Abstracts

dkfz

zum 2.
Heidelberger Flow-Zytometrie Symposium

Heidelberg, 19. bis 21. Oktober 1989

im
Kommunikationszentrum des
Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg

Im Neuenheimer Feld 280
D-6900 Heidelberg 1
Tel. 06221 / 48 42 00

Organisatoren

Klaus Goerttler
Michael Stöhr

Abstracts

(V = Vortrag; P = Poster)

zum 2.
Heidelberger
Flow-Zytometrie Symposium

Heidelberg, 19. bis 21. Oktober 1989

im
Kommunikationszentrum des
Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg

Im Neuenheimer Feld 280
D-6900 Heidelberg 1
Tel. 06221 / 48 42 00

Organisatoren

Klaus Goerttler
Michael Stöhr

p

FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON GEHIRNMAKROPHAGEN MITTELS DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE: RESPIRATORISCHER BURST UND ZYSTEIN-PROTEINASE AKTIVITÄT

R. Banati[1], G. Rothe[2], G.W. Kreutzberg[1], G. Valet[2]

[1]Abteilung Neuromorphologie, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, D-8033 Martinsried
[2]Mildred-Scheel-Labor für Krebszellforschung, Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried

Die intrinsischen Makrophagen des Gehirns entstehen aus der residenten ramifizierten Mikroglia (Glia 1:301-7;1988). Sie werden in inflammatorischen Erkrankungen wie der AIDS-Enzephalopathie, Multipler Sklerose, oder nach Gehirnverletzungen aktiviert. Das Ziel dieser Studie war es, den Funktionszustand kultivierter Mikrogliazellen der neugeborenen Ratte im Vergleich zu residenten und nach Thioglykolat-Injektion gewonnenen Peritonealmakrophagen der Ratte zu charakterisieren.

Mikrogliazellen zeigten im Vergleich zu residenten und Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen bereits spontan eine hohe "respiratorische Burst"-Aktivität, gemessen durch die intrazelluläre Oxidation von Dihydrorhodamin 123 (DHR) (40 μM, 30 min, 37°C) zu Rhodamin 123. Durch 20-minütige Stimulation mit 150 nM Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) konnte nur eine 40 - 95% Steigerung der DHR-Oxidation induziert werden. Die Kathepsin B-Aktivität, gemessen als Spaltung von $(Z\text{-Phe-Arg})_2$-Rhodamin 110 (10 μM, 30 min, 37°C) zum fluoreszenten monosubstituierten Z-Phe-Arg-Rhodamin 110 war in Mikroglia höher als in peritonealen Makrophagen und jeweils durch den spezifischen Inhibitor Z-Phe-Ala-Diazomethylketon (2 mM) hemmbar. PMA Stimulation induzierte eine niedrige Zunahme der Kathepsin B-Aktivität.

Kultivierte Mikrogliazellen entsprechen demnach voll differenzierten Makrophagen mit "respiratorischer Burst"-Aktivität und lysosomaler Zystein-Proteinase Aktivität. Sie unterscheiden sich von residenten oder Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen durch ihre deutlich höhere spontane funktionelle Aktivität.

Gefördert durch DFG SFB 207, Projekt G6.

DNA-Ploidie im Nierenzellkarzinom - Flow-zytometrische Untersuchung unterschiedlicher Tumorregionen -

V

G. Baretton, R. H. Krech, U. Löhrs

Institut für Pathologie der Medizinischen Universität zu Lübeck

Die bisher in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse durchflußzytophotometrischer (FCM) Untersuchungen an Nierenzellkarzinomen weisen bei der Häufigkeitsangabe von DNA-aneuploiden Tumoren mit 39 % bis 67 % erhebliche Unterschiede auf.

Die eigenen FCM-Untersuchungen von unterschiedlichen Arealen der analysierten Nierenzellneoplasien sollten klären, ob zwischen lichtmikroskopischem Phänotyp und dem DNA-Ploidiegrad der Tumorzellen eine Korrelation besteht.

Aus den Blöcken von 45 Nierenzellneoplasien wurde anhand von Paraffingroßflächenschnitten die Präparation der morphologischen Interessensbereiche vorgenommen.
Pro 1,5 cm Tumordurchmesser wurde durchschnittlich eine Gewebeprobe für die FCM-Untersuchung entnommen (insgesamt 220 Proben von 45 Tumoren). Die Aufarbeitung erfolgte nach einer Modifikation der von HEDLEY und Mitarb. (1983) beschriebenen Methode.
In 14 Fällen (31 %) zeigte sich ein homogen-diploider DNA-Status, in 8 Fällen (18 %) waren homogen-aneuploide Stammlinien nachweisbar. 23 Tumoren (51 %), ausnahmslos klarzellige Nierenkarzinome zeigten jeweils diploide und aneuploide (N = 18; 40 %) bzw. verschiedene aneuploide (n = 5; 11 %) Stammlinien, d. h. eine eindeutige Tumorzellheterogenität. Dabei schien in dieser Gruppe bei Klassifikation nach THOENES die Zunahme der zytoplasmatischen Eosinophilie mit einer Zunahme aneuploider Stammlinien gekoppelt zu sein.

Chromophile (n = 3; 6,7 %) und onkozytäre Nierentumoren (n = 1; 2,2 %) waren diploid, sarkomatoid differenzierte Nierenzellkarznome (n = 2; 4,4 %) aneuploid. Zwischen histologischem Wachstumsmuster und DNA-Ploidie sowie zwischen zytologischem Malignitätsgrad und DNA-Ploidie ließ sich keine Beziehung herstellen.

Von 21 klarzelligen Nierenzellkarzinomen konnte zusätzlich Frischmaterial untersucht und von einem Teil der Fälle eine zytogenetische Karyotyp-Analyse durchgeführt werden. Die immunhistologisch bestimmte Wachstumsfraktion (Ki-67-positive Tumorzellen) korrelierte nicht mit dem Ploidiegrad.

Unsere Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit der Untersuchung zahlreicher Gewebeproben pro Tumor und erklären die unterschiedlichen in der Literatur mitgeteilten Daten.
Insbesondere bei Studien, in denen die Beziehung von DNA-Gehalt und Prognose untersucht wird, sollte der Heterogenität des DNA-Gehaltes der Tumorzellen größere Bedeutung geschenkt werden.

FLOW-CYTOMETRISCHE CHARAKTERISIERUNG METASTASIERENDER MELANOME

V

Bartkowiak, D., Otto, F. J. und Schumann, J.
Fachklinik Hornheide, Abteilung für experimentelle Onkologie, 4400 Münster

Es wurden 73 metastasierende maligne Melanoma vom Primärtumor an sequenziell durchflußzytometrisch untersucht. Die Beobachtungszeit lag zwischen 6 und über 96 Monaten. Die prognostische Relevanz der Messungen wurde anhand zweier Teilkollektive geprüft: Patienten mit einer Überlebenszeit von maximal 2 Jahren (N = 15) und solche mit mehr als 4jähriger Überlebensdauer (N = 17). Weder hinsichtlich der Ploidie des Primärtumors noch hinsichtlich der Anzahl der im Laufe des Krankheitsgeschehens neugebildeten Stammlinien ließen sich signifikante Unterschiede feststellen. Einzig eine schwache Korrelation mit der Primärtumordicke wurde beobachtet. Biologisch auffällig ist allerdings das unterschiedliche Ausmaß der Instabilität der Tumoren, d.h. ihrer Fähigkeit, in einem gegebenen Zeitraum neue Stammlinien zu bilden. Eine tiefergehende Analyse dieses Phänomens wird durch therapeutische Notwendigkeiten erschwert.

A complete system for flow cytometric analysis of DNA with FACSscan

V

Boogaerts Wim, Product Manager Clinical Systems Europe . Becton- Dickinson .

For many years DNA-quantification has been used as a potential marker for "true atypia" . Different methods in terms of cell preparation,cell staining and analysis were developed . Today there is an agreement that DNA-quantification is an ideal additional test to standard morphology and cytology.

DNA analysis can be used as a supportive diagnostic test were cytology sometimes is difficult,e.g.SCLC were >95% of the cases is DNA-aneuploid.DNA quantification has the additional advantage to have a **prognostic** value and in some neoplasias it is a good indicator of response to therapy.

Quantitation of the total DNA content gives insight on the **genetic stability** of cycling, dividing, cells .Flow cytometric DNA analysis is a screening method ,based on the detection of DNA aneuploid cells .In case DNA-diploidy is detected ,special attention should be paid to the distribution of the peak,CV,and a conventional cytological analysis or DNA analysis by image might be indicated.

Becton Dickinson developed a flow cytometric **DNA system** for clinical analysis composed off

FACScan with Doublet Discriminator Module
CELLfit ,analysis and acquisition software
Cycletest reagents,isolation,staining and storage of cell nuclei
Chicken Erythrocyte Nuclei(CEN) ,for the automatic instrument set up

With this system,high resolution DNA analysis can be executed on a **routine basis**,using a simple preparation and staining protocol on a wide variety of neoplasias.The standardized instrument set up warrants reproducible and comparable data,inter and intra laboratory. To do clinical DNA analysis the system requirements are : high resolution,linearity,stability, doublet discrimination and eventually multivariate capabilities .If these criteria are forfilled the analysis of the histograms ,after selecting the appropriate algorithm,will give the exact calculations of the different cell cycles.

All these critical parameters were tested on different instruments and on a wide variety of neoplasias. The results will be shown during the presentation.

RESUME:
CV on lysed whole blood N=25 1,99
CV on 50 different solid tumours 3,14
G2/M-G0/G1 ratio on 4 different FACScan for 50 solid tumours 1,986 .

Zur Beziehung zwischen relativem DNS-Gehalt, Morphologie, Rezeptorstatus und Verlauf beim Endometriumkarzinom.

V

G. Feichter *, W. Kühn **, M. Kaufmann **,
G. v. Minckwitz **, K. Goerttler ***.
* Inst. für Pathologie der Univ. Basel, Schweiz
** Universitäts-Frauenklinik Heidelberg
*** Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg

Der relative DNS-Gehalt (DNS-Index = DI und S-Phasen-Fraktion = SPF) wurde mittels Durchfluss-zytometrie bei 121 Endometriumkarzinomen gemessen und mit den entsprechenden histologischen Daten (Stadium, Grading, Infiltrationstiefe), dem Gehalt an Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie mit dem Rezidiv-freien Intervall und der Gesamtüber-lebenszeit der Patientinnen verglichen.

Der Anteil von Fällen mit einem DI von 1.00 war mit 78% deutlich höher als bei den meisten anderen malignen Tumoren (z.B. Colon-,Mamma-,Ovarialkarzi-nom). Ferner konnte bei 61% der Fälle ein besonders niedriger S-Phasenanteil (4%) festgestellt werden.

Frauen, deren Karzinome einen DI von 1.00 oder eine niedrige SPF hatten, zeigten weniger Rezidive und eine längere Gesamtüberlebenszeit als jene mit DNS-Aneuploidie und hohem S-Phasenanteil.

DNS-Index und S-Phasenfraktion zeigten eine signi-fikante Korrelation zum histologischen Grading und zum Stadium (FIGO), aber nicht zur Infiltrations-tiefe des Myometrium.

Die Ergebnisse unterstreichen den Wert von DNS-Messwerten für die Ermittlung der Prognose beim Endometriumkarzinom.

ANALYSIS OF UNI- AND BIVARIATE DNA HISTOGRAMS WITH THE "MULTI2D" AND "MULTICYCLE" PACKAGES DEVELOPED BY PETER S. RABINOVITCH

p

R. Friedl, H. Seyschab, E.M. Weller, M. Poot

Department of Human Genetics, University of Würzburg, 8700 Würzburg, F.R.G.

A novel software package (MULTI2D), which runs on IBM PC-AT and compatibles, allows to analyse bivariate DNA histograms as generated by BrdU/Hoechst, BrdU-antiBrdU-Ab, DNA-surface marker, and Acridine Orange flow cytometry. Data clusters in regions of interest are selected with a mouse-driven subroutine, and deconvoluted onto the X or Y axis, which can be rotated if needed. Univariate histograms, thus generated or obtained via single parameter DNA analysis, are analysed with the "MULTICYCLE" package. This program uses the Dean and Jet algorithm (P.N. Dean and J.H. Jett (1974) J.Cell Biol. **60**, 523), and incorporates selectable options for zero-, first-, or second order broadened polynomials for the S phase region, aneuploid peaks within the cell cycle, several models for background correction and two overlapping cell cycles with a peak of aneuploid cells. An auto-mode enhancement allows batch analysis of large numbers of histograms with minimal operater interference. Available from Phoenix Flow Systems, 11575 Sorrentino Valley Road, Suite 202, San Diego, CA 92121, U.S.A.

PC Applications in Flow Cytometry: Hardware and Software Architecture

V

Futterman G. and Stöhr M. - DKFZ Cytometry Project Group

We are currently developing a computer system to preform real time aquisition, display, and analysis of flow cytometric data. This system runs under DOS 3.2+.

The minimum hardware configuration consists of an 80386 AT system, an EGA monitor, an ADC board of the type DT2828 from Data Translation, 640 Kb of main memory, and a 1.2 Mb diskette drive.

An optimal configuration would however include an 80387 co-processor, an MDA monitor, 256 Kb extended memory, a hard disk, a printer, and an HPGL compatible plotter.

The basic software consists of a series of modules (flow service routines), written in assembler, and which are accessed as C functions. These functions control such basic processes as data aquisition, colour display, mouse and cursor, screen switching etc.
Further modules, written in C, have been added to simplify I/O and plotting.

The system is designed, as mentioned, as modules accessable from a C program. Therefore, anyone with an understanding of the C language can develop his own flow programs.

To help with this development, we are using the C interpreter RUN/C Professional from Age of Reason. This interpreter supports external machine code modules (loadable libraries) which have been compiled or assembled and linked via the DOS link utility. For this reason, RUN/C has proved a useful tool for both system and application programs.

After a flow program has been written and tested using the interpreter, it can then be compiled and linked with the flow service routines to thereafter run at machine speed directly under DOS.
Alternatively, already tested portions of a partially developed system may be compiled or assembled as independent programs. These modules may then be called (EXECed) as overlays of the interpreter. After a system has been fully tested, these independent program modules may be re-incorporated into the main, or continue to run as overlays of the main program.

There are currently two loadable libraries available in this system; one supports mono parameter flow, the other, bi parameter.
Aquisition speeds achieved for mono parameter data are in the order of 95000 counts/sec. Bi parameter speeds are in the order of 60000 counts/sec. These tests were done on a Compaq Deskpro 386/25 measuring simulated events.

Die quantitative Bestimmung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen in CHO-Zellen mit Hilfe der Flußzytometrie.

p

J.Hain, A.H.Dietzel und R.P.Virsik-Peuckert:
Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Georg-August-Universität Göttingen.

Abstrakt:
In G_0/G_1-Phase synchronisierte CHO K1-Zellen (Subklon M3-1) wurden mit unterschiedlichen Dosen von 150 kV-Röntgenstrahlung bestrahlt. Die Metaphasechromosomen der ersten Mitose nach der Synchronisation wurden aus den Zellen herauspräpariert und in Suspension mit DAPI angefärbt. Die Chromosomensuspension wurde im Flußzytometer gemessen, hierzu wurde der Zellaufschluß standardisiert und die Anfärbung optimiert. Die gemessenen Histogramme wurden mit Hilfe eines iterativen Fit-Algoritmus in Peak- und Untergrundanteile aufgeteilt. Der DNA-Gehalt in den Peaks und im Untergrund wurden bestimmt. Der mit höherer Bestrahlungsdosis zunehmende Untergrundanteil wurde mit Hilfe einer Monte-Carlo-Simulation interpretiert und auf nichtreparierte bzw. fehlreparierte DNA-Läsionen pro Zelle umgerechnet.
Die Ergebnisse wurden auf ihre Übereinstimmung mit der mikroskopischen Auswertung von Chromosomenaberrationen verglichen und eine Korrelation konnte gezeigt werden.
Zusätzlich wurden Bestrahlungen mit unterschiedlichen Dosen von 43 kV-Röntgenstrahlung vorgenommen, die flußzytometrisch erhaltene Dosis-Wirkungs-Kurve wurde mit der Dosis-Wirkungs-Kurve der 150 kV-Röntgenstrahlung verglichen und die relative biologische Wirksamkeit (RBW) der 43 kV-Röntgenstrahlung flußzytometrisch bestimmt. Die RBW wurde auch anhand von mikroskopisch ermittelten Daten bestimmt und mit dem flußzytometrischen Ergebnis verglichen.

Monitoring von Chemotherapie solider Tumore durch DNA-Durchflußzytophotometrie von Biopsien

p

Jörg Hemmer

Universität Ulm, Abt. f. Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie

Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle wurden intra-arteriell mit Cisplatin/Epirubicin behandelt. In 22 Fällen wurde jeweils unmittelbar vor, während und nach Therapie Gewebeproben entnommen und durchflußzytophotometrisch untersucht. In 16 Fällen wiesen die Tumore einen aneuploiden klonalen DNA-Gehalt auf, 6 Karzinome waren diploid. In der Mehrzahl der Fälle konnte der zytostatische Effekt während der Therapie durch eine Akkumulation der Zellen in der späten S-Phase sichtbar gemacht werden. Die zytotoxische Wirkung der Therapie konnte durch die Reduktion des Anteils aneuploider maligner Zellen in der Probe abgeschätzt werden. Dabei war das Ausmaß der Reduktion des Anteils maligner Zellen vom jeweiligen prätherapeutischen Anteil abhängig, d. h. die Reduktion war umso größer, je geringer der anfängliche Anteil aneuploider Zellen war. Bei 7 Patienten war ein ursprünglich vorhandener aneupleoider Klon am Ende der Therapie verschwunden während in 9 Fällen zwar eine deutliche Verminderung festgestellt werden konnte, eine mehr oder weniger große Fraktion aneuploider Zellen jedoch noch posttherapeutisch nachgewiesen werden konnte. Weiterhin war der Effekt der Therapie umso größer (in Bezug auf die Reduktion maligner aneuploider Zellen) je höher der prätherapeutische Anteil der Zellen in der S-Phase war. Bei den diploiden Fällen verminderte sich der prätherapeutische Anteil der S-Phase Zellen von 15-20% - nach zytostatischer Akkumulation während der Behandlung - posttherapeutisch auf weniger als 10%. Die DNA-Durchflußzytophotometrie von aufeinander folgenden Biopsien stellt somit eine Methode dar, den Effekt von therapeutischen Maßnahmen unmittelbar am Tumor zu studieren und die auf diese Weise gewonnenen Erkenntnisse in Zukunft für eine flexible Steuerung der Behandlungsmodalitäten auf der Basis individueller Parameter einzusetzen.

Die proliferative Aktivität von Oralkarzinomen und ihren Metastasen bestimmt durch in vitro BrdUrd-Markierung

P

Jörg Hemmer

Universität Ulm, Abt. f. Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie

Von 33 primären, unbehandelten Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und 17 Lymphknotenmetastasen, sowie 8 Lymphknoten (LK) ohne Befund und 8 LK mit Sinushistiozytose wurden Proben entnommen. Ein Teil der Probe wurde für eine durchflußzytophotometrische Analyse des zellulären DNA-Gehaltes aufgearbeitet, ein zweiter Teil wurde in kleine Stücke zerschnitten und für 2 Std. bei 37°C in 15 µm Bromodeoxyuridin (BrdUrd) in MEM inkubiert und anschließend in 70% Äthanol fixiert. Nach Extraktion der Zellkerne durch 0.5% Pepsinlösung wurden die positiven Nuklei mit einer indirekten Immunfluoreszenzmarkierung nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte entweder fluoreszenzmikroskopisch oder durch biparametrische Durchflußzytophotometrie (PARTEC). Der Markierungsindex (MI) der Primärtumore variierte von 0 bis 23.2% (Median: 2.6%). Während keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die histologische Differenzierung festgestellt werden konnten, wiesen T_1- und T_2-Tumore geringere MIs auf als T_3-Karzinome. Primärtumore mit Metastasen zum Zeitpunkt der Untersuchung zeigten ebenfalls signifikant höhere MIs als Tumore ohne Anzeichen einer Metastasierung. Die proliferative Aktivität euploider Tumore war signifikant geringer als bei aneuploiden. Alle 17 LK-Metastasen waren aneuploid. Der in vitro BrdUrd MI wies Werte zwischen 0.6% und 9.8% auf (Median: 3.7%) und war signifikant höher als bei den Primärtumoren. LK ohne pathologischen Befund und LK mit Sinushistiozytose zeigten ausschließlich euploiden DNA-Gehalt. Der in vitro BrdUrd MI der normalen LK zeigte Werte von 0% bis 0.7% (Median: 0.1%), bei LK mit der Diagnose Sinushistiozytose wurden MIs zwischen 0.2% und 6.2% (Median: 1.3%) festgestellt. Die Unterschiede zwischen den drei LK-Kollektiven war signifikant. Die in vitro BrdUrd Markierung stellt offensichtlich eine adäquate Methode zur Untersuchung der proliferativen Aktivität von soliden Tumoren dar. Ein biparametrische Durchflußmessung ist aufgrund teilweise geringer Markierungsintensitäten nicht in jedem Fall anwendbar so daß eine relativ unproblematische Auswertung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes in jedem Fall parallel durchgeführt werden sollte. Da der MI bei Oralkarzinomen mit einer Reihe prognostisch wichtiger klinischer Parameter (Tumorgröße, Metastasierung, Ploidie) korreliert ist, scheint eine Zuordung von Patienten zu Risikogruppen auf dieser Basis gerechtfertigt zu sein. Das Ergebnis, daß Primärtumoren mit positiven LK höhere MIs aufweisen als Tumore ohne metastatischen Befund und gleichzeitig die proliferative Aktivität der Metastasen größer ist als bei den Primärtumoren kann als Hinweis gewertet werden, daß die Absiedelung von Metastasen von Zellinien mit höherer proliferativer Aktivität ausgeht.

Signifikante Veränderungen peripherer Lymphozytensubsets bei Nierentransplantierten mit chronisch aktiver CMV-Infektion.

P

J.Heymanns (1),K.Bittner (2), H.Lange (2) und K. Havemann (1).

Zentrum Innere Medizin, (1) Abteilung Hämatologie / Onkologie / Immunologie und (2) Abteilung Nephrologie.

Philipps-Universität, 355 0 Marburg

Primäre oder reaktivierte Zytomegalie-Virus (CMV) - Infektionen in den ersten Monaten nach Nierentransplantation können schwere Komplikationen verursachen.
Im Langzeitverlauf bei Nierentransplantierten sind klinisch apparente CMV-Infektionen dagegen selten, obwohl das Zytomegalievirus die Fähigkeit zur lebenslangen Persistenz besitzt. Eine effektive immunsuppressive Therapie nach allogener Nierentransplantation beeinträchtigt zwangsläufig immunologische Mechanismen zur Kontrolle persistierender Virusinfektionen. Es wurden deswegen die Auswirkungen einer CMV- Infektion auf die Lymphozytensubsets bei 76 Patienten mindestens 12 Monate (Mittel 48 Monate) nach Nierentransplantation untersucht.
Die immunsuppressive Therapie bestand aus Cyclosporin A (CiA) /Prednisolon (Pred) (n=52), Azathioprin (Aza) / Pred (n=14) oder CiA/Aza/Pred (n=10).
Eine CMV-Infektion wurde durch den Nachweis von CMV-IgG-AK im ELISA erfaßt.
Zur Lymphozytensubsetanalyse wurden monoklonale anti-CD 3,- CD 4,- CD 8, - CD 57 (HNK-1) und anti-HLA - DR Antikörper verwendet.
Bei 77,6 % (59 von 76) aller Langzeit-Nierentransplantierten konnten CMV-AK nachgewiesen werden, dabei waren alle 10 Patienten unter CiA/Aza/Pred CMV-AK positiv.
Bei der Gruppe CMV - AK positiver Patienten fand sich eine signifikante Zunahme von aktivierten T-Zellen, CD 8 positiven T-suppressor/zytotoxischer Zellen sowie besonders von CD 57 positiven/CD 8 negativen und CD 57 positiven/CD 8 positiven Lymphozyten. Das Ausmaß der Erhöhung dieser Subsets war bei den Patienten unabhängig von der immunsuppressiven Therapie.
Schlußfolgerung: Bei Langzeit - Nierentransplantierten zeigen immunologische Parameter wie eine Erhöhung von aktivierten T-Zellen, von CD 8 positiven - und CD 57 positiven-Zellen eine chronisch aktive Zytomegalievirusinfektion an.

Durchflusszytometrische Messungen von Nanoplankton im Nordatlantik

V

V. Kachel(+), Ch. Stienen(*)
(+)Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, (*)Institut für Meereskunde, Kiel

In der euphotischen Schicht des Ozeans, die sich bis in eine maximale Tiefe von 150 m erstreckt, laufen komplexe physikalische, chemische und biologische Prozesse ab. Von besonderer Wichtigkeit für das Leben im Meer ist die Bildung von biologischem Material durch Photosynthese des Phytoplanktons. Diese autotrophen Organismen bilden die Basis der Nahrungspyramide im Ozean. Die Primärproduktion wird teilweise direkt in der oberflächennahen Wasserschicht von Kleinkrebsen, Fischlarven und Bakterien gefressen und remineralisiert, ein Teil sinkt als Zellaggregat oder Kotpille auf den Grund des Ozeans. Ein hoher Prozentsatz der Primärproduktion erfolgt durch Zellen im Größenbereich zwischen <1 um - 20 um. In diesem Bereich ist die Unterscheidung von autotrophen (Phytoplankton) und heterotrophen Organismen (Flagellaten, Bakterien) sehr schwierig. Die durchflußzytometrische Meßtechnik erlaubt eine schnelle und genaue Quantisierung des Phytoplanktons über seine Pigmente.
Die Messungen wurden auf dem 2. Abschnitt der Reise Nr. 10 des deutschen Forschungsschiffes Meteor im Frühjahr 1989 durchgeführt, welcher von Ponta Delgada (Azoren) nach Reykjavik (Island) führte. Sie hatten zum Ziel, das Nanoplankton im Größenbereich von 1um bis 10 um durchflußzytometrisch zu charakterisieren und die Zelldichten festzustellen. Hierzu wurde ein FluvoII Durchflußzytometer verwendet, das zur Zellzählung mit einer schrittmotorgesteuerten Spritze zur Zelleingabe ausgerüstet wurde.
Die Meßproben wurden mit Wasserschöpfern aus Tiefen zwischen 5m und 100m geholt und nach einer Filterung durch ein 20um Sieb ohne weitere Behandlung analysiert. Zur Fluoreszenzanalyse wurde die Rotfluoreszenz des in den Zellen vorhandenen natürlichen Chlorophyll-A und die in bestimmten Organismen enthaltene gelb-orange Phycoerythrin Fluoreszenz verwendet. Gegated von der Chlorophyll-A Fluoreszenz, wurden die Volumenverteilungen der verschiedenen Zellpopulationen ermittelt. Aus den Messungen wurden an den einzelnen Meßstationen die Tiefenprofile verschiedener Zellcluster bestimmt und die Ortsabhängigkeit der Zelldichten über die jeweilige Serie von Meßstationen angegeben. Der Zusammenhang dieser Ergebnisse mit den gleichzeitig durchgeführten Nährstoffmessungen und Chlorophyllbestimmungen wird diskutiert.

INDUKTION VON WACHSTUMSSTÖRUNGEN UND CHROMATINLÄSIONEN IN SÄUGERZELLEN DURCH BLEOMYCIN.

V

G.M. Kaiser, R. Friedl, M. Kubbies, M. Poot, H. Hoehn
Institut für Humangenetik der Universität Würzburg

Vermittels verschiedener durchflußzytometrischer Methoden (BrdU-Hoechst, Acridine Orange, Säuredenaturierung und einer neuartigen Vitalverfärbung) wurde der Einfluß von Bleomycin (BM) auf das Wachstumsverhalten von humanen peripheren Blutlymphozyten (HPBL) und Mäusefibroblasten (NIH-3T3) untersucht. In HPBL hemmt BM den Exit aus der G0/G1-Phase und bedingt eine Arretierung der replizierenden Zellen in der G2-Phase des ersten und zweiten Zyklus; demgegenüber findet sich bei NIH-3T3 Zellen ein wesentlich geringerer Effekt auf den G0/G1-Phasen Exit, jedoch eine wesentlich stärker ausgeprägte Blockierung der Zellen in der G2-Phase des ersten Zyklus. Die BM induzierte Hemmung des G0/G1 exit in HPBL kann mithilfe einer log Funktion, der G2-Phasen Arrest mittels einer Potenzfunktion beschrieben werden. Cytogenetisch fanden sich Chromatid- und Chromosomen-brüche in HPBL. In beiden Zellsystemen wurde die Abhängigkeit der BM-Wirkung von der Sauerstoff-Spannung dokumentiert. Acridine Orange Färbungen ergaben einen signifikant höheren RNA Anteil der in den G2-Phasen arretierten Zellen in NIH-3T3 im Vergleich zu HPBL Kulturen. Durch Säuredenaturierung konnte gezeigt werden, daß die durch BM bewirkte Zellzyklus-Arretierung tatsächlich in der G2-Phase des Zellzyklus, und nicht in der Mitose stattfindet. Nur im NIH-3T3 Zellsystem konnten die BM-Wirkungen auf den Zellzyklus durch kontinuierliche Behandlung mit reduziertem Glutathion verringert werden. Durch eine neuartige Ethidium-Bromid Exklusionsmethode konnte gezeigt werden, daß das Chromatin der auf Grund der BM-Wirkung in der G2-Phase arretierten Zellen in HPBL Kulturen (im Gegensatz zu NIH-3T3) irreversibel geschädigt ist.

Diagnostik subkutaner und lymphonodaler Melanom-Metastasen mittels Zytologie und DNS-Flow-Zytometrie

V

F. Kiesewetter, H. Schell

Dermatologische Universitäts-Klinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. O.P. Hornstein)

Die Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) ist eine in der präoperativen onkologischen Diagnostik bekannte, den Patienten wenig belastende Methode. In der Dermatologie ist sie speziell zur Früherkennung subkutaner und/oder lymphonodaler Melanom-Metastasen oder allgemein zur Abklärung in ihrer Dignität unklarer Knoten wenig gebräuchlich. Das mittels der FNAB gewonnene Gewebsmaterial eignet sich in Ergänzung zur konventionellen Zytologie auch für die DNS-Flow-Zytometrie (DNS-FCM). Bei 21 Patienten mit malignem Melanom im klinischen Stadium I-III wurde zur Abklärung Metastasen-verdächtiger Lymphknoten-Metastasen oder Subkutanknoten eine FNAB durchgeführt. Diese Befunde wurden mit denen der Routinehistologie nach chirurgischer Exstirpation der Knoten verglichen. Unsere Ergebnisse zeigten mittels der konventionellen Zytologie in 11 von 12 Lymphknoten Melanom-Metastasen (LMM). Dieselben LMM zeigten ein DNS-aneuploides Histogramm. Ein Punktat war unverdächtig. Diese Befunde wurden durch die Routinehistologie bestätigt. Bei den subkutanen Knoten fanden wir mittels konventioneller Zytologie in 8 Fällen eine Melanom-Metastase (SMM). Dieselben SMM zeigten ein DNS-aneuploides Histogramm. Ein Knoten war zytologisch und DNS-FCM unverdächtig. Auch diese Befunde wurden durch die Routinehistologie bestätigt. Die FNAB mit anschließender konventioneller Zytodiagnostik ergänzt durch die DNS-FCM kann demnach mit hoher Treffsicherheit zwischen benignen und malignen Gewebe unterscheiden und liefert so Entscheidungshilfen bei einzuschlagenden Therapie.

Markierung von Intermediärfilamenten (Cytokeratinen) zur Verbesserung der Detektion DNA-aneuploider Subpopulationen und Validisierung der Zellzyklusanalyse maligner epithelialer gynäkologischer Tumoren in der Durchflußzytometrie

V

R. Klmmig, D. Egner, W. Permanetter*

Frauenklinik im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München, Marchioninistr. 15, 8000 München 70 (Direktor: Prof. Dr. H. Hepp)

* Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Thalkirchnerstr. 36, 8000 München 15 (Direktor: Prof. Dr. M. Eder)

Insgesamt 80 maligne gynäkologische Tumoren (Mamma, n = 39; Ovar, n = 38; Cervix/Corpus uteri, Vulva, n = 9/2/2) wurden unfixiert mechanisch/enzymatisch zu Einzelzellsuspensionen dissoziiert (Trypsin/Collagenase/DNase-Methode). Nach Fixation in 70%igem Methanol erfolgte die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung (monoklonaler AK, Anti-Cytokeratin 8, 18, 19 (Maus IgG 2-Alpha); Ziege-Anti-Maus - AK, FITC-markiert) sowie die DNA-Färbung mit Propidiumjodid nach RNase-Inkubation. Messung und Auswertung erfolgten mit dem Facscan-Cytoflowmeter sowie der Cellfit-Software von Becton-Dickinson.
In allen Fällen epithelialer Tumoren ließ sich mindestens eine Cytokeratin-positive Subpopulation nachweisen. In 13 Fällen konnte durch Analyse ("Gating") der Cytokeratin-positiven Zellen eine zuvor nicht zu beweisende aneuploide Zellpopulation gesichert werden (Mamma 5/39; Ovar 3/28; Cervix 4/9; Vulva 1/2). Der S-Phasen-Anteil der Cytokeratin-positiven Subpopulationen war durchschnittlich um 20% (Mamma) bis 60% (Ovar) höher als der für die Gesamtpopulation ermittelte Anteil. Die Cytokeratin-negativen Zellen erwiesen sich als idealer diploider interner Standard zur Errechnung des Ploidiegrades.

Die Cytokeratinmarkierung der Zellen gynäkologischer epithelialer Tumoren zeigte folgende Vorteile:

1. **Verbesserung der Detektion aneuploider Subpopulationen**
2. **Exaktere Evaluation des S-Phasenanteils der Tumorzellen**
3. **Verfügbarkeit Cytokeratin-negativer Zellen als interner Standard zur Errechnung des Polidiegrades.**

DNA FLOW CYTOMETRY IN THE ESTIMATION OF BIOLOGICAL AGGRESSIVENESS OF GRANULOSA CELL TUMORS OF THE OVARY

V

PJ Klemi, MD*, H Joensuu, MD**, and T Salmi, MD,***
From the Departments of *Pathology, **Radiotherapy, and ***Obstetrics and Gynecology, University Central Hospital of Turku, and University of Turku, SF-20520 Turku, Finland

The biological behavior of the granulosa cell tumors of the ovary is unpredictable by clinical and morphological grounds. Even the granulosa cell origin is difficult and sometimes impossible to determine in poorly differentiated tumors due to the lack of specific markers. Flow cytometric DNA analysis, i.e.ploidy and cell cycle analysis has been shown to be a useful tool in predicting the biological behavior of other types of ovarian tumors.

The nuclear DNA content and S-phase fraction of 23 ovarian tumors, originally histologically classified as granulosa cell tumors, were measured from paraffin-embedded tissue with flow cytometry. Crude survival of the patients with euploid tumors (17 diploid, 1 tetraploid) was more favorable than that of the patients with aneuploid tumors (n=5, p=0.02). The percentage of S phase cells was a good predictor of survival. If more than 6% S phase cells were present in the DNA histogram, both crude survival (p=0.0001) and survival corrected for intercurrent deaths(p=0.0001) were clearly inferior as compared with tumors with less than 6% S phase cells.

The results indicate that DNA flow cytometry is a rapid and powerful method to predict the biological behavior of such tumors that have been classified as granulosa cell tumors of the ovary by conventional histologic criteria.

Flow-zytometrische Studien der thermalen Denaturierungskinetik in alkohol-fixierten Zellkernen mit DAPI, CA und PI.

P

Klett, Th. und Stoehr, M.:

Zytometrie, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
INF 280, 69 Heidelberg 1

Suspendierte Zellen experimenteller Tumoren (Ehrlich und Walker 256) wurden nach Fixation in 96%-tigem Ethanol einer Hitzedenaturierung 10-Grad-Schritten ausgesetzt. Flow-zytometrische Haeufigkeitsverteilungen wurden nach Einzelfluorochromierung mit DAPI (und HO-33258), CA3 sowie PI und geeigneten Kombinationen dieser Substanzen registriert. Bei letzteren wurden korrelierte Doppelfluoreszenz-Analysen einschliesslich Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer von DAPI (oder HO-33258) auf CA3 und PI durchgefuehrt.
Im Vergleich zur Standardtechnik (Absorptions-DNA-Schmelzkurven bei 260 nm) zeigte sich erwartungsgemaess eine Verschiebung des Schmelzprofiles zu hoeheren Temperaturen aufgrund der chromatin-stabilisierenden Wirkung der verwendeten DNA-Fluorochrome. Besonders das interkalierende PI erschwert das Aufschmelzen der DNA durch Erhoehung der inneren Spannung in der Doppelhelix, so dass die AT-bezogene DAPI-Fluoreszenz erst ueber 80 C zurueckgeht, waehrend PI-Fluoreszenz und DAPI-PI-Energie-Transfer bis 91 C ansteigen, weil zusaetzliche Bindungsstellen im Chromatin infolge des Abschmelzenz von Proteinen frei werden. PI-Fluoreszenz und Energie-Transfer bleiben auch nach Renaturierung erhoeht, die DAPI-Fluoreszenz dagegen ist niedriger im Vergleich zur nicht-erhitzten Kontrolle. CA3 verhaelt sich aehnlich: es stabilisiert die AT-Regionen (aber weniger als PI) und seine Eigenfluorszenz sowie der DAPI-CA3-Energie-Transfer nehmen bis zum Schmelzpunkt bei steigender Temperatur zu, was wiederum fuer eine Rekrutierung von Bindungsstellen fuer die grosse CA3-Molekel durch Abschmelzen DNA-bindender Proteine spricht.

Erstaunlicherweise unterscheiden sich die Schmelzkurven der diploiden Zellen in der G1/0-Phase von den tetraploiden Zellen in der G2M-Phase. Die somatischen Zellen und die Tumorzellen weisen auch geringfuegige Abweichungen in ihrem Schmelzverhalten auf; dafuer ist die Temperaturabhaengigkeit des DNA-Index ein Indiz.

ANEUPLOIDY ODER NICHT-STÖCHIOMETRISCHE FLUOROCHROMBINDUNG: PROBLEME DER DNA-HISTOGRAMM ANALYSE

V

M. Kubbies, B. Goller

Boehringer Mannheim GmbH, Forschungszentrum Penzberg, FRG

Bei flowzytometrischen Untersuchungen von in vitro Tumorlinien oder klinischen Studien von Patiententumoren kommt der genauen Bestimmung aneuploider Zellpopulationen große Bedeutung zu. Die stöchimetrische Fluorochrombindung an Zellen unterschiedlichen zellphysiologischen Status oder Zellaktivierungsgrads ist bei gleicher Genomgröße die Grundvoraussetzung. Bei in vitro Studien mit normalen diploiden Zellen und permanenten Zellinien zeigte sich, daß unterschiedlicher Differenzierungsgrad und Chromatinkondensation zu nicht-stöchiometrischen Bindungen interkalierender (z. B. Propidium-Jodid) und nicht-interkalierender Fluorochromen (z. B. Hoechst) führen kann.

1. Bei der Applikation klastogener Agenzien (z. B. Röntgenstrahlen treten in peripheren Blutlymphozyten nicht-proliferierende, z. T. vitale Subpopulationen auf, die eine um 23 % geringere Hoechst 33258 (Detergenztechnik) und Hoechst 33342 (Vitalmessung) Fluororeszenzintensität aufweisen. Genomische und zellphysiologisch Daten weisen auf den Prozeß der Apoptosis hin (programmierter Zelltod).
2. In seneszenten humanen Knochenmarkskulturen finden sich Zellpopulationen die bei Analysen mit Propidium-Jodid einen "DNA-Index" von 1,21 aufweisen (CV Normalpopulation 1,7-3,3 und "aneuploide" Fraktion 2,8-3,4). Bei Messungen mit nicht-interkalierenden Fluorochromen (Hoechst 33258) findet sich diese Population nicht. Zellzykluskorrelierte Oberflächenmarker- und Streulichtmessungen deuten auf eine nicht-proliferierende Monozyten/Granulozyten $CD14^+$-Fraktion hin.
3. In Populationen rekombinanter CHO-Zellen (Weidle U et al; Gene 66:193, 88) taucht bei hohen Zelldichten (>1x10^6/ml) in der Zellzyklusanalyse mit Propidium-Jodid eine "aneuploide" Subpopulationen (bis zu 20 %) mit einem "DNA-Index" von 1,22 auf (CV G1-Phase normaler und varianter Fraktion 5,7). Diese Zellpopulation ist bei der flowzytometrischen Messung mit Hoechst 33258 nicht mehr vorhanden (CV G1-Phase 3,9).

Die Beispiele 2 und 3 (0.1 % Detergenz) zeigen, daß aufgrund nicht-stöchiometrischer Bindung interkalierender Fluorochrome bei der DNA-Histogramm Analyse "pseudoaneuploide" Zellpopulationen gemessen werden können. Der Begriff "DNA-Index" ist dabei nicht anwendbar, da er sinngemäß nicht die reallen genomischen Veränderungen wiedergibt. Nur die Aussage "Populationen mit unterschiedlicher Fluorezenzintensität" entspricht in diesen Fällen den Meßergebnisen.

Durchflußzytometrische Messungen der 1/20 Translokation in Schafspermien

P

H. Lewalski[1], T. Kranert[2] und F.J. Otto[3]

[1]Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen
[2]Strahlenzentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen
[3]Abteilung für experimentelle Tumorforschung der Fachklinik Hornheide, Universität Münster

Während einer routinemäßigen Ankaufsuntersuchung wurde bei einem Schwarzköpfigen Fleischschafbock auf dem Versuchsgut Oberer Hardthof der Justus-Liebig-Universität Gießen eine autosomal interchromosomale 1/20 Translokation festgestellt. Nach Erstellung hetero- und homozygoter Translokationsträger zeigte sich eine deutlich verminderte Fertilität dieser Tiere.
Aufgrund verschiedener Untersuchungen wird vermutet, daß von den heterozygoten Translokationstieren unbalancierte Gameten produziert werden, die als Ursache für eine erhöhte frühembryonale Mortalität anzusehen sind (GLAHN-LUFT und WASSMUTH, 1984).
Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten durchflußzytometrische Messungen an Schafbockejakulaten von Normaltieren und Translokationsträgern Aufschluß darüber geben, ob unbalancierte Spermien mit erhöhten bzw. verminderten DNA-Gehalten nachgewiesen werden können.
An Hand der Meßergebnisse konnte bei Normaltieren ein Unterschied im DNA-Gehalt Y- und X-Chromosomen tragender Spermien von ca. 4,5% ermittelt werden.
Das Histogramm des Ejakulates eines Translokationsbockes zeigt eine fünfgipflige Verteilung, die durch die Exsistenz unbalancierter Spermien erklärt werden kann . Sie setzt eine Translokation voraus, bei der die translocierten Bruchstücke der Hälfte des DNA-Unterschiedes der Y- und X-Chromosomen tragenden Spermien entsprechen.
Es zeigt sich, daß die Histogramme mit einem Modell, in dem sechs Gauss-Kurven im Verhältnis 1:2:1:1:2:1 überlagert werden, gut quantitativ angenähert werden können.
Ergänzend zu den Ergebnissen von MEISTRICH et al. (1979), die mit Hilfe der Durchflußzytometrie die Cattanach Translokation (7→X) in Mäusesperma darstellen konnten, belegen die hier gezeigten Resultate, daß selbst autosomale Translokationen mit relativ kleinen translocierten Bruchstücken meßbar sind.

Literatur

GLAHN-LUFT, B.; WASSMUTH, R.: Auswirkungen der 1/20 Translokation beim Schaf: Verminderte Fruchtbarkeit durch Chromosomenanomalie. Gießener Schriftenreihe Tierzucht und Haustiergenetik, Band 47, Verlag Paul Parey, Hamburg Berlin, 1984

MEISTRICH, M.L.; GÖHDE, W.; WHITE, R.A.; LONGTIN, J.L.: "Cytogenetic" Studies of Spermatids of Mice Carrying Cattanach's Translokation by Flow Cytometry. Chromosoma 74, 1979, S. 141-151

Flow-zytometrische DNA-Analyse von Blasenspülflüssigkeiten

V

Verbesserung der Aussagekraft durch Cytokeratin-AK-Markierung

Liedl, Th., Prosinger, M., Ganzmann, B., Jocham, D.
Urologische Klinik und Poliklinik der LMU-München
(Direktor: Prof. Dr. med. A. G. Hofstetter)

Methanolfixierte Blasenspülflüssigkeiten wurden mit verschiedenen Präparationsmethoden auf ihren DNA-Gehalt (Farbstoff: PI) untersucht.
Wird die Messung an der durch Pepsinverdauung gewonnenen Kernsuspension durchgeführt, stört die entstehende Debris-Kurve die Analyse des Zellzyklus:
Durch die Andauung von Tumorzellen werden pathologische Zellinien undeutlicher oder verschwinden ganz.
Gute Ergebnisse liefert dagegen die Untersuchung von intakten Zellen: In über 50 % von G I - II und in über 80 % der G III-Tumoren bietet der Nachweis von Aneuploidien ein sicheres Tumorkriterium. Durch den verschieden hohen Anteil von miterfaßten Entzündungszellen sind die Aussagen über Proliferationsstörungen allerdings eingeschränkt.
Da in den meisten Fällen eine Trennung von Epithel- und Entzündungszellen anhand des Vol/Sca-Dot Plots unmöglich ist, fand deshalb eine indirekte Antikörpermarkierung mit einem Cytokeratin zusätzliche Verwendung: Zuverlässiges Gating der Populationen ermöglicht eine verbesserte, selektive Zellzyklusuntersuchung für Epithelzellen und eine Aussage über Vorliegen/Schwere eines entzündlichen Prozesses.
Die vorgestellte standardisierte Methode bietet wesentliche Zusatzinformationen in der Diagnosestellung sowie in der Nachsorge und wird deshalb seit einem Jahr routinemäßig (über 400 Proben) bei der Betreuung von Blasentumor-Patienten eingesetzt.

MITOCHONDRIEN-AKTIVITÄT UND DNA-GEHALT: METHODISCHE STUDIE

P

M. Löffler, T. Hämmerle, D. Heese, F. Schneider

Institut für Theoretische Medizin, Philipps-Universität Marburg, Karl-von-Frisch-Straße, D-3550 Marburg.

Ziel der Arbeit war die Korrelation zwischen Mitochondrien-Aktivität und Zellzyklusposition von Tumorzellpopulationen.
Als Modell wurden Ehrlich Ascites Tumorzellen verwendet.
Die flußzytophotometrischen Messungen wurden am PAS II (Partec, Schweiz) durchgeführt.
Die zur simultanen Färbung beider Komponenten notwendige Permeabilisierung der Plasmamembran wurde durch schonende Behandlung mit Digitonin erreicht.
Mit Aktivitätsmessungen cytoplasmatischer und mitochondrialer Enzyme wurde die strukturelle und funktionelle Integrität der permeabilisierten Zellen kontrolliert.
Zur selektiven Färbung aktiver Mitochondrien wurde Rhodamin 123 (Johnson et al. 1980) verwendet. Für die Färbung der DNA erwies sich die Kombination von Propidiumjodid/Mithramycin der Kombination von Ethidiumbromid/Mithramycin weit überlegen. Darüberhinaus gestattete die RH 123 Technik keine Verwendung von RNAse.

Zur Erklärung der hier gefundenen Diskrepanz zwischen Ethidium und Propidium wurde ein Computer gestütztes Molecular-Modelling Verfahren für die drei verwendeten Farbstoffe herangezogen.
Die durchgeführte Studie erlaubt weitere Rückschlüsse auf die molekularen Grundlagen der Mitochondrienfärbung mit dem Vitalfarbstoff Rhodamin 123.

Technische Verbesserungen für die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

P

B. Mechtold, C. Göttlinger, S. Miltenyi und A. Radbruch

Institut für Genetik der Universität zu Köln

Zur Optimierung der fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung werden eine Reihe technischer Verbesserungen vorgestellt:

1) Zur Titration der Reagenzien für Immunfluoreszenz, Bestimmung der optimalen Färbeparameter und Bestimmung von Reinheit und Rückgewinnungsrate bei Sortierungen werden einfache durchflußzytometrische Methoden vorgeschlagen.

2) Ein isopygnisches " Sample-Medium " verhindert die störende Sedimentation der Zellen im Applikationsröhrchen bei längeren Sortierungen.

3) Mit Peltier-Elementen haben wir Temperaturblöcke für die Zellen im Applikationsröhrchen und im Auffangröhrchen gebaut. Diese Blöcke sind anderen Kühlvorrichtungen überlegen.

4) Das von uns im letzten Jahr vorgestellte magnetische Zellsortiersysthem MACS wurde inzwischen erfolgreich auch zur Vorsortierung seltener Zellen eingesetzt. Erfahrungen mit MACS werden vorgestellt.

DNA-Zytophotometrie und histologische Klassifikationen beim Magenkarzinom

V

Mellin W, Grundmann E, Böcker W

Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie, Univ. Münster

An 300 histologisch nach Lauren, Ming und der WHO klassifizierten Magenkarzinomen wurde die Frage untersucht, ob und inwieweit zwischen den histologischen Klassifikationen und der zytophotometrisch bestimmten DNA-Ploidie bzw. DNA-Stammlinienheterogenität Korrelationen bestehen. Signifikante Korrelationen fanden sich lediglich zwischen der Lauren-Klassifikation und den zytophotometrischen Daten. Dabei zeigten die intestinalen Karzinome im Mittel höhere DNA-Indizes und eine höhere Stammlinienheterogenität als die diffusen Karzinome. Differenzierte, d.h. tubulopapilläre Karzinomanteile zeigten in der Regel ähnliche, oft identische DNA-Verteilungsmuster wie die undifferenzierten intestinalen Karzinomanteile, was die nahe Verwandtschaft dieser beiden histologischen Erscheinungsformen der intestinalen Karzinome unterstreicht. Andererseits wurden die engen Beziehungen zwischen den diffusen Karzinomen und dem bei ihnen oft vorhandenen Siegelringzellanteil auch zytophotometrisch deutlich. Dabei zeigte die Siegelringzellkomponente meist einen um 0,3 niedriger liegenden DNA-Index als die gewöhnliche diffuse Komponente. Die Ergebnisse lassen ganz deutlich erkennen, daß der an morphologischen Kriterien und der Tumorbiologie orientierten Laurenklassifikation bestimmte Muster der DNA-Verteilung entsprechen. Die intestinalen und diffusen Karzinome müssen somit sowohl aufgrund ihres Phänotyps, als auch aufgrund typischer Veränderungen ihrer DNA (DNA-Verteilungsmuster) als eigenständige Entitäten aufgefasst werden.

"Mikrobiologische Diagnostik mit Hilfe der Durchflußzytometrie".

C.Thomas Nebe, Gerhard Nebe, Werner Nader und Christian Birr
ORPEGEN, Im Neuenheimer Feld 517, 6900 Heidelberg

In den vergangenen Jahren sind nur sehr spärliche Publikationen auf dem Gebiet der mikrobiologischen Diagnostik mittels Flow Zytometrie erschienen. Dies hat eine Reihe von Gründen:

Einerseits sind die technischen Vorraussetzungen bei den meisten kommerziellen (und in den Labors aufgestellten Geräten) nicht vorhanden ("jet in air"). Die apparativen Notwendigkeiten haben wir im vergangenen Jahr an dieser Stelle vorgetragen.

Andererseits sind die kommerziellen Überlegungen eher zurückhaltend, da diese Technik im Vergleich zur klassischen mikrobiologischen Testung (Petrischalen, Bunte Reihe) sehr teuer ist und nur von wenigen Spezialisten kritisch betrieben werden kann.

Eine Einführung in das Gebiet der Mikrobiologie muß also eine Reihe von Vorteilen und Vorraussetzungen aufweisen, um sich gegen konkurrierende auch moderne Verfahren durchsetzen zu können.

Ein Beispiel dafür ist die Diagnostik von Mycobakterien, die relativ langsam wachsen und Bestätigungskulturen oft Wochen oder Monate benötigen. Hier bieten sich sogar Vorteile gegnüber ELISA-Tests wie wir an Hand von Beispielen zeigen werden.

Dieser Vorteil (keine Vorraussetzungen an das Wachstum zu stellen) hat in der Umweltmikrobiologie zu einem erheblichen Interesse an dieser Technik geführt, wo z.B. die Laborbedingungen für die Vermehrung des Organismus oft ungeeignet sind. Auch hierrüber haben wir bereits berichtet und erste Daten gezeigt.

An Hand der technischen Möglichkeiten jedoch lassen sich bereits jetzt die zukünftigen Anwendungsfelder in der medizinischen Mikrobiologie erkennen. So entziehen sich hier beispielsweise Arthritiden verursachende intrazellulär wachsende Symbionten oft der klassischen Routinediagnostik.

Leicht werden die Bedürfnisse in der Lebensmitteltechnologie übersehen, wo verderbliche Ware ständig bakterieller Zersetzung oder einer Kontamination mit pathogenen Keimen (z.B. Listerien) ausgesetzt sind oder Hefen oder Bazillen in dem Herstellungsprozeß eine wesentliche Rolle spielen. Hier können mit einfachen Tests ein Befall entdeckt oder die Qualität von Starterkulturen überwacht und verbessert werden.

Flow Cytometric Analysis of Chromosome Aberrations in Chinese Hamster and Mouse Tumor Cell Clones Obtained from Cells that have Survived Ionizing Radiation

Michael Nüsse[+], Andreas Bartsch[*], Regina Warring[+] and Hans Joachim Egner[*]
[+]GSF-Institut für Biophysikalische Strahlenforschung, Frankfurt/M,
and [*]Institut für Biophysik der Universität Frankfurt/M, F.R.G.

Cells that have survived ionizing radiation can show stable homogeneous and/or numerical chromosome aberrations (aneuploidy) due to radiation induced chromosome rearrangements during division. Because aneuploidy is an important step in neoplastic transformation induced by ionizing radiation, the measurement of aneuploidy in surviving cells is of interest. Flow cytometric analysis of chromosomes in cell clones that have survived ionizing radiation was performed to detect and quantify stable chromosomal aberrations induced in nearly diploid Chinese hamster cells (22 chromosomes per cell) and in hyperdiploid mouse Ehrlich ascites tumor cells (39-40 chromosomes per cell) by ^{60}Co γ-irradiation. Chromosome fluorescence distributions (flow karyotypes) of cell clones obtained from cells that have survived doses between 2 and 15 Gy were compared with flow karyotypes of unirradiated clones. A quantitative analysis of the deviations in the various clones studied was performed by identifying additional and lost chromosome peaks in the flow karyotypes. In Chinese hamster cell clones obtained from an unirradiated culture the number of deviations per clone varied between 0 and 4 deviations (mean value of several experiments: 2.0 deviations per clone). Between 7 and 14 deviations were observed in the flow karyotypes of surviving clones (mean value: 11.2 deviations per clone) after 15 Gy. A linear dose dependency of the mean number of deviations per clone was found. However, only 6 from 18 clones obtained from unirradiated mouse tumor cells displayed deviations in their flow karyotypes. The mean number of deviations per clone was 0.3 compared to 1.0 calculated from the karyotypes of clones obtained from surviving cells after doses between D = 2 and 8 Gy. No dose dependency was found for this endpoint in mouse tumor cells. Most aberrations were found to occur mainly in the smaller chromosomes. Nearly all Chinese hamster cell clones did not show aberrations involving the four largest chromosomes indicating the importance of these large chromosomes for survival after ionizing radiation.

STANDARDISIERUNG DER DNA-MESSUNG

V

F.J. Otto, D. Bartkowiak und G. Stricker
Fachklinik Hornheide, Abteilung für experimentelle Onkologie,
4400 Münster

Die durchflußzytometrische DNA-Messung hat eine hohe Genauigkeit erreicht und in vielen Bereichen, vor allem auch in der Tumordiagnostik und Tumorforschung eine erhebliche Bedeutung erlangt. Der diagnostische und prognostische Wert der Ploidie-Bestimmung wird durch eine Vielzahl von Untersuchungen an den verschiedensten Tumoren bestätigt.
Es ist nun an der Zeit, die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu sichern. Dazu ist eine Standardisierung der Methoden unerläßlich.
Während des Flow-Zytometrie-Symposiums 1988 wurde vorgeschlagen, die von uns vorgestellte Methode der hochauflösenden DNA-Messung als Standardverfahren zu erproben. Daraufhin wurde in der Fachklinik Hornheide ein Kurs über die Präparation, Fixierung, Färbung und Messung von Zellen aus soliden Tumoren durchgeführt. 19 Teilnehmer nahmen die Gelegenheit wahr, die Methoden in der Praxis kennenzulernen. Im Anschluß wurde ein Ringtest vereinbart und vorbereitet. 7 Institute erklärten sich zur Teilnahme bereits und erhielten Teilproben von ausgewähltem Tumormaterial zur Färbung und Messung. Die Ergebnisse des Ringtests zeigen, daß die Übernahme der Färbemethode in anderen Labors keine Schwierigkeiten bereitet. Die Messungen sind reproduzierbar; die Auflösung ist gut. Das Verfahren garantiert eine hohe Genauigkeit in der Erfassung aneuploider Zellinien und in der Ermittlung zellkinetischer Daten. Bisher liegen allerdings nur Meßergebnisse vor, die mit Geräten gewonnen wurden, die eine Quecksilberhöchstdrucklampe als Lichtquelle benutzen.
Eine weitere Erprobung des Verfahrens unter Ausweitung des Teilnehmerkreises und Gerätespektrums ist erwünscht.

DNA MINOR-GROOVE LIGANDS PERTURB CHROMATIN CONDENSATION AND KINETICS OF THE CHROMOSOME CYCLE.

V

Martin Poot, Tomas Haaf, Katrin Kausch,
Julia Köhler and Holger Hoehn
Department of Human Genetics, University of
Würzburg, 8700 Würzburg, West Germany.

Berenil, Netropsin, and Distmycin A are three minor groove binding, AT-specific DNA ligands, which interfere with DNA curvature. To elucidate the involvement of DNA curvature and the putative role of the G2 phase of the chromosome cycle in preparation of mitosis, the effects of these DNA ligands on cell cycle traverse of human diploid fibroblasts were analysed with BrdU/Hoechst flow cytometry. At low doses, all three ligands provoked a protracted response to serum stimulation and a prolongation of the G1 phase of the cell cycle along with an arrest of cells in the preceding G2 compartment. At slightly higher doses, all ligands elicited polyploidisation of chromosomes and at much higher dose they cause undercondensation of the heterochromatic regions of metaphase chromosomes. These results indicate that perturbation of the tertiary structure of DNA induces a disturbance of transit from the G2 phase to mitosis, and highlight the critical role of the DNA minor groove for the formation of fully condensed metaphase chromosomes.

V

DNA-ANALYSE MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE BEIM NIERENKARZINOM: EIN ZUSÄTZLICHER PROGNOSEFAKTOR?

Prosinger,M.; Liedl,Th.; Ganzmann,B.; Jocham,D.

Urologische Klinik und Poliklinik der LMU-München
(Direktor: Prof.Dr.A.G.Hofstetter)

Bei einhundert Patienten mit Nierenkarzinom wurden Proben aus Normal- und Tumorgewebe mit der FCM auf ihren DNA-Gehalt hin untersucht. Die Kernpräparation erfolgte ähnlich der Vindelov-Methode, die Messung am FACS-Analyser, als internen Standart verwendeten wir Hühnererythrozyten.

Ergebnisse

1. Normales Nierengewebe zeigt eine Proliferation von im Mittel 6,2%.
2. Aneuploidie fanden wir nur im Tumorgewebe. In 50% der Proben lassen sich solche Peaks eindeutig von der G0/I Phase separieren.
3. Bei Tumoren mit bekanntem TNM-Stadium und Zellgrading fanden wir Aneuploidie in 38% der GI-,46% der GII- und 80% der GIII-Tumoren.
4. Aufgrund der bekannten Heterogenität der Nierenkarzinome wurden Messungen aus verschiedenen Arealen durchgeführt; ab der 3.Messung ergibt sich jedoch kein weiterer diagnostischer Zugewinn.
5. 50% der Proben ohne nachweisbare Aneuploidie zeigen eine erhöhte Proliferation.
6. Die Messung ist im Routinelabor durchführbar.

V

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG DER PROTEINASE-AKTIVITÄT PHAGOZYTIERENDER ZELLEN

G. Rothe[1], I. Assfalg-Machleidt[2], A. Oser[1], W. Machleidt[2], W.F. Mangel[3], G. Valet[1]

[1]Mildred-Scheel-Labor für Krebszellforschung, Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried

[2]Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München, Goethestr. 33, D-8000 München

[3]Biology Department, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY 11974, USA

Die mikrobizide und tumordestruierende Wirkung phagozytierender Zellen beruht auf der Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetaboliten und der Aktivität proteolytischer Enzyme. Die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten durch stimulierte Phagozyten kann durchflußzytometrisch mit fluorogenen Substraten wie Dihydrorhodamin 123, 2',7'-Dichlorfluoreszin oder Hydroethidin gemessen werden. In dieser Studie sollte die proteolytische Aktivität von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen als neuer durchflußzytometrischer Aktivierungs- und Differenzierungsmarker untersucht werden.

Der intrazelluläre Umsatz von Peptidderivaten des 7-Amino-4-(trifluormethyl)-cumarin (AFC) oder von Dipeptidderivaten des Rhodamin 110 (R110) durch ruhende oder stimulierte humane Leukozyten oder Rattenmakrophagen wurde unter simultaner Gegenfärbung toter Zellen mit 3 mM Propidium Jodid (PI) mit einem FLUVO-II Durchflußzytometer (AFC/PI: Anregung 300 - 400 nm, Emission 420 - 530 / 590 - 750 nm, R110/PI: Anregung 460 - 500 nm, Emission 520 - 550 / 590 - 750 nm) gemessen.

AFC-Derivate wie Z-Arg-Arg-AFC oder Z-Phe-Arg-AFC (10 μM, 15 min, 37°C) wurden von ruhenden Zellen nur geringfügig umgesetzt. Die hohe AFC Fluoreszenz toter Leukozyten und Makrophagen oder lebender *E.coli*-phagozytierender Granulozyten wies auf die Aktivierung von Endopeptidasen nach Zelltod oder nach Phagosom-Lysosom Fusion in lebenden Zellen hin. Der intrazelluläre Umsatz von Z-Arg-Arg-AFC oder Z-Phe-Arg-AFC wurde durch die Inhibitoren DFP (2 mM) oder E-64 (200 μM) nicht gehemmt und konnte daher weder eindeutig den Serin- noch den Zysteinproteinasen zugeordnet werden. Der spezifische Nachweis lysosomaler Zysteinproteinasen wie Kathepsin B war hingegen durch die intrazelluläre Spaltung des nichtfluoreszenten $(Z\text{-}Phe\text{-}Arg)_2$-R110 (10 μM, 15 min, 37°C) zum fluoreszenten Monoamid Z-Phe-Arg-R110 möglich. Eine hohe Kathepsin B-Aktivität fand sich in Makrophagen, eine niedrigere Aktivität in Monozyten, während Granulozyten keine detektierbare Aktivität aufwiesen. Während Z-Arg-Arg-AFC und Z-Phe-Arg-AFC von Nutzen zum Studie der Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten sind, stellt die Messung der Kathepsin B Aktivität mit $(Z\text{-}Phe\text{-}Arg)_2$-R110 einen nützlichen durchflußzytometrischen Marker der Aktivierung und Differenzierung mononukleärer Phagozyten dar.

Gefördert durch DFG SFB 207, Projekt G6.

FLOW CYTOMETRIC MONITORING OF THE RADIATION-INDUCED CELL CYCLE REDISTRIBUTION. **p**

Derk H. Rutgers, Mart A.A.M. Heesters, Chris H.J. Terhaard
University Hospital, Institute for Radiotherapy
Heidelberglaan 100
NL 3584 CX Utrecht

Using flow cytometry, a murine experimental tumour (MS013) was employed to monitor the radiation-induced accumulation pattern of cells in G2-phase of cell cycle after single dose and fractionated irradiation in vivo.
Single doses of 3, 6, 10, 15, and 30 Gy were administered. In control tumours, the fraction of cells in G2+M phase was 6%. With 3 Gy, the accumulation in the radiosensitive G2-phase was maximal (20%) at 12 hours after which it decreased rapidly. With 6 Gy, the maximum level of accumulation (26%) lasted from 12 to 24 hours. With higher doses, accumulation did not reach higher levels but took longer to be maximal. This observation is regarded to reflect the interference of the longer lasting G2-arrest with radiation-induced cell death.
With the scheme of three fractions of 3 Gy, at intervals of 24 hours, the accumulation maximum of the single 3 Gy dose was repeated after each subsequent fraction.
The second of three fractions of 6 Gy, given at 24 hours when the cells were still arrested in G2 by the first fraction, prevented the cells to resume cell cycle traverse and, as a result, accumulation progressed to 35% at 36 hours. After 36 hours the percentage of cells in G2 declined. The third fraction of 6 Gy induced a second wave of synchrony (maximal at 60 hours).
These results illustrate i) the value of flow cytometry in studies of the induction of cell cycle synchrony, and ii) the potential relevance of the radiobiological phenomenon of the cell cycle redistribution in the practice of clinical radiotherapy.

Vorstellung einer neuen Meßmethode zur Detektion der thermalen Denaturierungskinetik der DNA in Metaphasechromosomen in Suspension **v**

R.K.A.Schaller,R.B.Spieß,F.F.Bier,U.Bettag,C.Cremer
Institut für Angewandte Physik I,Universität Heidelberg,FRG

27. Juli 1989

Die Kinetik der thermalen Denaturierung von Metaphasechromosomen in Suspension wurde in situ mittels der Fluoreszenz des Hoechstfarbstoffes 33258 (HO) analysiert.
Die Ergebnisse zeigen, daß HO, wegen der Stabilität des Farbstoffmoleküls und dessen Quantenausbeute bei verschiedenen Temperaturen, eine geeignete Sonde zur Detektion von doppelsträngiger (ds) DNA ist. So ist es möglich, die Konzentration der dsDNA in einer Suspension durch Messung der Gesamtfluoreszenzintensität zu bestimmen.
Fluoreszenz-Denaturierungs-Profile von Kalbsthymus-DNA in SSC sind durchaus vergleichbar mit Messungen der Extinktion.
Die Abnahme des Fluoreszenzsignals mit steigender Tempratur von HO gefärbten Metaphasenchromosomen in Suspension läßt somit Aussagen über Konformationsänderungen der DNA-Struktur (Denaturierung) insitu zu.

Improved flow-cytometry techniques

V

M. Schliermann, Partec GmbH, D-4400 Münster, Hüfferstraße 73-79, W.-Germany

1. Combined laser and arc-lamp excitation

Two lines of commercially available flow-cytometers have been designed for particular applications. One type of FCM uses laser excitation because of the high light intensity at particular wavelengths and the well defined optical geometry for light scatter measurements. The other type of FCM uses light emitted by arc-sources (mercury-, xenon arc-lamps); the advantage of using arc lamps is the high resolution analysis even from morphologically heterogeneous specimen (x- and y-chromosom bearing sperm cells, tumor biopsies). The availability of almost any wavelength for fluorescene excitation esp. in the UV-range as well as low hard-ware and running costs are of aditional advantage.
The aim of the latest development of PARTEC was to design a state-of-the art FCM which combines all the advantages of laser and arc-lamp FCM as well.
This new equipment (PAS III) allows to analyze cells with highest possible accuracy (e.g. DNA -CV ≤ 1 %) together with the detection of weak fluorescence emission (surface markers). The particular design of the optical bench of the PAS III allows dual or three wavelength excitation simultaneously (1). Sorting capability with a unique new closed sorting system is optional (2).

2. Doublet- and coincidence detection

PARTEC has introduced signal-area to peak-height relationship or signal-duration to peak-height relationship for detection of doublets, triplets etc. and for the detection of statistical coincidences in flow-cytometry devices (3,4).
Both procedures turned out to be highly sensitive for the elimination of erroneous events in order to raise the quality of FCM-results.

1) United States Patent No. 4225225 and foreign patents
2) United States Patent No. 4756427 and foreign patents
3) United States Patent No. 4021117 and foreign patents
4) W. Göhde, J. Schumann, J. Früh: Coincidence eliminating device for Pulse Cytometry. In: Pulse Cytophotometry, ed. by W. Göhde et al. European Press, Ghent 1976, p. 79-85

ACR 1000: EIN DURCHFLUSSZYTOMETER DER NEUEN GENERATION

V

SCHMITT Janine.
Flow Cytometry Dept, Bruker, 34 rue de l'industrie, F-67160 Wissembourg

Das ACR 1000 ist ein neuer Durchflusszytometer bestehend aus drei verschiedenen Einheiten:

1. Ein patentiertes optisches Messsystem
2. Ein Datenerfassungsprozessor
3. Ein PC-AT kompatibler Computer der die Darstellung und Verarbeitung von Daten erlaubt dank des FLOWER Software.

Eine Probeentnahme von *20 ul* reicht für jede Messung. Die Probe wird in den Messkopf injiziert durch ein Präzisioneinspritzsystem, um so die Zellzahl pro Volumeneinheit zu erhalten.

Dank seiner Erregunsquelle vom *Ultraviolett* zum *Visibel*, erlaubt das ACR 1000 die Benutzung einer grossen Reihe von Fluorochromen.
Leicht austauschbare optische Filterblöcke für jede Anwendungsgebiete sind erhältlich.

Das ACR 1000 ist sehr leicht zu bedienen mit seinen vorherbestimmten DNA Analyse- und Immunofluoreszenzprotokollen.

Dank einer sehr einfachen Markierungsmethode, durch einen nicht intercalenten Fluorochrom: Mithramycin, wird das ACR 1000 unentbehrlich für die Detektion der Veränderungen des DNA Inhalts in den meisten Geweben.

Einfluß von Isotyp und Spezifität auf die *in vivo* Effekte von monoklonalen Antikörpern gegen den CD3/T Zellrezeptorkomplex

R. Schwinzer, B. Nashan, H. J. Schlitt, K. Wonigeit

Klinik für Abdominal- und Transplantationschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover

P

Für die *in vitro* Effekte von monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen den CD3/T Zellrezeptor (TCR) Komplex ist einerseits ihre Spezifität und andererseits ihr Isotyp von Bedeutung. Mit zunehmender Verwendung von CD3/TCR mAk zur Immunsuppression nach Organtransplantation stellt sich die Frage, welchen Einfluß beide Parameter auf die *in vivo* Effekte von CD3/TCR mAk ausüben. Wir untersuchten daher periphere Blutlymphozyten (PBL) von leber- und herztransplantierten Patienten unter immunsuppressiver Therapie mit den Maus anti-human Antikörpern BMA 031 (IgG2b, anti-α/β TCR) und OKT3 (IgG2a, CD3). Ergebnisse: Die Gabe von OKT3 und BMA 031 führte zu einer deutlichen Verminderung der zirkulierenden Lymphozyten (202±138/µl; 24h nach 1. Injektion) im Vergleich zu Vorwerten (2387±1798/µl). Diese Lymphopenie blieb während der gesamten Therapiephase (7 Tage) bestehen und zeigte etwa ab Tag 2 nach letzter Antikörpergabe deutlich steigende Tendenz. 60-75% der unter Therapie mit BMA 031 noch vorhandenen PBL konnten als B Lymphozyten identifiziert werden ($CD19^+$); 5-20% exprimierten den pan T Zellmarker CD2. Ein vergleichbarer Prozentsatz positiver Zellen wurde nach Färbung mit einem direkt markierten Ziege anti-Maus Ig Antikörper gefunden, was darauf hinweist, daß es unter Therapie mit BMA 031 zu einem "coating" der nicht elimierten T Zellen kommt. Bei etwa der Hälfte der untersuchten OKT3 Patienten wurde ein ähnliches Muster festgestellt. Bei den übrigen OKT3 Patienten wurde eine vorübergehende Modulation (1-3 Tage gegen Ende der Therapie) des CD3/TCR Komplexes beobachtet. Phänotypisch äußerte sich dieser Zustand mit dem Erscheinen von $CD2^+$ Zellen (40-60%) die CD4 oder CD8 exprimierten, nicht jedoch den CD3/TCR Komplex. Schlußfolgerungen: Da sowohl OKT3 als auch BMA 031 in der Lage ist, eine Lymphopenie zu induzieren, scheinen hierfür Isotyp und Spezifität nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu deutet der Befund einer Modulation des CD3/TCR Komplexes ausschließlich bei OKT3 therapierten Patienten darauf hin, daß für diesen Effekt Isotyp und/oder Spezifität des verwendeten Antikörpers von Bedeutung sind. Sollten einige der beobachteten Effekte essentiell für die immunsuppressive Wirkung von CD3/TCR mAk sein, bilden diese Ergebnisse eine wichtige Grundlage zur Auswahl geeigneter mAk für die Immunsuppression.

Redox-Farbstoffe für die Flow-Cytometrie: Vier Tetrazoliumsalze im Vergleich

P

E.Severin, J.Stellmach, C.Wiezorek
Institut für Strahlenbiologie der Universität
4400 Münster

Tetrazoliumsalze (TZ) werden in der Cytochemie zumeist benutzt, um zelluläre Dehydrogenasen nachzuweisen. Wir haben TZ synthetisiert, deren zelluläre Reduktionsprodukte, die Formazane, fluoreszieren. Sie sind deshalb prinzipiell für die Flow-Cytometrie geeignet.

Die physikalischen Eigenschaften von 5 - Cyano - 2,3 - diphenyl-Tetrazoliumchlorid und von drei ähnlichen, am Phenylring substituierten Verbindungen ist aufgelistet.
Die Redoxaktivität (= Gesamtheit der Enzym- und Radikal-Reaktionen, bei denen ein Elektronen- oder Wasserstoffionen-Transfer stattfindet) der EAT-Zellen nach Inkubation mit einem der vier TZ und Gegenfärbung der DNA mit DAPI ist in zweiparametrischen Histogrammen dargestellt.
Drei der vier Tetrazoliumsalze liefern eine detaillierte Fluoreszenz-Verteilung, aus der sich die relative Redoxaktivität der einzelnen Zellen ableiten läßt.

Vereinzelung biochemisch aktiver Zellen aus soliden Tumoren. Bestätigung ihrer Intaktheit durch die zweiparametrische Fluß-Zytometrie der Redoxaktivität. **V**

E.Severin, C.Wiezorek
Institut für Strahlenbiologie der Universität und
Chemisches Landes-Untersuchungsamt NRW, D-4400 Münster

Es gibt zahlreiche Methoden zur Vereinzelung von Zellkernen. Sie liefern zumeist schmale DNA-Verteilungen und beruhen auf einer mechanischen Zerkleinerung des Gewebes und einer anschließenden Proteolyse mit Enzymen oder Detergentien.

Um intakte Zellen zu präparieren, haben wir die beschriebenen Methoden modifiziert. Kriterium für die Unversehrtheit der Zellmembran war die Redox-Aktivität, die mit der fluoreszierenden Tetrazoliumsalz-Formazan-Reaktion flußzytometrisch bestimmt wurde. Als zweiter Parameter wurde die DNA gemessen (Dapi-Färbung).

Am schonendsten ist die Zellpräparation mit Dispase und DNase. Collagenase vermindert die Testreaktion; Trypsin, Pepsin und Detergentien verhindern sie vollständig, indem sie die Plasmamembran schädigen. Rinderserum-Albumin oder inaktiviertes Serum, deren Zufügung zur Stabilisierung von Enzymen in der histochemischen Literatur empfohlen wird, verhindern in einigen Fällen die Anfärbbarkeit der Zellkerne mit DAPI.

Der Vergleich dieses Verfahrens mit dem Trypanblau-Ausschlußtest und mit der Fluorescein-diacetat-Reaktion (FDA-Test) bestätigt seine Empfindlichkeit.

Besteht ein Zusammenhang zwischen Primärfluoreszenz und Redoxaktivität vitaler Zellen nach Bestrahlung? **P**

E.Severin, C.Wiezorek
Institut für Strahlenbiologie der Universität und
Chemisches Landes-Untersuchungsamt NRW, Münster

Die Primärfluoreszenz (300-400 nm) vitaler Zellen und Gewebe steigt nach einer Bestrahlung mit 1-6 Gy um 20% nach einem Tag [1]. Als Ursache dafür werden Steigerungen des Energiestoffwechsels diskutiert, die im Zusammenhang mit einem Einfluß der Strahlung auf die Mitose stehen.

Wir untersuchten, ob die beschriebenen Veränderungen sich in Änderungen der Reoxaktivität widerspiegeln. Die Redoxaktivität können wir auf Einzelzellbasis im Durchflußverfahren (Flow cytometry) messen. Das Tetrazoliumsalz CTC wird von vitalen Zellen an der Zelloberfläche zytochemisch zu einem fluoreszierenden Formazan reduziert, dessen Menge von der zellulären Reduktionskapazität abhängt.

Ganzkörper-Röntgenbestrahlung (5 Gy) von Mäusen mit Ehrlich-Aszitestumoren; Inkubation der Tumoren mit dem Redox-Farbstoff und unterschiedlichen Substratkombinationen; zweiparametrische Fluoreszenzmessung (DNA gegen Formazan).

Die bisherigen Messungen zeigten in den unterschiedlichen Inkubationsansätzen keinen Einfluß der Bestrahlung auf die Redoxaktivität während der untersuchten Zeitspanne. Daher konnten wir keinen Zusammenhang zwischen der durch Bestrahlung gesteigerten Primärfluoreszenz und der Redoxaktivität vitaler Zellen feststellen.

[1] Merkle, K.: studia biophysica 65: 341 f.(1977)

MODULATION VON G2-PHASE-SPEZIFISCHEN CHROMATIN-LÄSIONEN DURCH COFFEIN-BEHANDLUNG MENSCHLICHER LYMPHOZYTENKULTUREN

V

Helga Seyschab, Gisela Bretzel, R. Friedl, D.Schindler
M. Nenadov[1], A. Schinzel[2] und H. Hoehn

Institut für Humangenetik, U Würzburg, F.R.G.,
[1]U Lausanne und [2] U Zürich, Schweiz.

Isolierte Blutlymphozyten von Patienten mit Fanconi Anämie (FA) zeigen nach Stimulierung mit PHA eine spezifische G2-Phasen Läsion. Die defekte G2-Phase bei FA besteht sowohl aus einer Verlängerung der G2-Phasendauer, als auch aus kompletter Arrettierung einzelner Zellen in den G2-Phasen. Diese Störung der Zellproliferation wurde als Reparaturdefekt von DNA-Läsionen interpretiert, hervorgerufen durch erhöhte Sauerstoffempfindlichkeit[1,2]. Die Ratio von G2/G1 Phasen der Lymphozyten von 8 FA-Patienten liegt im Bereich von 1.5-2.2. Im Vergleich dazu zeigen 32 Kontrollpersonen eine G2/G1 Ratio von 0.45±0.32 ($p<0.001$). Diese endogen bedingte G2-Phasen Arretierung von FA-Zellen kann durch Coffein beeinflußt werden: Lymphozyten wurden 22-72 h nach PHA-Stimulierung mit 0.25-3.0mM Coffein behandelt. In den Konzentrationen von 1.5-3.0mM konnte Coffein die spontan erhöhte G2/G1 Ratio in FA auf Kontrollwerte senken, indem die in G2 arretierten Zellen nach mitotischer Teilung die G1-Phase des darauffolgenden Zellzyklus erreichten. Im Gegensatz dazu konnte ein exogen durch Röntgenstrahlung hervorgerufener G2-Phasenarrest in Kontrollymphozyten nur geringfügig reduziert werden. Diese Ergebnisse deuten auf einen unterschiedlichen molekularen Mechanismus für den G2-Phasenarrest in FA und, durch Röntgenbestrahlung induziert, in Kontrollpersonen hin. (1) Schindler D, Hoehn H, Am J Hum Genet 43:429, 1989 (2) Hoehn H et al, in: Fanconi Anemia, TM Schroeder-Kurth et al (eds.) p 161, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1989.

DNA-FLOW-ZYTOPHOTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN AN NEUROENDOKRINEN TUMOREN DES PANKREAS UND DÜNNDARMS

P

B. Sieg[1], A. von Herbay[2], G. Schürmann[3], D. Haag[1]

[1] Inst. für Vergeichende und Experimentelle Pathologie
[2] Inst. für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
[3] Chirurgische Klinik, Universität Heidelberg

Untersucht wurde Tumorgewebe von 8 neuroendokrinen Pankreastumoren (4 benigne, 4 maligne) und von 4 neuroendokrinen Dünndarmtumoren (alle maligne). Einziges Malignitätskriterium war die Sicherung von Metastasen. In allen Tumoren wurden neuroendokrine Zellmarker nachgewiesen. Die Präparation für die Flow-Zytometrie erfolgte an frisch-gefrorenem Tumorgewebe.

Alle benignen Tumoren zeigten diploide DNA-Stammlinien. Von 8 malignen Tumoren wiesen 6 Abweichungen vom diploiden DNA-Gehalt auf. Das waren in 2 Fällen Tetraploidien und in 4 Fällen hypo- bzw. hyperdiploide DNA-Stammlinien. Als Besonderheit fanden sich 2 Tumoren mit hypodiploider Stammlinie.

Nach vorliegenden Ergebnissen stellen neuroendokrine Tumoren des Pankreas und Dünndarms hinsichtlich ihrer Ploidie eine heterogene Gruppe dar. Aneuploidien kommen häufiger vor als bisher beobachtet. Sie traten in unserem Material ausschließlich bei malignen Tumoren auf. Ob sich der Grad der Aneuploidie bei neuroendokrinen Tumoren des Pankreas und Dünndarms als prognostisch relevant erweist und in die Dignitätsbestimmung einbezogen werden kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Entwicklung einer neuen Methode der DNA-DNA in situ Hybridisierung in Suspension von Metaphasechromosomen

V

R.B.Spieß,R.K.A.Schaller,F.F.Bier,U.Bettag,C.Cremer
Institut für Angewandte Physik I,Universität Heidelberg,FRG

27. Juli 1989

Um die Qualität und Ausbeute der in situ Hybridisierung in Suspension von Metaphasechromosomen in Suspension zu verbessern, wurden Metaphasechromosomen in Suspension auf ihr Denaturierungsverhalten in verschiedenen Puffern untersucht. Hierfür wurde in unterschiedlichen Konzentrationen von SSC mit und ohne Formamid die Fluoreszenz des an die Chromosomen gebundenen Fluorochroms Hoechst 33258 bei bestimmten vorgegebenen Temperaturen gemessen.
Aufgrund der hierbei gewonnenen Daten konnten wesentliche Schritte zur Verbesserung der bisherigen Methode der DNA-DNA in situ Hybridisierung von Metaphasenchromosomen durchgeführt werden.

V

M. F. Trendelenburg, M. Montag, H. Tröster, B. Meissner, H. Steinbeißer, H. Spring

Institut für experimentelle Pathologie, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg

Aufgrund des Alternierens extrem unterschiedlicher Chromatin-Organisationszustände während des Zellzyklus werden unterschiedliche Verfahren zur strukturellen Charakterisierung verwandt.

Unsere Arbeitsgruppe befaßt sich vorwiegend mit der Anwendung und Weiterentwicklung von Verfahren zur Strukturanalyse des Interphasechromatins:
1. Chromatinspreitungstechnik für die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).
2. Untersuchung der in situ Organisationsform von Interphasechromatin mittels Video- verstärker Lichtmikroskopie und Confokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM).

Verfahren (1) gibt uns Aufschluß über makromolekulare Strukturparameter eukaryontischer Transkriptions-Komplexe sowie deren Alternieren mit verschiedenartigen Packungszuständen der nukleosomalen Chromatinstruktur.

Verfahren (2) erlaubt eine weitgehend ´ zerstörungsfreie ´ Untersuchung distinkter Gen-Domänen in intakten Zellkernen bei hoher mikroskopischer Auflösung. Hierbei kann die native 3-dimensionale Chromatin-Anordnung durch geeignete Computer-unterstützte Rekonstruktionsverfahren aus seriellen ´ optischen Schnitten ´ dargestellt werden.

DNA-Durchflußzytophotometrie an pflanzlichem Zellmaterial

p

ULRICH Ingunn & ULRICH Wolfgang

Institut für Genetik, Universität Hohenheim, 7000 Stuttgart-70

Die Durchflußzytophotometrie ist in letzten Jahren zunehmend von Interesse für Arbeiten mit pflanzlichem Zellmaterial geworden. Sie wird überwiegend für pflanzenphysiologische Untersuchungen und zum Sorten von fusionierten Protoplasten eingesetzt. Der relativ späte Einsatz der Durchflußzytophotometrie in der Pflanzenforschung ist hauptsächlich durch Schwierigkeiten der Isolierung von Einzelzellen aus der komplexen dreidimensionalen Struktur pflanzlicher Gewebe zurückzuführen.

Zwei Präparations- und Färbemethoden von pflanzlichen Zellen werden dargestellt: Die sog. "Chopping-Methode" für Blatt- und Wurzelspitzenmaterial, sowie die Isolierung und Färbung von intakten Protoplasten aus Blättern. Der Einsatz Basenpaar-bindender Fluorochrome (Chromomycin A_3, Mithramycin, DAPI oder Bisbenzimide) hat sich als optimal erwiesen. Beste Ergebnisse wurden mit "ge-chopptem", unfixiertem Zellmaterial erzielt (CV-Werte um 2%). Auch DNA/Protein-Doppelfärbung unter Verwendung von DAPI bzw. Hoechst-Farbstoffen in Kombination mit Sulphorhodamin 101 sind möglich. Schwierigkeiten bestehen noch bei fixierten Zellen (Protoplasten), weil hier geeignete proteolytische Enzyme fehlen, um Verklumpungen zu verhindern.

Anwendungsgebiete der Durchflußzytophotometrie in den Pflanzenforschung scheinen noch nicht absehbar, dennoch bedeutet der Einsatz der Technik einen Fortschritt gegenüber bisherigen langwierigen Untersuchungen. Vor allem in der Pflanzen- und Saatzucht wären schnell Aussagen über homo- und heterogene DNA-Verteilungen oder Ploidiegradbestimmungen möglich. Die Ausarbeitung neuer Testsysteme unter Verwendung der Durchflußzytometrie, wie am modifizierten Allium-Test gezeigt, ergäbe Informationen über die Wirkung exogener Faktoren auf pflanzliche Organismen, z.B. von in der Landwirtschaft verwendeten Substanzen (Düngemittel, Pestizide, Unkrautvertilgungsmittel etc.).

Anwendung der Flow-Zytometrie als analytische zytogenetische Methode in der biologischen Grundlagenforschung

v

ULRICH W.[1], ULRICH I.[1], HOGH-JANOVSKY K.[1], FRITZ J.P.[2] & FRITZ B.[1]

[1] Institut f. Genetik, Universität Stuttgart-Hohenheim
[2] Zoologisches Museum Alexander Koenig, Bonn

Die Flow-Zytometrie hat sich als analytische Methode in medizinischen Fachdisziplinen durchgesetzt. In der biologischen Forschung mit ihren klassischen Fächern der Botanik und Zoologie konnte sie sich bisher nicht richtig etablieren. Ursachen dafür sind sowohl die geringen finanziellen Mittel dieser Forschungszweige, die eine Anschaffung teurer Geräte verhindern; als auch eine weitreichende Unkenntnis der Flow-Zytometrischen Technik. An Beispielen von DNA-Untersuchungen mit zoologischen und pflanzlichen Objekten soll gezeigt werden, daß die Flow-Zytometrie als analytische Methode durchaus Anwendung in der biologischen Grundlagenforschung finden kann.

Der DNA-Gehalt homologer Gewebe ist für jede Spezies als Genomkorrelierter Faktor eine feste Größe. Flow-Zytometrische DNA-Analysen konnten als zusätzlicher Marker zur taxonomischen Einordnung von Amphibien- und Reptilienspezies herangezogen werden. Untersuchungen an Kaulquappen des Krallenfrosches *Xenopus laevis* unterschiedlicher embryonaler Entwicklungsstadien ergaben eine Zunahme des DNA-Gehalts, die in Zusammenhang mit speziellen Differenzierungsvorgängen steht. Korrekte Verabreichung des Hormons Choriogonatropin, das zum Ablaichen der Tiere verwendet wird, führte zu genetisch einheitlichen, diploiden Organismen. Eine Überdosierung des Sexualhormons ergab neben phänotypisch erkennbaren Veränderungen auch genotypische Abweichungen bei noch lebensfähigen Kaulquappen. Aneuploide und triploide Formen konnten erfaßt werden.

Entwicklungsphysiologisch bedingte Veränderungen der DNA-Zusammensetzung wurden bei Untersuchungen an Diptera-Arten *(Chironomus* und *Drosophila)* nachgewiesen werden. Diese Tiere, die klassischen Objekte der Allgemeinen Genetik, besitzen deutlich Anteile von aneuploiden und polyploiden Zellpopulationen innerhalb des Organismus. Das DNA-Verteilungsmuster der Tiere ändert sich während der Entwicklung von der Larve über die Puppe bis zum Imago.

Während bei Untersuchungen von tierischem Zellmaterial die allgemein üblichen Präparations- und Färbetechniken verwendet werden konnten, war bei pflanzlichem Zellmaterial die Schwierigkeit der Einzelzellisolierung aufgrund der starren komplexen, dreidimensionalen Struktur zu überwinden. Durch mechanisches Zerkleinern oder über die Protoplastenisolierung konnte pflanzliches Zellmaterial der durchflußzytophotometrischen Analyse zugeführt werden. Auch zellkinetische Untersuchungen mit pflanzlichem Zellmaterial sind möglich, wie an Wurzelspitzen von Allium cepa (sog. Allium-Test) gezeigt.

Flow-zytometrische Untersuchungen des apoptotischen Zelltods bei hämatopoetischen Zellen

ULRICH Wolfgang, HOGH-JANOVSKY Klaus & FRITZ Barbara

Institut für Genetik, Univeristät Hohenheim, 7000 Stuttgart-70

p

Der zelluläre Tod wird durch zwei fundamentale Mechanismen verursacht: *Nekrose ("accidantal death")* oder *Apoptosis ("programmed cell death")*. Die Nekrose ist mit einer biochemischen und strukturellen Degeneration verbunden, während der Zelltod durch Apoptosis mit einer frühen endonukleolytischen Fragmentierung zellulärer DNA als Folge einer spezifischen Genexpression einhergeht. Apoptosis wurde als Hauptursache des Zelltodes solider Tumoren beschrieben, und konnte nach Hormonbehandlung und Bestrahlung lymphoider Zellen sowie in Targetzellen der T-Lymphozyten gebundenen Cytolysis beobachtet worden.

Das Auftreten apoptotischer Zellen, die einen geringeren DNA- aber höheren Protein- und RNA-Gehalt als die Massenzellpopulation aufweisen, konnte durchflußzytophotometrisch bei einer hämatopoetischen T-Zell-Leukämielinie (MOLT-4) nach Behandlung mit nicht-toxischen Pflanzenextrakten und nach Applikation geringer Dosen von Zytostatika nachgewiesen werden. Verschlechterung der Zellkulturbedingungen (Streß) förderte das Auftreten der Zellen mit geringerem DNA-Gehalt. Eine Induktion von apoptotischen Zellen durch Glycocorticoid-Behandlung konnte weder bei MOLT-4 Zellen noch bei einer Erythroleukämiezellinie (K-562) bewirkt werden. Lediglich bei normalen Lymphozyten aus peripherem Blut war eine Hormonbehandlung erfolgreich. Die antagonistische Wirkung von Zink-Ionen auf die Induzierung apoptotischer Zellen nach Einfluß von Glycocrticoiden war nicht nachvollziehbar. Im Gegenteil, die Verabreichung des synthetischen Hormons Dexamethons und $ZnSO_4$ bei MOLT-4 Zellen erzeugte deutlich eine Zellpopulation mit geringerem DNA- und höherem Proteingehalt. Normal kultivierte, unbehandelte MOLT-4 Zellen besitzen einen konstanten Anteil von 3-5% solcher Zellen. Hochauflösende durchflußzytophotometrische Analysen ergaben sogar bis zu drei Zellpopulationen mit weniger DNA. Der zelluläre Debris entspringt stets aus den Zellen mit weniger DNA. Die Fragmentierung der zellulären DNA im Verlauf des apoptotischen Mechanismus könnte demzufolge über mehrere Schritte ablaufen.

CYTOSTATIKATESTUNG MIT HILFE VON MUSTERN ZELLULÄRER FUNKTIONS-EIGENSCHAFTEN

V

G.Valet, K.Trevorrow, G.Wulf, T.Lampidis
Max-Planck-Institut für Biochemie, 8033 Martinsried und Dep. Oncology, Univ.Miami School of Medicine, Miami, Fl 33136, USA

Die durchflußcytometrische Bestimmung funktioneller Zelleigenschaften wie intrazellulärer pH Wert, Calcium, Transmembran- und Mitochondrienpotential, H_2O_2 und O_2^-, Glutathion und freien Protein SH-Gruppen, der Oberflächenladungsdichte sowie von Enzymaktivitäten wie z.B. der Esterase, Myeloperoxidase oder Kathepsin B, vermitteln einen detaillierten Einblick in den metabolischen, Erregungs-, Energie-, Oxidations- und Reduktions-, Oberflächen- und enzymatischen Zustand lebender Zellen.

Das multifunktionelle Eigenschaftsmuster von Krebszellen ändert sich in charakteristischer Weise bei Behandlung mit cytostatischen Medikamenten. Unsere Untersuchungen zeigen, daß z.B. die Resistenz von Zellen gegen Anthracyclin-Cytostatika mit niedrigen Transmembran- und Mitochondrienpotentialen verbunden ist. Die Herstellung von lipophileren Anthracyclinverbindungen könnte wahrscheinlich den **Influx** des Cytostatikums in die Zellen erhöhen und damit seine Wirksamkeit steigern. Im Gegensatz dazu erfordet die von anderen betriebene Hemmung des p-Glykoproteins, welches den **Efflux** der Anthracycline fördert, eine zusätzliche Belastung des Patienten mit potentiell toxischen Substanzen. Diese ist bei Verfolgung der ersteren Strategie **nicht** der Fall.

Dinalin (4-amino-N-(2-aminophenyl)-benzamid) ist im Tiermodell gegen langsam wachsende colo-rektale Tumoren und myeloblastische Leukämien wirksam, wenig toxisch und deshalb von potentiellen Interesse für die Anwendung beim Menschen. Da die Substanz keine der bisher bekannten Cytostatikaklassen angehört, ist die Aufdeckung des Wirkunsgmechanismus von Wichtigkeit.

Doxorubicin empfindliche (FL) und resistente (ARN) Friend Leukämiezellen der Maus wurden mit 2 und 20ug/ml Dinalin inkubiert. Das Zellwachstum in beiden Zellinien war von 8h bis 24h durch Arretierung der Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzyklus reversibel blockiert. Danach begannen die Zellen abzusterben. Intrazellulärer pH Wert, Esterasekonzentration, Mitochondrienpotential und Zellvolumen der überlebenden Zellen verminderten sich, während das Transmembranpotential bis 96h zunahm.

Der Wachstumsblock und die Wirksamkeit des Dinalins gegen Doxorubicin resistente Zellen sind von Interesse für weitere experimentelle Untersuchungen.

Identifizierung von Lymphozytensubpopulationen mit zytotoxischer Aktivität nach kontinuierlicher intravenöser Injektion von Interleukin 2.

E. Weidmann, S. Christ, P. Hechler, L. Bergmann, P.S. Mitrou
Abteilung für Hämatologie, Zentrum der Inneren Medizin, Klinikum der J.W. Goethe-Universität, Frankfurt/M

Neben einer Vielzahl an biologischen Effekten bewirkt Interleukin 2 (IL-2) invitro und in vivo die Aktivierung zytotoxischer Lymphozyten, die in der Lage sind, ein breites Spektrum von Tumorzellen zu lysieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zytotoxische Lymphozytensubpopulationen anhand der Expression von Oberflächenantigenen nach Abschluß einer IL-2 Therapie zu definieren. Dazu wurden definierte Lymphozytensubpopulationen 24 Stunden nach Beendigung der kontinuierlichen IL-2 Applikation mit Hilfe der Flowzytometrie isoliert und mit dem Chrom 51 release assay gegen die Tumorzellinien K562 und Daudi auf ihre zytotoxische Aktivität getestet. Die Reinheit der isolierten Lymphozytensubpopulationen war $\geq$ 95%.

Hohe zytotoxische Aktivitäten wurden in der Population der non-T-non-B-Zellen ($CD3^-CD19^-$) gefunden. Auch die gesamt T-Zellpopulation ($CD3^+$), sowie die $CD8^+$ Subpopulation, waren in der Lage Tumorzellen zu lysieren; die Population der $CD4^+$-Zellen wies keine wesentliche zytotoxische Aktivität auf. Untersucht wurden weiterhin NK-assoziierte $NKH1^+$ ($CD56^+$) Zellen, die nach IL-2 Therapie erhebliche Lyseraten zeigten. Als weitere Populationen mit zytotoxischer Aktivität wurden $CD3^+NKH1^+$ und $CD8^+NKH1^+$ Zellen identifiziert. Keine wesentliche Lyse von Tumorzellen wurde bei $CD3^+NKH1^-$ und $CD8^+NKH1^-$ Zellen induziert. Zusammenfassend werden nach IL-2 Therapie zytotoxische $NKH1^+$ Zellen induziert, die zum Teil der non-T-non-B-Zellpopulation angehören, zum Teil aber auch T-Zellantigene exprimieren.

Generation of highly specific DNA and RNA probes for *in situ* hybridization by primer directed enzymatic *in vitro* amplification.

Heinz-Ulrich Weier, Caridad Rosette, Frank Dolbeare, Maria Pallavicini and Joe Gray
Biomedical Sciences Division, L-452, University of California, Lawrence Livermore National Laboratory, PO Box 5507, Livermore, CA 94550, USA.

We present the generation of specific nucleic acid probes utilizing the polymerase chain reaction (PCR) and use of synthetic probes for *in situ* hybridization. PCR is applied for rapid synthesis of templates for transcription by phage RNA polymerases and/or labeled DNA probes with defined length and nucleotide sequence, thus eliminating much of the effort required for molecular cloning and probe labeling by nick translation or random priming. We detail strategies for probe synthesis and labeling and show application of probes for localization and quantitation of murine c-myc proto-oncogene segments and intracellular mRNA in a recombinant CHO cell line. Different specific RNA and DNA probes were labeled with either biotin or sulphur and have been hybridized *in situ* with cells and chromosomes on microscope slides as well as with cells in suspension. Labeled DNA or RNA is detected with fluorochrome conjugated avidin or specific antibodies. Due to their excellent specificity and high density of reporter molecules on relatively small molecules PCR generated probes might be very useful for application in flow cytometry and sorting.

Die Synthese spezifischer Nukleinsäureproben mit Hilfe von *in vitro* DNA Amplifikation und deren Anwendung in *in situ* Hybridisierungen wird vorgestellt. Die Methodik erlaubt eine effiziente Synthese von Nukleinsäuren mit definierter Länge und Nukleotidsequence und ersetzt zeit- und arbeitsintensive Methodiken basierend auf rekombinanter DNA Technologie. Am Beispiel verschiedener Proben für Exon- und Intronbereiche des murine c-myc Proto-Oncogens werden Synthesestrategien und Markierungen mit Biotin oder Schwefel dargestellt. Zur Untersuchungen der Genexpression in einer rekombinanten CHO Zellinie wurden verschiedene Proben mit Spezifität für c-myc DNA und mRNA eingesetzt, wobei Hybridisierungen sowohl mit Zellen oder Chromosomen auf Objekträgern als auch in Suspension durchgeführt wurden. Die Detektion markierter Nukleinsäureabschnitte nach Hybridisierung erfolgt mit fluorochrome-konjugiertem Avidin oder spezifischen Antikörpern. Aufgrund ihrer ausgezeichneten Spezifität und hohen Dichte von Reportermolekülen bei gleichzeitig geringer Größe erscheinen *in vitro* synthetisierte Nukleinsäureproben vielversprechend für Anwendungen in der Durchflußzytometrie.

Work performed under the auspices of the U.S. Department of Energy by the Lawrence Livermore National Laboratory under contract number W-7405-ENG-48 with support from USPHS grant HD17665.

Differentielle Expression von MHC Klasse-II Antigenen auf *in vivo* aktivierten humanen CD8⁺ T-Lymphozyten

P

M.Winkler, R.Schwinzer, U.Dreikhausen, K.Wonigeit

Klinik für Abdominal- und Transplantationschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover

HLA-Klasse-II Moleküle sind hochpolymorphe Membran-Glykoproteine, die von Genen innerhalb der HLA-D Region auf Chromosom 6 kodiert werden. Drei verschiedene Subregionen (HLA-DP, -DQ und -DR) konnten identifiziert werden, welche für drei mittels spezifischer monoklonaler Antikörper differenzierbare Isotypen kodieren. Während Makrophagen und B-Zellen konstitutiv Klasse-II Moleküle exprimieren, sind sie auf T-Zellen nur nach Aktivierung nachweisbar. Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, ob *in vivo* aktivierte T-Zellen in der Lage sind, selektiv HLA-DP, -DQ oder -DR zu exprimieren. Hierzu wurden $CD8^+$ PBL von 60 leber- oder nierentransplantierten Patienten mit akuter Abstossung oder CMV-Infektion auf Koexpression der verschiedenen Klasse-II Isotypen untersucht. Ergebnisse: Mittels 2-Farben Fluoreszenz konnten bei nahezu allen (95%) Patienten DP^+CD8^+ PBL nachgewiesen werden. DR^+CD8^+ PBL waren bei 90% der Patienten nachweisbar, während DQ^+CD8^+ PBL nur bei 27% der untersuchten Patienten gefunden wurden. Eine Expression von HLA-DQ auf $CD8^+$ Zellen konnte nur bei Patienten gezeigt werden, deren $CD8^+$ Zellen auch zu einem hohen Prozentsatz DP und DR exprimierten. Die Frage nach dem Koexpressionsverhalten von DP und DQ auf $CD8^+$ Zellen wurde unter Verwendung von Mischungsansätzen und mit der 3-Farben Fluoreszenz untersucht. Dabei konnten alle vier möglichen Phaenotypen abgegrenzt werden: DP^+DR^+, DP^+DR^-, DP^-DR^+ und DP^-DR^- Zellen. Dieses deutet auf eine lokusspezifische Regulation der Expression bon DR und DP. Interessanterweise wiesen Transplantat-Abstossungen bei Patienten mit vorwiegendem Nachweis von DP^+DR^+ oder DP^-DR^+ $CD8^+$ PBL zum Zeitpunkt der Diagnose eine deutlich ungünstigere Prognose auf als Abstossungen mit vorwiegendem Nachweis von $DP^+DR^-CD8^+$ PBL. Schlussfolgerung: *In vivo* aktivierte $CD8^+$ PBL sind in der Lage, selektiv nur einzelne Klasse-II Isotypen zu exprimieren. Ob die abgrenzbaren Phaenotypen Klasse-II positiver Zellen Ausdruck einer sequentiellen Expression der verschiedenen Klasse-II Isotypen während unterschiedlicher Aktivierungstadien sind, oder auf unterschiedliche Aktivierungsbedingungen zurückgeführt werden können, wird zur Zeit untersucht.

Nachweis von S_0-Zellen in vitro und in vivo mit Hilfe zweidimensionaler Durchflußzytometrie

P

F. Zölzer[1], E. Budach[2] und C. Streffer[1]
Institut für Medizinische Strahlenbiologie[1] und Strahlenklinik[2] der Universität - Gesamthochschule - Essen, Universitätsklinikum, Hufelandstraße 55, 4300 Essen

Zweidimensionale Durchflußzytometrie mit PI-Färbung und anti-BrdUrd/FITC-Markierung erlaubt die Korrelation von DNA-Gehalt und DNA-Synthese-Leistung der untersuchten Zellen. Dabei zeigen oft auch solche Zellen, die sich ihrem DNA-Gehalt nach in der S-Phase des Zyklus befinden sollten, keinen BrdUrd-Einbau. Der Anteil dieser Zellen nimmt in vitro nach Bestrahlung, Hyperthermie und Kombination beider Behandlungsmodalitäten deutlich zu. Gleiches gilt im Falle xenotransplantierter menschlicher Tumoren auf der Maus nach fraktionierter Bestrahlung.
Bei früheren Untersuchungen in vitro hatte man entsprechende Variationen des ^{3}H-Thymidin-Markierungsindexes bei Zellen gefunden, die aufgrund ihres DNA-Gehalts der S-Fraktion zuzuordnen waren (Streffer et al., Br. J. Cancer 41 (1980) 205). Ein Vergleich aller jetzt vorliegenden Daten läßt den Schluß zu, daß der Effekt nach fraktionierter Behandlung weniger stark ausgeprägt ist.

Hybridocytochemistry with Fluorochromes as Reporter Molecules: State of the Art

V

M. van der Ploeg
Dept. of Cytochemistry and Cytometry, Leiden University.

Hybridochemistry of IN SITU hybridization facilitates the localization of specific nucleic acid sequences (DNA as well as RNA) both in microscopic slides and in flow cytometric preparations.

During recent years several non-isotopic hybridization procedures were developed having -in principle- all the same sensitivity. Recently, direct procedures using fluorochrome-labeled oligonucleotide probes have raised a lot of interest because of improved accessibility of the target and a relatively better signal to noise ratio due to a low background staining.

Another development that even more enhanced the applicability of ISH is the production of so-called "composite" probes consisting of a cocktail of sequences specific for one individual chromosome.

Hybridocytochemical procedures can be combined with immunocytochemistry to enable the detection of genes and gene products simultaneously.

The availability of different procedures, some of which are commercially available, allows the detection/localization of several targets (in different colors) simultaneously.

At this moment the localization of single gene targets as small as 2 Kb is possible using hybridocytochemical procedures with fluorescent endproducts.

All these developments have enhanced the value of ISH as a perfect tool for morphologic analysis necessary for a.o. gene localization, detection of numerical or structural gene aberrations in metaphase cells or interphase nuclei; identification of marker chromosomes in different types of cancers; 3-D topography of chromosomes in interphase nuclei; viral diagnosis but also for cell differentiation studies.

Coulter EPICS Ⓐ ELITE

V

Coulter Electronics GmbH, Krefeld, West Germany

Das neue EPICS Ⓐ Elite-System ist ein Durchflußzytometer mit Zellsorter, das nach einer völlig neuartigen Konzeption entwickelt ist. Durch die Kombination technischer Neuheiten mit einem Modul-System, das auf Industriestandards basiert, kann das EPICS Ⓐ ELITE-System auch als Multi-User-System Anwendung finden.

- Luftgekühlte Argon- und Neon-Helium-Laser mit niedrigem Energieverbrauch vereinfachen die Installation und Wartung und tragen wesentlich zur Reduktion von Folgekosten bei.
- Die Coulter Sort Sense Durchflußzelle erzielt eine extrem hohe Sensitivität mit weniger als 1000 FITC Molekülen.
- Durch die Anwendung eines neuen Koinzidenzschaltkreises werden bessere Sort-Gewinnungsraten erzielt.
- Ein installiertes Video-System ermöglicht die Überwachung des Sort-Vorganges.
- Zur Datenverarbeitung wird ein IBM kompatibler Computer mit MS-DOS-Betriebssystem und 85 MB Speicherkapazität verwendet.
- Farbsoftware erleichtert die optische Differenzierung der Daten auf dem Bildschirm.

Das Coulter EPICS Ⓐ ELITE-System wird insbesondere durch die Berücksichtigung aller Details höchsten wissenschaftlichen Ansprüchen gerecht.