



KOMPENSATION

1. TEIL:

EINE ZWANGLOSE BETRACHTUNG

von M.Roederer, Stanford University

(Übersetzt von W.Hübl. Vorbemerkungen: 1. Einige Passagen der angeblich "zwanglosen Betrachtung" bedürfen m.E. durchaus einiger Konzentration beim Lesen. 2. Das englische Wort "spillover" wurde mit dem aus der Ton-technik stammenden Begriff "Übersprechen" [nämlich von einem Kanal in den anderen] übersetzt)

1. Einleitung

Kompensation ist der wahrscheinlich am wenigsten verstandene Prozeß der durchflußzytometrischen Analyse. Der Grund dafür könnte sein, daß oft versucht wird, die Kompensation mit Elementen der Linearen Algebra zu erklären. Viele von uns haben vergessen, was lineare Algebra ist, geschweige denn wissen, wie man mit ihr arbeitet. Nichtsdestoweniger ist eine richtige Kompensation ein kritischer Faktor für viele Anwendungen der Durchflußzytometrie. Eine davon ist die Messung der Antigendichte. Unglücklicherweise wird die Kompensation in vielen Laboratorien nicht richtig eingestellt, weil sie nicht verstanden wird und weil so viele Mythen über sie verbreitet werden.

Unter diesen Vorzeichen werde ich versuchen, einige Punkte der Kompensation zu behandeln

und einige Mythen zu vertreiben. Ich hoffe, daß am Ende niemand verwirrt sondern vielmehr sicher sein wird, was richtige Kompensation ist. Beginnen Sie bitte mit dem Quiz und gehen sie nachher in der vorgeschlagenen Reihenfolge weiter.

Wenn Sie so richtig abenteuerlustig sind, können Sie in die detailliertere Beschreibung der Kompensation einsteigen. Komplett mit mathematischen Beispielen und den Fallen falscher Kompensation [Anmerkung: kommt in der nächsten Ausgabe von FM]. Das empfehle ich aber nur nachdem Sie die zwanglose, gelassene Betrachtung absolviert haben.

2. Quiz (Antworten am Ende des Artikels)

Siehe Abbildungen 1A und 1B.

3. Wie wichtig ist richtige Kompensation

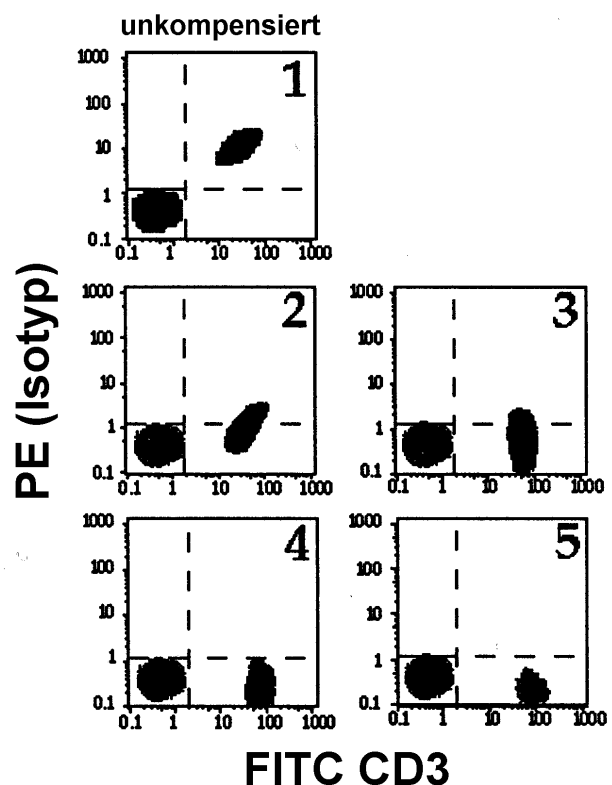


Abbildung 1A. QUIZ 1.Frage: Die Zellen sind mit CD3-FITC und einer Isotypkontrolle-PE gefärbt. In welchem Diagramm ist die Kompensation von FL1 (FITC) gegen FL2 (PE) korrekt?

Wenn Sie eine oder beide Fragen des Quiz' falsch hatten, machen Sie sich nichts daraus. Sie befinden sich bei der Mehrheit der FACS-User. Die erste Frage, die uns jetzt vielleicht in

den Sinn kommt: "Warum bekommen wir schon so lange ordentliche Flow-Resultate, wenn so wenige Leute wissen, wie man richtig kompensiert?". Die einfache Antwort ist, daß

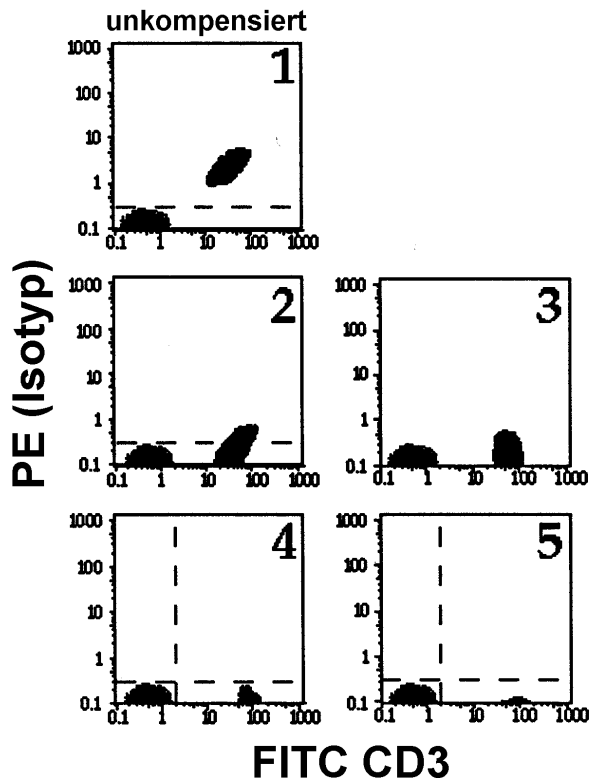


Abbildung 1B. QUIZ 2.Frage: Die Zellen sind mit CD3-FITC und einer Isotypkontrolle-PE gefärbt. In welchem Diagramm ist die Kompensation von FL1 (FITC) gegen FL2 (PE) korrekt?

man für viele Anwendungen des letzten Jahrzehnts keine absolut korrekte Kompensation benötigte.

Wenn man nur die Frequenz von Zellpopulationen bestimmen möchte, braucht man keine exakte Kompensation, weil - in den meisten Fällen - die Subpopulationen, die uns interessieren, mit einem hellen Marker ganz leicht erkennbar sind. Eine etwas ungenaue Kompensation, die zu einer geringgradig falschen Position der Negativpopulation führt, wird die Zählung der Zellen nicht beeinträchtigen, da ja immer noch ein großer Abstand zwischen positiver und negativer Population ist.

Betrachten Sie zum Beispiel die Abbildung 2 weiter unten. In diesem hypothetischen Beispiel sind die PBMC mit FITC CD3 und PE CD4 oder mit FITC CD3 und PE Isotypkontrolle gefärbt. Die Ergebnisse dieser Färbungen sind bei verschiedenen Kompensationsstufen dargestellt

(paarweise, unten). Sie werden merken, daß man bei jeder Kompensationsstufe – von 0 (d.h. komplett unterkompensiert) bis leicht überkompensiert - die CD3+CD4+ Zellen leicht erkennen und genau zählen kann. Sie werden aber auch merken, daß das Gate, das man braucht um die Zellen korrekt zu zählen, nicht dem Quadranten entspricht, den man über die ungefärbten Zellen setzt (unterbrochene Linien), sondern es ist das Gate, das man auf die Isotypkontrolle der Zellen setzt, die FITC-positiv

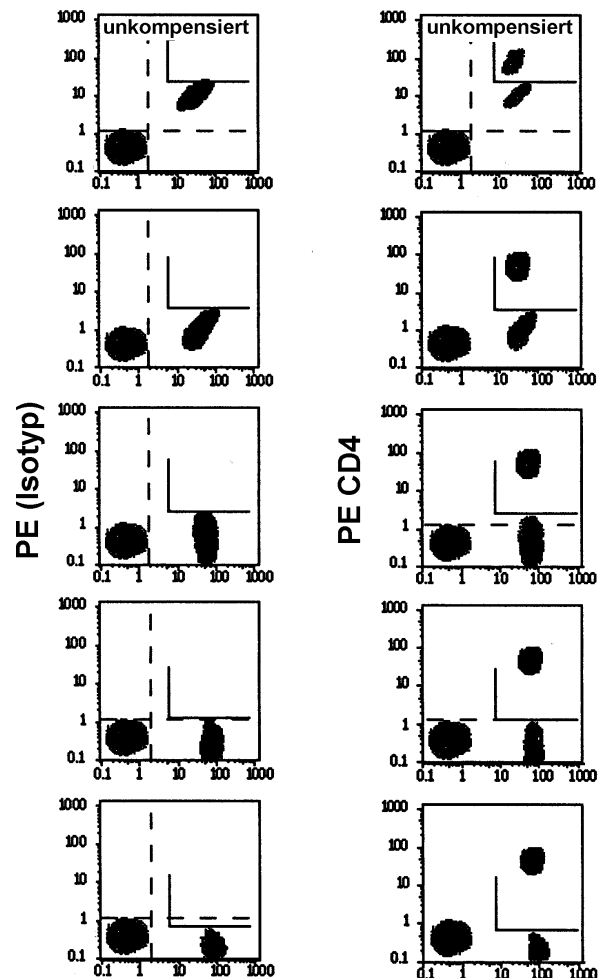


Abbildung 2. Siehe Text.

sind. Dieses Gate ist mit durchgehenden Linien dargestellt.

Richtige Kompensation ist hingegen absolut notwendig, wenn man Antigendichten messen möchte. Dabei verfälscht jedes unkorrigierte Übersprechen (der Fluoreszenz in den anderen Kanal) die Messung. Auch die Unterscheidung einer schwach positiven Population von der negativen erfordert eine korrekte Kompensation: Unterkompensation führt zu einer Überschätzung, Überkompensation zu einer Unter-

schätzung der Zahl der schwach positiven Zellen. Generell ist eine korrekte Kompensation notwendig, wenn man multiple Fluoreszenzfarbstoffe einsetzt, die in einen einzelnen Kanal übersprechen. Die Gründe dafür würden den Rahmen dieser Diskussion sprengen.

4. Richtige Kompensation

Das Ziel der Kompensation ist, die übersprechende Fluoreszenz einer bestimmten Probe aus dem "falschen" Kanal zu entfernen. D.h., obwohl die Fluoreszein-Fluoreszenz hauptsächlich grün ist, was im FL1 (FITC) Kanal gemessen wird, hat Fluoreszein auch einen signifikanten gelben Anteil, der in den FL2 (PE) Kanal fällt. Eine der Eigenschaften der Fluoreszenz ist, daß das Verhältnis dieser zwei gemessenen Werte, also der Fluoreszein-Fluoreszenz in FL1 und FL2 (grün/gelb) konstant ist (bei einer gegebenen PMT Spannung, einem gegebenen Filtersatz, und gegebener Instrumentenempfindlichkeit). In einer "idealen Welt", können wir die Gelbfluoreszenz des Fluoreszein (im PE Kanal) durch die Messung der Grünfluoreszenz des Fluoreszein (im FITC Kanal) genau bestimmen. In einer idealen Welt könnten wir daher diese Gelbfluoreszenz genau korrigieren und müßten uns keine Sorgen über den Beitrag von FITC in den PE Kanal machen. Das Resultat ist, daß das Ergebnis des kompensierten PE Kanals nur die wahre (gelb) Fluoreszenz, die von PE selbst kommt, repräsentiert.

Mathematisch, wird bei der Kompensation von FITC auf PE einfach ein Teil des FITC Signals vom PE Signal abgezogen: Je mehr FL1 (grüne Fluoreszein-Fluoreszenz) es gibt, umso mehr Übersprechen in FL2 (gelbe Fluoreszein-Fluoreszenz) wird vorhanden sein (d.h. wie oben erwähnt, die grün/gelb Ratio ändert sich nicht).

Als Beispiel: wenn die Menge der Gelbfluoreszenz des Fluoreszein-Signals im FL2 Kanal 15 % des Grünfluoreszenz-Signals im FL1 Kanal ist (d.h. 15 Prozent Kompensation), dann können wir die wahre (oder reine) PE Fluoreszenz einer Zelle genau bestimmen, auch wenn bei der Zelle auch eine FITC Fluoreszenz vorhanden ist:

$$PE_{\text{wahr}} = PE_{\text{gemessen}} - 0.15 \times FITC_{\text{gemessen}}$$

Auf identische Weise wird die PE Fluoreszenz korrigiert, die in den FITC Kanal überspricht. Wenn zum Beispiel die Menge des (grünen) PE Signals im Fluoreszein Kanal 2 Prozent des gelben Signals im PE Kanal ist (d.h. 2 Prozent Kompensation), dann können wir die wahre FITC Fluoreszenz einer Zelle genau bestimmen:

$$FITC_{\text{wahr}} = FITC_{\text{gemessen}} - 0.02 \times PE_{\text{gemessen}}$$

Diese Gleichungen sind auch gültig, wenn eine Zelle sowohl FITC als auch PE Fluoreszenz besitzt (die Maschine macht diese Kompensationen unabhängig und gleichzeitig; das heißt, sie verwendet nicht den kompensierten FITC Wert als Eingabe in die PE Kompensation).

Wenn Sie ein Beispiel dieser Berechnungen wollen, dann gehen Sie zur Detaillierten Diskussion der Kompensation [*Anmerkung: nächste FM-Ausgabe*]. Bitte beachten Sie, daß die Gleichungen, die auf dieser Seite angegeben sind, nur korrekt sind, wenn Sie nur eine Kompensation auf einmal machen. Deswegen sind die Kompensationskoeffizienten und Gleichungen etwas anders als jene, die im Beispiel der Detaillierten Diskussion angegeben sind. Um gleichzeitig zwei oder mehr Farben zu kompensieren braucht man für die Kompensation eine allgemeine Lösung, die man mit Hilfe der Matrix-Algebra, die anderswo beschrieben ist, erreicht.

5. Meßfehler bei der Kompensation

Aus dem Vorhergesagten ergibt sich, daß eine korrekt kompensierte Messung der FITC Fluoreszenz sowohl eine exakte Messung der Fluoreszenz im FITC Kanal als auch eine exakte Messung der Fluoreszenz im PE Kanal erfordert. In unserer idealen Welt könnte jede Zelle exakt kompensiert werden, da man all diese Fluoreszenzen exakt messen kann. Da das relative Übersprechen für alle Zellen gleich ist, würden wir in der Lage sein den exakten Beitrag von FITC in den PE Kanal (und umgekehrt) zu messen und würden reine Messungen erreichen.

Und tatsächlich, auch in der realen Welt sind unsere Geräte in der Lage, gute Ergebnisse bei der Kompensation zu erzielen.

Es gibt jedoch einen relativ kleinen Fehler bei der Messung der Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle. Und bedenken Sie, ausgehend von den

Übersprechen kommt) zu messen. In diesem Fall sind selbst kleine Meßfehler bei der Bestimmung der Fluoreszenz des anderen Kanals signifikant im Vergleich zu dem wahren Signal, das man zu messen trachtet.

Eine Folge dieses Fehlers ist eine Verbreiterung der Verteilung der kompensierten Fluoreszenz (siehe Abbildung 3): Der Fehler in der Messung der Fluoreszenz ist die Summe der Fehler der Messung beider Fluoreszenzen. In einer Welt der fehlerfreien Messungen würde die Kompensation nicht zu einer Vergrößerung der Breite (des Variationskoeffizienten) einer Population führen, weil die Menge der Fluoreszenz im PE Kanal, die aus dem Übersprechen des FITC CD3 kommt, genau gemessen werden könnte und auch genau korrigiert werden könnte. Die Breite der kompensierten Population in der PE Dimension würde die gleiche sein, wie die der unkompenzierten Probe (Diagramme auf der

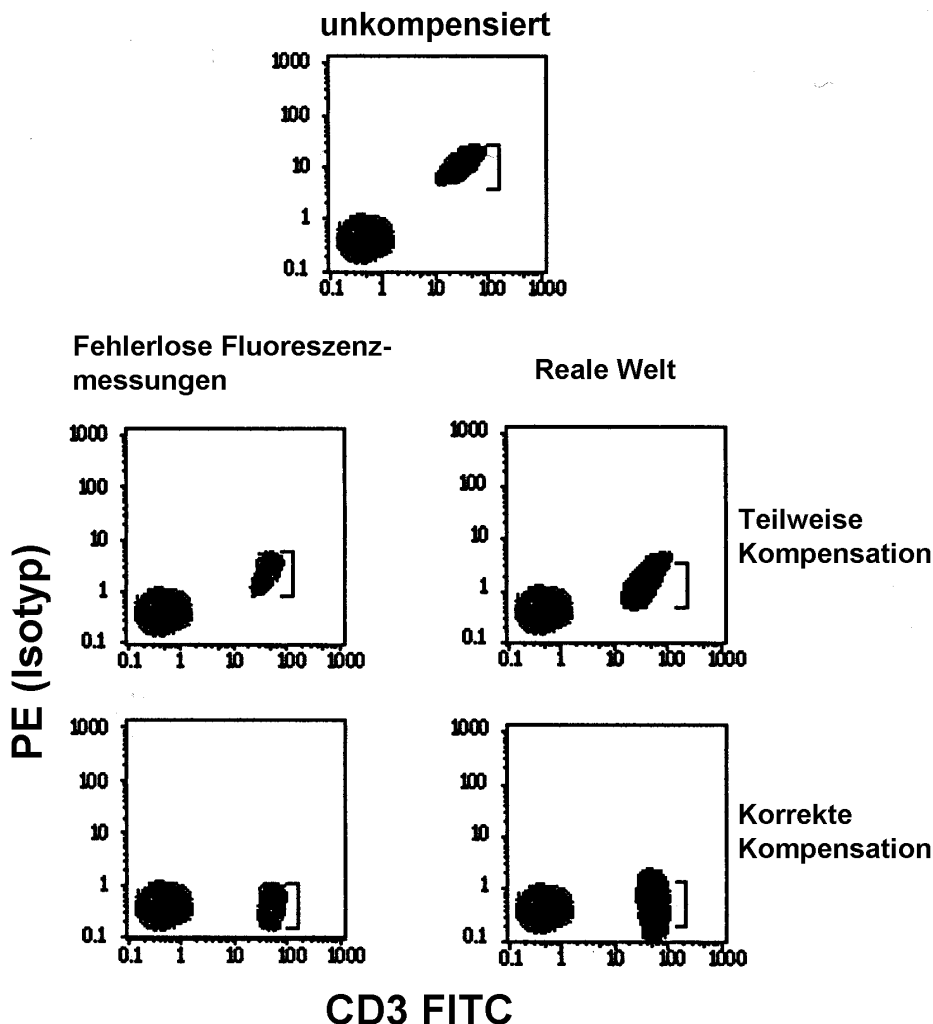


Abbildung 3. Siehe Text.

oben angeführten Gleichungen, daß der Fehler bei der Berechnung der wahren kompensierten Fluoreszenz sowohl vom Fehler der primären Messung als auch vom Fehler in dem anderen Kanal (multipliziert mit dem Kompensationskoeffizienten) beeinflusst wird. Bei sehr geringem Kompensationsfaktor wird nur ein sehr kleiner Fehler entstehen; je größer die Kompensation ist, desto größer wird der Fehler sein. Dieser vergrößerte Fehler betrifft vor allem Zellen, die im kompensierten Kanal schwach positiv sind: Besonders deswegen, weil man dabei versucht, einen kleinen Meßwert bei einem relativ großen Hintergrundsignal (das vom

linken Seite der Abbildung 3). In der realen Welt jedoch erfolgen die FITC Messungen und die PE Messungen mit einer gewissen Ungenauigkeit. Es ist demnach unmöglich, exakt festzustellen, welche Menge des Signals aus dem PE Kanal kommt von FITC CD3. Dementsprechend wird dann die kompensierte Probe in der PE Dimension eine Breite haben, die gleich der ursprünglichen Breite plus einen durch den Meßfehler verursachten Anteil ist. D. h. sie wird breiter (Diagramme auf der rechten Seite der Abbildung 3). Beachten Sie, daß ein einzelner kompensierter Fluoreszenzwert von - in diesem Fall - zwei Messungen abhängt: Dar-

aus ergibt sich, daß der Fehler des Kompensationswerts die Summe der Fehler beider Messungen sein wird.

Schlußfolgerungen aus den Fehlern bei der Kompensationsberechnung: Wegen der Fehler bei der Messung der Fluoreszenz können wir nicht garantieren, daß jede Zelle perfekt kompensiert wird. Genausowenig, wie wir sicherstellen können, daß die Fluoreszenz jeder Zelle exakt gemessen wird. Aber wir können garantieren, daß eine größere Population von Zellen genau kompensiert wird; d.h., im Mittel werden die Zellen richtig kompensiert. Auch das ist analog zu der Messung der Fluoreszenz: Wir können garantieren, daß wir die mittlere Fluoreszenz einer großen Population von Zellen genau bestimmen können, auch wenn der statistische Fehler die Genauigkeit der Einzelmessung beschränkt.

6. Praktische Kompensation

Wie stellen wir die Kompensation richtig ein? Eine richtige Kompensation liegt dann vor, wenn im Mittel von einer Population kein Beitrag der FITC-Fluoreszenz in den PE Kanal erfolgt (usw. für andere Kombinationen von Fluoreszenzmolekülen). Um unser Beispiel weiter zu verfolgen, bedeutet dies, daß eine Population von Zellen, die mit Fluoreszein gefärbt ist, aber nicht mit PE, dieselbe mediane PE Fluoreszenz besitzen sollte wie eine Population von Zellen, die nicht Fluoreszein gefärbt ist. Siehe Abbildung 4: der Kompensationsfaktor wird solange vergrößert, bis das Zentrum der positiv gefärbten Population auf derselben Höhe liegt wie das Zentrum der negativ gefärbten Population. Wegen des inhärenten Meßfehlers bedeutet das, daß einige Zellen oberhalb einer Quadrantenlinie, die nach den negativen Zellen eingestellt wurde, liegen werden! In der Tat, beachten Sie, daß, wenn man die Kompensation so setzt, daß die positive Population unterhalb der Quadrantenlinie ist, die Zellen in Wirklichkeit überkompensiert sind: im Durchschnitt haben die meisten Zellen zuviel Signal abgezogen und die mittlere PE Fluoreszenz dieser Population ist weniger als die der FITC-Negativen. Also weniger als die Autofluoreszenz. Das ist offensichtlich falsch. [Bei einer

Durchflußzytometrischen Analyse mit logarithmischen Achsen ist der Median im Allgemeinen ein viel besseres Maß, um die Tendenz des Mittelwertes zu messen, als der arithmetische Mittelwert. Der arithmetische Mittelwert kann durch einige Ausreißer beträchtlich nach oben verfälscht werden.] Genausowenig kennen wir die echte Fluoreszenz eines Events, das auf der

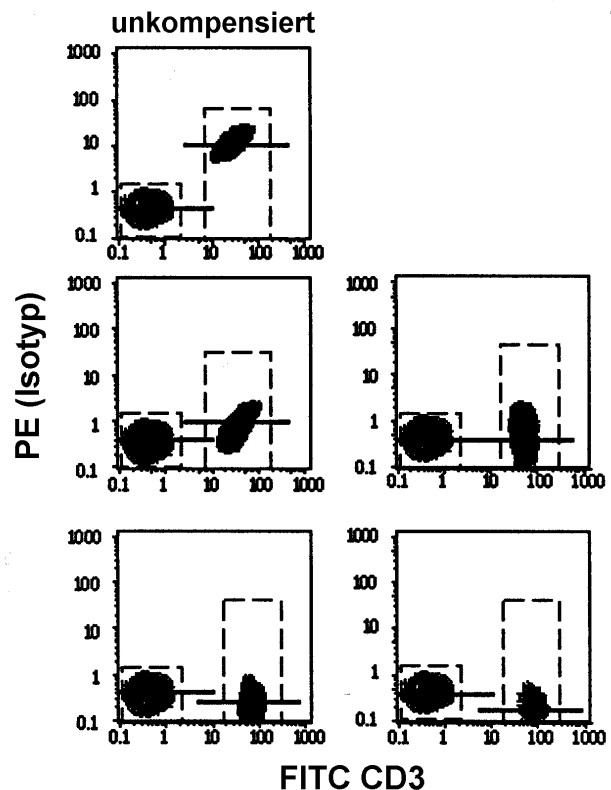


Abbildung 4. Die Zellen wurden mit FITC-CD3 und PE-Isotypkontrolle gefärbt. Eine korrekte Kompensation liegt dann vor, wenn für bestimmte Zellpopulation kein Anteil des PE Signals vom FITC Signal stammt. In anderen Worten, eine richtige Kompensation liegt dann vor, wenn die FITC-positiven Zellen dieselbe mittlere (oder mediane) PE Fluoreszenzintensität wie die FITC-negativen Zellen (3. Diagramm, rechts oben, Abbildung 4) haben. Die strichlierten Linien zeigen die Analysegates, die verwendet wurden, um den Mittelwert (beziehungsweise den Median) zu berechnen; die durchgehenden horizontalen Linien sind durch den Median der einzelnen Populationen ge-

unteren Achse liegt (es könnte jeden Wert unter dem Minimum haben); auch das führt dazu, daß der arithmetische Mittelwert fälschlich erhöht wird. Der Median jedoch wird von keinem dieser Phänomene signifikant betroffen. Verwenden Sie daher - wenn möglich - die mediane Fluoreszenz, wenn Sie Kompensationen ein-

stellen: Justieren Sie den Kompensationsfaktor bis der Median der (FITC-)Positiven gleich

tion gegen die untere Achse "gequetscht". Daher kann man den medianen Fluoreszenzkanal der Population nicht bestimmen (er ist kleiner als 0,1, aber wir wissen nicht, um wieviel weniger als 0,1 er ist). Betrachten Sie Abbildung 5, um eine genauere Erklärung zu erhalten.

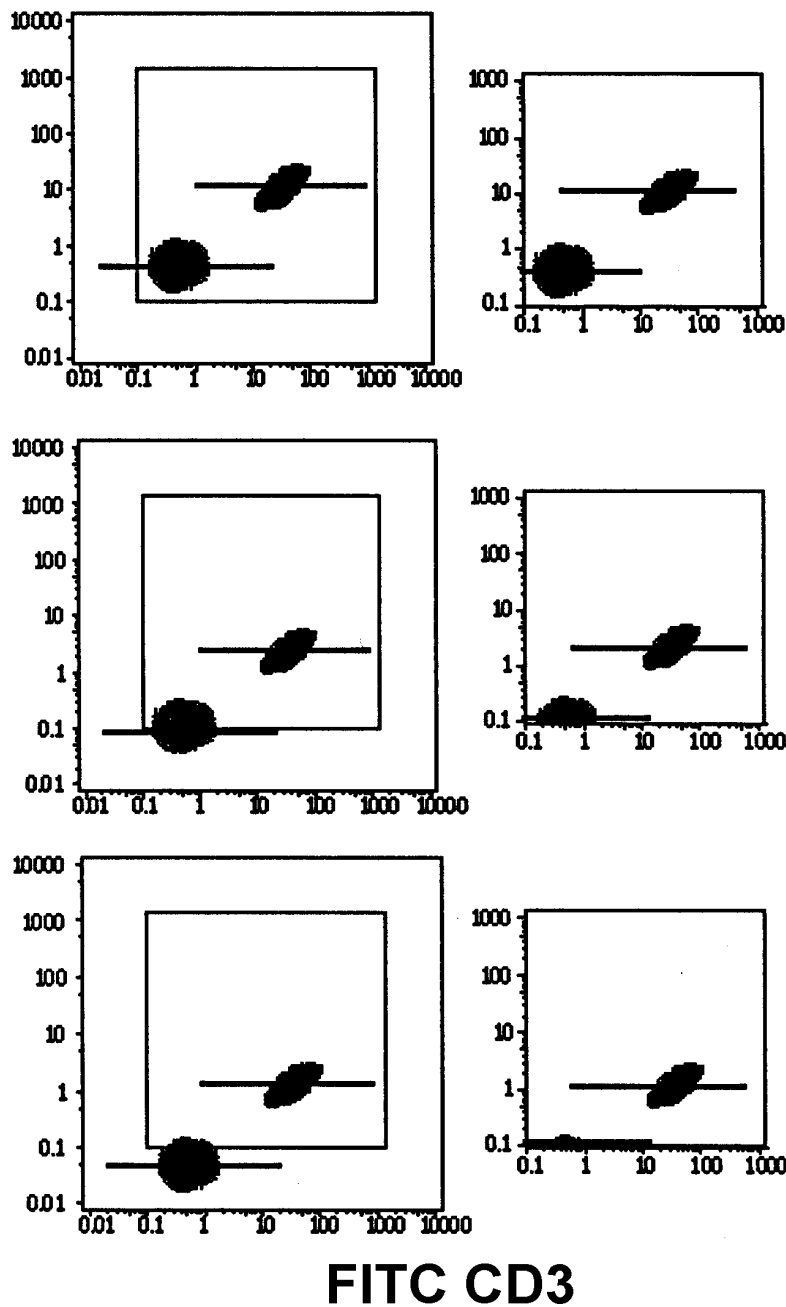


Abbildung 5. Kompensation und Empfindlichkeitseinstellung.
Legende: siehe Text.

dem der (FITC-)Negativen ist (Stellen Sie dabei sicher, daß alle Zellen einer Population im Analysengate liegen).

Jetzt können sie wahrscheinlich verstehen, warum keines der Beispiele der Abbildung 1B (im Quiz) als korrekt kompensiert bezeichnet werden kann. Um die Richtigkeit einer Kompensation zu beurteilen, muß man die Mediane der positiven und negativen Population vergleichen. In Abbildung 1B ist die negative Popula-

an (0,1). Das hat einen wichtigen Effekt auf die Kompensation: Die 2 Populationen sind um einen Faktor von etwa 100 im FITC Kanal getrennt und um einen Faktor 20 im PE Kanal das bedeutet daß die korrekte Kompensation 20 Prozent wäre. [Anmerkung: der Abstand der 2 Zellpopulationen auf der FITC-Achse ist ca. 100 und auf der PE-Achse ca. 20. Da die Zellen nur FITC-gefärbt sind kommt also der PE-Achsenabstand vom Übersprechen des FITC-

Signals. Die Kompensation müßte also 20% des FITC-Signals vom PE-Signal abziehen]. Aber in dem Beispiel unten rechts ist die Trennung zwischen dem Mittel der negativen und positiven Population nur etwa zehnfach, was zu einer Kompensationseinstellung von 10 Prozent führt. Das ist aber inkorrekt niedrig.

7. Autofluoreszenz

In den meisten Fällen beeinflusst Autofluoreszenz die Kompensation nicht. Autofluoreszenz ist in allen Kanälen vorhanden und wird auch nach der Kompensation vorhanden sein (obwohl der Absolutwert durch die Kompensation geändert wird). Bei den meisten Anwendungen können wir den Beitrag der Autofluoreszenz zur Kompensation vernachlässigen, wir müssen ihn aber bei der Berechnung von Antigendichten abziehen (d.h. die Autofluoreszenz ist ein Leerwert). Beachten Sie, daß die Autofluoreszenz der positiven und negativen Population ident sein muß, um die Kompensation korrekt einzustellen! In anderen Worten, wenn Sie einen Fluoreszenzmarker verwenden, der Monozyten färbt, und sie die Population nach den Lymphozyten ausrichten, deren Autofluoreszenz signifikant geringer ist als die der Monozyten, dann wird dieses Vorgehen keine richtige Kompensation ergeben.

Im allgemeinen (für die PBMC Analyse) erreichen Sie die beste Kompensation, indem Sie etwa gleiche Mengen von ungefärbten Zellen und mit dem entsprechenden Antikörper gefärbten Zellen mischen, und dann, wenn Sie die Kompensation einstellen, ein Lymphozytengate verwenden, um die Populationen zu analysieren. In diesem Fall kann man die Autofluoreszenz total ignorieren. Es ist akzeptabel, wenn Sie eine Kompensationsfärbung verwenden, die die Lymphozyten in verschiedene Untergruppen unterteilt (zum Beispiel CD4, CD8, oder CD19), wobei aber gegeben sein muß, daß die positive und negative Population (in diesem Fall B-Zellen oder T-Zelluntergruppen) eine gleich hohe Autofluoreszenz aufweisen. Falls Sie kein Lymphozytengate verwenden, vergleichen Sie die Fluoreszenz der positiven Zellen (die nur aus Lymphozyten bestehen) mit den negativ gefärbten Zellen (die aus Lymphozyten

und Monozyten bestehen). Das hat zur Folge, daß die Probe unterkompensiert sein wird.

8. Kompensation: Das Rezept.

Eine korrekte Kompensation braucht vier Schritte. Diese Schritte sollten Sie bei jedem Experiment, für jede unterschiedliche Zelltype, für unterschiedliche Reagenzien, oder wenn die Instrumenteneinstellungen geändert wurden, durchführen. Eine tägliche Kompensationseinstellung ist daher eventuell nicht häufig genug!

1. Das Kompensationsröhrchen muß Zellen beinhalten, die ungefärbt sind, und solche, die mit einer einzelnen Farbe gefärbt sind. Die gefärbten (positiven) Zellen müssen dieselbe Autofluoreszenz (wenn Sie ungefärbt sind) wie die ungefärbten (negativen) Zellen haben (zum Beispiel: alle Zellen sind Lymphozyten).

2. Die PMT Spannungen müssen so hoch gesetzt werden, daß sich die negative Population von der Achse in jedem Kanal abhebt.

3. Das Analysengate muß so gesetzt werden, daß nur Zellen mit einer identischen Autofluoreszenz betrachtet werden (zum Beispiel ein Lymphozytengate). Das Analysengate muß auch so gesetzt werden, daß alle negativen und alle positiven Zellen enthalten sind.

4. Die Zentren der positiven und negativen Zellpopulation werden so ausgerichtet, daß die mediane Fluoreszenz übereinstimmt

9. Postskriptum

Ich möchte Susan Wormsley und Susan Saiget von Pharmingen, David Parks, Adam Treister und den anderen Mitgliedern des Herzenberg Labors für ihre hilfreichen Anregungen und ihre kritische Durchsicht danken. Wenn Sie irgendwelche Kommentare haben, dann bitte e-mailen Sie sie mir.

[Anmerkung: ich nehme an, daß Dr.Roederer englisch geschriebene Rückmeldungen erwartet]

Mario Roederer

Department of Genetics, Stanford University
Beckman B011
Stanford, CA 94305
Phone: 415 723 7149
FACS: 415 725 8564
E-Mail: Roederer@drmr.com

ANTWORTEN ZUM QUIZ:

Abbildung 1: Dot-Plot 3

Abbildung 2: Die Einstellung der Kompensation ist auf den Diagrammen nicht beurteilbar.