodik zur Reduktion der Hintergrundmarkierung um Kollokationen besser untersuchen zu können. Diese Messmethode war jedoch sehr zeitaufwändig und erbrachte keine verbesserten Messwerte. Auch Helligkeitsmessungen über automatisch ermittelte Belichtungszeiten, wie sie von Wessendorf und Brelje (1992) genutzt wurden, eigneten sich aufgrund des inhomogenen Verteilungsmusters der spezifisch markierten Areale nicht zur Intensitätsbestimmung. Um jedoch die Markierungsintensitäten miteinander vergleichen zu

können, muss die unspezifische Hintergrundmarkierung eliminiert werden (Benchaib et al.; 1996), dieses gelang durch die Einstellung eines Schwellenwertes (Threshold) in den Histogrammen (siehe Abbildung 2.7). Im optischen Abgleich mit dem mikroskopierten Gewebeschnitt wurde ein unterer Threshold definiert, ab dem nur noch das Histogramm der spezifisch markierten Areale sichtbar war. In einigen Markierungen waren punktuell sehr helle Signale erkennbar, welche z. B. durch Ablagerungen von Fluorochromkonglomeraten hervorgerufen wurden. Um diese Fluoreszenzsignale im oberen Intensitätsbereich auszugrenzen, erfolgte die Einstellung eines oberen Thresholdes, wobei extrem helle Fluoreszenzsignale außerhalb des Dynamikbereichs des Detektors durch optimierte Intensitätseinstellung der anregenden Laser stets vermieden wurden. Durch Subtraktion des unteren vom oberen Schwellenwert konnte so ein Spektrum der Markierungsintensität ermittelt werden. Hierfür wurde in dieser Arbeit der Begriff Intensitätsbreite eingeführt und als Kriterium für die Markierungsstärke benutzt. Die manuell eingestellten Schwellenwerte bergen natürlich einen subjektiven Fehler durch den auswertenden Beobachter. Um diesen zu minimieren, wurden pro Gewebeschnitt 5 Scans in unterschiedlichen Arealen aufgezeichnet und die dazugehörigen manuellen Threshold-Einstellungen ermittelt. Sämtliche Messungen erfolgten zudem durch eine Person (Carsten Haas), wodurch subjektiv unterschiedliche Wahrnehmungen reduziert werden konnten. Die Methode der Threshold-Messung zeigte reproduzierbare Ergebnisse mit geringer mittlerer Abweichung von durchschnittlich 9% (siehe 3.1). Die Erfahrungen dieser Arbeit gehen konform mit den Ergebnissen von Mossberg et al. (1990), die eine technische Methode zur automatischen Thresholdermittlung entwickelten, welche verglichen mit den hier verwendeten manuellen Einstellungen ähnlich gute Ergebnisse erbrachte.

Durch die Nutzung der Intensitätsbreite als Markierungsmaß ergeben sich valide und vergleichbare Werte für die jeweiligen Markierungen. Vereinzelt stärker fluoreszierende Areale werden berücksichtigt, verfälschen aber nicht das Ergebnis, wie es beispielsweise der Fall sein könnte, wenn Intensitätsmaxima zur Auswertung benutzt würden. Die ermittelten Intensitätsbreiten bilden jedoch nicht die reale Leuchtkraft einer Markierung ab. Das bedeutet, dass Markierungen trotz gleicher Intensitätsbreiten deutliche Helligkeitsunterschiede aufweisen können. So fanden sich bei den durchgeführten

Vimentinmarkierungen vergleichbare Intensitätsbreiten nach 5 und 10 min (siehe Diagramm 3.3), durch die verdoppelte Inkubationszeit zwischen Antigen und Antikörper konnten nach 10 Minuten jedoch deutlich mehr Epitope markiert werden, was zu einem helleren Erscheinungsbild führte trotz gleicher Intensitätsbreiten (Abbildung 3.3). Somit ist je nach Fragestellung auch immer das subjektive Ergebnis zu berücksichtigen, für die objektive Markierungsbeurteilung ist die Thresholdmessung jedoch gut geeignet.

### 4.3 Ökonomische Gesichtspunkte

Zahlreiche Aspekte bezüglich der effizienten Nutzung von Fab-Fragmenten für die immunhistochemische Methodik wurden in dieser Arbeit experimentell untersucht. Dabei zeigte sich unter anderem, dass der Einsatz von Fab-Fragmenten aus zeitökonomischer Sicht für Mehrfachmarkierungen hervorragend geeignet ist. Ein wichtiger Punkt für die Etablierung im Alltag ist jedoch auch die Wirtschaftlichkeit einer Methode, welche unter anderem vom finanziellen Aufwand abhängig ist. Deshalb sollen im folgenden Abschnitt speziell die Kosten einer Fab-Fragment-Markierung erörtert werden.

#### Markierungskosten

Stehen sowohl direkt konjugierte Antikörper als auch unkonjugierte Primärantikörper und Fab-Fragmente für eine Einfach- oder Mehrfachmarkierung zu Verfügung, so sollten hinsichtlich einer effizienten Arbeitsweise auch die Kosten der Markierung berücksichtigt werden. Um diese miteinander zu vergleichen, wurden exemplarisch 2 verschiedene CD3-Markierungen gegenübergestellt: 1. CD3-Antikörper direkt konjugiert mit Alexa 488 und 2. CD3-Antikörper konjugiert mit Zenon Alexa 488. Pro Markierung, d. h. pro benetztem Objektträger mit einer Menge von 50  $\mu$ l bei einer Verdünnung von 1:100, wurden 0,1  $\mu$ g der CD3-Antikörper als Berechnungsgrundlage angenommen (Tabelle 4.2). Diese Angaben entsprechen praxisüblichen Mengen, ebenso entsprechen die angegebenen Preise (ohne Mehrwertsteuer) dem aktuellen Stand beim Hersteller. Weitere Kosten für Labormaterial und andere Reagenzien wurden nicht mit berücksichtigt. Aus den aufgeführten Werten (Tabelle 4.2) ergeben sich für eine Einfachmarkierung mit direkt konjugierten Antikörpern Kosten in Höhe von 0,40

Euro/Objektträger, für die Nutzung der Fab-Fragment-Technik entstehen Kosten von 0,93 Euro/Objektträger (CD3-Antikörper + Fab-Fragment) bei einem Massenverhältnis von 1:1. Erhöht man das Massenverhältnis auf die in dieser Arbeit als optimal bestimmte Relation von 2:1, so liegen die Kosten bei 1,67 Euro pro Objektträger. Damit kostet eine Fab-Fragment-Markierung ca. das Doppelte bzw. Vierfache einer direkt durchgeführten Einfachmarkierung. Die deutlich höheren Kosten für eine Fab-Fragment-Markierung stellen jedoch kein Argument für die primäre Nutzung direkt konjugierter Antikörper dar. Durch die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der Fab-Fragmente und die Tatsache, dass indirekte Markierungen eine höhere Intensität als direkte Markierungen aufweisen (Brown et al. 2004), kann die Nutzung der Fab-Fragment-Technik, je nach experimenteller Fragestellung, durchaus auch eine ökonomische Alternative darstellen.

Herstellerangaben	Menge	Preis in Euro
anti-CD3, mouse IgG <sub>1</sub> , monoclonal 289-13801	0,5 ml (0,2 µg/µl)	194
anti-CD3, mouse IgG <sub>1</sub> , monoclonal 289-13801, Alexa Fluor® 488 conjugate	0,5 ml (0,2 µg/µl)	403
Zenon® Alexa Fluor® 488 Mouse IgG <sub>1</sub> Labeling Kit *50 labelings*	250 µl (0,2 µg/µl)	370

**Tabelle 4.1: Preise ausgewählter Antikörper (Stand 05/2010)**

Antikörper	Euro/µg	pro Markierung <sup>1</sup>
CD3	1,94	0,19 €
CD3 mit Alexa 488 direkt konjugiert	4,03	0,40 €
Fab-Fragment (Zenon Alexa 488)	7,40	0,74 € (MV 1:1) <sup>2</sup> 1,48 € (MV 2:1)

**Tabelle 4.2: Kosten pro Markierung**

<sup>1</sup> Als Berechnungsgrundlage für eine Markierung wurde die Nutzung von 0,1 µg Antikörper bei einer Verdünnung von 1:100 auf 50µl angenommen. Die Menge des genutzten Antikörpers wurde für die direkte als auch für die Fab-Fragment-Markierung als identisch vorausgesetzt.

<sup>2</sup> Kosten für unterschiedliche Massenverhältnisse (MV) von Fab-Fragment zu Primärantikörper (ohne Berücksichtigung der Kosten für die Primärantikörper).

### **Verfügbarkeit fluorochromkonjugierter Fab-Fragmente**

In dieser Arbeit wurden ausschließlich monoklonale Fab-Fragmente der Maus genutzt. Die vom Hersteller Invitrogen angebotenen Fab-Fragmente sind für die Spezies Mensch, Maus, Kaninchen und Ziege der Immunglobulinklasse G verfügbar. Für Fab-Fragmente der Maus werden sogar isotypspezifische Immunglobuline der Klassen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> und IgG<sub>2b</sub> angeboten. In der Forschung werden jedoch auch Primärantikörper aus Hamstern oder Ratten benutzt, eine Erweiterung der Fab-Fragmente um diese beiden Spezies würde die Flexibilität der Methode weiter erhöhen. Hervorragend ist das Angebot der an Fab-Fragmente gekoppelten Fluorochrome: Diesbezüglich werden alle Anregungswellenlängen vom UV- bis zum Infrarot-Bereich lückenlos abgedeckt.

### **4.4 Grenzen der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie**

Die sichere spektrale Trennung verschiedener Fluorochrome ist bei der Auswertung von Fluoreszenzmehrfachmarkierungen eine Grundvoraussetzung. Bei Doppelmarkierungen ist dieses relativ einfach mittels geeigneter Bandpassfilter, einer entsprechenden Lichtquelle (Quecksilberlampe, Laser) und einem Fluoreszenzmikroskop möglich (Ferri et al., 1997; Kumar et al., 1999). Je mehr Fluorochrome gleichzeitig eingesetzt werden, desto schwieriger wird die Trennung der Emissionen. Sie ist häufig nur durch spezielle Software und den Einsatz von Laser-Scanning-Mikroskopen zu erreichen. So gelangen Carlsson und Liljeborg (1997) die spektrale Trennung und simultane Darstellung von 4 Fluorochromen mithilfe eines Konfokalmikroskops. In dieser Arbeit sollten bis zu 5 Fluoreszenzspektren voneinander getrennt werden. Dieses erfolgte unter Nutzung des Konfokalmikroskops Zeiss LSM 510 META. Zur Detektion der Fluoreszenzsignale wurden 3 Kanäle genutzt (Abbildung 2.4), wobei für 2 Kanäle Bandpassfilter zur spektralen Trennung dienten (z. B. Hoechstfarbstoff: BP 385-470 nm; Alexa 488: BP 505-530 nm), der dritte Kanal („META“-Kanal) bot die Möglichkeit der individuellen Bandpass-Einstellung für maximal 8 Fluorochrome. Somit hätten mit der vorliegenden Technik theoretisch bis zu 10 Fluoreszenzsignale simultan aufgezeichnet und spektral getrennt werden können. Doch schon die simultane Detektion von 5 Fluorochromen war nicht trivial. Durch die stark überlappenden Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome kam es zu einem erheblichen Cross-talk, d. h. der ungewollten Mitabbildung

von anderen Fluoreszenzsignalen (Carlsson et al., 1994), und einer unvollständigen spektralen Trennung. Um die Fluoreszenzsignale einwandfrei aufzeichnen und auswerten zu können, wurden verschiedene Möglichkeiten erprobt.

### **Aufzeichnungen im Single- und Multi-Track-Modus**

Zur Detektion von Fluoreszenzsignalen bietet das LSM 510 META verschiedene Möglichkeiten. In dieser Arbeit wurde der Multi-Track-Modus zur Aufzeichnung von Mehrfachmarkierungen benutzt, doch auch der Single-Track-Modus wurde erprobt. Im Single-Track-Modus konnten durch optimal gewählte Fluorochromkombinationen und eng eingestellte Bandpassfilter im Bereich der jeweiligen Emissionsmaxima zwar alle 5 Wellenlängen voneinander getrennt werden, doch im Vergleich zum Multi-Track-Modus war das Signal-Rausch-Verhältnis der Bilder schlechter. Ursächlich hierfür waren die sehr eng eingestellten Bandpassfilter, da dadurch nur ein geringer Anteil der Emission detektiert werden konnte und so ein intensitätsärmeres Bild entstand. Um jedoch effektiv den Cross-talk zu vermeiden, waren diese eng begrenzten Bandbreiteneinstellungen der Filter notwendig. Auch höhere Laserintensitäten führten zu keiner wesentlichen Verbesserung der Bildqualität, zudem verstärken erhöhte Laserintensitäten das Ausbleichen der Fluoreszenz (Brelje et al., 2002).

Da sich der Single-Track-Modus nur bedingt zur simultanen Aufzeichnung von Mehrfachmarkierungssignalen eignet, wurde der Multi-Track-Modus erprobt. Dabei werden die verschiedenen Fluoreszenzsignale einer Mehrfachmarkierung in mehreren nacheinander durchgeführten Scandurchläufen separat detektiert und anschließend zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Für jeden Scandurchlauf wird die optimale Laserlinie im entsprechenden Exzitationsbereich des zu detektierenden Fluorochroms genutzt (z. B. Argon-Laser mit 488 nm zur Anregung des Farbstoffs Alexa 488). Ein Nachteil dieser Methode ist die verlängerte Aufzeichnungsdauer bei Mehrfachmarkierungen, bedingt durch die Anzahl an Scandurchläufen, wodurch es theoretisch zu einem vermehrten Ausbleichen der Markierung kommen kann. Dieses konnte in den Experimenten nicht beobachtet werden. Um jedoch die Aufzeichnungsdauer weiter zu verkürzen, können auch im Multi-Track-Modus pro Scandurchlauf mehrere Fluoreszenzsignale aufgezeichnet werden, dabei sollte jedoch auf eine ausreichende spektrale Distanz bezüg-

lich der Emissionsmaxima (z. B. Alexa 488 und Alexa 647) geachtet werden, um Cross-talk zu vermeiden. Kenntnisse über die Expression von Antigenen können den Cross-talk weiter reduzieren. Bei den durchgeführten Vierfachmarkierungen hat es sich bewährt, schwach exprimierte Antigene mit Fluorochromen kurzer Wellenlängen, z. B. aus dem UV- und Blaubereich, zu markieren und für stärker exprimierte Antigene Fluorochrome längerer Wellenlängen zu nutzen. So wird die Beeinflussung durch starke Fluoreszenzsignale (siehe Abbildung 2.5) in dicht beieinander liegenden Spektralbereichen minimiert. In dieser Arbeit wurde zur Auswertung von Mehrfachmarkierungen ausschließlich der Multi-Track-Modus genutzt, und es wurden pro Scandurchlauf nicht mehr als 2 Fluoreszenzspektren gleichzeitig aufgezeichnet. So konnte die Scanzeit verkürzt werden bei gleichbleibend guter Bildqualität, vermindertem Risiko des Ausbleichens und ohne Cross-talk.

#### 4.5 Abschließende Betrachtung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode aufzuzeigen, welche es ermöglicht, immunhistochemische Mehrfachmarkierungen mit speziesgleichen Antikörpern durchzuführen. Bisher war die Nutzung von mehreren Antikörpern aus derselben Spezies gar nicht oder nur durch komplexe Blockierungsmechanismen möglich. Durch die Anwendung der Fab-Fragment-Methode, welche in dieser Arbeit systematisch erprobt und modifiziert wurde, steht ein qualitativ hochwertiges Verfahren für die einfache und zügige Durchführung von Fluoreszenzmehrfachmarkierungen zur Verfügung. Bis zu 4 monoklonale Antikörper der Maus (IgG<sub>1</sub>) konnten gleichzeitig genutzt werden, um eine Fluoreszenzmarkierung in nur *einer* Stunde durchzuführen. Die Markierungsergebnisse sind durchaus vergleichbar mit bisherigen direkten und indirekten Markierungstechniken. Langwierige Markierungsprotokolle mit Markierungszeiten von vielen Stunden bis Tagen und aufwendigen Blockierungstechniken können dadurch vermieden werden. Auch eine kombinierte Nutzung mit herkömmlichen direkten und indirekten Markierungsmethoden ist möglich. Die Nutzung von Alexa-Farbstoffen gewährleistet gute und bleichstabile Fluoreszenzsignale im gesamten Fluoreszenzspektrum.

Aufgrund des Aufbaus und der Eigenschaften der Fab-Fragmente ist die Methode theoretisch auch für Mehrfachmarkierungen mit mehr als 4 Antikörpern geeignet. Der aktuell limitierende Faktor besteht in der spektralen Trennung der Fluoreszenzsignale. Mit den modernen Konfokalmikroskopen könnten bis zu 10 Fluoreszenzsignale gleichzeitig aufgezeichnet werden, aufgrund der dicht beieinander liegenden Emissionsspektren ist die spektrale Trennung aber schwierig. In dieser Arbeit gelang es, bis zu 5 Fluoreszenzspektren im Multi-Track-Modus sicher voneinander zu trennen, dieses war jedoch nur durch eine gut überlegte Kombination der Fluorochrome und Antikörper möglich. Durch Technologien, wie das Emission Fingerprinting (Firma Zeiss), besteht die Möglichkeit, auch stark überlappende Spektralbereiche und damit mehr als 5 Fluoreszenzspektren voneinander zu trennen. In der Erprobung des Emission Fingerprintings wiesen die Bilder jedoch ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis auf, sodass für diese Arbeit der Multi-Track-Modus vorgezogen wurde.

Möglicherweise kann durch den technischen Fortschritt das sich bietende Potenzial der Fab-Fragment-Technik in Zukunft vollständig genutzt werden. Aufgrund ihrer einfachen Anwendung, der kurzen Markierungszeiten sowie der hohen Flexibilität bezüglich der nutzbaren Antikörper ist die Fab-Fragment-Technik für die aktuelle Forschung und Diagnostik schon jetzt eine hervorragende Ergänzung und Alternative zu den bestehenden Mehrfachmarkierungsmethoden.

## 5 Zusammenfassung

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von immunmarkierten Zellen und Gewebsschnitten stellt in der Medizin und den Biowissenschaften eine weit verbreitete Technik dar und wird u.a. zur Diagnostik von Erkrankungen und zur Erforschung zellulärer Prozesse genutzt. Zur Kolokalisation mehrerer Zielmoleküle im selben Gewebe ist es häufig nötig, Mehrfachmarkierungen durchzuführen. Dabei ergeben sich allerdings insbesondere beim Einsatz monoklonaler Antikörper erhebliche methodische Schwierigkeiten. Ziel dieser Arbeit war es, eine neue Methode zu etablieren und weiter zu entwickeln, die es mithilfe fluorochromkonjugierter Fab-Fragmente ermöglicht, Mehrfachmarkierungen auch mit speziegleichen Antikörpern einfach, schnell und sicher durchzuführen. Der zentrale Ansatz besteht in der Kopplung von farbstofftragenden Fab-Fragmenten an den primären Antikörper noch *vor* der Inkubation am Gewebsschnitt. Dies ermöglicht es, auch speziegleiche Antikörper simultan zu verwenden und prinzipiell beliebig viele Antigenstrukturen gleichzeitig nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde systematisch untersucht, welche Massenverhältnisse und Inkubationszeiten zu den besten Ergebnissen führen, wie die Markierungsintensität verlässlich gemessen werden kann, welche Faktoren die Methode stören können und welche praktischen Aspekte beim Einsatz zu berücksichtigen sind. Zur quantitativen Auswertung wurde eine neue mikroskopische Messmethode entwickelt, die insbesondere unempfindlich ist gegen Hintergrundhelligkeit und Farbstoffniederschläge. Es zeigte sich, dass der relative Anteil an Fab-Fragmenten einen kritischen Einfluss auf die Markierungsintensität hat. Gute Ergebnisse fanden sich für mehrere getestete Antikörper bei einem Massenverhältnis von 2:1 (Fab-Fragment : Primärantikörper). Anders als zu erwarten, ergaben kurze Markierungszeiten von einer Stunde die besten Ergebnisse, während es schon bei einer Dauer von mehr als 2 Stunden zu Intensitätsverlusten von bis zu 59 % kam. Simultane Mehrfachmarkierungen wurden mit bis zu vier monoklonalen Antikörpern aus der Maus durchgeführt und ergaben für die Einzel-fluoreszenzen keinen Intensitätsverlust im Vergleich zu Einzelmarkierungen. Unerwünschte Kreuzreaktionen traten dabei nicht auf. Bei der standardisierten Auswertung mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop zeigte sich, dass die maximal erreichbare Anzahl simultan nachweisbarer Antigene nicht durch die Fab-Fragment-Technik limitiert ist, sondern vor allem durch Probleme in der sicheren spektralen Trennung der

eingesetzten Fluorochrome. In praktischer Hinsicht ergaben die Versuche, dass die Fab-Fragment-Technik derzeit deutlich teurer ist als herkömmliche Methoden und eine etwas längere Vorbereitungszeit zur Generierung der Fab-Fragment-Komplexe benötigt. Mit dem Ansatz, auch speziessgleiche Antikörper simultan zu verwenden, eröffnet sie jedoch einmalige neue Möglichkeiten und verkürzt die benötigte Zeit gegenüber den bisherigen direkten und indirekten Markierungsmethoden drastisch.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Amos WB, White JG. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biol Cell* 2003; 95:335-342.
2. Anderson GP, Nerurkar NL. Improved fluoroimmunoassays using the dye Alexa Fluor 647 with the RAPTOR, a fiber optic biosensor. *J Immunol Methods* 2002; 271:17-24.
3. Avrameas S, Uriel J. Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1966; 262:2543-2545.
4. Benchaib M, Delorme R, Pluvinage M, Bryon PA, Souchier C. Evaluation of five green fluorescence-emitting streptavidin-conjugated fluorochromes for use in immunofluorescence microscopy. *Histochem Cell Biol* 1996; 106:253-256.
5. Berlier JE, Rothe A, Buller G et al. Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *J Histochem Cytochem* 2003; 51:1699-1712.
6. Boenisch T. *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*. 3.Auflage, 2003.
7. Brakenhoff GJ, Blom P, Barends P. Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses. *J Microsc* 1979; 117:219-232.
8. Brandtzaeg P. Rhodamine conjugates: specific and nonspecific binding properties in immunohistochemistry. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 254:35-54.
9. Brelje TC, Wessendorf MW, Sorenson RL. Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: practical application and limitations. *Methods Cell Biol* 1993; 38:97-181.
10. Brelje TC, Wessendorf MW, Sorenson RL. Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: practical application and limitations. *Methods Cell Biol* 2002; 70:165-244.

11. Brouns I, Van NL, Van GJ et al. Triple immunofluorescence staining with antibodies raised in the same species to study the complex innervation pattern of intrapulmonary chemoreceptors. *J Histochem Cytochem* 2002; 50:575-582.
12. Brown JK, Pemberton AD, Wright SH, Miller HR. Primary antibody-Fab fragment complexes: a flexible alternative to traditional direct and indirect immunolabeling techniques. *J Histochem Cytochem* 2004; 52:1219-1230.
13. Carlsson K, Mossberg K. Reduction of cross-talk between fluorescent labels in scanning laser microscopy. *J Microsc* 1992; 167: 23-37.
14. Carlsson K, Aslund N, Mossberg K, Philip J. Simultaneous confocal recording of multiple fluorescent labels with improved channel separation. *J Microscop* 1994; 176:287-299.
15. Carlsson K, Liljeborg A. Confocal fluorescence microscopy using spectral and lifetime information to simultaneously record four fluorophores with high channel separation. *J Microsc* 1997; 185:37-46.
16. Chaiet L, Wolf FJ. The properties of Streptavidin, a Biotin-binding protein produced by streptomycetes. *Arch Biochem Biophys* 1964; 106:1-5.
17. Coleman R. The impact of histochemistry--a historical perspective. *Acta Histochem* 2000; 102:5-14.
18. Coleman R. Histochemistry in the new millenium--a time to change our terminology? *Acta Histochem* 2000; 102:241-246.
19. Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J Immunol* 1942; 45:159-170.
20. Coons AH. Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods* 1958; 1:399-422.
21. Coons AH. The development of immunohistochemistry. *Ann N Y Acad Sci* 1971; 177:5-9.
22. De Rosa SC, Brenchley JM, Roederer M. Beyond six colors: a new era in flow cytometry. *Nat Med* 2003; 9:112-117.

23. Demandolx D, Davoust J. Multicolour analysis and local image correlation in confocal microscopy. *J Microsc* 1997; 185:21-36.
24. Dickinson ME, Bearman G, Tille S, Lansford R, Fraser SE. Multi-Spectral Imaging and Linear Unmixing Add a Whole New Dimension to Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *BioTechniques* 2001; 31:1272-1278.
25. Eichmuller S, Stevenson PA, Paus R. A new method for double immunolabelling with primary antibodies from identical species. *J Immunol Methods* 1996; 190:255-265.
26. Entwistle A, Noble M. The use of lucifer yellow, BODIPY, FITC, TRITC, RITC and Texas Red for dual immunofluorescence visualized with confocal scanning laser microscope. *J Microsc* 1992; 168:219-238..
27. Ferri GL, Gaudio RM, Castello IF, Berger P, Giro G. Quadruple immunofluorescence: a direct visualization method. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:155-158.
28. Gruber HJ, Hahn CD, Kada G et al. Anomalous fluorescence enhancement of Cy3 and cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of Cy5 and Cy7 upon covalent linking to IgG and noncovalent binding to avidin. *Bioconjug Chem* 2000; 11:696-704.
29. Grumbach IM, Veh RW. The SA/rABC technique: a new ABC procedure for detection of antigens at increased sensitivity. *J Histochem Cytochem* 1995; 43:31-37.
30. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979; 27:1131-1139.
31. Happerfield LC, Bobrow LG, Bains R, Miller KD. Peroxidase labelling immunocytochemistry: a comparison of eleven commercially-available avidin-biotin systems. *Br J Biomed Sci* 1993; 50:21-26.
32. Haugland RP. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. 9 ed. Molecular Probes, 2002.

33. Hebert GA, Pittman B, Cherry WB. Factors affecting the degree of nonspecific staining given by fluorescein isothiocyanate labelled globulins. *J Immunol* 1967; 98:1204-1212.
34. Hebert GA, Pittman B, Cherry WB. The definition and application of evaluation techniques as a guide for the improvement of fluorescent antibody reagents. *Ann N Y Acad Sci* 1971; 177:54-69.
35. Hermiston ML, Latham CB, Gordon JI, Roth KA. Simultaneous localization of six antigens in single sections of transgenic mouse intestine using a combination of light and fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* 1992; 40:1283-1290.
36. Hoyt C. Liquid crystal filters clear the way for imaging multiprobe fluorescence. *Biophotonics Int* 1996; July/Aug:49-51.
37. Ino H. Application of antigen retrieval by heating for double-label fluorescent immunohistochemistry with identical species-derived primary antibodies. *J Histochem Cytochem* 2004; 52:1209-1217.
38. Ishaque A, Thrift J, Murphy JE, Konstantinov K. Cell surface staining of recombinant factor VIII is reduced in apoptosis resistant BHK-21 cells. *J Biotechnol* 2008; 137:20-27.
39. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomick M. *Immunologie*. 5 ed. Gustav Fischer, 2002.
40. Kroeber S, Schomerus C, Korf HW. A specific and sensitive double-immunofluorescence method for the demonstration of S-antigen and serotonin in trout and rat pinealocytes by means of primary antibodies from the same donor species. *Histochem Cell Biol* 1998; 109:309-317.
41. Kumar RK, Chapple CC, Hunter N. Improved double immunofluorescence for confocal laser scanning microscopy. *J Histochem Cytochem* 1999; 47:1213-1218.

42. Lanier LL, Loken MR. Human lymphocyte subpopulations identified by using three-color immunofluorescence and flow cytometry analysis: correlation of Leu-2, Leu-3, Leu-7, Leu-8, and Leu-11 cell surface antigen expression. *J Immunol* 1984; 132:151-156.
43. Larsson LI. *Immunocytochemistry, theory and practise*. CRC Press, Boca Raton, 1988.
44. Leduc EH, Avrameas S, Bouteille M. Ultrastructural localization of antibody in differentiating plasma cells. *J Exp Med* 1968; 127:109-118.
45. Lewis Carl SA, Gillete-Ferguson I, Ferguson DG. An indirect immunofluorescence procedure for staining the same cryosection with two mouse monoclonal primary antibodies. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:1273-1278.
46. Lichstein HC, Birnbaum J. Combinability of Avidin and Streptavidin with analogs of Biotin. *Biochem Biophys Res Commun* 1965; 20:41-45.
47. Mao SY. Conjugation of fluorochromes to antibodies. *Methods Mol Biol* 1999; 115:35-38.
48. Mao SY, Javois LC, Kent UM. Overview of antibody use in immunocytochemistry. *Methods Mol Biol* 1999; 115:3-10.
49. McKay IC, Forman D, White RG. A comparison of fluorescein isothiocyanate and lissamine rhodamine (RB 200) as labels for antibody in the fluorescent antibody technique. *Immunology* 1981; 43:591-602.
50. McKinney RM, Spillane JT, Pearce GW. Factors affecting the rate of reaction of fluorescein isothiocyanate with serum proteins. *J Immunol* 1964; 93:232-242.
51. McKinney RM, Spillane JT, Pearce GW. A simple method for determining the labeling efficiency of fluorescein isothiocyanate products. *Anal Biochem* 1966; 14:421-428.
52. Miller AK, Tausig F. Biotin-binding by parenterally-administered streptavidin or avidin. *Biochem Biophys Res Commun* 1964; 14:210-214.

53. Minsky M. Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning* 1988; 10:128-138.
54. Montag M, Kukulies J, Jorgens R, Gundlach H, Trendelenburg MF, Spring H. Working with the confocal scanning UV-laser microscope: specific DNA localization at high sensitivity and multiple-parameter fluorescence. *J Microsc* 1991; 163:201-210.
55. Morrish TA, Greider CW. Short telomeres initiate telomere recombination in primary and tumor cells. *PLoS Genet* 2009; 5:e1000357.
56. Mossberg K, Arvidsson U, Ulfhake B. Computerized quantification of immunofluorescence-labeled axon terminals and analysis of co-localization of neurochemicals in axon terminals with a confocal scanning laser microscope. *J Histochem Cytochem* 1990; 38:179-190.
57. Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ, Waggoner AS. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug Chem* 1993; 4:105-111.
58. Nairn RC, Herzog F, Ward HA, de Boer WG. Microphotometry in immunofluorescence. *Clin Exp Immunol* 1969; 4:697-705.
59. Nakane PK, Pierce GBJr. Enzyme-labelled antibodies: preparation and application for the localization of antigen. *J Histochem Cytochem* 1966; 14:929.
60. Nakane PK. Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. *J Histochem Cytochem* 1968; 16:557-560.
61. Negoescu A, Labat-Moleur F, Lorimier P et al. F(ab) secondary antibodies: a general method for double immunolabeling with primary antisera from the same species. Efficiency control by chemiluminescence. *J Histochem Cytochem* 1994; 42:433-437.
62. Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J et al. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem* 1999; 47:1179-1188.

63. Pryzwansky K. Applications of double-label immunofluorescence. *Techniques in Immunocytochemistry* 1, 77-89. 1982. G. R. Bullock and P. Petrusz.
64. Ravdin P, Axelrod D. Fluorescent tetramethyl rhodamine derivatives of alpha-bungarotoxin: preparation, separation, and characterization. *Anal Biochem* 1977; 80:585-592.
65. Riggs JL, Seiwald RJ, Burckhalter JH, Downs CM, Metcalf TG. Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Am J Pathol* 1958; 34:1081-1097.
66. Robenek H. Konfokale Laserscanning Mikroskopie. *Mikroskopie in Forschung und Praxis*. Darmstadt: GIT Verlag GmbH, 1995: 219-232.
67. Rothlisberger D, Honegger A, Pluckthun A. Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *J Mol Biol* 2005; 347:773-789.
68. Sabri S, Richelme F, Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Interest of image processing in cell biology and immunology. *J Immunol Methods* 1997; 208:1-27.
69. Schieker M, Pautke C, Reitz K et al. The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. *J Anat* 2004; 204:133-139.
70. Schubert W. Triple immunofluorescence confocal laser scanning microscopy: spatial correlation of novel cellular differentiation markers in human muscle biopsies. *Eur J Cell Biol* 1991; 55:272-285.
71. Shindler KS, Roth KA. Double immunofluorescent staining using two unconjugated primary antisera raised in the same species. *J Histochem Cytochem* 1996; 44:1331-1335.
72. Southwick PL, Ernst LA, Tauriello EW et al. Cyanine dye labeling reagents--carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry* 1990; 11:418-430.

73. Staines WA, Meister B, Melander T, Nagy JI, Hokfelt T. Three-color immunofluorescence histochemistry allowing triple labeling within a single section. *J Histochem Cytochem* 1988; 36:145-151.
74. Stauffer JK, Khan T, Salcedo R et al. Multicolor fluorescence-based approaches for imaging cytokine-induced alterations in the neovascularization, growth, metastasis, and apoptosis of murine neuroblastoma tumors. *J Immunother* 2006; 29:151-164.
75. Stengl M, Hildebrand JG. Insect olfactory neurons in vitro: morphological and immunocytochemical characterization of male-specific antennal receptor cells from developing antennae of male *Manduca sexta*. *J Neurosci* 1990; 10:837-847.
76. Tausig F, Wolf FJ. Streptavidin--a substance with avidin-like properties produced by microorganisms. *Biochem Biophys Res Commun* 1964; 14:205-209.
77. Tidman N, Janossy G, Bodger M, Granger S, Kung PC, Goldstein G. Delineation of human thymocyte differentiation pathways utilizing double-staining techniques with monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 1981; 45:457-467.
78. Tornehave D, Hougaard DM, Larsson L. Microwaving for double indirect immunofluorescence with primary antibodies from the same species and for staining of mouse tissues with mouse monoclonal antibodies. *Histochem Cell Biol* 2000; 113:19-23.
79. Tsurui H, Nishimura H, Hattori S, Hirose S, Okumura K, Shirai T. Seven-color fluorescence imaging of tissue samples based on Fourier spectroscopy and singular value decomposition. *J Histochem Cytochem* 2000; 48:653-662.
80. Valdes-Aguillera O, Neckers DC. Aggregation phenomena in xanthene dyes. *Acc Chem Res* 1989; 22:171-177.

81. van der Loos CM, Das PK, Houthoff HJ. An immunoenzyme triple-staining method using both polyclonal and monoclonal antibodies from the same species. Application of combined direct, indirect, and avidin-biotin complex (ABC) technique. *J Histochem Cytochem* 1987; 35:1199-1204.
82. van der Loos CM, Das PK, Van den Oord JJ, Houthoff HJ. Multiple immunoenzyme staining techniques. Use of fluoresceinated, biotinylated and unlabelled monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1989; 117:45-52.
83. van der Loos CM, Becker AE, Van den Oord JJ. Practical suggestions for successful immunoenzyme double-staining experiments. *Histochem J* 1993; 25:1-13.
84. van der Loos CM, Gobel H. The animal research kit (ARK) can be used in a multistep double staining method for human tissue specimens. *J Histochem Cytochem* 2000; 48:1431-1438.
85. van der Voort HTM, Brakenhoff GJ, Valkenburg JAC, Nanninga N. Design and use of a computer controlled confocal microscope for biological applications. *Scanning* 1985; 7: 66-78.
86. Vervoordeldonk SF, Merle PA, Behrendt H et al. Triple immunofluorescence staining for prediction of relapse in childhood precursor B acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1996; 92:922-928.
87. von Smolinski D, Blessenohl M, Neubauer C, Kalies K, Gebert A. Validation of a novel ultra-short immunolabeling method for high-quality mRNA preservation in laser microdissection and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2006; 8:246-253.
88. Wang BL, Larsson LI. Simultaneous demonstration of multiple antigens by indirect immunofluorescence or immunogold staining. Novel light and electron microscopical double and triple staining method employing primary antibodies from the same species. *Histochemistry* 1985; 83:47-56.
89. Wang H, Pevsner J. Detection of endogenous biotin in various tissues: novel functions in the hippocampus and implications for its use in avidin-biotin technology. *Cell Tissue Res* 1999; 296:511-516.

90. Wessel GM, McClay DR. Two embryonic, tissue-specific molecules identified by a double-label immunofluorescence technique for monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 1986; 34:703-706.
91. Wessendorf MW, Brelje TC. Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas red, and cyanine 3.18. *Histochemistry* 1992; 98:81-85.
92. Wessendorf MW, Brelje TC. Multicolor fluorescence microscopy using the laser-scanning confocal microscope. *NeuroProtocols* 1993; 2:121-140.
93. Wood GS, Warnke R. Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *J Histochem Cytochem* 1981; 29:1196-1204.
94. Wright SJ, Wright DJ. Introduction to confocal microscopy. *Methods Cell Biol* 2002; 70:1-85.
95. Wurden S, Homberg U. A simple method for immunofluorescent double staining with primary antisera from the same species. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:627-630.
96. Yamaguchi Y, Kim H, Kato K, Masuda K, Shimada I, Arata Y. Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G. Mapping of proteolytic cleavage sites in the hinge region. *J Immunol Methods* 1995; 181:259-267.

## 7 Danksagung

Meinen besonderen Dank richte ich an Prof. Dr. med. Andreas Gebert für die freundliche Überlassung des Themas und vor allem für die hervorragende Betreuung der Dissertation über den gesamten Zeitraum. Seine stets konstruktiven Anmerkungen und Hinweise sowie sein Wissen über die Laser-Scanning-Mikroskopie ermöglichten erst die Entstehung und Vollendung dieser Arbeit. Herzlichen Dank!

Für die stetige Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung in sämtlichen Bereichen der Laborarbeit danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie, insbesondere Harry Manfeldt, Christo Örün und Doris Stöckmann.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern Ingrid und Gerhard Neubauer sowie meinen Großeltern Gerda und Paul Nehring. Durch ihre moralische und finanzielle Unterstützung ermöglichten sie mir das Studium und letztlich auch die Entstehung dieser Doktorarbeit. Es ist schön zu wissen, dass ihr hinter mir steht und mich meinen Weg habt immer gehen lassen. Danke!

Die Fertigstellung dieser Arbeit ist auch meiner Frau Katrin Haas zu verdanken. Durch ihr großes Verständnis und ihre sorgsame Beharrlichkeit gab sie mir immer wieder die Motivation, diese Arbeit neben dem anstrengenden Klinikalltag fortzusetzen. Außerdem danke ich ihr für die fachliche Unterstützung im Umgang mit Photoshop.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Carsten Haas, geb. Neubauer

Geburtsdatum: 19.04.1977

Nationalität: deutsch

Familienstand: verheiratet



### Schulausbildung

1983-1993 Realschule "Sigmund Jähn" (Schwerin)

1993-1996 Fachgymnasium für Elektrotechnik (Schwerin)

### Berufsausbildung

1996-1999 Ausbildung zum Krankenpfleger (Klinikum Schwerin)

### Studium

1999-2006 Studium der Humanmedizin (Universität zu Lübeck)

### Berufserfahrung

08/99-09/99 Krankenpfleger in der Orthopädie der Universitätsklinik Lübeck

10/99-07/06 Krankenpfleger/Extrawache auf der Neurochirurgischen  
Intensivstation der Universitätsklinik Lübeck

08/06-09/07 Assistenzarzt Chirurgie in der Helios Klinik Titisee-Neustadt

seit 10/07 Assistenzarzt Innere Medizin im Städtischen Klinikum Lüneburg

## 9 Veröffentlichungen

1. A one-step-immunolabelling method for simultaneous detection of three or more antigens in histological sections.  
Neubauer C, Klinger A, Gebert A.  
100th Annual Meeting, Anatomische Gesellschaft, 11.-14. März 2005, Leipzig  
(Poster: Seite 81)
2. Validation of a novel ultra-short immunolabeling method for high-quality mRNA preservation in laser microdissection and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction.  
von Smolinski D, Blessenohl M, Neubauer C, Kalies K, Gebert A.  
Journal of Molecular Diagnostics 2006; 8:246-253.

