Abstracts

dkfz

zum 3.
Heidelberger Flow-Zytometrie Symposium

Heidelberg, 18. bis 20. Oktober 1990

im
Kommunikationszentrum des
Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg

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

Organisatoren

Klaus Goerttler
Michael Stöhr

VORTRÄGE
Sitzungen I - VI

Mehrfarben-Flow-Zytometrie zur Analyse der Subpopulationen von Lymphozyten

Diether J. Recktenwald, Chia Huei Chen

Becton Dickinson Immunocytometry Systems,
2350 Qume Drive, San Jose CA 95131-1807, USA

Die Kombination von Antikörperkonjugaten biologischer Pigmente wie Phycoerythrine (PE), Phycocyanine (PC) und allo-Phycocyanine (aPC) mit Konjugaten herkömmlicher Fluoreszenzfarbstoffe wie Fluoreszein (FITC) und Texasrot (TxR) erlaubt die routinemäßige gleichzeitige Bestimmung von drei oder mehr Zellkomponenten durch Immunofluoreszenzmessungen mittels Durchflußzytometrie. Mit Zweilasersystemen sind Messungen von vier oder mehr Fluoreszenzfarben mit einfachen Antikörperkonjugaten von FITC, PE, PC, und aPC möglich. Einlasersysteme mit einem 488nm Argonionenlaser benutzen FITC, PE, PerCP oder komplexe PE-tandemkonjugate für die simultane Analyse von drei oder mehr Fluoreszenzfarben. Die Auswahl der idealen Farbkombination erfordert Information über die Molekulargewichte der Antikörper und Pigmente, über die Fluoreszenzanregungs- und -emissionsspektren und über die erforderliche Meßempfindlichkeit. Besonders die PE-tandemkonjugate haben ein hohes Molekulargewicht und breite Emissionsspektren, die hohe Spektralkompensationseinstellungen am Instrument erfordern; anderseits werden mit diesen und direkten PE-konjugaten die höchsten Meßempfindlichkeiten erzielt.

Für Durchflußzytometer mit 488nm Anregung sind die Kombinationen von FITC und PE oder FITC und PerCP ideal. Dabei kann die Kombination von FITC und PerCP in den meisten Fällen ohne Zweifarbenkompensation benutzt werden; die Kombination FITC und PE erlaubt empfindlichere Messungen mit dem PE-konjugat. Für die Dreifarbenanalyse minimiert die Kombination von FITC, PE und PerCP die Mehrfarbenkompensation; die Benutzung von PE-Tandemkonjugaten ergibt höhere Meßempfindlichkeiten.
Mit gewissen Einschränkungen können alle Antikörperkonjugate für eine annähernde quantitative Bestimmung von zellulären Bestandteilen eingesetzt werden. Die Kalibrierung für quantitative Messungen erfolgt durch direkte Titration oder durch fluoreszierende Mikropartikel mit bekannter Masse an Fluoreszenzfarbstoff.

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF DISTINCT CD16$^+$ LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PERIPHERAL BLOOD

P. Uciechowski, R. Leo, J. Schubert, and R.E. Schmidt

Abt. Immunologie und Transfusionsmedizin, Zentrum Innere Medizin, Medizinische Hochschule Hannover, Konstanty-Gutschow Str. 8, 3000 Hannover 61, FRG

CD16 is the low affinity Fcγ receptor III and mainly expressed on CD56$^+$ (NKH1) CD3/T cell receptor (TCR)$^-$ Natural Killer (NK) lymphocytes of peripheral blood. CD16 (FcγRIII) on human peripheral blood lymphocytes of a normal donor displayed two major distinct CD16$^+$ subsets. These lymphocyte subpopulations expressed CD16 with low or bright density (CD16^{dim}, CD16^{bright} cells). Lymphocytes from normal donor single colour histograms usually display one CD16$^+$ population. In two colour analysis both CD16$^+$ subsets expressed CD56 in identical density. When comparing CD16^{dim} and CD16^{bright} subpopulations in expression of CD3 and TCR antigens the CD16^{dim} lymhocytes were found to be positive for these antigens. CD16^{bright} cells lacked T cell antigens. Within the CD3$^+$ CD16^{dim} subset 20% coexpressed the γ/δ TCR. The other cells were α/β TCR$^+$. In addition CD16^{dim} lymphocytes expressed CD8 in high density, CD16^{bright} cells did not react with CD8 mAb with the exception of a very small CD8^{dim} subset. Both CD16$^+$ subsets were positive for CD2, CD11a,b, CD18 but CD4 negative. To investigate the status of activation of both subsets several mAb against activation antigens (CD2R, CD25, CD26, p75/IL-2R, HLA-DR) were used. There was a difference in expression of p75/IL-2R and CD2R (T11 $_3$) molecules of both subsets. Whereas all CD16^{bright} cells expressed the p75 chain of the IL-2 receptor, CD16^{dim} cells lacked this marker. On the other hand, CD16^{dim} lymphocytes were CD2R$^+$ but only 30% CD16^{bright} cells were also positive stained. CD16^{dim} and CD16^{bright} clones generated from PBMC of this donor reflected phenotypes of the respective subsets of peripheral blood. Functional studies will reveal the physiologic role of differentially expressed CD16 antigens.

DIFFERENT ANTIGEN EXPRESSION IN PERIPHERAL CD16⁻ AND CD16⁺ NATURAL KILLER (NK) CELLS OF BONE MARROW TRANSPLANT PATIENTS.

Jacobs R, Leo R, Hinrichs G, Kemper A, Uciechowski P, Stoll M, Schmidt RE.

Abteilung Klinische Immunologie, Medizinische Hochschule Hannover, Konstanty-Gutschow-Str. 8, 3000 Hannover 61, FRG

In order to investigate human NK cells in an early reconstituting immune system, we studied peripheral blood lymphocytes during the follow up of bone marrow transplant patients (pts). In about 30% of these pts we were able to detect an additional distinct NK cell population during the early phase of reconstitution. These cells were extensively characterized by FACS analysis, and found to be $CD3^-$ $CD56_{bright}^+$ $CD16^-$. NK cells in healthy volunteers are $CD3^-$ $CD56_{dim}^+$ $CD16^+$. Moreover this new NK set coexpressed a broad panel of activation antigens. Some of these proteins are exclusively expressed on this NK subpopulation but not on normal NK cells: CD26, CD2R and the p75 chain of the IL-2 receptor. In contrast neither one of both NK cell types were positive for the CD25 antigen. Moreover preliminary functional results have been obtained with cells sorted corresponding to their different density of CD56 antigen expression using a FACSstar cell sorter. Highly purified $CD56_{bright}^+$ NK cells are as potent as $CD56_{dim}^+$ cells in TNFα and IFNγ production but essentially less active in NK killing (vs K562) and ADCC. Prior investigations concerning NK cells in pts during interleukin-2 (IL-2) therapy and observations in children with immune deficiency syndromes revealed a similar NK cell profile. Therefore we conclude that this new NK subset appearing under in vivo activation conditions might be a precursor pool for mature peripheral blood NK cells.

DETERMINATION OF HEMOPOIETIC PROGENITOR CELLS IN PERIPHERAL BLOOD BY MULTIPARAMETER FLOW-CYTOMETRY AND CD34-MONOCLONAL ANTIBODY

STEFAN SERKE, SABINE SÄUBERLICH, DIETER HUHN

UNIVERSITÄTSKLINIKUM RUDOLF VIRCHOW-CHARLOTTENBURG
ABTLG.INNERE MEDIZIN UND POLIKLINIK, HÄMATOLOGIE-ONKOLOGIE
1000 BERLIN 19, SPANDAUER DAMM 130, HAUS 5

HEMOPOIETIC PROGENITOR CELLS ARE PRESENT IN PERIPHERAL BLOOD AND BY MEANS OF IN VITRO COLONY-ASSAYS THEIR NUMBER HAS BEEN ESTIMATED TO BE ABOUT 1000 PER 1.0 ML OF WHOLE BLOOD. THE CD34-ANTIGEN IS PRESENT ON ALL IN VITRO COLONY-FORMING CELLS. USING THE CD34-MONOCLONAL ANTIBODY MY-10 AND MULTIPARAMETER FLOW-CYTOMETRY WE HAVE STUDIED THE $CD34^+$-CELLS FROM HUMAN ADULT PERIPHERAL BLOOD. STUDYING 20 HEALTHY INDIVIDUALS, A MEAN NUMBER OF 1900 $CD34^+$-CELLS PER 1.0 ML OF WHOLE BLOOD WAS DETERMINED. PERIPHERAL BLOOD $CD34^+$-CELLS ARE ALMOST IDENTICAL TO BONE MARROW $CD34^+$-CELLS WITH REGARD TO THEIR LIGHT SCATTER CHARACTERISTICS, BUT THEY DIFFER SUBSTANTIALLY WITH REGARD TO THE COEXPRESSION OF THE CD19- AND CD33-ANTIGEN. DETERMINATION OF NUMBERS OF CIRCULATING $CD34^+$-CELLS PROVED TO BE USEFUL FOR OPTIMAL TIMING OF HARVEST OF PERIPHERAL BLOOD HEMOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS IN PATIENTS UNDERGOING HIGH-DOSE CHEMOTHERAPY WITH SUBSEQUENT AUTOLOGOUS REINFUSION OF CRYOPRESERVED PERIPHERAL BLOOD STEM/PROGENITOR CELLS.

7A5 - A NEW MONOCLONAL ANTIBODY WHICH RECOGNIZES THE γδ T CELL RECEPTOR ON HUMAN γδ+ T CELLS.

OTTMAR JANSSEN[1], GERHARD MOLDENHAUER[2], AND DIETER KABELITZ[1]

[1]Institute of Immunology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 305, and German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, D-6900 Heidelberg, Federal Republic of Germany.

By immunizing Balb/c mize with cloned human γδ+ T cells , we were able to generate a monoclonal antibody (mAb, termed 7A5) which recognizes the γδ-T cell receptor on a major fraction of human peripheral blood γδ+ T cells.
Double-fluorescence analyses on freshly isolated double-negative (DN, for the most part γδ+) human T lymphocytes revealed that our antibody 7A5 identifies a similar epitope as does the well characterized mAb TiyA directed against a $V_{\gamma 9}J_PC_{\gamma 1}$ epitope (1). Thus, 7A5 and TiyA double-stained identical cell populations. In addition, most but not all 7A5+ DN cells also reacted with mAb BB3 which identifies a $V_{\delta 2}$ epitope (1,2), whereas 7A5+ and δTCS-1+ (i.e. $V_{\delta 1}$+, 1) cells were almost mutually exclusive subsets of CD4-CD8- peripheral blood T cells. In addition, mAb 7A5 and TiyA precipitated molecules with identical molecular weights from the surface of a fetal γδ+ T cell clone.

1) Triebel, F. et al. (1988), J. Exp. Med. 167:694
2) Ciccone, E. et al. (1988), J. Exp. Med. 168:1

Flow cytometric analysis of B cell proliferation in vivo

Markus Schmitt, Klaus Rajewsky and Irmgard Förster

Institut für Genetik, Universität Köln, Weyertal 121, D-5000 Köln 41.

We have studied the proliferative behaviour of various B lineage subsets looking at the incorporation of the thymidine analogue 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) into the DNA of dividing cells. For this purpose mice were fed with BrdU for various periods of time and the percentage of BrdU-labeled cells was determined by simultaneous flow cytometric detection of cell surface markers and BrdU-incorporation. Using this method, we could show that more than two thirds of murine splenic B cells have a lifespan of several weeks or months. Similar results were obtained for peritoneal B cells, most of which belong to the CD5+ B cell subset. In spite of their slow division rate, these cells often give rise to chronic B cell leukemias (B-CLL). To obtain a better understanding of the growth properties of CD5+ B cells, we are presently analyzing their proliferative capacity following transfer into *scid* mice and stimulation with bacterial antigens.

Immunologisches Staging und klinisches Stadium der HIV-Infektion

Böhm I, Bauer R, Niedecken HW

Universitäts- Haut- und Poliklinik
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
D- 5300 Bonn 1

Anhand von Laborparametern, die zur Beurteilung der HIV-Infektion eingesetzt werden, sollte der Immunstatus des Patienten ermittelt und mit dem klinischen Befund verglichen werden.
Bei 294 HIV- Patienten in verschiedenen Stadien ihrer Krankheit wurden neben Blutbild und Differentialblutbild flowzytometrisch die Marker CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD16, CD57 und HLA-DR erfaßt. Die Stadien der HIV-Infektion wurden nach CDC und Walter Reed festgelegt.
Der Vergleich des klinisches Bildes mit den Immunparametern gestattete eine gute Partition des Patientenkollektivs in vier Gruppen,die sich in ihrem Immunstatus signifikant unterschieden:

	HIV AK	CD4/CD8	CD4/mm^3	Leukozyten/mm^3
Gruppe I	+	1,32	779 + 488	6135 + 1739
Gruppe II	+	0,68	679 + 261	6804 + 2014
Gruppe III	+	0,40	234 + 135	5667 + 1424
Gruppe IV	+	0,37	157 + 983	100 + 801

In der Gruppe I wurden nur minimale klinische Veränderungen gesehen. In der Gruppe II waren klinische Symptome eines Immundefektes ebenfalls nur schwach ausgeprägt, die Lymphadenopathie erreichte aber mit fast 70% den höchsten Wert. In der Gruppe III traten zunehmend Infektionskrankheiten, nicht-infektiöse Dermatosen und Neoplasien auf. In der Gruppe IV waren opportunistische Infektionen, Kaposi-Sarkom, Candidose des Oesophagus usw. regelmäßig vorhanden.
Die gute Partition des Patientenkollektivs anhand der Parameter CD4, CD8 und Leukozyten spricht dafür, daß die immunologischen Veränderungen in geordneter Reihenfolge auftreten. Dem Absinken der CD4-Lymphozyten geht stets eine Zunahme der CD8-Zellen voraus. Die Abnahme der Granulozyten führt zur Leukozytopenie. Die Progression des Immundefektes entwickelt sich folgerichtig in mehreren Schritten. Sie kann durch das immunologische Staging exakt beschrieben werden und ermöglicht eine quantifizierbare Definition der Stadien Latenzphase, Lymphadenopathie, AIDS-Related-Complex und AIDS.

ANALYSIS OF DIFFERENT LYMPHOCYTE SUBSETS DURING THE CLINICAL COURSE OF PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Garritsen[+], H.S.P., Kaufhold*, E., Pelzer*, P., Wörmann*, B., de Grooth[+], B.G., Greve[+], J., Hiddemann*, W.

[+] Cell Characterization Group, Dept. of Applied Physics, University of Twente, P.O.Box 217 , 7500 AE Enschede, the Netherlands
* Dept. of Internal Medicine, Westfälische Wilhelms University, Münster, Fed. Rep. Germany

The immunophenotype of lymphocyte subsets was determined in 45 patients with de novo AML undergoing intensive chemotherapy. Immunophenotyping of peripheral blood and bone marrow lymphocytes was performed by means of flow cytometry based on the whole blood lysis method. Combinations of the following antibodies were used: CD3, CD4, CD8, WT31 for T-cells, CD16, CD56 and CD57 for NK-cells and CD19 for B-cells. In 21 patients a monoclonal antibody specific for T cells expressing the gamma delta T cell complex was used. Analyses were performed at 5 timepoints: a) before chemotherapy, b) during treatment induced bone marrow aplasia, c) at achievement of complete remission, d) prior to consolidation, e) 4 to 8 weeks after consolidation therapy. The analysis of the first 24 AML patients gave the following results:
Prior to therapy (timepoint a) the percentage of cytotoxic lymphocytes was substantially decreased both in the blood and bone marrow (2-42%) as compared to normal controls and returned to normal values at timepoints b to e, while B-cells were significantly diminished (median 6%). Three patients had increased percentages of CD16 and CD56 positive lymphocytes (up to 42%) prior to and after chemotherapy. These three patients were older then 60 years. Four cases revealed a substantial rise of $CD3^+$, $WT31^-$, $CD4^-$ lymphocytes at timepoint d. These data indicate substantial changes of CL during the clinical course in patients with AML with large interpatient variations. Further follow up will allow correlation of these findings with response and remission duration.

Analyse von Leukämiezellen mittels Nachweis von Oberflächen- und Kernantigenen

M. Michels*, S. Klein, V. Diehl, H. Tesch

Med. Klinik I, Universität zu Köln, Joseph-Stelzmann-Str. 9, D-5000 Köln 41
* Neurologische Klinik, Julius-Maximilian-Universität, Josef-Schneider-Str. 11, D-8700 Würzburg

Die Differentialdiagnose menschlicher hämatopoetischer Erkrankungen geschieht heute durch immunologische Analysen von charakteristischen zellulären Antigenen. Die hier beschriebene Methode erlaubt den gleichzeitigen Nachweis von Oberflächen- und Kernantigenen mittels Immunfluoreszenzanalyse. Hierzu werden mit verschiedenern FITC- oder PE-gekoppelten Antikörpern Phänotypisierungen der zu untersuchenden Tumorzellen vorgenommen und durchflußzytometrisch analysiert. Anschließend erfolgt eine Permeabilisierung der Zellmembran durch eine Äthanol/Aceton Fixation und die Inkubation mit fluoreszenz-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen ein Proliferationsprotein des Zellkerns (Ki67). Dieser Test erlaubt die Bestimmung der proliferierenden Zellen innerhalb der zu untersuchenden Zellpopulation. Ferner wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von onkogen kodierten Proteinen (c-myb; p53) etabliert. Hier wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen c-myb und p53 inkubiert und dann mit einem PE-gekoppelten, subklassenspezifischen 2. Antikörper entwickelt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Tumorzellen in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden können. Die Bedeutung dieser Heterogenität für die Entstehung oder die Prognose der Erkrankung ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

MASKIERUNG DES HLA B27 BEI PATIENTEN MIT SPONDYLITIS ANKYLOSANS (SA)

J. NEUMÜLLER

Ludwig Boltzmann-Institut für Rheumatologie und Balneologie, Kurbadstraße 1o, A-11o7 Wien-Oberlaa, Österreich

Im Verlauf der HLA Typisierung von Patienten mit entzündlichen rheumatischen Erkrankungen (insbesondere bei der Bestimmung des HLA B27 bei Patienten mit SA) mittels lymphozytotoxischen Tests fiel auf, daß bei einem Teil der Patienten kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte. Die Empfindlichkeit des Tests konnte aber nach Inkubation der isolierten mononukleären Zellen (MNC) in sterilem Kulturmedium bei 37° C über 24 Stunden erhöht werden. Um diese Beobachtung objektivieren zu können, wurde bei HLA B27 positiven SA-Patienten durchflußzytofotometrisch unter Verwendung eines monoklonalen, FITC-markierten Antikörpers gegen HLA B27 (Fa. Behringwerke) ein Vergleich der Bindung dieses Antikörpers an das HLA B27 bei frisch isolierten und bei 24 Stunden in Medium inkubierten MNC vorgenommen. Das Zytofotometer EPICS C (Fa. Coulter) wurde mit Kalibrationsbeads, die mit unterschiedlichen FITC-Konzentrationen beladen waren, kalibriert. Parallel dazu wurde ein selbst entwickelter, quantitativer Zytotoxizitätstest auf Basis der Messung des intrazellulären ATP mithilfe der Biolumineszenz durchgeführt, wobei monoklonale und polyklonale Antikörper gegen HLA B27 und kreuzreagierende Spezifitäten eingesetzt wurden. Bei einem Großteil der SA-Patienten konnte nach Inkubation der MNC in Kulturmedium mit beiden Methoden eine signifikante Erhöhung der anti-HLA B27 Antikörperbindung nachgewiesen werden, sodaß bei diesem Patientengut eine Maskierung des HLA B27 durch Autoantikörper oder unspezifisch bindende Plasmaproteine zu erwarten ist.

LEUKOCYTE SUBPOPULATIONS IN A RADIATION-DOMINATED THERAPY MODEL OF HEAD AND NECK CARCINOMAS

W. Kaffenberger*, B. Clasen+, C. Liebrecht+, D. van Beuningen*

*Institute of Radiobiology, Federal Armed Forces Medical Academy, Munich, FRG
+ENT Department, University Hospital "Rechts der Isar", Technical University, Munich, FRG

We studied the effects of a local radiation treatment on a comprehensive panel of leukocyte subpopulations in peripheral blood of 31 patients suffering from squameous cell carcinomas of the head and neck. Using monoclonal antibodies to cell surface epitopes and flow cytometry together with quantitative buffy coat analysis, total white blood cell counts, and the absolute numbers of granulocytes, total mononuclear cells, monocytes, natural killer cells, pan T cells, helper and suppressor T cell subsets, the helper/suppressor ratio, and B lymphocytes were evaluated before, during, and after therapy. Before treatment a tumorigenic reduction of the mean T and B lymphocytes counts (T_B: -19%, T_S: -29%, B: -36% of controls, resp.) was observed, mean granulocyte counts were increased by 31%, whereas the means of monocytes and natural killer cells were not influenced. The helper/suppressor T cell ratio was significantly elevated. During radiotherapy all lymphocyte populations declined further as did the granulocyte counts. As the most radiosensitive subpopulation B lymphocytes declined to 43% of the pre-therapeutic value after 30 Gy. NK cells were not significantly influenced while absolute monocyte counts increased significantly beyond normal levels after initial depletions during both courses of treatment. The helper/suppressor ratio was reduced therapeutically to normal levels. Local radiotherapy of these patients resulted in systemic effects at the level of leukocyte subpopulations and seemed to cause a major shift of immune competence to a stable monocyte system. With a therapeutically normalized helper/suppressor T cell ratio and severely reduced B lymphocyte counts the humoral immune system in these patients occurred heavily deficient, while the NK surveillance seemed to be quite unaffected. The clinical relevance of these observations remains to be elucidated.

Flow cytometric analysis of the proliferative activity in the memory B cell compartment of the mouse

Birgit Schittek and Klaus Rajewsky

Institut für Genetik, Weyertal 121, D-5000 Köln 41, FRG

Using magnetic cell sorting and multiparameter flow cytometry, we analyzed the proliferative behaviour of memory B cells in vivo. We used the highly fluorescent protein phycoerythrin (PE) as an immunizing antigen and as a fluorescent probe to detect antigen-binding cells. We show that B cells in the spleen of PE-immunized mice which stain brightly with PE are $B220^+$ IgM^-IgD^-. These cells which comprise 0,01-0,02% of the total spleen cell population persist in the animal for more than 28 weeks after primary immunization and are able to produce a secondary antibody response in vitro. Simultaneous detection of cell surface markers and 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation allowed us to study the turnover of PE-binding B cells. We show that after an initial phase of extensive proliferation following primary immunization memory B cells can persist in the organism for extended periods of time in the absence of cell division.

PHENOTYPIC DISCRIMINATION BETWEEN CIRCULATING AND RESIDENT PORCINE $CD4^-CD8^-$ T LYMPHOCYTES

A. Saalmüller+, W.Hirt* and M.J. Reddehase*

+Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals, Paul-Ehrlich-Str. 28, D-7400 Tübingen

*Institute for Microbiology, Albert-Einstein-Allee, University of Ulm, D-7900 Ulm

The composition of the extrathymic T lymphocyte population in swine is unique. In addition to the $CD4^-CD8^+$ and $CD4^+CD8^-$ subpopulations, $CD4^+CD8^+$ and $CD4^-CD8^-$ T lymphocytes are prominent in the peripheral circulating as well as in the resident T lymphocyte pools. With three-color flowcytometry, $CD4^-CD8^-$ double negative T lymphocytes can be separated by the expression of the CD2 antigen into two subsets: $CD2^+CD4^-CD8^-$ and $CD2^-CD4^-CD8^-$ T lymphocytes. Whereas in blood the percentage of the $CD2^+CD4^-CD8^-$ cells is low, this subset is enriched in lymphoid tissues. With a monoclonal antibody (mAb) against a conserved external epitope of the $\gamma\delta$ T cell receptor ($\gamma\delta$ TCR), the 86D epitope, two distinct subsets of $CD2^-CD4^-CD8^-$ T lymphocytes can be defined in the circulating lymphocyte pool: $86D^+CD2^-CD4^-CD8^-$ T lymphocytes bearing a 38/40 kDa TCR and a $86D^-CD2^-CD4^-CD8^-$ subset expressing a 37/40 kDa TCR. In the resident T lymphocyte pools $86D^+$ cells are rare or even absent and mainly two $CD4^-CD8^-$ subsets can be found: $86D^-CD2^-CD4^-CD8^-$ and $86D^-CD2^+CD4^-CD8^-$ T lymphocytes. Whereas the $86D^-CD2^-CD4^-CD8^-$ T lymphocyte subpopulation shows the 37/40 kDa TCR $\gamma\delta$ phenotype of the circulating $86D^-CD2^-CD4^-CD8^-$ subset, the mainly resident $86D^-CD2^+CD4^-CD8^-$ T lymphocytes are characterized by 40/46 kDa TCR $\gamma\delta$ molecules.
Thus, in swine 3 subsets of $CD4^-CD8^-$ T lymphocytes can be defined by the expression of different TCR $\gamma\delta$ molecules and the CD2 differentiation antigen.
It seems that both expression of the differentiation antigen CD2 and different TCR $\gamma\delta$ molecules are involved in the migration and homing propensity of these subsets.

Mehrparameter-FCM in der Diagnose und Langzeitnachsorge von Blasentumorpatienten

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

Urologische Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Marchioninistraße 15, 8000 München 70
*Urologische Klinik der Medizinischen Hochschule Lübeck

In über 400 Blasenspülflüssigkeiten wurde flowzytometrisch der DNA/Cytokeratin-Gehalt der Zellen gemessen und die klinischen Anwendungen dieser Methode untersucht.

Die verschiedenen Subpopulationen in den Proben konnten aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften identifiziert werden:
Zwei störende Probenanteile lassen sich ausschließen: Pyknotische Zellen, die im DNA-Histogramm manchmal wie hypoploide Tumoren erscheinen können, werden durch ihre Lage im cytokeratin-negativen Bereich erkannt. Plattenepithelien, die Aneuploidie oder erhöhte Proliferation aufgrund ihrer zytoplasmatischen RNA simulieren können, grenzen sich im Fluoreszenzbild eindeutig von Entzündungs- und Urotheizellen ab.
Durch die Bestimmung des Anteils cytokeratin-negativer Entzündungszellen einer Probe wird eine Aussage über das Vorliegen und die Schwere einer Zystitis möglich. Die Übereinstimmung der flowzytometrischen und zytologischen Diagnose betrug 67% bei chronischer und 76% bei akuter Entzündung.
Nach Ausgrenzen dieser Populationen ist eine selektive Zellzyklusanalyse des cytokeratin-positiven Urotheis möglich. Die Erkennung kleiner Tumorklone und der sog. tetraploiden und near-diploiden Karzinome wird entscheidend verbessert.

Nach Messung von über 400 Blasenspülflüssigkeiten ergibt sich für den Tumorparameter 'Aneuploidie' im Vergleich zum zytologischen Grading folgendes Bild:
Der Anteil aneuploider Karzinome steigt mit zunehmender Anaplasie: von 26% bei G1 über 42% bei G2 auf 78% bei G3-Tumoren.
13% der cytologisch als normal bzw. suspekt befundeten Zytologien zeigten DNA-Histogramme mit aneuploiden Zellinien. Bei der Hälfte dieser Fälle wurden im Laufe der folgenden Monate (durchschnittliche Nachbeobachtungszeit 9 Monate) histologisch Blasentumore oder Rezidive gesichert.

Die standardisierte Messung und Auswertung erlaubt eine Anwendung der DNA/Cytokeratin-Methode im Routinelabor. Weil der flowzytometrische Aneuploidienachweis der cytologischen Tumorerkennung vorausgehen kann und zusätzliche prognostische Information besitzt, wird die vorgestellte Methode in der Diagnostik und Nachsorge von Blasentumorpatienten eingesetzt.

DNA- Image Zytometrie bei Mamma-Karzinomen:

Korrelation des Ploidie - Grades zu anderen Prognosekriterien

Kristen,P.; Kaesemann,H.; Rempen,A.;Beier,H.-J.; Caffier,H.

Universitäts-Frauenklinik Würzburg

Direktor: Prof.Dr.K.-H. Wulf

Josef-Schneiderstr. 4, 8700 Würzburg

Seit 1989 wird an der Universitäts- Frauenklinik in Würzburg routinemäßig der DNA- Gehalt mit Hilfe der Image- oder statischen Zytometrie gemessen. Zum Einsatz kommt hierbei der CAS-100 der Firma Beckton- Dickinson. Die Messungen werden an zytologischen Präparaten durchgeführt, deren Zellkerne nach Feulgens gefärbt sind. Zur Bestimmung des Ploidiegrades wird die Färbeintensität der Zellkerne gemessen und mit einem sicher euploiden Standard verglichen.

Bisher liegen Messungen von 44 Mamma-Ca. vor. Das mittlere Alter der Patientinnen beträgt etwa 60 Jahre, es handelt sich ausschließlich um epitheliale Tumoren, wobei das invasiv duktale Karzinom mit 36 Fällen am häufigsten vertreten war. 24 Tumoren hatten eine Tumorgröße von kleiner 2,0 cm, 27 dieser Ma- Ca waren nodal positiv. In 29 Fällen konnten in der Immunhistochemie u./o. der Zytosolbestimmung ein positiver Östrogen- Rezeptor nachgewiesen werden, Gestagen- Rezeptoren bei 22 Tumoren. Bezüglich ihres DNA- Gehaltes waren 52% der untersuchten Malignome als euploide, 48% als aneuploide Tumoren einzustufen.

Die gemessenen DNA- Indices wurden mit sogenannten etablierten Prognosekriterien (Tumorgröße, Nodal-Status, Grading, Rezeptoren- Besatz) verglichen. Im untersuchten Kollektiv konnten keinerlei Korrelationen zwischen diesen Parametern und dem zellulären DNA- Gehalt gefunden werden. Zusätzlich wurde bei einer Reihe dieser Tumoren eine Bestimmung des Kathepsin D durchgeführt. Kathepsin D ist eine lysosomale Protease, die von Mammakarzinom-Zellen vermehrt produziert wird. Sie gilt als ein Marker für die Zellproliferation und Invasivität des Tumors Die Kathepsinkonzentration im Zytosol wird daher als ein möglicher Prognosefaktor für das Mamma -Ca. betrachtet. Auch im Vergleich zwischen dem DNA- Index und den Kathepsin-D Konzentrationen im Zytosol ergaben sich bisher keine signifikanten Beziehungen.

DNA-Ploidie und maligne Progression bei Oralkarzinomen

J. Hemmer[#], D. Bartkowiak[*] T. Thein[#], J. Kreidler[#]

Universität Ulm
[#] Abt.. Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Oberer Eselsberg 40
[*] Abt. Radiologie II, Steinhövelstr. 6
7900 Ulm

Insgesamt wurden 148 Patienten mit primären, unbehandelten Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle mit Hilfe von DNA-Durchflußzytophotometrie untersucht. Der Anteil der Fälle mit aneuploiden Zellinien zeigte eine deutliche Korrelation sowohl mit dem Grad der Gewebedifferenzierung (G1: 38%, G2: 77%, G3: 92%) als auch mit der Größe (T1: 15%, T2: 74%, T3: 88%). Es konnten geringe Unterschiede zwischen einzelnen Lokalisationen gefunden werden. So waren alle T1-Tumoren der Lippe und der Zunge diploid, während einige Mundbodenkarzinome auch schon in diesem Stadium aneuploide Klone aufwiesen. Bei diploiden Fällen erwiesen sich die Tumorzellen mit normalem DNA-Gehalt als Zytokeratin-positiiv, während bei aneuploiden nur bei der Zellinie mit aberrantem DNA-Gehalt Zytokeratin nachweisbar war. Obwohl diese Untersuchung bislang nur bei wenigen Fällen durchgeführt wurde, mag dies als Hinweis verstanden werden, daß die diploide Tumorzellpopulation im Verlaufe der weiteren Tumorentwicklung durch aneuploide Zellen ersetzt wird. Auch wenn das Vorhandensein einzelner aneuploider Zellen zu einem frühen Stadium des Tumorwachstums nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden kann, weisen diese Ergebnisse auf eine rasche Vermehrung, möglicherweise auch auf eine Genese von Klonen mit aberrantem DNA-Gehalt zu einem relativ späten Stadium der Tumorentwicklung hin. Die naheliegende Vermutung, daß das Auftreten aneuploider Tumorzellen als Parameter einer malignen Progression bei Oralkarzinomen zu werten ist, wird durch das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen nahezu ausschließlich im aneuploiden Patientenkollektiv (86%) erhärtet. Dieser Befund erwies sich auch dann als signifikant, wenn der Zusammenhang von Ploidie des Primärtumors und Metastasierung innerhalb gleicher T-Klassen untersucht wurde. Weiterhin konnte bei 35 chemotherapeutisch behandelten Patienten ein signifikanter Zusammenhang von Ploidie und Therapieerfolg festgestellt werden: 75% der diploiden, aber nur bei 26% der aneuploiden Karzinome zeigten eine vollständige Reduktion der Tumormasse nach intra-arterieller Chemotherapie mit Cisplatin und Epirubicin.

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER DNA-PLOIDIE BEIM MAGENKARZINOM: PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG UND KORRELATION MIT KLINISCH-PATHOLOGISCHEN VARIABLEN

R. PORSCHEN, U. REMY, G. BEVERS, S. SCHAUSEIL, F. BORCHARD

Abt. f. Gastroenterologie, Inst. f. Pathologie und Klin. Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Die DNA-Aneuploidie stellt bei verschiedenen Tumorarten einen prognostischen Faktor dar. Da durchflußzytometrische (FCM) Studien mit ausreichenden Fallzahlen beim Magenkarzinom bisher fehlen, wurde der Einfluß der DNA-Aneuploidie und klinisch-pathologischer Parameter auf die Überlebensrate bei 184 Pat. mit einem Adenokarzinom des Magens (Alter: 62±11 J., 112 Männer; 72 Frauen) analysiert. Tumoren wurden nach der UICC, Ming und Lauren Einteilung nachklassifiziert. Eine Zellkernsuspension wurde mittels Pepsininkubation (0,5%, pH 1,5) von entparaffinierten Tumorschnitten hergestellt und mit Propidiumjodid für die FCM angefärbt (CV: 6,1±1,9%). 1-9 Tumorblöcke (im Mittel: 2,6) wurden pro Patient untersucht.

Ein aneuploider DNA-Gehalt (mittlerer DNA-Index: 1,47±0,33; Bereich: 1,06-2,90) war bei 58 % der Pat. vorhanden und korrelierte signifikant mit männlichem Geschlecht (p=0,005) und dem Ausmaß des regionalen Lymphknotenbefalls (p=0,01). Aneuploidie war häufiger beim intestinalen (63%) als diffusen Typ (46%) und bei Tumoren im oberen (66%) im Vergleich zum mittleren und unteren (52%) Magendrittel vorhanden. Die mediane Überlebensdauer in diploiden und aneuploiden Tumoren war statistisch nicht unterschiedlich (551 vs. 382 Tage). Das Überleben (Life-table Analyse) korrelierte signifikant mit der Ming Klassifikation, kurativer Resektion, Tumorlokalisation, TNM-Stadium und Tumordurchmesser. Pat. mit Tumoren im mittleren und unteren Drittel lebten signifikant länger als Pat. mit Tumoren im oberen Drittel (in 94% Kardiakarzinome) (mediane Überlebenszeit: 20,0 vs. 9,5 Mo).

FAZIT: Klinisch-pathologische Parameter, aber nicht die DNA-Ploidie besitzen prognostische Bedeutung beim Magenkarzinom. Kardiakarzinome stellen möglicherweise eine eigenständige Entität dar, weil sie sich in der Rate aneuploider Tumoren und im Überleben von anderen Lokalisationen unterscheiden. Die signifikante Assoziation der Aneuploidie mit dem männlichen Geschlecht läßt einen hormonellen Einfluß beim Magenkarzinom vermuten.

Die Bestimmung von EGF-Rezeptoren und DNA mit Hilfe der zweidimensionalen Durchflußzytometrie an menschlichen Plattenepithel-Carcinom-Zellen A431

J. Estermann, F. Zölzer und C. Streffer

Institut für Medizinische Strahlenbiologie der Universität-Gesamthochschule-Essen, Universitätsklinikum, Hufelandstraße 55, 4300 Essen 1

Die Rezeptordichte für den Epidermal Growth Factor (EGF) und der DNA-Gehalt werden während der Proliferation von menschlichen Plattenepithel-Carcinom-Zellen A431 durchflußzytometrisch bestimmt. Der Nachweis des EGF-Rezeptors erfolgt durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierung (monoklonaler Maus-Antikörper EGFR1; Schaf-anti-Maus-FITC) sowie die Färbung der DNA mit 7-Aminoactinomycin D.

Nach 48 h Kulturdauer - die Zellen befinden sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase - haben 90 % der Zellen eine einheitlich hohe EGF-Rezeptordichte und 45 % der Zellen befinden sich in der S-Phase. Mit zunehmender Kulturdauer vermindert sich der Anteil an S-Phase Zellen und es entsteht eine Population von Zellen, die durch eine deutlich geringere Anzahl von EGF-Rezeptoren gekennzeichnet ist. Der Anteil an S-Phase-Zellen liegt bei den Zellen hoher EGF-Rezeptordichte deutlich höher als bei den Zellen niedriger EGF-Rezeptordichte.

Inwieweit es sich bei den Zellen mit niedriger EGF-Rezeptordichte um nicht proliferierende Zellen handelt, zeigt eine dreidimensionale Messung am Durchflußzytometer, bei der der EGF-Rezeptor, die DNA, und das Ki-67-Antigen (spezifisch für proliferierende Zellen) markiert werden.

Zytogenetische Variabilität und Prognose beim malignen Melanom

F.J. Otto, J. Schumann, D. Bartkowiak

Fachklinik Hornheide, Abteilung für experimentelle Onkologie,
Dorbaumstraße 300, 4400 Münster,
Institut für Strahlentherapie, Steinhövelstraße 9, 7900 Ulm

Die prognostische Beurteilung des malignen Melanoms stützt sich in erster Linie auf die im histologischen Schnitt gemessene Turmordicke. Die durchflußzytometrische Bestimmung des Ploidiestatus und S-Phase-Anteils liefert zusätzliche Kriterien, die beim primären Melanom zur Präzisierung der Prognose herangezogen werden.
Beim metastasierenden Melanom erwiesen sich Aneuploide und S-Phase-Fraktion als wenig aussagefähig. Deshalb wurden bei Patienten, von denen über den Zeitraum mehrerer Jahre sequenzielle Messungen vorlagen, die Entwicklung und Veränderungen der aneuploiden Zellinien untersucht. Es zeigte sich, daß die durchflußzytometrisch erfaßte zytogenetische Variabilität der Tumorzellen mit der Überlebenszeit der Patienten korreliert ist. Eine starke Variabilität, abgeleitet aus der Häufigkeit der Ploidieänderungen, ist mit einer kurzen Überlebenszeit verknüpft. Die zytogenetische Variabilität wird als Ausdruck der gentischen Instabilität der Tumorzellen gedeutet. Eine Möglichkeit zur Bestimmung der tumorspezifischen Variabilität als Maß für die genetische Instabilität und als prognostischer Parameter wird erprobt.

SIMULTANER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHER NACHWEIS VON TdT UND MEMBRANANTIGENEN ZUR ERFASSUNG EINER MINIMALEN RESTERKRANKUNG BEI AKUTEN LEUKÄMIEN

Johannes Drach, Claus Gattringer, Heinz Huber

Univ.-Klinik für Innere Medizin, Innsbruck
Abteilung für Immunhämatologie und Onkologie
Anichstraße 35
A - 6020 Innsbruck
Österreich

Der Nachweis einer minimalen Resterkrankung bei akuten Leukämien nach intensiver Chemotherapie erfordert hohe Spezifität und Sensitivität der Methodik. Durch die Verwendung durchflußzytometrischer Multiparameter-Analysen nach Markierung mit monoklonalen Antikörpern werden diese Kriterien zur Erfassung kleinster Zellpopulationen erfüllt.
In dieser Studie wurde eine durchflußzytometrische Technik zum Nachweis intrazellulärer Antigene etabliert, um simultan TdT (terminale desoxyribonukleotidyl-Transferase, ein Enzym lymphatischer Vorläuferzellen) und Oberflächenantigene zu bestimmen. Dazu wurden die Zellen zunächst mit einem Phycoerythrin-markierten Antikörpe inkubiert, um das Membranantigen zu markieren. Im Anschluß wurde die Zellmembran mit 1%igem Paraformaldehyd fixiert und durch Zugabe von eiskaltem Methanol permeabilisiert. Der Nachweis der TdT erfolgte unter Verwendung von Kaninchen-anti-TdT und FITC-markiertem Ziegen anti-Kaninchen IgG.
Die Reliabilität der Methode wurde bestätigt durch die Anwendung bei 77 akuten Leukämien: Dabei war TdT bei allen 32 ALL in der überwiegenden Mehrzahl der Blasten positiv, während TdT bei 45 AML nur in 7 Fällen (15%) nachweisbar war.
Die Sensitivität der beschriebenen Methodik wird anhand eines Mischexperiments, bei dem eine Verdünnungsreihe von leukämischen mit normalen Zellen hergestellt wurde, demonstriert: TdT + cALLA/CD10 bzw. TdT + CD19 positive Zellen waren dabei noch in einem Prozentsatz von 0.04% zweifelsfrei nachweisbar.

Die Anwendung dieser Technik ermöglicht die Dokumentation einer minimalen Resterkrankung
(1) insbesondere bei der T-ALL durch Doppelmarkierung eines pan-T Zellantigens (CD5) mit TdT;
(2) durch den Nachweis TdT/CD10 positiver Zellen im peripheren Blut bei der common-ALL;
(3) bei AML Fällen mit Koexpression von TdT und myeloischen Antigenen.

Entsprechende Beispiele werden gemeinsam mit Follow-up Daten der Patienten präsentiert, um die Bedeutung einer minimalen Tumorzell-Population zu beurteilen.

Ki-67- und S-Phasenfraktionen beim malignen Non-Hodgkin-Lymphom

Sauter G, Feichter G, Albrecht R, Gudat F

Institut für Pathologie der Universität Basel

Zellkinetische Untersuchungen können mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden. In Anbetracht der klinischen Relevanz und der Verbreitung verschiedener Methoden sind wir der Frage nachgegangen, ob bei malignen Non-Hodgkin-Lymphomen die Ki-67-Fraktion mit der flow-cytometrisch gemessenen S-Phasen-Fraktion korreliert.

Untersucht wurde tiefgefrorenes Material von 29 diffus wachsenden Non-Hodgkin-Lymphomen. Von jedem Gewebestückchen wurde ein Gefrierschnitt angefertigt und mit einem Antikörper gegen Ki-67 inkubiert. In 13 dieser Fälle wurde zusätzlich eine Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen Ki-67 und T11 (T-Lymphocytenmarker, CD 2) vorgenommen. Das restliche Tumormaterial des Gewebeblockes wurde der durchflusszytometrischen Untersuchung zugeführt.
Präparationsmethode: Zitronensäuremethode nach Otto und Goehde. Gerät: PARTC II. Auswertung: MYCYCLE nach Rabinovitch. Die Auszählung der Ki-67-Fraktion erfolgte an mindestens 1200 Zellen pro Fall, sowohl auf schwarz-weiss Photographien (in 22 Fällen) als auch direkt unter dem Mikroskop (in 29 Fällen).

Bisherige vorläufige Ergebnisse zeigen eine signifikante Korrelation zwischen Ki-67-Fraktion und S-Phasenfraktion ($p \leq 0.001$) und mit dem Proliferationsindex ($p \leq 0.001$); (Rangkorrelation nach Spearman). Hingegen konnten deutliche Unterschiede in der Höhe der Ki-67-Fraktion in Abhängigkeit von der Auswertungsmethode festgestellt werden. Beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen kann der erwartete Zusammenhang zwischen dem immuncytochemischen Proliferationsmarker Ki-67 sowie den flow-cytometrisch ermittelten Zellzykluskompartimenten bestätigt werden.

Establishment and partial characterization of a new human gastric cancer cell line.

Voliotis,D., Golbach,G., Dreuw,K., Voigt,P., Klein,H.O..

Onkologisches Labor der medizinischen Klinik I der Universität zu Köln, FRG

There are only a few well characterized human gastric cancer cell lines published.
We established a cell line from ascitic fluid of a male patient with metastazing gastric cancer. Cells were held as a suspension culture.
Up to now cells have been maintained for 70 serial passages. Subcultivation occurs every 48 hours.
Morphologically the gross appearance of the cells is heterogenous with respect to size and shape. There is a majority of small cells having only a small rim of cytoplasm, but there are also larger ones with more cytoplasm being granular and PAS-positive. Some nuclei show numerous nucleoli, mitotic and pathologic mitotic figures are often seen.
The cells do not secrete and produce CEA, TPA and CA19-9, which held true to the primary tumor, too.
Growth kinetics were determined by single cell autoradiography, flow cytometry (anti-BrdU, Ki 67, propidium iodide), image cytometry (feulgen stain, autoradiograms) and by analyzing the growth curve of the cells.
DNA-content of the main stem line is near diploid, but there are some smaller peaks showing stem lines in the hypo- and hyperdiploid region. About 3% of the cells are highly aneuploid with values exceeding 4c.
The percentage of cells in S-phase of cell cycle is approximately 45%, population doubling time is 19-25 hours, 3H-labelling index 18-25% and mitotic index 20-30/1000.
Our further aim is to fully characterize this cell line and to isolate and subcultivate cell clones.

Die Normierung flow - zytochemischer Enzymmessungen

E.Severin und E.Seidler

Institut für Strahlenbiologie, Westf. Wilhelms-Universität
Hittorfstr.17, D-4400 Münster und
Institut für Anatomie, Humboldt-Universität
Philippstr.12, DDR-1044 Berlin

Grundlage der Fluorometrie ist die Annahme, daß das emittierte Fluoreszenzlicht proportional zur fluorochromierten Substanzmenge ist.

Da die Meßgröße (Fluoreszenz-Intensität) nur einen Relativwert darstellt, muß sie geeicht werden: Das geschieht durch die Zufügung von biologischen oder künstlichen Standards zu jeder Meßprobe, um alle optischen und elektronischen Einflüsse auf das Meßsignal zu bestimmen.

Da die Meßgröße ein physikalischer Parameter ist, der auf der Basis einer chemischen Farbreaktion Auskunft über die Aktivität zellulärer Enzymsysteme geben soll, muß sie scaliert werden: Das geschieht durch die Korrelation biochemischer mit flowzytometrischen Messungen.

Zur Messung der zellulären (enzymatischen und nicht-enzymatischen) Redoxaktivität haben wir die Tetrazoliumsalz-Technik auf die Flow-Zytometrie angewendet. Als "Redoxaktivität" erfassen wir alle Reaktionen, bei denen Elektronen oder Wasserstoffionen an unseren Indikatorfarbstoff abgegeben werden. Mit dieser Technik läßt sich ebenso auch die Aktivität einzelner Dehydrogenasen bestimmen.

Ziel der Arbeit ist es, mit flow-zytometrischen Analysen von heterogenen Zellpopulationen für jede einzelne Zelle die Redoxaktivität oder Dehydrogenase-Aktivität in biochemischen Einheiten (fmol/Zelle) benennen zu können.

Das schwarze Loch der Flowzytometrie

Bauer R, Böhm I, Niedecken HW

Universitäts- Haut- und Poliklinik
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
5300 Bonn 1

Bei flowzytometrischen Untersuchungen peripherer Lymphozyten-Subpopulationen setzt man voraus, daß die Interaktion des monoklonalen Antikörpers (mAk) mit mononukleären Zellen (PBMC) des Blutes die Morphologie der Zellen nicht beeinflußt. Wir haben diese unseres Erachtens bislang nicht erforschte Annahme analysiert.
Über 500 Blutproben von Patienten mit unterschiedlichen Hautkrankheiten, die mit T-Lymphozyten-Verschiebungen im Blut einhergehen, wurden untersucht. Dazu gehören die atopische Dermatitis, kutane T-Zell-Lymphome, Psoriasis, virale Dermatosen der Herpes-Gruppe und HIV-Patienten. Nach Ficoll-Trennung und Markierung mit mAk (verwendete Ak-Kombinationen: CD3/HLA-DR, CD4/CD8, CD4/CD14, CD8/CD11b und CD3/CD14) analysierten wir die PBMC anhand des Scatterbildes.
Wir konnten nachweisen, daß die Ak-Markierung PBMC zu einer Veränderung der Granularität und des Volumens führt. Die Zahl der Lymphozyten und Monozyten im Gate der Negativkontrolle unterschied sich signifikant von der Zahl dieser Zellen nach Markierung mit mAk. Nach der Markierung waren die fehlenden Zellen außerhalb des gesetzten elektronischen Fensters auffindbar. Es stellte sich heraus, daß überwiegend Zellen mit CD3+ Eigenschaften durch die Ak-Markierung aus dem definierten Gate verschwanden. Ein Verlust von Zellen nach Ak-Fixierung gegenüber der Negativkontrolle betrifft auch Zellen des Phänotyps CD8+. Die vielfach publizierten Defizienzen CD8+ Zellen könnte teilweise technisch bedingt sein.
Wir konnten zeigen, daß der antikörperbedingte Zellshift von der Aktivität des Immunsystems abhängt. Während Gesunde dieses Phänomen nicht zeigten, wiesen Patienten mit Ekzemen, mit kutanen T-Zell-Lymphomen und mit HIV-Infektion dieses regelmäßig auf. Unsere Ergebnisse deuten daraufhin, daß mAk zu einer Veränderung zellphysiologischer Parameter führen. Es genügt unseres Erachtens nicht, anhand einer Negativkontrolle ein Gate im Scatterbild zu setzen, sondern es muß die zu untersuchende Zellpopulation nach der Markierung mit Antikörpern festgelegt werden.

Berechnung der absoluten Rezeptordichte auf Zellen durch interne Standardisierung mit FITC- oder PE-Partikeln im FACSCAN(R)

A. Brückmann, H. Kraus

BIOSCIENTIA
Institut für Laboruntersuchungen
6507 Ingelheim
Hamburger Str. 1

Der Fluoreszenz-Peak im FACS ist ein indirektes Maß für die Dichte der Antikörper-bindenden Rezeptoren. Weiterhin läßt sich beurteilen, wie die Antigendichte verteilt ist: ein schmaler Peak bedeutet, daß alle Zellen in etwa die gleiche Dichte an Rezeptoren haben, während ein breiter Peak auf eine große Variabilität in der Rezeptorverteilung hindeutet. Nimmt man die Rohdaten des FACS, so lassen sich mittlere Fluoreszenzintensitäten und deren Streubreite berechnen. Man erhält somit arbiträre Werte für die Rezeptordichte, die jedoch nur vergleichbar sind, wenn sie an demselben Gerät und mit gleicher Geräteeinstellung gemessen wurden.
Unsere Überlegungen waren nun die Meßergebnisse zu standardisieren und die mittlere Rezeptorzahl pro Zelle zu berechnen. Dazu versetzten wir die wie üblich markierten Zellsuspensionen mit FITC-Beads. Diese sind käuflich zu erwerben und erhalten eine definierte Menge FITC-Moleküle pro Partikel. Durch die gleichzeitige Messung von markierter Zellsuspension und FITC-Partikel, lassen sich die Fluoreszenzintensitäten ins Verhältnis setzen und die Anzahl der FITC-Moleküle pro markierter Zelle unabhängig von der Geräteeinstellung berechnen. Kennt man auch das Protein/FITC-Verhältnis der Antikörper-Präparation, so ist es auch möglich die Anzahl der gebundenen Antikörper pro Zelle zu berechnen: Man erhält ein unmittelbares Maß der Rezeptordichte. Die Berechnung erfolgt mit einem Pascal-Programm auf PC-AT. Die FACS-Rohdaten (Listmode) werden über eine spezielle Einschubkarte in den PC eingelesen. Dort können sie in verschiedenster Weise verarbeitet werden. Für eine Reihe von Fragestellungen - wie Rezeptorregulation oder Aktivitäts- und Funktionszustände von Zellen - könnte diese Methode ein wichtiges Hilfsmittel sein.

IMMUNOLOGISCHE MARKER UND DNA-FLUOROCHROME BEI DER SUBPOPULATIONSSPEZIFISCHEN PROLIFERATIONSANALYTIK: PROBLEME DER FLOWZYTOMETRISCHEN MULTI-COLOR ANLYSE

Kubbies M., Bauer K., Goller B.

Boehringer Mannheim GmbH, Forschungszentrum Penzberg,
Nonnenwald 2, 8122 Penzberg (08856/602786)

Bei Studien der Zellaktivierungskaskaden in der Immunologie ist der Nachweis von Differenzierungs-/Aktivierungsmarkern nicht mehr ausreichend. Es müssen zusätzlich subpopulationsrelevante zellphysiologische Aspekte wie Ca^{2+}-Flux oder Glutathionsynthese analysiert werden. Letztlich muß gezeigt werden, ob die entsprechenden Subpopulationen proliferieren (differenzielle BrdU/Hoechst Zellkinetik).
In aktivierten Lymphozytensystemen kommt es zur heterogenen Zellaktivierung und zur Verbreiterung der Differenzierungsmarker-Cluster. Für eine signifikante Trennung zweier Populationen (z. B. $CD4^+$ und $CD8^+$) muß eine Zweifarbenanalyse angewandt werden (FITC, PE). Aufgrund der spektralen Überlappung von PE mit den DNA-Fluorochromen EB und PI es nicht möglich eine subpopulationspezifische Proliferationsanalytik durchzuführen. Gelöst werden kann das Problem mit der Verwendung von nahe-infrarot bzw infrarot emittierenden, nucleinsäurebindenden Fluorochromen wie 7-Aminoactinomycin D. Allerdings ist die Bindung dieses Fluorochrom abhängig vom Kondensationsgrad der DNA. Vor kurzem wurden neue DNA/RNA-bindende Fluorochrome zur Vitalzellanalytik beschrieben, welche im Infrarotbereich emittieren. Diese LDS-Fluorochrome (Exciton, Inc.) überlappen nicht mit der Emission von Phycoerythrin oder Allophycocyanin. In permeabilisierten und fixierten Zellen ist es möglich einen "energy transfer" von Hoechst (blau) auf diese LDS-Fluorochrome (infrarot) zu erreichen, und somit eine BrdU/Hoechst-LDS Analytik zur differenziellen Zellkinetik zu erreichen. Dabei wird gesamte Spektralbereich grün/orange/rot "frei" zur gleichzeitigen Messung von fluorochrommarkierten Antikörpern. Somit sind Drei- und Vierfarbenanalysen (Dual-Laser) subpopulationsspezifischer Proliferation möglich (Differenzierungsmarker FITC/PE und BrdU/Hoechst-LDS).

Isolierung von IgA1+ B Lymphozyten aus peripherem Blut zur molekularen Analyse des Immunglobulin-Klassenwechsels

Andreas Radbruch, Pete Burrows und Max Cooper

Institut für Genetik der Universität zu Köln,
Weyertal 121, 5000 Köln 41

Der Immunglobulin-Klassenwechsel ist ein wichtiger Differenzierungsschritt in durch Antigen aktivierten B Lymphozyten, durch den Antigen-spezifische Antikörper funktionell verändert werden und so die humorale Immunantwort optimiert wird. Als molekulare Grundlage des Klassenwechsels werden differentielle Transkription der betreffenden Gene oder eine Neuordnung (Rekombination) dieser Gene diskutiert. Letztere findet man in transformierten Plasmazellen, d.h. terminalen B Zellentwicklungsstadien. In normalen menschlichen B Lymphozyten konnte der Klassenwechsel bisher nicht analysiert werden, da aktivierte Zellen *in vivo* selten sind und *in vitro* nicht den Klassenwechsel durchlaufen.
Durch Kombination verschiedener Trennverfahren, u.a. magnetische und fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, haben wir aus peripherem Blut aktivierte B Zellen isoliert, die den Klassenwechsel von IgM zu IgA1 durchlaufen hatten und seltener als 0.5% sind, in genügender Anzahl (10^6) und Reinheit (>95%), um die Anordnung der Immunglobulin-Gene zu analysieren. Es zeigt sich, daß die Mehrheit dieser Zellen bereits die Gene rekombiniert hat. Weitere Untersuchungen sollen zeigen, ob auch beim Menschen eine Instruktion der B Zellen für ganz bestimmte Klassenwechsel-Rekombinationen stattfindet, wie wir erstmalig für die Maus zeigen konnten. Darüberhinaus bietet sich die von uns entwickelte Zellseparationstechnologie auch zur Bearbeitung anderer Fragestellungen der modernen Zell- und Molekularbiologie in normalen Leukozyten an, besonders wenn kleinere Subpopulationen untersucht werden sollen.

USING FLOW CYTOMETRY TO CHARACTERIZE LDL RECEPTORS ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

Günther.Böck*, Lukas.A.Huber*, Günther Jürgens¶, Dieter Schönitzer¶¶ and Georg Wick*.

*Inst. for General and Experimental Pathology, University of Innsbruck Medical School,
¶ Inst. for Medical Biochemistry, University of Graz, Medical School, Graz, Austria.
¶¶ Blood Bank and Transfusion Unit, University of Innsbruck, Medical School, Innsbruck, Austria.

The characteristics of high affinity low density lipoprotein(LDL) receptors of mitogen activated human T- blasts were compared with that of *in vitro* cholesterol-deprived resting peripheral blood lymphocytes (PBL) and of freshly isolated resting PBL. At 37°C, specific binding/uptake of fluorescently labelled (dioctadecylindocarbocyanine, DiI) LDL was analysed by flow cytometric analysis(FACS). This method allows for the assessment of the characteristics of classical receptors, i.e. saturation, competition and determination of affinity constants at a single cell level on living cells. Using double reciprocal transformation of the specific binding FACS curves (Lineweaver - Burke plots) we found similar dissociation constants on T-blasts: Kd= 4.14×10^{-9}, freshly isolated resting PBL: Kd=7.56×10^{-9}, and preincubated resting cells: Kd=8.91×10^{-9}. All these experiments were carried out in parallel with bulk cell preperations in cuvettes with a fluorimeter to perform Scatchard-analyses. FACS and fluorimeter measurements gave the same dissociation constants for T-blasts and preincubated resting cells. Furthermore , we were able to show that T-blasts express high levels of LDL-receptor activity (Bmax = 250±24 compared to 115±24 for pre-incubated resting PBL).
Furthermore we report here that rescue from mevinolin (competitor of the rate limiting enzyme of cholesterol biosynthesis) suppression and enhancement of mitogen responsiveness at low LDL concentrations (≤100 µg/ml) , occurs by LDL uptake via the high affinity LDL receptor on human PBL, but at high concentrations a receptor independent uptake is also affected . Suppression at high LDL concentrations (≥100 µg/ml) is not mediated via either high or low affinity lymphocyte receptors for LDL, but rather via non specific uptake.

This work was supported by grants from the Austrian Research Council (project no. 7341),and the Austrian Ministry of Science and Research and the Sandoz Foundation for Gerontology.

A SIMPLE AND SENSITIVE FLOW CYTOMETRIC ASSAY FOR DETERMINATION CYTOTOXIC ACTIVITY OF HUMAN NATURAL KILLER CELLS

Katarina Radosević, Henk S.P. Garritsen, Marja Van Graft,
Bart G. De Grooth, Jan Greve

Department of Applied Physics, Twente University of Technology
7500 AE Enschede, The Netherlands

A new, simple and sensitive flow cytometric assay for determination cytotoxic activity of human natural killer cells is described. The assay is based on the use of two fluorochromes. The target cell population ist stained with one fluorochrome (octadecylamine-fluorescein isothiocyanate, F-18) prior to incubation with the effector cells. F-18 remains in the membrane of target cells even when they are killed what enables a clear separation between effector and target cells. Dead cells are determined by staining with a second fluorochrome (propidium iodide) after incubation of effector and target cells.

F-18 is not toxic, does not decrease the cytotoxic activity of human natural killer cells, it is stabile (exchange between labeled and non labeled cells is negligible in the period of at least 4 hours at 37°C) and it remains in the membrane of the killed cells. A clear distinction between unlabeled effector and labeled target cells is obtained even after incubation of target and effector cells for 4 hours at 37° C and using a high ratio between effector and target cells (75:1).

A good correlation with ^{51}Cr-release assay is obtained.

The possibility to use the flow cytometric cytotoxicity assay using whole blood instead of isolated lymphocytes is presented.

Monoklonale Antikörper gegen R-Phycoerythrin und ihre Anwendung in der Durchflußzytometrie

Ladusch, M., Seidel, B., Fiebig, H.

Sektion Biowissenschaften
Karl-Marx-Universität Leipzig
Talstr.33
7010

Es wurden monoklonale Anitkörper gegen das R-Phycoerythrin (R-PE) der marinen Rotalge Ceramium rubrum in der Maus erzeugt und auf ihre Eignung als Bestandteil eines Immunfluoreszenz-Detektionssystems in der Durchflußzytometrie untersucht.
Im Screening der durch Elektrofusion erhaltenen Klone erwies sich ein durchflußzytometrischer Latex-Fluoreszenzimmunassay gegenüber einem Festphasen-Enzymimmunassay als deutlich selektiver in der Erfassung geeigneter Klone. Die ausgewählten zwei monoklonalen Antikörper reagieren mit zwei verschiedenen Epitopen des R-PE und binden in fast gleicher Effektivität ein PE anderen Typs und Ursprungs (B-PE aus Porphyridium cruentum). Die Antikörper sind in einer Dreischrittmethode (monoklonaler Antikörper gegen Zelloberflächenantigen/ anti-Mausimmunglobulin/ PE-anti-PE-Komplex) gut zur Immunfluoreszenzmarkierung von Zellantigenen geeignet. In der Kombination mit nicht-immunologischen Fluoresceinmarkierungen wie z.B. mit FITC-Lektin oder Fluoresceindiazetat sind Doppelmarkierungen leicht realisierbar. Zur Zweifarbimmunfluoreszenz sind die Isotypen der drei beteiligten monoklonalen Antikörper und die Spezifität des anti-Mausimmunglobulin-Antikörpers zu berücksichtigen.
Durch Fusion eines anti-PE-Hybridoms mit einem anti-human-IgM-Hybridom und einer auf FITC- und PE-Fluoreszenz basierenden Zellsortierung wurden Hybridhybridome erzeugt. Sie produzieren bispezifische Hybridantikörper, die zur Fluoreszenzmarkierung von IgM auf humanen Zellen sehr gut geeignet sind. Die Reinigung der bispezifischen Antikörper und ihre Anwendung in Doppelmarkierungen wird demonstriert.

Mehrparametrische durchflußzytometrische Analyse des DNA-Gehaltes strahleninduzierter Mikrokerne in Säugetierzellen

Johannes Kramer und Michael Nüsse

Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
Institut für Biophysikalische Strahlenforschung
Paul Ehrlich Straße 20
6000 Frankfurt a.M. 70

Mikrokerne werden seit einiger Zeit zur qualitativen und quantitativen Analyse von Chromosomenschäden herangezogen. Dabei wird davon ausgegangen, daß Mikrokerne entweder aus azentrischen Chromosomen- und Chromatidfragmenten oder aus ganzen Chromosomen und Chromosomenfragmenten mit Zentromer entstehen.
Durch mehrparametrische durchflußzytometrische Untersuchungen wurde die Größenverteilung von strahleninduzierten Mikrokernen in embryonalen Chinesischen Hamster (CHE) Zellen bestimmt.
Die Chromosomenverteilung wurde ebenfalls durchflußzytometrisch gemessen. Aus dem so gewonnenen Flow Karyotyp wurde ein zu erwartendes Größenspektrum azentrischer Fragmente theoretisch berechnet.
Zum Vergleich und zur Interpretation der gemessenen und berechneten Verteilungen von Mikrokernen und azentrischen Fragmenten wurden Immuno-Fluoreszenz Techniken angewendet: Erkennung der Kinetochorregion in Mikrokernen durch Anti-Kinetochor-Antikörper, Untersuchung der DNA-Synthese in Mikrokernen mit der BrdUrd-Technik.
Die Untersuchungen zeigten, daß der DNA-Gehalt (und damit die Größe) von Mikrokernen im wesentlichen bestimmt wird durch 1) das Chromosomenspektrum der untersuchten Zellen, 2) die Zyklusphase der Zellen bei Bestrahlung, 3) die Zeit, die nach Bestrahlung für DNA-Synthese zur Verfügung steht, 4) den Anteil ganzer Chromosomen und zentrischer Fragmente, die zu Mikrokernen werden.

Identification of a marker chromosome in methotrexate resistant V79 cells by flow karyotyping and sorting, metaphase analysis and in situ hybridization

M. Nüsse[+], S. Viaggi[#], and S. Bonatti[#]

[+]GSF-Institut für Biophysikalische Strahlenforschung, Frankfurt/M, F.R.G.; [#]Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Laboratory of Mutagenesis, Genova, Italy

The chromosomes from a methotrexate resistant and its parental V79,B7 Chinese hamster cell line were analysed by the combined use of flow karyotyping and sorting, metaphase analysis and in situ hybridization with a probe for the dihydrofolate reductase (DHFR) gene responsible for methotrexate resistance. A marker chromosome with an elongated arm carrying the amplified DHFR gene was identified by in situ hybridization of metaphase cells of the methotrexate resistant line. In the flow karyotype the marker chromosome was found as an additional peak with a higher DNA content compared to the largest chromosome of the sensitive line. This was additionally verified by G-banding of chromosomes sorted from the marker peak. Several other chromosomal rearrangements not associated with the amplified gene could be identified in the methotrexate resistant line by the combined use of flow karyotyping and metaphase analysis. About 80% of the cells contained the typical marker chromosome. The fate of this original marker chromosome was studied in cells growing several weeks in the absence of methotrexate comparing flow karyotyping and metaphase analysis. The original marker chromosome was lost in about 50% of the cells after 5 weeks and in about 60% of the cells after 8 weeks. Metaphase analysis however showed that between 80% and 90% of the cells contained marker chromosomes of various, usually smaller sizes. These rearranged marker chromosomes could not be identified by analysis of the flow karyotypes due to the heterogeneous nature of the cell population. In conclusion, it is demonstrated that the power of cytogenetic analysis is improved by the combined use of conventional cytogenetics, molecular cytogenetics and flow cytometry.

Hochauflösende DNA-Flow Cytometrie an pflanzlichem Zellmaterial

ULRICH, Wolfgang; ULRICH, Ingunn & FRITZ, Barbara

Institut für Genetik, Universität Hohenheim, 7000 Stuttgart-70

Flow Cytometrie (FCM) wird in zunehmendem Maße für zytogenetische Untersuchungen an pflanzlichen Zellen eingesetzt [1]. Das Zellmaterial für FCM-Analysen wird entweder über mechanische Aufarbeitung ("chopping") oder über die Isolierung von Protoplasten gewonnen. Die Fluorochromierung von höheren Pflanzenzellen mit DNA-spezifischen Fluorochromen ergab beste Ergebnisse bei der Verwendung AT-Basenpaar-bindender Farbstoffe wie Bisbenzimid oder DAPI [2]. Bei den bisher veröffentlichten DNA-Untersuchungen an pflanzlichen Zellen wurde eine bessere Auflösung der DNA-Verteilungskurven bei Präparation von unfixiertem Zellmaterial erzielt. Fixiertes Material ergab durchweg eine schlechtere Auflösung [1,2], weshalb sich fixierte Zellen für weitergehende Untersuchungen, z.B. für zellkinetische Analysen, häufig als ungeeignet erweisen, da oft CV-Werte >4-5% vorliegen.
Der Einsatz der von F. Otto und Mitarbeitern beschriebenen Präparationsmethode für tierisches bzw. menschliches Zellmaterial [3] erbrachte hochauflösende DNA-FCM-Analysen auch bei Pflanzenzellen mit CV-Werten um 1% und darunter. Durch Behandlung der Zellen mit Zitronensäure/Tween 20 werden Zellkerne isoliert. Ein anschließender Fixationsschritt mit Äthanol:Eisessig erlaubt es, pflanzliches Material für längere Zeit zu konservieren, ohne eine schlechtere Auflösung in Kauf nehmen zu müssen, wie es bei der bisherigen Fixierung der Fall war. Nach erneuter Resuspension der Zellkerne in Zitronensäure/Detergenz und anschließender Zugabe von Phosphat / DAPI wird der pH angehoben und die DNA gefärbt [3]. Diese Präparationsmethode, die neben der hoch-auflösenden DNA-Analyse auch von ausgezeichneter Reproduzierbarkeit ist, ermöglicht es, zelluläre DNA in fixiertem pflanzlichem Zellmaterial gleichermaßen wie bei tierischem Material mit großer Präzision zu ermitteln.

(1) Galbraith, D.W. (1989), Int. Review Cytol. **116**, 165
(2) Ulrich, I.; Fritz, B. & Ulrich, W. (1988), Plant Science **55**, 151
(3) Otto, F.J., Oldiges, H., Göhde, W. & Jain, V.K. (1981), Cytometry **2**, 189

Magnetic separation of chromosome 1 from human lymphocytes

Dino Celeda[1,2], Roland K.A. Schaller[1], Barbara Spieß[2], Michael Hausmann[1], Thomas Cremer[2], Christoph Cremer[1]

[1]= Institute of Applied Physics I, University of Heidelberg, Albert-Überle-Str. 3-5, D-6900 Heidelberg, FRG
[2]= Institute of Human Genetics and Anthropology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 328, D-6900 Heidelberg, FRG

Human lymphocytes were cultivated (72 hrs) and arrested with Colcemid (8 hrs) for chromosome preparation. In situ hybridization was performed with the probe pUC 1.77, which specifically binds to the region 1q12 of chromosome 1 (1), alpha-S-thionucleotides were incorporated by nick translation. The isolated chromosomes were hybridized in suspension without dextransulfate and formamide. This reduced the number of washing steps considerably. For magnetic separation, Dynabeads coated with streptavidin were bound to the hybridized chromosomes. The chromosomes were then separated by means of a permanent magnet (2). Changing the pH of the suspension allowed to hydrolize the thioesterbond between the magnetic particle and the hybridized DNA-probe pUC 1.77. Thus the beads were removed. The amount of DNA of the separated chromosomes as estimated by extinction measurements was sufficient for proteinase K digestion and DNA isolation. The isolated DNA was then used for in situ hybridization to human metaphase chromosomes fixed on slides (visualization by FITC staining)(3).

(1) Cooke et al. (1979); Nucl. Acid Res. 10, 3177-3197
(2) Dudin et al. (1988); Hum. Genet. 80, 111-116
(3) Emmerich et al. (1989); Exp. Cell Res. 181, 126-140

QUANTITATIVE 3D-MIKROSKOPIE

P. Schwarzmann

Inst. für Physikalische Elektronik, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 47, 7000 Stuttgart 80.

Neben der klassischen Mikroskopie im visuellen Bereich bieten neue Werkzeuge der Lichtmikroskopie Möglichkeiten an, Zelleigenschaften bzw. Zellkomponenten quantitativ zu erfassen. Anzuführen sind hier das konfokale Prinzip im Lichtweg und die Einbeziehung von Rechnern zur Auswertung bzw. Bearbeitung von Bildsignalen.
Der Beitrag diskutiert Möglichkeiten durch geeignete Verrechnung der Bildsignale das zu untersuchende Objekt 3-dimensional quantitativ zu modellieren. Dadurch wird es möglich, Zellkomponenten morphologisch und densitometrisch zu vermessen, soweit sie der Lichtmikroskopie zugänglich sind und optische Grundprinzipien beachtet werden.
Für hochtransparente Objekte bieten sich dazu Verfahren der linearen Systemtheorie an. Für stärker absorbierende Objekte müssen nichtlineare Modelle zur Beschreibung des Abbildungsvorganges und der Bestimmung von Objekteigenschaften aus den Bildeigenschaften herangezogen werden.

POSTER
Präsentationen I und II mit Kurzvorträgen

Flow-zytometrische Untersuchung der zytostatischen Effekte von Epirubicin in vitro

D. Bartkowiak*, J. Hemmer#, E.M. Röttinger*

* Abt. Strahlentherapie der Universität Ulm, Postfach 3880, 7900 Ulm
# Abt. Mund-,Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Ulm, Postfach 1220, 7900 Ulm

CHO-Kulturen wurden während der exponentiellen Wachstumsphase mit Epirubicin in Endkonzentrationen von 0.1, 1.0 bzw. 10.0 µg/ml inkubiert. Mit Hilfe der BrdU-Antikörper-Technik und bivariater Flowzytometry wurden die zytokinetischen Veränderungen während und nach der Epirubicin-Behandlung untersucht. Parallel hierzu wurden die Koloniebildung und das Populationswachstum analysiert. Die beobachteten Effekte waren sowohl Dosis- als auch Dosiszeit-abhängig. Mit Hilfe der BrdU-Markierung ließen sich Einflüsse selbst bei minimaler Zytostatika-Konzentration nachweisen.

HEMMUNG DER ZELLPROLIFERATION DURCH METRONIDAZOLE UND POTENZIERUNG DURCH ZUGABE VON BUTHIONINE - SULFOXIMINE (BSO)

Detlef Bittner, Martin Poot und Holger Hoehn

Institut für Humangenetik der Universität, Koellikerstr. 2
Würzburg

Metronidazole, ein Nitroimidazol-Derivat, findet in der Klinik Anwendung als Chemotherapeutikum bei mikrobiellen Infektionen und wird als Sensitizer von hypoxischen Tumorzellen gegenüber Bestrahlung und Chemotherapeutika diskutiert.
Menschliche, EBV-transformierte lymphoide Zellinien wurden mit einer Metronidazole -Konzentrationsreihe (0 bis 10 mM) und 100 µM BrdU bei 5% O_2 kultiviert.
Die Zellaktivierung und die Progression durch 3 Zellzyklen wurde mit Hilfe der Hoechst/Ethdiumbromid Durchflußcytometrie ermittelt. Bei einer Metronidazole-Konzentration von 5mM wurde bei den lymphoiden Zellen eine 15 %ige Hemmung beobachtet, während native T-Lymphozyten des peripheren Blutes eine doppelte Empfindlichkeit bei gleicher Dosis zeigten.
Die Wachstumshemmung durch Metronidazole beruht auf einer verringerten Aktivierung der Zellen (Hemmung des Austritts aus der G_0-Phase); die Progression durch die einzelnen Phasen des 1. Zellzyklus wurde nicht beeinflußt. Insbesondere konnte keine Arretierung der Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus beobachtet werden.
In der Literatur wird diskutiert, daß die Toxizität von Metronidazole abhängig vom Glutathionspiegel der Zelle ist. Die de novo Synthese des Glutathion wird durch BSO gehemmt. In einem eigenen Experiment wurde gezeigt, daß die wachstumshemmende Wirkung von Metronidazole durch Zugabe von BSO (0,1mM, 0,2 mM und 0,5 mM) verstärkt wird. Diese Verstärkung könnte in der Strahlentheraphie von Tumoren klinisch genutzt werden.

A Cisplatin (DDP)-resistant associated reverse transformation from heteroploidy to near-diploidy in a rat ovarian tumor cell line.

G. Chen[1], K.-J. Hutter[2], J. Bullerdiek[3] and W.J. Zeller[1]

1) Institute of Toxicology and Chemotherapy, 2) Project Group Cytometry and Chromosome Sorting, German Cancer Research Center, 6900 Heidelberg; 3) Department of Human Genetic, University of Bremen, 2800 Bremen

A 33-fold DDP resistant ovarian tumor cell line (O-342/DDP) was in vitro developed by continuous exposure of parent cell line (O-342) to a step-size increase of DDP concentrations in culture medium. This resistance development was accompained by a karyotype transformation from heteroploidy in O-342 cells to near-diploidy in O-342/DDP cells as shown by chromosome number histograms. This finding was further confirmed by measuring cellular DNA content using flow-cytometry. Besides, there had also significant difference of chromosomal DNA distribution between two cell lines.
Our results suggest that sensitive O-342 cells consist of at least two subpopulations, namely DDP-sensitive and inherent DDP-resistant fractions, which correspond to heteroploidy and near-diploidy respectively. Continuous DDP-exposure selectively killed the sensitive fraction, leaving behind a residual of DDP-resistant fraction, resulting in a reverse karyotype transformation in O-342/DDP cells.

SIMULTANEOUS ANALYSIS OF TUMOUR ASSOCIATED SURFACE ANTIGENS AND DNA CONTENT OF OVARIAN CARCINOMA CELL LINES.

W.E. Corver, E. C. de Jong, H. H. van Ravenswaay Claasen,
P. I. Schrier, C. J. Cornelisse and G. J. Fleuren.

Dept. of Pathology, State University Leiden, The Netherlands.

W. E. Corver Department of Pathology, P.O. Box 9603,
2300 RC, Leiden, The Netherlands.

Since promising results were obtained with the treatment of cancer patients with interleukin-2 (IL-2) and lymphokine activated killer-cells (LAK-cells), immunotherapy has proven its therapeutic benefit in some malignancies. In vitro experiments have shown the possibility to retarget cytotoxic T-lymphocytes (CTL) to tumour cells with bispecific monoclonal antibodies (MoAbs), which could enhance the efficacy of immunotherapy. A key condition for the success of this approach is the high and cell cycling independent expression of tumour associated surface antigens on the target cells. In this flow cytometric analysis we have studied simultaneously tumour associated surface antigen expression on established ovarian carcinoma cell lines (OVCAR-3, IGROV, COV413B, COV362 and COV644) and nuclear DNA-content as cell cycle parameter. Tumour cells were indirectly labeled with a panel of MoAbs (MOV18, OC125, OV632 and OVTL3) and a Goat-anti-Mouse IgG-FITC was applied as a second step. Simultaneous permeabilization and fixation was performed with 10 µg/ml lysolecithin, dissolved in buffered 1.0% paraformaldehyde according to Dent et al. with sligth modifications. After RNAse treatment cells were stained for DNA with propidium iodide (PI). FITC and PI fluorescence were measured on a FACScan flow cytometer in list mode. All cell lines showed a modest to strong staining with the MoAbs OVTL3 and MOV18, except for COV413B and OVCAR-3 which were weakly positive for MOV18 and COV362 which was negative for MOV18. OVCAR-3 was the only cell line recognized by OV632. Furthermore, COV644 and OVCAR-3 showed a positive fluorescence with OC125. IGROV, COV362 and COV413B were negative for the OC125 MoAb. S-phase fractions ranged from 25-35%. After extensive analysis using FACScan, Consort 30 and Paint a Gate software, no clear relation between cell cycle and antigen expression could be detected. The antigen expression showed the same intensity range for cells in the G_0/G_1, S and G_2/M-phase of the cell cycle. This finding suggests, that the susceptibility of these cells for CTL in combination with bispecific MoAbs is equal and cell cycle independent in vitro. This study is now extended with synchronisation experiments in order to support the present data.

ANALYSIS, A PROGRAM FOR ANALYZING MULTI-PARAMETER FLOW CYTOMETER DATA

R.M.P. Doornbos*, T.C. Bakker Schut, B.G. de Grooth and J. Greve.

Cell Characterization Group, Department of Applied Physics, Twente University of Technology, Enschede, The Netherlands.

In our group the flow cytometer is an important research tool, because it can measure scatter and fluorescence signals necessary for correct cell characterization. The program we present in this poster gives the user a powerful tool especially developed for this purpose.

ANALYSIS runs on a standard XT/AT equipped with a EGA color screen, a mouse and a Hewlett Packard Paint Jet printer.

The program is designed for 8 parameters and each parameter can contain specific information for each cell, for instance signal peak height of 0.5 to 3 degrees light scatter, or the integrated signal from FITC fluorescence. The data is in listmode and contains 12 bit information in 8 parameters of 16,384 cells.

The data can be presented in two parameter dot plots and histograms. Selection of cells can be done by defining windows in the dot plots and it is possible to use 15 windows per cell type. Totally 8 cell types can be defined giving all types a different color. Of these defined cell types percentages and coëfficiënts of variation (CV) can be calculated. The defined windows can be saved and used for every other sample (in future an automated analysis may be possible).

Software amplification (16 times without loss of accuracy) of a measured parameter is possible, so that the maximum of information is obtained.

For presentations of experiments a special part is developed so that a hardcopy or overhead sheets in color can be made very easily.

Durchflußzytophotometrische Untersuchungen zur Wirkweise von Salinomycin-Natriumsalz auf *Eimeria tenella* Sporozoiten

K. Ehrlich, J. Hofmann, W. Raether, B. Bräu

Hoechst AG
Postfach 800320
6230 Frankfurt 80
Tel. 069/305-2761

Coccidien sind tiermedizinisch relevante Protozoen, welche in der Massentierhaltung erhebliche wirtschaftliche Schäden durch Coccidiose verursachen können. Bisher wird die Wirksamkeit coccidiozider Stoffe an Versuchstieren geprüft.
Für das hier vorgestellte in vitro Testverfahren wurden isolierte Sporozoiten, infektiöse Stadien von Coccidien, eingesetzt. Die durch Salinomycin-Natriumsalz (Sal) hervorgerufenen Veränderungen an *Eimeria tenella* Sporozoiten wurden mit einem Ortho Cytofluorograf 50H (Argon-Laser 488 nm, 250 mW) analysiert.
Form und Größe der aus Oocysten gewonnenen Sporozoiten wurden im Vorwärts- und 90°-Streulicht erfaßt. Die Membranintegrität der Zellen wurde durch Vitalfärbung mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumjodid (PJ) untersucht. Für die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes wurde Seminaphthorhodafluor-1 (SNARF-1) eingesetzt.
Unbehandelte Sporozoiten waren morphologisch einheitlich. Nach zehnminütiger Behandlung mit 100 µg/ml Sal traten zwei verschiededene Populationen auf. Die Zellen der einen Population wiesen einen gegenüber unbehandelten Zellen erhöhten intrazellulären pH-Wert auf. Zellen der zweiten Population waren verkleinert und zeigten einen Verlust der Membranintegrität.
Bei längerer Einwirkzeit von Sal nahm der Anteil an Zellen mit Membranschädigung zu.
Die durchflußzytophotometrische Bestimmung von Zellmorphologie, Membranintegrität und intrazellulärem pH-Wert ermöglicht einen raschen Nachweis coccidiozider Effekte und eignet sich daher für das Auffinden neuer gegen Coccidien wirksamer Verbindungen.

Flow-zytometrische Analyse von durch G-CSF induzierten neutrophilen Granulozyten in Patienten mit connataler Neutropenie (Kostmann-Syndrom).

A. Emmendörffer[1], J. Elsner[1], M.-L.-Lohmann-Matthes[1], K. Welte[2] und J. Roesler[2].

[1] Abteilung Immunbiologie, Fraunhofer Institut Hannover, Nikolai- Fuchs Str. 1, 3000 Hannover 61
[2] Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover,

Neutrophile Granulozyten von Patienten mit schwerer connataler Neutropenie wurden flow-zytometrisch untersucht, nachdem diese Zellen *in vivo* durch Therapie mit rec. G-CSF induziert worden waren. Unter Verwendung des FACScan™ wurden folgende funktionelle und phänotypische Charakteristika ermittelt: 1. die Produktion von Sauerstoffradikalen (ROI) mit Hilfe des Dihydrorhodamin 123, 2. die Expression von CD 16- und CD 14-Antigenen, fMLP-Rezeptoren, C5a Rezeptoren und von Fc Rezeptoren. Nachdem parallel durchgeführte *in vitro* Tests eine normale Phagozytose und eine eingeschränkte, fMLP gerichtete Migration unter Softagar ergeben hatten, zeigte die flow-zytometrische Untersuchung, daß die Produktion von ROI nicht eingeschränkt war. Auffällig war eine bei allen untersuchten Patienten zu beobachtende Erhöhung der FcγRI-Expression. Häufig ließ sich auch eine Expression des CD 14-Antigens feststellen, welches auf aktivierten Granulozyten nachweisbar sein kann. Bei normaler Expression von fMLP-Rezeptoren, von CR1 und CR3 war die Bindung von FITC-markiertem C5a i.d.R. vermindert. Der klinische Verlauf der Patienten zeigt, daß die Granulozyten auch *in vivo* funktionell intakt sind, wobei der z.T. einem aktivierten Granulozyten entsprechende Phänotyp Bedeutung bei der Beurteilung von klinischen Nebenwirkungen der Therapie haben könnte.

Subtyping of PBMC in patients with renal cell cancer treated with different dosages of ifosfamide*

Golbach,G., Voigt,P., Dreuw,K., Klein,H.O.

Medizinische Klinik I der Universität zu Köln, FRG
5000 Kön 41 , FRG

The aim of our study was to evaluate the influence of ifosfamide on lymphocytes and monocytes in the peripheral blood. Oxazaphosphorines are said to modulate by low dosages immune reactions in animal and men.
11 patients with advanced renal cell cancer were in a phase I/II study i.v. treated with 50 mg, 100 mg and 200 mg/m²/d on day 1-3. Subtyping of PBMC by monoclonal antibodies and flow cytometry was performed before, during and several times after treatment.
With respect to PBMC, pan-T, Nk, T-Helper and B cells, as well as monocytes and the Helper/suppressor quotient already with a low dose of 50 mg/m²/d (day 1-3) of ifosfamide in 3 out of 4 a marked modulation and increase in all subpopulations and nearly normalisation of the H/S quotient was observed. The maximum effect was between the 3rd and 4th day.
With a dose of ifosfamide of 200 mg/m²/d (day 1-3) only cytotoxic suppressor cells (Leu 2+15+) showed in all 3 patients a marked increase, whereas the other subpopulations stayed in the range of th initial values.
With a low dose of ifosfamide modulations and stimulation of PBMC is marked. But due to the individual variations more patients for each dose level are necessary.

* supported by Deutsche Krebshilfe

EXPRESSION OF NATURAL KILLER CELL ANTIGENS ON HUMAN LUNG CANCER CELL LINES

J. Heymanns, M. Rotsch, C. Hennig, M. Maasberg, H. Heidtmann, K. Havemann

Dept. of Internal Medicine, Div. of Hematology, Oncology, Immunology
Philipps-University, D-3550 Marburg

Small-cell lung cancer (SCLC) has been classified as a neuroendocrine neoplasm due to its expression of neuroendocrine markers such as dopa-decarboxylase and neuron specific enolase. In addition antigenic characteristics link SCLC with other neuroendocrine tumors. Non-small-cell lung cancers (NSCLC) generally lack all these properties. Recently, the presence of the neural cell adhesion molecule (N-CAM), which occurs in normal nervous tissue as well as in other neuroendocrine tumors has been demonstrated in SCLC cell lines also (Aletsee-Ufrecht et al., FEBS Letters, in press). Since an identity of the 140 kDa isoform of N-CAM with the leucocyte differentiation antigen CD56 (NKH-1) expressed on virtually all NK-cells has been shown (L.L.Lanier et al., J.Exp.Med.169, 2233, 1989), we analysed the expression of several natural killer cell antigens on established human lung cancer cell lines (7 SCLC classic type, 3 SCLC variant type, and 7 NSCLC). Cells were incubated with FITC- or PE-conjugated CD56 (Leu-19), CD57 (Leu-7), CD16 (Leu-11c) and CD11b (Leu-15) and analysed by flow cytometry.
All SCLC cell lines but one with atypical growth properties showed an intense staining with CD56. The expression of the HNK-1 antigen (detected by CD57) which is a carbohydrate epitope on N-CAM varies considerably with two SCLC variant cell lines being negative. CD16 (FcIII-Receptor) was weakly positive in almost all SCLC and CD11b always negative. One NSCLC cell line with a proven expression of N-CAM was CD56 positive.
Thus SCLC in contrast to NSCLC reveal an expression of antigens typical for NK-cells. Differences in the staining pattern may indicate transitions between subtypes of lung cancer. The phenomenon of common antigens in lung cancer and NK-cells might be involved in cancer growth or metastasis.

Einsatz der Fluoreszenzserologie und der Durchflußzytometrie zum Nachweis von Infektionskeimen bei biotechnologischen Prozessen

Karl-Josef Hutter und Michael Stöhr

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Institut für angewandte Immunologie
Im Neuenheimer Feld 280
6900 Heidelberg 1

In der technischen Mikrobiologie werden Mikroorganismen eingesetzt, um chemische oder biologische Substanzen abzubauen, bzw. erwünschte Stoffwechselendprodukte (z.B. Alkohole) zu produzieren. Zur Bierherstellung verwendet man aus diesem Grunde Hefereinzuchtkulturen der Gattung Saccharomyces (S. cerevisiae var. Hansen/obergärige Bierhefe; S. uvarum var. Beijerinck/untergärige Bierhefe). Kontaminationen durch Mikroorganismen, die nicht dieser Spezies angehören und andere Stoffwechselendprodukte (höhere Alkohole, Essigsäure, Milchsäure) produzieren oder Trübungen, bzw. Geschmacksveränderungen im Endprodukt hervorrufen, müssen in einem möglichst frühen Stadium der Fertigung erkannt werden.

Bei der konventionellen Betriebskontrolle geschieht dies mit Hilfe der Membranfiltration und anschließender Bebrütung der Keime auf Selektionsnährböden. Die Auswertung erfolgt nach 3-7 Tagen.

Zur Optimierung der zeit- und arbeitsintensiven Auswertung wird ein Schnellnachweis vorgestellt, um mit Hilfe der Immunofluoreszenztechnik und der Durchflußzytometrie Infektionskeime zu detektieren.

Es wurden gegen verschiedene Reinkulturen von "Fremdkeimen"in Kaninchen Antikörper entwickelt und mit FITC-labelled sheep-anti-rabbit Globulin gekoppelt. Die Fluoreszenzlichtsignale wurden mono- (FITC) und biparametrig- (FITC - TRITC) analysiert.

T-CELL RECEPTOR/CD3-SIGNALLING INDUCES DEATH BY APOPTOSIS IN HUMAN T-CELL RECEPTOR γδ-POSITIVE T-CELLS.

OTTMAR JANSSEN, BRIGITTE HECKL-ÖSTREICHER, AND DIETER KABELITZ

Institute of Immunology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 305, D-6900 Heidelberg

Monoclonal antibodies (mAb) directed against the TCR/CD3 complex activate resting T cells. However, TCR/CD3 signalling induces death by apoptosis in immature ($CD4^+CD8^+$) murine thymocytes and certain transformed leukemic T cell lines. Here we show that anti-TCR and anti-CD3 mAb induce growth arrest of cloned $TCR\gamma\delta^+$ T cells in the *presence* of IL-2. In the *absence* of exogenous IL-2, however, the very same anti-TCR/CD3 mAb stimulated $\gamma\delta^+$ clones to proliferation and IL-2 production. In the presence of exogenous IL-2, anti-TCR/CD3 mAb induced the degradation of DNA into oligosomal bands of approximately 200 bp length in cloned $\gamma\delta^+$ T cells. This pattern of DNA fragmentation is characteristic for the programmed cell death termed apoptosis. These results demonstrate that TCR/CD3 signalling can induce cell death in cloned $\gamma\delta^+$ T cells. In addition, this report is the first to show that apoptosis triggered by TCR/CD3 signalling is not restricted to $CD4^+CD8^+$ immature thymocytes and transformed leukemic T cell lines but can be also observed with IL-2 dependent normal (i.e. $TCR\gamma\delta^+$) T cells.

INDUZIERT BLEOMYCIN EINEN "ADAPTIVE RESPONSE" IN MENSCHLICHEN BLUTLYMPHOZYTEN?

Kaiser, G.M., Friedl, R., Köhler, J., Poot, M., Seyschab, H., *Greinert, R., Hoehn, H.

Institute für Humangenetik und *Medizinische Strahlenkunde der Universität Würzburg, Koellikerstraße 2, 87 Würzburg

Unter "adaptive response" versteht man die meßbare Verminderung der Zytotoxizität eines Agens, wenn Zellen vor der eigentlichen Schädigungs-Dosis (challenge dose) bereits gegenüber einer sehr niedrigen Dosis des gleichen Agens (adaptive dose) exponiert wurden. Dieses Phänomen wurde für Röntgenstrahlen und Radioisotope (1-4), aber auch für das sogenannte Radiomimetikum Bleomycin (5) berichtet. Als Erklärung für den adaptive response wird die Induktion von Reparatursystemen durch die niedrig dosierte Vorbehandlung postuliert. - Nach eigenen Untersuchungen zeigt Bleomycin in seiner Wirkung auf Säugerzellen erhebliche Unterschiede gegenüber ionisierenden Strahlen; es wurde daher geprüft, ob derartige Unterschiede auch im Bezug auf die Auslösung eines adaptive response bestehen. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden mit PHA stimuliert und in der Gegenwart von 1.6 x 10^{-4} U/ml Bleomycin und 10^{-4}M Bromodeoxyuridin kultiviert. Nach 48 Std wurde die challenge dose von 2.3 x 10^{-3} U/ml Bleomycin appliziert. Die Kulturen wurden nach 72 Std geerntet und ihre Zellzyklusverteilung im ICP 22 nach Doppelfärbung mit Hoechst 33258 und Ethidium Bromid vermessen. Die erhaltenen Zytogramme zeigten bereits eine signifikante Inhibition der Zellproliferation durch die adaptive dose. Nach Anwendung der challenge dose kam es zu einer starken Arretierung der Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus, sowie zu einer weiteren Verminderung des G0-Phasen Austritts. Die proliferationshemmende Wirkung der challenge dose wurde durch die vorhergehende adaptive dose nicht beeinflußt. Somit ergibt sich in diesem sehr sensitiven System kein Hinweis auf die Induktion eines adaptive response durch Bleomycin.

(1) Olivieri et al: Science 223, 594, 1984
(2) Shadley and Wolff: Mutagenesis 2/2, 95, 1987
(3) Sankaranarayanan et al: Mutat Res 211, 7, 1989
(4) Wienke et al: Mutagenesis 1/5, 375, 1986
(5) Vijayalaxmi and Burkart: Mutat Res 211, 1, 1989

TITEL

SELECTION OF HYBRID HYBRIDOMAS BY A FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING

AUTOREN

L. KARAWAJEW, O. BEHRSING, S. RUDCHENKO[+] AND B. MICHEEL

INSTITUT, ANSCHRIFT

Central Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of The GDR, 1115 Berlin-Buch, DDR

[+]Institute of Experimental Cardiology, 121552 Moscow, USSR

TEXT

Selection procedure for hybrid hybridomas producing bispecific monoclonal antibodies (biMAbs) usually requires a time-consuming production of parental cell lines sensitive to a selection medium. We have developed a simple and effective method of hybrid hybridomas isolation which obviates the need for mutant phenotypes by labelling parental hybridoma cells with fluorescent markers, fluorescein isothiocyanate (FITC) and tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC), before fusion and sorting of heterofluorescent cells with a fluorescence activated cell sorter after fusion. Using this technique we were able to obtain a number of hybrid hybridomas stably secreting biMAbs.

In order to increase the efficiency of hybrid hybridoma selection the method was extended by a second cell sorting step. The heterofluorescent cells recovered after fusion were allowed to proliferate for several days in culture. Thereafter, the cells were stained with the DNA-specific dye bis-benzimidazole Hoechst 33342 and sorted on the basis of their DNA content. The staining conditions (10 µg/ml of Hoechst 33342, 90 min incubation time at 37°C) were found to be optimal representing a compromise between cell growth properties and DNA staining quality.

REAKTIONEN ZELLULÄRER IMMUNPARAMETER AUF PHYSISCHEN UND PSYCHISCHEN STRESS

Kaufmann, D.[1], Teller, S.[1], Heymann, J.[2], Voigt, K.[1]

1. Institut für Normale und Pathologische Physiologie der Philipps-Universität Marburg
2. Zentrum Innere Medizin, Abt. Hämatologie, Onkologie und Immunologie der Philipps-Universität Marburg

Bei 14 männlichen Probanden (Alter 20 bis 35 Jahre) wurde mit Hilfe eines Fahrradergometers ein physischer Stress induziert. In einem zweiten Versuchsaufbau wurde bei vier Panikpatienten psychischer Stress durch Inhalation von CO_2 für 15', bzw. bis zur Auslösung eines Panikanfalles, erzeugt und mit der Reaktion von vier gesunden Kontrollpatienten verglichen.

Es wurden jeweils drei Blutabnahmen durchgeführt, ein Ruhewert, ein Erschöpfungswert 5' nach Abbruch der Ergometrie bzw. nach Abschluß der CO_2 - Inhalation und ein Erholungswert 55' nach Ergometrieende bzw. 30' nach Ende der Inhalation.

Aus den gewonnenen Blutproben wurde das Differentialblutbild bestimmt, sowie eine durchflußzytometrische Analyse der folgenden Subsets durchgeführt: T-Lymphozyten (CD3), T-Helferzellen (CD4), T-Suppressorzellen (CD8), NK-Zellen (CD57), B-Lymphozyten (HLA-DR) und aktivierte T-Zellen (CD3 und HLA-DR).
Es zeigte sich nach Ergometrie ein deutlicher Anstieg der Leukozyten (von 5.6 auf 8.5 x 10^9 Zellen/1, $p < 0{,}001$) und Lymphozyten (von 1.7 auf 3.1 x 10^9 Zellen/ 1, $p < 0.001$), mit einer absoluten Zunahme aller Subsets bei Erschöpfung, die nicht allein durch Hämokonzentration erklärt werden konnte. Die relative Zellverteilung jedoch veränderte sich deutlich zugunsten der NK-Zellen (von 5.9 auf 12.4%, $p < 0.001$) und der T-Suppressorzellen (von 21.3 auf 25.3%, $p < 0.001$). Die Erholungswerte entsprachen bei nahezu allen Subsets wieder den Ruhewerten. Im Gegensatz dazu fanden sich bei den untersuchten Panikpatienten, weder im Verlauf einer Sitzung, noch im Vergleich mit der Kontrollgruppe, signifikante Unterschiede.

SCHLUßFOLGERUNG: Physischer Stress führt zu einer deutlichen Zunahme der Leukozyten und einer erheblichen Verschiebung der Lymphozytensubsets. Die von uns gewählte Induktion psychischen Stresses führte hingegen zu keiner meßbaren Veränderung.

A METHOD DETECTING EFFECTS OF CYTOKINES ON BONE MARROW ASPIRATES FROM PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA AND MYELODYSPLASTIC SYNDROME.

H.-D. Kleine, P. Radde, U. Wagner, H. Poliwoda and M. Freund

Department of Hematology/Oncology of the Hannover Medical School D-3000 Hannover 61

We have established a method to evaluate the effects of cytokines on the cell-cycle of cells from bone marrow aspirates of patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in short-term suspension cultures. The cells are grown in RPMI 1640 culture medium with 1000 U/ml GM-CSF or Iscove's medium with 2 µg/ml TNFα, and 5-bromodeoxyuridine (BrdU), a halogenated pyrimidine, for 22 hours. Cell samples are repeatedly drawn at 0.5, 2, 4, 6, 8, 10 and 22 h and prepared for flow cytometric cell-cycle-analysis with the BrdU/propidiumiodid-method. Effects on the cell-cycle of different cells as discriminated by light-scatter and doublet-discrimination-gating can be determined. About 60% of AML samples grown in media with GM-CSF show more activated cells (0.5 - 10 h sample) than without. Cell samples grown in media with TNFα are inhibited in proliferation (0.5 - 22 h sample). In addition to cell-cycle-analysis a myeloid surface-marker analysis (CD33, CD34, CD15, CD13, CD38, CD14) is done on peripheral mononuclear cells. Mononuclear cells negative for CD34 seem to be non-responsive to GM-CSF.

Uniform expression of Interleukin 4 receptor on murine lymphocytes

Werner Müller

Institut für Genetik der Universität zu Köln
Weyertal 121
5000 Köln 41

IL4-receptor expression on murine lymphocytes was measured by flow cytometry using biotinylated IL4. All lymphocytes present in thymus, spleen, lymph node and peritoneal cavity express IL4-receptors to the same degree. In bone marrow all B220 positive lymphocytes express IL4-receptors at a level comparable to cells of the other organs analysed while B220 negative cells express fewer IL4-receptors.

DURCHFLUßZYTOMETRISCHE ANALYSE DES ZELLULÄREN THIOLSPIEGELS ALS FUNKTION DER ZELLZYKLUSPHASE.

Martin Poot, Terrance J. Kavanagh*, Hee Chol Kang, Richard P. Haugland**, Peter S. Rabinovitch* und Holger Hoehn.**

Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, 8700 Würzburg, *Department of Pathology University of Washington, Seattle, und **Molecular Probes, Inc., Eugene, U.S.A.

Die herkömmlichen Methoden zur durchflußzytometrischen Darstellung vom zellulären Glutathion sind in ihrer Anwendung begrenzt weil sie meistens eine UV-Anregung benötigen und keine simultane Analyse des DNA- und Thiol-Gehalts erlauben (Rice et al. (1986) Cancer Res. 46, 6105; Poot et al., (1986) Biochim.Biophys.Acta 883, 580). Durch Halogenierung von Methylfluorescein-Diacetat oder Eosin-Diacetat wurden zwei neue Farbstoffe für zelluläres Thiol entwickelt, die optimal mit herkömmlichen Lasern angeregt werden können. In einem Zwei-Laser-System wurde der zelluläre Thiolspiegel als Funktion der Zellzyklusverteilung analysiert. Dabei wurden V-79-Zellen mit Hoechst 33342 und einem der halogenierten Farbstoffe angefärbt. Die Thiolfarbstoffe erreichen maximale Färbeintensität nach 10 Minuten Anfärbung bei 37 °C. Die Fluoreszenzintensität verringert sich nach Vorbehandlung mit Diethylmaleat, aber nicht nach Buthionin-Sulfoximin. Es ist anzunehmen, dass der Thiolfarbstoff sowohl mit Glutathion als auch mit γ-Glutamylcystein und freiem Cystein reagiert. Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus erweisen sich als mehr empfindlich gegenüber Thioldepletion mit Diethylmaleat als Zellen in der G1- und S-Phase. Die neuen Thiolfarbstoffe erlauben die simultane Darstellung des Thiolspiegels als Funktion der Zellzyklusverteilung.

ZELLGRÖSSE UND RNA-GEHALT KORRELIEREN MIT DER ZELLDIFFERENZIERUNG UND DER PROLIFERATIVEN KAPAZITÄT VON RATTENKERATINOZYTEN

Martin Poot, Marthe Rizk-Rabin*, Holger Hoehn und Jana H. Pavlovitch*

Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, 8700 Würzburg und *CNRS UA 583, Hôpital Necker des Enfants Malades, Paris.

Rattenkeratinozyten der Basalschicht wurden in einer Sedimentationskammer in 4 Größeklassen aufgetrennt. Ihr DNA- und RNA-Gehalt wurde nach Färbung mit Acridine-Orange durchflußzytometrisch bestimmt. Dabei ergab sich, daß die kleinsten Zellen in der Ruhephase (G0/G1) waren (kennzeichnend hierfür ist ein 2C DNA- und ein geringer RNA-Gehalt). Zellen mittlerer Größe befanden sich in der G1-, S- oder G2- Phase des Zellzyklus, während die größten Zellen einem G1-Kompartiment mit stark erhöhten RNA-Gehalt zugeordnet werden konnten. Diese Zellen zeigten schon Zeichen eines prädifferen-zierten Zustandes. Parallel wurden die nach Größe getrennten Zellen in Kultur gebracht und während 72-Stunden mit Bromo-desoxyuridin markiert; danach wurden sie mittels bivariater Hoechst/Ethidium-Bromid-Durchflußzytometrie analysiert. Die kleinsten Zellen zeigten einen verzögerten Austritt aus der Ruhephase, während die Zellen mittlerer Größe eine frühe und starke Stimulierung zur Proliferation zeigten. Die größten Zellen (mit gleichzeitig hohen RNA-Gehalt), beantworteten die Serumstimulation mit nur geringem Wachstum. Das Ausmaß an Zellwachstum nach 72-stündiger Kulturdauer zeigte eine Korrelation mit dem Ausmaß an RNA-Synthese zwischen 16 und 24 Stunden nach Serumstimulation. Diese Ergebnisse zeigen, daß frühe RNA-Synthese nach Serumstimulation zusammen mit einer optimalen, initialen Zellgröße die proliferative Kapazität der Keratinozyten bestimmen.

DIE DURCHFLUSSZYTOMETRISCH GEMESSENE DNA-PLOIDIE IST EIN UNABHÄNGIGER PROGNOSTISCHER FAKTOR BEIM PANKREASKARZINOM

R. PORSCHEN, U. REMY, G. BEVERS, S. SCHAUSEIL, F. BORCHARD

Abt. f. Gastroenterologie, Inst. f. Pathologie und Klin. Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Durchflußzytometrische (FCM) Studien des DNA-Gehalts beim Pankreaskarzinom sind bisher nicht durchgeführt worden. Deshalb wurde der Einfluß der DNA-Ploidie und klinisch-pathologischer Parameter auf die Überlebenszeit von 56 Pat. mit einem Adenokarzinom des Pankreas (Alter: 59±10 J., 34 Männer; 22 Frauen) analysiert. Eine Zellkernsuspension wurde mittels Pepsininkubation (0,5%) von entparaffinierten Tumorschnitten hergestellt und mit Propidiumjodid für die FCM angefärbt (Variationskoeffizient: 6,1 ± 1,8%). Im Mittel wurden 1,8 Tumorblöcke (Bereich: 1-5) pro Patient untersucht. Tumoren wurden nach der UICC Einteilung 1987 nachklassifiziert, so daß ein einheitlich definiertes Kollektiv vorlag.

Der DNA-Index reichte von 1,0-2,0. Eine aneuploide DNA-Zellinie war bei 48 % aller Pat. (27/56 Pat.) vorhanden. Die DNA-Aneuploidie war unabhängig vom Geschlecht, der Tumorlokalisation, der Histologie, dem Differenzierungsgrad oder dem Tumorstadium. Eine grenzwertige Assoziation (p=0,08) bestand mit dem OP-Resultat. Die 5-Jahresüberlebensrate aller Pat. lag bei 2% mit einer medianen Überlebenszeit von 6 Monaten (Life-table Analyse). Die Überlebenszeit wurde signifikant durch den Ploidiestatus (diploid: 6,9±0,9 Mo.; aneuploid: 4,5±1,2 Mo.; p<0,02), das Operationsresultat (kurativ: 7,0±1,0 Mo.; nicht-kurativ: 3,8±1,1 Mo.; p<0,009) und das Metastasenstadium beeinflußt (M0: 6,5±0,5 Mo.; M1: 2,9±0,6 Mo.; p<0,03). In einer Cox'schen Regressionsanalyse konnten alleine der Ploidiestatus und das Operationsresultat als unabhängige prognostische Faktoren identifiziert werden.

SCHLUSSFOLGERUNG: Es konnte erstmalig gezeigt werden, daß die durchflußzytometrisch gemessene DNA-Ploidie einen unabhängigen prognostischen Faktor beim Pankreaskarzinom darstellt. Sie sollte deshalb als Variable für eine stratifizierte Patientenrandomisation in Therapiestudien des Pankreaskarzinoms benutzt werden.

DNA-ANEUPLOIDIE BEI COLITIS ULCEROSA UND MORBUS CROHN: ERGEBNISSE EINER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN ANALYSE UND VERGLEICH MIT DER PATHOLOGISCHEN DYSPLASIEKLASSIFIKATION

R. PORSCHEN, A. SCHUMACHER, U. ROBIN, S. SCHAUSEIL, F. BORCHARD

Abt. f. Gastroenterologie, Inst. f. Pathologie und Klin. Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Die biologische Bedeutung der DNA-Aneuploidie zur Früherkennung einer malignen Entartung bei der Colitis ulcerosa (CU) ist noch nicht ausreichend definiert. Wir untersuchten deshalb die Prävalenz der Aneuploidie beim Morbus Crohn (MC) und der CU, da das Risiko, an einem Kolonkarzinom zu erkranken, für diese 2 Krankheitsgruppen unterschiedlich ist.

Die DNA-Ploidie und die Zellzyklusverteilung wurden mittels Durchflußzytometrie (FCM) an 368 endoskopisch gewonnenen Kolonbiopsien von 51 Pat. mit MC (Krankheitsdauer: 0,1-22 Jahre, im Mittel: 7,1 J.), 28 Pat. mit CU (Dauer: 0,1-16 J., im Mittel: 5,4 J.) und 20 Kontrollen (Gesunde u. Pat. mit infektiöser Kolitis) untersucht. Neben Biopsien für die histologische Beurteilung wurde jeweils in unmittelbarer Nachbarschaft eine zweite Biopsie für die FCM entnommen. Die mit einer Detergensmethode (0,6% NP 40) gewonnene Zellkernsuspension wurde mit Propidiumjodid gefärbt. Zellzyklusberechnungen erfolgten mit einem Polynommodell.

Der Variationskoeffizient des G1 Gipfels betrug 4,9 ± 1,1%. Während MC und die Kontrollen nur diploide DNA Histogramme besaßen, wiesen 3 Pat. mit CU eine Aneuploidie auf, die einmal biklonal war (DNA Index: 1,9; 1,8; 1,1+1,2). Bei einem Pat. war sie mit einer niedriggradigen Dysplasie assoziiert. Die CU besaß eine höhere S-Phase (17,8 ± 7,7%) als der MC (13,1 ± 4,6%) und Kontrollen (14,2 ± 4,6%), die aber weder mit der Aktivität noch Erkrankungsdauer der CU oder des MC korrelierte.

SCHLUSSFOLGERUNG: Die DNA Aneuploidie war ausschließlich bei der CU vorhanden und kann auch unabhängig von einer Dysplasie auftreten. In Anbetracht des unterschiedlichen Entartungsrisikos zwischen CU und MC untermauert diese Studie frühere Vermutungen, daß die FCM als zusätzliche Methode dazu beitragen könnte, Patienten mit CU und einem erhöhten Entartungsrisiko frühzeitig zu identifizieren.

MODULATION DER GRANULOZYTENFUNKTION NACH AKTIVIERUNG DURCH TUMOR NEKROSE FAKTOR (TNFα)

G. Röthe[1], W. Kellermann[2], T.A. Raffin[3], G. Valet[1]

[1]Arbeitsgruppe Zellbiochemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried
[2]Institut für Anästhesiologie der Universität München, Klinikum Großhadern, D-8000 München 70
[3]Division of Respiratory Medicine, Department of Medicine, Stanford University Medical Center, Stanford, CA 94305-5236, USA

Die durch Tumor Nekrose Faktor (TNFα) veränderte Stimulierbarkeit neutrophiler Granulozyten ist für den Pathomechanismus des pulmonalen Organversagens (ARDS) bei Sepsis von wesentlicher Bedeutung. Der Nachweis von TNFα (Amer.Rev.Respir.Dis. 141:94;1990) oder einer veränderten Granulozytenfunktion (J.Lab.Clin.Med. 115:52;1990) bei Sepsis korrelieren mit einer hohen Inzidenz des pulmonalen Organversagens. Weiterhin kann der durch TNFα im Tiermodell induzierbare akute Lungenschaden durch eine vorherige Neutrophilen-Depletion verhindert werden (Chest 95:1114;1989). Ziel dieser Untersuchung war es, typische Parametermuster für die *in vitro* Einwirkung von TNFα auf neutrophile Granulozyten zu ermitteln, um *in vitro* Möglichkeiten der Modulation der Granulozytenfunktion nach Aktivierung durch TNFα zu untersuchen.

Die intrazelluläre Produktion von Superoxid-Anion (J.LeukocyteBiol. 47:440; 1990) und Wasserstoffperoxid (Naturwissen. 75:354;1988) sowie der intrazelluläre pH-Wert (Cytometry 9:316;1988) und das Zellvolumen humaner neutrophiler Granulozyten wurden unter Stimulation mit *N*-formyl-Met-Leu-Phe (FMLP) oder Phorbolmyristatacetat (PMA) in Abhängigkeit von 10 min Vorstimulation mit 10 ng/ml TNFα durchflußzytometrisch bestimmt. Der Einfluß von *N*-Acetylcystein (NAC) auf die Stimulierbarkeit neutrophiler Granulozyten wurde nach 20 min Vorinkubation untersucht.

TNFα allein induzierte weder eine signifikante Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, noch eine Veränderung des intrazellulären pH-Wertes oder des Zellvolumens. Die Vorstimulation mit TNFα führte jedoch zu einer 4 - 6 fachen Steigerung der Stoffwechselreaktionen auf eine folgende Stimulation mit einer suboptimalen Konzentrationen von FMLP (10^{-7} M) während die Reaktion auf die maximale, direkte Stimulation der Proteinkinase C mit PMA (150 nM) unbeeinflußt blieb.

NAC führte *in vitro* in Konzentrationen, die die akute pulmonale Toxizität von TNFα inhibieren, zu keiner signifikanten Veränderung der TNFα-Effekte auf Neutrophile, so daß *in vivo* von einem der Neutrophilenaktivierung nachgeschalteten Wirkmechanismus ausgegangen werden muß. Dies läßt es sinnvoll erscheinen, NAC mit Substanzen zu kombinieren die eine direkte Hemmung der Neutrophilenaktivierung bewirken, wie z. B. Pentoxifyllin, Verapamil oder Amilorid.

Gefördert durch DFG SFB 207, Projekt G6.

UNUSUAL MHC II ANTIGEN EXPRESSION ON RESTING PORCINE T LYMPHOCYTES

A. Saalmüller and F. Weiland

Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals,
Paul-Ehrlich-Str. 28, D-7400 Tübingen

The expression of CD4 and CD8 differentiation antigens on resting extrathymic T lymphocytes is unique in swine. In contrast to other species four T-lymphocyte subpopulations can be defined by CD4 and CD8. In addition to the $CD4^-CD8^+$ and $CD4^+CD8^-$ subpopulations, $CD4^-CD8^-$ and $CD4^+CD8^+$ T lymphocytes are prominent in the extrathymic T-lymphocyte population.
Beside these four T-lymphocyte subpopulations, the immune system of swine shows an additional unusual antigen distribution: the distribution of MHC II antigens.
Within mononuclear leucocytes MHC II surface antigens can be detected on B lymphocytes, on monocytes and on a destinct number of T lymphocytes.
These MHC II^+ T lymphocytes characterized as resting T lymphocytes by electron microscopy can be apportioned by three-color flowcytometry either to the $CD4^-CD8^+$ or to the $CD4^+CD8^+$ T-lymphocyte subpopulation. $CD4^-CD8^-$ and $CD4^+CD8^-$ T lymphocytes don't show any MHC II antigen expression.
The comparism of in vitro functions of both fractions, MHC II^+ and MHC II^- T lymphocytes yielded in following data: MHC II^+ T lymphocytes contain the majority of cells with spontaneous cytolytic activity against tumor cells (natural killer cells, NK) and the progenitors of the lymphokine activated killer cells (LAK). MHC II^- T lymphocytes show a higher response after stimulation with mitogens and against alloantigens. The MHC II^+ and as well as the MHC II^- fraction contain precursors of cytolytic T lymphocytes. Analyzed in their effector stage both show MHC II antigen expression.
Nothing is known at the moment about the in vivo function of MHC II^+ resting T lymphocytes but this will be a chapter for further investigations.

DURCHFLUßZYTOMETRISCHE DIAGNOSTIK DER ATAXIA TELEANGIECTASIA (LOUIS-BAR-SYNDROM)

H. Seyschab, D. Schindler, R. Friedl, und H. Hoehn.

Institut für Humangenetik, U Würzburg, F.R.G.

Klassische Ataxia teleangiectasia (AT), ein autosomal rezessiv vererbtes Syndrom, ist klinisch gekennzeichnet u.a. durch progressive cerebellare Ataxie, Dilatation venöser Kapillaren und Immundefizienzen. Charakteristisch sind auch die erhöhte Chromosomeninstabilität, erhöhtes AFP und die Überempfindlichkeit gegenüber ionisierender Bestahlung. (McKinnon PJ. Hum Genet 1987, 75:197). Die erhöhte Strahlensensibilität der Zellen kann als diagnostischer Parameter genutzt werden (Schindler D et al. Lancet 1987, 2(8572):1398). Hierfür werden isolierte Blutlymphozyten vor Stimulierung mit PHA im Bereich von 0.5 bis 4.0 Gy bestrahlt. Die Zellen werden in Gegenwart von BrdU 72h kultiviert und mittels zweidimensionaler BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid Durchflußzytometrie analysiert.

Lymphozyten von AT-Patienten (1.5-31.5 Jahre) zeigen eine altersgemäß stark unterdurchschnittliche Aktivierung durch PHA. Die nicht aktivierte G0/G1-Fraktion beträgt ohne Bestahlung 61.78±14.89% (n=14) gegenüber 32.62±18.43% (n=42) bei einer Kontrollgruppe gleichen Alters. Die aktivierten Zellen durchlaufen durchschnittlich bis zu drei Zellzyklen ohne Zellzyklusblockierung. Nach Bestrahlung mit 1.5 Gy manifestiert sich bei AT-Patienten im Vergleich zu Kontrollen eine massive Blockierung der Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus. Als Vergleichsparameter dient die Ratio aus G2-Phase und proliferierenden Zellen (growth fraction, GF). Die G2/GF-Ratio liegt für AT-Patienten bei 43.45±10.23% (range 26.1-59.9%) gegenüber 8.53±2.98% für Kontrollen (range 2.2-16.2%). Eine Verlängerung der G2-Phase sowie Arretierung der Zellen nach Bestrahlung konnte auch in zellkinetischen Experimenten über 4 Tage nachgewiesen werden. Gegenüber der konventionellen Chromosomenanalyse bietet die durchflußzytometrische Diagnostik den Vorteil der Schnelligkeit und Reproduzierbarkeit. Das für klassische AT charakteristische Zellzyklusverhalten gestattet überdies die Differentialdiagnostik von Patienten aus dem Formenkreis der AT-verwandten Syndrome (e.g. Nijmegen Breakage Syndrom, Seemanova Syndrom).

Absolute numbers in flow cytometry using an adapter for defined sample volumes

Frank Schweppe[1], Michael Hausmann[1], Klaus Hexel[2], Jochen Barths[3], Christoph Cremer[1]

[1]= Institute of Applied Physics I, University of Heidelberg, Albert-Überle-Str. 3-5, D-6900 Heidelberg, FRG
[2]= Institute of Immunology and Genetics, German Cancer Research Centre, Im Neuenheimer Feld 280, D-6900 Heidelberg, FRG
[3]= Coulter Electronics GmbH, Gahlingspfad 53, D-4150 Krefeld, FRG

For many applications in flow cytometry it may be interesting to count cells absolutely (see for instance (1, 2)). A possible solution of this problem is to use standard beads of known concentration as a reference (3) or to apply a COULTER Counter (4). Here, a rather simple device is described, which can be adapted to several flow cytometers especially to the COULTER EPICS V and EPICS VII series. The volume adapter can be installed instead of the viable sample handling system without any further modifications of the instrument or the data acquisition program. Using different flow cytometric parameters to discriminate subpopulations, they can be enumerated separately. The volume adapter consists of a special pipette with two optical detectors to determine the beginning and the end of the measuring volume. By means of a shutter for the laser beam, data acquisition was influenced indirectly (time to switch the laser on/off was less than 0.1 sec). Sample volumes of 20-100µl can be measured (typically 50µl ± 0.5%). The mesurements were performed with a sample concentration of less than 10^6 particles/ml and a flow rate of about 10^3 particles/sec. Calibration beads as well as blood cells were enumerated according to the FALS, 90° scatter, and fluorescence parameter. The results were compared to the evaluation in the COULTER Counter and in the Neubauer chamber of a microscope. The number of particles could be determined with an error of 2-5% using a concentration of $1x\ 10^5$ - $5x\ 10^5$ particles/ml. Together with a high reproducibility the results indicate that absolute numbers of particles can be measured directly in a flow cytometer.

(1) Moody et al. (1995); Cytometry 3, 44-47
(2) Smart et al. (1988); Cytometry 6, 172-174
(3) Stewart and Steinkamp (1981); Cytometry 2, 238-243
(4) Kreuzfelder et al. (1987); J. Immun. Meth. 97, 251-258

Mitoserate, DNS Verteilungsmuster und Chromatin in situ Sensitivität gegenüber Heparin, einem Polyanion, beim Mammakarzinom.

Weiß H[1], Kunde D, Brasching HP[1], Bock A[2], Mauthner F[3], Peek U[1], Rüdiger KD[1], Granetzny A[1]

[1]Akademie der Wissenschaften der DDR, Zentralinstitut für Krebsforschung, Lindenberger Weg 80, Berlin, 1115, DDR
[2]Humboldt-Universität, Charite, Abt. diagnostische Radiologie, Berlin, DDR

[3]St. Joseph Hospital, Berlin, DDR

Das Ziel der Untersuchungen ist durch den Einsatz zellkinetischer Methoden einen Beitrag zur Individualisierung der Therapie beim Mammakarzinom (MCa) zu leisten. Hierzu wurden Messungen zur Erfassung der Proliferationsaktivität DNS aneuploider MCa ausgeführt. Die Mitoserate (MR) wurde morphometrisch gezählt. Durchflußcytometrisch wurden DNS-Verteilungen per se und unter dem Einfluß von Heparin zur Chromatin insitu Testung sowie DNS-Protein 2 Parameterhistogramme gemessen.
Ergebnisse:
Die MR stieg bis zu einer Tumorgröße von 4.2 cm ($p < 0.05$); mit steigender Tumorgröße fiel sie ab (N= 73). Duktale, LN + MCa (T1-T2) weisen höhere MR (LN > 3 : 8.6 ± 1.5; N = 9), Prozentsätze an Zellen in der G_2M Phase (LN+ : 15 ± 1.2; N = 26) und Proteinwerte (LN > 3 : 123 ± 4.8; N = 8) gegenüber ihren LN- Pendants (MR : LN 0-3 : 4.6 ± 0,5; N = 34, G_2M % LN0 : 12 ± 0.5; N = 22, Protein LN 0-3 : 111 ± 3.2; N = 31) auf ($p < 0.05$).
Die Chromatin in situ Sensitivität gegenüber Heparin, nachgewiesen an Hand des Anstieges der Fluoreszensintensität auf Grund einer durch Heparin erzielten gesteigerten Farbstoffbindungskapazität, gestattete die Identifizierung einer hoch "H" und einer schwach "P" sensitiven Untergruppe an MCa (T1 - T2). "H" liegt im Conf. Intervall von normalen und hyperplastischem Mammagewebe. "H" und "P" differieren hinsichtlich der Altersverteilung (4/48 vs. 14/38 Patientinnen jünger als 50 Jahre), des LN Befalls bei duktalen MCa (10/18 vs.23/29) und des G2M % bei lobularen LN - MCa (4 ± 1.1%; N = 4 vs. 10 ± 1.5%; N = 4) ($p < 0.05$).
"P" scheint die aggresiven MCa zu repräsentieren. Für LN-Fälle der "P" Gruppe wird eine adjuvante Therapie empfohlen.

Methodische Probleme bei der Bestimmung von Wachstumsfraktionen in Tumorzellkulturen *in vitro*

F. Zölzer, T. Pelzer und C. Streffer

Institut für Medizinische Strahlenbiologie der Universität - Gesamthochschule - Essen, Hufelandstraße 55, 4300 Essen

Als Maß für die Wachstumsfraktion in Tumorzellkulturen (menschliche Melanomzellen MeWo) wurde zunächst der Anteil der Zellen in der S-Phase nach unterschiedlichen Analyseverfahren bestimmt. Die Kulturen wurden für 0.5h mit BrdUrd markiert, dann fixiert, mit Maus-anti-BrdUrd and Schaf-anti-Maus-FITC-Konjugat markiert und schließlich mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Messung erfolgte in einem FACScan Durchflußzytometer (Beckton Dickinson), die Auswertung wurde mit der vom Hersteller gelieferten Software bewerkstelligt. Es standen 3 Verfahren zur Analyse von DNA-Histogrammen zur Verfügung, die auf zum Teil drastisch unterschiedliche S-Phase-Anteile führten. Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse einschätzen zu können, wurde mit Werten verglichen, die auf dem Wege der 2-Parameter-Analyse gewonnen worden waren. Dabei wiederum ergab sich die Frage, ob die Grenze zwischen BrdUrd-positiven und -negativen Zellen knapp oberhalb der sicher nicht-markierten G_1- und G_2-Phase-Zellen oder knapp unterhalb der sichere markierten S-Phase-Zellen gezogen werden sollte. Die letztere Methode lieferte Ergebnisse in Übereinstimmung mit einem Analyse-Verfahren für DNA-Histogramme, das die S-Phase durch 3 - 8 verbreiterte Rechtecke unterschiedlicher Höhe approximiert. Diese interne Konsistenz sowie die Übereinstimmung mit den Ergebnissen fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen werden als Hinweis auf die Zuverlässigkeit der beschriebenen Methoden gewertet.

Die direkte Bestimmung der Wachstumsfraktion mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen proliferierende Zellen (Ki67) war bisher nur fluoreszenzmikroskopisch vorgenommen worden. Entsprechende durchflußzytometrische Messungen bereiteten zunächst Schwierigkeiten. Es stellte sich heraus, daß die übliche Aufarbeitung der Kulturen mit Trypsin zur Zellvereinzelung und Pepsin zur Kernisolierung die Ki67-Markierung behindert. Diese Probleme wurden durch Abschaben des Zellrasens in Kulturmedium und Messung ganzer Zellen umgangen. Eine weitere Voraussetzung für erfolgreiche Markierung ist das Einfrieren der fixierten Zellen bei -20°, das vermutlich die Durchlässigkeit der Membranen für Antikörper erhöht.

Seitenverzeichnis

V = Vortrag
P = Posterpräsentation

Autor/Seite		
Albrecht R	26	V
Bakker Schut TC	47	P
Barths J	66	P
Bartkowiak D	21	V
-	24	V
-	43	P
Bauer K	31	V
Bauer R	12	V
-	29	V
Behrsing O	55	P
Beier HJ	2o	V
Bevers G	22	V
-	61	P
Bittner D	44	P
Bock A	67	P
Boeck G	33	V
Boehm I	12	V
-	29	V
Bonatti S	37	V
Borchard F	22	V
-	61	P
-	62	P
Bräu B	48	P
Brasching HP	67	P
Brueckmann A	3o	V
Bullerdiek J	45	P
Burrows P	32	V
Caffier H	2o	V
Celeda D	39	V
Chen G	45	P
Clasen B	16	V
Cooper M	32	V
Cornelisse CJ	46	P
Corver WE	46	P
Cremer Ch	36	V
-	66	P
Cremer Th	36	V
de Grooth GB	13	V
-	34	V
-	47	P
de Jong EC	46	P
Diehl V	14	V
Doornbos RMP	47	P
Drach J	25	V
Dreuw K	27	V
-	5o	P

Autor/Seite		
Ehrlich K	48	P
Elsner J	49	P
Emmendörfer A	49	P
Estermann F	23	V
Feichter G	26	V
Fiebig H	35	V
Fleuren GJ	46	P
Foerster I	11	V
Freund M	57	P
Friedl R	54	P
-	65	P
Fritz B	36	V
Ganzmann B	19	V
Garritsen HSP	13	V
-	34	V
Gattringer C	25	V
Golbach G	27	V
-	5o	P
Goller B	31	V
Granetzny A	67	P
Greinert R	54	P
Greve J	13, 34	V
-	47	P
Gudat F	26	V
Haugland RP	59	P
Hausmann M	36	V
-	66	P
Havemann K	51	P
Heckl-Östreicher B	53	P
Heidtmann H	51	P
Hemmer J	21, 43	P
Hennig C	51	P
Hexel K	66	P
Heymann J	56	P
Heymann J	51	P
Hiddemann W	13	V
Hinrichs G	8	V
Hirt W	18	V
Hoehn P	44	P
-	54	P
-	59	P
-	6o	P
-	65	P

V = Vortrag
P = Posterpräsentation

Autor/Seite		
Hofmann J	48	P
Huber H	25	V
Huber LA	33	V
Huhn D	9	V
Hutter K-J	45	P
-	52	P
Jacobs R	8	V
Janssen O	1o	V
-	53	P
Jocham D	19	V
Juergens G	33	V
Kabelitz D	1o	V
-	53	P
Kaesemann H	2o	V
Kaffenberger W	16	V
Kaiser GM	54	P
Kang HCH	59	P
Karawajew L	55	P
Kaufhold E	13	V
Kaufmann D	56	P
Kavanagh TJ	59	P
Kellermann W	63	P
Kemper A	8	V
Klein HO	27	V
-	5o	P
Klein S	14	V
Kleine H-D	57	P
Köhler J	54	P
Kramer J	36	V
Kraus H	3o	V
Kreidler J	21	V
Kristen P	2o	V
Kubbies M	31	V
Kunde D	67	P
Ladusch M	35	V
Leo R	7	V
-	8	V
Liebrecht C	16	V
Liedl Th	19	V
Lohmann-Matthes ML	49	P
Maasberg M	51	P
Mauthner F	67	P

Autor/Seite		
Micheel B	55	P
Michels M	14	V
Moldenhauer G	1o	V
Müller W	58	P
Neumüller J	15	V
Niedecken HW	12	V
-	29	V
Nüsse M	36	V
-	37	V
Otto FG	24	V
Pavlovitch JH	6o	P
Peek U	67	P
Pelzer P	13	V
Pelzer T	68	P
Poliwoda H	57	P
Poot M	44	P
-	54	P
-	59	P
-	6o	P
Porschen R	22	V
-	61	P
-	62	P
Prosinger M	19	V
Rabinovitch PS	59	P
Radbruch A	32	V
Radde P	57	P
Radosevic K	34	V
Raether W	48	P
Raffin TA	63	P
Rajewski K	11	V
-	17	V
Recktenwald D	5	V
Reddehase MJ	14	V
Rempen A	2o	V
Remy U	22	V
-	61	P
Rizk-Rabin M	6o	P
Robin U	62	P
Roesler J	49	P
Röttinger EM	43	P
Rothe G	63	P

V = Vortrag
P = Posterpräsentation

Autor/Seite		
Rotsch M	51	P
Rudschenko S	55	P
Rüdiger KD	67	P
Saalmüller A	18	V
-	64	P
Säuberlich S	9	V
Sauter G	26	V
Schaller RKA	36	V
Schauseil S	22	V
-	61	P
-	62	P
Schindler D	65	P
Schittek B	17	V
Schmidt RE	8	V
Schmitt M	11	V
Schoenitzer D	33	V
Schrier PI	46	P
Schubert J	7	V
Schumacher A	62	P
Schumann J	24	V
Schwarzmann P	4o	V
Schweppe F	66	P
Seidel B	35	V
Seidler E	28	V
Serke St	9	V
Severin E	28	V
Seyschab H	54	P
-	65	P
Spiess B	36	V
Stöhr M	52	P
Stoll M	8	V
Streffer C	23	V
-	68	P
Teller S	56	P
Tesch H	14	V
Thein T	21	V
Uciechowski P	7	V
-	8	V
Ulrich I	38	V
Ulrich W	38	V
Valet G	63	P
van Beuningen D	16	V
van Graft M	34	V

Autor/Seite		
van Ravenswaay Claasen HH	46	P
Viaggi S	37	V
Voight K	56	P
Voight P	27 V, 5o	P
Voliotis D	27	V
Wagner U	57	P
Weiland F	64	P
Weiss H	67	P
Welte K	49	P
Wick G	33	V
Woermann B	13	V
Zeller WJ	45	P
Zoelzer F	23	V
-	68	P